



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación *in vitro* del efecto de una estimulación con campos magnéticos a condrocitos

Juan Felipe Escobar Huertas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento Ingeniería Mecánica y Mecatrónica
Bogotá D.C., Colombia
2018

Evaluación *in vitro* del efecto de una estimulación con campos magnéticos a condrocitos

Juan Felipe Escobar Huertas

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Materiales y Procesos

Director (a):

Ph.D., Diego Alexander Garzón Alvarado
Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica

Codirector (a):

M.Sc., Juan Jairo Vaca González
Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica

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 Ingeniería, Departamento Ingeniería Mecánica y Mecatrónica

Bogotá D.C., Colombia

2018

III

Dedico este logro,

A mi Papá, siempre me has aconsejado y has estado a mi lado para guiarme. Por ti es que soy el hombre que soy. Siempre has sido y serás un ejemplo a seguir.

A mi Mamá, por enseñarme que siempre hay que perseverar y seguir adelante. Eres una mujer valiente, luchadora y tenaz. Tu amor siempre será incondicional, así como el mío hacia ti.

A mi Hermano, en ti puedo confiar de manera incondicional, así como tú en mí, para lo que sea. Siempre seremos el uno para el otro e iremos hombro a hombro hacia adelante.

¡¡Gracias!!

Agradecimientos

Fue una etapa de crecimiento tanto personal como intelectual la cual hoy se culmina con éxito y satisfacción. Este trabajo es el reflejo de mucho esfuerzo y dedicación, en el cual estuve acompañado de personas siempre dispuestas a brindarme todo su apoyo y conocimiento. Le agradezco:

A mi director Diego Alexander Garzón Alvarado, PhD., quien me guió día a día en este proceso investigativo dedicándome su tiempo y brindándome toda su sabiduría. También por fortalecer mi crecimiento como persona y como profesional.

A Juan Vaca M.Sc., además de ser mi codirector y estar siempre dispuesto a ayudarme en lo que necesité, encontré un amigo en el cual se puede confiar para hablar de diversos temas de interés no solo académicos. Me enseñó que hay que tener mucha disciplina, dedicación y empeño para que se puedan lograr las metas que cada uno se propone.

A Johana Guevara, PhD., (Juanita), quien siempre tuvo la mejor disposición y el tiempo de ayudarme y aconsejarme en cada etapa de este trabajo. De ti aprendí que no hay que desanimarse a pesar de los problemas y tener la mejor disposición antes las dificultades que se presenten en la vida, porque todo tiene solución. Como tú dices “no hay que entrar en pánico”.

Juanita y Juan les agradezco por haberme enseñado con mucha paciencia desde el principio este mundo totalmente nuevo para mí de los cultivos celulares. Por tener el tiempo y la dedicación de explicarme todo de la forma más clara y sencilla. Sin ustedes tal vez no hubiera realizado mi tesis experimentalmente.

A profesora Yoshie Hata, PhD., y todas las personas que trabajaron a mi lado en el laboratorio de Biomiméticos (IBUN), que permitieron el desarrollo de mis experimentos de manera satisfactoria.

A mis Tíos y Primos por preocuparse en los avances en esta etapa. Por aportarme sus ideas y conocimiento, o simplemente darme su apoyo. A mis amigos, quienes estuvieron pendientes y me brindaron su apoyo durante la realización de este arduo trabajo.

Resumen

Los campos magnéticos han sido utilizados como un estímulo externo con el fin de ser usados como métodos terapéuticos para recuperar el cartílago articular. Se han llevado a cabo investigaciones donde se evidencian que el campo promueve la proliferación y síntesis molecular como los glicosaminoglicanos en condrocitos. Sin embargo, en estos estudios no se evidencia una similitud en los resultados obtenidos. Esto se debe a la variedad de magnitudes de campo utilizadas y los rangos de tiempo. Adicionalmente la homogeneidad del campo no es clara debido al tipo de bobina que se utiliza en dichos ensayos. Por esta razón en esta investigación se implementó una metodología computacional que permitió el diseño de un dispositivo que genera un campo magnético homogéneo en su interior. También haciendo uso de modelos computacionales se demostró el efecto que existe en la membrana celular cuando es estimulada con un campo eléctrico y magnético. Finalmente, experimentalmente se demostró que la magnitud del campo magnético y el tiempo total de estimulación son variables que combinadas adecuadamente pueden potenciar la proliferación celular o la síntesis de glicosaminoglicanos en cultivos *in vitro*. En conclusión, en los modelos computacionales y en los ensayos experimentales realizados pudimos demostrar que los campos magnéticos generan un efecto positivo sobre los condrocitos aumentando su proliferación celular y síntesis de glicosaminoglicanos, lo cual permite mejorar los tratamientos que se realizan en la actualidad en ingeniería de tejidos y en medicina regenerativa con el fin de recuperar el cartílago articular.

Palabras clave: Campo magnético, cartílago articular, condrocitos, monocapa, proliferación, glicosaminoglicanos, estímulos biofísicos.

Abstract

The magnetic fields have been used as an external stimulus with the purpose of being used as therapeutic methods to regenerate the articular cartilage. That's why it has been carried out some researches where they show that the magnetic field promotes in chondrocytes proliferation and molecular synthesis such as glycosaminoglycans. However, in those studies there is no evidence of similarity in the results. This is due to the fact that there is a variety of magnetic field magnitudes used and the time ranges. In addition, it can't be seen the homogeneity of the field inside the coil because of the kind used in these tests. For this reason, in this research a computational model was implemented that enhance the design of a device that produce a homogeneous magnetic field inside of it. Also making use of computational models it was demonstrated the effect in the cell membrane when it is stimulated with an electric and magnetic field. Finally, experimentally we showed that the magnitude of the magnetic field and the total time stimulation are the combined variables to improve cell proliferation or the synthesis of glycosaminoglycans in *in vitro* cultures. In conclusion, in the computational models and in the experimental tests, we were able to demonstrate that the magnetic fields, generate a positive effect on chondrocytes proliferation and the synthesis of glycosaminoglycans, which allows us to improve the treatments that are currently carried out in the tissue engineering and regenerative medicine in order to regenerate articular cartilage.

Keywords: Magnetic field, articular cartilage, chondrocytes, monolayer, proliferation, glycosaminoglycans, biophysical stimuli.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract.....	XI
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIX
1. Introducción	1
1.1 Alcance de la investigación.....	5
Objetivos de la investigación	6
1.2 Objetivo General.....	6
1.3 Objetivos Específicos.....	6
1.4 Esquema de la Tesis	6
2. Estructura, patologías y campos magnéticos como alternativa terapéutica del cartílago articular	8
2.1 Estructura del cartílago articular	8
2.2 Enfermedades del cartílago articular.....	10
2.3 Métodos para regenerar el cartílago articular.....	11
2.4 Estímulos celulares con campos magnéticos.....	12
3. Modelo del Efecto de la Aplicación de Campos Magnéticos y Eléctricos sobre la Membrana Plasmática de Células en Cultivos en Monocapa.....	15
3.1 Introducción	15
3.2 Materiales y métodos.....	18
3.2.1 Modelo matemático	18
3.2.2 Simulación de Campo Eléctrico.....	18
3.2.3 Simulación Campo Magnético.....	19
3.2.4 Morfología Celular	21
3.3 Resultados.....	23
3.3.1 Convergencia de malla.....	23
3.3.2 Estimulación Eléctrica	25
3.3.3 Estimulación Magnética	29
3.4 Discusión	30

4. Evaluación In Vitro del Efecto de una Estimulación con Campos Magnéticos a Condrocitos.....	34
4.1 Introducción.....	34
4.2 Materiales y Métodos	37
4.2.1 Estimación Teórica del Campo Magnético	37
4.2.2 Simulación del Dispositivo de Estimulación Magnética	37
4.2.3 Sistema de Estimulación Magnética	38
4.2.4 Medición de Campo Magnético y Temperatura.....	40
4.2.5 Aislamiento y Cultivo Celular	40
4.2.6 Aplicación de Campo Magnético.....	41
4.2.7 Determinación de Viabilidad y Proliferación Celular	42
4.2.8 Cuantificación de Glicosaminoglicanos (GAGs)	42
4.2.9 Análisis Estadístico	43
4.3 Resultados	43
4.3.1 Dispositivo de Estimulación Magnética	43
4.3.2 Proliferación Celular.....	45
4.3.3 Cuantificación de GAG's	48
4.4 Discusión.....	49
5. Conclusiones y recomendaciones	52
5.1 Conclusiones.....	52
5.2 Recomendaciones.....	53
A. Anexo: Planos de fabricación del dispositivo de estimulación y soporte	55
B. Anexo: Circuito eléctrico del sistema de estimulación.....	61
C. Anexo: Análisis estadístico de la proliferación celular	63
D. Anexo: análisis estadístico de la síntesis de GAGs	67
Bibliografía	71

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1: Zonas del cartílago articular, donde se puede observar la morfología de la célula en cada una de las zonas del tejido y adicionalmente la organización de las fibras de colágeno tipo II (Matta, 2013).	9
Figura 3-1: Geometría utilizada para las simulaciones computacionales axisimétricas a) campo eléctrico, b) campo magnético con orientación horizontal de la bobina.	19
Figura 3-2: Geometrías de la célula para la realización del modelo en tres etapas diferentes.	22
Figura 3-3: Refinamiento de la malla en la membrana celular para garantizar valores de CE y CM.	23
Figura 3-4: Estudios de convergencia de la malla para la realización de las simulaciones. a) grafica de número de elementos vs CE b) grafica de número de elementos vs error relativo. Las mallas utilizadas no exceden el 1% de error.	24
Figura 3-5: Simulación del CE (V/m) de una célula cultivada en monocapa a) efecto en la membrana celular a una frecuencia de 60 kHz. b) Valores de CE a través de la membrana celular con radio de 5 μm	25
Figura 3-6: Valores de CE a través de la membrana celular a) con eje mayor de 8 μm y eje menor de 2 μm . b) con eje mayor de 9 μm y eje menor de 1 μm	26
Figura 3-7: Comparaciones entre las magnitudes de CE con una frecuencia de 60 kHz a) Variación de la geometría de la célula. Se evidencia como va aumentando la concentración de carga a medida que cambia la forma de la célula. b) Magnitud de CE en el borde externo, en la mitad y en el borde interno de la membrana celular.	27
Figura 3-8: CE con respecto a la frecuencia en diferentes puntos de la membrana celular.	29
Figura 3-9: Simulación de una bobina la cual tiene una caja de cultivo con una célula sumergida en medio de cultivo y su efecto en la membrana celular a una frecuencia de 10 MHz. a) Efecto del CM sobre la membrana celular b) Distribución del CM a través de la longitud de la bobina con una magnitud de CM de 2 mT.	30
Figura 4-1: Geometría utilizada en la simulación de la bobina en configuración axisimétrica. a) El rectángulo de la bobina representa el espesor de pared del tubo donde se realiza el embobinado, el eje de simetría es la línea donde se realiza la revolución del modelo. b) Revolución que realiza el software para calcular el campo magnético.	38

Figura 4-2: Montaje del dispositivo de estimulación **a)** Bobina construida para la estimulación magnética donde se detalla sus partes principales (bobina, cables de conexión, soporte y cajas de cultivo., **b)** circuito utilizado para la estimulación de CM.... 39

Figura 4-3: Dispositivo utilizado para la estimulación magnética con su respectiva base la cual fue fabricada en PMMA y garantiza que las cajas de cultivo estén estimuladas con la misma magnitud de CM. 40

Figura 4-4: Modelo computacional de la bobina **a)** verificación de la magnitud de CM necesaria para la estimulación de los condrocitos **b)** gráfica correspondiente donde se evidencia la magnitud del CM al interior de la bobina..... 44

Figura 4-5: Gráficas donde se realiza la medición del **a)** Aumento de la temperatura al medio de cultivo dentro y fuera de la incubadora. **b)** CM al interior de la bobina y su relación con la resistencia aplicada. 45

Figura 4-6: Conteos de proliferación celular con magnitud de CM de **a)** 1 mT **b)** 2 mT. Se realizó una comparación con el cultivo de control en cada uno de los días de conteo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el esquema de 2 mT y 1 hora con respecto al control y los demás esquemas de estimulación en los días 5 y 8 ($p < 0,05$), también hay diferencia significativa entre el esquema de 2 mT y 3 horas con respecto a los tres esquemas de estimulación con CM de 1 mT ($p < 0,05$). Los marcados con "s" (significativo)..... 46

Figura 4-7: Registro fotográfico de la estimulación de 2 mT con los tres tiempos de estimulación y su respectiva comparación con el cultivo de control para la verificación si existe algún cambio de morfología debido al CM. Las fotos fueron tomadas con un objetivo de 10x de magnificación. 47

Figura 4-8: Concentración de GAGs sintetizada por célula con una magnitud de CM de **a)** 1 mT **b)** 2 mT. Se realizó una comparación con el cultivo de control en tres días de conteo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres esquemas de estimulación y el control ($p < 0,05$), los marcados con "s" (significativo). 48

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1: Revisión bibliográfica de condrocitos estimulados con un CM.....	13
Tabla 3-1: Propiedades Eléctricas utilizadas en las simulaciones	20
Tabla 3-2: Dimensiones geométricas del modelo.....	22
Tabla 3-3: Dimensiones de las células modeladas.....	23
Tabla 4-1: Características de fabricación del dispositivo de estimulación magnética.	39

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
h	Longitud bobina	m
mT	Militesla	$N/A\ m$
N	Número de vueltas	m
B_{int}	Campo magnético interno	T
E	Vector de campo eléctrico	V/m
H	Intensidad de campo magnético	$A\ m$
J	Densidad de corriente eléctrica	A/m^2
D	Desplazamiento eléctrico	C/m^2

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
μ_0	Permeabilidad magnética del vacío	N/A^2
μ	Permeabilidad magnética	N/A^2
μ_r	Permeabilidad relativa	-
ρ	Densidad de carga	C/m
ϵ	Permitividad eléctrica	F/m

Símbolo	Término	Unidad SI
ϵ_r	Permitividad relativa	-
ϵ_0	Permitividad del vacío	$\frac{C^2}{N m^2}$
ω	Frecuencia	$1/s$

Abreviaturas

Abreviatura	Término
CM	Campo Magnético
CE	Campo eléctrico
GAGs	Glicosaminoglicanos
MEC	Matriz extracelular
PG	Proteoglicanos
OA	Osteoartritis
MPa	MegaPascales
ICA	Implantación de condrocitos autólogos

1.Introducción

El cartílago es un tejido conectivo avascular, aneural y alinfático el cual según la composición de su matriz extracelular (MEC) y su ubicación en el cuerpo humano, se clasifica en elástico, fibrocartílago y articular (Bhosale & Richardson, 2008). El cartílago articular está ubicado en las articulaciones sinoviales, en los extremos de los huesos que forman la articulación. Este cartílago está constituido por el condrocito, único tipo celular el cual está encargado de sintetizar y degradar las moléculas que componen la MEC. La MEC está compuesta por el colágeno tipo II y proteoglicanos (PG) (Hall & Miyake, 2000; J. Cole & M. Mike, 2004; Miller, 2005).

El colágeno tipo II constituye aproximadamente el 80% del tejido y es el encargado de proporcionar elasticidad al tejido (Miller, 2005). Por su parte, los PG es la segunda molécula más abundante, la cual proporciona al tejido una alta resistencia a la compresión (Bhosale & Richardson, 2008). Esto se debe a que los proteoglicanos están compuestos por asociaciones de proteínas y glicosaminoglicanos (GAG). La naturaleza hidrofílica de los GAGs provoca una presión de hinchamiento, que permite a la MEC resistir las fuerzas de compresión. La matriz del cartílago que recubre la articulación de la rodilla, por ejemplo, puede soportar presiones elevadas debido a su alto contenido de GAGs (Gentili & Cancedda, 2009). Sin embargo, cargas excesivas, ocasionadas por el sobrepeso o los impactos contundentes, conducen a daños en la MEC y a la apoptosis celular (Landínez-parra & Garzón-alvarado, 2009). Por lo tanto, después cualquier lesión que sufre el cartílago la capacidad de regeneración es limitada convirtiéndose en un problema de salud pública, donde se busca regenerar tanto la integridad estructural como la función del tejido tal como lo era antes de la lesión (Bhosale & Richardson, 2008; Buckwalter & Mankin, 1997).

La patología degenerativa más común que afecta el cartílago articular, deteriorando las proteínas generadas por los condrocitos en la MEC, es la osteoartritis (OA). Esta enfermedad afecta a personas tanto en Colombia como en el resto del mundo (Erickson et

al., 2002). La OA es una enfermedad crónica de las articulaciones sobre todo de aquellas que tienen gran movimiento la cual se caracteriza por el desgaste y destrucción de las superficies articulares (Colombiana de Salud, 2014). LA OA se manifiesta con grandes cambios morfológicos en el tejido como resultado de alteraciones bioquímicas y biomecánicas; disminuyendo la resistencia a la tracción, rigidez y espesor del cartílago articular (Roland W. Moskowitz et al., 2007). En las mujeres entre los 45 - 64 años existe un 30% de probabilidad de contraer esta enfermedad y asciende a 86% al alcanzar los 65 años de edad. En los hombres existen valores similares, aunque algo más bajos en edades avanzadas (Colombiana de Salud, 2014). Debido a lo anterior se ha considerado a la OA como un problema de salud pública.

Hoy en día se cuenta con varios tratamientos para mitigar las diferentes patologías que afectan el cartílago articular. Entre ellas podemos ver las intervenciones quirúrgicas como la penetración del hueso subcondral, microfractura, la mosaicoplastia, desbridamiento y perforación conjunta, los injertos de tejido, la osteotomía, entre otros (Bhosale & Richardson, 2008; Temenoff & Mikos, 2000; Yen et al., 2008) los cuales son llevados a cabo con el objetivo de regenerar el cartílago articular. A pesar de la disponibilidad de los diferentes métodos de tratamiento descritos, ninguno de estos ha sido capaz de regenerar un cartílago similar en estructura, composición y en especial sus propiedades mecánicas debido a la formación de fibrocartílago (Solchaga, Goldberg, & Caplan, 2001). Este tejido fibroso no tiene las mismas propiedades mecánicas del cartílago nativo ya que es más rígido provocando que su degradación más rápida con el tiempo (Bhosale & Richardson, 2008). Por tal motivo que se desea buscar nuevos métodos terapéuticos que sean capaces de aumentar la población celular y la síntesis de MEC.

En la actualidad existen evidencias donde se demuestra que la proliferación y actividad metabólica de los condrocitos aumenta cuando están en presencia de estímulos biofísicos tales como compresiones dinámicas, ultrasonido, presiones hidrostáticas, estímulos eléctricos y estímulos magnéticos (Démarteau et al., 2003; Ikenoue et al., 2003; Pezzetti et al., 1999; Wang, Wang, Zhang, Clark, & Brighton, 2004). Los estímulos con campos magnéticos (CM) se basan en aplicar una magnitud específica de este estímulo; para ello se diseña una bobina capaz de generar la magnitud del campo deseado. En diferentes investigaciones *in vitro* se ha demostrado que la estimulación de condrocitos con CM entre 0,5 mT y 2 mT hay un aumento en la proliferación celular y adicionalmente se incrementa la síntesis de moléculas propias del cartílago articular tales como el colágeno tipo II,

proteoglicanos (PG) como el agrecan y glicosaminoglicanos (GAGs) (M De Mattei et al., 2001; Monica De Mattei et al., 2003, 2004; Pezzetti et al., 1999; Sadoghi, Leithner, Dorotka, & Vavken, 2013; Vanessa et al., 2007). Adicionalmente se ha encontrado evidencias de tratamientos con campos magnéticos a personas que padecen artritis reumatoide, en los cuales los resultados son positivos en cuanto la reducción de los síntomas de esta enfermedad ya que tiene un efecto sobre tejidos conectivos (Zwolińska, Gąsior, Śnieżek, & Kwolek, 2016).

Aunque se han encontrado resultados satisfactorios en las investigaciones consultadas todas utilizan un sistema de estimulación con bobinas de Helmholtz el cual produce un CM homogéneo en un área reducida con lo cual no se puede garantizar que el cultivo este siendo estimulado con la misma magnitud en toda su área. Esto dificulta la reproducibilidad de los ensayos. Adicionalmente no se han reportado gráficos o simulaciones en donde se puede apreciar claramente la distribución del CM, y así poder demostrar que el cultivo está siendo estimulado en tu totalidad con la misma magnitud. Adicionalmente, si se extrapolan estos ensayos para estimulación en humanos las dimensiones de estas bobinas de Helmholtz serían extremadamente grandes lo cual es inviable. Por otro lado, existe gran variación en los tiempos de estimulación utilizados para estimular con CM. Los tiempos varían 4 horas por día, hasta estimulaciones continuas durante 14 días (Sadoghi et al., 2013; Sakai, Suzuki, Nakamura, Norimura, & Tsuchiya, 1991; Schmidt-Rohlung, Silny, Woodruff, & Gavenis, 2008). Tampoco se ha encontrado un estudio en donde se haga una comparación entre dos o más magnitudes de CM. Esto genera discrepancia en los resultados obtenidos, ya que no está establecido el tiempo de estimulación ni la magnitud del CM para obtener la mejor tasa de proliferación celular y síntesis de MEC.

Con el objetivo de dar solución a las dificultades existentes en investigaciones anteriores, este trabajo presenta la evaluación *in vitro* del efecto de una estimulación de CM en condrocitos. La primera etapa de esta investigación consistió en el cálculo matemático y diseño del dispositivo de estimulación magnética. Para ello se consultó los diferentes dispositivos capaces de generar un CM con sus respectivas ecuaciones para luego realizar el cálculo y dimensionamiento del dispositivo. Se seleccionó una bobina la cual será capaz de generar un CM de 1 mT y 2 mT con una corriente de 0,7 A y 1 A respectivamente y una frecuencia de 60 Hz, estos valores fueron seleccionados basados en los estudios ya existentes (M De Mattei et al., 2001; Fioravanti, Nerucci, Collodel, Markoll, & Marcolongo, 2002; Vanessa et al., 2007). En la segunda etapa se procedió a realizar una simulación

por elementos finitos para comprobar que la distribución del CM y su magnitud fuesen las deseadas, para finalmente realizar la fabricación de la bobina y demás elementos que componen el circuito de estimulación. Una vez que todos los componentes del circuito se tuvieron se procedió a realizar el montaje para luego realizar las mediciones del CM producido por la bobina y cotejarlos con los datos de la simulación. Adicionalmente, se realizaron unas mediciones de temperatura al medio de cultivo ya que el CM genera una inducción sobre los materiales que pueden causar el aumento de la temperatura y por consiguiente afectar la viabilidad celular. Una vez comprobado que no existía ningún aumento en la temperatura del medio de cultivo se procedió a la tercera etapa. En la tercera etapa se evaluó en el cultivo celular *in vitro* la viabilidad, proliferación y síntesis de GAGs con estimulación magnética. Los tiempos de estimulación a los cuales fueron sometidos los cultivos fueron 1 hora, 3 horas y 5 horas cada 6 horas durante una semana, estos tiempos no se basaron en ningún estudio porque como ya se mencionó hay gran discrepancia en la literatura. En la última etapa de la investigación se realizó un modelo computacional del efecto de la aplicación de CM y eléctricos sobre la membrana plasmática de células en cultivos en monocapa. Para ello se discretizó la geometría por elementos finitos; los elementos utilizados fueron tetraedros con un tamaño mínimo de 0,003 μm y tamaño máximo de 1,5 μm . Con este modelo se observó el efecto que existe sobre la membrana celular cuando está bajo un estímulo biofísico ya sea CM o campo eléctrico (CE).

Esta investigación combina los modelos computacionales con la validación de resultados experimentales, adicionalmente una simulación por elementos finitos donde se evidencia el efecto sobre la membrana celular al estar bajo estímulos biofísicos. Esta última parte nos puede brindar una visión más amplia de lo que sucede a nivel micrométrico cuando una célula está en cultivo monocapa y dar una posible explicación a las limitaciones que tienen estos cultivos. Por otra parte, se diseñó un dispositivo capaz de generar un CM homogéneo lo suficientemente largo como para estimular 9 cajas de cultivo simultáneamente, todo esto comprobado tanto experimentalmente como en simulaciones computacionales. De la misma manera es la primera vez que se realiza un estudio en el que se comparen dos magnitudes de CM con tres tiempos de estimulación obteniendo resultados satisfactorios. Debido a lo anterior, se comprobó que la respuesta celular a la proliferación como a la síntesis de GAGs depende de la magnitud del CM y del tiempo de estimulación.

En conclusión, esta investigación aporta un avance a los cultivos en monocapa mediante la utilización de métodos computacionales en los que se evidencia los efectos sobre la membrana celular, con el objetivo de mejorar la proliferación y síntesis de MEC. Haciendo uso de estas herramientas y complementando con los métodos tradicionales de cultivo celular, se logró tener resultados satisfactorios en los cultivos de condrocitos, lo cual es un aporte para la medicina regenerativa que está enfocada en cartílago articular. Es por esto que en la actualidad están siendo utilizados nuevos métodos terapéuticos como la implantación celular autóloga para mitigar los efectos de las enfermedades degenerativas del cartílago articular.

1.1 Alcance de la investigación

En investigaciones anteriores solo se ha realizado el análisis *in vitro* del efecto de los CM en condrocitos, implementando dispositivos que no garantizan una distribución de CM homogénea. Es por esto que, en esta investigación se implementa un análisis *in silico* para complementar los experimentos *in vitro* y garantizar las mismas condiciones del cada ensayo y evaluar las siguientes hipótesis:

- Mediante el uso de un método de simulación computacional, por elementos finitos se puede evidenciar si existe algún efecto sobre la membrana celular al estar estimulada por un CM o un CE en un cultivo monocapa.
- Las pérdidas o efectos de borde no causan ninguna interferencia en cada uno de los elementos que interviene el cultivo celular monocapa ocasionando limitaciones a la hora de realizar la investigación.
- Se puede llegar a calcular y fabricar un dispositivo que genere un campo magnético homogéneo para garantizar una estimulación idónea y la reproducibilidad del ensayo de viabilidad y proliferación celular.
- La simulación por elementos finitos del dispositivo de estimulación magnética es una herramienta útil para corroborar que la magnitud de campo sea la deseada.
- El incremento en la proliferación y la síntesis de GAGs depende tanto de la magnitud del CM como del tiempo de estimulación.

Objetivos de la investigación

1.2 Objetivo General

Evaluar el efecto de una estimulación con campos magnéticos sobre condrocitos cultivados en monocapa.

1.3 Objetivos Específicos

1. Diseñar y construir un dispositivo para la aplicación de campos magnéticos a condrocitos cultivados en monocapa.
2. Determinar la viabilidad y proliferación de condrocitos cultivados en monocapa ante una estimulación con campos magnéticos.
3. Evaluar la síntesis molecular de condrocitos cultivados en monocapa que han sido sometidos a una estimulación con campos magnéticos.

1.4 Esquema de la Tesis

La presente tesis se divide en 5 capítulos. El capítulo 1 es la introducción de toda la investigación realizada. En el siguiente capítulo se menciona una revisión bibliográfica de la composición del cartílago articular y las principales moléculas que lo componen: colágeno tipo II y proteoglicanos. También se menciona la anatomía del cartílago. A continuación, se habla de las principales patologías que afectan el cartílago y el por qué se ha convertido en un problema de salud pública. Finalmente, se pueden ver los avances en investigación que se han hecho durante los últimos años aplicando CM con el objetivo de tener nuevos métodos terapéuticos.

En el capítulo 3 se puede observar la implementación de un modelo computacional haciendo uso de elementos finitos, en el cual se evidencian los efectos que se presentan sobre la membrana celular cuando está en presencia de un estímulo biofísico ya sea CM o CE. Para ello se utilizó el software (COMSOL Multiphysics, Comsol Inc. Los Angeles, USA), en el cual se modeló una célula cultivada en monocapa. Se realizaron varias simulaciones en las cuales se varió la frecuencia de los estímulos biofísicos como también la forma de la célula.

Después de observar los efectos que producen los estímulos biofísicos (CM o CE) sobre la membrana celular al estar en monocapa, en el capítulo 4 se analiza el comportamiento de un cultivo de condrocitos cultivados en monocapa siendo estimulados por un CM. En este capítulo se puede observar el procedimiento de diseño y construcción de una bobina capaz de generar un CM homogéneo. Este dispositivo garantiza la reproducibilidad de los ensayos. Por otro lado, se presenta el esquema de aislamiento, cultivo y estimulación magnética de condrocitos. Como resultado de esta estimulación se obtuvo la cuantificación de proliferación celular, así como de la síntesis de GAGs y su debida comparación con células que no fueron estimuladas con el CM.

Finalmente, en el capítulo 5 se presentan las conclusiones generales derivadas de cada uno de los análisis realizados ya sean experimentales o computacionales en el transcurso de esta investigación. Adicionalmente se mencionan algunas recomendaciones para investigaciones futuras que utilicen este tipo de estímulos magnéticos.

2. Estructura, patologías y campos magnéticos como alternativa terapéutica del cartílago articular

2.1 Estructura del cartílago articular

Durante el desarrollo embriológico, el cartílago articular se crea a partir de condensaciones de células mesenquimales mediante un proceso denominado condrogénesis (Bhosale & Richardson, 2008; Coburn, Gibson, Monagle, Patterson, & Elisseeff, 2012). La diferenciación de las células mesenquimales a condrocitos es regulada por factores de transcripción los cuales controlan la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (MEC). El factor de transcripción más importante es el SOX9 ya que es el encargado de regular la producción de colágeno tipo II y proteoglicanos (PG) (Ballock & Keefe, 2003; Karsenty & Wagner, 2002). El colágeno tipo II es la molécula principal del cartílago constituyendo del 10 al 20 % del peso húmedo del cartílago, además es el encargado de dar resistencia a la tracción al tejido (Bhosale & Richardson, 2008). Por otro lado, los PG son moléculas polisacáridos los cuales son los encargados de darle la resistencia a la compresión al cartílago, adicionalmente mantiene la concentración de agua y electrolitos (Buckwalter & Mankin, 1997). Los PG están constituidos por moléculas llamadas glucosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs son moléculas hidrófilas lo que genera que formen geles en concentraciones muy bajas y ocupen un gran volumen en comparación con su peso (Gentili & Cancedda, 2009). Adicionalmente son los encargados de soportar los esfuerzos de compresión a las que son sometidas las articulaciones (Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, 2002).

El cartílago articular está ubicado en los extremos de los huesos que forman la articulación sinovial. El cartílago tiene diferentes espesores según la ubicación y las cargas mecánicas a las que esté sometido. Por ejemplo, el grosor en las articulaciones interfalángicas varía entre 1 mm y 2 mm, mientras en las que en la rodilla y la cadera tiene un espesor de 3 mm a 5 mm (Kronenberg, 2003). Las cargas a las que puede estar sometida la articulación de la cadera está entre 1 – 4 MPa, mientras que la rodilla soporta cargas de hasta 18 MPa cuando se realiza actividad física (Bhosale & Richardson, 2008; Erggelet & Mandelbaum, 2008).

El cartílago articular está constituido por un único tipo celular, el condrocito. La densidad celular al interior del cartílago es baja ya que constituye un 5% del volumen total del cartílago, esto también dificulta que la regeneración del cartílago sea rápida (Bhosale & Richardson, 2008). Histológicamente, el cartílago está dividido en cuatro zonas según la morfología de los condrocitos y la orientación del colágeno tipo II (Bhosale & Richardson, 2008; Matta, 2013) (**Figura 2-1**). La zona tangencial es la zona más delgada donde los condrocitos tienen una morfología aplanada. La siguiente zona es de transición en la cual la densidad celular es menor y los condrocitos tienen una forma ovalada. En la zona media los condrocitos se comienzan a agrupar, la forma es circular y posteriormente se organizan en columnas. En esta zona las células sintetizan colágeno tipo II en grandes cantidades. Finalmente, en la zona calcificada los condrocitos se agrupan y comienzan a sintetizar colágeno tipo X con el fin de dar amortiguación entre el cartílago articular y el hueso subcondral (Matta, 2013).

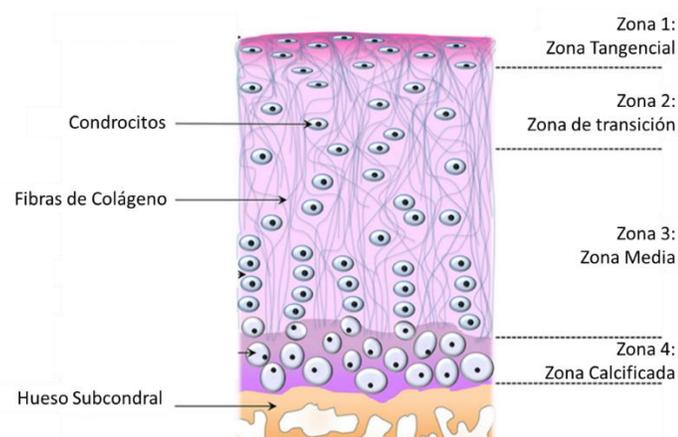


Figura 2-1: Zonas del cartílago articular, donde se puede observar la morfología de la célula en cada una de las zonas del tejido y adicionalmente la organización de las fibras de colágeno tipo II (Matta, 2013).

2.2 Enfermedades del cartílago articular

Las lesiones que afectan el cartílago articular se pueden clasificar en tres tipos. La primera son las lesiones que cambian la composición de la MEC. La segunda son las que generan un cambio en el espesor del tejido las cuales provocan fisuras en la superficie del cartílago articular. Finalmente están las lesiones que afectan en su totalidad el espesor del cartílago hasta llegar al hueso subcondral (Temenoff & Mikos, 2000). Durante las actividades diarias, el cartílago está sometido a ciertas cargas cíclicas que pueden afectar la morfología del tejido y conllevar a estas alteraciones funcionales como limitar el movimiento de la articulación. Adicionalmente, existen patologías que pueden ser causa de factores genéticos o de crecimiento (Ross, 2007).

La enfermedad degenerativa más frecuente del cartílago articular es la osteoartritis (OA) la cual afecta tanto las células como la MEC. Según (Mueller & Tuan, 2011) afecta aproximadamente a 9,6% de los hombres y 18% de las mujeres debido a la obesidad y el envejecimiento, convirtiéndola en un problema de salud pública. La evolución de esta enfermedad incluye varios factores donde se destaca la inflamación de la articulación, predisposición genética entre otras (Seed, Dunican, & Lynch, 2009). Las principales consecuencias que presenta un paciente al contraer esta enfermedad son las alteraciones en las proteínas primarias como el colágeno tipo II y los PG. Lo anterior causa una disminución en la resistencia a la compresión, rigidez y espesor del cartílago articular, remodelación del hueso subcondral e inflamación crónica de la membrana sinovial (Martel-pelletier, Boileau, & Roughley, 2008; Roland W. Moskowitz et al., 2007). Existen otras patologías como osteocondritis y espondiloartritis las cuales producen dolor, inflamación, dificultades de movimiento y fractura de las articulaciones (Nesic et al., 2006). Debido a lo anterior se crea la necesidad de buscar métodos terapéuticos que ayuden a la regeneración del cartílago articular de forma efectiva y rápida y lo más importante, que todas las propiedades mecánicas del tejido sean las mismas al cartílago nativo.

2.3 Métodos para regenerar el cartílago articular

Hoy en día se cuenta con varios tratamientos para mitigar las diferentes patologías que afectan el cartílago articular. Existen técnicas tales como la penetración del hueso subcondral en la cual se afectan los vasos sanguíneos subcondrales lo cual causa la creación de un coágulo de fibrina, en este punto las células madre mesenquimales primitivas de la médula ósea migran hacia el coágulo, proliferan y se diferencian, pareciéndose morfológicamente a los condrocitos (Bhosale & Richardson, 2008). Así mismo el método de micro fractura consiste en la eliminación de cartílago para crear un defecto bien definido y estable rodeado de cartílago normal, con una exposición completa de la placa subcondral; el éxito de este procedimiento radica en crear bordes perpendiculares estables de cartílago sano alrededor del defecto, luego se usa un punzón artroscópico para crear agujeros y rellenarlos con un coágulo; para una buena recuperación se debe tener un movimiento pasivo continuo, seguido de un programa de soporte de peso estrictamente protegido (Bhosale & Richardson, 2008). Los tratamientos quirúrgicos son técnicas costosas e invasivas con efectos a corto y mediano plazo. Las principales limitaciones incluyen la afectación de tejidos sanos. Este tejido no tiene las mismas propiedades mecánicas y bioquímicas del cartílago articular, lo que implica una gran limitación desde el punto de vista mecánico. Además, el efecto combinado de estos procedimientos es difícil de cuantificar (Bhosale & Richardson, 2008).

Por otro lado, a través del tiempo la fisioterapia ha tratado las lesiones presentes en la articulación como una alternativa no invasiva. Dentro de los métodos fisioterapéuticos más utilizados encontramos la electroterapia. Así mismo existe la electroestimulación tal como lo realiza (Zizic, Hoffman, & Holt, 1995) quien encuentra que por medio de pulsos eléctricos intermitentes se disminuye el dolor en la rodilla y aumenta la flexión y funciones de la articulación. Sin embargo, la regeneración de tejidos en personas con edades avanzadas es lenta lo cual nos lleva a buscar nuevos métodos terapéuticos que sean más efectivos en tiempos más cortos.

Recientemente, también se ha propuesto la terapia celular autóloga donde los condrocitos son aislados del paciente y expandidos *in vitro* para ser introducidos finalmente en el sitio de la lesión (Jakob et al., 2003). La técnica de implantación de condrocitos autólogos (ICA), implica la extracción de una pequeña pieza de cartílago de un área que soporta poco peso de la articulación de la rodilla. Los condrocitos se aíslan enzimáticamente y se cultivan *in vitro* para obtener millones de condrocitos activos. Después de 2-3 semanas, se abre la articulación y el defecto condral se cubre con un parche perióstico de la superficie tibial superior. Finalmente cuando se logra un sello hermético, la suspensión celular se inyecta en la articulación afectada (Bhosale & Richardson, 2008). De esta forma se aumenta la densidad celular del tejido y por consiguiente su regeneración puede ser más rápida.

2.4 Estímulos celulares con campos magnéticos

A pesar de las diferentes técnicas que se tienen hasta el momento ninguna ha logrado regenerar el cartílago articular que tenga las mismas propiedades morfofisiológicas. Debido a lo anterior aún se continúa en la búsqueda de nuevos métodos no invasivos haciendo uso de estímulos biofísicos externos como por ejemplo el campo magnético (CM). La ingeniería de tejidos actualmente ha buscado la forma de construir dispositivos que puedan promover la proliferación celular y la síntesis de MEC para mejorar las posibilidades de regenerar cartílago articular de forma *in vitro* diseñando generadores de CM. El CM se puede producir por cualquier flujo de electrones a través de un medio conductor. Por el contrario el campo eléctrico (CE) es producido por cargas estacionarias, y el CM por cargas en movimiento (corriente) (Van Bladel, 2007). El CM es proporcional a la corriente que circula por un alambre el cual, matemáticamente hablando, se representa por vectores que van en dirección radial al alambre.

Los CMs han evidenciado tener gran impacto en la proliferación celular, expresión y síntesis de moléculas asociadas al cartílago articular como el colágeno tipo II y agregan (Monica De Mattei et al., 2003; Schmidt-Rohlwng et al., 2008; Vanessa et al., 2007), por lo cual es un ámbito en el cual se desea profundizar con el fin de encontrar medios eficientes no invasivos para su futura implementación en terapia regenerativa. A continuación, se muestra una revisión bibliográfica de los resultados obtenidos en diversas investigaciones.

Tabla 2-1: Revisión bibliográfica de condrocitos estimulados con un CM.

Autor	Magnitud de CM	Bobina	Frecuencia	Tipo celular	Esquema de estimulación	Resultados
(Vanessa et al., 2007)	1,6 mT	Helmholtz	75 Hz	Humanos	Continuo de 12 horas durante 24 horas y 4 horas por día durante 10 días.	Evidenció una mayor proliferación celular en todos los esquemas de estimulación en comparación con los que no fueron expuestos al campo, adicionalmente cuantifican la apoptosis celular la cual tiene unos valores menores al 5%.
(Pezzetti et al., 1999)	2,3 mT	Helmholtz	75 Hz	Humanos	6 y 30 horas	Identificar los factores de crecimiento o los mitógenos que son importantes en la estimulación de los condrocitos humanos estimulados con un CM pulsante
(Stolfa et al., 2007)	0,6 T	Helmholtz	21,3 MHz	Humanos	72 horas	El CM estimula el metabolismo de condrocitos cultivados <i>in vitro</i> después de 72 horas de aplicación
(M De Mattei et al., 2001)	2,3 mT	Helmholtz	75 Hz	Humanos	1, 6, 9, 18 horas, y 3 y 6 días continuos	Se observó un aumento significativo en la proliferación celular en los tres primeros días en que estuvieron expuestas al campo
(Monica De Mattei et al., 2004)	1,5 mT	Helmholtz	75 Hz	Bovinos	24 horas continuas	El CM pueden actuar en conjunto con el factor principal de crecimiento anabólico del cartílago para estimular la síntesis de los componentes esenciales de la matriz del cartílago.
(Jahns, Lou, Durdle, & Bagnall, 2007)	1,7 y 3,1 mT	Helmholtz	500 y 100 Hz respectivamente	Humanos	6 horas	El CM pulsante indujo un cambio morfológico de estrellado con procesos extendidos a esférico retraídos
(Liu, 1996)	0,1 mT	Helmholtz	1,5 Hz	Pollo	3 horas diarias durante 48 horas	Conserva claramente el contenido de proteoglicanos sulfatados del cartílago del pollo embrionario sin afectar a la estructura o función del proteoglicano sulfatado
(Livingston, Mohanty, & Chittaranjan, 2011)	No especifica	Helmholtz	1 Hz	Conejo	1 hora diaria durante 6 semanas	Muestran un efecto benéfico para la regeneración del cartílago articular tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .

Como se puede apreciar en la **Tabla 2-1**, el campo magnético con magnitudes entre 0,5 a 2 mT favorece la proliferación celular de condrocitos. Sin embargo, bajo los esquemas de estimulación a los que las células son expuestas, no existe un patrón en donde los resultados sean semejantes entre sí en proliferación, viabilidad y síntesis molecular. Adicionalmente las bobinas de Helmholtz utilizadas en los trabajos mencionados anteriormente, no generan un campo homogéneo si las dimensiones del dispositivo no son lo suficientemente grandes tales como el diámetro de cada bobina. Por tal motivo si no se diseña un dispositivo que produzca un campo homogéneo y estable no se puede garantizar la reproducibilidad de los experimentos.

3. Modelo del Efecto de la Aplicación de Campos Magnéticos y Eléctricos sobre la Membrana Plasmática de Células en Cultivos en Monocapa

3.1 Introducción

En los seres vivos existen estímulos biofísicos en todos los órdenes de escala entre ellos se destacan estímulos mecánicos, lumínicos y eléctricos. Entre los estímulos eléctricos encontramos los campos eléctricos (CE) y campos magnéticos (CM) encargados, por ejemplo, de la comunicación de las células nerviosas o la apertura de canales de señalización para permitir el ingreso y salida de moléculas de la membrana celular, entre muchas más (Chao & Inoue, 2003). También existen CM alrededor del cuerpo humano producidos por la activación de los músculos (Cohen & Givler, 1972). En la actualidad los CE y CM están siendo ampliamente investigados con el fin de encontrar métodos terapéuticos eficientes en los cuales se puedan tratar enfermedades sin tener que realizar intervenciones quirúrgicas a los pacientes.

Los CE y CM han demostrado tener un efecto positivo en la dinámica celular tal como aumento en proliferación, estimulación de la producción de proteínas como colágeno, agregan y los glicosaminoglicanos (GAGs) (Martino, Perea, Hopfner, Ferguson, & Wintermantel, 2010; J. J. Vaca-González, Guevara, Vega, & Garzón-Alvarado, 2016; Vanessa et al., 2007). Una de las causas por las cuales se cree que hay un efecto sobre la membrana celular cuando se estimula con un CE se debe al campo inducido sobre la misma, generando una activación más prolongada de proteínas de membrana y por consiguiente mayor ingreso de sustancias tales como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . El valor de la diferencia de potencial a través de la membrana celular animal suele variar entre -20 mV y -200 mV según el tipo celular y el organismo (Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, 2002). Este potencial transmembranal es establecido

por los canales iónicos y proteínas integrados a la membrana celular (Sundelacruz, Levin, & Kaplan, 2009; Xu et al., 2009).

Durante la estimulación de campos biofísicos externos a los tejidos, se debe tener en cuenta no solo la magnitud del campo (eléctrico o magnético), sino también la frecuencia de aplicación. Existe evidencia experimental donde se demuestra que la estimulación de células con un CE a frecuencias entre 20 Hz hasta 448 kHz promueve la proliferación celular, así como la producción de proteínas propias de la matriz extracelular de cada línea celular (Foster, 2000; Luisa, Luis, María, & Trillo, 2014; J. J. Vaca-González et al., 2016; B. Zhang et al., 2010; Zizic et al., 1995). Por ejemplo, (Foster, 2000) menciona que la excitación de la membrana celular se da aproximadamente con valores de 1 KHz o superiores. Sin embargo, las frecuencias de baja magnitud de 10 Hz hasta 100 Hz son generalmente las más utilizadas ya que se consideran naturales y adicionalmente se han reportado como las más efectivas a la hora de estimular tejidos (Balint, Cassidy, & Cartmell, 2013).

Adicionalmente, existen gran cantidad de reportes en los cuales realizan estímulos celulares *in vitro* con CM con magnitudes entre 0,4 mT y 2,3 mT, que muestran un efecto favorable en la proliferación celular (M De Mattei et al., 2001; Fini et al., 2005; Vanessa et al., 2007). Trabajos como los de (Liu, 1996) y (Monica De Mattei et al., 2004) concluyen que el tratamiento con CM conserva el contenido de proteoglicanos sulfatados del cartílago, principales responsables de mantener la hidratación y por ende compresibilidad del tejido, lo cual permite concluir que es un método terapéutico potencial para la recuperación del cartílago. Por otro lado, (Stolfa et al., 2007) con un campo de 0,6 T y a una frecuencia de 21,2 MHz comprobó que el campo magnético induce un aumento significativo en la actividad metabólica en todos los experimentos después de 72 horas de aplicación.

Como se mencionó anteriormente existen evidencias que demuestran el efecto biológico tanto del CE como del CM. Sin embargo, los mecanismos no están muy bien entendidos lo cual ha conllevado a la realización de modelos computacionales especialmente con CE con el objeto de dar una explicación a esta interacción. Una de las razones es, que los rangos de frecuencias de CE y CM con las que se puede estimular un cultivo celular son muy extensos. Adicionalmente, hay que tener en cuenta el tiempo y los costos económicos que conlleva realizar experimentos suficientes para demostrar ciertas hipótesis. Por lo

tanto, alternativas computacionales se han implementado con el objetivo de evaluar el efecto que tiene los estímulos biofísicos sobre el comportamiento celular. Debido a lo anterior, existen modelos computacionales en los cuales se evalúa el efecto sobre la membrana celular en presencia de un CE y sus efectos al momento de variar la frecuencia (Taghian, Narmoneva, & Kogan, 2015), sin embargo la geometría de la célula utilizada no se acercan lo suficiente a las condiciones a las que se encuentra cuando está en un cultivo monocapa. Otros estudios brindan apoyo indirecto para demostrar que ciertos campos con frecuencias específicas pueden desencadenar una variedad de eventos de señalización intracelular que involucran redistribución de carga y flujo iónico, incluyendo propagación de señal a través de Ca^{2+} (Sheikh et al., 2012). En cuanto al efecto sobre la membrana celular en presencia de un CM no se han encontrado modelos computacionales que indique si existe un efecto positivo y negativo sobre la célula.

De acuerdo con lo descrito anteriormente el objetivo de este estudio fue simular el efecto sobre la membrana celular al ser estimulada tanto con un CE o un CM. Adicionalmente, se quiso comprobar si el campo inducido por los estímulos es suficiente para generar una interacción en los canales de señalización de la membrana celular. Para llevar esto a cabo se implementó un modelo por elementos finitos. Fue simulada una célula con una capa no conductora (membrana celular) que separa dos regiones conductoras, el medio de cultivo y el citoplasma. La célula se consideró como un cultivo celular en monocapa. La forma de la célula se varió en tres diferentes geometrías: una esférica y dos geometrías elipsoidales diferentes. Con lo anterior se quería observar el comportamiento de la membrana celular mientras es estimulada por un CE o CM. Todos los valores de los estímulos biofísicos fueron seleccionados basados en rangos biológicos. Los resultados obtenidos demuestran que existe una concentración de carga al momento que se pasa de una forma esférica a una elipsoidal, es decir que se acumula el CE cuando el área es menor. Por otro lado, en el CM no existe un efecto notorio sobre la membrana celular al variar tanto la geometría como el valor de la frecuencia.

En éste estudio se buscó complementar las investigaciones experimentales que se han realizado y obtener una visión más amplia de lo que sucede con la membrana celular al momento de estar expuesta a un estímulo eléctrico o magnético. Este modelo puede complementar las teorías sobre el efecto que se induce en la membrana celular cuando se estimula con un CE y un CM y la relación con la geometría de la célula. Este estudio puede ser útil para todos los investigadores que trabajan en ingeniería de tejidos porque pueden

diseñar sus experimentos en función de los resultados obtenidos de modelos computacionales.

3.2 Materiales y métodos

Modelo Computacional

3.2.1 Modelo matemático

Se realizó un modelo computación haciendo uso del software (COMSOL Multiphysics, Comsol Inc. Los Angeles, USA), mediante el cual se discretizó la geometría con elementos finitos de diferentes tamaños ya que según el área de interés permite una mayor precisión de los resultados. Los elementos con los cuales se discretizó la malla fueron tetraédricos con un tamaño máximo de 1,5 μm con un refinamiento en el espesor y alrededores de la membrana celular llegando a un tamaño mínimo de 0,003 μm . Se realizó un análisis de convergencia de malla. La simulación para CE fue realizada con el módulo de corrientes eléctricas (ec) y para CM con el módulo de campos magnéticos (mf). Los dos modelos se realizaron con en una configuración 2D axisimétrica. Las condiciones de contorno tanto para CE como para CM que se utilizaron en los modelos fueron: temperatura de 310 K es decir la temperatura de una incubadora de cultivo celular y la presión atmosférica estándar de 1 atm.

Mediante la resolución de las ecuaciones de Maxwell las cuales describen los fenómenos electromagnéticos en el dominio del tiempo. Se calculó el campo eléctrico y magnético inducido en cada una de las áreas que se tienen en el modelo (membrana celular, medio de cultivo, aire, citoplasma etc.).

3.2.2 Simulación de Campo Eléctrico

Se modelaron dos electrodos de acero inoxidable lo suficientemente largos para asegurar la distribución homogénea e isotrópica del CE. En medio de los electrodos se ubicó una caja de cultivo celular en la cual están adheridas las células (**Figura 3-1a**). El CE generado entre los electrodos es perpendicular a la célula, con una diferencia de potencial de 100 Vpp. Se realizaron variaciones en la frecuencia con valores de 60 kHz, 10 MHz y 1 GHz. Estos valores se escogieron basados en experimentos realizados por (J. J. Vaca-González et al., 2016) para la primera frecuencia y por (Taghian et al., 2015) para las otras dos. Las propiedades magnéticas y eléctricas de cada uno de los elementos que constituyen las

simulaciones se pueden ver en la **Tabla 3-1**. Se modeló un área lo suficientemente grande para evitar los efectos de borde, siguiendo análisis similares tal como se realiza en dinámica de fluidos computacional. Esta área se modeló para evitar un sesgo en los resultados.

3.2.3 Simulación Campo Magnético

Para la simulación del CM, la bobina se simuló en dos orientaciones diferentes: horizontal y vertical (**Figura 3-1b**). El valor de corriente que se utilizó y el número de vueltas de la bobina fue de 0,024 A y 15 respectivamente con el objetivo de tener una magnitud de CM de 2 mT magnitud reportada por (Monica De Mattei et al., 2004; Fini et al., 2005) donde se evidencia un aumento de proliferación celular. Al igual que en las simulaciones de CE se varió la frecuencia con las mismas magnitudes (60 kHz, 10 MHz y 1 GHz). Las dimensiones de cada uno de los modelos realizados se pueden observar en las **Tabla 3-2** y **Tabla 3-3**. Se modeló un área lo suficientemente grande para evitar los efectos de borde, siguiendo análisis similares tal como se realiza en dinámica de fluidos computacional. Esta área se modeló para evitar un sesgo en los resultados.

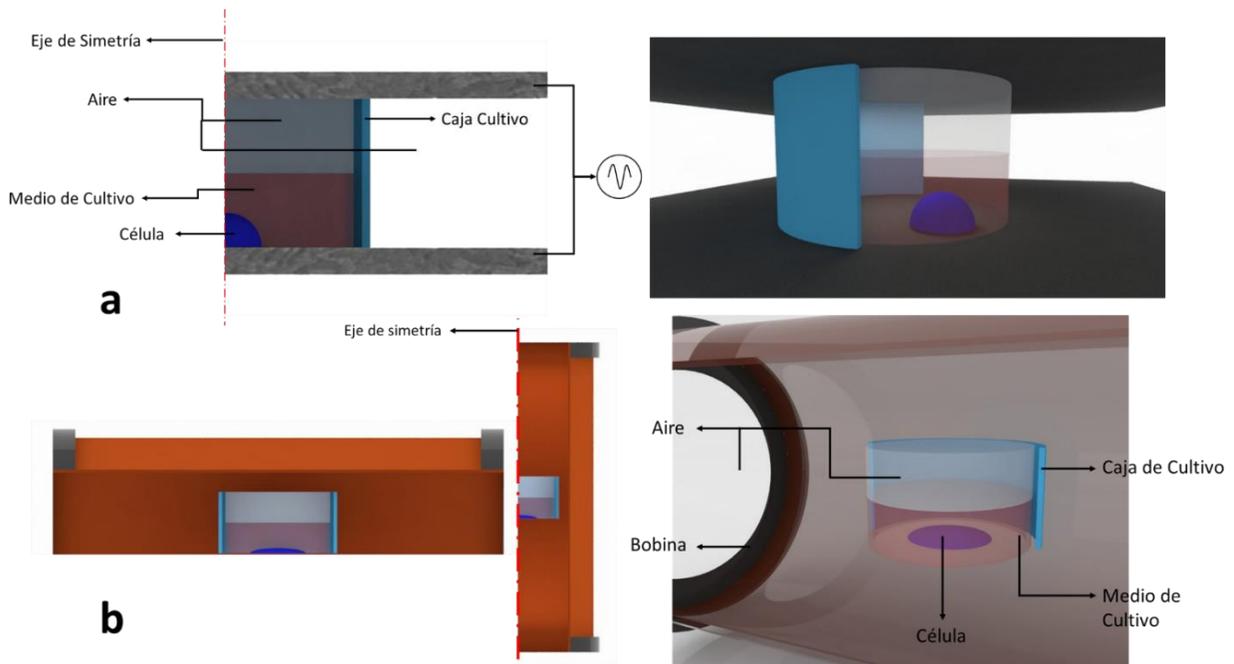


Figura 3-1: Geometría utilizada para las simulaciones computacionales axisimétricas **a)** campo eléctrico, **b)** campo magnético con orientación horizontal de la bobina.

Tabla 3-1: Propiedades Eléctricas utilizadas en las simulaciones

Componente	Parámetro	Valor utilizado en la simulación	Referencia
Membrana Celular	Permitividad Relativa	11.3	(Foster, 2000)
	Conductividad eléctrica	0	(Foster, 2000)
	Permeabilidad Relativa *	1	
Citoplasma	Permitividad Relativa	80	(Fear, Member, & Stuchly, 1998)
	Conductividad eléctrica	1.5 [S/m]	(Zhadobov et al., 2012)
	Permeabilidad Relativa *	1	
Medio de Cultivo	Permitividad Relativa	80	(Fear et al., 1998)
	Conductividad eléctrica	1.5 [S/m]	(Zhadobov et al., 2012)
	Permeabilidad Relativa *	1	
Cobre	Permitividad Relativa	1	
	Conductividad eléctrica	5.998E7 [S/m]	
	Permeabilidad Relativa	1	
Acero Inoxidable	Permitividad Relativa	1	
	Conductividad eléctrica	1.7391 [S/m]	

Caja de Cultivo	Permitividad Relativa	2.6	(Taghian et al., 2015)
	Conductividad eléctrica	10E-16 [S/m]	(Taghian et al., 2015)
	Permeabilidad Relativa	1	
Aire	Permitividad Relativa	1	
	Conductividad eléctrica	0 [S/m]	
	Permeabilidad Relativa	1	

Nota: * La permeabilidad relativa para los tejidos es aproximadamente 1 (Marinova & Mateev, 2010).

3.2.4 Morfología Celular

Se modeló la geometría de la célula considerando una forma esférica y elipsoidal con el objetivo de simular una célula cultivada en monocapa (**Figura 3-2**). En cuanto a la forma elipsoidal se mantuvieron las proporciones en cuanto a la disminución del eje menor (coordenada y) y el aumento del eje mayor (coordenada x) con el fin de mantener un área similar para cada uno de los casos. Las dimensiones implementadas para la célula se encuentran en la **Tabla 3-3** y las medidas de las demás geometrías que componen el modelo tales como la caja de cultivo, electrodos, bobina entre otros, se encuentran en la **Tabla 3-2**. Se consideró que la célula está rodeada de medio de cultivo. Adicionalmente se modeló un dominio que corresponde al aire tal como se presenta en un cultivo celular.

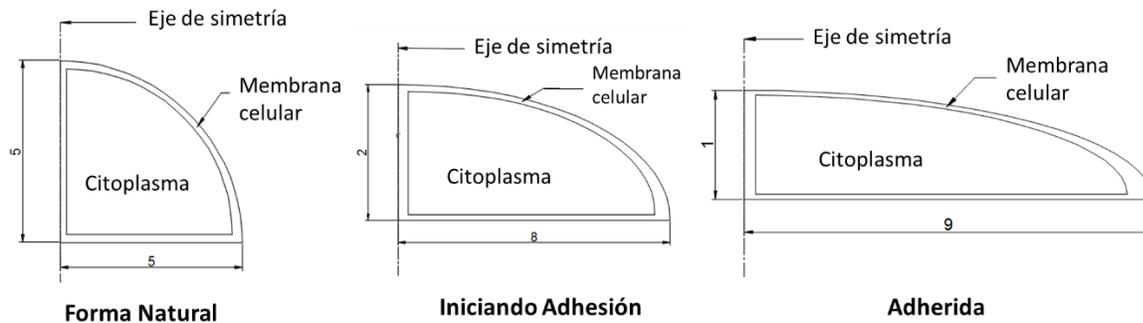


Figura 3-2: Geometrías de la célula para la realización del modelo en tres etapas diferentes.

Tabla 3-2: Dimensiones geométricas del modelo

Componente	Parámetro	Dimensión (μm)	Referencia
Membrana Celular	Espesor	0.005	(Kotnik & Miklavcic, 1998)
Medio de Cultivo	Alto	25	
	Ancho	30	
Bobina	Ancho	2	
	Alto	200	
	Distancia al eje	50	
Caja de Cultivo	Espesor	1	(Taghian et al., 2015)
	Separación	50	
Electrodos	Espesor	5	
	Ancho	70	
Aire	Ancho	30	
	Alto	23	

Tabla 3-3: Dimensiones de las células modeladas.

Componente	Parámetro	Dimensión (μm)	Referencia
Membrana Celular	Espesor	0.005	(Kotnik & Miklavcic, 1998)
Citoplasma	Eje mayor (μm)	Eje menor (μm)	(Rip et al., 2004; Taghian et al., 2015)
	5	5	
	8	2	
	9	1	

3.3 Resultados

3.3.1 Convergencia de malla

La calidad de la malla es muy importante a la hora de realizar un modelo por elementos finitos ya que de esta depende la estabilidad y exactitud de los cálculos numéricos. Para la realización de la malla se decidió utilizar elementos triangulares, esto se debe a los recursos computacionales disponibles ya que con otro tipo de elementos (hexaédricos) el costo computacional puede llegar a ser excesivo. Adicionalmente, la geometría que se tiene de la célula y en especial el espesor de la membrana celular son extremadamente pequeños lo cual aumenta el costo computacional.

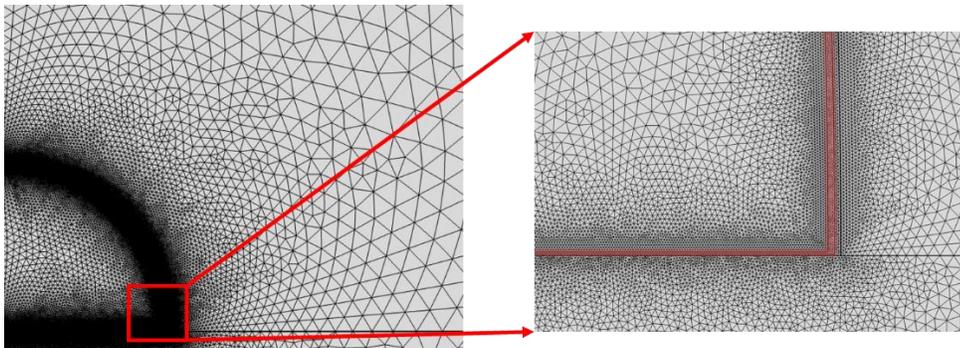


Figura 3-3: Refinamiento de la malla en la membrana celular para garantizar valores de CE y CM.

En los dominios que comprende la membrana celular se realizó un refinamiento con el fin de obtener una aproximación lo suficientemente precisa. Debido a lo anterior la densidad de la malla en este dominio es elevada tal como se puede apreciar en la **Figura 3-3**. El análisis de convergencia de malla se puede apreciar en la **Figura 3-4**. Como se puede observar se realizaron mallas con diferentes cantidades de elementos. Lo anterior con el fin de encontrar el valor del CE o CM sin necesidad de aumentar el costo computacional. Como se puede observar (**Figura 3-4a**) la curva toma un comportamiento estable después 650000 elementos. Sin embargo, para poder garantizar la veracidad de los resultados de los campos se decidió trabajar con mallas con un total de elementos de 750000. Con este número de elementos se puede apreciar en la **Figura 3-4b** que el error relativo es de 0,14% el cual es el más bajo en comparación con mallas con mayor número de elementos. Al momento de realizar mallas con un mayor número de elementos el costo computacional fue excesivo y el resultado del campo calculado era el mismo. Por tal motivo y por qué el error relativo es menor al 1% (**Figura 3-4b**) (Tu, Yeoh, & Liu, 2008), se decidió trabajar con mallas con elementos del orden de 700000.

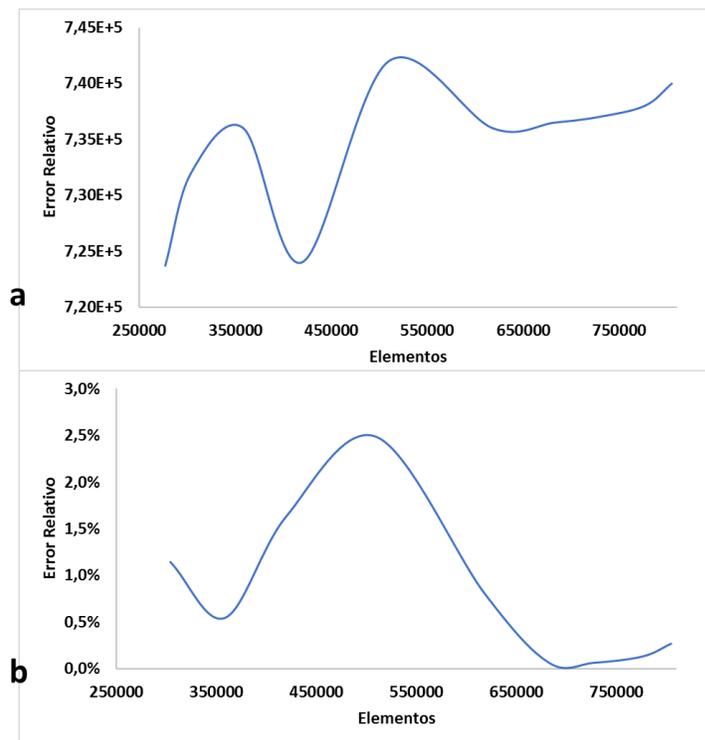


Figura 3-4: Estudios de convergencia de la malla para la realización de las simulaciones. **a)** grafica de número de elementos vs CE **b)** grafica de número de elementos vs error relativo. Las mallas utilizadas no exceden el 1% de error.

3.3.2 Estimulación Eléctrica

La primera simulación que se realizó consistió en aplicar un CE a una célula con forma esférica tal como se puede ver en la **Figura 3-5a**. En esta se puede observar la magnitud del CE en todos los dominios, principalmente en la membrana celular tal como sucede en las otras simulaciones al variar tanto la forma de la célula como la frecuencia. En la **Figura 3-5b** se observa una magnitud de 45×10^3 V/m para una frecuencia de 60 kHz en la parte superior de la membrana celular, para las frecuencias de 10 MHz y de 1 GHz los valores son de 72×10^3 V/m y 69×10^3 V/m respectivamente. Este valor va disminuyendo a medida que se acerca al borde de la célula. Esta razón con la cual va decayendo la magnitud del CE sobre la membrana es constante siempre y cuando el área donde se distribuye es constante. También se puede ver en la **Figura 3-5** el efecto de borde causado por los electrodos de acero inoxidable, causado por la geometría de los mismos.

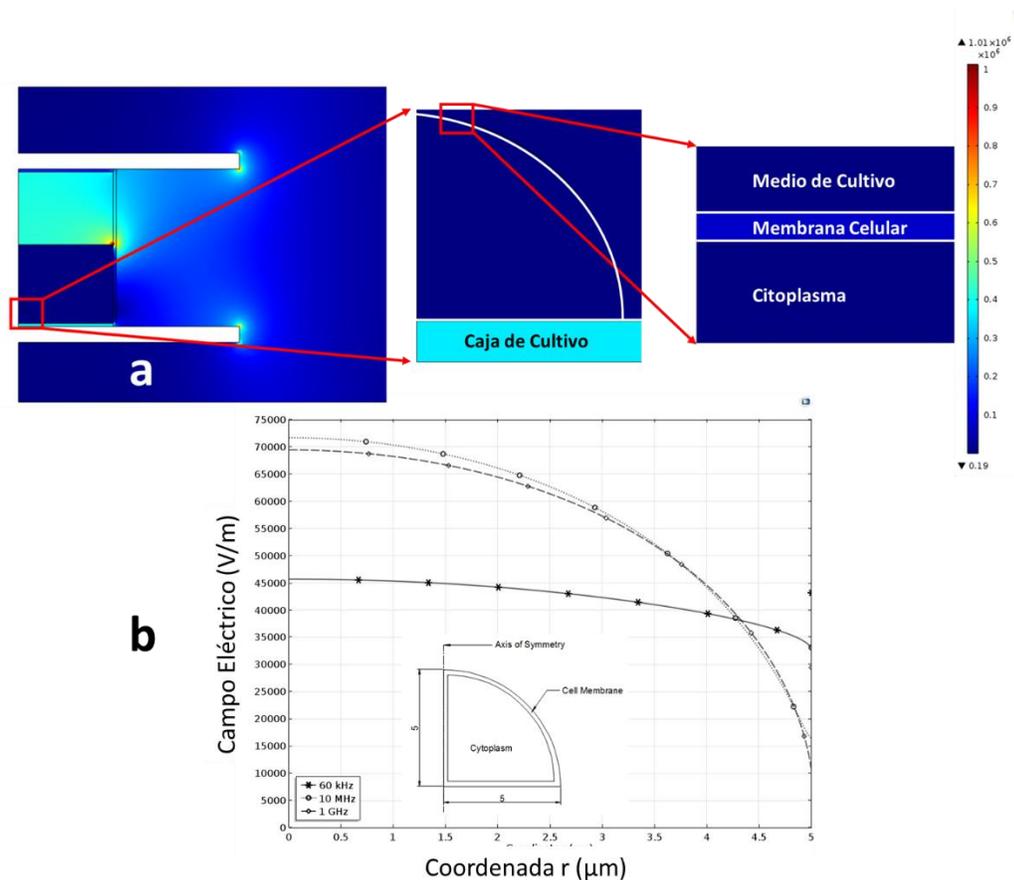


Figura 3-5: Simulación del CE (V/m) de una célula cultivada en monocapa **a)** efecto en la membrana celular a una frecuencia de 60 kHz. **b)** Valores de CE a través de la membrana celular con radio de 5 μm.

Cuando la geometría de la célula es de forma elipsoidal podemos apreciar que el comportamiento del CE sobre la membrana es diferente a medida que se aumenta la frecuencia (**Figura 3-6a**). En ambas formas elipsoidales estudiadas se presenta un fenómeno físico denominado efecto punta. Este fenómeno físico se basa en la acumulación de carga eléctrica en la superficie de un material el cual está en presencia de un CE externo (Yang et al., 2017; R. Zhang et al., 2016). Este valor de carga se tenderá a distribuir uniformemente en toda la superficie, es decir que, si el área es menor, su densidad de carga tenderá a ser mucho mayor. Lo anterior explica el pico que se presenta en la **Figura 3-6a** y en la **Figura 3-6b** especialmente con la frecuencia de 60 kHz. Por ejemplo, cuando el CE tiene una frecuencia de 60 kHz en la **Figura 3-6a** la magnitud de este es de 8.1×10^5 V/m. Sin embargo, cuando la frecuencia aumenta (10 MHz y 1 GHz) este efecto desaparece y se tiene un valor constante de 7.5×10^5 V/m y 7.2×10^5 V/m respectivamente.

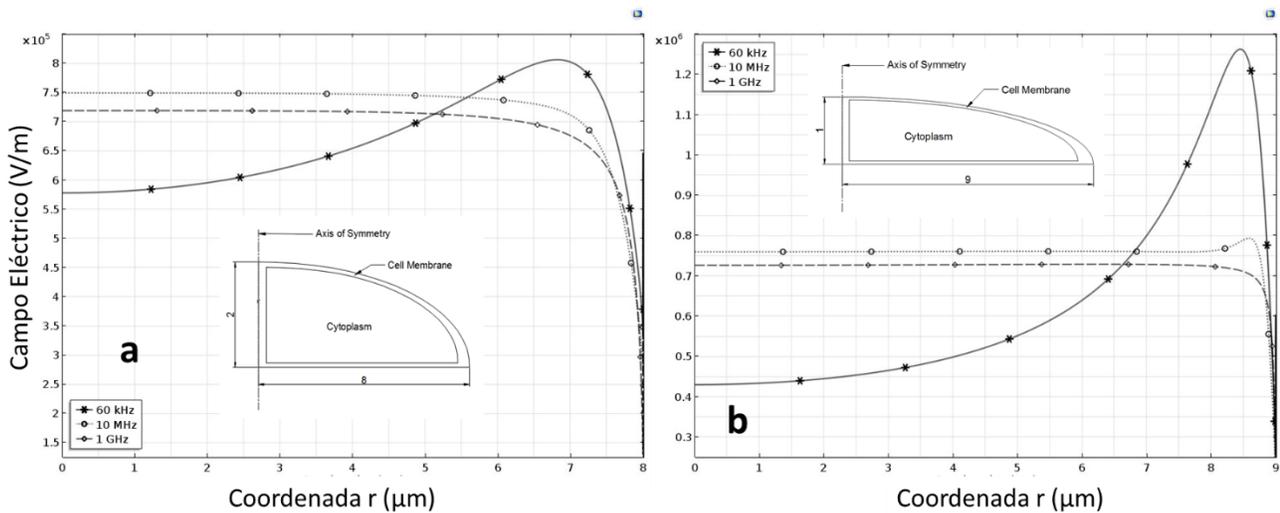


Figura 3-6: Valores de CE a través de la membrana celular **a)** con eje mayor de $8 \mu\text{m}$ y eje menor de $2 \mu\text{m}$. **b)** con eje mayor de $9 \mu\text{m}$ y eje menor de $1 \mu\text{m}$.

En la **Figura 3-6b** se presenta un fenómeno similar al de la **Figura 3-6a**. Se puede observar en la **Figura 3-6b** que existe un punto en el que hay concentración de carga con frecuencias tanto de 60 kHz (12.6×10^5 V/m) como en 10 MHz (7.9×10^5 V/m). Se evidencia un claro aumento en la magnitud del CE en el área concentradora de carga a 60 kHz pasando de 8.1×10^5 V/m (eje mayor $8 \mu\text{m}$) a un valor de 12.6×10^5 V/m (eje mayor $9 \mu\text{m}$), con lo cual se puede decir que hay una relación entre la frecuencia y la geometría de la célula, en especial en el extremo de la célula. Adicionalmente, se puede apreciar una cresta la membrana celular estimulada a una frecuencia de 10 MHz, pero con un valor

máximo mucho menor en comparación con la de 60 kHz. Realizando una comparación de las tres geometrías realizadas podemos ver que las magnitudes del CE en la membrana cambian además la concentración de carga se desplaza al extremo de la célula, debido a la disminución del área superficial en esta zona de la célula.

Como se puede ver en las **Figura 3-6a** y **Figura 3-6b** existe un valor pico de la magnitud del campo a frecuencias bajas en donde el radio de curvatura es menor. Al realizar una comparación con un valor de frecuencia de 60 kHz variando la geometría de la célula se evidencia la magnitud del campo inducido en la membrana celular en un caso en el que la estimulación se comience a realizar en el mismo momento en que la célula fue colocada en la caja de cultivo hasta el punto en el que la misma se fija a la caja y toma su forma aproximada elipsoidal (**Figura 3-7**). Adicionalmente, el valor de 12.6×10^5 V/m no supera los valores de potencial de membrana naturales los cuales están entre -10 a -100 mV (Sundelacruz et al., 2009). Por otro lado, podemos observar en la **Figura 3-7b** la diferencia de valores del CE en la mitad de la membrana celular comparada con la parte externa e interna cuando la célula esta adherida a caja de cultivo. Los valores de campo eléctrico tanto en la parte interna como externa tienen el mismo comportamiento, llegando a un valor máximo de 6.5×10^5 V/m. Sin embargo, como se había mencionado anteriormente en el centro de la membrana es mayor.

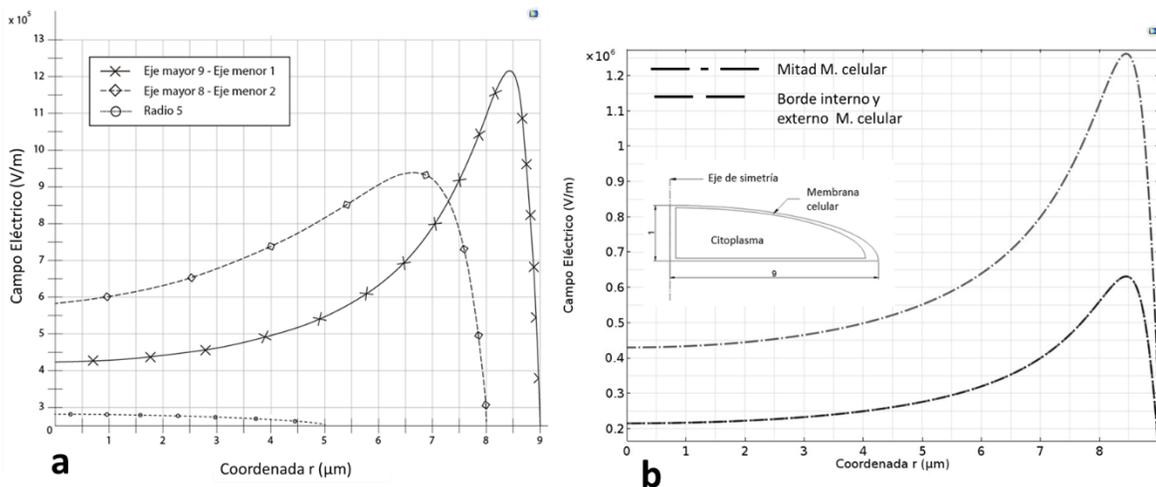


Figura 3-7: Comparaciones entre las magnitudes de CE con una frecuencia de 60 kHz **a)** Variación de la geometría de la célula. Se evidencia como va aumentando la concentración de carga a medida

que cambia la forma de la célula. **b)** Magnitud de CE en el borde externo, en la mitad y en el borde interno de la membrana celular.

Se realizó una gráfica logarítmica de la frecuencia respecto al CE (

Figura 3-8a) en la cual se puede ver que en el punto C es el lugar donde a frecuencias bajas (menores a 60 kHz) existe una magnitud de campo inducido mayor en comparación con los otros dos puntos (A y B) en los cuales se hizo la medición. Debido a lo anterior se podría llegar a pensar que esta magnitud de campo inducido provoque una apoptosis celular. Sin embargo, a medida que la frecuencia aumenta sin importar el lugar en el contorno de la membrana celular el valor de campo será constante (7.5×10^5 V/m).

En las tres geometrías estudiadas se evidenció que siempre hay una magnitud de CE más alta en la parte superior de la membrana con la frecuencia de 10 MHz en comparación con la frecuencia de 1 GHz y de 60 kHz (**Figura 3-5b** y **Figura 3-6a** y **Figura 3-6b**). Ahora bien, la magnitud de CE es completamente diferente en la superficie de la membrana celular que está en contacto con la caja de cultivo como se puede ver en la **Figura 3-5a**. En esta área donde la célula se fija a la caja de cultivo la magnitud de CE es constante sin importar la geometría de la célula. El valor de campo para la frecuencia de 1 GHz es de 7.3×10^5 V/m y para las frecuencias de 60 kHz y 10 MHz tiene un valor de 7.7×10^5 V/m. Por lo tanto, se puede decir que existe una gran variación del campo inducido en la membrana celular que no está en contacto con la caja de cultivo, y por consiguiente habrá una mayor polarización de la membrana celular ocasionando una mayor actividad de los canales de señalización.

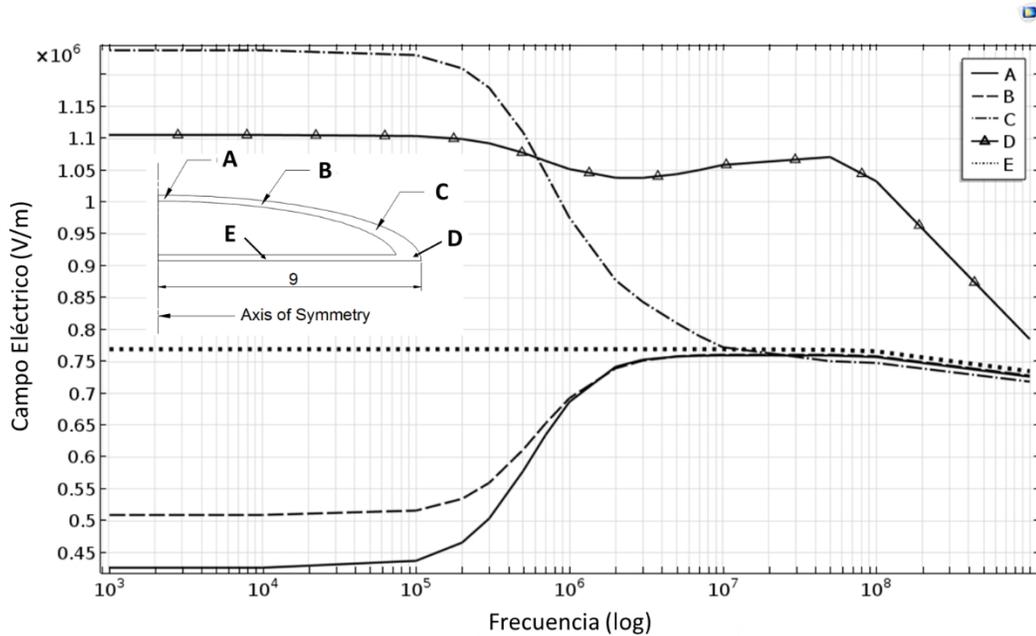


Figura 3-8: CE con respecto a la frecuencia en diferentes puntos de la membrana celular.

3.3.3 Estimulación Magnética

Adicionalmente, se realizó la simulación de una célula en presencia de un CM con el fin de observar el comportamiento de la membrana celular bajo este estímulo biofísico (**Figura 3-9a**). También se puede apreciar en la **Figura 3-9a** el efecto de borde debido al campo magnético producido por la bobina. Este fenómeno no tiene ninguna implicación positiva o negativa sobre la membrana celular. Los resultados muestran que el valor del CM no varía entre el ambiente extracelular, la membrana y el intracelular, a diferencia de lo observado con el CE donde se observó un aumento en la magnitud del campo en el área de la membrana celular (**Figura 3-5a**). La distribución de campo es uniforme al interior de la bobina con un valor de 2 mT (**Figura 3-9b**). Adicionalmente, no se observa ningún efecto en las demás áreas de la geometría construida (medio de cultivo, caja de cultivo y aire). Estos resultados que se presentan son iguales tanto al modificar la frecuencia, la forma de la célula y al modelar la bobina con una orientación horizontal y vertical.

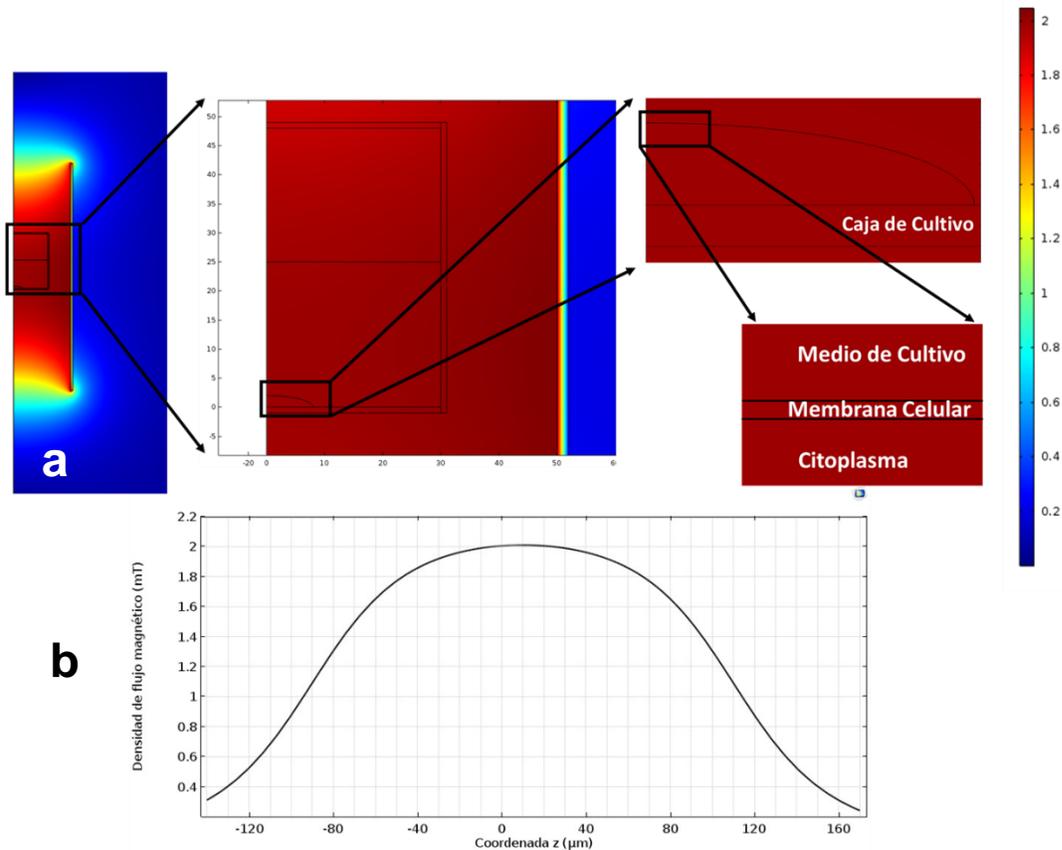


Figura 3-9: Simulación de una bobina la cual tiene una caja de cultivo con una célula sumergida en medio de cultivo y su efecto en la membrana celular a una frecuencia de 10 MHz. **a)** Efecto del CM sobre la membrana celular **b)** Distribución del CM a través de la longitud de la bobina con una magnitud de CM de 2 mT.

3.4 Discusión

Es conocido que el estímulo de CE y CM afecta proteínas en la membrana celular permitiendo el transporte activo (por aperturas de canales iónicos y estimulación de bombas) y pasivo (por difusión iónica) de iones a través de esta. El estudio de la distribución de los campos cuando se aplica a un cultivo monocapa permitirá conocer cuál es el efecto de la variación de la frecuencia sobre la magnitud del estímulo en la capa fosfolipídica y en el citoplasma. Debido a lo anterior es que este modelo supone un primer marco de trabajo para el diseño experimental de cultivo en monocapa.

El objetivo de esta investigación fue demostrar el efecto que existe en la membrana celular de una célula cultivada en monocapa cuando está siendo estimulada tanto por un CE como

un CM. Los resultados obtenidos concuerdan con los conseguidos por (Taghian et al., 2015), ya que se puede apreciar la influencia que tiene la frecuencia sobre la membrana celular cuando se estimula con un CE. Sin embargo si se comparan los valores de campo inducido obtenidos por (Taghian et al., 2015) existen variaciones notables, ya que para una célula de morfología esférica estimulada con un CE a frecuencias de 10 MHz ellos obtiene un valor máximo en la membrana celular de 12×10^5 V/m, mientras que en este estudio se obtuvo un valor de 72×10^3 V/m.

De manera similar a lo propuesto por (Taghian et al., 2015), quien en su estudio concluyó que tanto la frecuencia como la magnitud del CE son factores relevantes que influyen sobre el comportamiento de la membrana celular, nuestros resultados evidencian cambios importantes en la magnitud del campo censado en la membrana celular en función de estas dos variables. Adicionalmente, se observan cambios en la distribución del campo en la membrana en función de la morfología celular cuando la forma cambia a elipsoidal. Esto puede ser relevante a la hora de interpretar resultados obtenidos *in vitro* y su potencial extrapolación a escenarios *in vivo*.

Nuestros resultados parecen indicar que la diferencia de potencial inducida en la membrana celular puede ser la desencadenante de los efectos celulares que se han observado en ensayos *in vitro* e *in vivo*, en donde se ha documentado aumento de proliferación, migración, diferenciación celular y síntesis de proteínas (Hartig, Joos, & Wiesmann, 2000; NAKASUJI Shota, MORITA Yusuke, 2009; J. J. Vaca-González et al., 2016). Algunos autores han sugerido que dicho potencial es capaz de activar mecanismos de señalización a través de los canales de calcio dependientes del voltaje (VDCC), receptores de potencial transitorio vaniloides (TRPV4) (Kis-Toth et al., 2011; Lieben & Carmeliet, 2012; Matta, Zákány, & Mobasher, 2015) entre otros, los cuales se pueden abrir como respuesta a los cambios en el potencial de la membrana para permitir que los iones inorgánicos difundan sus gradientes electroquímicos a través de la membrana celular para activar diferentes eventos bioquímicos como la expresión génica y la producción de proteínas (Kis-Toth et al., 2011; Matta, 2013; Xu et al., 2009). Es decir que si estos canales (VDCC, TRPV4) son activados eléctricamente, iones como el Ca^{2+} ingresan a la célula activando intracelularmente varios factores de transcripción. En el caso de los condrocitos, la entrada de iones de Ca^{2+} permite la unión Ca^{2+} /calmodulina, una proteína intracelular que actúa como receptora de calcio, para activar la expresión del factor de transcripción SOX9 (Xu et al., 2009). El SOX9 actúa en conjunto con otras proteínas intracelulares para

activar la producción de proteínas tales como el colágeno tipo II y agregan (Matta, 2013; Matta et al., 2015; Xu et al., 2009). Por lo tanto, esto nos permite plantear la hipótesis que, si los canales VDCC se activan a través del uso de estímulos biofísicos externos, es posible elevar la producción de proteínas extracelulares.

Basados en lo mencionado anteriormente hay algunos estudios *in vitro* en los que demuestran valores de CE donde la membrana celular se permeabiliza. Por ejemplo, (Teissie & Rols, 1993) aplicó un CE a células de ovario de hámster chino y demuestra que a medida que se aumenta el CE, también aumenta la permeabilización de la célula, con un valor máximo de 1 kV/cm.. Adicionalmente, (Saulis & Saul, 2012) obtuvieron resultados similares ya que aumentaron la concentración extracelular de potasio (K^+) con un valor máximo de CE de 1,2 kV/cm. Comparando esos resultados con nuestro modelo, se puede decir que la frecuencia que mejor se ajusta a los resultados de (Teissie & Rols, 1993) es 60 kHz (**Figura 3-5**) donde se tiene una forma esférica de la célula, esta geometría es la que se asemeja a las condiciones naturales de esta. Como podemos ver, los modelos computacionales pueden predecir y estimar el CE sobre la membrana celular, proporcionando una nueva herramienta para la planificación de nuevos experimentos.

De acuerdo con los resultados obtenidos por (Caraglia et al., 2005), se puede generar la hipótesis que el CE puede generar apoptosis, ya que en su estudio se evidenció que CE aplicados a frecuencias de 1.95 GHz desencadenan un proceso de apoptosis en células cancerígenas epidérmica. Sin embargo, el objetivo de este estudio no es determinar la frecuencia en la cual las células mueren sino por el contrario promover la viabilidad, por tal motivo se debería concluir que la estimulación a frecuencias muy altas no es favorable para las células sanas. Por otro lado, en la **Figura 3-7** se ve los efectos sobre la membrana celular al cultivar una célula en monocapa a diferencia de tenerla en un medio tridimensional (con una misma frecuencia). Este fenómeno podría ser una de las causantes de la diferenciación que sufren las células al cultivarlas en monocapa. Así mismo se puede observar la importancia que tienen los modelos computacionales para lograr una clara comprensión de como el CE afecta a la célula.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que el CM no genera un efecto sobre la membrana celular, por lo tanto, no hay campos inducidos en la membrana tal como sucede con el CE. Estos resultados contrastan con lo observado en múltiples experimentos *in vitro* que señalan que la estimulación con CM en condrocitos promueve la proliferación celular

y por ende un potencial tratamiento terapéutico para la regeneración del cartílago articular (M De Mattei et al., 2001; Monica De Mattei et al., 2004; Fini et al., 2005; Liu, 1996; Livingston et al., 2011; Pezzetti et al., 1999; Vanessa et al., 2007). Adicionalmente, (Zwolińska et al., 2016) menciona que el CM causa el movimiento de iones al interior de la célula lo que genera una hiperpolarización de la membrana celular aumentando el uso de oxígeno por la célula. Por ejemplo, (Fanelli et al., 1999) en sus ensayos demuestran que los CM tienen un efecto anti apoptótico en células U937 si el campo tiene valores entre 2 mT y 6 mT con una disminución máxima de 1,9 estimulando con un CM de 6 mT. Al igual que comprueban que el efecto anti apoptótico está ligado a la habilidad del CM de aumentar el flujo de Ca^{2+} al interior de la célula (Fanelli et al., 1999). Así mismo (Miyakoshi, 2005) sugiere que el efecto de un CM varía según el tipo celular. Por otro lado (Rosen, 2003) realizando una estimulación a células GH3 (células cancerígenas de glándula pituitaria) encontró que hubo una reducción en la corriente pico en los canales activados por voltaje de Na^+ . En cuanto a estimulaciones *in vivo* se ha encontrado que el tratamiento de la artritis reumatoide con CM genera un efecto analgésico, reduce la inflamación y el dolor en los pacientes (Zwolińska et al., 2016).

En cuanto a modelos matemáticos con CM hasta el momento no se han encontrado investigaciones similares, sin embargo, es claro que no se evidencia ningún efecto físico sobre la membrana celular. Esto se debe a que los CMs no necesitan de un medio para su propagación como si sucede con el CE. Adicionalmente, existen teorías en las cuales se cree que el campo magnético afecta las reservas de Ca^{2+} al interior de la célula y de este modo se activa la calmodulina para generar mayor síntesis de proteínas (Balint et al., 2013). Debido a lo anterior, esto llevaría a realizar futuros modelos que aborden aspectos biológicos de la célula para dar una explicación del efecto del CM sobre el citoplasma o mejor aún sobre algún organelo en específico.

4. Evaluación In Vitro del Efecto de una Estimulación con Campos Magnéticos a Condrocitos.

4.1 Introducción

El cartílago articular es un tejido conectivo que actúa como una superficie lisa, lubricada y de baja fricción para facilitar el movimiento entre las superficies articulares (Bhosale & Richardson, 2008; Lee, Grad, Wimmer, & Alini, 2006). Dado que este tejido cumple con una función de amortiguación, requiere de una estructura molecular especializada para resistir las cargas mecánicas a las que es sometido durante la actividad diaria. En este contexto el condrocito, el único componente celular que constituye el cartílago, es el encargado sintetizar y mantener las principales moléculas características de la matriz extracelular del cartílago tales como el colágeno, proteoglicanos como el agregan (Bhosale & Richardson, 2008; J. Cole & M. Mike, 2004; Vega Álvarez, García-Suárez, Fernández Monjil, & del Valle Soto, 2002). Los proteoglicanos están conformados por largas cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs tienen una carga altamente negativa y, por lo tanto, atraen sodio por lo que se consideran moléculas osmóticamente activas, lo que hace que se atraigan grandes cantidades de agua a su estructura de tal manera que este tejido se caracteriza por un alto contenido de agua entre 65% a 85% (Gentili & Cancedda, 2009), (J. Cole & M. Mike, 2004).

El cartílago articular es un tejido avascular, aneural, alinfático (Landínez-parra & Garzón-alvarado, 2009; J. J. Vaca-González et al., 2016; Juan J. Vaca-González et al., 2017) y con baja densidad celular. Además, es un tejido que tiene una baja capacidad de autoregeneración ante posibles lesiones causadas por el envejecimiento o una carga excesiva sobre la articulación. Debido a las causas anteriores pueden disminuir la calidad del tejido generando enfermedades degenerativas tales como la osteoartritis (OA) (Vega

Álvarez et al., 2002), (Martínez, Martínez, Calvo, & Poblete, 2015). Por ejemplo, en Colombia la población entre los 45 – 65 años tienen un 30% de probabilidad de contraer esta enfermedad, convirtiéndose en un problema de salud pública (Colombiana de Salud, 2014). Para reparar este tejido existen métodos terapéuticos invasivos como por ejemplo penetración del hueso subcondral en la cual se afectan los vasos sanguíneos subcondrales provocando la creación de un coágulo de fibrina o también la micro fractura donde se genera un defecto homogéneo y definido (Bhosale & Richardson, 2008; Kalson, Gikas, & Briggs, 2010; Temenoff & Mikos, 2000). Sin embargo, estos tratamientos son técnicas costosas en las cuales afectan tejidos sanos. Recientemente, también se ha propuesto la terapia celular autóloga donde los condrocitos son aislados de una zona no lesionada del paciente, expandidos a través de técnicas *in vitro* y por último injertados en el sitio de la lesión (Bhosale & Richardson, 2008; Kalson et al., 2010; Temenoff & Mikos, 2000). No obstante, el uso de estas intervenciones y terapias regenerativas solo generan un efecto a corto y mediano plazo (Bhosale & Richardson, 2008). Estos tratamientos podrían ser mejorados si se puede implementar un tratamiento externo que promueva la proliferación celular y producción de proteínas y por consiguiente matriz extracelular con el fin de evitar la intervención quirúrgica del paciente, la afectación de tejidos sanos y el desarrollo de enfermedades degenerativas.

Se ha evidenciado en varios estudios que los condrocitos responden a estímulos externos como los campos magnéticos (CM). Por ejemplo, (Liu, 1996) demostró que un CM de 0,1 mT aplicados células de pollo durante 3 h/día conserva el contenido de proteoglicanos sulfatados del cartílago. Investigaciones similares se han llevado a cabo en las cuales realizan estímulos celulares *in vitro* con magnitudes del CM entre 0,4 mT y 2,3 mT, en ellas demuestran un efecto favorable en la proliferación celular (M De Mattei et al., 2001; Fini et al., 2005; Vanessa et al., 2007). Con una magnitud de campo más alta de 0,6 T, (Stolfa et al., 2007) con sus resultados comprobó que el campo magnético induce un aumento significativo en la actividad metabólica de los condrocitos en todos los experimentos después de la aplicación de 72 h. Basado en esto se puede concluir que la estimulación con CM es un potencial método terapéutico para el cartílago como también lo concluye (Monica De Mattei et al., 2004) en su investigación.

A pesar de la evidencia descrita anteriormente, en varias de las investigaciones que se han realizado (Monica De Mattei et al., 2003, 2004; Luo et al., 2012; Pezzetti et al., 1999; Sadoghi et al., 2013; Vanessa et al., 2007) no se garantiza que el cultivo celular este

expuesto a un CM homogéneo debido a dos razones: La primer razón se basa en la implementación de bobinas de Helmholtz ya que estas bobinas se caracterizan por producir un CM con una magnitud constante en la mitad de la distancia de separación de estas; sin embargo, la magnitud del campo es baja y no abarca la superficie completa del cultivo celular. La segunda razón radica en que en ningún estudio se evidencia tanto la distribución como la magnitud del campo al interior de las bobinas y en la superficie del cultivo celular. Adicional a esto, existe una discrepancia en los tiempos de estimulación, como también la magnitud exacta del CM en los cuales las tasas de proliferación y síntesis de matriz extracelular serían las óptimas.

Basados en las limitaciones que se tiene actualmente con la regeneración del cartílago articular mencionadas anteriormente, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del CM sobre condrocitos cultivados en monocapa. Los cultivos fueron estimulados con dos magnitudes de CM (1 mT y 2 mT). Estas magnitudes de CM fueron seleccionadas basados en lo descrito por otros autores donde obtiene buenos resultados de proliferación y síntesis de matriz extracelular (M De Mattei et al., 2001; Monica De Mattei et al., 2003; Schmidt-Rohlung et al., 2008). Se decidió implementar tres tiempos de estimulación (1 hora, 3 horas y 5 horas) durante una semana de cultivo. Para ello, se realizó el cálculo matemático, diseño y simulación de un dispositivo capaz de generar un CM homogéneo sobre toda la superficie del cultivo celular. En esta investigación se realizó una comparación del efecto de dos CM con tres tiempos de estimulación, metodología que no se ha visto en las investigaciones consultadas. Los resultados obtenidos demuestran que, según el CM y el tiempo de estimulación aplicados, se puede aumentar la proliferación celular o estimular la síntesis de GAGs. Con lo anterior se puede llegar a contribuir al método terapéutico de implantación autóloga, además de mejorar futuras estrategias de cultivo en ingeniería de tejidos considerando que el CM es versátil a la hora de ser implementado.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Estimación Teórica del Campo Magnético

Para el diseño del dispositivo de estimulación magnética se realizó el cálculo de la bobina con el objetivo de garantizar una magnitud de campo homogénea en gran parte de su longitud. Para ello se utilizó la siguiente ecuación: (Jiles, 1991)

$$B_{int} = \frac{\mu_0 N I}{h} \quad (4.1)$$

Donde

μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío ($4\pi \times 10^{-7}$), N es el número de vueltas del alambre de cobre, I la corriente y h la longitud de la bobina, la cual debe ser mayor a su diámetro.

Haciendo uso de la ecuación (4.1) se calculó el número de vueltas necesarias para producir un campo máximo de 2 mT con una longitud de 250 mm de la bobina y corriente de 1 A.

4.2.2 Simulación del Dispositivo de Estimulación Magnética

Para corroborar el resultado obtenido por la ecuación (4.1) se realizó una simulación computacional haciendo un análisis de la distribución del CM por medio de elementos finitos en el software COMSOL Multiphysics, Comsol Inc. Los Angeles, USA. La simulación consistió en modelar la bobina con una configuración 2D axisimétrica como se observa en la **Figura 4-1a**. Los parámetros de entrada al sistema son los descritos en la sección anterior. Se generaron dos dominios, el primero representa la pared del tubo de PVC en el cual se va a realizar el embobinado (**Figura 4-1b**) y el segundo simula el ambiente que rodea la bobina (aire). Las condiciones de contorno que se utilizaron en el modelo fueron: temperatura de 310 K y la presión atmosférica estándar de 1 atm ya que son las propiedades dadas por una incubadora de cultivo celular.

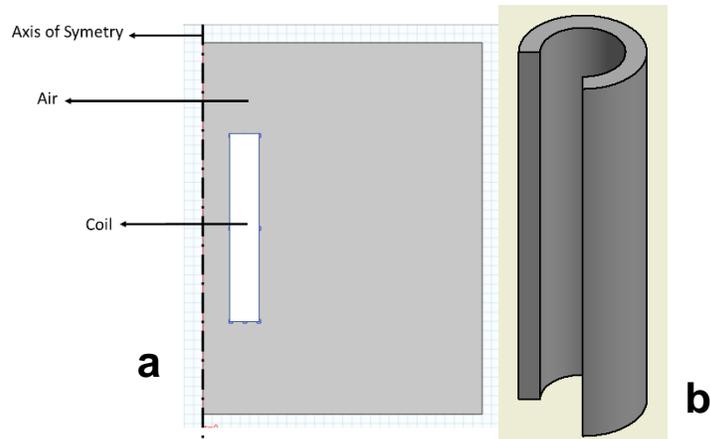


Figura 4-1: Geometría utilizada en la simulación de la bobina en configuración axisimétrica. **a)** El rectángulo de la bobina representa el espesor de pared del tubo donde se realiza el embobinado, el eje de simetría es la línea donde se realiza la revolución del modelo. **b)** Revolución que realiza el software para calcular el campo magnético.

4.2.3 Sistema de Estimulación Magnética

La bobina se construyó en un tubo de PVC con longitud de 250 mm y diámetro de 84 mm (**Figura 4-2a**). Estas dimensiones se escogieron basados en el espacio disponible de la incubadora y el tamaño de las cajas de cultivo a utilizar. Este tubo fue embobinado con un alambre de cobre AWG 18 con total de 450 vueltas (**Figura 4-2a**). Adicionalmente se construyó un soporte en PMMA para garantizar que las cajas de cultivo siempre estén ubicadas en el centro de la bobina (**Figura 4-2a**). En la **Tabla 4-1** se puede ver las dimensiones finales del dispositivo de estimulación magnética. Adicionalmente, para aumentar la corriente del circuito a 1 A se utilizó un transformador con entrada de 110 V AC con frecuencia de 60 Hz y salida de 6 V AC a una frecuencia de 60 Hz. El circuito utilizado para la estimulación magnética se puede ver en la **Figura 4-2b**. Finalmente en la **Figura 4-3** se puede apreciar el dispositivo y el soporte después de su fabricación los cuales fueron utilizados para la estimulación de las células.

Tabla 4-1: Características de fabricación del dispositivo de estimulación magnética.

Parámetro	Valor
Campo magnético máximo	2 mT
Corriente máxima	1 A
Longitud	250 mm
Diámetro	84 mm
Numero de vueltas	450

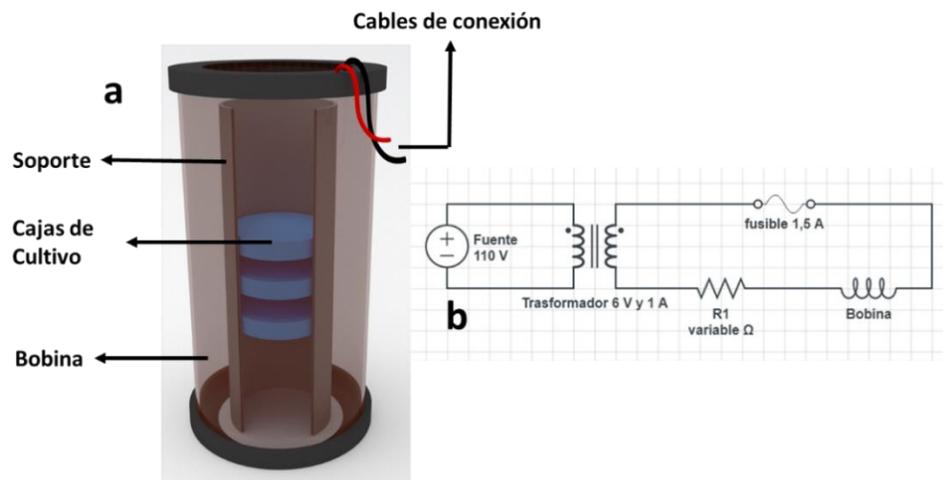


Figura 4-2: Montaje del dispositivo de estimulación **a)** Bobina construida para la estimulación magnética donde se detalla sus partes principales (bobina, cables de conexión, soporte y cajas de cultivo., **b)** circuito utilizado para la estimulación de CM.



Figura 4-3: Dispositivo utilizado para la estimulación magnética con su respectiva base la cual fue fabricada en PMMA y garantiza que las cajas de cultivo estén estimuladas con la misma magnitud de CM.

4.2.4 Medición de Campo Magnético y Temperatura

Para comprobar la magnitud del CM al interior de la bobina al variar el valor de la resistencia se realizó la medición utilizando un gaussímetro (PHYWE 13610-93). Para ello se ubicó el instrumento de medición en la mitad de la bobina y se varió el valor de la resistencia, simultáneamente se registraron los valores de corriente. Adicionalmente se realizó la medición de la temperatura del medio de cultivo al estar expuesto a la magnitud de campo más alta (2 mT) ya que existía la posibilidad de un aumento en la temperatura debido a la inducción magnética que se genera al interior de la bobina. Las mediciones se realizaron con un termómetro infrarrojo FLUKE 62 MAX. Estas mediciones se realizaron tanto al interior de la incubadora como en el exterior.

4.2.5 Aislamiento y Cultivo Celular

Cuatro ratas Wistar, neonatas de 2 – 4 días de nacidas fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. A partir de los neonatos se obtuvo la condroepífisis de húmero, fémur y escapula para la extracción celular. El sacrificio de los animales se realizó por decapitación tal como lo establece el manual del laboratorio de Biomiméticos. El uso de los animales fue aprobado por el comité de ética de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia en el Acta 06-2015.

El protocolo de aislamiento de condrocitos a utilizar se basó en el descrito por (Gál, Neâas, Adler, Teyschl, & Fabián, 2002; Olney, Wang, Sylvester, & Mougey, 2004) en el cual las porciones distales de fémur, húmero y escápula se lavaron con PBS + 2% de antibióticos (estreptomina y penicilina). Luego, el tejido fibroso y los músculos se retiraron de la epífisis y metáfisis de los huesos. Después, las epífisis fueron separadas del hueso y segmentadas en trozos de 4 mm de espesor y lavadas con PBS + 2% de antibióticos. Los fragmentos de tejido fueron sometidos a un proceso de doble digestión usando 0.25% de Tripsina/EDTA durante 1 hora a 37 °C, seguido por una digestión con colagenasa tipo I al 0.3% en HBSS durante 4 horas a 37 °C. La reacción fue inactivada con 20% de suero fetal bovino. La solución final se homogenizó por pipeteo, luego se filtró con una membrana de nylon estéril para eliminar el tejido remanente, y por último centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. Las células obtenidas fueron suspendidas en 1mL de medio de cultivo celular DMEM-F12 suplementado con 50 µg/mL de ácido ascórbico, 100 µg/mL de piruvato de sodio, 1% de estreptomina/penicilina y 1% suero fetal bovino (SFB) (medio de mantenimiento). Posteriormente se sembraron las células en cajas de cultivo celular T75; al llegar a una confluencia del 80% se tripsinizaron para su posterior congelación. Para los ensayos se utilizaron células en pase 1.

4.2.6 Aplicación de Campo Magnético

Los experimentos se llevaron a cabo en cajas de cultivo celular de 35 mm de diámetro en las cuales se sembraron 50.000 células. Por cada uno de los experimentos se cultivaron 9 cajas en total, de las cuales cada uno de los días de muestreo se tomaron 3 cajas para realizar los análisis correspondientes de viabilidad, proliferación y medición de proteínas. Al día 2, 5 y 8 de estar expuestas las células al campo magnético se realizaron los conteos y obtención de muestras respectivas. Los cultivos fueron estimulados con dos magnitudes de CM: 1 mT y 2 mT. Estas magnitudes se aplicaron a las células por periodos de 1, 3 y 5 horas cada 6 horas continuamente durante los 8 días del experimento. Para el encendido y apagado del circuito se utilizó un temporizador digital (General Electric GE 15150-15154). Los cultivos permanecieron en condiciones atmosféricas de 37 °C y 5% de CO₂ y el cambio de medio de cultivo se realizó cada dos días con medio de mantenimiento, respectivamente. El control consistió en cultivos ubicados al interior de la bobina en las mismas condiciones de cultivo anteriormente descritas, pero no fueron sometidos a ningún tipo de CM. En la **Figura 4-3** se puede observar el dispositivo con el cual se realizó la estimulación magnética y la base donde se colocaron las cajas de cultivo.

Los tiempos de estimulación se seleccionaron según la metodología usual de prescripción, en donde la dosis del tratamiento debe suministrarse en intervalos iguales a tiempos máximos determinados, por ejemplo, para este caso, se utilizó una dosis de campo magnético cada seis horas. Por otro lado, para garantizar que el tiempo de cultivo fuese el mismo para todos los esquemas de estimulación se decidió que tuviesen una duración máxima de 8 días (que significa el tiempo total de dosis). Para garantizar que todos los cultivos tengan el mismo tiempo de descanso o de estimulación entre sí, esto conllevaría a que la duración de cada cultivo fuese diferente. Debido a lo anterior, el costo económico y el tiempo que conllevaría sería elevado para esta primera etapa de estimulación con CM a condrocitos. Finalmente, al realizar los análisis estadísticos se tendría una complejidad debido a la cantidad de variables independientes que se manejarían tales como el tiempo de estimulación, tiempo de descanso y duración del cultivo.

4.2.7 Determinación de Viabilidad y Proliferación Celular

La proliferación celular se analizó a los días 2, 5 y 8 de cultivo. Las células fueron tripsinizadas y posteriormente se realizó el conteo con un hemocitómetro para determinar la viabilidad y muerte celular mediante una tinción con azul tripán. En las células viables el azul tripán no consigue cruzar la membrana celular mientras que en células muertas el azul de tripán penetra la membrana celular tiñéndolas de azul y haciéndolas visibles bajo un microscopio óptico. La densidad celular final es la cantidad de células por área de superficie. Este método de cuantificación celular fue utilizado ya que no es costoso, reacciona rápidamente y se puede realizar el conteo con un microscopio óptico (Mcmahon & Rohr, 2014; Piccinini, Tesei, Arienti, & Bevilacqua, 2017).

4.2.8 Cuantificación de Glicosaminoglicanos (GAGs)

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 utilizando 1-9-dimetilmetileno (DMB) 31 μM en buffer formato 55 mmol/l que se llevó a pH de 8,0, mediante adición de TrisBase 2 M. Las muestras fueron tomadas en los días 2, 5 y 8 de cultivo y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su preservación y posterior análisis. Las mediciones se realizaron con 50 μl del medio y 275 μl de DMB y al transcurrir un minuto de realizar esta reacción las muestras se analizaron 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 condroitina sulfato 0 a 35 µg/ml frente a blanco de reactivo (J. J. Vaca-González et al., 2016).

4.2.9 Análisis Estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado biológico. El crecimiento de población celular y la síntesis de GAGs se analizaron a través de un ANOVA. El modelo basa su análisis en evaluar la significancia individual de los datos. La prueba estadística para realizar comparación pareada utilizada fue test Tukey. Las diferencias significativas fueron consideradas significantes con un $p < 0.05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Dispositivo de Estimulación Magnética

4.3.1.1 Generación y Distribución del Campo

En el proceso del diseño del dispositivo se realizó el cálculo del número de vueltas requeridas para generar un campo de 2 mT haciendo uso de la ecuación (4.1), obteniendo como resultado 400 vueltas. Para comprobar este resultado se realizó la simulación por elementos finitos con los parámetros anteriormente calculados, sin embargo, el campo resultante en la simulación fue menor al esperado. Mediante un proceso iterativo se llegó al valor esperado. En la **Figura 4-4b** se puede observar que con 450 vueltas y una corriente de 1 A se tiene un valor de CM de 2 mT, además, se evidenció que magnitud del campo es constante en toda la longitud de la bobina.

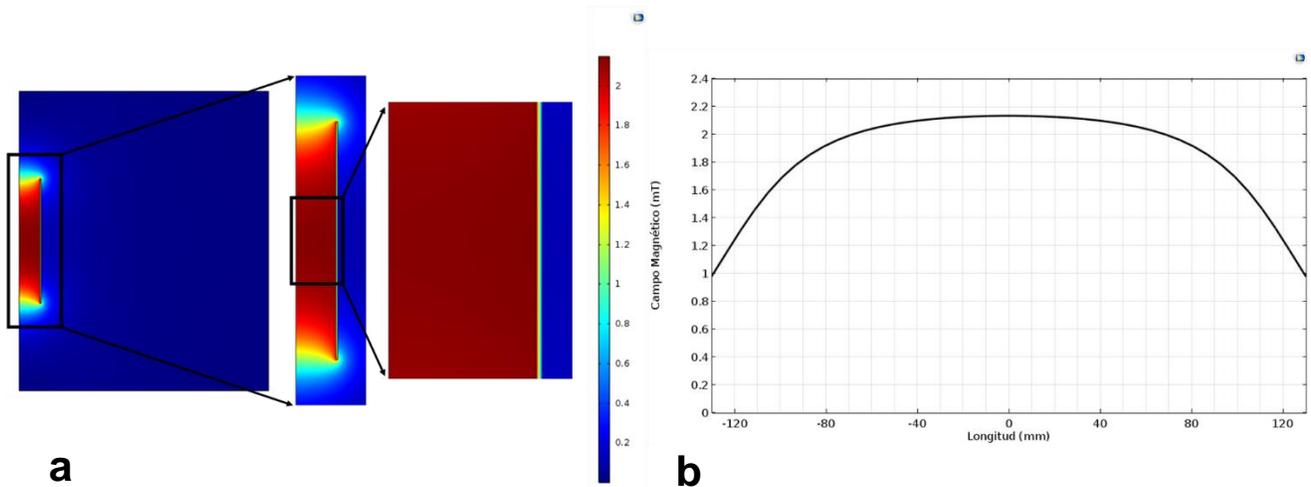


Figura 4-4: Modelo computacional de la bobina **a)** verificación de la magnitud de CM necesaria para la estimulación de los condrocitos **b)** gráfica correspondiente donde se evidencia la magnitud del CM al interior de la bobina.

4.3.1.2 Medición de Campo Magnético y Temperatura

Una vez construido el dispositivo, se comprobó experimentalmente el campo realizando mediciones para garantizar que el CM al interior de la bobina es constante. En la **Figura 4-5a** se muestra que existe una dependencia lineal entre la corriente y la magnitud del CM. También se evidencia una relación inversa entre la corriente y la resistencia que se le debe aplicar al circuito. Se encontró que se debe aplicar una resistencia de $0,7 \Omega$ para que al interior de la bobina se produjera un CM de 1 mT (**Figura 4-5a**).

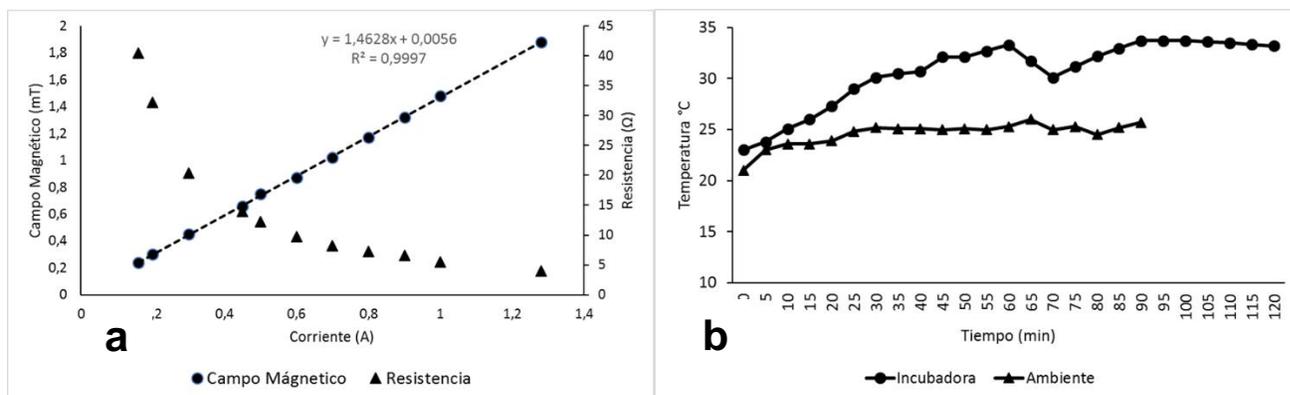


Figura 4-5: Gráficas donde se realiza la medición del a) Aumento de la temperatura al medio de cultivo dentro y fuera de la incubadora. b) CM al interior de la bobina y su relación con la resistencia aplicada.

La segunda prueba que se realizó consistió en comprobar que al estimular las células con la magnitud de campo más alta (2 mT) no se aumentara la temperatura por encima de 37 °C, ya que al interior de la bobina se genera un fenómeno denominado inducción electromagnética. Como se observa en la **Figura 4-5b** se realizó una medición a temperatura ambiente con un valor inicial de 21 °C el cual fue aumentando hasta tener un valor máximo de 26 °C al transcurrir 90 minutos. Así mismo se realizó el registro de la temperatura al estar al interior de la incubadora siendo estimulado con 2 mT. Como se observa en la **Figura 4-5b** el valor inicial fue de 23 °C hasta llegar a un valor máximo de 34 °C.

4.3.2 Proliferación Celular

En la **Figura 4-6a** se puede evidenciar un efecto negativo en la estimulación con 1 mT, ya que la proliferación celular no supera en ningún momento al cultivo de control. Por ejemplo, existe una diferencia en el conteo de 46% en el octavo día de estimulación comparando el control con el esquema de 5 horas. Según nuestras condiciones y resultados el campo de 1 mT disminuye la proliferación celular. Sin embargo, la estimulación con magnitud de 2 mT (**Figura 4-6b**) promueve la proliferación celular con el esquema de estimulación de 3 horas; ya que existe un aumento del 29% en comparación con el control para el octavo día de cultivo. Del mismo modo para el día 5 tanto el tiempo de 3 y 5 horas superan al control por 20% y 15% respectivamente, aunque no es una diferencia significativa se evidencia

una tendencia al aumento de la proliferación. Por el contrario, para el esquema de estimulación de una hora se evidencia que el campo inhibe la proliferación durante los 8 días del cultivo.

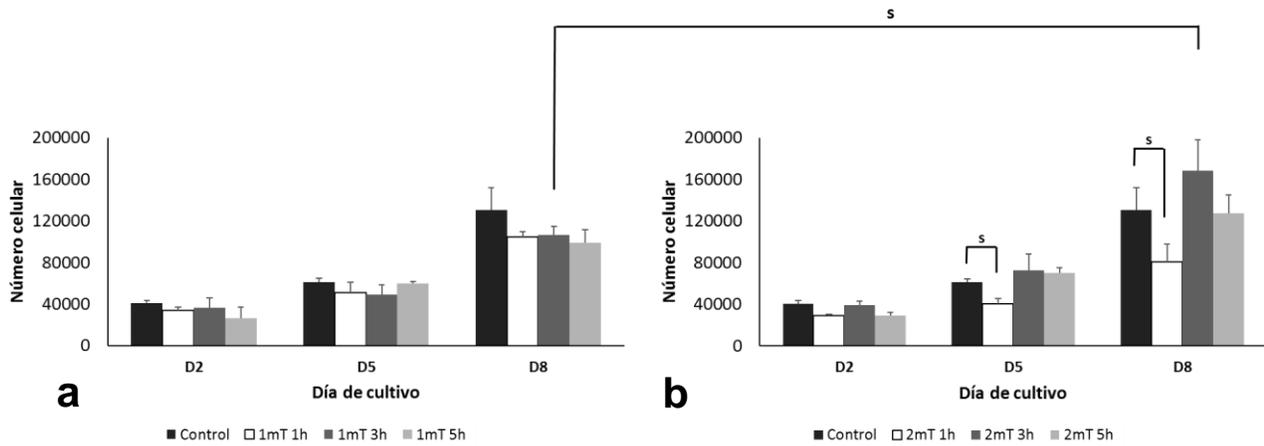


Figura 4-6: Conteos de proliferación celular con magnitud de CM de **a)** 1 mT **b)** 2 mT. Se realizó una comparación con el cultivo de control en cada uno de los días de conteo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el esquema de 2 mT y 1 hora con respecto al control y los demás esquemas de estimulación en los días 5 y 8 ($p < 0,05$), también hay diferencia significativa entre el esquema de 2 mT y 3 horas con respecto a los tres esquemas de estimulación con CM de 1 mT ($p < 0,05$). Los marcados con "s" (significativo).

Según el registro fotográfico realizado que se puede observar en la **Figura 4-7** no se evidenció ningún cambio morfológico en las células en comparación al cultivo de control, así como tampoco en la distribución de las células en la caja de cultivo. También se evidencia en la **Figura 4-7** que a medida que avanza el cultivo hay un aumento en la densidad celular tal como lo demuestran los conteos de la **Figura 4-6**. Por otro lado, aunque en los conteos celulares no se evidenció la muerte celular en este registro fotográfico se observaron algunas células muertas (puntos blancos) tanto en los cultivos con estimulación magnética como en el cultivo de control. El motivo por el cual no se observaron estas células a la hora de realizar los conteos con azul tripán se debe a que en el momento de retirar el medio todas las células muertas eran descartadas.

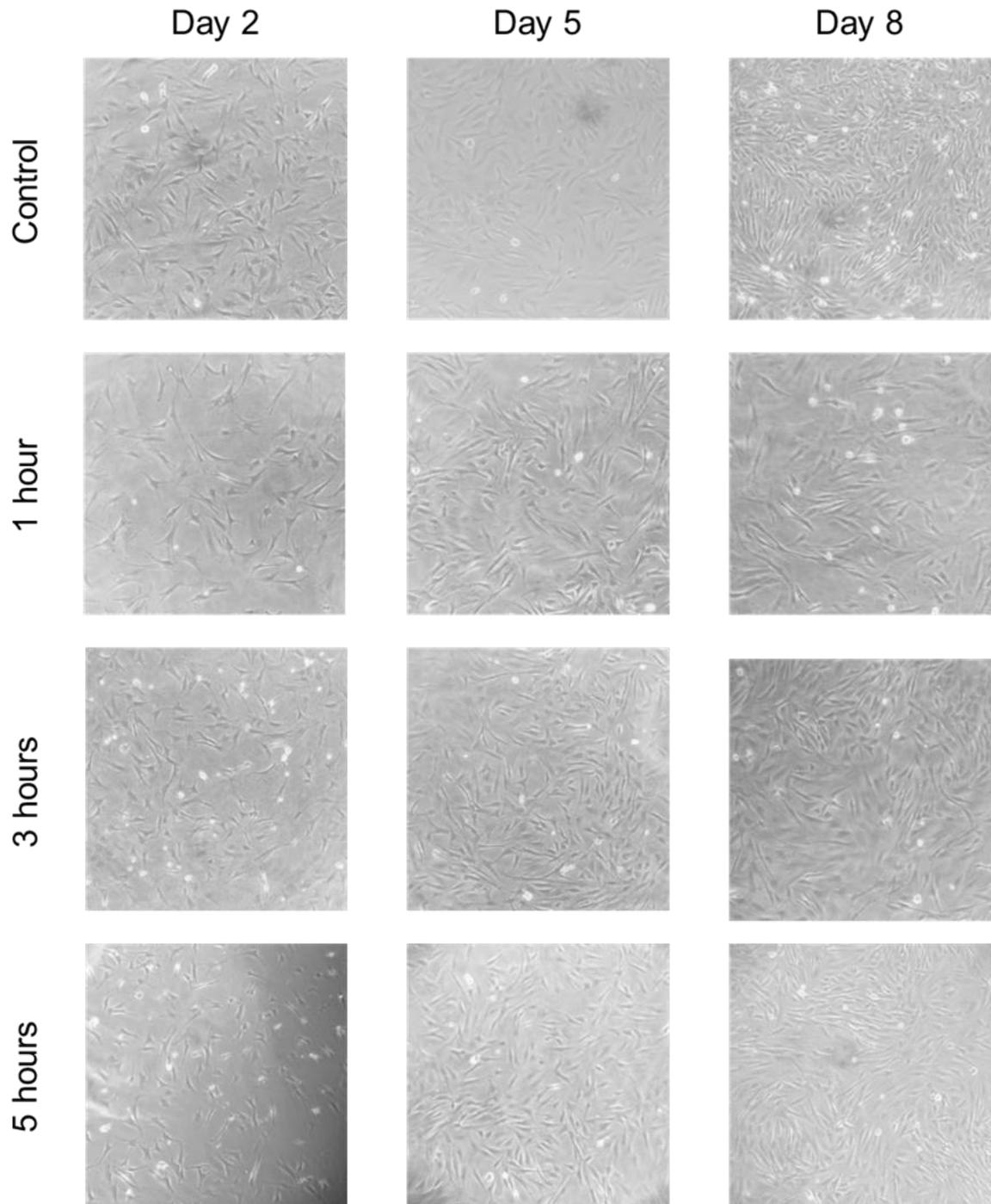


Figura 4-7: Registro fotográfico de la estimulación de 2 mT con los tres tiempos de estimulación y su respectiva comparación con el cultivo de control para la verificación si existe algún cambio de morfología debido al CM. Las fotos fueron tomadas con un objetivo de 10x de magnificación.

4.3.3 Cuantificación de GAG's

En cuanto a la producción de GAGs, con el esquema de 1 mT existe un aumento del 37% en la síntesis de estos al segundo día de cultivo con una estimulación de 5 horas (**Figura 4-8a**). Así mismo, al quinto día de estimulación con el mismo se obtuvo un incremento del 53% en comparación con el cultivo de control. Sin embargo, al día 8 el aumento es de 9%. En cuanto al esquema de 1 mT y 3 horas la síntesis de GAGs siempre es mayor en el cultivo estimulado a comparación del control. Por otro lado, se observó que la producción de GAGs con el campo de 2 mT aplicados durante 1 y 5 horas se mantiene constante durante los 8 días de cultivo al **Figura 4-8b**. Adicionalmente, en el octavo día de estimulación con el esquema de 5 horas existe un aumento del 65% en la síntesis de GAGs por célula en comparación con el cultivo de control. El esquema de estimulación de 3 horas con un CM de 2 mT tiene un efecto negativo sobre la producción de estos carbohidratos siendo este el que tiene mejores resultados de proliferación celular. La síntesis de GAGs en el cultivo de control siempre es menor que los cultivos estimulados magnéticamente, a excepción del esquema de 2 mT y 3 horas en el cual se puede observar que hay una disminución progresiva de los GAGs durante todo el cultivo. Con lo anterior se puede concluir que el CM promueve la síntesis de GAGs sin importar la magnitud de éste, aunque en el esquema de 1 mT no existan diferencias significativas.

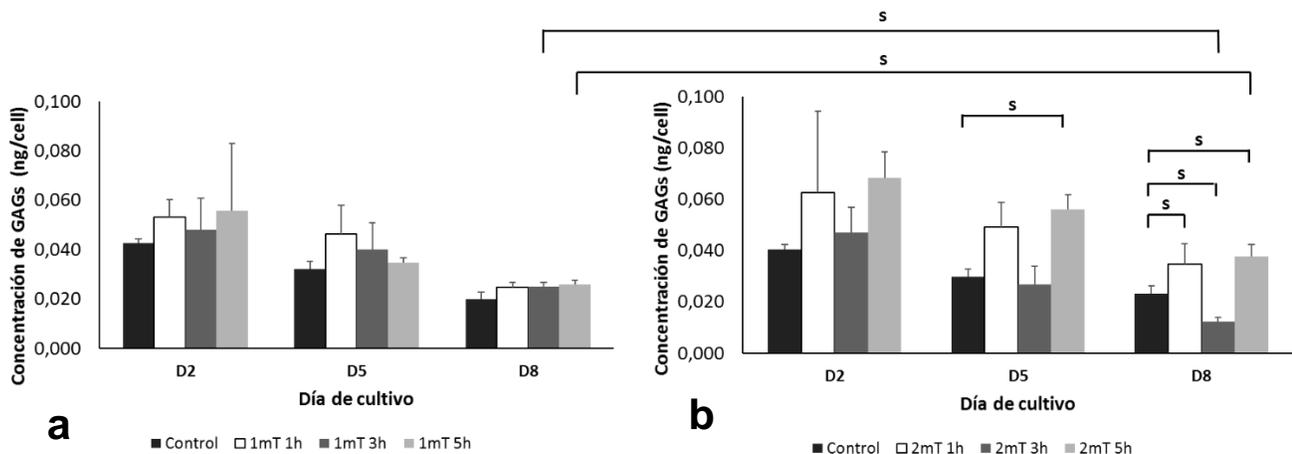


Figura 4-8: Concentración de GAGs sintetizada por célula con una magnitud de CM de **a)** 1 mT **b)** 2 mT. Se realizó una comparación con el cultivo de control en tres días de conteo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres esquemas de estimulación y el control ($p < 0,05$), los marcados con "s" (significativo).

4.4 Discusión

El objetivo de esta investigación fue demostrar que al estimular a condrocitos cultivados en monocapa con dos magnitudes de CM se promueve la proliferación celular y la síntesis de GAGs teniendo tres tiempos de estimulación diferentes. Los resultados mostraron que los diferentes CM aplicados con diferentes tiempos de estimulación pueden aumentar o inhibir la población celular o estimular la síntesis de GAGs. Si se desea un aumento en la proliferación celular se debería implementar el esquema de 2 mT y 3 horas. Pero, si se desea incrementar la síntesis de GAGs se debería estimular las células con un CM de 2 mT y 5 horas. Basados en estos resultados se puede decir que podría ser implementado como una técnica de expansión celular en métodos terapéuticos como los es la implantación celular autóloga.

Los dispositivos de estimulación magnética que se han utilizado en investigaciones anteriores están basados en el principio de las bobinas de Helmholtz. En estos estudios se han reportan las magnitudes del CM generados por este tipo de bobinas, pero no se documenta el volumen al interior de las bobinas donde este valor es válido (Monica De Mattei et al., 2003, 2004; Luo et al., 2012; Pezzetti et al., 1999; Sadoghi et al., 2013; Vanessa et al., 2007). Para poder tener una estimulación homogénea en toda la superficie del cultivo con este tipo de bobinas sus dimensiones deben ser muy grandes, tanto que no es posible usarlas al interior de una incubadora, además del elevado costo de fabricación que esto conlleva. Sin embargo, (Yan, Dong, Zhang, & Qi, 2010) fabricó una bobina similar a la realizada en esta investigación con una longitud de 40 cm y diámetro de 21 cm, capaz de generar un campo homogéneo al interior de la bobina de 20 mT. Este valor de campo se debe a sus 880 vueltas y las dimensiones de la bobina las cuales son mayores en comparación con las de esta investigación (250 mm de largo, 84 mm de diámetro y 450 vueltas). En las mediciones de temperatura realizadas fuera de la incubadora hubo un incremento de 5°C posiblemente debido al CM. No obstante, cuando las mediciones se realizaron al interior de la incubadora la temperatura más alta que se registro fue de 34°C, este incremento de temperatura de 11°C es causado por la temperatura interna de la incubadora (37°C) y no debido al CM. Basados en lo anterior se comprobó que el CM no genera un aumento en la temperatura del medio de cultivo celular.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que al estimular las células con 1 mT no hay un efecto significativo en la proliferación celular; sin embargo

algunos trabajos han demostrado que con CM entre 0,1 mT y 1 mT aumentan la proliferación celular (Fioravanti et al., 2002; Liu, 1996; Sakai et al., 1991). Esta discrepancia podría ser causada por los tiempos de estimulación que cada uno de los autores utiliza o la duración del cultivo. En cuanto a la estimulación de CM de 2 mT nuestros resultados demuestran que el tiempo de estimulación de 1 hora no estimula la proliferación celular. Sin embargo, con el esquema de 3 horas se evidenció un aumento significativo en la proliferación en comparación con el cultivo de control. Este hallazgo concuerda con los resultados reportados por M. De Mattei et al. quienes realizaron una estimulación continua con un CM de 2.3 mT y encontraron un aumento en la proliferación de condrocitos (M De Mattei et al., 2001; Monica De Mattei et al., 2004).

En cuanto a la síntesis de matriz extracelular, se logró evidenciar un aumento de GAGs con los tres tiempos de estimulación y CM de 1 mT, en el quinto día fue donde se obtuvo mejores resultados en la síntesis de GAGs. Como lo demuestra (Monica De Mattei et al., 2004) quien realizó una estimulación con CM de 1,5 mT a condrocitos generando un aumento del 20% en la síntesis de proteoglicanos, y llega a la conclusión que los CM actúan como un factor de estimulador de la síntesis de los componentes esenciales de la matriz extracelular del cartílago, así como también lo demuestra (Sakai et al., 1991). Aunque los tiempos de estimulación y la duración de los cultivos en cada una de las investigaciones nombradas anteriormente no son comparables entre sí, y tampoco con esta investigación se puede evidenciar que independientemente de los parámetros de CM o tiempo utilizados se logra un aumento en la síntesis de proteínas propias del cartílago.

Del mismo modo, se evidenció que la síntesis de GAGs se mantiene estable con el CM de 2 mT aplicados durante 1 y 5 horas. Estos resultados indican que la exposición de condrocitos a un CM de alta intensidad y por tiempos prolongados favorece la síntesis de GAGs. Se han reportado resultados similares por otros autores (Monica De Mattei et al., 2003; Schmidt-Rohlung et al., 2008; Vanessa et al., 2007). Sin embargo, (Sadoghi et al., 2013) no obtuvo cambios en la síntesis de GAGs en condrocitos humanos al ser estimulados con un CM de 1,6 mT durante 4 días por 4 horas diarias. Esto puede deberse a que el tiempo de estimulación o la duración del cultivo son muy cortos, ya que como lo evidencia (Stolfa et al., 2007) el aumento de la actividad metabólica celular ocurre después de 72 horas de la aplicación del CM. Como se mencionó anteriormente la estimulación de condrocitos en monocapa con un CM de 2 mT puede ser utilizado como un complemento en métodos terapéuticos como por ejemplo la implantación autóloga de condrocitos. Según

lo anterior dependiendo de las necesidades hay que seleccionar el mejor esquema de estimulación.

En la **Figura 4-7** se puede observar que durante los 8 días de cultivo de cada uno de los esquemas de estimulación no se evidencia ningún cambio morfológico en las células que nos pueda indicar algún efecto adverso debido a la magnitud del CM. Esto quiere decir que el CM no tendría un efecto negativo en las células que lleven a cambios morfológicos o fenotípicos de tipo neoplásico que puedan ser perjudiciales para la salud. Sin embargo, las células empiezan con una forma estrellada, y a medida que transcurre el cultivo van tomando una forma elongada. Este cambio de forma según (Goldring, 2010) se debe a una pérdida en el fenotipo ya que la célula deja de sintetizar colágeno tipo II y agregan y comienza a sintetizar colágeno tipo I y III. Además (Honegger, 1999) menciona que en estos cultivos las células están adheridas a una superficie artificial lo que limita la interacción directa entre células. Sin embargo, (Jahns et al., 2007) aplicando un CM de 1,7 mT y 3,1 mT concluye que el campo indujo un cambio morfológico en los condrocitos ya que su forma cambio de estrellado a esférico retraídos, además el área de contacto superficial se redujo en un 30%, lo cual promovería la migración celular, y evitaría que las células se diferencien.

Según los resultados comentados anteriormente es evidente que el CM genera un estímulo en las células generando aumentos en el metabolismo celular como también su proliferación. Esto nos lleva a pensar que los CM pueden llegar a ser estímulos biofísicos que se implementen en la regeneración del cartílago articular sin la necesidad de realizar intervenciones quirúrgicas.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Este trabajo muestra un enfoque computacional como herramienta para comprender el mecanismo por el cual los campos eléctricos y magnéticos impactan los canales de señalización causando el aumento en el metabolismo de la célula. Los resultados obtenidos sugieren diferentes efectos del CM y CE. Estos resultados evidencian que los modelos computacionales son una herramienta útil en la que podemos evidenciar efectos a escalas micrométricas que pueden complementarse y compararse con datos experimentales. Esto permite la posibilidad de reducir esas brechas de conocimiento y dar luces para el desarrollo de futuros estudios experimentales. Nuestros resultados muestran que, aunque el uso de dispositivos de estimulación magnética y eléctrica son métodos terapéuticos que promueven la actividad celular en términos de proliferación y síntesis de proteínas, aún es necesario comprender mejor los mecanismos que explican estos efectos. Las ventajas de implementar modelos computacionales son la capacidad de simular diferentes campos variando las frecuencias y brindando la posibilidad de reducir los estudios *in vitro*. Pero también es necesario validar modelos computacionales con estudios experimentales.

Teniendo en cuenta los resultados de las simulaciones computacionales del efecto de los estímulos biofísicos sobre la membrana celular, se procedió a realizar el diseño y construcción de un dispositivo el cual garantiza un CM homogéneo en su interior. Debido a lo anterior, se demostró que existe un aumento en la proliferación cuando se estimulan condrocitos con un CM de 2 mT durante 3 horas cada 6 horas por 8 días. Mientras que la síntesis de GAGs aumenta cuando se estimula con un CM de 2 mT durante 5 horas cada 6 horas por 8 días. Este último esquema de estimulación tiene una proliferación celular muy similar a la del cultivo de control. Nuestros hallazgos sugieren que, dependiendo de

los resultados deseados, es posible elegir el esquema de estimulación que mejor se adapte a las necesidades.

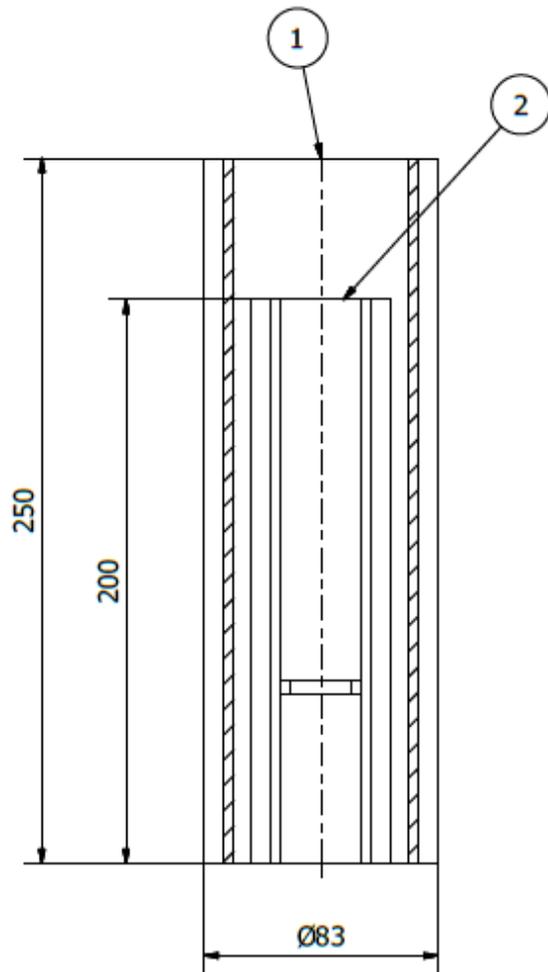
En conclusión, en esta tesis se pudo evidenciar el aporte que pueden llegar a ser las simulaciones computacionales para mejorar o dar una explicación más clara de los fenómenos que suceden a escalas micrométricas. También es evidente que la estimulación a condrocitos cultivados en monocapa con un CM estimula la proliferación y el metabolismo celular. Basados en los resultados obtenidos la estimulación magnética puede llegar a ser un método terapéutico no invasivo que se implemente en la regeneración de cartílago articular, o en métodos *in vitro* como la implantación celular autóloga. Este trabajo presenta una primera aproximación del potencial uso que se le puede dar a los campos magnéticos para la regeneración de cartílago articular.

5.2 Recomendaciones

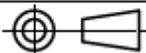
Durante la realización de esta investigación se realizó el modelo de una célula que está siendo estimulada por un CE o CM lo cual si es comparado con un cultivo en monocapa no se acerca del todo a la realidad. Debido a lo anterior se plantea que para estudios futuros deben dirigirse a la realización de una simulación en tres dimensiones con varias células cercanas entre sí en donde se pueda analizar si existe algún cambio o interacción de las células al estar expuestas a un CE o CM. También se plantea la posibilidad de encontrar experimentalmente propiedades magnéticas como la permeabilidad relativa propias de la membrana celular y del citoplasma con el fin de intentar dar una explicación más precisa al efecto que causa un CM sobre estos.

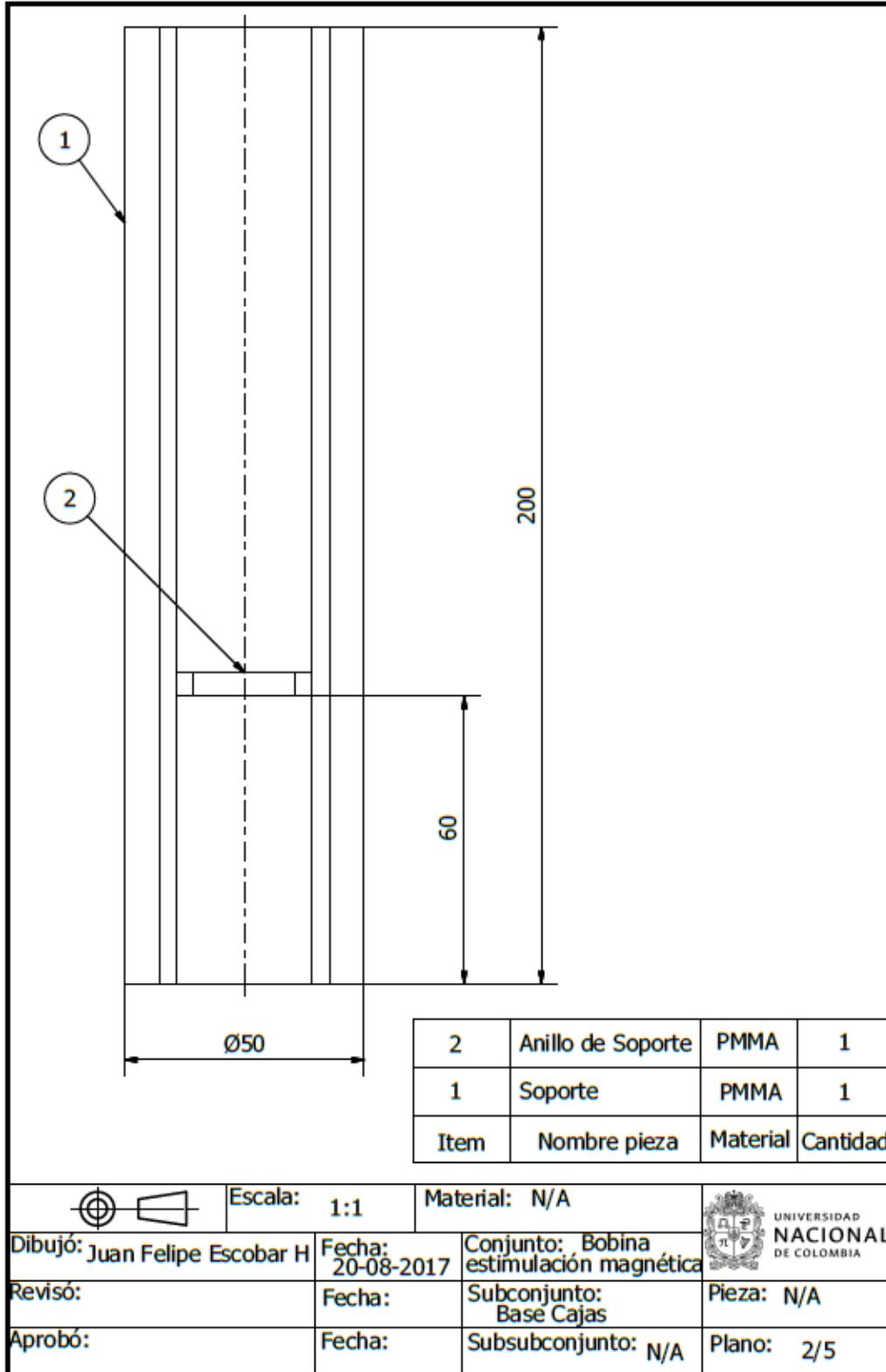
Basados en las desventajas que presentan los cultivos en monocapa se recomienda que para futuras investigaciones se podría evaluar el efecto del CM directamente en el cartílago articular o en constructos en 3 dimensiones, donde las células estarán en condiciones similares a las reales. También sería interesante cuantificar de manera más detallada la síntesis de moléculas propias del cartílago articular como por ejemplo el colágeno tipo II y agregan, ya que son las proteínas más importantes y con ello complementar lo realizado en este estudio.

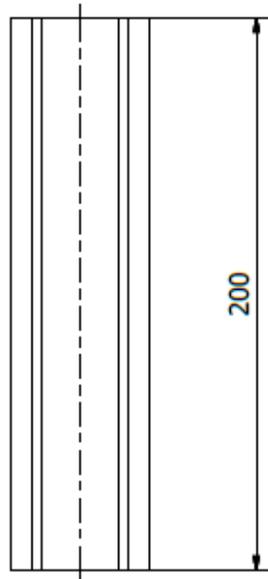
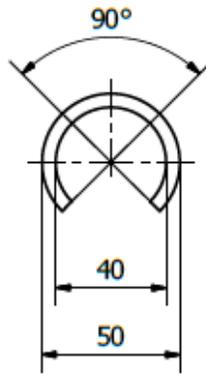
A. Anexo: Planos de fabricación del dispositivo de estimulación y soporte.

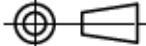


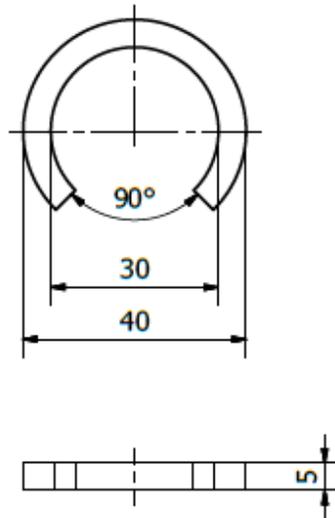
2	Base Cajas	N/A	1
1	Bobina	PVC	1
Item	Nombre pieza	Material	Cantidad

	Escala: 1:2	Material: N/A	 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Dibujó: Juan Felipe Escobar H	Fecha: 20-08-2017	Conjunto: Bobina estimulación magnética	
Revisó:	Fecha:	Subconjunto: N/A	Pieza: N/A
Aprobó:	Fecha:	Subsubconjunto: N/A	Plano: 1/5

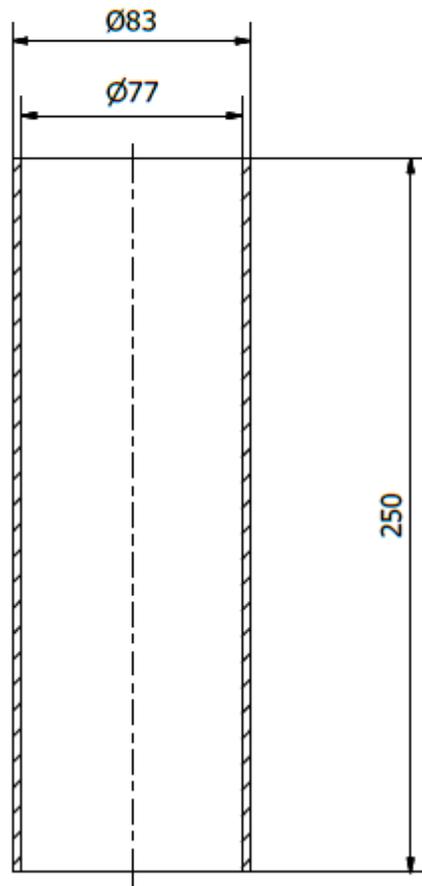




		Escala: 1:2	Material: PMMA	 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Dibujó: Juan Felipe Escobar H	Fecha: 20-08-2017	Conjunto: Bobina estimulación magnética		
Revisó:	Fecha:	Subconjunto: Base Cajas	Pieza: Soporte	
Aprobó:	Fecha:	Subsubconjunto: N/A	Plano: 3/5	



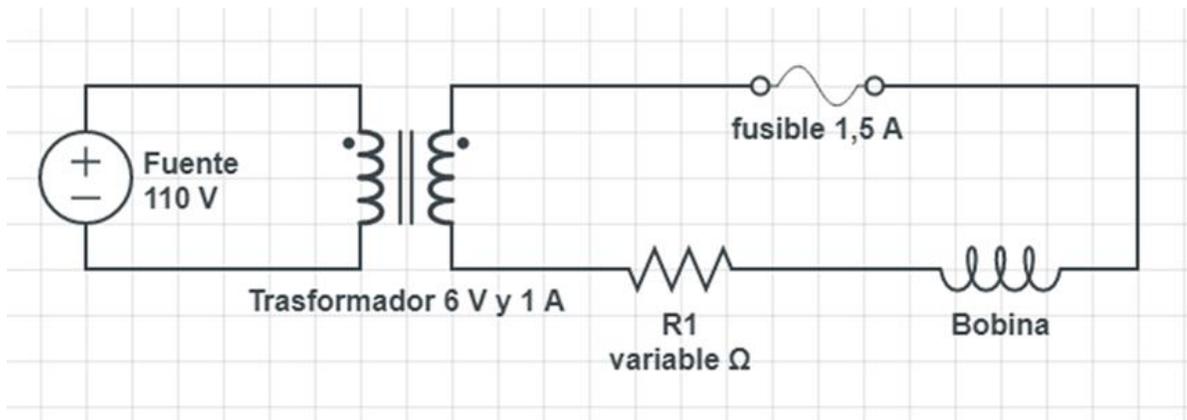
	Escala: 1:1	Material: PMMA	
Dibujó: Juan Felipe Escobar H	Fecha: 20-08-2017	Conjunto: Bobina estimulación magnética	
Revisó:	Fecha:	Subconjunto: Base Cajas	Pieza: Anillo de Soporte
Aprobó:	Fecha:	Subsubconjunto: N/A	Plano: 4/5



	Escala: 1:2	Material: PVC	
Dibujó: Juan Felipe Escobar H	Fecha: 20-08-2017	Conjunto: Bobina estimulación magnética	
Revisó:	Fecha:	Subconjunto: N/A	
Aprobó:	Fecha:	Subsubconjunto: N/A	Plano: 5/5

B. Anexo: Circuito eléctrico del sistema de estimulación

Circuito eléctrico utilizado en la estimulación magnética.



C. Anexo: Análisis estadístico de la proliferación celular

Se presentan los datos estadísticos de los días 5 y 8 de conteo celular en los cuales se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Convenciones

1: CM de 1 mT con 1 hora de estimulación

2: CM de 1 mT con 3 hora de estimulación

3: CM de 1 mT con 5 hora de estimulación

4: CM de 2 mT con 1 hora de estimulación

5: CM de 2 mT con 3 hora de estimulación

6: CM de 2 mT con 5 hora de estimulación

7: Control

Día 5

Los datos se les realizó una transformación aplicándoles \log_{10}

Test de Normalidad

	Tratamiento	Shapiro-Wilk
		Significancia
Células_log	1	0,381
	2	0,95
	3	0,986
	4	0,062
	5	0,484
	6	0,362
	7	0,287

Test de homogeneidad de varianzas

	Estadística de Levene	Significancia
Células_log	2,247	0,099

ANOVA

		Suma de cuadrados	df	Mean Square	F	Sig.
Células_log	Entre grupos	0,15	6	0,025	6,54	0,002
	Dentro de los grupos	0,054	14	0,004		
	Total	0,204	20			

A continuación, se presenta el test de Tukey donde se realiza las comparaciones entre grupos para encontrar cuales fueron las diferencias estadísticamente significativas.

Test de Tukey

		Tratamiento	significancia
Células	2	1	1,000
		3	,523
		4	,730
		5	,049
		6	,072
		7	,449
	4	1	,550
		2	,730
		3	,051
		5	,003
		6	,005
		7	,040
	7	1	,627
		2	,449
		3	1,000
		4	,040
		5	,787
		6	,884

Día 8

A los datos no fue necesario aplicarles ninguna transformación.

Test de normalidad

	Tratamiento	Shapiro-Wilk
		Significancia
Células	1	0,059
	2	0,497
	3	0,421
	4	0,626
	5	0,292
	6	0,888
	7	0,388

Test de homogeneidad de varianzas

	Estadística de Levene	Significancia
Células	2,29	0,095

ANOVA

		Suma de Cuadrados	Mean Square	F	Significancia
Células	Entre grupos	1,44E+10	2,40E+09	7,842	0,001
	Dentro de los grupos	4,29E+09	3,07E+08		
	Total	1,87E+10			

A continuación, se presenta el test de Tukey donde se realiza las comparaciones entre grupos para encontrar cuales fueron las diferencias estadísticamente significativas.

Test de Tukey

		Tratamiento	Significancia
Células	2	1	1,000
		3	,998
		4	,558
		5	,010
		6	,758
		7	,639
	4	1	,628
		2	,558
		3	,844
		5	,000
		6	,063
		7	,043
	7	1	,568
		2	,639
		3	,352
		4	,043
		5	,191
		6	1,000

D. Anexo: análisis estadístico de la síntesis de GAGs

Se presentan los datos estadísticos de los días 5 y 8 de cuantificación de GAGs en los cuales se encontraron diferencias estadísticamente significativas

Convenciones

- 1: CM de 1 mT con 1 hora de estimulación
- 2: CM de 1 mT con 3 hora de estimulación
- 3: CM de 1 mT con 5 hora de estimulación
- 4: CM de 2 mT con 1 hora de estimulación
- 5: CM de 2 mT con 3 hora de estimulación
- 6: CM de 2 mT con 5 hora de estimulación
- 7: Control

Día 5

Los datos se les realizó una transformación aplicándoles \log_{10}

Test de Normalidad

	Tratamiento	Shapiro-Wilk
		Significancia
GAGs_log	1	0,635
	2	0,07
	3	0,486
	4	0,084
	5	0,562
	6	0,941
	7	0,272

Test de homogeneidad de varianzas

	Estadística de Levene	Significancia
GAGs_log	2,244	0,1

ANOVA

		Suma de cuadrados	df	Mean Square	F	Sig.
GAGs_log	Entre grupos	0,256	6	0,043	5,159	0,005
	Dentro de los grupos	0,116	14	0,008		
	Total	0,371	20			

A continuación, se presenta el test de Tukey donde se realiza las comparaciones entre grupos para encontrar cuales fueron las diferencias estadísticamente significativas.

Test de Tukey

		Tratamiento	significancia
GAGs	6	1	,876
		2	,426
		3	,146
		4	,976
		5	,007
		7	,029
	7	1	,230
		2	,647
		3	,961
		4	,126
		5	,986
		6	,029

Día 8

A los datos no fue necesario aplicarles ninguna transformación.

Test de normalidad

	Tratamiento	Shapiro-Wilk
		Significancia
GAGs	1	0,241
	2	1
	3	0,463
	4	0,637
	5	0,069
	6	0,463
	7	0,637

Test de homogeneidad de varianzas

	Estadística de Levene	Significancia
GAGs	2,553	0,07

ANOVA

		Suma de cuadrados	Mean Square	F	Significancia
GAGs	Entre grupos	0,001	0	14,347	0
	Dentro de los grupos	0	0		
	Total	0,001			

A continuación, se presenta el test de Tukey donde se realiza las comparaciones entre grupos para encontrar cuales fueron las diferencias estadísticamente significativas.

		Test de Tukey	
		Tratamiento	Significancia
GAGs	2	1	1,000
		3	1,000
		4	,082
		5	,014
		6	,014
		7	,998
	3	1	1,000
		2	1,000
		4	,119
		5	,009
		6	,021
		7	,986
	7	1	,999
		2	,998
		3	,986
		4	,032
		5	,036
		6	,005

Bibliografía

- Balint, R., Cassidy, N. J., & Cartmell, S. H. (2013). Electrical Stimulation: A Novel Tool for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(1), 48–57.
<https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0183>
- Ballock, R. T., & Keefe, R. J. O. (2003). Physiology and Pathophysiology of the Growth Plate. *Wiley InterScience (Www.Interscience.Wiley.Com)*, 143(Part C), 123–143.
<https://doi.org/10.1002/bdrc.10014>
- Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*, 87(1), 77–95.
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldn025>
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and P. W. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (Fourth Edi).
- Buckwalter, J. A., & Mankin, H. J. (1997). Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY*, 15, 600–611.
- Caraglia, M., Marra, M., Mancinelli, F., D'Ambrosio, G., Massa, R., Giordano, A., ... Bismuto, E. (2005). Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 204(2), 539–548.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20327>
- Chao, E., & Inoue, N. (2003). Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *European Cells and Materials*, 6(1979), 72–85.
<https://doi.org/10.22203/eCM.v006a07>
- Coburn, J. M., Gibson, M., Monagle, S., Patterson, Z., & Elisseeff, J. H. (2012). Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10012–10017.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1121605109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1121605109>

- Cohen, D., & Givler, E. (1972). Magnetomyography : magnetic fields around the human body produced by skeletal muscles. *Applied Physics Letters*, 114, 34–37.
<https://doi.org/10.1063/1.1654294>
- Colombiana de Salud, S. (2014). *GUIA DE ATENCION MANEJO DE OSTEOARTROSIS*.
- De Mattei, M, Caruso, A., Pezzetti, F., Pellati, A., Stabellini, G., Sollazzo, V., & Traina, G. C. (2001). Effects of pulsed electromagnetic fields on human articular chondrocyte proliferation. *Connective Tissue Research*, 42(4), 269–279.
<https://doi.org/10.3109/03008200109016841>
- De Mattei, Monica, Pasello, M., Pellati, A., Stabellini, G., Massari, L., Gemmati, D., & Caruso, A. (2003). Effects of electromagnetic fields on proteoglycan metabolism of bovine articular cartilage explants. *Connective Tissue Research*, 44(3–4), 154–159.
<https://doi.org/10.1080/03008200390208546>
- De Mattei, Monica, Pellati, A., Pasello, M., Ongaro, A., Setti, S., Massari, L., ... Caruso, A. (2004). Effects of physical stimulation with electromagnetic field and insulin growth factor-I treatment on proteoglycan synthesis of bovine articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(10), 793–800.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.06.012>
- Démarteau, O., Wendt, D., Braccini, A., Jakob, M., Schäfer, D., Heberer, M., & Martin, I. (2003). Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(2), 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.099>
- Erggelet, C., & Mandelbaum, B. R. (2008). *Principles of Cartilage Repair*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-7985-1593-2>
- Erickson, G. R., Rice, H. E., Awad, H., Guilak, F., Erickson, G. R., Guilak, F., ... Guilak, F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(2), 763–769.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6270>
- Fanelli, C., Coppola, S., Barone, R., Colussi, C., Gualandi, G., Volpe, P., & Ghibelli, L. (1999). Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(1), 95–102.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.13.1.95>
- Fear, E. C., Member, S., & Stuchly, M. A. (1998). Modeling Assemblies of Biological Cells Exposed to Electric Fields. *TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*,

- 45(10), 1259–1271. <https://doi.org/10.1109/10.720204>
- Fini, M., Giavaresi, G., Carpi, A., Nicolini, A., Setti, S., & Giardino, R. (2005). Effects of pulsed electromagnetic fields on articular hyaline cartilage: Review of experimental and clinical studies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59(7), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.02.002>
- Fioravanti, A., Nerucci, F., Collodel, G., Markoll, R., & Marcolongo, R. (2002). Biochemical and morphological study of human articular chondrocytes cultivated in the presence of pulsed signal therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61, 1032–1033. <https://doi.org/10.1136/ard.61.11.1031>
- Foster, K. R. (2000). Thermal and Nonthermal Mechanisms of Interaction of Radio-Frequency Energy with Biological Systems. *TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*, 28(1), 15–23. <https://doi.org/10.1109/27.842819>
- Gál, P., Neâas, A., Adler, J., Teyschl, O., & Fabián, P. (2002). Transplantation of the Autogenous Chondrocyte Graft to Physeal Defects : an Experimental Study in Pigs Growth plate fractures in children , in particular those ones of types III to V according to the classification by Salter – Harris (1963), belong to i. *Journal of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno*, 71, 327–332. <https://doi.org/10.2754/avb200271030327>
- Gentili, C., & Cancedda, R. (2009). Cartilage and Bone Extracellular Matrix. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 1334–1348. <https://doi.org/10.2174/138161209787846739>
- Goldring, M. B. (2010). *Cartilage and Chondrocytes. Kelley's Textbook of Rheumatology* (Tenth Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1738-9.00003-7>
- Hall, B. K., & Miyake, T. (2000). All for one and one for all: Condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays*, 22(2), 138–147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200002\)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4)
- Hartig, M., Joos, U., & Wiesmann, H. P. (2000). Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. *European Biophysics Journal*, 29(7), 499–506. <https://doi.org/10.1007/s002490000100>
- Honegger, P. (1999). Overview of Cell and Tissue Culture Techniques. In *Current Protocols in Pharmacology* (pp. 1–12). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1201s04>

- Ikenoue, T., Trindade, M. C. D., Lee, M. S., Lin, E. Y., Schurman, D. J., Goodman, S. B., & Smith, R. L. (2003). Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, *21*(1), 110–116. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00091-8)
- J. Cole, B., & M. Mike, M. (2004). *Articular Cartilage Lesions* (1st ed.). Springer Books.
- Jahns, M. E., Lou, E., Durdle, N. G., & Bagnall, K. (2007). The effect of pulsed electromagnetic fields on chondrocyte morphology. *Med Bio Eng Comput*, *45*, 917–925. <https://doi.org/10.1007/s11517-007-0216-8>
- Jakob, M., Démartheau, O., Schäfer, D., Stumm, M., Heberer, M., & Martin, I. (2003). Enzymatic Digestion of Adult Human Articular Cartilage Yields a Small Fraction of the Total Available Cells. *Connective Tissue Research*, *44*(44), 3–4. <https://doi.org/10.1080/03008200390215836>
- Jiles, D. (1991). *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials* (First edit).
- Kalson, N. S., Gikas, P. D., & Briggs, T. W. R. (2010). Current strategies for knee cartilage repair. *International Journal of Clinical Practice*, *64*(10), 1444–1452. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02420.x>
- Karsenty, G., & Wagner, E. F. (2002). Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development. *Developmental Cell*, *2*, 389–406. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00157-0)
- Kis-Toth, K., Hajdu, P., Bacskai, I., Szilagy, O., Papp, F., Szanto, A., ... Rajnavolgyi, E. (2011). Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Maintains the Membrane Potential and Regulates the Activation and Chemokine-Induced Migration of a Monocyte-Derived Dendritic Cell Subset. *The Journal of Immunology*, *187*(3), 1273–1280. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003345>
- Kotnik, T., & Miklavcic, D. (1998). Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields—a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, *45*, 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(97\)00093-7](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(97)00093-7)
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, *423*(May), 332–336.
- Landínez-parra, N. S., & Garzón-alvarado, D. A. (2009). Mechanical Behavior of Articular Cartilage. *Rev Cubana Ortop Traumatol*, *23*, 1–28.

- Lee, C., Grad, S., Wimmer, M., & Alini, M. (2006). The Influence of Mechanical Stimuli on Articular Cartilage Tissue Engineering. In *Topics in Tissue Engineering* (Vol. 2, pp. 1–32).
- Lieben, L., & Carmeliet, G. (2012). The involvement of TRP channels in bone homeostasis, *3*(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00099>
- Liu, Bh. (1996). Pulsed electromagnetic fields influence hyaline cartilage extracellular. *Osteoarthritis and Cartilage*, *4*, 63–76.
- Livingston, A., Mohanty, M., & Chittaranjan, S. (2011). Pulsed electromagnetic field therapy results in healing of full thickness articular cartilage defect. *International Orthopaedics*, *35*(02), 143–148. <https://doi.org/10.1007/s00264-010-0994-8>
- Luisa, M., Luis, H. C., María, P., & Trillo, Á. (2014). Electric Stimulation at 448 kHz Promotes Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *34*, 1741–1755. <https://doi.org/10.1159/000366375>
- Luo, F., Hou, T., Zhang, Z., Xie, Z., Wu, X., & Xu, J. (2012). Effects of Pulsed Electromagnetic Field Frequencies on the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Orthopedics*, *35*(4), e526–e531. <https://doi.org/10.3928/01477447-20120327-11>
- Marinova, I., & Mateev, V. (2010). Electromagnetic Field Modeling in Human Tissue. *International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering*, *4*(4), 140–145.
- Martel-pelletier, J., Boileau, C., & Roughley, P. J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, *22*(2), 351–384. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.02.001>
- Martínez, R., Martínez, C., Calvo, R., & Poblete, F. (2015). Knee Osteoarthritis (osteoarthrosis). *Revista Chilena de Ortopedia y Traumatología*, *56*(3), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.rchot.2015.10.005>
- Martino, C. F., Perea, H., Hopfner, U., Ferguson, V. L., & Wintermantel, E. (2010). Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells. *Bioelectromagnetics*, *31*, 296–301. <https://doi.org/10.1002/bem.20565>
- Matta, C. (2013). Calcium signalling in chondrogenesis implications for cartilage repair. *Frontiers in Bioscience*, *S5*(1), S374. <https://doi.org/10.2741/S374>
- Matta, C., Zákány, R., & Mobasheri, A. (2015). Voltage-Dependent Calcium Channels in Chondrocytes: Roles in Health and Disease. *Current Rheumatology Reports*, *17*(7).

- <https://doi.org/10.1007/s11926-015-0521-4>
- McMahon, T. A., & Rohr, J. R. (2014). Trypan Blue Dye is an Effective and Inexpensive Way to Determine the Viability of *Batrachochytrium dendrobatidis* Zoospores. *International Association for Ecology and Health*. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0908-0>
- Miller, M. D. (2005). Osteoarthritis: Foreword. *Clinics in Sports Medicine*, 24(1). <https://doi.org/10.1016/j.csm.2004.08.015>
- Miyakoshi, J. (2005). Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Biophysics and Molecular Biology*, 87, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.08.008>
- Mueller, M. B., & Tuan, R. S. (2011). Anabolic/Catabolic Balance in Pathogenesis of Osteoarthritis : Identifying Molecular Targets. *PMRJ*, 3(6), S3–S11. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2011.05.009>
- NAKASUJI Shota, MORITA Yusuke, T. K. (2009). Effect of Pulse Electric Field Stimulation on Chondrocytes. *Asian Pacific Conference for Materials and Mechanics*, 1(January 2011), 13–16.
- Nesic, D., Whiteside, R., Brittberg, M., Wendt, D., Martin, I., & Mainil-varlet, P. (2006). Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease B. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 300–322. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.012>
- Olney, R. C., Wang, J., Sylvester, J. E., & Mougey, E. B. (2004). Growth factor regulation of human growth plate chondrocyte proliferation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(4), 1171–1182. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.170>
- Pezzetti, F., De Mattei, M., Caruso, A., Cadossi, R., Zucchini, P., Carinci, F., ... Sollazzo, V. (1999). Effects of pulsed electromagnetic fields on human chondrocytes: An in vitro study. *Calcified Tissue International*, 65, 396–401. <https://doi.org/10.1007/s002239900720>
- Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C., & Bevilacqua, A. (2017). Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures : Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *BioMed Central*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3>
- Rip, H. S., Kolb, J. J. F., Chen, N., Stacey, M., Beebe, S. J., & Virginia, E. (2004). ULTRASHORT ELECTRICAL PULSES OPEN A NEW GATEWAY INTO BIOLOGICAL CELLS. <https://doi.org/10.1109/MODSYM.2004.1433545>
- Roland W. Moskowitz, Altman, R. D., Buckwalter, J. A., Goldberg, V. M., Hochberg, M. C., & Hochberg, M. C. (2007). *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical*

- Management* (4th Editio). Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from <https://www.amazon.com/Osteoarthritis-Diagnosis-Medical-Surgical-Management/dp/B00A18DTWM>
- Rosen, A. D. (2003). Effect of a 125 mT Static Magnetic Field on the Kinetics of Voltage Activated Na⁺ Channels in GH3 Cells. *Bioelectromagnetics*, 523, 517–523. <https://doi.org/10.1002/bem.10124>
- Ross, M. H. (2007). *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular* (Fifth).
- Sadoghi, P., Leithner, A., Dorotka, R., & Vavken, P. (2013). Effect of Pulsed Electromagnetic Fields on the Bioactivity of Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Orthopedics*, 36(3), e360–e365. <https://doi.org/10.3928/01477447-20130222-27>
- Sakai, A., Suzuki, K., Nakamura, T., Norimura, T., & Tsuchiya, T. (1991). Effects of pulsing electromagnetic fields on cultured cartilage cells. *International Orthopaedics*, 15, 341–346. <https://doi.org/10.1007/BF00186874>
- Saulis, G., & Saul, R. (2012). Size of the pores created by an electric pulse : Microsecond vs millisecond pulses. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, 1818, 3032–3039. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.06.018>
- Schmidt-Rohlung, B., Silny, J., Woodruff, S., & Gavenis, K. (2008). Effects of pulsed and sinusoid electromagnetic Welds on human chondrocytes cultivated in a collagen matrix. *Rheumatol Int*, 28, 971–977. <https://doi.org/10.1007/s00296-008-0565-0>
- Seed, S. M., Dunican, K. C., & Lynch, A. M. (2009). Osteoarthritis: a review of treatment options. *Geriatrics (Basel, Switzerland)*, 64(10), 20—29. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/20726384>
- Sheikh, A. Q., Taghian, T., Hemingway, B., Cho, H., Kogan, A. B., Daria, A., ... Hemingway, B. (2012). Regulation of endothelial MAPK / ERK signalling and capillary morphogenesis by low-amplitude electric field Regulation of endothelial MAPK / ERK signalling and capillary morphogenesis by low-amplitude electric field. *The Royal Society*. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0548>
- Solchaga, L., Goldberg, V., & Caplan, A. I. (2001). Cartilage Regeneration Using Principles of Tissue Engineering. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 391S(S), 161–170.
- Stolfa, S., Skorvánek, M., Stolfa, P., Rosocha, J., Vasko, G., & Sabo, J. (2007). Effects of static magnetic field and pulsed electromagnetic field on viability of human chondrocytes in vitro. *Physiological Research / Academia Scientiarum*

- Bohemoslovaca*, 56 Suppl 1(May 2014), S45-9.
- Sundelacruz, S., Levin, M., & Kaplan, D. L. (2009). Role of Membrane Potential in the Regulation of Cell Proliferation and Differentiation. *Humana Press*, 231–246.
<https://doi.org/10.1007/s12015-009-9080-2>
- Taghian, T., Narmoneva, D. A., & Kogan, A. B. (2015). Modulation of cell function by electric field : a high-resolution analysis. *The Royal Society*, 21–25.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0153>
- Teissie, J., & Rols, M.-P. (1993). An Experimental Evaluation of the Critical Potential Difference Inducing Cell Membrane Electropermeabilization. *Biophysical Journal*, 65(July), 409–413. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81052-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81052-X)
- Temenoff, J. S., & Mikos, A. G. (2000). Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21(5), 431–440. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00213-6)
- Tu, J., Yeoh, G. H., & Liu, C. (2008). *CFD Solution Analysis—Essentials. Computational Fluid Dynamics*. <https://doi.org/10.1016/b978-075068563-4.50007-0>
- Vaca-González, J. J., Guevara, J. M., Vega, J. F., & Garzón-Alvarado, D. A. (2016). An In Vitro Chondrocyte Electrical Stimulation Framework: A Methodology to Calculate Electric Fields and Modulate Proliferation, Cell Death and Glycosaminoglycan Synthesis. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 9(1), 116–126.
<https://doi.org/10.1007/s12195-015-0419-2>
- Vaca-González, Juan J., Guevara, J. M., Moncayo, M. A., Castro-Abril, H., Hata, Y., & Garzón-Alvarado, D. A. (2017). Biophysical Stimuli: A Review of Electrical and Mechanical Stimulation in Hyaline Cartilage. *Cartilage*, 1–16.
<https://doi.org/10.1177/1947603517730637>
- Van Bladel, J. G. (2007). *Electromagnetic Fields. Electromagnetics* (2nd editio).
<https://doi.org/10.1002/047012458X>
- Vanessa, N., Nicolin, V., Ponti, C., Baldini, G., Gibellini, D., Bortul, R., ... Narducci, P. (2007). In vitro exposure of human chondrocytes to pulsed electromagnetic fields. *European Journal of Histochemistry European Journal of Histochemistry*, 51(3), 203–211.
- Vega Álvarez, J. A., García-Suárez, O., Fernández Monjil, D., & del Valle Soto, M. E. (2002). Biochemistry and biology of the articular cartilage. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 46(5), 391–400.
- Wang, W., Wang, Z., Zhang, G., Clark, C. C., & Brighton, C. T. (2004). Up-regulation of

- chondrocyte matrix genes and products by electric fields. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (427 SUPPL.), 163–173.
<https://doi.org/10.1097/01.blo.0000143837.53434.5c>
- Xu, J. M. D., Ph, D., Wang, W. M. D., D, C. C. C. P., Brighton, C. T. M. D., & Ph, D. (2009). Signal transduction in electrically stimulated articular chondrocytes involves translocation of extracellular calcium through voltage-gated channels 1. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(3), 397–405.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.07.001>
- Yan, J., Dong, L., Zhang, B., & Qi, N. (2010). Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 29(4), 165–176.
<https://doi.org/10.3109/01676830.2010.505490>
- Yang, Y., Wang, Z., Li, G., Jiang, T., Tong, Y., Yue, X., ... Sun, K. (2017). Inspired by the “tip effect”: a novel structural design strategy for the cathode in advanced lithium-sulfur batteries. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(7), 3140–3144.
<https://doi.org/10.1039/c6ta09322a>
- Yen, Y., Cascio, B., Brien, L. O., Stalzer, S., Millett, P. J., & Steadman, J. R. (2008). Treatment of Osteoarthritis of the Knee with Microfracture and Rehabilitation. *MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE*, (August 2007), 200–205.
<https://doi.org/10.1249/mss.0b013e31815cb212>
- Zhadobov, M., Augustine, R., Sauleau, R., Alekseev, S., Paola, A. Di, Mahamoud, Y. S., ... Que, C. Le. (2012). Complex Permittivity of Representative Biological Solutions in the 2 ^ 67 GHz Range. *Bioelectromagnetics*, 355(November 2010), 346–355.
<https://doi.org/10.1002/bem.20713>
- Zhang, B., Yeung, S. S., Liu, Y., Wang, H., Wan, Y., Ling, S., ... Yeung, E. W. (2010). The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *BioMed Central*.
<https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-87>
- Zhang, R., Cheng, X. B., Zhao, C. Z., Peng, H. J., Shi, J. Le, Huang, J. Q., ... Zhang, Q. (2016). Conductive Nanostructured Scaffolds Render Low Local Current Density to Inhibit Lithium Dendrite Growth. *Advanced Materials*, 28(11), 2155–2162.
<https://doi.org/10.1002/adma.201504117>
- Zizic, T. M., Hoffman, K. C., & Holt, P. A. (1995). Treatment of osteoarthritis of the knee

with pulsed electrical stimulation. *Rheumatology*, 22(September 1995), 57–61.

Retrieved from

https://www.researchgate.net/publication/14676677_Treatment_of_osteoarthritis_of_the_knee_with_pulsed_electrical_stimulation

Zwolińska, J., Gąsior, M., Śnieżek, E., & Kwolek, A. (2016). The use of magnetic fields in treatment of patients with rheumatoid arthritis . Review of the literature.

Reumatologia, 201–206. <https://doi.org/10.5114/reum.2016.62475>