



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del efecto de la estimulación con campos eléctricos sobre condrocitos cultivados en monocapa

Juan Jairo Vaca González

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia, Marzo 2014

Evaluación del efecto de la estimulación con campos eléctricos sobre condrocitos cultivados en monocapa

Juan Jairo Vaca González

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Biomédica

Director:

Diego Alexander Garzón Alvarado, Ph.D.

Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica

Co-Director:

José Félix Vega Stavro, Ph.D.

Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica

Línea de Investigación:

Ingeniería de tejidos

Grupo de Investigación:

Grupo de Modelado Matemático y Métodos Numéricos GNUM

Grupo de Mecanobiología de Tejidos y Órganos

Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia, Mazo 2014

Dedico este logro,

A mi madre, quien siempre me ha dado su confianza, apoyo y ejemplo. Hiciste que la investigación y la academia me convirtieran en una persona intelectual, responsable, solidaria y comprometida con la sociedad.

A Claudia y Diana, quienes siempre han sido el ejemplo a seguir. Gracias a ustedes aprendí que los conocimientos adquiridos deben ser aplicados con sentido humano.

A Harold y Andrés, quienes siempre aportan su conocimiento ingenieril para afrontar los obstáculos de la vida. Ustedes son el ejemplo de la disciplina que se debe tener para lograr un objetivo.

A Carlos Caicedo, quien siempre optó por la mejor alternativa y nunca erró. Si ayer era Ingeniero en Automatización hoy soy Magister en Ingeniería Biomédica. Por eso espero tu consejo para que me digas que ser mañana.

Juan Vaca

Agradecimientos

Este proyecto es el resultado de todo un proceso que conlleva crecimiento personal y profesional. Por lo tanto, quiero agradecer a todas las personas que de forma directa o indirecta aportaron su conocimiento para que este trabajo fuera culminado con éxito.

A mi director Diego Alexander Garzón Alvarado, PhD., quien dedicó gran parte de su tiempo y conocimiento, no solo para el desarrollo de este trabajo sino también para fortalecer mi crecimiento personal e investigativo.

A mi co-director el profesor José Félix Vega Stavro, PhD., quien puso a disposición gran parte de su tiempo y además aportó todo su conocimiento para la culminación exitosa de esta investigación.

A mi compañera y amiga Johana Guevara “Juanita”, quien con su intelecto, responsabilidad y solidaridad no solo hizo posible la realización de este proyecto sino que también influenció en mi gusto por la Biología. Gracias a ti aprendí que la vida es como un diseño experimental. Primero hay que identificar todas las variables de interés para asegurarse de que la información que se está obteniendo, y que se mostrará en la investigación, es fiable. Además, sin importar cuántas veces haya que repetir el experimento, siempre hay que hacerlo con disciplina. De esto depende el éxito en la vida.

A la profesora María Lucía Gutiérrez Gómez, PhD., quien puso a disposición su tiempo y conocimiento para crear un ambiente interdisciplinar, en el cual la Biología junto con la Ingeniería generaran conocimiento.

A las profesoras Carmen Alicia Cardozo de Martínez y Carmen Afife Mrad De Osorio, quienes pusieron a disposición tiempo y conocimiento para realizar todos los procedimientos experimentales el laboratorio de Biomiméticos (IBUN).

A sí mismo, quiero agradecer a todos a todos mis amigos, Cristhian, Andrés, Miguel, Yaneth, Rosy, Aleja, Hector, Kalenia, Karol, Jhon, Andrea, a todos!!! Quienes durante todo este tiempo me aportaron sus ideas y conocimiento.

Resumen

Los campos eléctricos han sido una herramienta utilizada por la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa para recuperar el cartílago articular. Varios procedimientos *in vitro* se han llevado a cabo y han evidenciado el incremento en la proliferación celular y síntesis de las principales moléculas que componen la matriz extracelular del cartílago articular, tales como los glicosaminoglicanos. Aunque se han reportado varios trabajos sobre el efecto de los campos eléctricos en condrocitos, no hay similitud en los datos obtenidos. Esto se debe a que hay un gran rango tanto de campos eléctricos como de tiempos de estimulación para obtener la mejor tasa de proliferación celular y síntesis molecular. Además, no se ha implementado un esquema que genere y distribuya el campo eléctrico sobre toda la superficie de cultivo celular. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo estudiar tanto experimental como computacionalmente la dinámica celular de condrocitos cultivados en monocapa en ausencia y presencia de campos eléctricos. Los resultados obtenidos al analizar la dinámica celular de los condrocitos en ausencia de campos eléctricos indican que un modelo computacional, como lo es un autómatas celular, predice de manera eficaz el comportamiento de condrocitos cultivados en monocapa: Migración, proliferación y muerte celular. Los resultados computacionales concuerdan con los datos experimentales y proveen información adicional para mejorar y optimizar los procedimientos *in vitro*. Por otro lado, al aplicar campos eléctricos a los cultivos celulares los resultados indican que tanto la intensidad del campo eléctrico como el tiempo de estimulación por día son variables que deben ser combinadas para duplicar la población del cultivo celular o estimular la síntesis de glicosaminoglicanos. Adicionalmente, los dispositivos implementados en ésta investigación permiten calcular, generar y distribuir el campo eléctrico sobre toda la superficie del cultivo celular. En conclusión, tanto los modelos computacionales validados experimentalmente como el uso de campos eléctricos, para aumentar la población celular o estimular la síntesis de glicosaminoglicanos, permiten mejorar y optimizar los tratamientos llevados a cabo por la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa para regenerar el cartílago articular lesionado.

Palabras clave: Campo eléctrico, cartílago articular, condrocito, glicosaminoglicano, proliferación, migración, muerte celular.

Abstract

Electric fields have been a used tool by tissue engineering and regenerative medicine to regenerate articular cartilage. Several *in vitro* procedures have been carried out and have evidenced the increase in cell proliferation and synthesis of main molecules that compound articular cartilage extracellular matrix, such as glycosaminoglycans. Although have been reported several *in vitro* experiments about the effect of electric fields in chondrocytes, there is not agreement in the data obtained. This because, there is a wide range of both electric fields intensities and stimulation times in order to obtain the best cell proliferation and molecular synthesis rate. Moreover, a scheme to generate and distribute the electric field over the whole cell culture surface has been no implemented. Therefore, the aim of this work is study computational and experimentally the *in vitro* chondrocyte cell dynamic in presence and absence of electric fields. Analyzing the results obtained of cell dynamics in absence of electric fields, we conclude that a computational model, such as cellular automaton, predicts efficiently the cell behavior of chondrocytes cultured in monolayer: Migration, proliferation and cell death. Computational results are in agreement with experimental data and provide additional information to improve and optimize *in vitro* procedures. On the other hand, applying electric fields to the cell cultures the results indicate that both electric field intensity and stimulation time per day are variables that should be combined to duplicate cell culture population or stimulate glycosaminoglycan synthesis. In addition, the devices implemented in this research allow calculating, generating and distributing homogenously the electric field over the cell cultures. In conclusion, the computational models validated experimentally and the use of electric fields, to increase cell population and stimulate glycosaminoglycan synthesis, allow improving and optimizing the treatment carried out by tissue engineering and regenerative medicine to regenerate articular cartilage injuries.

Keywords: Electric field, articular cartilage, chondrocyte, glycosaminoglycan, proliferation, migration, cell death.

Contenido

| | Pag. |
|--|------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Alcances de la investigación | 4 |
| 1.2 Objetivos de la investigación | 5 |
| 1.2.1 Objetivo general | 5 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 5 |
| 1.3 Esquema de la tesis | 5 |
| | |
| 2. El cartílago articular: Estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica | 7 |
| 2.1 Desarrollo embriológico del cartílago | 7 |
| 2.2 Anatomía del cartílago articular | 8 |
| 2.3 Composición del cartílago articular | 9 |
| 2.4 Componentes moleculares de la MEC del cartílago articular | 10 |
| 2.4.1 Fibras de colágeno | 10 |
| 2.4.2 Proteoglicanos (PG) | 11 |
| 2.4.3 Glicoproteínas | 13 |
| 2.5 Lesiones y patologías que afectan el cartílago articular | 13 |
| 2.6 Tratamientos para regenerar el cartílago articular | 14 |
| 2.7 Campos eléctricos como alternativa terapéutica | 16 |
| | |
| 3. Implementación de un autómata celular para simular la migración, proliferación y muerte celular de condrocitos articulares: Validación <i>in vitro</i> | 19 |
| 3.1 Introducción | 19 |
| 3.2 Materiales y métodos | 21 |
| 3.2.1 Análisis experimental | 22 |
| 3.2.1.1 Cultivo celular | 22 |
| 3.2.1.2 Ensayo de tensión superficial | 22 |
| 3.2.1.3 Ensayo de migración celular | 22 |
| 3.2.1.4 Ensayo de prliferación y muerte celular | 23 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.1.5 | Análisis estadístico | 23 |
| 3.2.2 | Implementación computacional | 23 |
| 3.2.2.1 | Algoritmo del autómata celular | 23 |
| 3.2.2.2 | Modelo geométrico: Morfología y área superficial | 24 |
| 3.2.2.3 | Estado celular | 25 |
| 3.2.2.4 | Migración celular (p_{mig} , d_{mig} , e_d) | 25 |
| 3.2.2.5 | Proliferación celular (p_p) | 26 |
| 3.2.2.6 | Muerte celular (p_{mc}) | 27 |
| 3.3 | Resultados | 27 |
| 3.3.1 | Análisis experimental | 27 |
| 3.3.1.1 | Tensión superficial | 27 |
| 3.3.1.2 | Migración celular | 27 |
| 3.3.1.3 | Proliferación celular | 29 |
| 3.3.1.4 | Muerte celular | 29 |
| 3.3.2 | Implementación computacional | 30 |
| 3.3.2.1 | Migración celular | 30 |
| 3.3.2.2 | Proliferación celular | 31 |
| 3.3.2.3 | Muerte celular | 33 |
| 3.4 | Discusión | 33 |
| 4. | Estimulación con campos eléctricos a condrocitos cultivados en monocapa: Evaluación de proliferación, muerte celular y síntesis de glicosaminoglicanos | 36 |
| 4.1 | Introducción | 36 |
| 4.2 | Materiales y métodos | 38 |
| 4.2.1 | Aislamiento y cultivo de condrocitos | 38 |
| 4.2.2 | Caracterización del medio de cultivo celular y cálculo del campo eléctrico | 39 |
| 4.2.3 | Dispositivo de estimulación eléctrica | 41 |
| 4.2.4 | Ensayo de estimulación eléctrica | 42 |
| 4.2.5 | Ensayo de proliferación y muerte celular | 43 |
| 4.2.6 | Cuantificación de glicosaminoglicanos | 43 |
| 4.2.7 | Análisis estadístico | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3 Resultados | 44 |
| 4.3.1 Caracterización del medio de cultivo celular y cálculo del campo eléctrico | 44 |
| 4.3.2 Proliferación y muerte celular | 45 |
| 4.3.3 Síntesis de glicosaminoglicanos | 47 |
| 4.4 Discusión | 48 |
| 5. Conclusiones y recomendaciones | 52 |
| 5.1 Conclusiones | 52 |
| 5.2 Recomendaciones | 53 |
| A. Anexo: Planos del capacitor coaxial | 54 |
| B. Anexo: Circuito Oscilador Puente de Wien | 59 |
| C. Anexo: Constantes eléctricas del medio de cultivo celular a diferentes frecuencias (10 – 100 kHz) | 60 |
| D. Anexo: Análisis estadístico de la proliferación celular | 61 |
| E. Anexo: Análisis estadístico de la muerte celular | 63 |
| F. Anexo: Análisis estadístico de la síntesis de GAGs | 64 |
| 6. Bibliografía | 68 |

Lista de figuras

| | Pag. |
|--|------|
| 2-1 Desarrollo embriológico de los huesos largos | 7 |
| 2-2 Cargas mecánicas soportadas por el cartílago articular | 9 |
| 2-3 Esquemas de las zonas del cartílago articular | 10 |
| 2-4 Representación esquemática de los PG y las fibras de colágeno dentro del cartílago articular, dominios globulares (G1, G2 y G3) y GAGs | 12 |
| 2-5 Diagrama esquemático de las diferentes etapas llevadas a cabo en la IAC | 15 |
| 2-6 Dispositivos empleados para estimular condrocitos cultivados en monocapa | 17 |
| 3-1 Esquema representativo para evaluar el efecto de la tensión superficial sobre la distribución celular | 22 |
| 3-2 Algoritmo del autómata celular | 24 |
| 3-3 Modelo geométrico | 25 |
| 3-4 Migración celular basada en la teoría random-walk | 26 |
| 3-5 Proliferación celular de acuerdo a la teoría random-walk | 26 |
| 3-6 Probabilidad de muerte celular | 27 |
| 3-7 Efecto de la tensión superficial sobre la distribución celular | 28 |
| 3-8 Migración celular para los pasajes de cultivo celular | 28 |
| 3-9 Curvas de proliferación del cultivo celular | 29 |
| 3-10 Determinación de la muerte celular <i>in vitro</i> | 30 |
| 3-11 Curvas de proliferación entre el cultivo celular y el modelo computacional | 31 |
| 3-12 Comparación de la proliferación entre el cultivo celular y el modelo computacional | 32 |
| 3-13 Expansión celular durante una semana de simulación | 32 |
| 4-1 Diagrama esquemático del capacitor coaxial | 39 |
| 4-2 Esquema representativo de un capacitor de placas paralelas para determinar el CE | 41 |
| 4-3 Diagrama esquemático de la posición de los electrodos y el sistema de acople para estimular los cultivos celulares | 42 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4-4 | Distribución y estimación del CE dentro de la caja de cultivo celular en vacío y con medio de cultivo celular | 45 |
| 4-5 | Proliferación celular de los controles y los cultivos celulares estimulados | 46 |
| 4-6 | Determinación de la muerte celular entre los cultivos estimulados y los controles | 47 |
| 4-7 | Producción de GAGs por célula de los cultivos celulares estimulados y los controles | 48 |

Lista de tablas

| | Pag. |
|---|------|
| 2-1 Tipos de Colágeno y su respectiva función | 11 |
| 2-2 Resumen de la aplicación de CEs a condrocitos cultivados en monocapa | 18 |
| 3-1 Comportamiento de la proliferación celular <i>in vitro</i> por hora entre P1 y P2 | 29 |
| 3-2 Estado de la migración celular | 30 |
| 3-3 Estado de la muerte celular | 33 |
| 4-1 Parámetros para calcular la capacitancia del capacitor coaxial | 40 |
| 4-2 Propiedades eléctricas del medio de cultivo celular | 44 |
| 4-3 Constantes eléctricas en vacío y con medio de cultivo celular | 44 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

| Símbolo | Término | Unidad SI |
|-----------|-------------------------------------|-----------|
| p_{mig} | Probabilidad de migración | -- |
| p_p | Probabilidad de proliferación | -- |
| p_{mc} | Probabilidad de muerte celular | -- |
| d_{mig} | Distancia de migración | -- |
| e_d | Espacio disponible | -- |
| p | Probabilidad | -- |
| C_0 | Capacitancia del vacío | pf |
| L_c | Longitud capacitor coaxial | m |
| r_{ext} | Radio externo del capacitor coaxial | m |
| r_{int} | Radio interno del capacitor coaxial | m |
| R_{mc} | Resistencia del medio de cultivo | Ω |
| C_{mc} | Capacitancia del medio de cultivo | nf |

Símbolos con letras griegas

| Símbolo | Término | Unidad SI |
|------------------|--|-----------|
| ϵ_0 | Permitividad del vacío | F/m |
| σ_{mc} | Conductividad | S/m |
| ϵ_{jmc} | Permitividad compleja del medio de cultivo | -- |
| ϵ_{mc} | Permitividad del medio de cultivo (parte real) | -- |
| $j\epsilon_{mc}$ | Permitividad del medio de cultivo (parte compleja) | -- |

Abreviaturas

| Abreviatura | Término |
|--------------------|----------------|
|--------------------|----------------|

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| <i>CE</i> | Campo eléctrico |
| <i>CEs</i> | Campos eléctricos |
| <i>GAGs</i> | Glicosaminoglicanos |
| <i>MEC</i> | Matriz extracelular |
| <i>PG</i> | Proteoglicanos |
| <i>MPa</i> | Mega pascales |
| <i>OA</i> | Osteoartritis |
| <i>AC</i> | Autómata celular |
| <i>IAC</i> | Implantación autóloga de condrocitos |
| <i>P1</i> | Pasaje celular 1 |
| <i>P2</i> | Pasaje celular 2 |
| <i>CPM</i> | Cellular Potts Models |

1. Introducción

El cartílago articular es un tejido conectivo ubicado en los extremos de los huesos que forman la articulación¹. Este tejido se caracteriza por amortiguar y distribuir cargas mecánicas como tensión, compresión y cizallamiento sobre toda la superficie de contacto²⁻⁴. Para que el cartílago articular pueda soportar dichas cargas mecánicas, su composición celular y estructura molecular es fundamental⁵. El cartílago articular está compuesto por un único tipo celular, el condrocito, el cual está encargado de sintetizar y degradar las moléculas que componen matriz extracelular (MEC) del tejido cartilaginoso. Las principales moléculas que componen la MEC del cartílago articular son las proteínas fibrilares de colágeno y glicoproteínas denominadas proteoglicanos^{1,2,6}. Tanto las fibras de colágeno como los proteoglicanos brindan tridimensionalidad, elasticidad y resistencia al cartílago articular para que éste pueda soportar las diferentes cargas mecánicas⁶⁻⁸. La síntesis y degradación óptima de estas proteínas, depende de la aplicación adecuada de las fuerzas mecánicas sobre el cartílago articular^{4,5,9}, sin embargo, cargas excesivas, ocasionadas por el sobrepeso o los impactos contundentes, conducen a daños en la MEC y a la apoptosis de los condrocitos⁵. Esto conlleva a una disfunción del cartílago articular y la generación de patologías como la Osteoartritis (OA)^{5,10,11}. Estudios recientes han evidenciado que la OA representa un problema de salud pública, ya que del 80% de los adultos mayores que padecen esta enfermedad, entre el 10% y 20% manifiestan limitación en sus actividades. Las articulaciones con mayor índice de afectación por la OA son las rodillas (40%), manos (30%) y caderas (19%)¹², presentando síntomas como fibrilación en la superficie del cartílago, daños enzimáticos y mecánicos en la MEC e inflamación de las articulaciones¹³. Para dar solución los síntomas causados por la OA, tratamientos no invasivos como la fisioterapia o el uso de medicamentos farmacológicos han sido utilizados para aliviar localmente el dolor¹⁴. Desafortunadamente, con ninguno de estos tratamientos se ha observado efectos a largo plazo en la recuperación de patologías como la OA⁶. Por otro lado, el uso de intervenciones quirúrgicas, tales como la estimulación de la médula ósea, la mosaicoplastia, los injertos de tejido, la osteotomía, entre otros, han sido métodos invasivos llevados a cabo para estimular la regeneración del cartílago articular¹⁴⁻¹⁸. Sin embargo, se ha observado que estas intervenciones generan pérdida de las propiedades mecánicas del cartílago articular debido a la formación de fibrocartílago¹⁹.

Este tejido fibroso no tiene las mismas propiedades del cartílago original, en particular sus características mecánicas, ya que es más rígido y más permeable, resultando en un cartílago más propenso a la degradación con el tiempo¹. Debido a que las metodologías existentes para tratar las patologías asociadas al cartílago articular no brindan una solución óptima, surge la necesidad de encontrar otras opciones terapéuticas que se enfoquen principalmente en el aumento de la población celular y síntesis de las principales moléculas del cartílago articular.

Experimentalmente se ha demostrado que los condrocitos responden a estímulos biofísicos externos, tales como presiones hidrostáticas, compresiones dinámicas, ultrasonido y estímulos eléctricos²⁰⁻²³. Estos últimos consisten en estimular, con campos eléctricos (CEs), condrocitos cultivados en monocapa. Para generar los CEs y estimular eléctricamente las células, una fuente de tensión en corriente alterna es conectada a electrodos ubicados tanto en la base como en la parte superior de la caja de cultivo^{24,25}. Los trabajos reportados por varios grupos de investigación han evidenciado que los CEs, desde 20 mV/cm hasta 500 mV/cm a una frecuencia de 60 kHz (onda sinusoidal), incrementan la población celular y estimulan la síntesis de las principales moléculas asociadas a la MEC cartilaginosa, tales como el colágeno tipo II, el agregan y los glicosaminoglicanos (GAGs)^{23,25-31}. Aunque diferentes intensidades de campo eléctrico (CE) se han establecido, los rangos de tensión empleados para generarlos son muy amplios (10 – 1000 V AC). Además, los reportes en la literatura no evidencian la intensidad de CE dentro del medio de cultivo celular, por lo tanto, se desconoce cuál es el valor que estimula directamente a los condrocitos. La razón principal, del por qué no se ha reportado el cálculo del CE, se debe a que no se han hallado las constantes eléctricas del medio de cultivo en el que permanecen cultivados los condrocitos. Estas constantes eléctricas del medio de cultivo, tales como la permitividad compleja y conductividad, son parámetros esenciales para calcular el CE, ya que este líquido influye en la distribución del CE sobre toda la superficie de cultivo celular³². Adicionalmente, tanto la permitividad compleja como la conductividad permiten calcular la intensidad de CE que está recibiendo el condrocito al ser estimulado³³. Por otro lado, existe una variación en los tiempos utilizados para estimular eléctricamente los condrocitos. Los tiempos van desde los 30 minutos hasta las 48 horas de estimulación continua^{23,25-31}. Esto genera discrepancia en los

resultados obtenidos, ya que no está establecido el tiempo estimulación eléctrica para obtener la mejor tasa de proliferación celular y síntesis de moléculas como los GAGs.

Para dar solución a los problemas mencionados, este trabajo de investigación presenta la evaluación del efecto de una estimulación con CEs sobre condrocitos cultivados en monocapa. La primera etapa de este proyecto consistió en caracterizar el comportamiento *in vitro* de condrocitos en ausencia de CEs. La caracterización se basó en el análisis experimental y computacional la dinámica celular de los condrocitos: Distribución, migración, proliferación y muerte celular. Esta fase permitió establecer los tiempos de cultivo celular y estandarizar los protocolos para cultivar condrocitos en monocapa. Adicionalmente, este primer estudio permitió correlacionar los datos experimentales a través de la implementación de un Autómata Celular y observar la dinámica celular de los condrocitos computacionalmente. En una etapa posterior, se evaluó el comportamiento celular: Proliferación, muerte celular y síntesis de GAGs cuando los condrocitos son sometidos a estímulos con CEs. En esta segunda etapa se hallaron las constantes eléctricas del medio de cultivo celular. Este procedimiento se realizó construyendo dispositivos que permitieron calcular las propiedades del medio de cultivo celular: Capacitancia y resistencia, con el objeto de hallar las funciones de reactancia e impedancia. Las propiedades obtenidas fueron sometidas a un análisis de sensibilidad para calcular computacionalmente la permitividad compleja, la conductividad del medio de cultivo celular y el CE que estimula directamente a los condrocitos. Una vez hallado el CE, se diseñó un circuito electrónico que convierte la corriente continua en corriente alterna para generar tensiones de 50 y 100 V AC a una frecuencia de 60 kHz (onda sinusoidal). Estos valores de tensión y frecuencia fueron seleccionados, ya que trabajos de investigación previamente realizados indican ser los parámetros ideales para generar un CE que incrementa la población celular y estimula la síntesis molecular de los condrocitos^{23,25,27,30}. Por último, para distribuir los CEs sobre toda la superficie de cultivo celular, se implementó un sistema de acople que cubre toda la superficie de la caja de cultivo celular evitando que el efecto de borde, generado por los CEs en los extremos de los electrodos, altere los cultivos celulares. En cuanto a los tiempos de estimulación para aplicar diariamente los CEs, se decidió utilizar tiempos de 30 minutos, 1 hora y 5 horas según lo reportado por varios autores^{23,25,30}.

Este trabajo de investigación combina el modelamiento computacional, la validación experimental y el diseño e implementación de una nueva metodología para calcular de forma más precisa el CE que estimula directamente a los condrocitos. Esta última parte, permite dar un enfoque más robusto para el análisis de la dinámica celular de los condrocitos estimulados eléctricamente, hallando por primera vez las propiedades eléctricas del medio de cultivo y haciendo un énfasis en las variables que influyen en la distribución de los CEs sobre toda la superficie de cultivo celular. Por otro lado, un aporte relevante de este estudio está enfocado hacia los tiempos de estimulación eléctrica. Los resultados obtenidos indican que la respuesta celular de los condrocitos no solo depende de la intensidad del CE sino también del tiempo de estimulación diaria. En conclusión, esta investigación es de alto impacto tanto para la ingeniería de tejidos como para la medicina regenerativa, ya que los cultivos monocapa, estimulados con CEs, pueden ser optimizados de forma mucho más eficiente con el objeto de mejorar los procedimientos *in vitro* y obtener cultivos de condrocitos bien caracterizados. Dicha caracterización puede ser utilizada en técnicas terapéuticas encargadas de tratar las diferentes enfermedades degenerativas que afectan al cartílago articular.

1.1 Alcances de la investigación

Investigaciones anteriores solo han realizado el análisis *in vitro* del efecto de los CEs sobre condrocitos, sin tener en cuenta las propiedades eléctricas del medio cultivo y su rol en la distribución del CE. Por lo tanto esta investigación, que liga el análisis *in vitro* con el *in silico*, tiene como objetivo apoyar las siguientes proposiciones:

- A través del uso de un método computacional discreto, como un autómata celular, y en combinación con una herramienta estocástica, como la teoría random-walk, se puede correlacionar el comportamiento de condrocitos cultivados en monocapa con el objeto de visualizar computacionalmente la dinámica celular: Distribución, migración, proliferación y muerte celular.
- El efecto de la tensión superficial no afecta de la distribución de las células en la superficie de la caja de cultivo celular, siempre y cuando los volúmenes de medio de cultivo sean los correctos.
- La dinámica celular de los condrocitos varía según el pasaje celular.

- El cálculo de las propiedades eléctricas del medio de cultivo celular permite hallar el CE que estimula directamente el cultivo celular de condrocitos.
- El esquema implementado para estimular a los condrocitos evita que el efecto de borde altere la distribución de los CEs sobre toda la superficie de cultivo celular.
- El incremento en la proliferación y la estimulación de la síntesis de GAGs depende de la intensidad tanto de la intensidad de CE como del tiempo de estimulación por día.

1.2 Objetivos de la investigación

1.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la estimulación con campos eléctricos sobre condrocitos cultivados en monocapa.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Diseñar e implementar un dispositivo para la aplicación de campos eléctricos a condrocitos cultivados en monocapa.
2. Determinar la viabilidad de condrocitos cultivados en monocapa ante una estimulación con campos eléctricos.

1.3 Esquema de la tesis

El presente trabajo está dividido en 5 capítulos. El **Capítulo 1** corresponde a ésta introducción. En el **capítulo 2** se presenta una revisión acerca del desarrollo embriológico del cartílago articular, haciendo énfasis en los principales factores de transcripción que se encargan de regular la síntesis de las principales moléculas que conforman el tejido. Se menciona la anatomía del cartílago resaltando su composición molecular: Fibras de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. Por otro lado, se hace un breve énfasis en las principales patologías que afectan al cartílago articular y los posibles tratamientos. Esta última parte da prioridad al tratamiento con CEs mostrando los diferentes aportes que ha hecho la ciencia durante los últimos 30 años.

En el **capítulo 3** se muestra la implementación computacional de un Autómata Celular, basado en la teoría random-walk, que simula el comportamiento celular de condrocitos cultivados en monocapa. También se describe detalladamente la validación del modelo computacional a través de cultivos celulares *in vitro*, haciendo énfasis en los siguientes parámetros: Análisis del efecto de la tensión superficial sobre la distribución de condrocitos en la superficie de la caja de cultivo celular. Caracterización de la migración celular mediante registros fotográficos durante un periodo total de 12 horas. Por último, cuantificación de la proliferación y muerte celular a través de una técnica colorimétrica con azul de tripan y un hemocitómetro.

Una vez estudiado el comportamiento celular de los condrocitos en ausencia de un estímulo biofísico externo, en el **capítulo 4** se analiza el comportamiento celular de un cultivo de condrocitos estimulados con CEs. En éste capítulo se ilustra gráfica y analíticamente la construcción de un capacitor coaxial que permite determinar la capacitancia del medio de cultivo. Utilizando dicha constante se calcula la permitividad del medio de cultivo, y a través de una simulación computacional se estiman los valores conductividad, permitividad compleja del medio de cultivo y el valor del CE. Por otro lado, se muestra el esquema empleado para estimular los cultivos celulares y el diseño de un circuito electrónico para generar la tensión, frecuencia y onda exacta que generan el CE. Los datos de tensión, frecuencia y tipo de onda que se usaron en este trabajo fueron obtenidos de la revisión que se realizó en el **capítulo 2**. Como complemento a lo anterior, se ilustra gráficamente la distribución del CE a través de un análisis por elementos finitos. Como resultados principales de éste capítulo, se resalta el cambio de la proliferación celular y síntesis de GAGs después de que el cultivo celular ha sido estimulado con CEs.

Por último, en el **capítulo 5** se muestran las principales conclusiones obtenidas por cada uno de los análisis experimentales y computacionales llevados que se llevaron a cabo en éste trabajo. Además, se discuten las perspectivas de ésta investigación y se realizan algunas recomendaciones para trabajos futuros.

2. El cartílago articular: Estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica

2.1 Desarrollo embriológico del cartílago

El cartílago es un tejido avascular que, dependiendo de la composición de la MEC y su ubicación en el cuerpo humano, se clasifica en cartílago elástico, fibrocartílago y cartílago articular^{1,34,35}. El cartílago elástico contiene haces de elastina dispersas en la MEC que le proporcionan elasticidad al tejido. Este tejido se encuentra en el oído y en la epiglotis³⁴. El fibrocartílago, contiene una MEC fibrosa rica en colágeno tipo I y se encuentra entre los discos vertebrales y meniscos^{34,35}.

El cartílago articular surge de condensaciones de células mesenquimales durante el desarrollo embriológico a través de un proceso denominado condrogénesis^{1,36,37} (Figura 2-1).

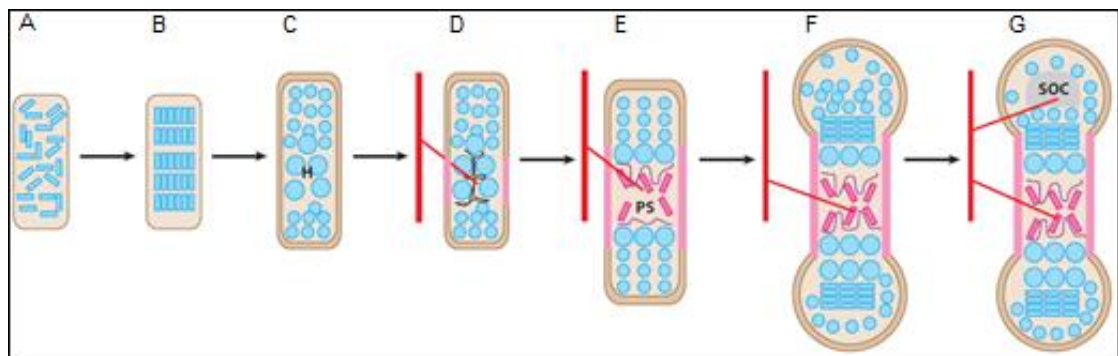


Figura 2-1: Desarrollo embriológico de los huesos largos³⁷.

Este proceso se inicia con el reclutamiento de células mesenquimales al sitio donde posteriormente se va a dar origen a los huesos largos que conforman el esqueleto (Figura 2-1 A). Luego de la migración, resultado de interacciones epitelio/mesénquima, se da origen a una condensación celular³ (Figura 2-1 B). Las células de estas condensaciones proliferan y se diferencian en condrocitos (condrogénesis) (Figura 2-1 C), formando un molde cartilaginoso mediante la secreción de una MEC rica en colágeno tipo II y proteoglicanos (PG). El molde cartilaginoso sufre posteriormente un proceso de osificación (osificación endocondral) para dar lugar a la formación de huesos largos (Figura 2-1 D-E), excepto en los

extremos donde persistirá como cartílago articular^{2,4,38} (Figura **2-1 F-G**). Las funciones principales del cartílago articular son proveer un bajo coeficiente de fricción durante el movimiento entre los extremos óseos para soportar y distribuir las cargas mecánicas sobre toda la superficie de contacto².

La diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, durante la condrogénesis, es regulada por la actividad de factores de transcripción que controlan la expresión de las principales proteínas que componen la MEC del cartílago articular³⁹. El factor de transcripción que más se destaca es el SOX9 que es esencial para la diferenciación de condroprogenitores⁴⁰. Además, regula la expresión del colágeno tipo II, IX, XI, y agregan^{39,41}.

2.2 Anatomía del cartílago articular

El cartílago articular está ubicado en las articulaciones sinoviales, en los extremos de los huesos que forman la articulación. El grosor del cartílago articular varía dependiendo su ubicación; Por ejemplo, en las articulaciones interfalángicas el grosor del tejido varía entre 1 a 2 milímetros, mientras que en la rodilla o cadera, que soportan mayor peso, el grosor del cartílago es de 3 a 5 milímetros^{3,4}. Dada la función de amortiguación del cartílago articular, éste tejido está expuesto a diferentes cargas mecánicas tales como tensión, compresión y cizallamiento (Figura **2-2**). La carga de tensión ejerce una fuerza hacia afuera aumentando la elongación del cuerpo. Mientras que la carga de compresión ejerce una fuerza de empuje que actúa sobre toda la longitud del tejido, haciendo que este se haga más plano. Por último, la fuerza de cizallamiento es tangencial al cuerpo y deforma el tejido en varias direcciones.

Algunas articulaciones, como la cadera o tobillo, soportan cargas que varían de 1 a 4 Mega pascales (MPa), sin embargo, articulaciones como la rodilla experimentan cargas de 5 a 10 MPa en la marcha normal y puede incrementar a 18 MPa cuando se realiza alguna actividad física^{1,2,6,42}.

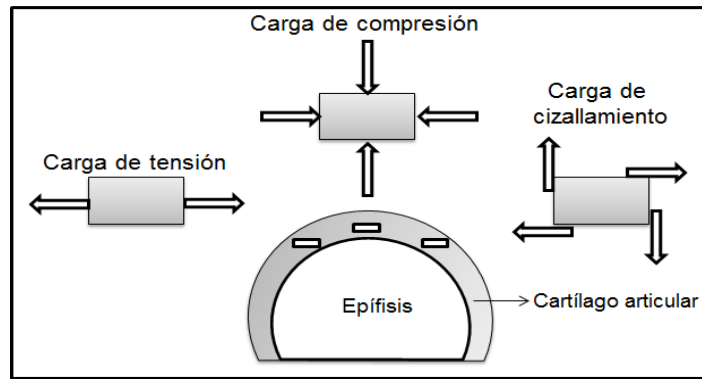


Figura 2-2: Cargas mecánicas soportadas por el cartílago articular.

2.3 Composición del cartílago articular

Para que el cartílago articular pueda soportar las diferentes cargas mecánicas, su estructura y composición es fundamental. Este es un tejido con una alta relación MEC-células. Los condrocitos son el único componente celular del tejido y representan aproximadamente el 1-5% del volumen total del cartílago¹. La morfología del condrocito varía de acuerdo a su ubicación dentro del cartílago, tipo de cartílago y edad del individuo (Figura 2-3 A). De acuerdo a esto, pueden ser circulares, ovalados o aplanados^{1,2}. Por otro lado, la MEC constituye más del 95% del volumen del cartílago articular. Ésta contiene aproximadamente de un 60 - 80% de agua, 15% de colágenos totales, entre ellos los colágenos tipo II, VI, IX, X, XI y por último un 9% de PG^{1,2,6}. Sin embargo, los porcentajes de colágeno y PG en el cartílago articular varían según la zona en la que se encuentre dentro del tejido (Figura 2-3 B).

El cartílago articular está organizado por zonas de acuerdo a la morfología celular y a la orientación del colágeno tipo II^{1,6,43} (Figura 2-3 A). Las zonas más distantes al hueso forman la zona superficial o tangencial, constituyendo la capa más delgada del tejido (aproximadamente de 50 a 100 μm). Esta zona está compuesta por condrocitos de morfología aplanada y fibras de colágeno paralelas a la articulación, además, las concentraciones de PG son bajas⁴⁴ (Figura 2-3 B). A continuación, una región de transición establece la zona intermedia del cartílago articular. Esta zona tiene una menor densidad celular de condrocitos con morfología ovalada. Seguida de la zona media, se encuentran condrocitos más circulares formando agrupaciones pequeñas. Las células sintetizan activamente colágeno tipo II, organizado de manera oblicua, y agregan. En la zona profunda el colágeno tipo II se encuentra de manera

perpendicular a la articulación, y los condrocitos de morfología circular se ordenan en columnas. Finalmente, en la zona calcificada se reagrupan condrocitos de morfología más alargada y aplanada que sintetizan colágeno tipo X con el objeto de formar fibrocartilago y proveer amortiguación entre el hueso subcondral y el cartílago articular⁴³.

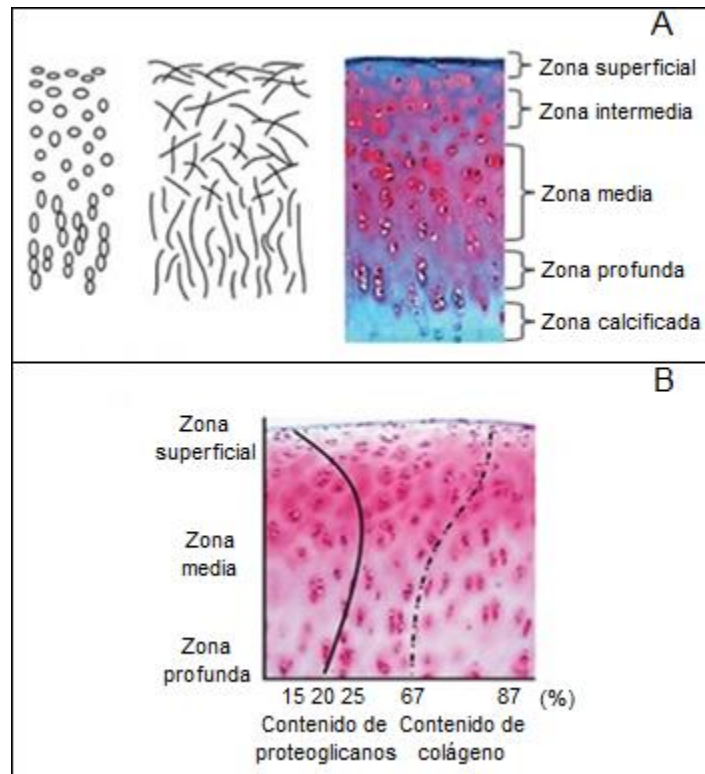


Figura 2-3: Esquemas de las zonas del cartílago articular⁴³. **A)** Morfología de los condrocitos en las diferentes zonas el cartílago articular (izquierda). Organización de las fibras de colágeno dentro de la MEC (centro). Zonas del cartílago articular (derecha). **B)** Porcentajes de colágeno y PG dentro del cartílago articular.

2.4 Componentes moleculares de la MEC del cartílago articular

2.4.1 Fibras de Colágeno

El principal componente de la MEC del cartílago articular es el colágeno tipo II. Esta es una proteína fibrilar sintetizada como un monómero, ensamblada en un trímero y procesada extracelularmente para remover los extremos amino y carboxy⁴⁵. Las fibras de colágeno se alinean de acuerdo a la dirección de la carga soportada por el

cartílago proporcionándole mayor rigidez⁴³. Además, en el cartílago articular se encuentran otros cinco tipos de colágenos (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Tipos de Colágeno y su respectiva función^{6,8}.

| Tipo colágeno | Función |
|-------------------------|---|
| Colágeno tipo II | Constituye la mayor parte del total del colágeno dentro del cartílago articular (aproximadamente un 80%) y es el encargado de proveer una alta resistencia a la compresión cíclica. |
| Colágeno tipo VI | Concentra la mayor parte alrededor de las células ayudando a que los condrocitos se adhieran a la MEC. Compone aproximadamente un 5 % del total de colágeno en el cartílago articular. |
| Colágeno tipo IX | Facilita la interacción entre las fibrillas de colágeno con los PG dentro la MEC. Compone aproximadamente un 15% del total de colágeno en el cartílago articular. |
| Colágeno tipo X | Organiza la fibrillas de colágeno en una red hexagonal tridimensional en la zona calcificada del cartílago articular (Figura 2-3 A) y compone aproximadamente un 5 % del total de colágeno en el cartílago articular. |
| Colágeno tipo XI | Regula el tamaño de las fibrillas que forman una red pericelular al condrocito. Además, permite la producción de colágeno tipo II. Compone aproximadamente un 15 % del total de colágeno en el cartílago articular. |

2.4.2 Proteoglicanos (PG)

Los PG son glicoproteínas complejas que componen la MEC del cartílago articular y le proporcionan al tejido, al igual que el colágeno, soporte y tridimensionalidad (Figura 2-3 B)⁷. Estas moléculas, de gran peso molecular, retienen agua y mantienen la distancia entre las células. Además, los PG le brindan una capacidad de resistencia

osmótica y de compresibilidad al tejido¹. Adicionalmente, los PG están unidos a la membrana celular de los condrocitos actuando como moduladores de señal en procesos de comunicación entre la célula y su entorno², y en ciertos casos promueven la adhesión celular¹.

Los PG están compuestos por una cadena central proteica a la cual se unen de manera perpendicular dímeros repetidos de carbohidratos, por lo general altamente sulfatados denominados glicosaminoglicanos (GAGs)⁴⁶. El principal PG del cartílago articular es el agregcan, compuesto por una proteína central de 210 a 250 kDA con tres dominios globulares: dos en el amino terminal (G1 y G2) y un tercer dominio en el carboxy-terminal (G3). A este tercer dominio lo separa una región de GAGs compuesta por queratán sulfato (KS) seguido de otra región de condroitín sulfato (CS) (Figura 2-4)^{1,7,16,17,42,43,47,48}. La función de los dominios globulares es proporcionar agregación, sitios de unión al hialuronan, adhesión celular y aportar a los procesos de apoptosis de los condrocitos⁷.

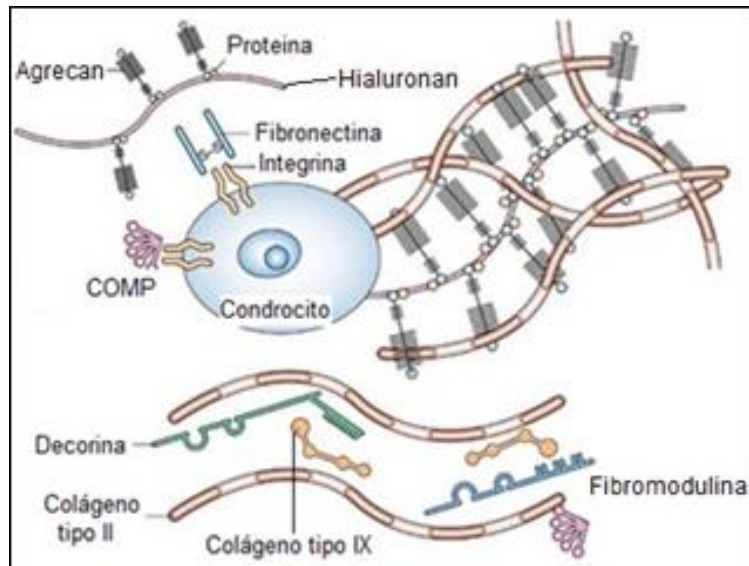


Figura 2-4: Representación esquemática de los PG, las fibras de colágeno dentro del cartílago articular, dominios globulares (G1, G2 y G3) y GAGs⁷.

El agregcan interactúa con otros constituyentes de la MEC como el colágeno tipo II, interconectando la MEC con los constituyentes de la superficie celular⁴⁸. Otros PG de menor peso molecular como la decorina y la fibromodulina se unen con el colágeno

tipo II y tienen un rol importante en la determinación de las propiedades físicas de las fibras de colágeno⁴⁹.

2.4.3 Glicoproteínas

Aunque en menor proporción que el colágeno tipo II y el agregan, el cartílago articular también posee glicoproteínas de diversas especies y funciones. Por ejemplo, la proteína oligomérica del cartílago (COMP) es una glicoproteína no-colagenosa que se encuentra en el cartílago articular y está localizada en la MEC alrededor de los condrocitos, ayudando al crecimiento, proliferación y fijación de las células en su entorno^{43,50,51}. Igualmente, la fibronectina está localizada a nivel pericelular y le permite al condrocito adherirse a la MEC y actuar con otras moléculas como el colágeno tipo II⁵². La tromboespondina, otra glicoproteína no-colagenosa, tiene varias funciones entre ellas ayudar a la adhesión, migración y proliferación celular⁵⁰.

2.5 Lesiones y patologías que afectan el cartílago articular

A lo largo de la vida el cartílago articular está condicionado a un desgaste interno debido a las cargas mecánicas externas soportadas por el tejido, generando alteraciones morfológicas y funcionales⁵. Sin embargo, existen lesiones y algunas patologías que pueden ocurrir con anticipación debido a factores genéticos, de crecimiento, metabólicos y traumáticos^{52,53}.

Hay tres tipos de lesiones que afectan el cartílago¹⁷. En primer lugar, se encuentran las lesiones que alteran y deterioran la MEC del tejido, sin embargo, los condrocitos viables restantes aumentan su actividad sintética y reparan las zonas afectadas. En segundo lugar, están las alteraciones en el espesor del cartílago que generan fisuras en la superficie del cartílago. Por último, están las lesiones que afectan todo el espesor del cartílago hasta penetrar al hueso subcondral. La reparación del daño es llevada a cabo por células progenitoras que migran desde la médula ósea hasta el tejido alterado, remplazándolo con cartílago articular y fibrocartílago.

La patología degenerativa del cartílago articular, con mayor incidencia, afectando tanto a los condrocitos como a la MEC es la osteoartritis (OA)⁵⁴⁻⁵⁸. Estudios realizados han encontrado que la OA afecta tanto a hombres como a mujeres mayores de 60

años y se especula que para el 2020 será la cuarta causa de discapacidad a nivel mundial^{59,60}. El desarrollo de la OA involucra múltiples factores incluyendo daño mecánico de la articulación, inflamación, predisposición genética entre otras⁶¹. La OA se manifiesta con grandes cambios morfológicos, bioquímicos, moleculares y biomecánicos, resultado del desbalance entre síntesis y degradación de los componentes de la MEC del cartílago. Como consecuencia, se presenta alteración en las proteínas primarias como el colágeno y los PG decreciendo la resistencia a la tracción, rigidez y espesor del cartílago articular, remodelación del hueso subcondral e inflamación crónica de la membrana sinovial^{62,63}.

Otras patologías, como la artropatía neurogénica, espondiloartritis y osteocondritis afectan el cartílago articular causando dolor, inflamación, dificultades de movimiento, fragmentación y fractura de las articulaciones⁶⁴. Debido a las patologías que afectan la morfología, composición y propiedades biomecánicas del cartílago articular, existe la necesidad de realizar tratamientos apropiados o encontrar alternativas fisioterapéuticas para reparar daños morfológicos y funcionales en el tejido cartilaginoso.

2.6 Tratamientos para regenerar el cartílago articular

Debido a que diferentes patologías afectan y degradan el cartílago articular, científicos han centrado su trabajo en la búsqueda de tratamientos terapéuticos que alivien localmente el dolor en la articulación o que replacen la superficie articular afectada con nuevo tejido cartilaginoso. Por lo tanto, las investigaciones se han enfocado en tratar el cartílago articular desde un punto de vista no invasivo e invasivo.

La fisioterapia se ha utilizado como una alternativa no invasiva para tratar lesiones en las articulaciones y se basa en el uso de diferentes estímulos físicos sobre el tejido afectado. Dentro de estos se incluye: la termoterapia (aplicación de calor local), el ultrasonido (estimulación con ondas de alta frecuencia), la magnetoterapia (aplicación de campos magnéticos estáticos) y la electroterapia a través de la estimulación eléctrica transcutánea nerviosa (TENS)⁶⁵.

Por otro lado, existen tratamientos quirúrgicos como la estimulación de la médula ósea que consiste en realizar microfracturas a través del cartílago articular hasta penetrar el hueso subcondral, permitiendo que células mesenquimales migren hacia la superficie de la lesión y se diferencien a condrocitos reparando la zona lesionada^{1,18}. La mosaicoplastia consiste en tomar pequeños cilindros de tejido sano de los bordes exteriores del cartílago e insertarlos en pequeñas perforaciones previamente realizadas en la zona afectada¹. Un tratamiento similar son los injertos de tejido. Esta técnica consiste en tomar pequeñas cantidades de cartílago sano de otras articulaciones del cuerpo y trasplantarlas al cartílago afectado¹⁷. También se puede practicar la osteotomía, procedimiento quirúrgico en el cual se remueve parte del hueso en la superficie de la articulación, reduciendo la carga sobre ésta^{2,6}. Otro tratamiento es la implantación autóloga de condrocitos (IAC), ésta es una técnica utilizada por la ingeniería de tejidos para regenerar o reemplazar un cartílago articular lesionado^{1,14,17}. La IAC es un tratamiento que requiere del cultivo *ex vivo* de condrocitos. Las células extraídas son expandidas *in vitro* y luego implantadas en la articulación afectada⁶⁶ (Figura 2-5). Por otro lado, los condrocitos extraídos también pueden ser expandidos con el uso de andamios (scaffolds). Estos proporcionan una estructura tridimensional imitando la MEC del tejido cartilaginoso¹⁵. Los andamios pueden contener factores de crecimiento para estimular la proliferación y expresión génica de señales asociadas al tejido cartilaginoso. El constructo tisular es implantado posteriormente en la articulación afectada.

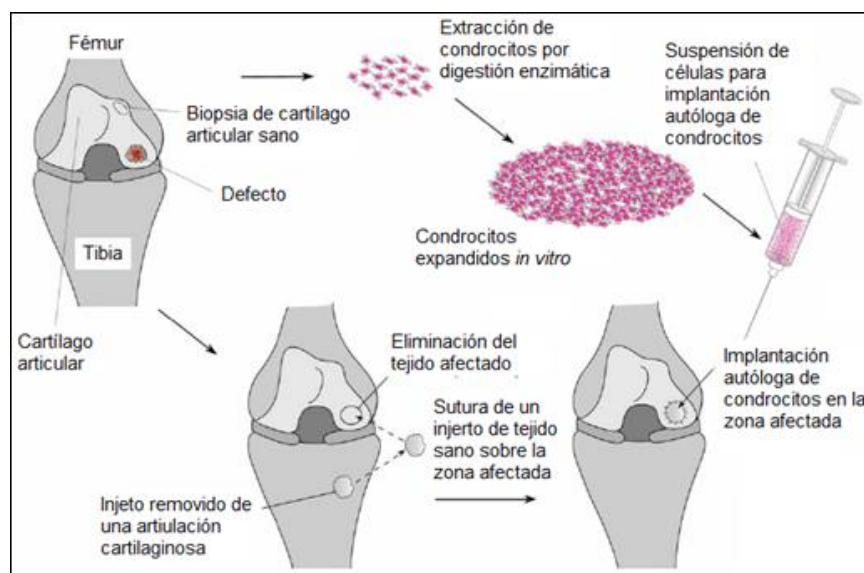


Figura 2-5: Diagrama esquemático de las diferentes etapas llevadas a cabo en la IAC⁶⁶.

2.7 Campos eléctricos como alternativa terapéutica

Los tratamientos mencionados en la sección anterior son técnicas costosas e invasivas con efectos a corto y mediano plazo. Además, dichos tratamientos afectan varios tejidos sanos y en la mayoría de los casos las zonas afectadas son remplazadas por tejido fibrocartilaginoso, el cual no tiene las mismas propiedades morfofisiológicas del cartílago articular. Esto representa una limitación, ya que el tejido no va a responder de manera adecuada a estímulos mecánicos^{1,18}. Por lo tanto, se continúa en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. La ingeniería de tejidos ha incursionado en el diseño y construcción de dispositivos, como generadores de CEs, con fines terapéuticos para aumentar la viabilidad y estimular la proliferación y expresión génica de los condrocitos.

Los CEs son generados en un espacio definido por partículas cargadas eléctricamente. El CE genera fuerzas puntuales, matemáticamente representados como vectores, que alteran las partículas posicionadas en el centro del CE. Como consecuencia, las partículas experimentan un movimiento aleatorio con distribución uniforme en el espacio⁶⁷.

La estimulación eléctrica en la regeneración del cartílago articular ha sido usada en sistemas *in situ*, *in vivo* e *in vitro*. En el primer caso, en 1974 *Backer* y colaboradores realizaron lesiones *in situ* en el cartílago articular del cóndilo femoral de un conejo, con el objetivo de colocar un dispositivo electroquímico directamente en la lesión. Los resultados mostraron que el uso del dispositivo aumentó en un 71% la producción de cartílago articular comparado con los controles que demostraron la síntesis de fibrocartílago⁶⁸.

Los CEs aplicados *in vivo* han mostrado resultados importantes para la OA en rodilla. *Farr* y colaboradores⁶⁹, reportaron el uso de un estimulador eléctrico transcutáneo en 288 pacientes con OA de rodilla. Los pacientes que usaron el dispositivo por más de 750 horas (73% de la población), presentaron mejoras y disminuyeron el uso de fármacos antiinflamatorios en un 45.3%. Además, el uso del dispositivo prorrogó la posibilidad de una intervención quirúrgica en pacientes crónicos. Clínicamente, el tratamiento de OA en rodilla usando un dispositivo generador de CEs durante seis

horas cada día, mostró mejoría en los síntomas de los pacientes reduciendo el dolor en la articulación.

De acuerdo con los estudios desarrollados por varios investigadores desde los años 70 hasta la fecha, para estimular la síntesis y expresión de moléculas asociadas a cartílago articular, y tratar las patologías asociadas con el tejido cartilaginoso, se ha evidenciado que los CE alteran la actividad celular de los condrocitos, estimulando la proliferación celular e incrementando las principales moléculas de la MEC, como los GAGs, el colágeno tipo II y el agregan^{23,25-31}. Con el objetivo de potenciar dichos efectos, se han evaluado a nivel *in vitro* diferentes dispositivos (Figura 2-6), distintas intensidades de CE y varios tiempos de estimulación por día (Tabla 2-2)^{23,25-31,70}. Según *Balint* y colaboradores²⁴, los dispositivos empleados en la literatura para estimular los cultivos celulares (Figura 2-6) disminuyen la posibilidad de contaminación, ya que los electrodos no están en contacto directo con el material biológico. Sin embargo, pueden existir limitaciones al generar altas tensiones (ej., 100 Voltios) entre los electrodos.

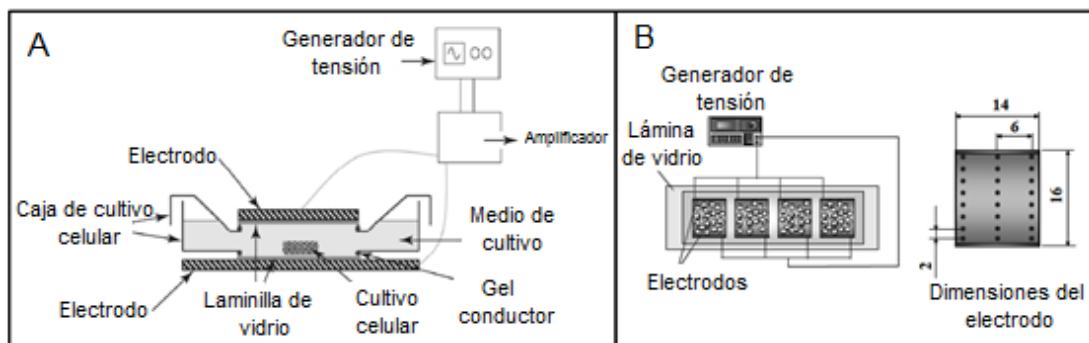


Figura 2-6: Dispositivos empleados para estimular condrocitos cultivados en monocapa. **A)** El sistema consta de un generador de señal que, conectado a un amplificador de voltaje, suministra la tensión adecuada para que dos electrodos, posicionados de forma horizontal sobre la caja de cultivo celular, generen un CE y estimulen el cultivo celular²⁵. **B)** El dispositivo empleado para estimular el cultivo celular está compuesto por un generador de señales que alimenta dos electrodos posicionados de forma vertical sobre el cultivo celular. Adicionalmente, el electrodo contiene agujeros que permiten medir el CE en diferentes puntos mientras el cultivo celular está siendo estimulado³¹.

Tabla 2-2: Resumen de la aplicación de CEs a condrocitos cultivados en monocapa

| Autor | Articulación utilizada para aislamiento de condrocitos | Tensión (Vpp) | Corriente | Frecuencia (kHz) | Campo eléctrico | Periodo previo de cultivo celular (días) | Resultados |
|------------------------------|--|--|---|--------------------------------|---|--|---|
| Rodan, et al. 1978 | Epifisis de la tibia de embrión de pollo | 1166 | ---- | 0.005 | ---- | 6 horas | Despolarización de la membrana celular permitiendo que el condrocito controle el proceso de proliferación. Además, estimulación de la síntesis de ADN. |
| Brighton, et al. 1984 | Rodilla de bovino | Parte A (250) Parte B (10-100-1000) | 37 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ---- | 60 sinusoidal 60 sinusoidal | ---- | 3 3 | Incremento en GAGs con 1% SFB. Incremento en proliferación con 10% SFB. Disminución de GAGs con 10 Vpp y 1% SFB. La producción de GAGs y proliferación se comportaron igual que el control a 100 Vpp, pero disminuyó para 1000 Vpp. |
| Brighton, et al. 1988 | Conostocondral de bovino | 10-100-250-500-750-1000-1500 | 4,8X10 ⁻⁷ A/cm ² /V | 60 sinusoidal | 1,5X10 ⁻² =500 2,25X10 ⁻² =750 3X10 ⁻² =1000 4,5X ⁻² =1500 V/cm | 4 | Aumento en la proliferación celular a tensiones de 500 - 750 - 1000 Vpp. El incremento de GAGs (66%) se observó con una tensión de 1500 Vpp. |
| Brighton, et al. 1988 | Epifisis de metacarpo de un bovino | 500 | 290 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ | 60 sinusoidal | 18 | 4 | Después de una estimulación de 48 horas aumento la proliferación en un 130% comparado con los controles. |
| Brighton, et al. 1989 | Conostocondral de bovino | Parte A (5-13,5-33,7-85) Vrms Parte B (13,5) Vrms | 105 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ = 5 Vrms 300 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ = 13,5 Vrms 750 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ = 33,7 Vrms 1,89 mA/cm ² = 85 Vrms | 60 sinusoidal | 7 mV/cm = 5 Vrms 20 mV/cm = 13,5 Vrms 50 mV/cm = 33,7 Vrms 126 mV/cm = 85 Vrms | 1 | Campos eléctricos de 20 mV/cm evidenciaron aumento en la proliferación celular. Los ciclos en la señal de salida (100%, 25%, 2% y 0.25%) no son parámetros relevantes ya que no se evidenciaron cambios en la proliferación celular. |
| Brighton, et al. 2004 | Epifisis metacarpo-falángica de un bovino | 44.81 | 300 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ | 60 sinusoidal | 20 mV/cm | 7 y 14 | Se observó un incremento en la producción de agregan y colágeno tipo II con un CE de 20 mV/cm y un tiempo de estimulación 0.5 horas. |
| Brighton, et al. 2006 | Patela de una bovino | 44.81 | 300 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ | 60 sinusoidal | 20 mV/cm | 7 y 14 | Con 7 días de estimulación el incremento de PG fue del 26 %, mientras que el colágeno tipo II incremento un 14 %. Para 14 días de estimulación fue de 34 % y 71 % respectivamente. |
| Brighton, et al. 2008 | Rodilla de humano | 44.81 | 300 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ | 60 sinusoidal | 20 mV/cm | 7 y 14 | Con 7 días de estimulación el incremento de PG fue 1.8 veces y de colágeno tipo II de 1.7 veces comparado con el control. Para 14 días de estimulación fue 1.4 y 1.5 veces respectivamente. |
| Nakasuji, et al. 2009 | Rodilla de cerdo | ---- | ---- | 0.001 Cuadrada | 5 -10 - 25 - 50 mV/mm | ---- | Sin alterar la morfología de los condrocitos, se aumentó la proliferación celular y síntesis de moléculas de la MEC. |

3. Implementación de un autómata celular para simular la migración, proliferación y muerte celular de condrocitos articulares: Validación *in vitro*

3.1 Introducción

El cartílago articular es un tejido conectivo cuya función es proveer un bajo coeficiente de fricción y soportar cargas mecánicas entre las articulaciones^{3,4}. Las cargas mecánicas que soporta el cartílago articular, tales como tensión, compresión y cizallamiento, generan un desgaste interno alterando las propiedades morfológicas y funcionales del tejido^{5,71} (Ver **capítulo 2**). Debido a esto, se han implementado tratamientos terapéuticos para regenerar el cartílago articular lesionado. Entre estos están los tratamientos fisioterapéuticos para aliviar localmente el dolor⁶⁹, o las intervenciones quirúrgicas, tales como las microfracturas, la mosaicoplastia, la osteotomía y la IAC para reemplazar el tejido lesionado por nuevo cartílago articular^{1,71,72} (Ver **capítulo 2**). Uno de los tratamientos más utilizados hoy día es la IAC, el cual consiste en extraer condrocitos del cartílago articular del paciente y expandirlos a través de cultivos *in vitro*, con el objeto de obtener un número celular significativo. Una vez los condrocitos alcanzan su máxima confluencia, éstos son trasplantados en las zonas del tejido lesionado^{23,27,29}. En la IAC los cultivos celulares tienen muchas variables a considerar, tales como el tiempo de cultivo, la población celular y la síntesis molecular⁷³. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar métodos que permitan predecir la dinámica celular de los condrocitos: Migración, proliferación y muerte celular, con el objeto de optimizar los procedimientos *in vitro* y aumentar el éxito de la terapia sobre la recuperación del cartílago articular. La combinación de procedimientos experimentales con métodos computacionales, tales como el uso de autómatas celulares, pueden optimizar los protocolos *in vitro* para mejorar el rendimiento costo-eficiente de los procedimientos experimentales llevados a cabo en un cultivo celular^{74,75}.

Un autómata celular (AC) es un método computacional discreto que considera partículas que ocupan un área determinada. Las partículas se mueven aleatoriamente y cambian de estado dependiendo de su posición actual o del estado de las partículas vecinas^{75,76}. Para que el AC pueda simular la dinámica celular de los condrocitos:

Migración, proliferación y muerte celular, es necesario combinarlo con herramientas estocásticas que modelen y distribuyan homogéneamente las partículas en un espacio determinado⁷⁵. La teoría random-walk, es un proceso estocástico formado por una suma sucesiva de variables, independientes e idénticas, aleatoriamente distribuidas (distribución gaussiana)⁷⁷. Por lo tanto, dicha teoría es implementada en este trabajo, ya que hay evidencia en la literatura que indica que al combinar la implementación de un AC con la teoría random-walk, se puede simular la dirección aleatoria de la migración celular y modelar el número de células que proliferan durante la dispersión celular^{75,78}. Además, la teoría random-walk presenta ventajas con respecto a otros modelos, tales como los de difusión. Estos modelos, al simular la migración y proliferación celular, tienden a crear una variación suave en la densidad celular, evento que no ocurre fisiológicamente⁷⁸. Por otro lado, un AC puede predecir parámetros como población inicial-final, velocidad de movimiento y distribución espacial de las células. Dicha cuantificación es esencial para determinar la evolución espacio-temporal de un cultivo celular⁷⁹. Dado que un AC predice el comportamiento celular, esto ha dado cabida para que investigadores utilicen ésta herramienta para simular la dinámica celular. Por ejemplo, *Schönfisch*⁸⁰ implementó un AC para demostrar que la migración celular es una fluctuación aleatoria que no está relacionada con el área de la superficie, pero si depende de los parámetros iniciales establecidos, tales como población inicial y velocidad de desplazamiento. Por otro lado, *Pérez* y colaboradores⁷⁸ concluyeron que el comportamiento celular puede ser simulado a través de un AC, siempre y cuando los eventos aleatorios sean tenidos en cuenta utilizando herramientas estocásticas, por ejemplo, la teoría random-walk que evalúa el estado aleatorio de una célula. Con el objetivo de simular la dinámica celular de células musculares: Migración, proliferación y diferenciación, se implementó un AC basado en la teoría random-walk. Los resultados de este trabajo demostraron que a través de un AC se puede predecir el desempeño que tienen estas células para reparar y regenerar el tejido muscular⁷⁵. Para validar los resultados de un AC experimentos *in vitro* han sido llevados a cabo por varios investigadores^{75,78,81-84}.

Aunque se ha evaluado la dinámica celular en distintos tipos celulares utilizando modelos computacionales^{75,84}, no se han llevado a cabo estudios para evaluar la dinámica celular de los condrocitos. El objetivo de este trabajo se centró en caracterizar el comportamiento celular de condrocitos cultivados en monocapa. Por lo

tanto, se simuló la dinámica celular de los condrocitos usando un AC, basado en la teoría random-walk, para predecir la migración, proliferación y muerte celular. La información obtenida de este estudio es importante para optimizar las condiciones del cultivo de condrocitos articulares destinados a futuras estrategias terapéuticas en la ingeniería de tejidos. Dicha optimización es posible, ya que los datos experimentales y computacionales establecen los mejores tiempos de cultivo y el mejor pase celular para que los condrocitos puedan ser implementados en terapias como la IAC⁶⁶. Los pases de cultivo celular evaluados en este trabajo fueron el pase 1 y el pase 2. Estos pasajes indican la transferencia de los condrocitos, de una caja de cultivo a otra, una vez las células han alcanzado su máxima confluencia. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la tensión superficial con el objeto de asegurar que la distribución celular es completamente homogénea sobre toda la superficie de la caja de cultivo, ya que se ha reportado que las células cultivadas en monocapa tienden a ubicarse en las zonas laterales de la caja de cultivo celular⁷⁵.

El modelo computacional implementado, basado en un sistema clásico, incluye el movimiento aleatorio de las células, proliferación y muerte celular. La dinámica celular fue definida por una ponderación de probabilidades derivada de datos experimentales. Los resultados muestran que el comportamiento celular varía según el periodo de cultivo celular. Los periodos de cultivo evaluados en esta investigación van desde el día cero al día 4 (Fase Lag) y desde el día 4 hasta una semana (Fase Log). Por lo tanto, dependiendo si las células fueron recién cultivadas o proliferaron exponencialmente, las probabilidades del tiempo de cultivo difieren en porcentajes en el AC.

3.2 Materiales y métodos

Se implementó un análisis experimental y un modelo computacional para predecir la dinámica celular de los condrocitos: Migración, proliferación y muerte celular. El análisis experimental se realizó para evaluar la dinámica celular y validar el modelo computacional.

3.2.1 Análisis experimental

3.2.1.1 Cultivo celular

Condrocitos humanos obtenidos de la articulación de rodilla (LONZA, Walkersville, MD USA) fueron cultivados y expandidos en pasajes uno (P1) y dos (P2). Las células fueron cultivadas en una caja de cultivo celular de 96 pozos. La población inicial cultivada por pozo fue de 3.000 células (de acuerdo a las instrucciones establecidas por LONZA Walkersville, MD USA). El medio de cultivo se cambió cada dos días. Las células se mantuvieron en condiciones atmosféricas de 37°C con 5% de CO₂.

3.2.1.2 Ensayo de tensión superficial

Para evaluar el efecto de la tensión superficial sobre la distribución celular dentro del pozo, diferentes volúmenes de medio de cultivo fueron adicionados para formar un menisco cóncavo sobre la superficie del líquido (Figura 3-1). Diariamente se llevó a cabo un registro fotográfico, con una cámara de alta resolución, durante la semana de cultivo celular.

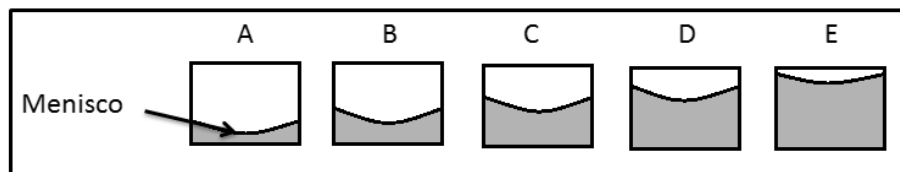


Figura 3-1: Esquema representativo para evaluar el efecto de la tensión superficial sobre la distribución celular. Se implementaron diferentes volúmenes de medio de cultivo por cada pozo. **A)** 50 μ l. **B)** 100 μ l. **C)** 150 μ l. **D)** 200 μ l. **E)** 250 μ l.

3.2.1.3 Ensayo de migración celular

La migración celular fue evaluada al tercer día de cultivo a través de un registro fotográfico con una cámara digital de alta resolución. Las fotos fueron capturadas cada dos horas para un periodo total de 12 horas. Para asegurar que las fotos siempre fueran tomadas en la misma ubicación del pozo, se colocó un punto de referencia en la base de la caja de cultivo celular.

3.2.1.4 Ensayo de proliferación y muerte celular

La proliferación celular fue evaluada una vez al día durante una semana. Para determinar la población celular se realizó una tripsinización diaria de tres pozos diarios y posteriormente se elaboró el conteo celular con un hemocitómetro. Para estimar la viabilidad y muerte celular, se empleó la técnica de tinción azul de tripan. En las células viables el azul de tripan no atraviesa la membrana celular, mientras que las células muertas se tiñen de azul y pueden ser cuantificadas bajo un microscopio de luz. La proliferación entre el P1 y el P2 fue comparada con los valores de la pendiente durante la fase Lag: desde el día 0 al día 4 de cultivo y para la fase Log desde el cuarto día hasta completar una semana de cultivo.

3.2.1.5 Análisis estadístico

Todos los análisis fueron llevados a cabo con un promedio $n = 3$. Los datos computacionales y experimentales obtenidos fueron analizados con estadística no paramétrica para cada punto de tiempo (0, 4, una semana). El test de Wilcoxon fue utilizado para analizar la migración y la proliferación celular. Por su parte, se usó el test de Kruskal-Wallis para analizar la muerte celular (GraphPad v.6.0, Software Inc., California USA). La diferencia entre la proliferación del P1 y P2 fue evaluada utilizando un test F entre los valores de las pendientes de cada curva de proliferación. Las diferencias estadísticas fueron consideradas significativas con un $p < 0.05$.

3.2.2 Implementación computacional

3.2.2.1 Algoritmo del autómatas celular

Para dar solución al AC se implementó el siguiente algoritmo (Figura 3-2). Primero se representó el modelo geométrico (área superficial y células cultivadas) y se trazó en un espacio bidimensional (plano x-y). En segundo lugar, se definió una población inicial de 3000 células distribuidas aleatoriamente en los 384.400 elementos que componen el área superficial del modelo geométrico. Cada elemento es ocupado solo una vez por cada célula. Una vez las células son distribuidas de forma aleatoria, mediante programación computacional se localizan los posibles vecinos de cada célula. Por último, el modelo considera un análisis computacional para establecer las

probabilidades de la migración (p_{mig}), proliferación (p_p) y muerte celular (p_{mc}). El algoritmo del AC y la visualización de los resultados fueron llevados a cabo usando FORTRAN 90 (Formula Translating System, New York, USA) y TECPLOT 360 (Tecplot Inc. Bellevue, WA USA).

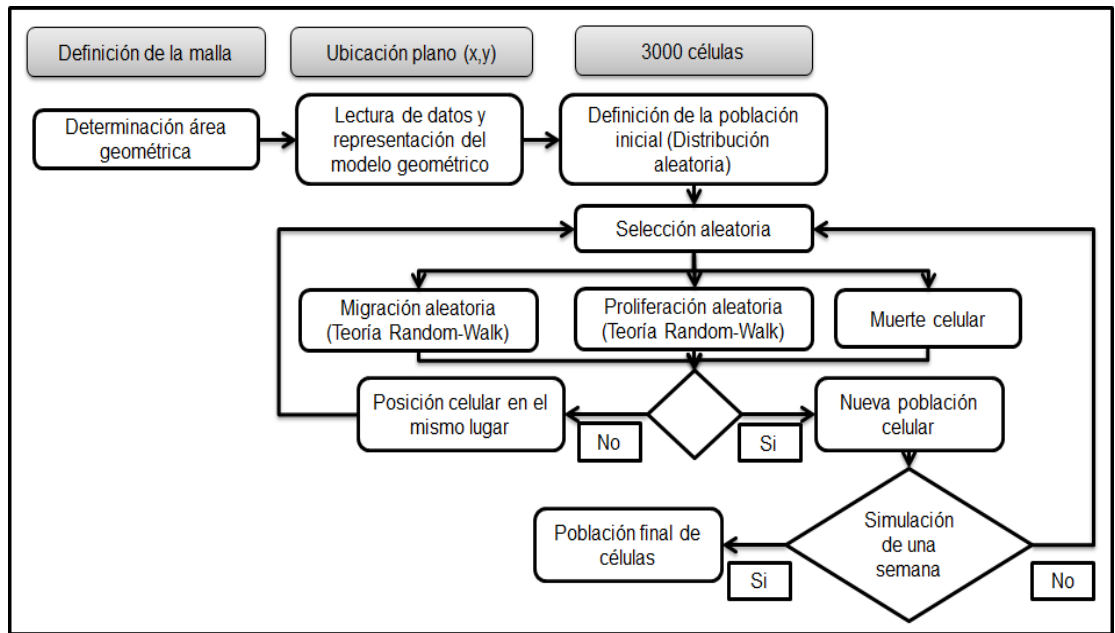


Figura 3-2: Algoritmo del autómeta celular.

3.2.2.2 Modelo geométrico: Morfología celular y área superficial

El área de un pozo de una caja de cultivo de 96 pozos fue representado como un círculo de 0.3 cm^2 (Figura 3-3 A). Esta área contiene una malla (Figura 3-3 B) donde cada elemento es de $10 \times 10 \text{ }\mu\text{m}$ (Figura 3-3 C), asumiendo que un condrocito cultivado en monocapa ocupa este espacio de acuerdo a la dimensión de la célula descrita en la literatura⁸⁵. Para simplificaciones del modelo computacional, la morfología celular fue asumida como un cuadrado dentro de un elemento.

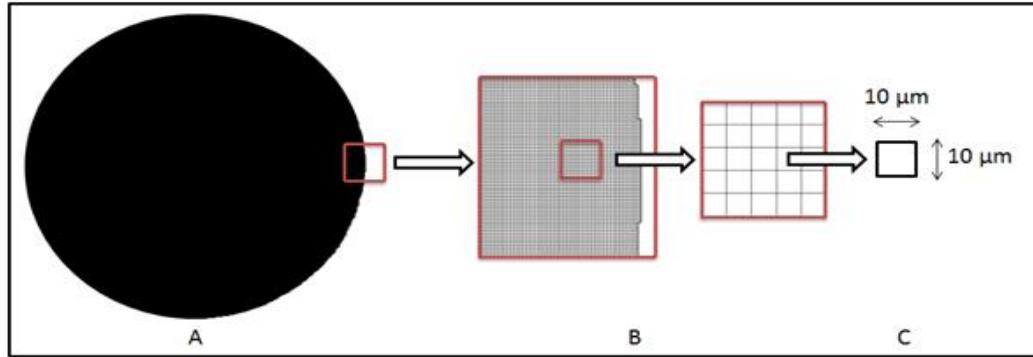


Figura 3-3: Modelo geométrico. **A)** Pozo de una placa de cultivo celular de 96 pozos con una área superficial de 0.3 cm^2 . **B)** Malla creada en Cubit 10.0 representando los elementos donde las células son cultivadas. **C)** Ampliación de la malla demostrando el área de cada célula cultivada, llamado elemento.

3.2.2.3 Estado celular

De acuerdo al modelo computacional las células pueden migrar, proliferar o morir. A esta dinámica celular se le denomina “estado celular”. Estos estados varían durante las fases Lag y Log. Se atribuyeron probabilidades con diferentes porcentajes a cada estado celular con el objeto de satisfacer la condición $\sum p = 1$, donde p depende de la probabilidad de migración (p_{mig}), probabilidad de proliferación (p_p) y probabilidad de muerte celular (p_{mc}), resultando en $\sum p = p_{mig} + p_p + p_{mc} = 1$. De acuerdo a la fase Lag o Log las probabilidades fueron ponderadas para cada estado celular.

3.2.2.4 Migración celular (p_{mig} , d_{mig} , e_d)

La migración celular fue modelada basándose en la teoría de random-walk^{75,78}. Además, dos parámetros fueron tenidos en cuenta: distancia de migración d_{mig} y espacio disponible e_d . Para el AC $d_{mig} = 10 \mu\text{m}$ de acuerdo a las dimensiones previamente descritas⁸⁵. Si la migración celular ocurre, el AC considera posibles elementos a ser ocupados (Figura 3-4). En este caso $e_d = 1, 2, \dots, 5$, ya que la célula puede migrar a los cuatro elementos disponibles o quedarse en el mismo sitio. De acuerdo a las probabilidades establecidas previamente, p_{mig} fue determinada para satisfacer la condición $\sum_{mig=1}^{e_d} P_{mig} = 1$. Si todas las posiciones adyacentes están disponibles $p_{mig} = 1/5$. Por otro lado, si solo un elemento está disponible, la probabilidad para ocupar ese elemento es de 1.

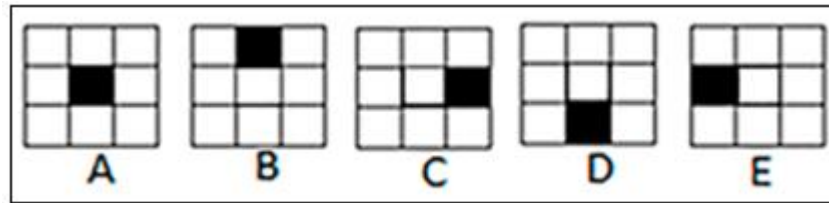


Figura 3-4: Migración celular basada en la teoría random-walk. **A)** En el estado celular inicial la célula puede migrar en las cuatro direcciones. **B)** Una célula migra al elemento de arriba. **C)** Una célula migra al elemento de la derecha. **D)** Una célula migra al elemento de abajo. **E)** Una célula migra al elemento de la izquierda. Debido a la optimización del AC las células no pueden migrar en sentido diagonal.

3.2.2.5 Proliferación celular (p_p)

La proliferación celular fue modelada usando la teoría random-walk^{75,78}. Ésta teoría propone un proceso estocástico el cual indica que la célula solo puede ocupar un elemento en particular de acuerdo a la p_p (Figura 3-5). Con el objetivo de satisfacer la condición $\sum_{p=1}^n p_p = 1$ las posiciones vacías son dadas por $n = 1, 2, \dots, 5$. Siguiendo el mismo esquema de la migración, si todos los elementos vecinos están disponibles la probabilidad de que una célula pueda proliferar y ocupar un elemento adyacente es de $1/5$. Por el contrario, si todos los elementos están ocupados, significa que no hay división celular. Como se describió en la migración, la ponderación de las probabilidades para p_p dependen de la fase en que se encuentra el cultivo celular: Lag o Log.

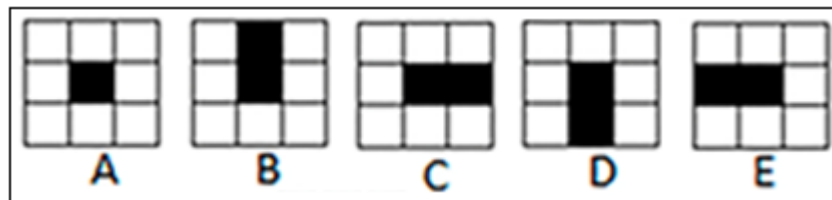


Figura 3-5: Proliferación celular de acuerdo a la teoría random-walk. **A)** En el estado inicial una célula puede proliferar en los cuatro espacios disponibles. **B)** Una célula prolifera al elemento de arriba. **C)** Una célula prolifera al elemento de la derecha. **D)** Una célula prolifera al elemento de abajo. **E)** Una célula prolifera al elemento la izquierda. Debido a la optimización del AC las células no pueden proliferar en diagonal.

3.2.2.6 Muerte celular (p_{mc})

La muerte celular fue modelada basándose en el porcentaje restante dependiendo de la fase Lag o Log respectivamente. Si una célula no migra ni prolifera, se determinó que la $p_{mc} = 1$ y si la célula permanece en el mismo sitio la $p_{mc} = 0$ (Figura 3-6).

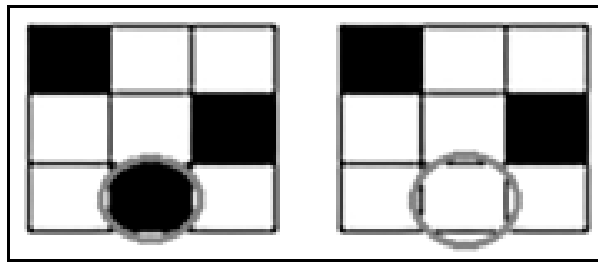


Figura 3-6: Probabilidad de muerte celular. Representación de la muerte celular dependiendo de la probabilidad restante. Una célula puede desaparecer dejando el espacio libre (elemento disponible).

3.3 Resultados

3.3.1 Análisis experimental

3.3.1.1 Tensión superficial

Los resultados del efecto de la tensión superficial sobre el cultivo celular muestran que la distribución celular de los condrocitos varía de acuerdo a la cantidad de volumen de medio de cultivo que se coloca dentro del pozo. Con el volumen más bajo (50 μ l) las células tienden a ubicarse a los bordes del pozo (Figura 3-7 A). Mientras que a mayor volumen (250 μ l) se distribuyen de forma homogénea dentro de todo el área del pozo (Figura 3-7 B).

3.3.1.2 Migración celular

La distribución aleatoria de los condrocitos sobre toda la superficie de la caja de cultivo celular se puede observar en la figura 3-8. Los óvalos de diferentes colores muestran el movimiento aleatorio que tiene los condrocitos dentro de la caja de cultivo celular.

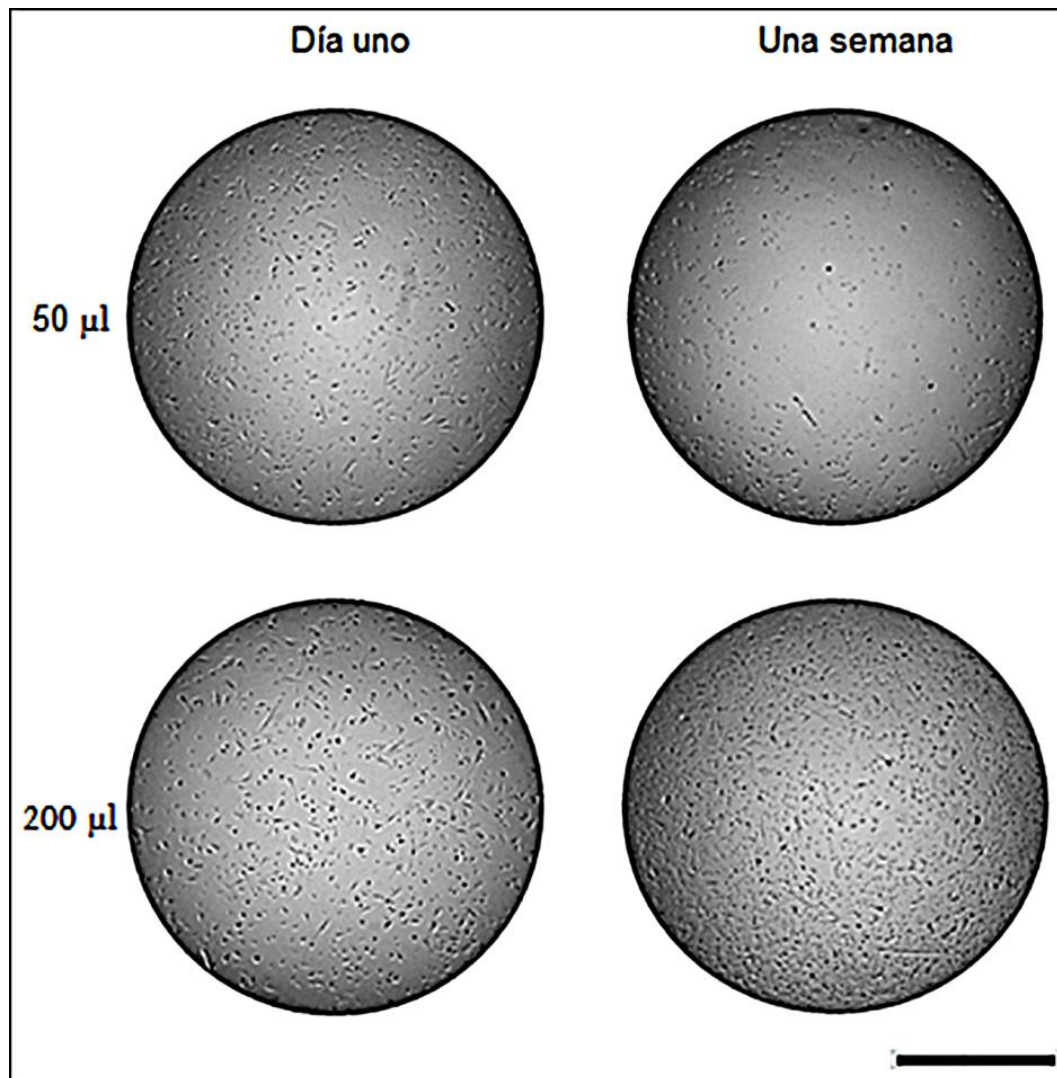


Figura 3-7: Efecto de la tensión superficial sobre la distribución celular. Esquema representativo de las células cultivadas a 50 μl y 250 μl de medio de cultivo. **A)** Distribución celular con 50 μl de medio de cultivo. **B)** Distribución celular con 250 μl de medio de cultivo.

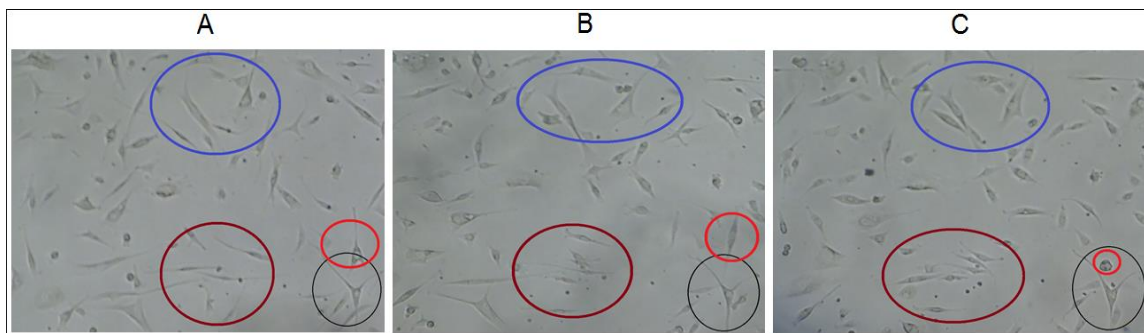


Figura 3-8: Migración celular para los pasajes de cultivo celular. Muestra representativa de la ubicación celular. **A)** Ubicación celular en el tiempo cero (8:00 am). **B)** Ubicación celular después de dos horas (10:00 am). **C)** Ubicación celular después de cuatro horas (12:00 m).

3.3.1.3 Proliferación celular

El aumento de la población celular difirió de acuerdo al pase de cultivo celular (Figura 3-9). Para el P1 la población celular final fue aproximadamente de 40.000 células (Figura 3-9 A), mientras que para las condrocitos cultivados en P2 el número celular final fue de 20.000 células (Figura 3-9 B).

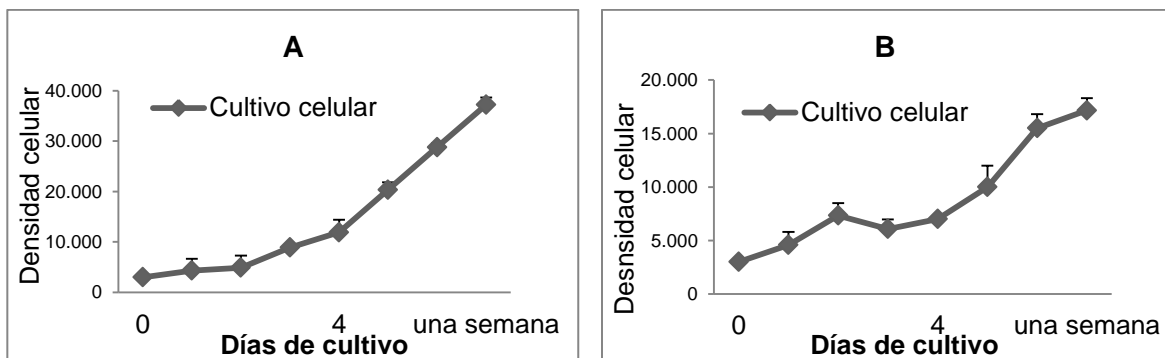


Figura 3-9: Curvas de proliferación del cultivo celular. **A)** Proliferación celular para el P1. **B)** Proliferación celular para el P2.

Adicionalmente, se observó una diferencia significativa al comparar el comportamiento de la proliferación celular para las fases Lag y Log, entre el P1 y el P2 (Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Comportamiento de la proliferación celular *in vitro* por hora entre P1 y P2. El comportamiento de proliferación de condrocitos para P1 y P2, en la fase Lag, fue determinada calculando los valores de la pendiente al día cero y al día cuatro de cultivo celular * $p = 0.004$.

Para la fase Log los valores de pendiente entre el día cuatro y una semana de cultivo fue significativamente alta *** $p = 0.0001$.

| | Fase Lag | Fase Log |
|-------------------|-----------------|-------------------|
| Pasaje uno | 93.19 ± 14.67 * | 351.70 ± 2.11 *** |
| Pasaje dos | 38.58 ± 9.23 * | 141.2 ± 9.26 *** |

3.3.1.4 Muerte celular

No se encontraron diferencias significativas durante el periodo de cultivo celular (Figura 3-10). Experimentalmente, la muerte celular fue evaluada a partir del segundo día de cultivo. La tasa más alta de mortalidad se registró al cuarto día de cultivo

celular un 8.7%. Luego, al pasar una semana de cultivo la muerte celular volvió a ser nula.

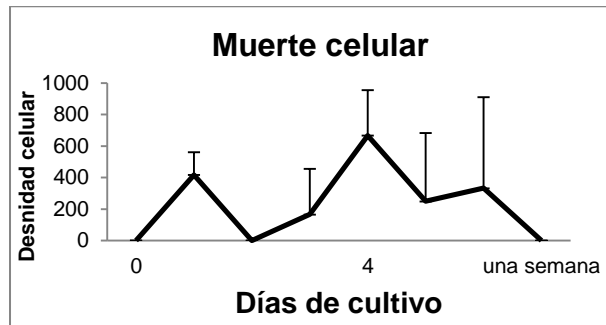


Figura 3-10: Determinación de la muerte celular *in vitro*. La muerte celular fue determinada para las células en P2.

3.3.2 Implementación computacional

3.3.2.1 Migración celular

Computacionalmente la migración celular se determinó mediante una ponderación de probabilidades (Tabla 3-2). Las células que fueron cultivadas en P1, durante la fase Lag, migraron con un porcentaje similar comparadas con las células del P2. Por el contrario, las células del P1 durante la fase Log disminuyeron el porcentaje de migración comparado con la fase Lag. Las células en P2 conservaron un porcentaje de migración similar a lo largo de la simulación.

Tabla 3-2: Estado de la migración celular. Ponderación de probabilidades para el P1 y P2.

| | Días de cultivo | Migración celular fase 1 | Migración celular fase 2 |
|-----------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| Fase Lag | 0 | 78% | 79% |
| Fase Log | 4 | 70% | 78% |
| | Una semana | 63% | 78% |

3.3.2.2 Proliferación celular

En la proliferación celular no se observaron diferencias significativas, para todos los tiempos de cultivo, en la comparación de los datos experimentales con los resultados computacionales (Figura 3-11). La distribución celular tanto para el cultivo celular como para el modelo computacional es homogénea y similar en toda la superficie del área de cultivo (Figura 3-12).

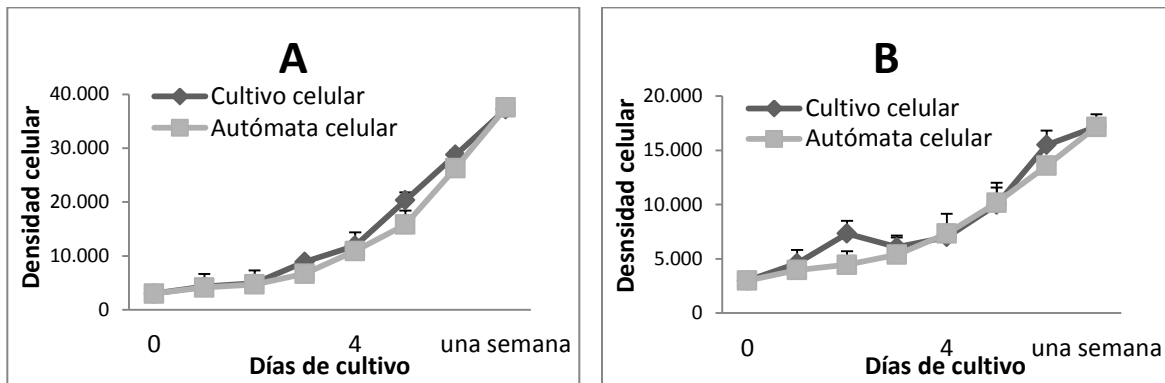


Figura 3-11: Curvas de proliferación entre el cultivo celular y el modelo computacional. **A)** Proliferación celular para el P1. **B)** Proliferación celular para el P2.

Computacionalmente, se determinó el porcentaje de proliferación para cada instante de tiempo durante toda la etapa de cultivo celular. Para el tiempo cero hasta 72 horas de cultivo se observaron porcentajes similares en la proliferación celular. El AC estimó que un 23% de las células proliferaron en P1. Un resultado similar se obtuvo para las células en P2 (18%). Sin embargo, al final del cultivo celular (una semana) el estado celular fue diferente con un 36% para las células en P1, y un 21% para las células en P2. Adicionalmente, el AC determinó diferencias notables en la proliferación celular entre P1 y P2 (Figura 3-13).

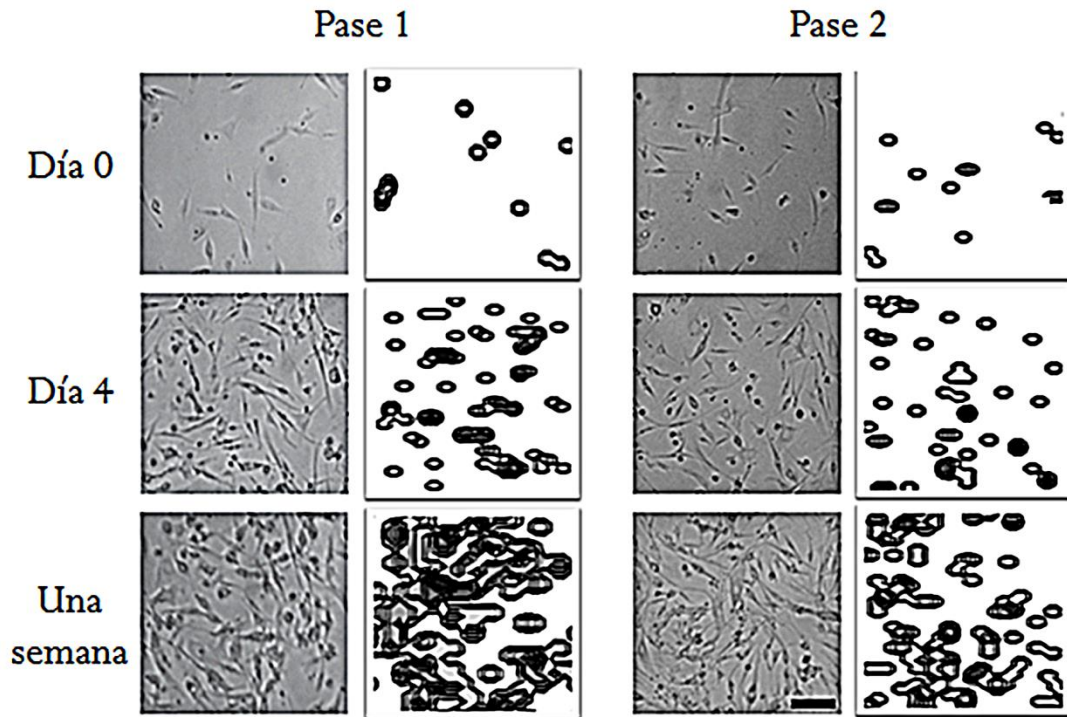


Figura 3-12: Comparación de la proliferación entre el cultivo celular y el modelo computacional. **A)** Esquema representativo de la distribución celular en P1. **B)** Esquema representativo de la distribución celular en P2. Escala de la barra = 100 μ m. Fotografías a 10 X de aumento.

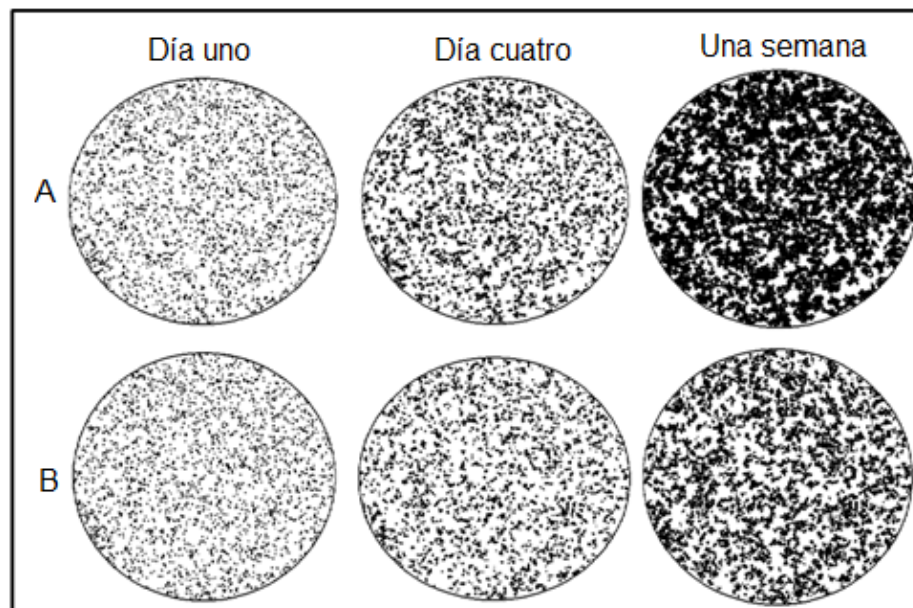


Figura 3-13: Expansión celular durante una semana de simulación. **A)** Distribución celular dentro del pozo de cultivo para el P1. **B)** Distribución celular dentro del pozo de cultivo para P2.

3.3.2.3 Muerte celular

El porcentaje obtenido computacionalmente muestra una tendencia decreciente para la muerte celular durante todo el periodo de cultivo celular (Tabla 3-3).

Tabla 3-3: Estado de la muerte celular. Porcentajes para P1 y P2.

| Días de cultivo | Muerte celular P1 | Muerte celular P2 |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0 | 5% | 5% |
| 4 | 2% | 2% |
| Una semana | 1% | 1% |

3.4 Discusión

Los resultados evidencian que un AC, basado en la teoría random-walk, es un modelo computacional que puede ser utilizado para mejorar los procedimientos de cultivo de condrocitos destinados a la reparación del cartílago articular. El modelo clásico utilizado para desarrollar el AC es suficiente para predecir la dinámica celular: Migración, proliferación y muerte celular. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los análisis del comportamiento celular *in vitro* son cruciales tanto para la investigación como para el control de calidad en la terapia celular⁸⁶. Por ejemplo, en una terapia celular como la IAC, que requiere de un gran número celular⁷³, varios procedimientos *in vitro* deben ser llevados a cabo. Por lo tanto, un análisis computacional podría ayudar a optimizar este requerimiento.

Computacionalmente, se puede predecir la dinámica celular a través de una ponderación de porcentajes. Por lo tanto, el comportamiento celular puede ser analizado por una herramienta computacional siempre y cuando los resultados *in vitro* retroalimenten el modelo. Gracias a una constante retroalimentación entre los resultados *in vitro* y la predicción del AC, el diseño experimental para el cultivo de condrocitos puede ser optimizado con el objeto de disminuir costos de cultivo y estandarizar los procedimientos cumpliendo con los requisitos de calidad^{73,84,87,88}. Adicionalmente, la implementación de un AC, en combinación con la teoría random-walk, muestra ventajas con respecto a otros modelos computacionales, tales como los modelos de difusión. Estos modelos al simular la migración y proliferación celular

tienden a crear una variación tenue en la densidad celular la cual no corresponde a las observaciones empíricas^{75,78,89}.

El modelo propuesto innova en el estudio de la dinámica celular de los condrocitos, incluyendo la muerte celular como una variable. Aunque modelos computacionales más sofisticados han sido utilizados, tales como los CPM (Cellular Potts Models) que tienen en cuenta la morfología celular⁹⁰. Este nivel de sofisticación no es necesario para evaluar la dinámica celular de los condrocitos. Además, tener en cuenta el cambio morfológico y tamaño de la célula, a través del modelo, resulta en un gasto computacional mayor y es evidente la dificultad de simular eventos como la fusión del citoplasma de las células adyacentes y el alineamiento del núcleo^{75,90}. Por lo tanto, el enfoque principal de esta investigación se centra en la IAC, la cual tiene como objetivo incrementar la población celular a través de técnicas *in vitro*.

Se compararon dos diferentes pasajes de cultivo celular y se observaron diferencias en la dinámica celular. Se realizaron cultivos celulares para condrocitos en P1 y P2 con el objeto de evaluar el tiempo de duplicación *in vitro* de un cultivo celular. Se observó que las células en P1 tienen una mayor tasa de proliferación comparadas con las células en P2 para ambas fases de cultivo: Lag y Log (ver Figura **3-11**). Esto se debe a que los cultivos celulares *in vitro* experimentan senescencia replicativa desde el P1⁹¹. Esto tiene implicaciones terapéuticas importantes, ya que el pasaje celular o la duplicación de población deben ser tomadas en cuenta para consideraciones de una terapia celular⁸⁶. Como complemento al estudio de la dinámica celular, se evaluó el efecto de la tensión superficial en la distribución celular. Esta variable es despreciable y no afecta la dispersión celular sobre la superficie de la caja de cultivo celular, a menos de las células sean cultivadas con volúmenes bajos de medio de cultivo. Por último, la muerte celular tuvo una tasa de mortalidad baja tal como se esperaba.

Como se mencionó anteriormente, la IAC requiere de una expansión celular a través de cultivos *in vitro*. Por esta razón, el AC se implementó en un ambiente bidimensional para simular de manera eficiente la dinámica celular de los condrocitos cultivados en monocapa. Adicionalmente, el uso de la teoría random-walk evidenció ser un método estocástico eficiente para simular eventos tales como la migración, proliferación y muerte celular. La teoría random-walk puede ser extrapolada para modelar e imitar

computacionalmente la formación de tejidos en un ambiente tridimensional (scaffolds). Por ejemplo, este método estocástico se ha utilizado para simular el movimiento aleatorio de células en un modelo 3D, con el objeto de predecir el crecimiento de nuevo tejido⁹²⁻⁹⁴. De acuerdo con esto, cada modelo computacional, ya sea 2D o 3D, puede utilizar el mismo método estocástico y obtener diferentes resultados. Además, con el objeto de validar el modelo, un diseño experimental debe ser implementado para cada caso. En este contexto, el AC implementado en este trabajo presenta una herramienta bidimensional novedosa para predecir el comportamiento individual de cada célula.

En conclusión, el AC es un modelo discreto que puede predecir la dinámica celular siempre y cuando haya una validación experimental. Como se resaltó previamente, los condrocitos requieren este tipo de evaluación para propósitos terapéuticos, ya que en terapias como la IAC se requiere de grandes cantidades de estas células para tratar enfermedades degenerativas que afectan el cartílago articular. Estos resultados son relevantes para el futuro de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Estas alternativas terapéuticas buscan mejorar los procedimientos de los cultivos celulares *in vitro* antes de la implantación⁷³, y esta optimización se puede mejorar con la ayuda de modelos computacionales tales como un AC.

4. Estimulación con campos eléctricos a condrocitos cultivados en monocapa: Evaluación de proliferación, muerte celular y síntesis de glicosaminoglicanos

4.1 Introducción

Como se mencionó en el **capítulo 2** el cartílago articular está expuesto a patologías degenerativas como la OA, y debido a su baja densidad celular el tejido no puede regenerarse por sí mismo. Por lo tanto, existe la necesidad de buscar alternativas terapéuticas para regenerar el cartílago articular. Se ha evidenciado que terapias, como la IAC, estimulan la producción de cartílago articular y aumentan la síntesis de moléculas características del cartílago articular^{66,95-97}. Sin embargo, la IAC es una terapia que, en su fase *in vitro*, toma bastante tiempo hasta que los condrocitos lleguen a su confluencia máxima para ser implantados en el paciente⁷³. Por lo tanto, en el **capítulo 2** se mostró que el uso de un estímulo biofísico, como los CEs, aumenta la proliferación celular y estimula la síntesis molecular^{23-31,98}. Desde el punto de vista terapéutico, ésta herramienta podría optimizar terapias como la IAC, ya que se obtendrían mayor cantidad de condrocitos y se implantarían en el cartílago articular lesionado en menos tiempo. Esto sería de gran impacto para aplicaciones futuras llevadas a cabo tanto por la ingeniería de tejido como por la medicina regenerativa.

Los estudios detallados que se muestran en la tabla **2-2**, evidencia la discrepancia que hay entre los resultados obtenidos por varios autores. Esto se debe a que hay una amplia variación en las intensidades del CE utilizadas para estimular los condrocitos (20 mV/cm hasta los 500 mV/cm)^{23,25-31}. Adicionalmente, los reportes en la literatura no evidencian el cálculo del CE, ya que no se han establecido las constantes eléctricas del medio de cultivo, tales como la permitividad y la conductividad, en el cual se encuentran cultivados los condrocitos. Dichas constantes eléctricas permiten caracterizar el medio de cultivo celular para calcular la intensidad de CE que estimula directamente a los condrocitos^{32,33}. Por otro lado, se desconoce el tiempo de estimulación eléctrica por día para alcanzar la mejor tasa de proliferación y síntesis de GAGs. Además, no se ha reportado la cantidad de días en los cuales los cultivos celulares necesitan estar bajo una estimulación con CEs. Sin embargo, datos como la

frecuencia y el tipo de onda están bien establecidos y fueron tomados en cuenta para el desarrollo de esta investigación^{23,25,27,30} (Ver tabla **2-2**).

El objetivo de este trabajo fue estimular condrocitos cultivados en monocapa con diferentes tiempos e intensidades de CE, reportados en la literatura^{23,25,30}, para establecer la mejor tasa de proliferación celular y síntesis de GAGs. En primer lugar, se estableció una metodología para encontrar las constantes eléctricas del medio de cultivo y poder calcular el CE que estimula directamente el cultivo celular. En esta etapa se construyó un capacitor coaxial que permitió estimar la capacitancia del medio de cultivo celular. La capacitancia fue utilizada para calcular la permitividad del líquido, y a través de una simulación computacional se estimó la conductividad, permitividad compleja del medio de cultivo y el CE que estimula directamente el cultivo celular. Por otro lado, se implementó un sistema de acople para generar y distribuir el CE dentro de la caja de cultivo celular. El sistema incluye la construcción de un circuito electrónico, basado en el puente de Wien, que genera las tensiones y frecuencia requeridas (50 – 100 V a 60 kHz). Dichas tensiones y frecuencia son utilizadas en este trabajo ya que generan el CE que aumenta la proliferación celular y estimula la síntesis de las principales moléculas del cartílago articular^{23,25,30}.

El análisis experimental y computacional llevado a cabo en ese trabajo fue de vital importancia ya que se hallaron, por primera vez, las constantes eléctricas del medio de cultivo celular donde están cultivados los condrocitos. Este hallazgo es relevante ya que permite analizar de forma más detallada la influencia de los CEs sobre la dinámica del cultivo celular: Proliferación, muerte celular y síntesis molecular de los condrocitos. Este análisis permite optimizar terapias como la IAC, enfocando el uso de los CEs ya sea en el aumento de la población celular o en la estimulación de moléculas que componen la MEC del cartílago articular. Dicha optimización puede ser utilizada en los tratamientos terapéuticos que se encargan de recuperar al cartílago articular cuando es afectado por patologías como la OA.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Aislamiento y cultivo de condrocitos

Ratas neonatas de dos días de nacidas se obtuvieron del Bioterio de la facultad de Farmacia y fueron sacrificadas en el laboratorio de Biomiméticos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Posteriormente, se aislaron los huesos humero, escápula y fémur. Los huesos fueron lavados con PBS (Phospahte Buffered Saline) más 2% de antibióticos (estreptomina y penicilina). El tejido fibroso y el músculo fueron separados cuidadosamente tanto de la epífisis como de la metáfisis. Luego, se obtuvo la epífisis y se segmentó en trozos pequeños aproximadamente de 4 milímetros cada uno. Los trozos fueron lavados con PBS + 2% de antibióticos. Para asegurarse de retirar el tejido conectivo circundante, los fragmentos de cartílago fueron sometidos a un proceso de doble digestión. En primer lugar, los fragmentos se colocaron en Ttipsyn/EDTA al 0.25% (LONZA, Walkersville, MD USA) durante 1 hora a 37°C. Luego, los trozos fueron colocados en colagenasa tipo I al 3% en HBSS (Hanks Buffered Saline Solution) por 4 horas a 37°C. Esta última digestión se realizó con el objeto de disgregar la MEC y obtener los condrocitos. La reacción de la colagenasa tipo I se inactivó con suero fetal bovino (SFB) al 20%. La solución fue homogenizada por pipeteo, filtrada con una membrana estéril de nylon para eliminar el tejido remanente y luego centrifugada durante 5 minutos a 1200 rpm. El líquido sobrenadante fue descartado y las células fueron suspendidas en 1 ml de medio de cultivo (DMEM-F12 suplementado con 50 µg/ml de ácido ascórbico, 100 µg/ml de piruvato de sodio, 1% de penicilina/estreptomina y 1% de SFB). Por último, la población y viabilidad celular se determinó por conteo a través de un hemocitómetro utilizando la técnica de tinción con azul de tripan. Las células fueron expandidas en cultivo hasta obtener la cantidad requerida para el experimento.

Para los ensayos se utilizaron células en pasaje 1. Los cultivos celulares se realizaron en cajas de cultivo celular de 6 pozos y en cada pozo se sembraron aproximadamente 45.000 células. Todos los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones atmosféricas de 37 °C con 5% de CO₂ y el medio de cultivo se cambió cada dos días. Este procedimiento se implementó tanto para los cultivos celulares que fueron estimulados con CEs como para los controles.

4.2.2 Caracterización del medio de cultivo celular y cálculo del campo eléctrico

Para caracterizar el medio de cultivo celular se realizaron pruebas experimentales y analíticas. En primer lugar, se diseñó y ensambló un capacitor coaxial de acero inoxidable para estimar la capacitancia del medio de cultivo (Figura 4-1).

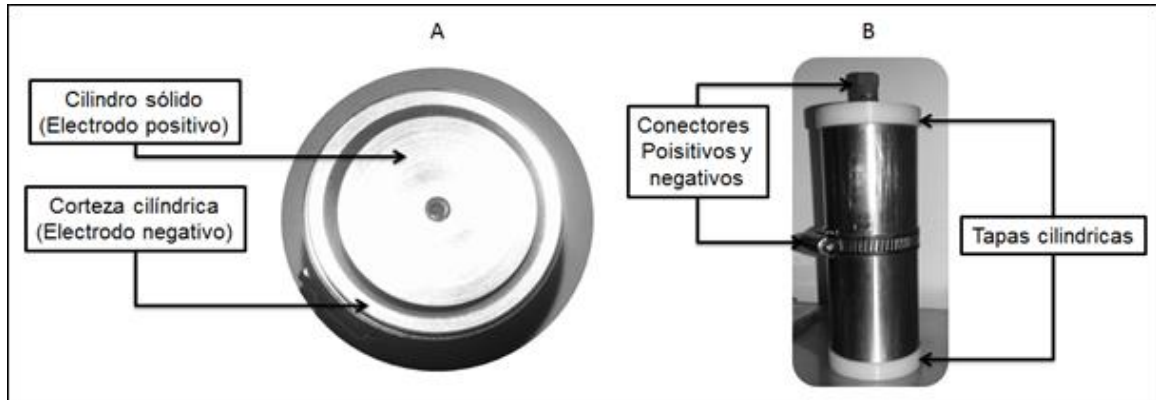


Figura 4-1: Diagrama esquemático del capacitor coaxial. **A)** El espacio entre el cilindro sólido y la corteza cilíndrica es aproximadamente de 4 milímetros. Dicho espacio se llena con el medio de cultivo celular. **B)** Las tapas cilíndricas son ubicadas tanto en la parte de superior como en la base del capacitor coaxial. Dos conectores (positivo y negativo) se colocaron para unir los electrodos al medidor RLC.

La capacitancia en vacío almacenada en la placa interior del capacitor coaxial (C_0) se calculó aplicando la Ley de Gauss (ecuación 4.1)⁹⁹ a la superficie cilíndrica del capacitor coaxial (Figura 4-1 A). Los parámetros utilizados para construir el capacitor coaxial se encuentran descritos en la tabla 4-1. Las dimensiones del capacitor coaxial se encuentran en el **Anexo A**.

$$C_0 = \frac{2\pi\epsilon_0 L_c}{\ln(r_{ext}/r_{int})} \quad 4.1$$

Para estimar la capacitancia del medio de cultivo C_{mc} se colocaron aproximadamente 40 mililitros del medio entre el cilindro sólido y la corteza cilíndrica (Figura 4-1 A), y usando un medidor RLC automático (Fluke 6306 RCL meter, Eindhoven, The Netherlands) se halló dicha constante.

Tabla 4-1: Parámetros para calcular la capacitancia del capacitor coaxial.

| Permitividad el vacío (ϵ_0) | Longitud del capacitor coaxial (L_c) | Radio interno (r_{int}) (electrodo positivo) | Radio externo (r_{ext}) (electrodo negativo) |
|--|--|--|--|
| $8,85 \times 10^{-12} F/m$ | $0,15 m$ | $0,0186 m$ | $0,02464 m$ |

Las medidas se realizaron a frecuencias de 10 a 100 kHz en pasos de 10 kHz. Posterior a esto, implementado la ecuación **4.2**⁹⁹, característica de un condensador coaxial, y usando el parámetro de C_{mc} hallado previamente, se calculó el valor de la permitividad relativa del medio de cultivo ϵ_{mc} .

$$\epsilon_{mc} = \frac{C_{mc} \ln(r_{ext}/r_{int})}{2\pi \epsilon_0 L_c} \quad \mathbf{4.2}$$

Debido a que el cultivo celular está sometido a un CE, esto hace que se generen diferentes eventos físicos y químicos dentro del medio de cultivo celular, haciendo que el medio se comporte como un material dieléctrico³². Para determinar qué tipo de comportamiento tiene el medio de cultivo, es necesario estimar la permitividad compleja del líquido ϵ_{jmc} (ecuación **4.3**)⁹⁹, ya que esta hace referencia a las pérdidas calóricas cuando el líquido es sometido a un CE.

$$\epsilon_{jmc} = \epsilon_{mc} - j\epsilon_{mc} \quad \mathbf{4.3}$$

La parte real ϵ_{mc} hace referencia a la permitividad relativa del medio de cultivo, hallada con la ecuación **4.2**. Esta constante está asociada al almacenamiento de cargas eléctricas. Dependiendo la magnitud de la ϵ_{mc} , al aplicar un CE al medio de cultivo celular, éste líquido se polariza y varía el CE interno⁹⁹. Por otro lado, la parte imaginaria $j\epsilon_{mc}$ describe todos los mecanismos de pérdida en el dieléctrico cuando es sometido a un CE con una frecuencia dada⁹⁹.

Para determinar el CE dentro de la caja de cultivo celular se implementó un sistema capacitivo (Figura **4-2**). En primer lugar, se midió la resistencia de dicho sistema capacitivo usando un medidor automático RCL. Utilizando la resistencia del sistema capacitivo se hallaron las funciones de reactancia e impedancia del medio de cultivo celular. En segundo lugar, se hizo una simulación electromagnética por elementos

finitos del montaje. En esta simulación se realizó una variación paramétrica de las constantes de conductividad del medio de cultivo σ_{mc} y permitividad compleja ϵ_{jmc} que intervienen en el montaje capacitivo (Plexiglás y medio de cultivo celular). La simulación se realizó usando el software de simulación electromagnética por elementos finitos COMSOL Multiphysics (Comsol Inc. Los Angeles, USA).

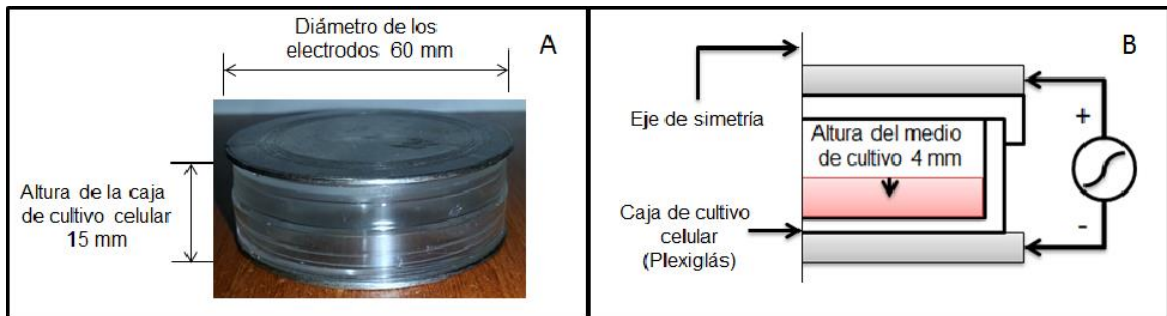


Figura 4-2: Esquema representativo de un capacitor de placas paralelas para determinar el CE. **A)** Esquema capacitivo utilizado para hallar determinar el CE en vacío. **B)** Esquema capacitivo para determinar el CE con medio de cultivo celular.

4.2.3 Dispositivo de estimulación eléctrica

El dispositivo utilizado para estimular eléctricamente los cultivos celulares está compuesto de dos partes (Figura 4-3). La parte A, consistió en ubicar los electrodos de acero inoxidable (Tipo 303), los soportes de acrílico y las placas de cultivo celular (Figura 4-3 A). Los electrodos se colocaron en soportes de acrílico para eliminar cualquier contacto con la superficie de la incubadora. Adicionalmente, se soldaron dos terminales (positivo y negativo) para conectar las salidas de tensión del circuito electrónico (Puente de Wien - Ver **Anexo B**). La parte B, consistió en el diseño de un sistema de acople para generar el CE y estimular los cultivos celulares (Figura 4-3 B). Una fuente dual (Dual source, HM-20, Ceif, UN) energiza el circuito electrónico oscilador para generar tensiones de 50 y 100 V a una frecuencia de 60 kHz. Las tensiones y frecuencia utilizadas en este trabajo fueron escogidas en base a las reportadas en la literatura para estimular la proliferación de los condrocitos y la síntesis de GAGs^{23,27}. Adicionalmente, se utilizó un osciloscopio (Tektronix, TDS 1002, USA) para verificar la señal antes y después de la estimulación eléctrica.

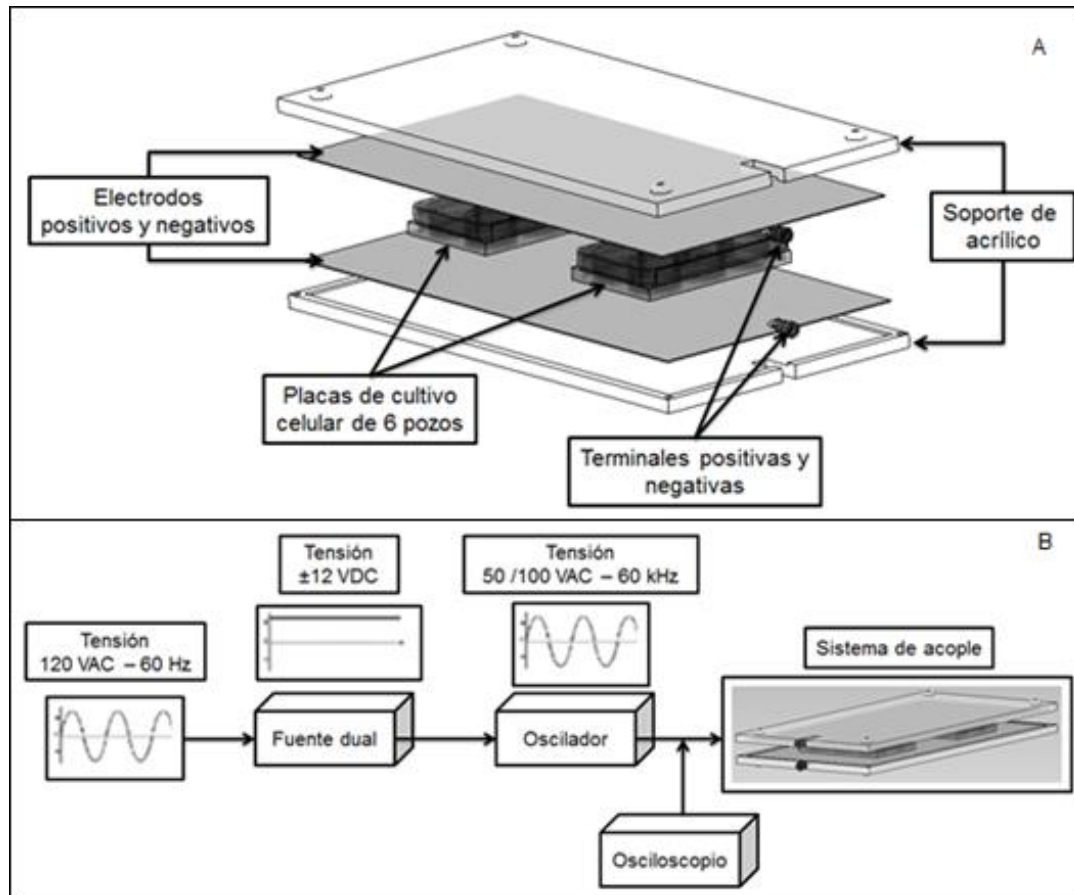


Figura 4-3: Diagrama esquemático de la posición de los electrodos y el sistema de acople para estimular los cultivos celulares. **A)** Esquema empleado distribuir de forma homogénea el CE en los cultivos celulares. **B)** Sistema de acople empleado para generar, distribuir y monitorear el CE óptimo aplicado al cultivo celular.

4.2.4 Ensayo de estimulación eléctrica

Los cultivos celulares estimulados fueron expuestos a CEs de 4 y 8 mV/cm a 60 kHz (onda sinusoidal). La estimulación eléctrica se llevó a cabo por un periodo de 7 días con un CE continuo durante 30 minutos, 1 y 5 horas por día^{23,25,27,30}. Los cultivos celulares de control fueron incubados de la misma forma que los cultivos estimulados, excepto que los electrodos no fueron conectados a la fuente de tensión (oscilador) (Figura 4-3B). Tanto los electrodos como la parte inferior y superior de las cajas de cultivo celular fueron cubiertas con un gel conductor de electricidad para eliminar cualquier espacio de aire y distribuir CE sobre toda la superficie de la caja de cultivo celular^{23,25-30}.

4.2.5 Ensayo de proliferación y muerte celular

La proliferación celular fue evaluada una vez al día durante una semana. Para determinar la población celular se realizó tripsinización de tres pozos diarios y posteriormente se elaboró el conteo celular con un hemocitómetro. Para estimar la viabilidad y muerte celular, se empleó la técnica de tinción azul de tripan. La proliferación celular entre los cultivos celulares estimulados y los controles fue comparada con los valores obtenidos cada dos días.

4.2.6 Cuantificación de glicosaminoglicanos

La cantidad de GAGs producida por cada una de las células, tanto de los cultivos celulares estimulados como de los controles, fue estimada en el medio de cultivo a través de un ensayo colorimétrico denominado 1-9-dimetilmetileno a 31 μM y un pH de 0.8. Las muestras fueron tomadas cada 48 horas después de estimular con CEs a los cultivos celulares. Todas las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro (BioSpec 1601, Shimadzu) a una longitud de onda de 520 nm. La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración preparada con estándares de condroitin sulfato 0 a 35 $\mu\text{g/ml}$ frente a blanco de reactivo¹⁰⁰.

4.2.7 Análisis estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo con un promedio $n = 3$. El crecimiento de población celular se analizó a través de un ANOVA. El modelo basa su análisis en evaluar la significancia individual de los datos. En caso de que los datos mostraran significancia, se realizaron pruebas estadísticas de verificación para hacer uso del modelo. Las pruebas estadísticas fueron: Análisis de varianzas, test F, test Shapiro-Wilk y test Durbin-Watson. Los datos que no cumplieron con los supuestos mencionados, fueron analizados mediante una estadística no paramétrica a través de un test F que comparara las pendientes de las curvas de proliferación. Este mismo test fue utilizado para analizar la muerte celular. Para analizar la síntesis de GAGs, se implementó un ANOVA de un factor para identificar la diferencia entre los grupos, adicionalmente, se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Además, se realizaron comparaciones pareadas utilizando test DMS. Las diferencias significativas fueron consideradas significantes con un $p < 0.05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterización del medio de cultivo celular y cálculo del campo eléctrico

La capacitancia el medio de cultivo (C_{mc}) hallada con el capacitor coaxial, y permitividad relativa (ϵ_{mc}) calculada con la ecuación 4.2 se encuentran en la tabla 4-2. Estas variables fueron calculadas con una frecuencia de 60 kHz. Sin embargo, dichas constantes pueden variar según la frecuencia aplicada. Por tal motivo, ésta variables fueron halladas desde 10 hasta 100 kHz en pasos de 10 kHz. Los resultados se encuentran listados en el **Anexo C**.

Tabla 4-2: Propiedades eléctricas del medio de cultivo celular.

| Medio de cultivo celular | Frecuencia (kHz) | C_{mc} (nf) | ϵ_{mc} |
|--------------------------|------------------|---------------|-----------------|
| DMEM-F12 | 60 | 30,66 | 402,4 |

El esquema implementado para determinar el CE dentro de la caja de cultivo celular (Figura 4-2) permitió encontrar la resistencia y reactancia tanto de la caja de cultivo celular en vacío (Plexiglás) como del medio de cultivo celular. Las constantes de resistencia y reactancia a diferentes frecuencias (1 – 100 kHz) se encuentran en el **Anexo C**. Utilizando dichas constantes se determinaron computacionalmente las constantes de conductividad y permitividad compleja tanto en vacío como con medio de cultivo celular (σ_{mc} y ϵ_{jmc}). Todas las constantes eléctricas mencionadas se encuentran en la tabla 4-3. Como se mencionó en la sección 4.2.2 la ϵ_{jmc} depende de una parte real y una imaginaria, por lo tanto, en el resultado que se muestra en la tabla 4-3 permite observar el valor para cada una de estas variables.

Tabla 4-3: Constantes eléctricas en vacío y con medio de cultivo celular.

| | Resistencia (K Ω) | Reactancia (Ohms) | Impedancia (Z ₀) | Conductividad σ (S/m) | Permitividad ϵ |
|------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Plexiglás | 900 | j17,34X10 ⁻¹² | 900- j17,34X10 ⁻¹² | 6,2X10 ⁻⁹ | 3,5 |
| DMEM F-12 | 751,4 | j20,92X10 ⁻¹² | 751,4- j20,92X10 ⁻¹² | 200X10 ⁻³ | 402,4 – j25000 |

La distribución del CE en todo el sistema capacitivo tanto para la caja de cultivo celular en vacío como con medio de cultivo celular se encuentra en la figura 4-4 A. Esta simulación integra las constantes de los materiales obtenidas en el paso previo. Para un tensión aplicada pico 100 V el CE es de 8 mV/cm. Consecuentemente, el CE que estimula el cultivo celular con una tensión pico de 50 V es de 4 mV/cm (Figura 4-4 B).

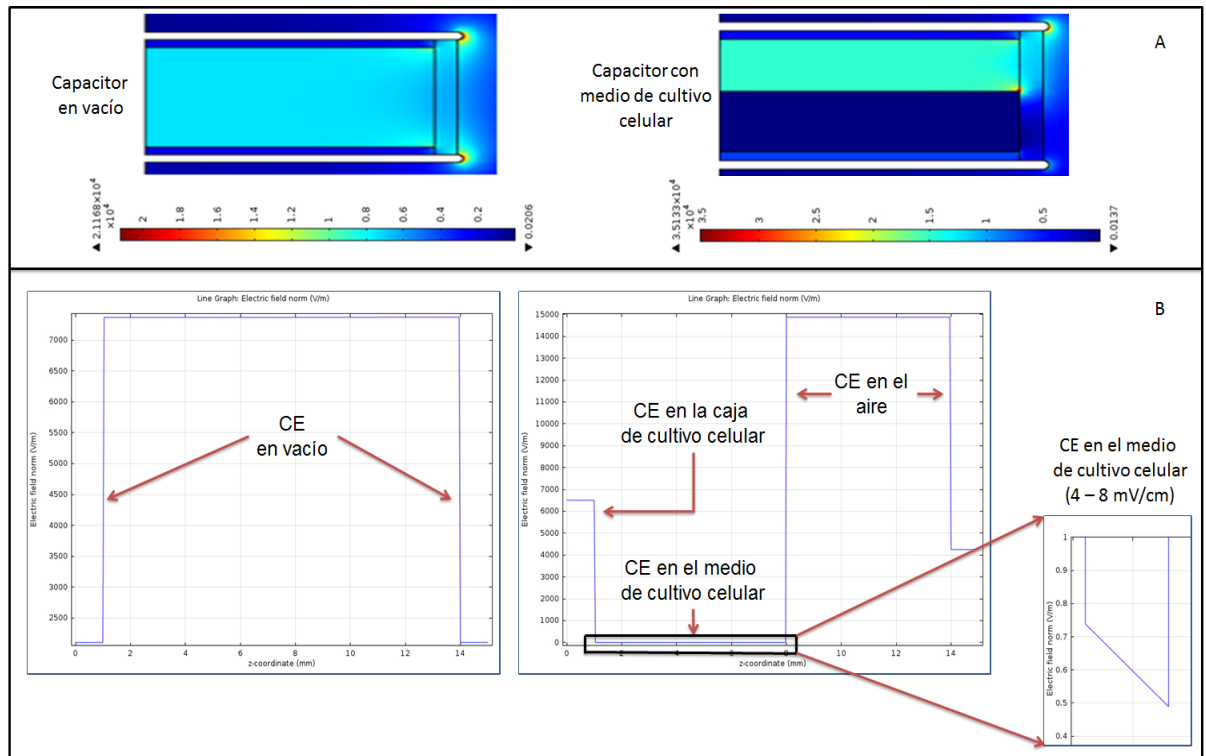


Figura 4-4: Distribución y estimación del CE dentro de la caja de cultivo celular en vacío y con medio de cultivo celular. **A)** Distribución del CE obtenida usando una simulación por elementos finitos. En la parte izquierda se observa el sistema capacitivo en vacío, mientras que en la parte derecha se observa el capacitor con medio de cultivo celular. **B)** Visualización del CE en una línea vertical que recorre el espacio entre las placas del sistema capacitivo. En la parte izquierda se observa el capacitor en vacío, mientras que en la parte derecha se observa el capacitor con medio de cultivo celular. En el esquema se puede observar la disminución del CE debido a la alta constante dieléctrica y conductividad del medio de cultivo.

4.3.2 Proliferación y muerte celular

A través de los ensayos experimentales se demostró que para obtener una duplicación de población se debe tener en cuenta la intensidad del CE, el tiempo de estimulación por día y el tiempo de cultivo en horas. En éste trabajo, la combinación

de dichos parámetros para obtener una duplicación en la proliferación celular fue: CE = 4mV/mm, tiempo de estimulación por día = 30 minutos y tiempo de cultivo = 96 y 144 horas. Con los parámetros establecidos, la proliferación celular del cultivo celular estimulado en el primer caso (4 mV/cm – 30 minutos – 96 horas) fue de 195.000 células, mientras que para el control fue de 98.333 respectivamente. Resultados similares se observaron para el segundo caso (4 mV/cm – 30 minutos – 144 horas) donde la población en el cultivo celular estimulado fue de 275.000, mientras que para el control fue de 178.333 células (Figura 4-5). Por otro lado, al aplicar CEs de 4 y 8 mV/cm durante 1 hora no se evidenció cambios en la población celular tanto en los cultivos celulares estimulados como en los controles. Sin embargo, los cultivos celulares estimulados con CEs de 4 y 8 mV/cm durante 5 horas inhibieron por completo la proliferación celular (Figura 4-5). Todos los resultados obtenidos del análisis estadístico realizado a la proliferación celular se encuentran en el **Anexo D**.

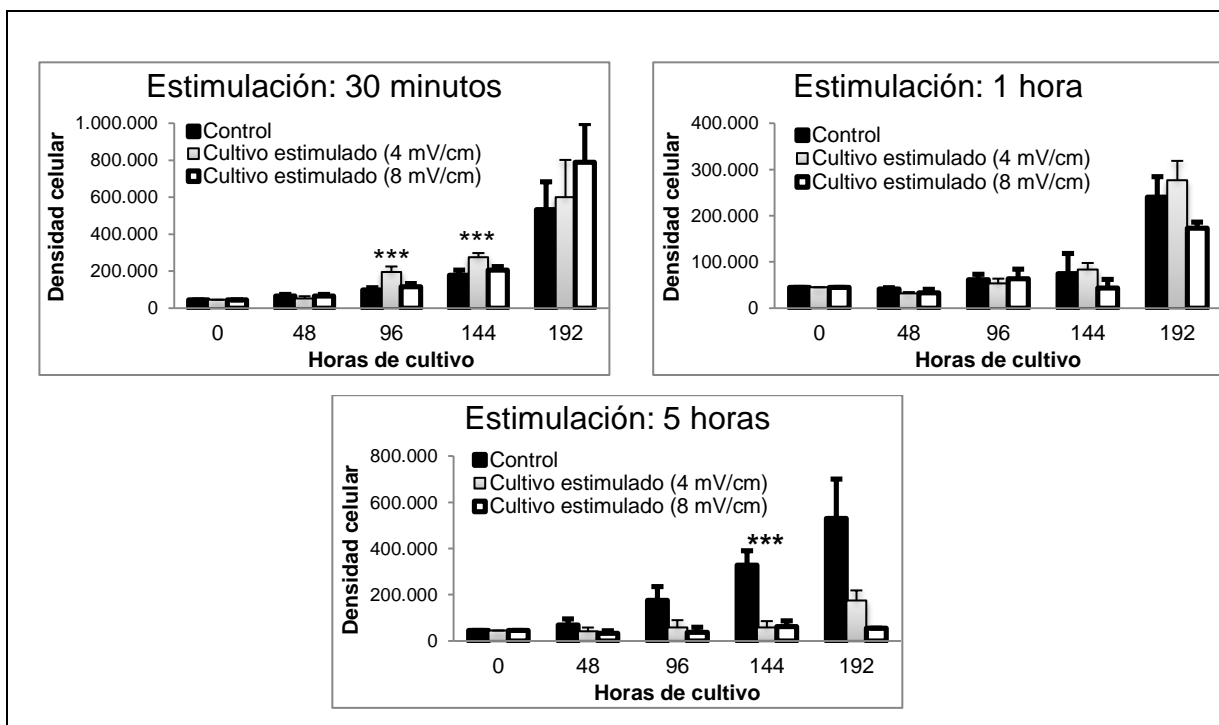


Figura 4-5: Proliferación de los cultivos celulares estimulados durante 30 minutos, 1 hora y 5 horas vs. Controles. Estadísticamente se encontraron diferencias significativas al aplicar un CE de 4 mV/cm durante 30 minutos a las 96 horas ($p = 0.002868^{***}$) y 144 horas ($p = 0.003792^{***}$) de cultivo celular. Además, un comportamiento similar se observó al estimular con CEs de 4 y 8 mV/cm ($p = 0.00006436^{***}$) durante 5 horas a las 144 horas de cultivo celular.

En el análisis de muerte celular, los cultivos celulares estimulados con CE de 4 y 8 mV/cm durante 30 minutos, 1 hora y 5 horas no evidenciaron diferencias significativas comparadas con los controles (Figura 4-6). Los resultados del análisis estadístico realizado a la muerte celular se encuentran listados en el **Anexo E**.

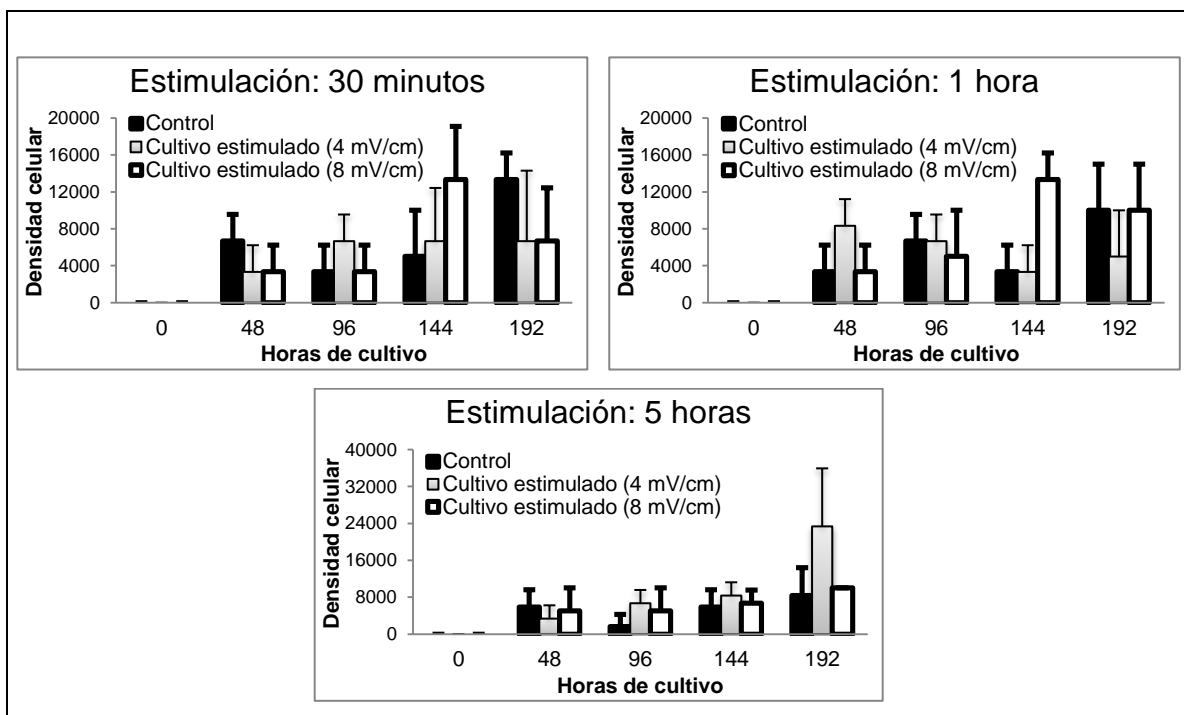


Figura 4-6: Determinación de la muerte celular entre los cultivos estimulados y los controles.

4.3.3 Síntesis de glicosaminoglicanos

La cantidad total de GAGs producida por cada célula tanto de los cultivos celulares estimulados como de los controles se muestra en la figura 4-7. La síntesis de GAGs producida por los controles tiene a decrecer a medida que el cultivo celular avanza en el tiempo. Un comportamiento similar se observa en los cultivos celulares estimulados con CE de 4 y 8 mV/cm durante un periodo de 30 minutos y 1 hora. Sin embargo, los cultivos celulares estimulados con un CE de 8 mV/cm durante un periodo de 5 horas evidenciaron un aumento en la síntesis de GAGs comparado tanto con los controles como con los cultivos celulares que fueron estimulados con un CE de 4 mV/cm durante el mismo periodo de tiempo. Los resultados del análisis estadístico realizado a la síntesis de GAGs se muestran en el **Anexo F**.

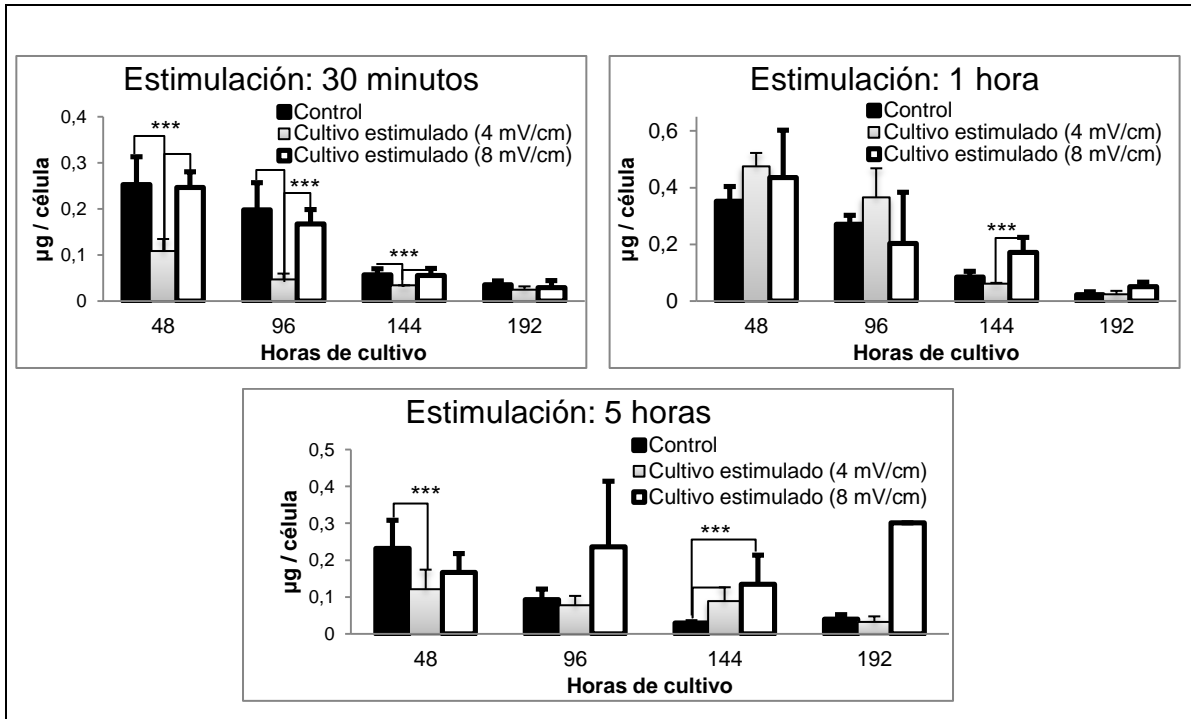


Figura 4-7: Producción de GAGs por célula de los cultivos celulares estimulados y los controles.

A) Concentración de GAGs de los cultivos celulares estimulados durante 30 minutos vs. Controles. **B)** Concentración de GAGs de los cultivos celulares estimulados durante 1 hora vs. Controles. **C)** Concentración de GAGs de los cultivos celulares estimulados durante 5 horas vs. Controles. Estadísticamente hubo diferencias significativas entre los datos con un $p < 0.05^{***}$.

4.4 Discusión

El objeto principal de esta investigación fue evaluar el efecto de un CE sobre condrocitos cultivados en monocapa. Los resultados evidenciaron que diferentes intensidades de CE y tiempos de estimulación por día aumentan la proliferación de condrocitos, inhiben la capacidad proliferativa de las células o estimulan la síntesis de GAGs. Este hallazgo es relevante, ya que si el objetivo es incrementar la población celular, se debe aplicar un CE de 4 mV/cm durante un periodo de tiempo de 30 min. Pero si se desea estimular la síntesis de GAGs, se debe aplicar un CE de 8 mV/cm durante 5 horas. Por lo tanto, una adecuada estimulación eléctrica podría ser llevada a cabo para optimizar el comportamiento celular de los condrocitos durante cultivos *in vitro*. De acuerdo con esto, terapias tales como la IAC podrían enfocarse en la reparación del cartílago articular desde diferentes puntos de vista.

Con el objeto de establecer apropiadamente las condiciones de estimulación eléctrica, se realizó la caracterización eléctrica del medio de cultivo celular. Dicha caracterización permitió establecer por primera vez las constantes eléctricas del medio líquido en el cual permanecen cultivados los condrocitos. La conductividad es una medida que establece la capacidad de un material para dejar circular corriente a través de él. En cuanto la conductividad hallada del medio de cultivo ($\sigma_{mc} = 200 \times 10^{-3} \text{ S/m}$) se puede decir que es un material conductor, ya que el líquido presenta una baja resistencia ($R_{mc} = 0,782 \Omega$). Dicho comportamiento se esperaba, ya que los líquidos que están compuestos por sales como magnesio, sodio y calcio, Ej: el medio de cultivo celular, permiten que el material conduzca de manera más eficiente la corriente³². Si el medio de cultivo es sometido a un CE, se genera una disociación de los iones positivos y negativos de dichas sales, permitiendo que la corriente eléctrica fluya a través del líquido. Otra constante eléctrica hallada en éste trabajo fue la permitividad del medio de cultivo ($\epsilon_{mc} = 402,4$). Esta propiedad indica que, dependiendo su magnitud, al aplicar un CE el material se polariza y anula el CE interno^{32,99}. Según los resultados obtenidos, la permitividad del medio de cultivo es relativamente alta. Por lo tanto, al aplicar un CE el medio líquido se polariza generando una intensidad baja de CE dentro del cultivo celular (4 y 8 mV/cm). Adicional a esto, si la permitividad es alta, la capacitancia del medio de cultivo aumenta. En nuestro estudio ésta relación se cumple, ya que al medir la capacitancia del medio de cultivo en el capacitor coaxial se obtuvo $C_{mc} = 30,66 \text{ nf}$, esto indica que la carga eléctrica es almacenada en un CE de baja intensidad.

Debido a la concordancia de las propiedades eléctricas del medio de cultivo y las intensidades de CE obtenidas, se puede hacer una correlación con los datos reportados en la literatura a nivel celular. Por ejemplo, se ha evidenciado que los CEs actúan directamente en la membrana celular incrementando los niveles de calcio a nivel intracelular, esto permite que la célula se despolarice y permita la activación de varias funciones celulares^{98,101}. En condrocitos, el aumento en los niveles de calcio ha evidenciado cambios en la dinámica celular tales como migración, aumento en la proliferación celular e incremento en la síntesis de moléculas que componen la MEC del cartílago articular^{24,102,103}.

Los análisis experimentales realizados mostraron que el comportamiento celular se ve afectado tanto por el CE como por el tiempo de estimulación. En cuanto a la proliferación, solo se observaron incrementos frente al control utilizando un estímulo de 4 mV/cm durante 30 minutos, esto concuerda con los reportes en la literatura desde el punto de vista de tiempo de estimulación eléctrica^{23,25,30}. Adicionalmente, se observó que exponer el cultivo celular a periodos más largos de estimulación (5 horas), las células perciben una inhibición en la proliferación ya que la población celular se mantiene estable durante toda la etapa de cultivo celular (Figura 4-5). Este hallazgo contrasta con lo observado por otros autores, quienes han reportado aumento en la proliferación celular con 24 horas de estimulación continua^{26,28,29}. Por último, como se observó en la figura 4-6 los CEs no influyen en el proceso de apoptosis.

A través de los ensayos experimentales se demostró que para obtener una duplicación de población se debe tener en cuenta la intensidad del CE, el tiempo de estimulación por día y el tiempo de cultivo en horas. En conclusión, un cultivo celular estimulado bajo estas condiciones permite observar mejorías con respecto a los cultivos de control. En cuanto a la intensidad de CE hallado en este trabajo, hay diferencias con lo que se ha reportado en la literatura. *Brighton* y colaboradores en la mayoría de sus trabajos reportaron un CE de 20 mV/cm, mientras que *Nakasuji* reporto CEs de 5 – 10 – 25 – 50 mV/mm (Ver tabla 2-2). En nuestro caso, tenemos CEs de 4 y 8 mV/cm. Por lo tanto, los datos obtenidos no son comparables. Esto se debe a que los autores mencionados no evidenciaron el cálculo del CE utilizado. Por lo tanto, esta investigación hace que el análisis detallado que se utilizó para hallar las constantes eléctricas del medio de cultivo, genere resultados más prometedores y exactos.

La síntesis de GAGs varía según la intensidad de CE aplicado. Para los cultivos celulares de control y los que fueron estimulados con CEs de 4 y 8 mV/cm durante 30 minutos y 1 hora presentaron una disminución en la síntesis de GAGs (Figura 4-7). Se ha reportado que los condrocitos cultivados en monocapa inician un proceso de diferenciación, el cual implica cambios morfológicos. Los condrocitos pasan de tener un fenotipo circular, morfología característica de un condrocito, a tener una morfología alargada similar a un fibroblasto¹⁰⁴. Además, este evento se ha asociado a la

disminución en la producción de moléculas características de la MEC del cartílago articular, tales como los GAGs. Por otro lado, si el cultivo de condrocitos es sometido a un CE de 8 mV/cm durante un periodo de 5 horas al día, la síntesis de GAGs se mantiene estable durante todo el periodo de cultivo (Figura 4-7). Este comportamiento coincide con la inhibición de la proliferación celular. Con base en este resultado, es posible plantear la hipótesis de que estimular cultivos celulares con un CE de 8 mV/cm durante 5 horas permite mantener al condrocito en estado de quiescencia, favoreciendo que éste mantenga su morfología natural y continúe la producción de moléculas de interés. Aunque dicha suposición no fue comprobada en éste estudio, el aumento de GAGs al aplicar CEs durante largos periodos de tiempo en el día también ha sido evidenciado por otros autores^{26,28,29}.

En conclusión, la estimulación eléctrica es una herramienta que permite controlar los procesos de proliferación celular y síntesis molecular de los condrocitos. Sin embargo, cada uno de esos procesos depende tanto de la intensidad del CE como del tiempo de estimulación. Por lo tanto, si se obtiene una integración de estos parámetros se puede obtener una regulación equilibrada tanto en la población celular como en la síntesis de GAGs. Esto permitiría optimizar los procedimientos *in vitro* para que los condrocitos tengan una mejor respuesta al ser utilizados en alguna terapia celular llevada a cabo ya sea por la ingeniería de tejidos o la medicina regenerativa.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Este trabajo presenta la evaluación de la dinámica celular de condrocitos cultivados en monocapa tanto computacional como experimentalmente. Los resultados permiten concluir que a través de un AC se puede predecir la dinámica celular de los condrocitos cultivados en monocapa: Migración, proliferación y muerte celular. Sin embargo, para validar los resultados obtenidos por la simulación es necesaria una retroalimentación experimental. Por otro lado, en ésta primera parte se evaluó el comportamiento de los condrocitos en diferentes pasajes de cultivo (P1 y P2). Los resultados obtenidos indican que los condrocitos cultivados en P1 presentan una mejor actividad celular, ya que la proliferación celular es aproximadamente el doble comparada con los cultivos en P2. Por lo tanto, usar condrocitos que presenten menor senescencia replicativa mejora la respuesta de diferentes procedimientos terapéuticos como la IAC. En conclusión, si se combinan los modelos computacionales con las validaciones experimentales, se pueden optimizar los procedimientos *in vitro*. Esto permite que los condrocitos tengan una mejor respuesta en los procedimientos terapéuticos llevados a cabo por la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

Por otro lado, la dinámica celular de los condrocitos fue evaluada bajo una estimulación con CEs. Como el objetivo principal era encontrar el CE que incrementa la proliferación celular y estimula la síntesis de GAGs, la caracterización de las propiedades eléctricas del medio de cultivo celular fue relevante en este trabajo. El hallazgo de las propiedades eléctricas del medio de cultivo celular: Resistencia, capacitancia, conductividad y permitividad compleja permitieron por primera vez establecer el CE que incrementa la proliferación de los condrocitos y estimula la síntesis de moléculas como los GAGs. Por otro lado, el esquema implementado para estimular los cultivos celulares permite concluir, que para aumentar la proliferación celular se necesita un CE de 4 mV/cm, un tiempo de estimulación de 30 minutos por día y un periodo de cultivo celular no mayor a seis días. Mientras que para estimular la síntesis de GAGs, se necesita un CE de 8 mV/cm, un tiempo de estimulación de 5 horas por días y un periodo de cultivo celular de una semana. Éste último esquema

también tiene implicaciones a nivel celular, ya que inhibe tanto el proceso de mitosis como el de apoptosis.

En conclusión, las estimulaciones eléctricas permiten controlar la dinámica celular de condrocitos cultivados en monocapa: Proliferación, muerte celular y síntesis molecular. Además, si se emplean los parámetros de entrada adecuados, tales como la intensidad de CE y el tiempo de estimulación por día, se pueden obtener respuestas deseadas, ya sea en el aumento de la población celular o en la síntesis molecular. Esto permite enfocar la estimulación eléctrica de acuerdo a la terapia requerida optimizando los procedimientos *in vitro* enfocados hacia la regeneración del cartílago articular.

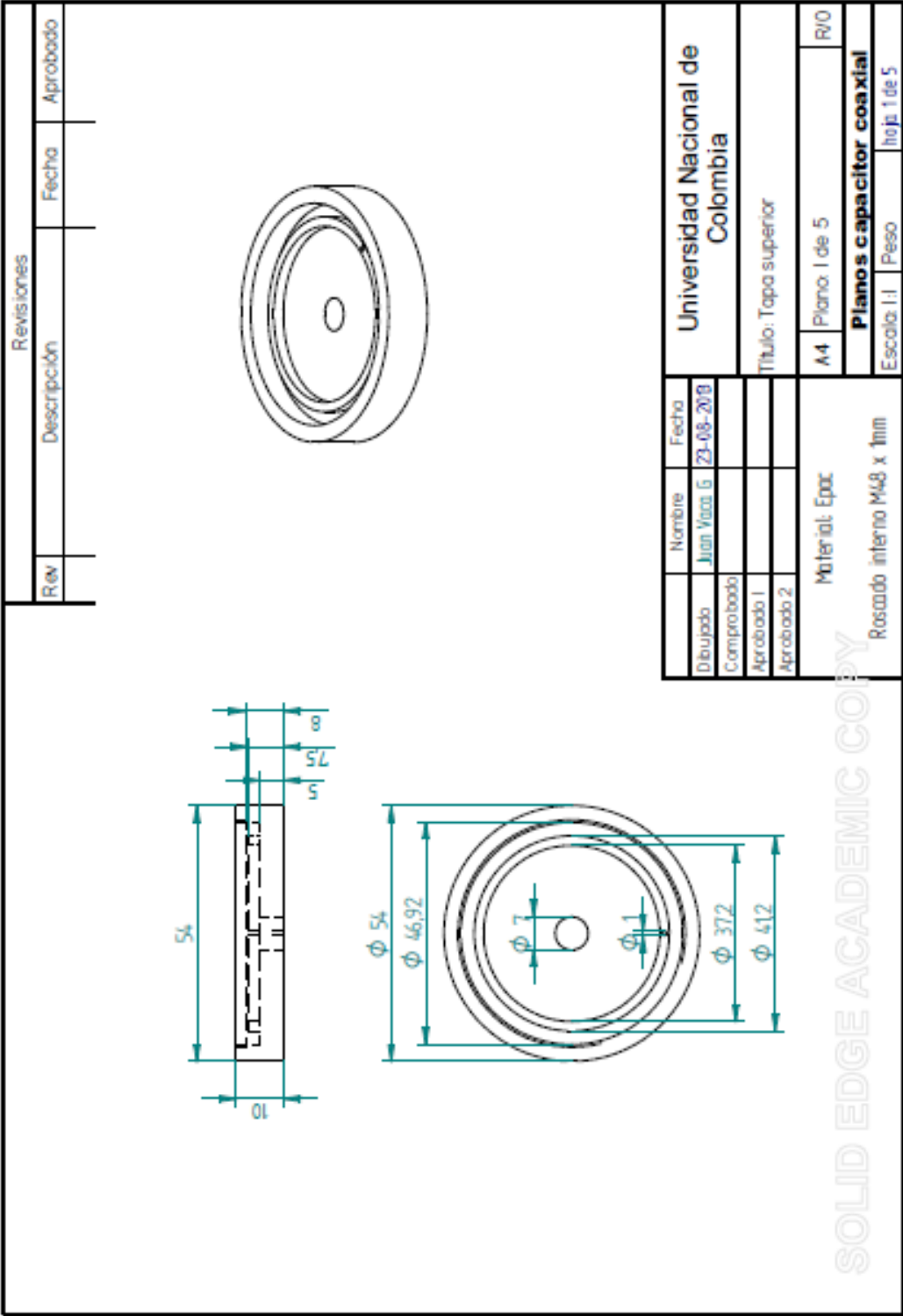
5.2 Recomendaciones

Debido a que los condrocitos cultivados en monocapa tienden a cambiar de morfología durante el periodo de cultivo, la implementación de un modelo computacional que prediga el fenotipo adquirido durante el proceso *in vitro* ayudaría a entender la dinámica celular de la célula. Además, se podría complementar dicho modelo al contemplar las variables moleculares que están interactuando en dicho proceso.

Los principales hallazgos de esta investigación muestran que los condrocitos cultivados en monocapa incrementan la síntesis de GAGs al aplicar un determinado CE. Por lo tanto, realizar un análisis más detallado de la síntesis de moléculas como el colágeno tipo II y agregar en presencia de un CE permitiría complementar éste estudio.

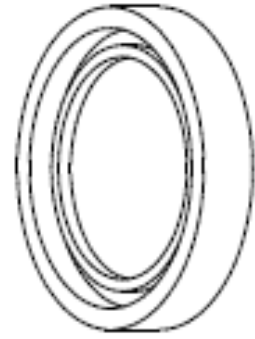
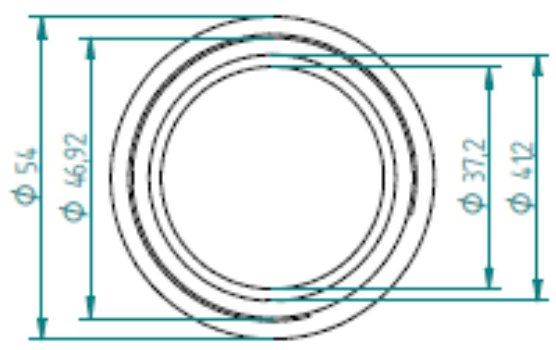
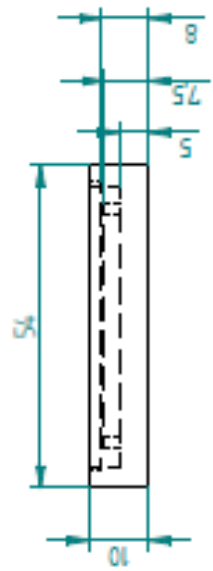
De acuerdo a los hallazgos positivos en esta investigación, se evidencio que los CEs aumentan la población celular y estimulan la síntesis de moléculas como los GAGs. Sin embargo, para evitar que el condrocito cambie su morfología circular y siga expresando las moléculas características del cartílago articular, estas células podrían ser cultivadas en constructos tridimensionales. Por lo tanto, evaluar el efecto de los CEs en condrocitos cultivados en un constructo tridimensional sería relevante para evaluar la dinámica de los condrocitos y el rol dentro MEC del cartílago articular.

A. Anexo: Planos del capacitor coaxial



SOLID EDGE ACADEMIC COPY

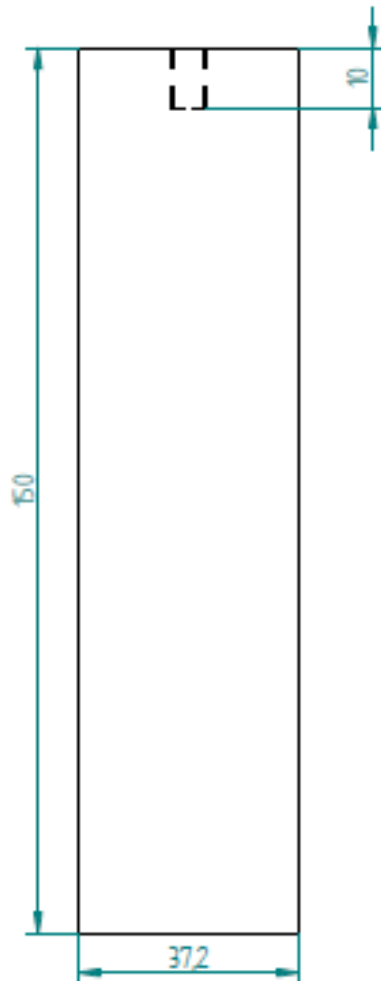
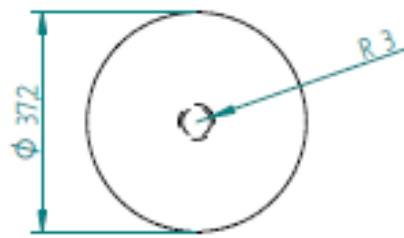
| Revisiones | | |
|------------|-------------|----------|
| Rev | Descripción | Aprobado |
| | | |



| | |
|----------------------------------|---------------------|
| Universidad Nacional de Colombia | |
| Título: Tapa inferior | |
| A4 | Plano: Plano 2 de 5 |
| R00 | |
| Planos capacitor coaxial | |
| Escala: 1:1 | Peso |
| Hoja 2 de 5 | |

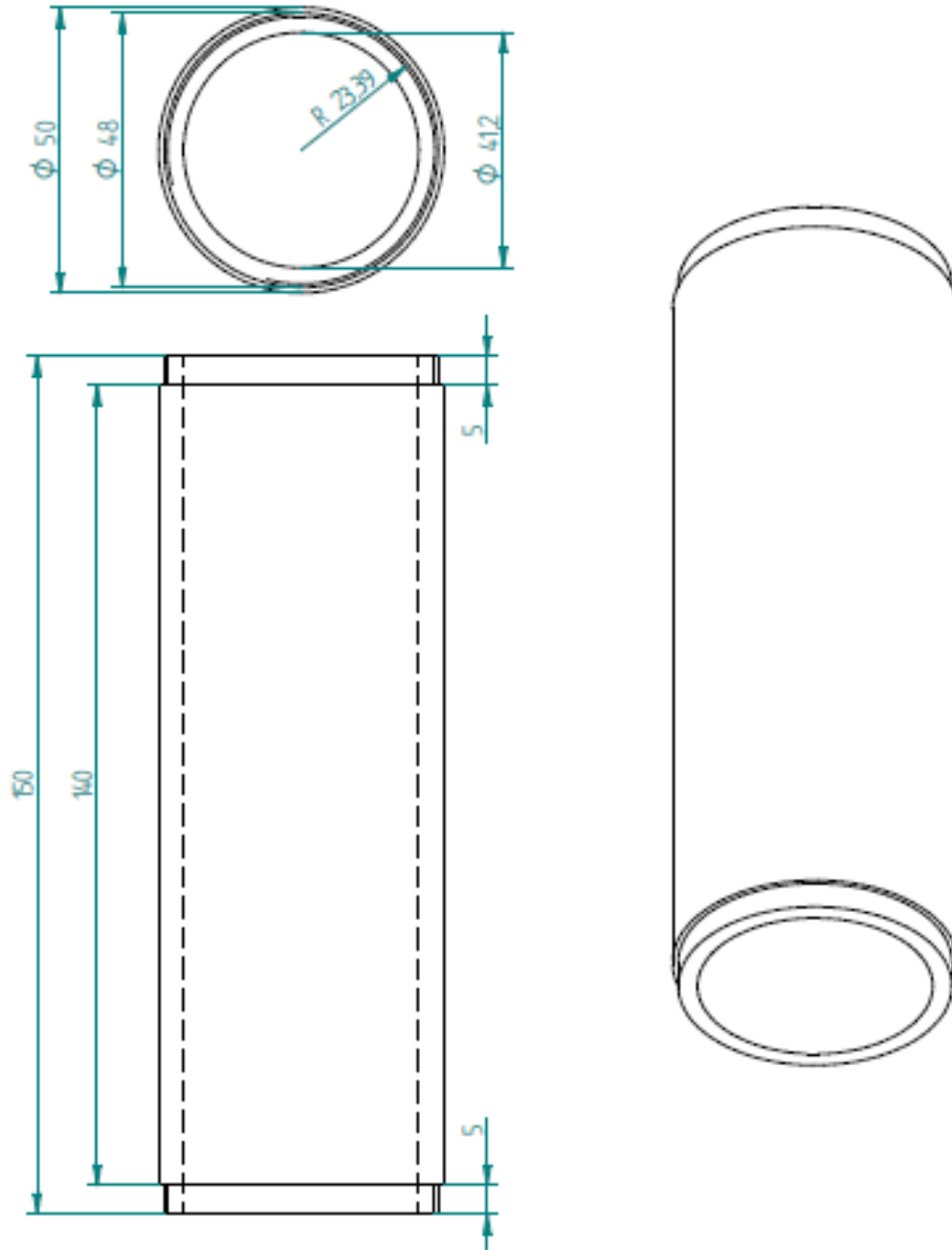
Material: Epac.
Rosca interna M4-8 x 1 mm

SOLID EDGE ACADEMIC COPY



| | Nombre | Fecha | Universidad Nacional de Colombia | |
|--|--------------|------------|---|---------------|
| Dibujado | Juan Vasco G | 23-08-2013 | Titulo Electrodo positivo (Cilindro interior) | |
| Comprobado | | | | |
| Aprobado 1 | | | | |
| Aprobado 2 | | | | |
| Material: Acero inoxidable Rosca interna M6 | | | A4 | Plano: 3 de 5 |
| | | | Palnos capacitor coaxial | |
| | | | Escala: 1:1 | Peso |
| | | | Hoja 3 de 5 | |

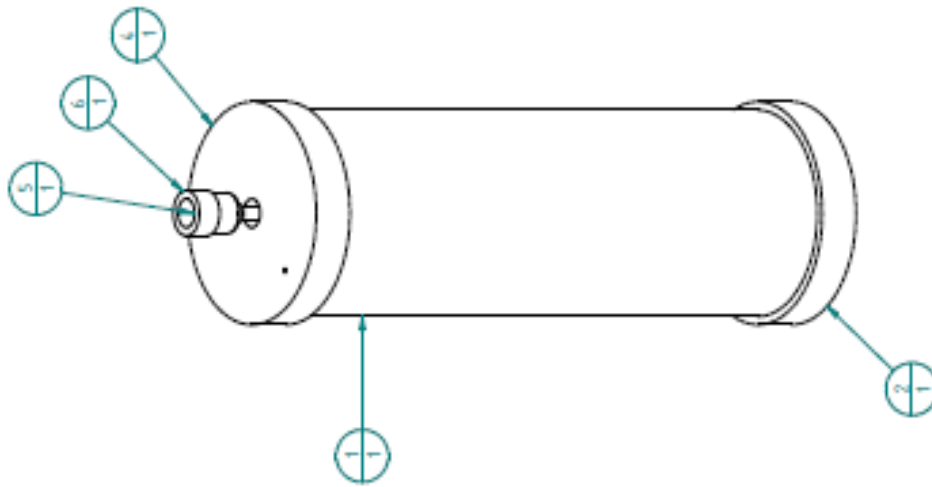
SOLID EDGE ACAD



| | Nombre | Fecha | Universidad Nacional de Colombia | | |
|--|-------------|------------|--|---------------|-----|
| Dibujado | Juan Vaca G | 23-08-2018 | Titulo: Electrodo negativo (Cilindro exterior) | | |
| Comprobado | | | | | |
| Aprobado 1 | | | | | |
| Aprobado 2 | | | | | |
| Material: Acero inoxidable Rosca externa M48 X 1 mm | | | A4 | Plano: 4 de 5 | R/O |
| Planos capacitor coaxial | | | | | |
| Escala: 1:1 | | Peso | | Hoja 4 de 5 | |

SOLID EDGE ACADEMY

| Revisiones | | |
|------------|-------------|-------|
| Rev | Descripción | Fecha |
| | | |
| | | |



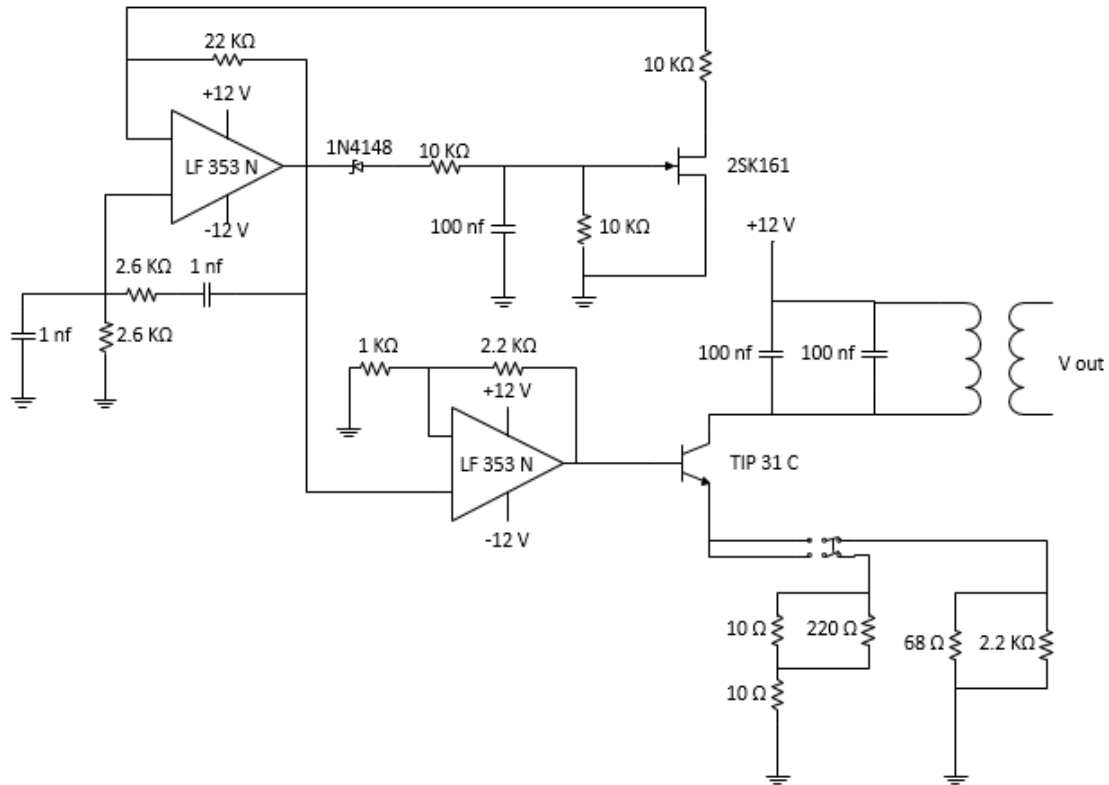
| Número de elemento | Nombre del elemento | Autor | Cantidad |
|--------------------|---------------------|-------------|----------|
| 1 | Tubo externo | Juan Vaca 6 | 1 |
| 2 | Tapabuse | Juan Vaca 6 | 1 |
| 3 | Cilindro interior | Juan Vaca 6 | 1 |
| 4 | Taparriba | Juan Vaca 6 | 1 |
| 5 | Bornel | Juan Vaca 6 | 1 |
| 6 | Bornel-rojo | Juan Vaca 6 | 1 |

| | | | | |
|--|---|---------|--|-------------|
| | Nombre | Fecha | Solid Edge ST Siemens PLM Software | |
| | Ejcs | 29/5/16 | | |
| | Comprobado | | | |
| | Aprobado 1 | | | |
| | Aprobado 2 | | Título | |
| | Salvo indicación contraria cotas en milímetros ángulos en grados tolerancias ±0,5 y ±P | | Plano | Rev |
| | | | Escala | Hoja 1 de 1 |

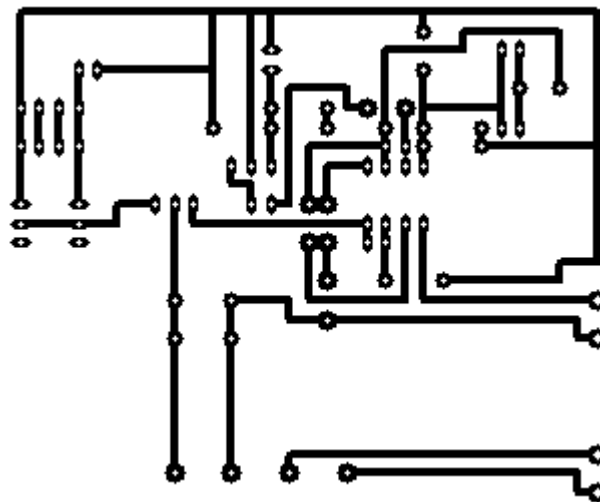
SOLID EDGE ACADEMIC COPY

B. Anexo: Circuito electrónico oscilador Puente de Wien

Circuito:



Circuito impreso PCB:



C. Anexo: Constantes eléctricas del medio de cultivo celular a diferentes frecuencias (10 – 100 kHz)

| Capacitor coaxial con DMEM-F12 | | |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Frecuencia kHz | Capacitancia (nf) | Permitividad (ϵ) |
| 10 | 490,510 | 6437,092 |
| 20 | 178,427 | 2341,540 |
| 30 | 97,327 | 1277,244 |
| 40 | 61,346 | 805,055 |
| 50 | 40,289 | 528,723 |
| 60 | 30,668 | 402,469 |
| 70 | 26,467 | 347,333 |
| 80 | 21,869 | 286,997 |
| 90 | 19,402 | 254,622 |
| 100 | 17,602 | 230,996 |

| Frecuencia kHz | Sistema capacitivo en vacío (Plexiglás) | | Sistema capacitivo con DEMEM-F12 | |
|-------------------|--|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| | Resistencia (M Ω) | Reactancia (Ohms) | Resistencia (M Ω) | Reactancia (Ohms) |
| 10 | 5,1 | 18,22X10 ⁻¹² | 4,338 | 21,86 X10 ⁻¹² |
| 20 | 2,6 | 17,90 X10 ⁻¹² | 2,231 | 21,48 X10 ⁻¹² |
| 30 | 1,74 | 17,90 X10 ⁻¹² | 1,473 | 21,48 X10 ⁻¹² |
| 40 | 1,32 | 17,59 X10 ⁻¹² | 1,122 | 21,17 X10 ⁻¹² |
| 50 | 1,07 | 17,40 X10 ⁻¹² | 0,9022 | 20,92 X10 ⁻¹² |
| 60 | 0,9 | 17,34 X10 ⁻¹² | 0,7514 | 20,92 X10 ⁻¹² |
| 70 | 0,776 | 17,15 X10 ⁻¹² | 0,6482 | 20,79 X10 ⁻¹² |
| 80 | 0,681 | 17,02 X10 ⁻¹² | 0,5702 | 20,67 X10 ⁻¹² |
| 90 | 0,605 | 17,27 X10 ⁻¹² | 0,5021 | 20,92 X10 ⁻¹² |
| 100 | 0,541 | 17,21 X10 ⁻¹² | 0,45331 | 20,79 X10 ⁻¹² |

D. Anexo: Análisis estadístico de la proliferación celular

| Cultivos celulares de control y estimulados durante 30 minutos | | | | | | | | | |
|--|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Horas de cultivo | Control | | | 50 V | | | 100 V | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 96 | 85000 | 110000 | 100000 | 165000 | 195000 | 225000 | 90000 | 125000 | 115000 |
| 144 | 205000 | 180000 | 150000 | 250000 | 285000 | 290000 | 165000 | 180000 | 205000 |

| Cultivos celulares de control y estimulados durante 5 horas | | | | | | | | | |
|---|---------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Horas de cultivo | Control | | | 50 V | | | 100 V | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 144 | 317500 | 372500 | 295000 | 40000 | 45000 | 90000 | 55000 | 90000 | 40000 |

Los datos que cumplieron las pruebas estadísticas (Ver tablas), fueron analizados a través de las siguientes ecuaciones:

$$Y_i = X\beta + E_i \quad E_i \cong N(\mu, \sigma^2) \quad i = 1, \dots, 4$$

Donde Y_i corresponde a una matriz respuesta que contiene los datos obtenidos del control y las estimaciones eléctricas. La matriz X corresponde a un arreglo binario de permite analizar los datos de control contra los datos de una estimulación eléctrica. La vector β contiene el tipo de tratamiento a analizar (control, estimulación con 50 V, estimulación con 100 V). Tanto la matriz X como el vector β se mantuvieron constantes en el análisis de todos los datos. Por último, la matriz E_i hace referencia a los errores de los datos.

Teniendo en cuenta el esquema descrito anteriormente, el modelo de análisis queda planteado de la siguiente manera:

$$Y_i = \begin{bmatrix} \text{Control 1} \\ \text{Control 2} \\ \text{Control 3} \\ \text{Tratamiento 50 V 1} \\ \text{Tratamiento 50 V 2} \\ \text{Tratamiento 50 V 3} \\ \text{Tratamiento 100 V 1} \\ \text{Tratamiento 100 V 2} \\ \text{Tratamiento 100 V 3} \end{bmatrix}, \quad X = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad \beta = \begin{bmatrix} \mu \\ \tau_1 \\ \tau_2 \end{bmatrix}, \quad E_i = \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \\ e_5 \\ e_6 \\ e_7 \\ e_8 \\ e_9 \end{bmatrix}$$

Los resultados obtenidos del análisis estadístico se muestran a continuación.

| Resultados estadísticos del modelo ANOVA para los datos que cumplieron los supuestos | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|--------|----------------------|--------------------|
| Tiempo de estimulación | Campo eléctrico (mV/mm) | Periodo de cultivo (horas) | Significancia individual | Análisis de varianzas | Test F | Test de Shapiro-Wilk | Test Durbin-Watson |
| 30 minutos | 50 | 96 | 0,002868 | 0,00287 | 0,2636 | 0,9696 | 0,6351 |
| | 100 | | | | | | |
| | 50 | 144 | | | | | |
| | 100 | | | | | | |
| 5 horas | 50 | 144 | 0,000006436 | 0,0000644 | 0,3044 | 0,1625 | 0,6954 |
| | 100 | | | | | | |

Los datos que no cumplieron los supuestos establecidos por el ANOVA anterior, fueron analizados con un test F. Los resultados se muestran a continuación:

| Tiempo de estimulación | Campo eléctrico (mV/mm) | Test F (p) |
|------------------------|-------------------------|------------|
| 30 minutos | 50 | 0,4237 |
| | 100 | 0,8363 |
| 1 hora | 50 | 0,4725 |
| | 100 | 0,3107 |

E. Anexo: Análisis estadístico de la muerte celular

Los datos obtenidos al realizar el análisis estadístico, utilizando un test F, se muestran a continuación.

| Tiempo de estimulación | Campo eléctrico (mV/mm) | Test F (p) |
|------------------------|-------------------------|------------|
| 30 minutos | 50 | 0,4428 |
| | 100 | 0,8859 |
| 1 hora | 50 | 0,1352 |
| | 100 | 0,3053 |
| 5 horas | 50 | 0,0245 |
| | 100 | 0,4251 |

F. Anexo: Análisis estadístico de la síntesis de GAGs

Los resultados obtenidos del análisis estadístico realizado a los datos de la síntesis de GAGs se muestran a continuación.

Tratamientos:

1: Control

2: 50 V

3: 100 V

Supuestos:

Para utilizar estadística paramétrica los datos deben provenir de una población normal y los grupos deben ser comparables (homogeneidad de varianzas).

| Tiempo de estimulación | Periodo de cultivo (horas) | Tratamiento | Test de Shapiro-Wilk | Análisis de varianzas |
|------------------------|----------------------------|-------------|----------------------|-----------------------|
| 30 minutos | 48 | 1 | 0,845 | 0,446 |
| | | 2 | 0,075 | |
| | | 3 | 1 | |
| | 96 | 1 | 0,588 | 0,145 |
| | | 2 | 0,077 | |
| | | 3 | 0,929 | |
| | 144* | 1 | 0,390 | 0,058 |
| | | 2 | 0,933 | |
| | | 3 | 0,247 | |
| | 192 | 1 | 0,721 | 0,199 |
| | | 2 | 0,082 | |
| | | 3 | 0,174 | |

* Los datos fueron transformado ($1/x$) y analizados con estadístico de Levene.

| Tiempo de estimulación | Periodo de cultivo (horas) | Tratamiento | Test de Shapiro-Wilk | Análisis de varianzas |
|------------------------|----------------------------|-------------|----------------------|-----------------------|
| 1 hora | 48* | 1 | 0,404 | 0,090 |
| | | 2 | 0,342 | |
| | | 3 | 0,238 | |
| | 96** | 1 | 0,053 | 0,145 |
| | | 2 | 0,504 | |
| | | 3 | 0,427 | |
| | 144 | 1 | 0,056 | 0,112 |
| | | 2 | 0,917 | |
| | | 3 | 0,587 | |
| | 192 | 1 | 0,384 | 0,530 |
| | | 2 | 0,171 | |
| | | 3 | 0,534 | |

* Los datos fueron transformado ($1/x$) y analizados con estadístico de Levene.

** Los datos fueron transformado (X^2) y analizados con estadístico de Levene.

| Tiempo de estimulación | Periodo de cultivo (horas) | Tratamiento | Test de Shapiro-Wilk | Análisis de varianzas |
|------------------------|----------------------------|-------------|----------------------|-----------------------|
| 5 horas | 48 | 1 | 0,993 | 0,090 |
| | | 2 | 0,540 | |
| | | 3 | 0,405 | |
| | 96* | 1 | 0,959 | 0,789 |
| | | 2 | 0,612 | |
| | | 3 | 0,369 | |
| | 144* | 1 | 0,601 | 0,112 |
| | | 2 | 0,106 | |
| | | 3 | 0,544 | |
| | 192 | 1 | 0,67 | 0,419 |
| | | 2 | 0,575 | |
| | | 3 | -- | |

* Los datos fueron transformado ($1/x$) y analizados con estadístico de Levene.

-- No hay disponibilidad de los datos.

Los resultados de las comparaciones múltiples, utilizando el test DMS, se muestran a continuación.

| Tiempo de estimulación | Periodo de cultivo (horas) | Tratamiento | DMS | ANOVA de un factor |
|------------------------|----------------------------|-------------|-------|--------------------|
| 30 minutos | 48 | 1 - 2 | 0,006 | 0,01 |
| | | 1 - 3 | 0,876 | |
| | | 3 - 2 | 0,007 | |
| | 96 | 1 - 2 | 0,003 | 0,008 |
| | | 1 - 3 | 0,381 | |
| | | 3 - 2 | 0,010 | |
| | 144* | 1 - 2 | 0,012 | 0,020 |
| | | 1 - 3 | 0,856 | |
| | | 3 - 2 | 0,015 | |
| | 192 | 1 - 2 | 0,285 | 0,537 |
| | | 1 - 3 | 0,544 | |
| | | 3 - 2 | 0,615 | |

| Tiempo de estimulación | Periodo de cultivo (horas) | Tratamiento | DMS | ANOVA de un factor |
|------------------------|----------------------------|-------------|-------|--------------------|
| 1 hora | 48* | 1 - 2 | 0,133 | 0,294 |
| | | 1 - 3 | 0,409 | |
| | | 3 - 2 | 0,427 | |
| | 96** | 1 - 2 | 0,257 | 0,351 |
| | | 1 - 3 | 0,840 | |
| | | 3 - 2 | 0,194 | |
| | 144 | 1 - 2 | 0,456 | 0,017 |
| | | 1 - 3 | 0,020 | |
| | | 3 - 2 | 0,008 | |
| | 192 | 1 - 2 | 0,916 | 0,071 |
| | | 1 - 3 | 0,042 | |
| | | 3 - 2 | 0,049 | |

* Los datos fueron transformado ($1/x$) y analizados con estadístico de Levene.

** Los datos fueron transformado (X^2) y analizados con estadístico de Levene.

| Tiempo de | Periodo de | Tratamiento | DMS | ANOVA de un |
|-----------|------------|-------------|-----|-------------|
|-----------|------------|-------------|-----|-------------|

| estimulación | cultivo (horas) | | factor |
|---------------------|------------------------|-------|---------------|
| | | 1 - 2 | 0,018 |
| | 48 | 1 - 3 | 0,068 |
| | | 3 - 2 | 0,510 |
| | | 1 - 2 | 0,756 |
| 5 horas | 96* | 1 - 3 | 0,032 |
| | | 3 - 2 | 0,088 |
| | | 1 - 2 | 0,006 |
| | 144 | 1 - 3 | 0,002 |
| | | 3 - 2 | 0,502 |

* Los datos fueron transformado ($1/x$) y analizados con estadístico de Levene.

Los datos para 192 horas de cultivo celular se muestran a continuación.

| Tiempo de estimulación | Periodo de cultivo (horas) | Tests T |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 5 horas | 192 | 0,583 |

Bibliografía

1. Bhosale, A.M. & Richardson, J.B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin* **87**, 77-95 (2008).
2. Cole, B.J. & Malek, M.M. *Articular Cartilage Lesions: A Practical Guide to Assessment and Treatment*, (Springer, New York, 2004).
3. Hall, B.K. & Miyake, T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**, 138-147 (2000).
4. Kronenberg, H.M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-336 (2003).
5. Parra N, Garzón-Alvarado D. A & C., V.J. Phenomenology work setting for articular cartilage damage. *Rev Cubana Ortop Traumatol* **23**, 1-28 (2009).
6. Quintero, M., Monfort, J. & Mitrovic, D.R. *Osteoartritis: Biología, fisiopatología, clínica y tratamiento*, (Médica Panamericana, España, 2009).
7. Chen, F.H., Rousche, K.T. & Tuan, R.S. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nature clinical practice. Rheumatology* **2**, 373-382 (2006).
8. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis research* **4**, 30-35 (2002).
9. Wong, M. & Carter, D.R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* **33**, 1-13 (2003).
10. Chen, C.T., Bhargava, M., Lin, P.M. & Torzilli, P.A. Time, stress, and location dependent chondrocyte death and collagen damage in cyclically loaded articular cartilage. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**, 888-898 (2003).
11. Lucchinetti, E., Adams, C.S., Horton, W.E., Jr. & Torzilli, P.A. Cartilage viability after repetitive loading: a preliminary report. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **10**, 71-81 (2002).
12. Salud, C.d. Guía de referencia de atención en medicina general: Osteoartritis. *Manial de Calidad* **1**, 1-18 (2012).
13. Silver, F.H., Bradica, G. & Tria, A. Do changes in the mechanical properties of articular cartilage promote catabolic destruction of cartilage and osteoarthritis? *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **23**, 467-476 (2004).
14. Meyer, U. The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. in *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (eds. Meyer, U., Handschel, J., Wiesmann, H.P. & Meyer, T.) 5-12 (Springer Berlin Heidelberg, 2009).
15. Kuettner, K.E., Pauli, B.U., Gall, G., Memoli, V.A. & Schenk, R.K. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *The Journal of cell biology* **93**, 743-750 (1982).
16. Nerem, R.M. Chapter Two - The challenge of imitating nature. in *Principles of Tissue Engineering (Third Edition)* (eds. Robert, L., Robert, L., Joseph VacantiA2 - Robert Lanza, R.L. & Joseph, V.) 7-14 (Academic Press, Burlington, 2007).

17. Temenoff, J.S. & Mikos, A.G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* **21**, 431-440 (2000).
18. Yen, Y.-m., *et al.* Treatment of Osteoarthritis of the Knee with Microfracture and Rehabilitation. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **40**, 200-205 210.1249/mss.1240b1013e31815cb31212 (2008).
19. Solchaga, L.A., Goldberg, V.M. & Caplan, A.I. Cartilage regeneration using principles of tissue engineering. *Clinical orthopaedics and related research*, S161-170 (2001).
20. Ikenoue, T., *et al.* Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**, 110-116 (2003).
21. Demarteau, O., *et al.* Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 580-588 (2003).
22. Parvizi, J., Wu, C.C., Lewallen, D.G., Greenleaf, J.F. & Bolander, M.E. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **17**, 488-494 (1999).
23. Wang, W., Wang, Z., Zhang, G., Clark, C.C. & Brighton, C.T. Up-regulation of chondrocyte matrix genes and products by electric fields. *Clinical orthopaedics and related research*, S163-173 (2004).
24. Balint, R., Cassidy, N.J. & Cartmell, S.H. Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **19**, 48-57 (2013).
25. Brighton, C.T., Wang, W. & Clark, C.C. The effect of electrical fields on gene and protein expression in human osteoarthritic cartilage explants. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **90**, 833-848 (2008).
26. Armstrong, P.F., Brighton, C.T. & Star, A.M. Capacitively coupled electrical stimulation of bovine growth plate chondrocytes grown in pellet form. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **6**, 265-271 (1988).
27. Brighton, C.T., Jensen, L., Pollack, S.R., Tolin, B.S. & Clark, C.C. Proliferative and synthetic response of bovine growth plate chondrocytes to various capacitively coupled electrical fields. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **7**, 759-765 (1989).
28. Brighton, C.T. & Townsend, P.F. Increased cAMP production after short-term capacitively coupled stimulation in bovine growth plate chondrocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **6**, 552-558 (1988).
29. Brighton, C.T., Unger, A.S. & Stambough, J.L. In vitro growth of bovine articular cartilage chondrocytes in various capacitively coupled electrical fields. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **2**, 15-22 (1984).

30. Brighton, C.T., Wang, W. & Clark, C.C. Up-regulation of matrix in bovine articular cartilage explants by electric fields. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 556-561 (2006).
31. Nakasuji, S., Morita, Y., Tanaka, K., Tanaka, T. & Nakamachi, E. Effect of pulse electric field stimulation on chondrocytes. *Asian Pacific Conference for Materials and Mechanics* (2009).
32. Moncada M. E, Saldarriaga M. P, Bravo A. F & R., P.C. Medición de Impedancia Eléctrica en Tejido Biológico – Revisión. *Tecno Lógicas* **25**, 51-76 (2010).
33. Foster, K.R. & Schwan, H.P. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. *Critical reviews in biomedical engineering* **17**, 25-104 (1989).
34. Cowin, S.C. & Doty, S.B. *Tissue Mechanics*, (Springer, New York, 2007).
35. Liebman, J. & Goldberg, R.L. Chondrocyte culture and assay. *Curr Protoc Pharmacol* **Chapter 12**, Unit 12 12 (2001).
36. Coburn, J.M., Gibson, M., Monagle, S., Patterson, Z. & Elisseeff, J.H. Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 10012-10017 (2012).
37. Karsenty, G., Kronenberg, H.M. & Settembre, C. Genetic control of bone formation. *Annual review of cell and developmental biology* **25**, 629-648 (2009).
38. Bobick, B.E. & Kulyk, W.M. Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* **84**, 131-154 (2008).
39. Ballock, R.T. & O'Keefe, R.J. The biology of the growth plate. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **85-A**, 715-726 (2003).
40. Karsenty, G. & Wagner, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell* **2**, 389-406 (2002).
41. Davies, S.R., Sakano, S., Zhu, Y. & Sandell, L.J. Distribution of the transcription factors Sox9, AP-2, and [delta]EF1 in adult murine articular and meniscal cartilage and growth plate. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **50**, 1059-1065 (2002).
42. Erggelet, C., Mandelbaum, B.R., Mrosek, E.H. & Scopp, J.M. Articular Cartilage Biology. in *Principles of Cartilage Repair* 3-5 (Steinkopff, 2008).
43. Athanasiou, K.A., Darling, E.M. & Hu, J.C. Articular Cartilage Tissue Engineering. *Synthesis Lectures on Tissue Engineering* **1**, 1-182 (2009).
44. Alvarez, L.A., Casanova, M.C. & García, L.Y. Fisiopatología, clasificación y diagnóstico de la osteoartritis de rodilla. *Rev Cubana Ortop Traumatol* **18**, 41-46 (2004).
45. Sandell, L.J., Morris, N., Robbins, J.R. & Goldring, M.B. Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *The Journal of cell biology* **114**, 1307-1319 (1991).

46. Sandell, L.J., Nalin, A.M. & Reife, R.A. Alternative splice form of type II procollagen mRNA (IIA) is predominant in skeletal precursors and non-cartilaginous tissues during early mouse development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **199**, 129-140 (1994).
47. Dudhia, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 2241-2256 (2005).
48. Schwartz, N. Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **5**, D649-655 (2000).
49. Hedbom, E., et al. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *The Journal of biological chemistry* **267**, 6132-6136 (1992).
50. DiCesare, P.E., Morgelin, M., Mann, K. & Paulsson, M. Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding. *European journal of biochemistry / FEBS* **223**, 927-937 (1994).
51. Eleswarapu, S.V., Leipzig, N.D. & Athanasiou, K.A. Gene expression of single articular chondrocytes. *Cell and tissue research* **327**, 43-54 (2007).
52. Poole, C.A. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of anatomy* **191 (Pt 1)**, 1-13 (1997).
53. Ross, M.H. & Pawlina, W. *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*, (Médica Panamericana, Buenos Aires, 2008).
54. Erickson, G.R., et al. Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and in Vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**, 763-769 (2002).
55. Aroen, A., et al. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *The American journal of sports medicine* **32**, 211-215 (2004).
56. Curl, W.W., et al. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* **13**, 456-460 (1997).
57. Helmick, C.G., et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis and rheumatism* **58**, 15-25 (2008).
58. Rojas, D.C. & Bejarano, B.M. Los usuarios con osteoartrosis de rodilla, UNISALUD, Colombia: una mirada desde la epidemiología crítica. *Medicina Social* **5**, 203-214 (2010).
59. Mueller, M.B. & Tuan, R.S. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* **3**, S3-11 (2011).
60. Woolf, A.D. & Pfleger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization* **81**, 646-656 (2003).
61. Seed, S.M., Dunican, K.C. & Lynch, A.M. Osteoarthritis: a review of treatment options. *Geriatrics* **64**, 20-29 (2009).

62. Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.P. & Roughley, P.J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best practice & research. Clinical rheumatology* **22**, 351-384 (2008).
63. Moskowitz, R., Altman, R., Hochberg, M., Buckwalter, J. & Goldberg, V. *Osteoarthritis: Diagnosis and medical-surgical management*, (Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007).
64. Nesic, D., et al. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Advanced drug delivery reviews* **58**, 300-322 (2006).
65. Sánchez, I., et al. *Manual SERMEF de rehabilitación y medicina física*, (2006).
66. Redman, S.N., Oldfield, S.F. & Archer, C.W. Current strategies for articular cartilage repair. *European cells & materials* **9**, 23-32; discussion 23-32 (2005).
67. Tipler, P.A. & Mosca, G. *Física para la ciencia y la tecnología: Electricidad y Magnetismo*, (Reverté, Barcelona, 2007).
68. Baker, B., Spadaro, J., Marino, A. & Becker, R.O. Electrical stimulation of articular cartilage regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* **238**, 491-499 (1974).
69. Farr, J., Mont, M.A., Garland, D., Caldwell, J.R. & Zizic, T.M. Pulsed electrical stimulation in patients with osteoarthritis of the knee: follow up in 288 patients who had failed non-operative therapy. *Surgical technology international* **15**, 227-233 (2006).
70. Rodan, G.A., Bourret, L.A. & Norton, L.A. DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. *Science* **199**, 690-692 (1978).
71. O'Sullivan, J., D'Arcy, S., Barry, F.P., Murphy, J.M. & Coleman, C.M. Mesenchymal chondroprogenitor cell origin and therapeutic potential. *Stem cell research & therapy* **2**, 8 (2011).
72. Diekman, B.O. & Guilak, F. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. *Current opinion in rheumatology* **25**, 119-126 (2013).
73. Grad, S., Eglin, D., Alini, M. & Stoddart, M.J. Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: a review. *Clinical orthopaedics and related research* **469**, 2764-2772 (2011).
74. Chopard, B., Ouared, R., Deutsch, A., Hatzikirou, H. & Wolf-Gladrow, D. Lattice-Gas Cellular Automaton Models for Biology: From Fluids to Cells. *Acta Biotheor* **58**, 329-340 (2010).
75. Garijo, N., Manzano, R., Osta, R. & Perez, M.A. Stochastic cellular automata model of cell migration, proliferation and differentiation: validation with in vitro cultures of muscle satellite cells. *Journal of theoretical biology* **314**, 1-9 (2012).
76. Alber, M., Kiskowski, M., Glazier, J. & Jiang, Y. On Cellular Automaton Approaches to Modeling Biological Cells. in *Mathematical Systems Theory in Biology, Communications, Computation, and Finance*, Vol. 134 (eds. Rosenthal, J. & Gilliam, D.) 1-39 (Springer New York, 2003).
77. Lawler G. F & V., L. Local Central Limit Theorem. in *Random Walk: A Modern Introduction*, Vol. 1 24-56 (2010).

78. Perez, M.A. & Prendergast, P.J. Random-walk models of cell dispersal included in mechanobiological simulations of tissue differentiation. *Journal of biomechanics* **40**, 2244-2253 (2007).
79. Lee, Y., Kouvroukoglou, S., McIntire, L.V. & Zygourakis, K. A cellular automaton model for the proliferation of migrating contact-inhibited cells. *Biophysical journal* **69**, 1284-1298 (1995).
80. Schönfisch, B. & Lacoursière, C. Migration in cellular automata. *Physica D: Nonlinear Phenomena* **103**, 537-553 (1997).
81. Alarcón, T., Byrne, H.M. & Maini, P.K. A cellular automaton model for tumour growth in inhomogeneous environment. *Journal of theoretical biology* **225**, 257-274 (2003).
82. Ermentrout, G.B. & Edelstein-Keshet, L. Cellular automata approaches to biological modeling. *Journal of theoretical biology* **160**, 97-133 (1993).
83. Longo, D., *et al.* Multicellular computer simulation of morphogenesis: blastocoel roof thinning and matrix assembly in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* **271**, 210-222 (2004).
84. Simpson, M.J., Merrifield, A., Landman, K.A. & Hughes, B.D. Simulating invasion with cellular automata: connecting cell-scale and population-scale properties. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **76**, 021918 (2007).
85. Morales, T.I. Chondrocyte moves: clever strategies? *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **15**, 861-871 (2007).
86. Wagner, W., *et al.* How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging* **2**, 224-230 (2010).
87. Mallet, D.G. & De Pillis, L.G. A cellular automata model of tumor-immune system interactions. *Journal of theoretical biology* **239**, 334-350 (2006).
88. Patel, A.A., Gawlinski, E.T., Lemieux, S.K. & Gatenby, R.A. A Cellular Automaton Model of Early Tumor Growth and Invasion: The Effects of Native Tissue Vascularity and Increased Anaerobic Tumor Metabolism. *Journal of theoretical biology* **213**, 315-331 (2001).
89. Lacroix, D., Prendergast, P.J., Li, G. & Marsh, D. Biomechanical model to simulate tissue differentiation and bone regeneration: Application to fracture healing. *Med. Biol. Eng. Comput.* **40**, 14-21 (2002).
90. Marée, A.M., Grieneisen, V. & Hogeweg, P. The Cellular Potts Model and Biophysical Properties of Cells, Tissues and Morphogenesis. in *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine* (eds. Anderson, A.A., Chaplain, M.J. & Rejniak, K.) 107-136 (Birkhäuser Basel, 2007).
91. Wagner, W., *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PloS one* **3**, e2213 (2008).
92. Chang, I., Gilbert, E.S., Eliashberg, N. & Keasling, J.D. A three-dimensional, stochastic simulation of biofilm growth and transport-related factors that affect structure. *Microbiology* **149**, 2859-2871 (2003).
93. Cheng, G., Youssef, B.B., Markenscoff, P. & Zygourakis, K. Cell population dynamics modulate the rates of tissue growth processes. *Biophysical journal* **90**, 713-724 (2006).

94. Kansal, A.R., Torquato, S., Harsh, G.I., Chiocca, E.A. & Deisboeck, T.S. Simulated brain tumor growth dynamics using a three-dimensional cellular automaton. *Journal of theoretical biology* **203**, 367-382 (2000).
95. Brittberg, M., *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine* **331**, 889-895 (1994).
96. Breinan, H.A., *et al.* Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **19**, 482-492 (2001).
97. Dell'Accio, F., *et al.* Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**, 123-131 (2003).
98. Hronik-Tupaj, M. & Kaplan, D.L. A review of the responses of two- and three-dimensional engineered tissues to electric fields. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **18**, 167-180 (2012).
99. Johnk, C.T. Ecuaciones de Maxwell y condiciones de frontera para regiones materiales en estado de reposo. in *Teoría Electromagnética: Campos y ondas*, Vol. 1 (ed. Limusa) 145-221 (1981).
100. Lukacs, Z. Mucopolysaccharides. in *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, Vol. 1 (ed. Springer) 287-325 (Berlin, Heidelberg, 2008).
101. Mycielska, M.E. & Djamgoz, M.B. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *Journal of cell science* **117**, 1631-1639 (2004).
102. Chao, P.H., *et al.* Chondrocyte translocation response to direct current electric fields. *Journal of biomechanical engineering* **122**, 261-267 (2000).
103. Xu, J., Wang, W., Clark, C.C. & Brighton, C.T. Signal transduction in electrically stimulated articular chondrocytes involves translocation of extracellular calcium through voltage-gated channels. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **17**, 397-405 (2009).
104. Brodtkin, K.R., Garcia, A.J. & Levenston, M.E. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* **25**, 5929-5938 (2004).