



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

“Determinación de las propiedades eléctricas involucradas en los cambios morfológicos, genéticos y de proliferación en la diferenciación de células trocales a osteoblastos al ser estimuladas eléctricamente”

OPCIÓN:

TESIS PROFESIONAL

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOMÉDICO

PRESENTA:

EDIE DE JESÚS PINTO BAAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



"2019. Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Anexo III

FORMATO DE LIBERACIÓN DEL PROYECTO PARA LA TITULACIÓN INTEGRAL

Mérida; Yuc., **6 de Febrero de 2019.**

M.C. DARVIN PEREZ SOSA.
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES.
PRESENTE

Por este medio le informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

a) Nombre del Estudiante	PINTO BAAS EDIE DE JESÚS
b) Carrera	INGENIERÍA BIOMÉDICA
c) N° de Control	E13081458
d) Nombre del Proyecto	DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS INVOLUCRADAS EN LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS, GENÉTICOS Y DE PROLIFERACIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TROCALES A OSTEÓBLASTOS AL SER ESTIMULADAS ELÉCTRICAMENTE
d) Producto	TESIS PROFESIONAL

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®

DR. VÍCTOR SANDOVAL CURMINA.
ENCARGADO DEL DEPTO. DE ELÉCTRICA ELECTRÓNICA.



ASESOR 	REVISOR 	REVISOR
Ingeniero en Comunicaciones y Electrónica Jacqueline Melo García	Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica Gabriela Noemi Moreno Novelo	Maestro en Ciencias en Ingeniería Eléctrica José Agustín Hernández Benítez

c.c.p. Expediente.



AGRADECIMIENTOS

A la licenciatura en Ingeniería Biomédica del Instituto Tecnológico Nacional (ITN) de la ciudad de Mérida.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por brindar el laboratorio de cultivo celular y el apoyo económico durante mi estancia durante la realización de la tesis de licenciatura.

A los proyectos CONACYT 1360 (Fronteras de la Ciencia) y 248378 (Problemas Nacionales) por el financiamiento del proyecto.

Al grupo de asesoras conformadas por la Ing. Jackeline Melo Garcia y Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por darme la oportunidad de emprender en un nuevo proyecto y por todo el apoyo académico, emocional y profesional durante el proyecto de residencia y en el desarrollo de la tesis.

Al grupo de revisores conformados por el Dr. Agustín Hernández Benitez y la M.C. Gabriela Noemí Moreno Novelo por el apoyo y orientación durante la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres, Edye Jesús Pinto Castillo y Rosalinda Baas Chel, a quienes debo el apoyo económico, emocional y afectivo desde el inicio de mi vida hasta el presente. Y por apoyo durante las situaciones adversas y bríndame palabra de aliento para no detenerme, alentarme en la búsqueda de mi vocación profesional.

A mis Hermanas, Elizabeth Alejandra Pinto Baas y Marissa Guadalupe Pinto Baas, por el apoyo fraternal ante los problemas y por estar siempre a mi lado en la búsqueda de un bien común.

A mis segunda madre Laura Griselda Castillo Solís, por brindarme hospicio durante estos 9 años como también por las enseñanzas de vida.

A mis Hermanos Adoptivos Alexander de Jesús Chay Couoh y Gabriel Rodrigo Rosado Castillo por su apoyo incondicional durante mi vida universitaria y por volver la vida más amena.

A mis grupos de amigos, las Dianas, los Peniches y las Elviras por el apoyo que me ofrecieron en cada una de mis etapas como universitario, por enseñarme sus mejores virtudes y siempre estar presente en los momentos más confusos y en los más divertidos, gracias a cada uno de ellos he tomado las decisiones que me han permitido estar frente a ustedes presentando este trabajo.

Por ultimo a las personas que me acompañaron durante esos sándwiches interminables entre clases, durante esas horas en el camión, durante esa horas en el laboratorio, que de alguno u otra manera volvían las cosas más triviales en una platicas interesante, y que por su puesto no olvidaré.

Tabla de contenido

I.- Índice de Figuras	4
II.- Índice de tablas.....	6
III.- Abreviaturas	7
IV- Resumen	9
1. Introducción	10
2. Antecedentes	11
2.1. Células Troncales	11
2.1.1 Ontogenia	11
2.1.2 Fuentes de obtención.....	13
2.1.3. Caracterización de acuerdo a la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)...	15
2.2. Diferenciación osteoblástica	17
2.2.1. Desarrollo del fenotipo osteoblástico.....	18
2.2.2. Control génico en osteoblastogénesis	20
2.2.3. Factores osteogénicos.....	23
2.3. Inducción eléctrica de la diferenciación osteoblástica.....	28
2.3.1. Entorno eléctrico celular	28
2.3.2. Factores físico-químicos del macroentorno	29
2.3.3. Actividades eléctricas en las células	31
2.3.4. Células excitables e inexcitables	33
2.3.5. Difusión y coeficientes de difusión a través de la membrana celular	34
2.3.6. Activación eléctrica en la osteogénesis.....	35
2.3.6.1. Efectos magnéticos en la membrana celular	44
2.3.6.2. Efectos magnéticos a nivel cromosoma y ADN.....	45
2.3.6.3 Efectos intracelulares por especies reactivas de oxígeno (ROS).	45
2.3.6.4. Efecto en ATP y calcio.....	46
2.4. Características Eléctricas.....	47
2.4.1. Ley de Gauss	53
2.4.2. Ley de Faraday	54
2.4.3. El Flujo del campo magnético.....	55
2.4.4 Características eléctricas de los materiales:	56
2.4.5. Campos magnetostáticos	58
2.4.6. Ley del Ampere.....	60

2.4.7. Densidad de Flujo magnético	60
2.4.8. Fuerzas y momentos de torsión magnéticos.....	61
2.4.9. Las fuerzas de torsión.....	62
2.4.10. Potencial magnético vectorial	62
2.4.11. Inductancia	63
2.4.12. Energía magnética	63
2.5.- Características del Medio Celular	64
2.5.1.- Características Químicas y biológicas	64
2.5.2.- Características Físicas	65
2.5.2.1 Polarización de un dieléctrico	66
2.5.2.2. Capacitancia de un dieléctrico.....	67
2.5.2.3. Tipos de dieléctricos.....	69
2.5.2.4. Ruptura en un dieléctrico	70
2.5.2.5. Dieléctricos con polímeros.....	71
3. Problemática.....	72
4. Justificación.....	73
5. Objetivos	74
5.1. Objetivo General.	74
5.2. Objetivos específicos.....	74
6. Hipótesis.....	75
7. Material y métodos.....	76
Protocolo 1. Cultivo y expansión de células troncales mesenquimales de pulpa dental.....	76
Protocolo 2. Ensayo de estimulación eléctrica.....	77
Protocolo 3. Tinción con rojo de alizarina.	77
Protocolo 4. Tinción con Azul de Toluidina	78
Protocolo 5. Tinción con Oil Red.....	78
Protocolo 6. Tinción con Cristal Violeta.....	79
Protocolo 7. Tinción con Giemsa.....	79
Protocolo 8. Proliferación celular.....	79
Protocolo 9. Elección de estímulos eléctricos.	79
Protocolo 10.- Selección de transductores	80
Protocolo 11. Medición eléctrica del cultivo celular.....	81
Protocolo 12. Medición del pH	81
Protocolo 13. Medición de la característica eléctrica de la célula.....	81
Protocolo 14. Cálculos de características del medio y estímulo.	82

7.	Resultados	90
7.1.	Análisis Morfológico con Cristal violeta.	90
7.2.	Análisis de depósitos de Calcio con Rojo de Alizarina	94
7.3.	Tinciones del Ensayo 2	95
7.4.	Efecto del campo magnético sobre la proliferación celular	101
7.5.	Efecto del campo de Magnético sobre el pH.....	103
7.6.	Mediciones eléctricas de los medios celulares.	103
7.7.	Energía potencial durante el estímulo	105
7.8.	Energía potencial después del estímulo	106
7.9.	Efecto de campo magnético sobre la Fuerza de Lorenz.....	107
7.10.	Características eléctricas de la célula.	108
8.	Discusión de resultados	109
9.	Conclusión.....	111
10.	Referencias	113
11.	Anexos.....	116

I.- Índice de Figuras

Figura 1. Ontogenia de las células troncales.	13
Figura 2. Diferenciación de las células mesenquimales.	15
Figura 3. Capacidad de diferenciación de las células troncales de pulpa dental.	16
Figura 4. Tipos de células troncales en el tejido dental.	17
Figura 5. Interacciones osteogénicas.	23
Figura 6. Formación y diferenciación temprana de la somita.	25
Figura 7. Esquema de la secreción de moléculas responsables de la proliferación y diferenciación de condrocitos.	26
Figura 8. Esquema de la osificación endocondrial.	27
Figura 9. Los principales factores involucrados en la diferenciación celular.	29
Figura 10. Flujo de iones en la membrana celular.	31
Figura 11. Modelo de ECIS.	34
Figura 12. Modelo experimental de la aplicación de campo eléctrico a cultivos celulares.	36
Figura 13. Esquema de los efectos biológicos por la presencia de campo eléctrico.	37
Figura 14. Microentorno de las células troncales.	39
Figura 15. Estructuras biológicas con propiedades diamagnéticas.	42
Figura 16. Esquema general de los efectos del campo magnético en la célula y sus posibles aplicaciones.	43
Figura 17. Orientación de Eritrocitos.	44
Figura 18. Efecto del campo magnético en células neuronales.	45
Figura 19. Tipos de corriente.	48
Figura 20. La dirección de la corriente convencional.	49
Figura 21. La ecuación de Coulomb.	50
Figura 22. Las Fuerzas de coulomb.	51
Figura 23. La ley de Gauss.	52
Figura 24. La ecuación de Gauss en forma diferencial.	54
Figura 25. La ley de Faraday.	55
Figura 26. La dirección del campo magnético.	56
Figura 27. Polarización de un medio dieléctrico.	66
Figura 28. Permitividad eléctrica de polímero con iones.	71
Figura 29. Expansión del cultivo celular.	76
Figura 30. Distribución de los cultivos en una placa de 24 pocillos.	77
Figura 31. Selección de transductores.	80
Figura 32. Medición de Medios.	81
Figura 33. Tinción de cuerpo amorfos.	91
Figura 34. Células alargadas.	92
Figura 35. Células con forma hexagonal.	92
Figura 36. Células con proyecciones.	93
Figura 37. Presencia de Calcio.	95
Figura 38. Depósitos de Calcio.	95
Figura 39. Depósitos de lípidos.	97
Figura 40. Células redondeadas.	98
Figura 41. Acoplamiento celular.	98
Figura 42. Desprendimiento del suelo.	99
Figura 43. Núcleos celulares.	100

Figura 44. Canales celulares.....	100
Figura 45. Células ancladas.....	101
Figura 46. Proliferación celular.....	102
Figura 47. Proliferación celular en porcentaje respecto al control negativo.....	103
Figura 48. pH de los Medios.....	103
Figura 49. Densidad de energía magnética.....	105
Figura 50. Densidad de energía por pocillos durante el estímulo.....	106
Figura 51. Densidad de energía después del estímulo.....	107

II.- Índice de tablas

<i>Tabla 1. Fuentes de células Troncales.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 2. Los factores moleculares más importantes en la osteogénesis.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 3. Principales iones presentes en un medio celular con sus respectivas concentraciones.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4. Experimentos realizados con campo magnéticos expuestos a células en proceso osteogénico.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 5. Características de la corriente alterna y directa.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 6. Leyes de Maxwell.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 7. Ramas de la Teoría Electromagnética.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 8. Tabla comparativa de la morfología celular.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 9. Análisis de depósitos de calcio.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 10. Tinciones del experimento 2.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 11. Valores eléctricos del medio celular DMEM con estímulo, medio DMEM sin estímulo y Medio Osteogénico.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 12. Características magnéticas de los estímulos.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 13. Fuerza magnética y eléctricas de lo estímulos.....</i>	<i>104</i>

III.- Abreviaturas

CTMs	Células Troncales Mesenquimales
LSCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
Ag	Antígenos
CD	Marcadores moleculares de grupos de diferenciación
CD105	Endogлина, HHT1, ORW, SH-2
CD73	Ecto-5'-nuclotidasa, NT5E, E5NT, NT5, NTE, eN, eNT
CD45	Antígeno Común de Leucocitos (LCA), T200, B220, Ly5, Receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C (PTPRC)
CD34	gp105-120, antígeno de células progenitoras hematopoyéticas 1 (HPCA1)
CD11b	Integrina α M, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1
CD79a	IGA (α asociado a inmunoglobulina), MB-1
CD19	B4
HLA-DR	Receptor de superficie celular de HLA
HLA	Antígeno de leucocito humano
DPSCs	Células troncales de pulpa dental
SCAPS	Células troncales de ápice papilar
SHEDs	Células troncales del exfoliulares deciduos dental
DFSCs	Células troncales foliculares
PDLCS	Células troncales aisladas del PDL
PDL	Ligamento periodontal
ALP	Fosfata alcalina
PTH	Hormona paratiroidea
Ihh	Gene Indian hedgehog
Shh	Gene Sonic hedged
CBFA-1	Factor de unión al núcleo 1
BMPs	Proteínas morfológica ósea
AML3	Factor de transcripción relativo del Runx2
Runx2	Factor de transcripción del osteoblastos
USF3	Factor de transcripción
Dhh	Gene Desert hedgehog
OPN	Osteopontina
BSP	Sialoproteína
OCN	Osteocalcina
VEGF	Factores de crecimiento del endotelio vascular
PDFG	Actores de crecimiento derivados de la plaqueta
Hox	Genes proteicos
BMP5	Genes proteicos morfológicos de hueso
BMP7	Genes proteicos morfológicos de hueso
Wnt	Winter
pH	Potencial de hidrógeno
Vm	Voltaje de membrana
Vr	Voltaje en reposo
c	Concentración
J _d	Número de iones
S	Siemens (Unidad de conductancia eléctricos)

m	metro
ECIS	Sensibilidad de impedancia eléctrica del sustrato celular
Rgab	Resistencia de agarre
Cgab	Capacitancia de agarre
ADN	Ácido Desoxirribonucleico

IV- Resumen

Las enfermedades degenerativas son padecimiento que en la mayoría de los casos no poseen tratamiento, produciendo el deterioro de órganos o sistemas causando la disminución de habilidades motoras, intelectuales o incluso produciendo la muerte. Entre las enfermedades degenerativas se encuentra el Alzheimer, Huntington, Parkinson, Artritis, escoliosis, osteoporosis, Lupus, diabetes, entre otras. La activación y regulación de la regeneración de tejido a través de andamios representa una posibles solución, sin embargo, los andamios no siempre representan una alternativa viable debido a que se requiere la inserción en el área afectada. Debido a la problemática anterior, se buscan nuevas soluciones no invasivas. El proyecto propone estudiar los efectos biológicos de los campos magnéticos en células troncales, con la finalidad de demostrar si es posible activar la regeneración de tejido, especialmente en el tratamiento de enfermedades degenerativas óseas.

En este trabajo se empleo la siguiente metodología:

- 1) Analizar y calcular los parámetros de estimulación.
- 2) Identificar cambios morfológicos en células estimuladas a diferentes intensidades de campo.
- 3) Determinar la presencia de cuerpos de calcio, depósitos de lípidos, grupos proteoglicanos, estructuras nucleares y membranosas.
- 4) Analizar la Proliferación celular de los cultivos estimulados y no estimulados.
- 5) Medir y calcular las características eléctricas de los medios con y sin estímulo.

Los resultados demuestran que los campos magnéticos modifican el medio celular y producen diferenciación a diversos linajes celulares debido a la acumulación, así como la migración de los nutrientes producidos por la polarización del medio durante y después del estímulo. Como conclusión, la intensidad del campo magnético (1 mT, 600 mT, 1 T) es directamente proporcional a los cambios morfológicos y al cambio de las características eléctricas del medio como la permitividad eléctricas.

1. Introducción

En la actualidad existen diversos padecimiento que no poseen tratamientos que permitan eliminar o detener estas afecciones, sobre todo aquellas de naturaleza degenerativa o crónica, los cuales se pueden presentar principalmente en los huesos, músculos, órganos digestivos, en el sistema inmunológico y en el sistema nervioso.

Debido a estos padecimientos, se estudia el proceso de regeneración con el fin de contrarrestar los efectos de estas enfermedades. En el 2017 el Institute Centers for Disease Control and Preventions (CDC), publicó que más 30 millones de estadounidenses adultos sufren de osteoartritis, una de muchas enfermedades degenerativas. Según estudios de la iofbonehealth, se calcula que 113 millones de personas padecen osteoporosis, principalmente en adultos mayores de 50 años y se estima que para el 2050 exista más de 150 millones de personas afectadas (iofbonehealth, 2017).

Existen investigaciones enfocadas en analizar del comportamiento de las células troncales en diversos nichos, varias de estas han logrado crear andamios capaces de regenerar hueso, piel, músculo liso, vasos, entre otros. Aunque la utilización andamios ha resultado favorable, su diseño no representa algo fácil y mucho menos predecible debido a que no existen estándares que predigan su comportamiento dentro de un nicho específico. El movimiento de ciertos nutrientes se encuentra íntimamente relacionado con la capacidad que tiene un andamio para proliferar y diferenciarse; uno de lo fenómenos involucrado con el movimiento de moléculas se llama electroforesis, la cual está dada por las características del medio (Grimnes & G Martinsen, 2015).

Es por este motivo, que el tema de investigación se centró en recrear nichos con diversas características eléctricas, empleando estímulos eléctricos para estudiar sus efectos sobre las células, con la finalidad de evaluar las características eléctricas como posibles factores involucrados en la regeneración de tejido. En el estado del arte existen diversos estudios, que han encontrado resultados favorables para la diferenciación de células troncales a diferentes estirpes celulares. Sin embargo, se han limitado al análisis de los efectos biológicos, sin tomar en cuenta su posible relación con las propiedades eléctricas del nicho.

2. Antecedentes

2.1. Células Troncales

Las células troncales (CTs) también conocidas como células madre, están presentes en la mayoría de los organismos multicelulares y son las responsables del desarrollo y regeneración de tejidos. Se diferencian de otras células al poseer la capacidad de autorenovarse y diferenciarse (Burgess, Introduction to stem cell, 2013). Así como de promover la remodelación de los órganos, así como la reparación de los tejidos dañados (To'a Salazar Georgina, 2013), (Arjmand Monireh, 2017). Las CTs se pueden clasificar de acuerdo al tipo de células a las que pueden dar origen y en la etapa de la gestación en la que estas aparecen. Todos los tipos de CTs cambian de capacidad durante el transcurso del desarrollo embrionario, disminuyendo su capacidad de diferenciación hasta tener la capacidad de crear un solo tipo de linaje celular (Burgess, Introduction to stem cell, 2013).

2.1.1 Ontogenia

La presencia de células troncales dentro del ciclo de desarrollo de un organismo, se inicia a partir de la fecundación de un óvulo con un espermatozoide. Los cuales se fusionan para formar el cigoto, considerada como la primera célula totipotente en aparecer (Keith L. Moore M. G., 2016). A partir de esta célula se desarrolla la mórula, la cual se implanta en el útero en el 7 día del desarrollo embrionario.

El desarrollo embrionario es el proceso de formación de un individuo, el cual presenta la clave para la ingeniería de órganos y la medicina regenerativa. Esto es debido a que posee los elementos y factores necesarios para definir las características del individuo y desencadenar los procesos de maduración. En la actualidad se sabe que las células no pueden vivir aisladas y para realizar el proceso de curación de una herida, se requiere de la participación de diversas señales moleculares que se originan a partir de células de diferentes linajes, e incluso, de células provenientes de otros sistemas (Digel Ilya, 2011).

Por lo cual, el desarrollo embrionario es el único proceso conocido que posee las rutas definidas, consecutivas . Al poseer un entorno inicial uniforme y un conjunto de células replicadas, se conoce que los cambios siguientes se dan debido a la formación de nuevos microentornos que dan origen a nuevas capas celulares (ectodermo, mesodermo y endodermo), los cuales se redefinen para dar origen a nuevos linajes (Moore Keith L., 2016) . Los nichos celulares que existen son muy diversos y poseen la capacidad de regenerar tejido necesario para cada uno de sus entornos. Por lo cual, cada tipo de célula troncal adulta es capaz de diferenciarse a células del entorno en que se encuentren (Ajaykumar Vishwakarma, 2017).

De acuerdo a su capacidad de diferenciación, las CTs se clasifican en 4 tipos (Ute Bissels, 2013) (Figura 1):

- Células Totipotentes: dan origen a todos los linajes de células embrionarias y extraembrionarias, se originan a partir del cigoto y cambian cuando se forma las células mesodérmicas.
- Células pluripotentes: generan células germinales de todos los linajes de cada sistema fisiológico, se presentan en la capa mesodérmica y desaparecen con la aparición del embrión.
- Células multipotentes: generan células de linajes que se necesitan dentro de cada sistema fisiológico, aparecen a partir de la formación de feto hasta final de la vida del organismo.
- Células unipotentes: generan un tipo único de célula, como es el caso de las células troncales espermatogénicas, estas son las última células troncales en aparecer y se le conoce como célula precursora de los espermatozoides.

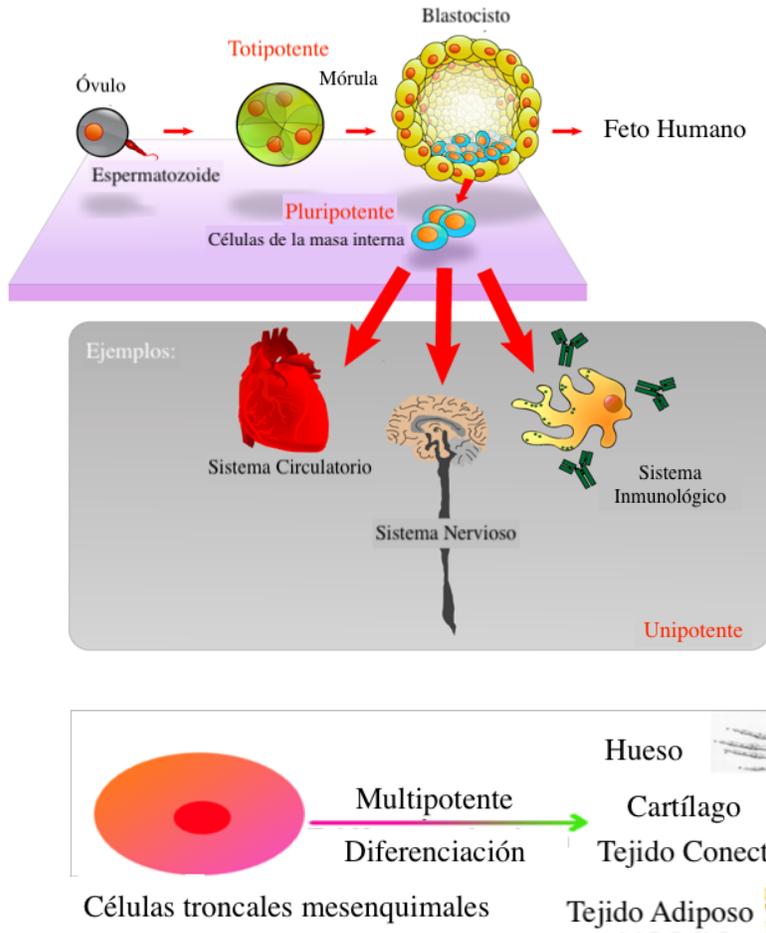


Figura 1. Ontogenia de las células troncales. Las células troncales se presentan en el inicio de la formación de un nuevo individuo, las cuales dan origen a células troncales de menor capacidad de diferenciación hasta alcanzar el máximo nivel de especialización y conformar a células adultas que poseen la capacidad de remodelar y reparar tejidos.

2.1.2 Fuentes de obtención

La importancia de Células Troncales Mesenquimales (CTMs) radica en su capacidad de adherencia y la variedad de líneas celulares a las cuales se pueda diferenciar. En la actualidad existen diversas fuentes de obtención de CTMs (Chengcai Zheng, 2017). Las más comunes son la placenta, sangre de cordón umbilical, extracción de medula ósea o

la extracción de células en diferentes tejidos adultos. Los cuales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 6. Fuentes de células Troncales. Las fuentes de obtención de células troncales son diversas y dependiendo de la necesidad del estudio, se puede requerir de una determinada estirpe celular.

Tejido de origen	Tipo de células troncales adultas	Tipos de linaje que produce
Sangre	Circulatorio Esquelético	Adipocito , Osteocito
Medula ósea	Angioblastos Células troncales Hematopoyéticas (CTHs)	Maduración endotelial y formación de venas sanguíneas, Hepatocitos, Colangiocitos
	Células mesenquimales (CMSs)	Adipocito, Osteocito, Condrocito, Cardiomícito , Miocito
Medula Ósea (Fetal)	CTHs	CTHs, Linaje de células sanguíneas rojas, Linaje de células sanguíneas blancas
Cerebro (adulto y fetales)	Células troncales neuronales (CTNs)	Células musculares
	Células progenitoras neuronales (CPNs)	Astrocitos, Neuronas, Oligodendrocitos
Grasa	Fracción vascular estromal del proceso de lipoaspirado	Precursores de los adipocitos Precursores de los osteocitos Precursores de los condrocitos Precursores de los miocitos
Hígado (fetal)	CTHs	Células precursoras hematopoyéticas Linaje de Células sanguíneas rojas Linajes de células sanguíneas blancas
Cordón umbilical	CPNs CTHs Células precursoras Mesenquimales (CPMs)	Linajes de células sanguíneas blancas y rojas, Osteoblastos , Adipocitos
Pulpa dental (adulto)	Células troncales de pulpa dental	Osteocitos, Neuronas, Adipocito, condrocitos, miocitos
Placenta	Células multipotentes derivadas de la placenta (CMDPs) Células troncales embrionarias	Osteoblastos, Neuronas, adipocitos, condrocitos Células T

Las CTMs poseen grandes capacidades de diferenciación dependiendo de los factores de diferenciación que tenga el nicho donde habiten (Figura 2).

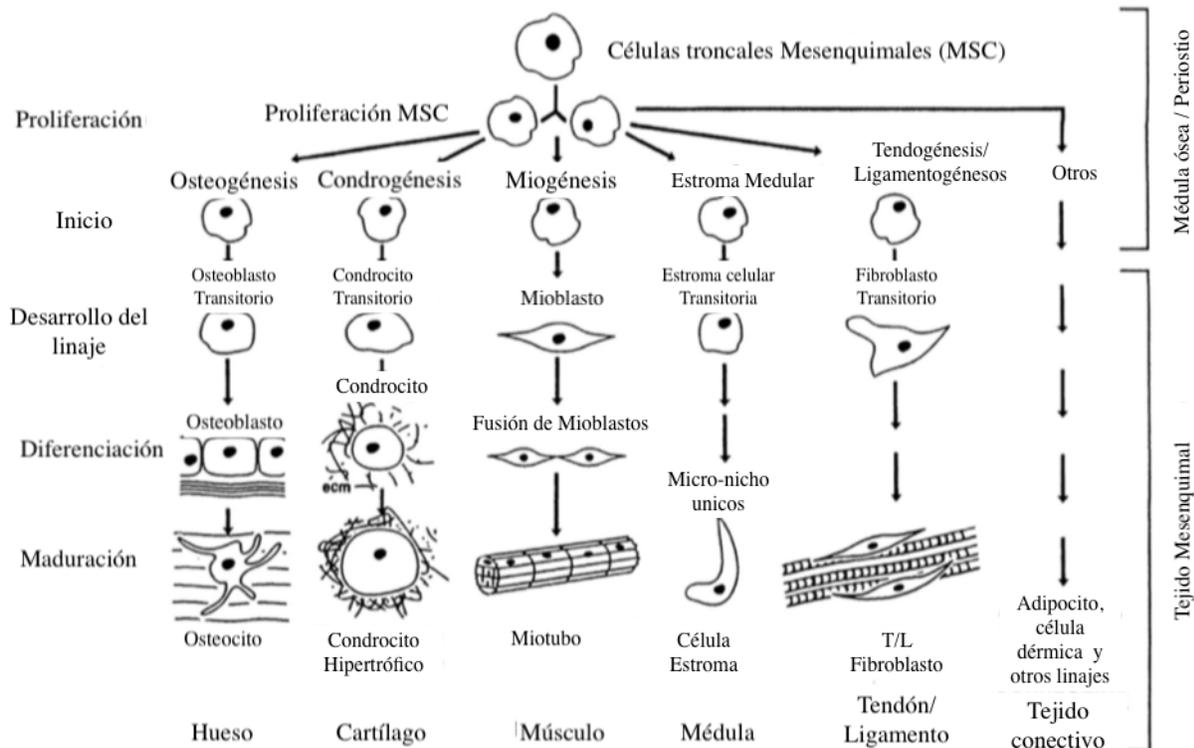


Figura 2. Diferenciación de las células mesenquimales. Las células troncales mensequimales (CTM) poseen una amplia capacidad de diferenciación para formar los tejidos (Scott P. Bruder, 2013).

2.1.3. Caracterización de acuerdo a la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)

La Sociedad Internacional de Terapia Celular en el año 2006 publicó un artículo acerca de los criterios mínimos requeridos para trabajar con cultivos celulares enfocados en terapia celular. El propósito del estudio se centró en establecer los estándares para trabajar con CTMs humanas. Dichos criterios son los siguientes (Mauro Krampera, 2013):

- 1) La adherencia al plástico.

2) Expresión específica de antígenos (Ag): se deben expresar fenotipos CD105, CD73, CD90 en un 95% o más. Y la carencia de los genes CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19, HLA-DR (Lv., S. Tuan, M.C. Cheung, & Y.L.Leung, 2014).

3) Potencial de diferenciación multipotente: Las células deben poder diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

2.1.4 Células Troncales de Pulpa dental

Como se visualiza en la Tabla 1, existen diferentes fuentes de obtención de CTs y como se ha mencionado con anterioridad cada tipo de célula posee diferente capacidad de diferenciación. Por lo cual es importante saber el tipo de célula que se requiere para cada experimento. Las CTs de pulpa dental, son células que poseen la capacidad de diferenciarse en diversos linajes celulares (Demirci, Doğan, & Şahin, 2016), como se ve en la Figura 3.

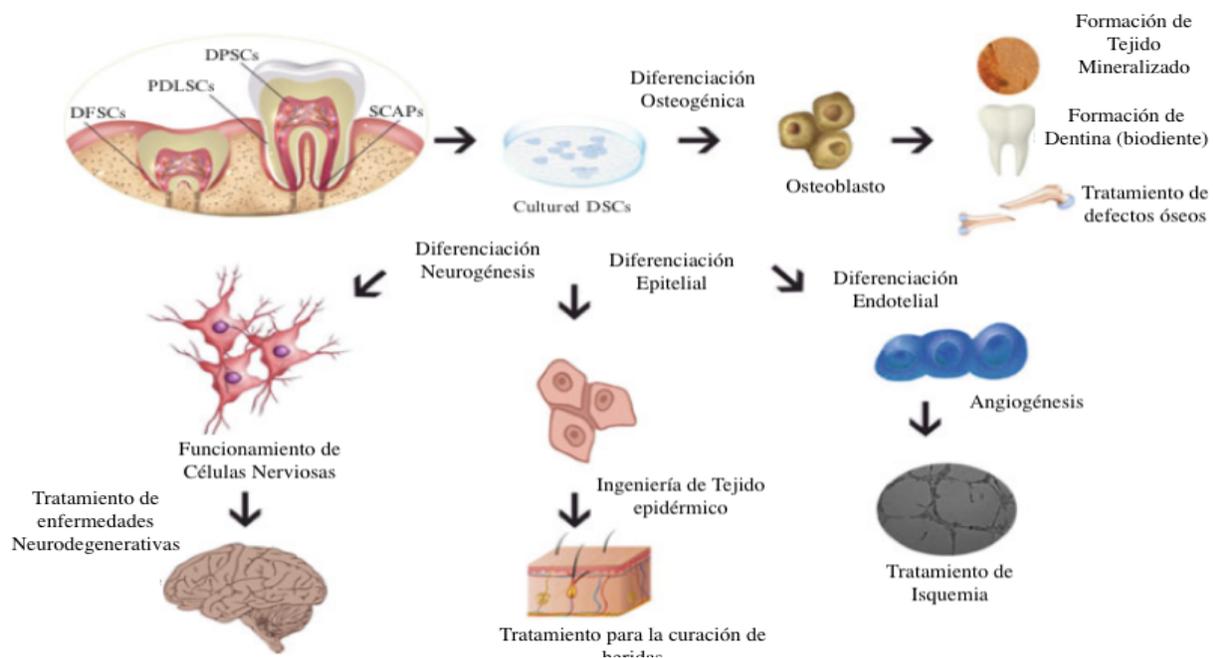


Figura 3. Capacidad de diferenciación de las células troncales de pulpa dental. En la imagen se puede apreciar las rutas de diferenciación más estudiadas para estas células (Demirci, Doğan, & Şahin, 2016).

El tejido dental y el craneofacial son tejidos ampliamente empleadas por la gran cantidad de CTs que contienen. Sin embargo, solo las CTs de tejido dental poseen fácil accesibilidad, además de poseer una protección debido a que se encuentra dentro del diente, por lo cual, los protege de agente externos (R. Cooper, 2016). Las CTs de pulpa dental poseen las características requeridas por la ISCT (Neslihan Taşlı, Aydın, & Şahin, 2016). Es por esta razón, que es una CT ampliamente empleada de forma experimental, así como en el área pre-clínica. En el tejido dental, las CTs se encuentran en diversas estructuras dentro del diente o en ciertos dientes, como se observa en la Figura 4.

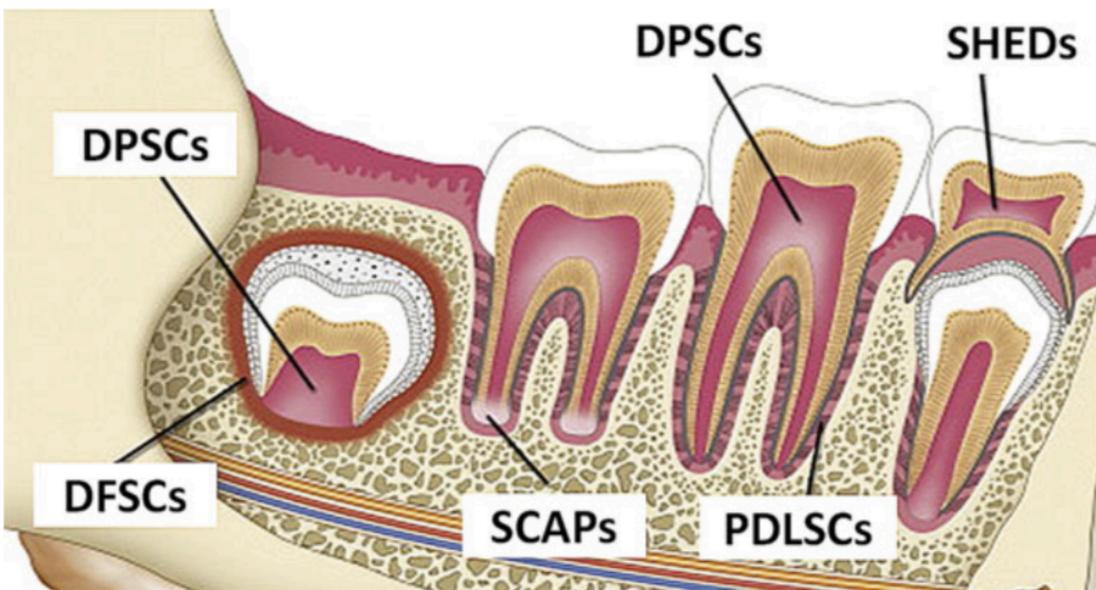


Figura 4. Tipos de células troncales en el tejido dental. Existen 5 tipos de células troncales las cuales son: Células troncales de pulpa dental (DPSCs), Células troncales del apice papilar (SCAPs), células troncales del exfoliated deciduous dental (SHED), Células troncales foliculares (DFSCs), células troncales aisladas del PDL (PDLSCs) (Khojasteh, Nazeman, & Rezai Rad, 2016) .

2.2. Diferenciación osteoblástica

La diferenciación osteoblástica se presenta en el proceso de formación y curación de huesos. Este proceso tiene estrecha relación con el proceso de la inflamación y la vasculogénesis. Existen tres tipos de curación ósea, las cuales se diferencian por el tamaño del defecto óseo y la fijación rígida. Los diferentes procesos de curación nos dan

información acerca del proceso de la regeneración ósea. Todos los procesos de curación ósea inician de forma semejante, en la primera etapa, se aprecia la aparición de osteoclastos encargados de recortar los núcleos a los costados de las áreas de compresión con una velocidad de 50 a 80 μm por día. Los espacios darán origen a los nuevos conductos circulatorios que formaran venas o arterias. Este proceso de destrucción o resorción ósea, es acompañado por el proceso de inflamación, el cual propicia un proceso de reacción en cadena que culmina con la regeneración ósea (The principals of tissue engineering, Robert P. Lanza).

2.2.1. Desarrollo del fenotipo osteoblástico

Las células osteoprogenitoras son estimuladas para proliferar y diferenciarse con la activación de condroblastos y osteoblastos que eventualmente se hipertrofian y mueren, dejando vacías algunas lagunas óseas, que están compuesta de matriz calcificada. Esos espacios vacíos permiten el crecimiento vascular, que resulta en una alta tensión de oxígeno y normalización del pH, el cual, retorna a favor de la diferenciación de osteoblastos (Ajaykumar Vishwakarma, 2017).

Los procesos esenciales para el desarrollo de la curación de hueso son: Osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción.

1.- La osteogénesis es definida como la formación de nuevo hueso usando osteocomponentes celulares, es decir, sustancias que se requieren para la formación de material extracelular, los cuales están contenidos dentro del tejido óseo que lo rodea.

2.- La osteoinducción se define como la formación de hueso que resulta de células mensenquimales primitivas que son estimuladas a diferenciarse en células formadoras de hueso por proteínas inductivas (T. Laurencin, Khan, & Veronick, 2014).

3.- La Osteoconducción se presenta por el crecimiento interno de capilares y osteoprogenitores celulares desde el interior y alrededor del injerto (Abjornson, Yoon, & M. Lane, 2014).

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo, con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares (Keith L. Moore M. G., 2016). Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembranales o integrinas, que actúan de enlace entre las células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citosinas. En estas células la conexión intercelular es la Conexina.

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día (Spyropoulou & K. Basdra, 2013). Actualmente, se sabe que: 1.- sintetizan las proteínas colagénicas y no colagénicas de la matriz orgánica del hueso, 2.- dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, 3.- contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina, 4.- median en la resorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citocinas específicas y 5.- sintetizan factores de crecimiento (Ajaykumar Vishwakarma, 2017).

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos (15%). Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración. Las células limitantes son células elongadas y planas con un núcleo en forma de huso sin organelos. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina y fosfatasa alcalina así como el receptor de hormona

paratiroidea (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo (Ajaykumar Vishwakarma, 2017).

2.2.2. Control génico en osteoblastogénesis

Actualmente se sabe que la diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: Ihh (Indian hedgehog) y Shh (Sonic hedgehog). El factor de transcripción Cbfa1 (core-binding factor α -1, también llamado Runx2) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), las cuales se consideran como los reguladores más importantes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales pluripotenciales (Atricia Arreba-Tutusa, 2014).

La diferenciación de células progenitoras a células osteoblásticas *in vitro*, ha sido inducida por la presencia de suplementos de medio osteogénico (Dexametasona, ácido ascórbico, vitamina D3, β -glicofosfato, etc). La función de maduración de los osteoblastos está directamente relacionada con la expresión de dos factores de transcripción claves de la osteogénesis: Runx2 y Osterix (Witkowska-Zimny, 2012).

Runx2 : El control de la transcripción de la proliferación, crecimiento y diferenciación de células troncales mesenquimales a células maduras de hueso, es principalmente regulada por Runx2, también conocido como CBFA1, AML3 o OSF2. Muchos estudios *in vitro* mostraron que este gen se encarga de regular de manera positiva la producción de proteínas de la matriz extracelular, como también de la colágena tipo I, osteopontina, sialoproteínas del hueso y osteocalcina. El gene Runx2 frecuentemente es descrito como el gen maestro de la regulación de la osteogénesis (Spyropoulou & K. Basdra, 2013). La falta de expresión de este gene en el homocigoto provoca diversos padecimientos, como algunos tipos de displacia ósea, que consisten en un desorden en la estructura ósea. El Runx2 también se encuentra relacionado con el proceso de maduración de células de cartílago, aunque en el proceso de la dentinogénesis, la Runx2 se llega a inhibir al

terminar el proceso de odontoblasto. El papel que juega este gene, también recaen en tejido cerebral, espermias y células T. La familia de los Runt (Runx1 y Runx3), a la cual pertenece este gen, también participan en el proceso de la osteogénesis (Atricia Arreba-Tutusaus, 2014).

Osterix (SP7, OSX): Es otro factor de regulación importante en la osteogénesis, esencialmente en la diferenciación de células progenitoras a osteoblastos y en la formación de hueso. Esta proteína pertenece a la familia de factores de transcripción Sp/XKLF. Es un regulador que se encuentra presente en el ADN, consiste de dedos de Cys2His2 Zinc. La proteína OSX esta compuesta de 431 aminoácidos, este gen esta regulado por Runx2 y cuando éste se inhibe, la expresión de Osterix no ocurre. Osterix se requiere para el proceso de la diferenciación osteoblástica. Se encarga de regular algunas proteínas, incluyendo NFAT (factor nuclear de la actividad de células T) y factores como el TF-IIB, o Brg1 factores de remodelación cromática. Entre otras funciones, participa en la regulación de las actividades de la fosforilación y la glicolisación (Atricia Arreba-Tutusaus, 2014).

Proteínas Hedgehog: La familia de proteínas Hedgehog (Hh) está compuesta de Sonic (Shh), Indian (Ihh), Desert (Dhh); se encargan del control de varios aspectos del desarrollo: el crecimiento, supervivencia y diferenciación celular. La expresión de Dhh está restringida por las gónadas. La expresión específica de la Ihh delimita el crecimiento de una gran cantidad de tejidos como el endodermo. Shh se relaciona con la expresión de moléculas de señalización. Durante el proceso de esqueletogénesis, esta familia de factores, provee información para iniciar y mantener la diferenciación celular para la formación de huesos y cartílagos. El mal funcionamiento de las proteínas Hh puede causar deformaciones esqueléticas (Atricia Arreba-Tutusaus, 2014).

Existen más proteínas involucradas en la regulación genética de la osteogénesis, la cual se presenta en la siguiente Tabla 2.

Tabla 7. Los factores moleculares más importantes en la osteogénesis. Existen diversos factores involucrados en diversas etapas de la diferenciación y formación de tejido óseo.

Factores	Nombre genérico	Acción biológica
TGF- β	Factor de crecimiento	Estimula/inhibe la reparación ósea
IGF	Factor de crecimiento	Incrementa la densidad ósea
FGF	Factor de crecimiento	Actúa en fase finales de linaje osteogénico
PDGF	Factor de crecimiento	Incrementa la osteoinducción de MOD
BMP-2	BMP-2a	Morfogénesis de hueso y cartílago
BMP-3	Osteogenina	Osteogénesis
BMP-3B	GDF-10	Huesos craneofaciales
BMP-4	BMP-2B	Morfogénesis de huesos y cartílago
BMP-5	-	Morfogénesis de hueso
BMP-6	-	Hipertrofia de cartílago
BMP-7	Prot. Osteogénesis (OP1)	Diferenciación ósea
BMP-9	GDF-2	Osteogénesis
BMP-12	GDF-7	Condrogénesis
BMP-13	GDF-6	Condrogénesis
BMP-14	GDF-5	Condrogénesis y osteogénesis

Marcadores de diferenciación: A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. La expresión de Cbfa1 es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica, cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos (Figura 5). La colágena I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que participa en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas (Spyropoulou & K. Basdra, 2013). La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto a osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica (Wanda Lattanzi, 2012).

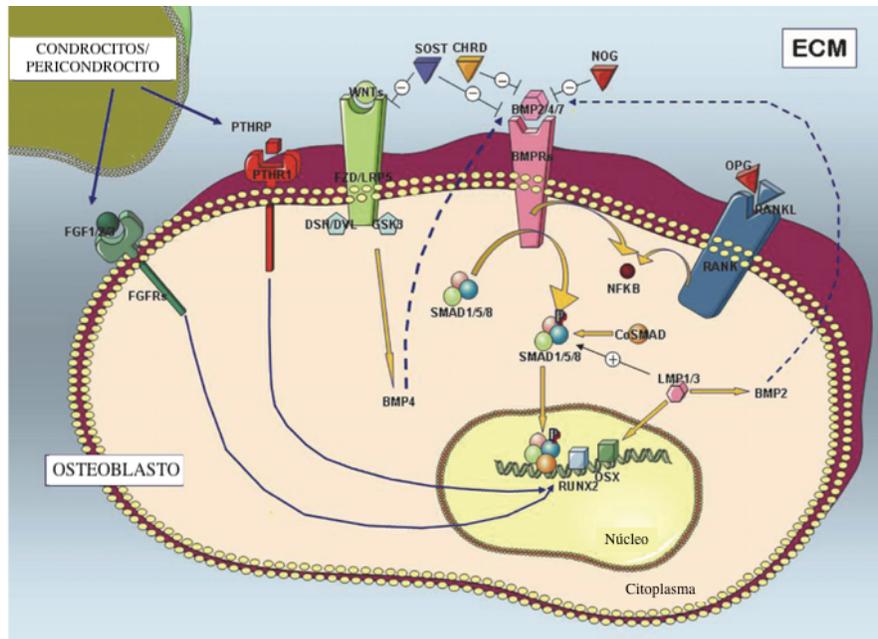


Figura 5. Interacciones osteogénicas. La interacción de los factores involucrados en la diferenciación, involucran cambio genéticos, existen diversas vías para la activación de rutas osteogénicas, sin embargo, la activación del Runx2 es un paso en común y esencial para este proceso (Wanda Lattanzi, 2012).

2.2.3. Factores osteogénicos.

Los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), están involucrados en el reclutamiento, supervivencia y actividad de las células endoteliales, osteoblastos y osteoclastos en la curación de heridas (Fisher, 2015) (Y., S., & C., 2015)

La curación de heridas finas requieren de apoyo de hueso sano y es caracterizado por cuatro fases:

1. Coagulación (inmediatamente hasta la primera hora)
2. Inflamatorio (1h- día 4)
3. Proliferación (día 3- día 21)
4. Remodelación(A partir del día 21)

La coagulación se caracteriza por el daño en el endotelio y la activación de plaquetas en fibras coaguladas. Las plaquetas liberan factor angiogénico (VEGF) y citocinas

incluyendo las PDGF y TGF- β . La VEGF influye en la diferenciación a osteoblasto y está involucrado en la mineralización del callo de la fractura, también es un requisito para la función de otros factores como es el caso de los inductores BMP-2 o FGF-2 de la angiogénesis. La inhibición de VEGF ha mostrado el bloqueo de BMP-7 inductor de la diferenciación a osteoblasto y BMP-4 inductor de la formación del hueso (Fisher, 2015).

2.2.4.- Desarrollo del tejido óseo en el desarrollo embrionario.

La aparición de células precursoras óseas se da hasta la cuarta semana de gestación con la aparición de las células del esclerotomos, las cuales darán origen al tejido óseo y cartilaginoso. Las células forman un tejido con espacios intracelulares, llamado mesénquima que es tejido conectivo embrionario. Y tiene la capacidad de formar hueso. El primer hueso aparece debido a la condensación de la mesénquima (Figura 6). La condensación inicia la actividad de genes selectivos, los cuales preceden a la diferenciación celular (Keith L. Moore T. P., 2016).

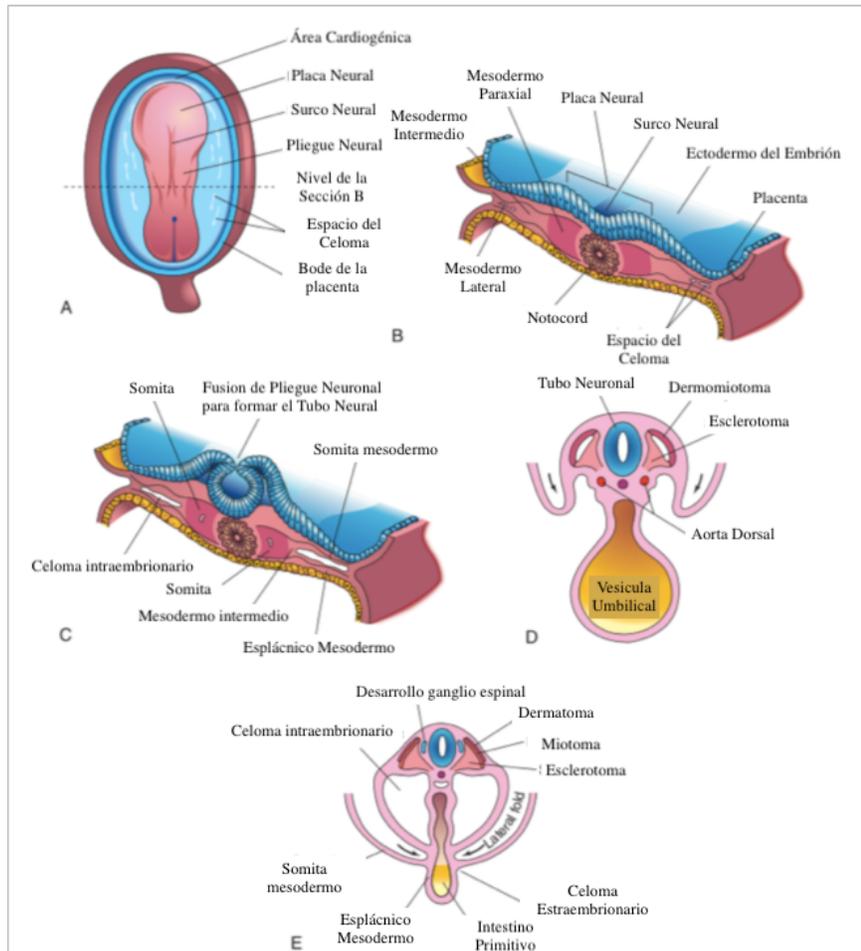


Figura 6. Formación y diferenciación temprana de la somita. A) vista dorsal del embrión a los 18 días, B) sección transversal, C) sección transversal en el 22 días, d) sección transversal en el día 24 aparición del esclerotomo, E) sección transversal en el día 26 (Keith L. Moore T. P., 2016).

La mayoría de los huesos se forman a partir de una membrana delgada, este tipo de osteogénesis se denomina osificación intermembranosa. La mayoría de los huesos apendiculares se desarrollan por el proceso de osificación osteocondral.

Las proteínas codificadoras de las HOX son genes proteicos morfogenéticos de hueso (BMP5 y BMP7), factores de crecimiento GDF5, la familia de TGF- β y otras moléculas reguladoras de la endogénesis de los condrocitos y desarrolladoras del esqueleto. Las células precursoras de los condrocitos y osteoblastos son determinados por el nivel de β -catenina. Y la vía canónica de Wnt canonical, señala y juega un papel crítico en la formación de cartílago (Figura 7) y hueso (Keith L. Moore T. P., 2016).

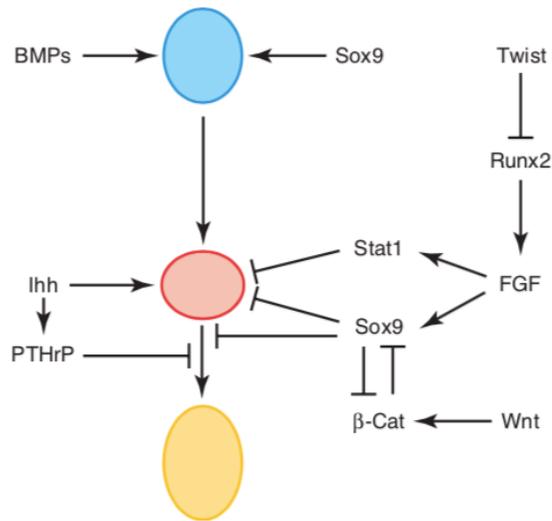


Figura 7. Esquema de la secreción de moléculas responsables de la proliferación y diferenciación de condrocitos. En la parte superior se aprecian de color azul las células de mesenquimales que proliferan. La de color rojo es un condrocito y la amarilla es un condrocito hipertrófico (Keith L. Moore T. P., 2016).

2.2.4.1. Osificación intranmembranosa

Este tipo de osificación, ocurre en la mesénquima, la cual se conforma de membranas en forma de vaina y produce tejido osificado sin la necesidad de formación de cartílago previo. La formación del hueso se debe a la condensación del mesénquima y al inicio de la vascularización. La condensación causa la aparición de células precursoras de los osteoblastos que inician la mineralización de la matriz formando el osteoide. La señal Wnt es un factor clave en la diferenciación osteogénica y está presente en las células precursoras. El Fosfato de calcio es un compuesto importante en los depósitos de osteoide como organizador del hueso. Los osteoblastos aparecen durante la formación de matriz extracelular y cuando los osteoblastos son atrapados por la matriz se diferencian a osteocitos (Y., S., & C., 2015).

2.2.4.2. Osificación Endocondral

Es la formación de hueso a partir de un modelo cartilaginosa preexistente. En esta osificación, los condrocitos (células cartilaginosas) aumentan de tamaño (hipertrofia), la matriz se calcifica y las células mueren. Al mismo tiempo los osteoblastos comienzan a

penetrar en el cartílago muerto. e deposita una capa delgada de hueso debajo del pericondrio que rodea la diáfisis, y el pericondrio se convierte en el periostio. La invasión por el tejido conectivo vascular de los vasos sanguíneos que rodean el periostio también rompe el cartílago. Los osteoblastos alcanzan el hueso en desarrollo desde estos vasos sanguíneos. Algunas células invasoras se diferencian en células hemopoyéticas (células sanguíneas de la médula ósea). Este proceso continúa hacia las epífisis (extremos de los huesos) (Keith L. Moore T. P., 2016). El proceso de muestra en la Figura 8.

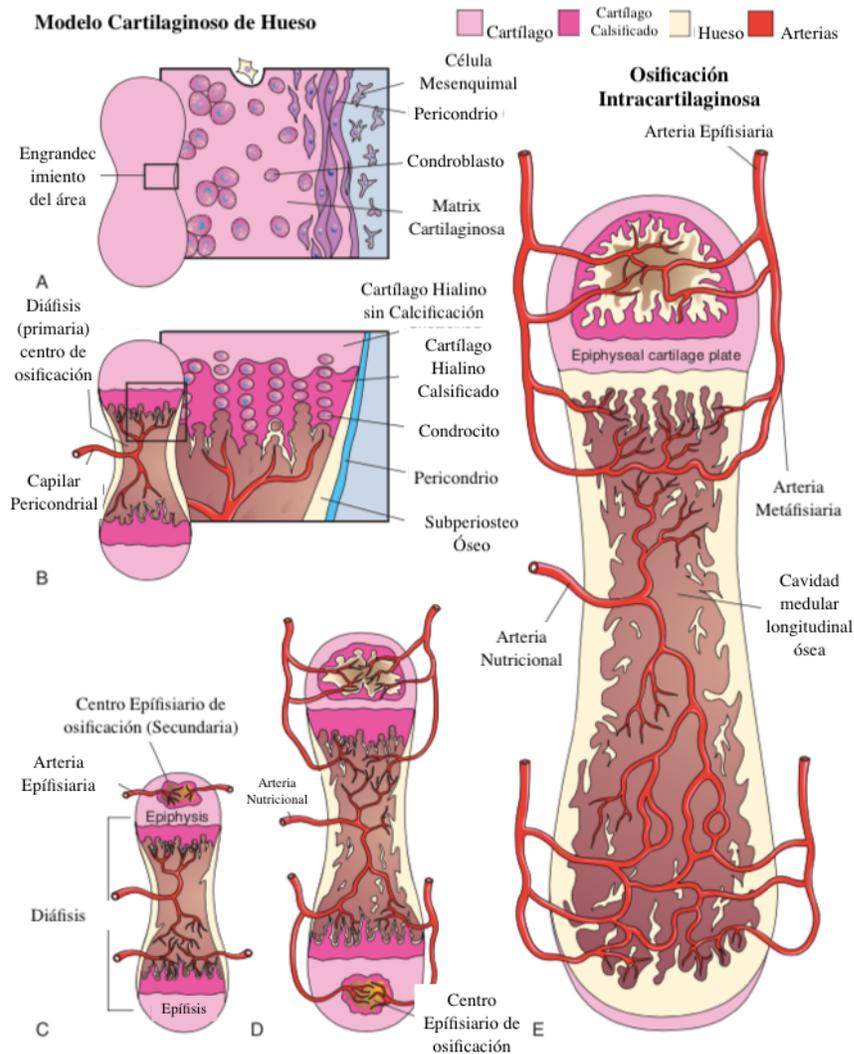


Figura 8. Esquema de la osificación endocondrial. Durante este proceso las etapas de osificación están regidas por la liberación de factores moleculares de diferenciación suministrados por el sistema vascular en los centros de osificación (Keith L. Moore T. P., 2016).

2.3. Inducción eléctrica de la diferenciación osteoblástica

2.3.1. Entorno eléctrico celular

Existen tres aspectos intrínsecos del entorno que guían el funcionamiento y destino de la célula. El entorno bioquímico, incluyendo los ligandos, señales moleculares, síntesis de proteínas, entre otros. El entorno físico-químico, que comprende los gradientes que depende de factores como propiedades de la superficie, tensión de oxígeno, pH y la temperatura. Y para finalizar, el tercer aspecto es el entorno mecánico-estructural, este puede estar en 2 o 3 dimensiones como son las fuerzas mecánicas y estrés entre otros, todos estos factores actúan de forma no lineal pero equitativamente y de manera constante (Ajaykumar Vishwakarma, 2017).

Las células en vivo son estimuladas por todos estos factores al mismo tiempo en un entorno microscópico que se presenta en forma de matriz extracelular, compartiendo ambiente con otras células con señales endocrinas y exocrinas, flujo de sangre, movimientos corporales, fuerza y nutrientes en difusión. Además, las células se auto remodelan y modulan su propio entorno, aspectos que frecuentemente son ignorados en experimentos *in vitro*, como son mayormente los estímulos mecánico-estructurales, su metabolitos o señales moleculares y gradientes eléctricos, térmicos o químicos. En la Figura 9 se presentan los principales factores de cada aspecto sobre el entorno celular (nicho celular) (Paolo Di Nardo, 2011).

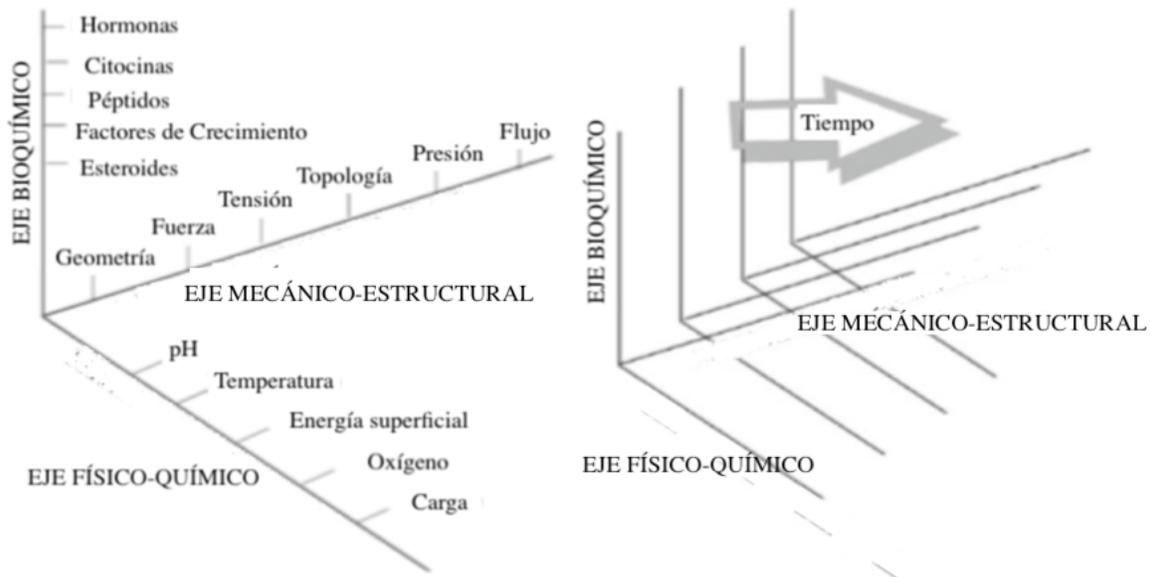


Figura 9. Los principales factores involucrados en la diferenciación celular. En este esquema se encuentran los principales factores de cada uno de los tres aspectos importante del nicho celular (Paolo Di Nardo, 2011).

2.3.2. Factores fisico-químicos del macroentorno

Los estímulos a los cuales está expuesta la célula, influyen en su comportamiento. Muchos de estos factores son externos, mientras hay otros que pueden ser internos, pero de alguna manera son modulados por factores externos. Por ejemplo, la concentración de oxígeno depende en primer lugar de la presión parcial atmosférica e internamente de la distancia entre las células y la fuente de oxígeno (capilares) (Paolo Di Nardo, 2011).

Los factores físico-químicos típicos influyen en el microentorno en una concentración, campo o gradiente. Estos incluyendo los gradientes químicos, los gradientes de temperatura, y la variación en el tiempo de los campos eléctricos y magnéticos.

Un ejemplo sería el reporte de Lennon, él cual empleo células CTMs de rata y las expuso a 5% de oxígeno adicional en el proceso de osteogénesis y al compáralo con células que tenían un 20% de oxígeno adicional, y mostró que existe la probabilidad de incrementar la proliferación al cambiar factores químicos.

En el campo de la electricidad, magnetismo y ultrasonido se han popularizado para su uso en terapias, particularmente en hueso, cartílago y músculo dañado, porque cada uno de estos mecanismos ayuda a la curación y regeneración, sin embargo, no se sabe claramente como funcionan.

Existen diversos estudios realizados donde se han mostrado que los campos electromagnéticos pueden modificar el comportamiento celular, entre algunos estudios se encuentran los siguientes:

- La década de 1990 se demostró que un solo estallido de estimulación electromagnética (5 V/cm) de las ESC condujo a la diferenciación hacia un fenotipo de cardiomiocito. Los mismos autores muestran que el tratamiento de los cuerpos embrioides derivados de ESC con intensidades de campo que van de 2.5 a 7.5 V/cm, afectan al embrión de manera dependiente de la dosis del campo (Paolo Di Nardo, 2011).
- Los modelos de miocitos y cardiomiocitos son probablemente los más conocidos, ya que la estimulación eléctrica (1 Hz, 5 V/cm, pulsos de 2 ms) induce el acoplamiento de la contracción y la organización estructural de los cardiomiocitos y las células del músculo liso (Paolo Di Nardo, 2011).
- Los pulsos magnéticos débiles con mayor frecuencia (30-120 Hz, 1.25 mT) se han utilizado para diferenciar las células preosteoblásticas. Se ha demostrado que los campos solo afectaban a las células indiferenciadas y a los osteoblastos no diferenciados, indicando que las células indiferenciadas eran más sensible al efecto del campo (Paolo Di Nardo, 2011).
- Las células progenitoras endoteliales y las células precursoras musculares, también se han estimulado por campos electromagnéticos para promover la diferenciación de los miocitos. En este sentido, la estimulación eléctrica (10 - 40 V, 5 ms, impulsos de 0,5 Hz) de fibroblastos embrionarios humanos demostró promover la disminución de la proliferación celular y el número de células, así

como la diferenciación de fibroblastos en estructuras multinucleadas tipo microtúbulos (Paolo Di Nardo, 2011).

2.3.3. Actividades eléctricas en las células

La actividad eléctrica en las células se aprecia en la membrana celular, que es una estructura bicapa, semipermeable y selectiva, encargada de regular el flujo de sustancias que entran y salen de la célula, a través de unas estructuras llamados canales, los cuales, logran regular el flujo de desechos, alimentos y iones (Figura 10) (Bruce Alberts, 2008)

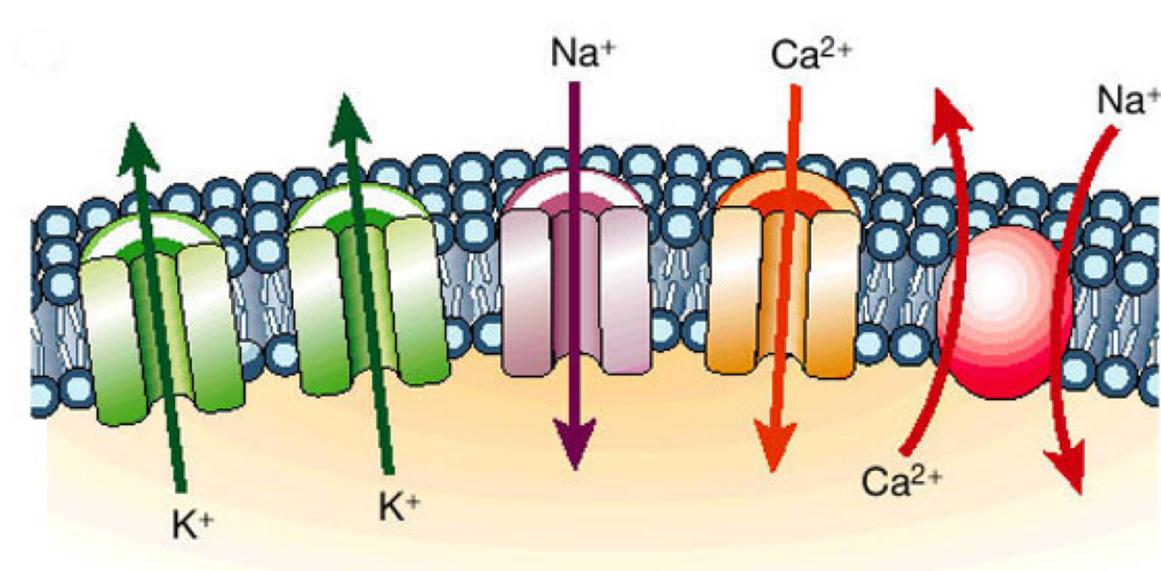


Figura 10. Flujo de iones en la membrana celular. El flujo de iones a través de la membrana celular se lleva a cabo a través de canales o bombas, como es el caso de los canales de sodio y calcio, y las bombas de Na⁺/K⁺ (Bruce Alberts, 2008).

Un aspecto importante es que los sistemas vivos desarrollan su energía eléctrica desde la diferencia de concentración que existe entre la membrana celular al producir un potencial de acción de una forma electroquímica (Lodish, Berk, & Chris, 2016), propiciado por la diferencia de concentración de sales y biomoléculas que existen entre el espacio

extracelular e intercelular. Este potencial de acción participa en diversos procesos celulares, como transporte de nutrientes conducción de señales eléctricas en células excitables y en el caso de la mitocondrias, cloroplastos y algunas bacterias para la producción de Adenosina trifosfato (ATP) (Plonsey & Barr, 2000). Las señales eléctricas son vitales para la transmisión de información nerviosa, la iniciación de la contracción muscular, es esencial para la visión, el oído, los latidos, la digestión y otros procesos biológicos. En tejidos vivos, las cargas acarreadas son iones en un medio acuoso (soluciones de ácidas, básicas y salinas, pueden conducir la electricidad). Tales iones están presentes en ambos sitios, afuera y adentro de la célula. Especialmente los iones de sodio y potasio, permiten corrientes de flujo entre el volumen intracelular y extracelular(Tabla 3) (Plonsey & Barr, 2000).

Tabla 8. Principales iones presentes en un medio celular con sus respectivas concentraciones (Plonsey & Barr, 2000).

Compuestos orgánicos iones	Concentración Intracelular (mM)	Concentración Extracelular (mM)
Cationes		
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Mg ⁺²	0.5	1-2
Ca ⁺²	10 ⁻⁴	1-2
H ⁺	7x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁵
Aniones		
Cl ⁻	5-15	110

2.3.4. Células excitables e inexcitables

Desde tiempos antiguos el ser humano siempre ha estado interesado en el funcionamiento de los sistemas biológicos, pero no fue hasta en 1991 cuando el análisis del comportamiento celular incluía conceptos físicos para explicar los potenciales de acción, este descubrimiento fue realizado por Erwin Neher y Bert Sakmann a quienes se les otorgó el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por la explicación acerca de las función de los canales iónicos en las células individuales. (Wang, Wu, & Hsia, 2016)

Las células presentan una membrana plasmática que separa el medio intracelular y extracelular, delimitando a la célula para permitir la regulación de moléculas, por lo cual, la célula requiere de un conjunto de interacciones entre ambos medios, la mayoría de éstos, son necesarios para la obtención de nutrientes y para eliminar los desechos.

Las células pueden dividirse desde el punto de vista eléctrico, como excitables y no excitables. Las células excitables presentan una diferencia de potencial a través de la membrana celular que se conoce con el nombre de potencial de membrana (V_m). Al potencial de membrana que exhiben las células excitables cuando no generan actividad eléctrica se llama potencial de reposo (V_r).

El potencial de reposo y el potencial de acción son producto de la apertura de diferentes canales iónicos localizados en la membrana celular.

Existe una diversidad de tejidos excitables cuyas células son capaces de generar potenciales de acción como es el tejido nervioso, el tejido muscular liso, cardíaco y esquelético. El sistema glandular también cuenta con células capaces de general potencial de acción como es el caso de las células beta pancreáticas que liberan insulina. Cada una de estas estirpes celulares. presentan potenciales de acción diferentes y características propias. Las actividades eléctricas en las células inducen y regulan la respuesta contráctil, mientras que en las células glandulares promueve la liberación de hormonas.

Las células no excitables no presentan actividades eléctricas en forma de potencial de acción; sin embargo, presentan un potencial de reposo. En algunos tipos de células no excitables se encontraron canales iónicos semejantes a los observados en las células excitables, lo cual demuestra que las cargas eléctricas presentan un papel fisiológico importante. En ese caso, se ha demostrado que los canales iónicos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune, iniciando y modulando la actividad linfocitaria. (Paolo Di Nardo, 2011)

2.3.5. Difusión y coeficientes de difusión a través de la membrana celular

La membrana celular es considerada como una estructura compleja de alta capacitancia y baja conductancia (Figura 11). Está principalmente compuesta de fosfolípidos de una bicapa con el grosor de 7 nm.; la conductancia del fosfolípido de la bicapa es baja, y posee diversos tipos de canales; las moléculas de agua y iones pueden entrar y salir por medio de estos canales y la magnitud de la conductancia de la membrana es de 10^6 S/m. Desde esta perspectiva estructural de la membrana, la difusión de iones y moléculas en el entono celular juega un papel importante en presencia de campo eléctricos.

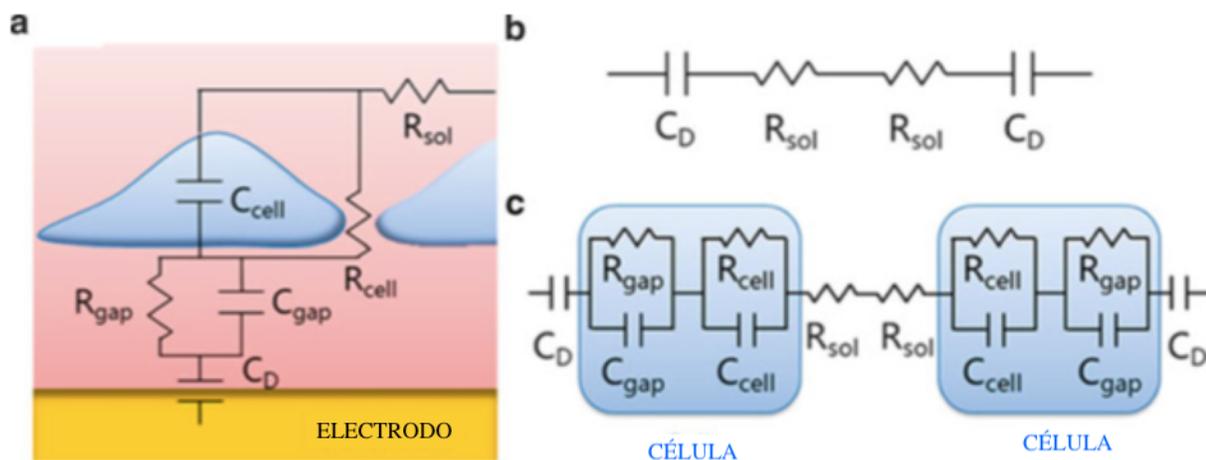


Figura 11. Modelo de ECIS. a) simplificación del modelo b) en donde R_{gap} y C_{gab} es la resistencia y capacitancia de distancia del electrodo a la célula respectivamente, C_d es la capacitancia de electrodos con el citosol, R_{sol} es la resistencia de citosol.

Las moléculas y los iones que participan en las actividades eléctricas de la célula, se encuentran regidas por el proceso de la difusión y su origen de energía térmica. No se requiere un campo eléctrico para que se produzca difusión, ya que la difusión no es un fenómeno eléctrico. Más bien, la difusión surge como consecuencia del pronunciado movimiento aleatorio de las moléculas, el cual se produce a temperaturas ordinarias. Por lo cual la descripción de la difusión está regida por una ley sin parámetros eléctricos.

La ecuación 1 que describe la difusión es la ley de Fick.

$$J_d = -D\nabla C \quad (1)$$

Donde C es la concentración de las sustancias en función de la posición de las partículas de la sustancia, D es una constante de proporción, también llamada constante de Fick. J_d es el número de partícula, que en este caso se refiere a los iones que se mueven en una cierta concentración por unidad de tiempo al cruzar una sección (Iguchi & J. Ilegbusi, 2014).

2.3.6. Activación eléctrica en la osteogénesis

Desde un par de años se han realizado diversas investigaciones sobre los efectos que desencadenan los estímulos eléctricos durante el proceso de regeneración en diversos tejidos, la mayoría están enfocados en tejido cardíaco, nervioso, muscular y óseo.

Los estímulo eléctrico se pueden clasificar por la forma en que estos interactúan con las células, existen tres tipos de estimulaciones: estimulación de corriente, estimulación de campo magnético y estimulación de campo eléctrico. La estimulación de corriente eléctrica se basa en la interacción directa del paso de electrones a través de un medio

de cultivo, la estimulación de campo magnético se basa en la aplicación de campos magnéticos sin contacto directo, en este tipo de experimentos, se emplean inductores senoidales o toroidales. La estimulación de campo eléctrico se realiza cuando al cultivo se encuentra entre dos placas con un voltaje determinado, donde el medio de cultivo tomará la función de medio dieléctrico, en este caso se puede emplear de forma directa o indirecta.

Un trabajo realizado por Marie Hronik Tupaj en el 2010 en la Universidad de Tufts en Medford, Estados Unidos, sobre la diferenciación osteoblástica y la respuesta al estrés de CTM que fueron expuesta a campo eléctrico alterno de 20 mV/cm con una frecuencia de 60 KHz y una duración de 40 minutos de forma diaria hasta el día 28 (Figura 12), han mostrados que la células incrementan la diferenciación osteogénica, esto debido al aumento de estrés.

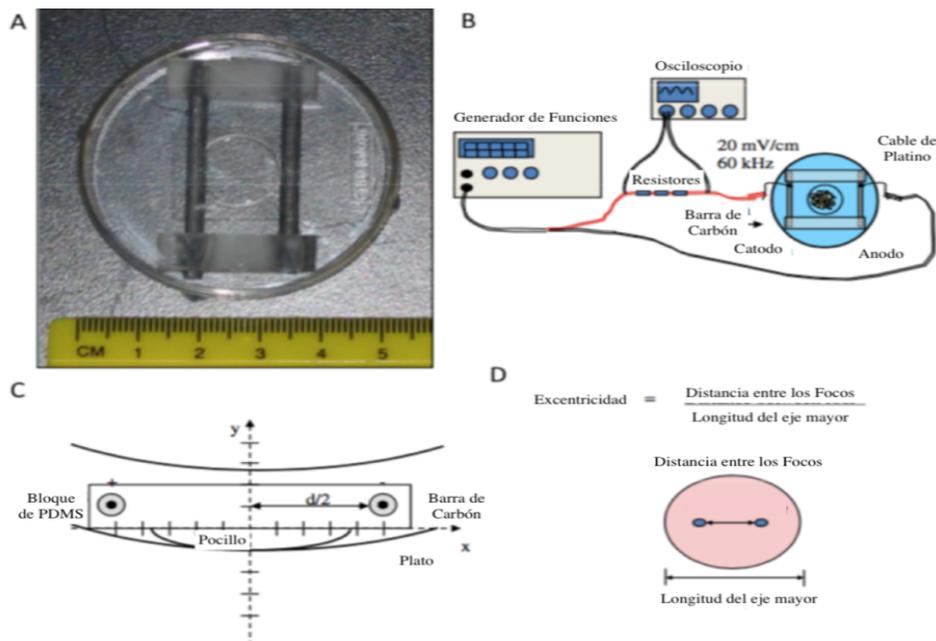


Figura 12. Modelo experimental de la aplicación de campo eléctrico a cultivos celulares. En la imagen se muestra el diseño del sistema de estimulación de campo eléctrico para el cultivo celular. A) se presenta el recipiente donde se realizó el estudio y en el podemos encontrar las varillas que permitieron crear el campo eléctrico. B) Sistema de estimulación. C) esquema del posición de las varillas respecto al cultivo, D) ubicación de los focos de los cultivo.

Al concluir su experimento, formularon una nueva idea acerca del mecanismo involucrado en la estimulación con base a sus resultados (Figura 13).

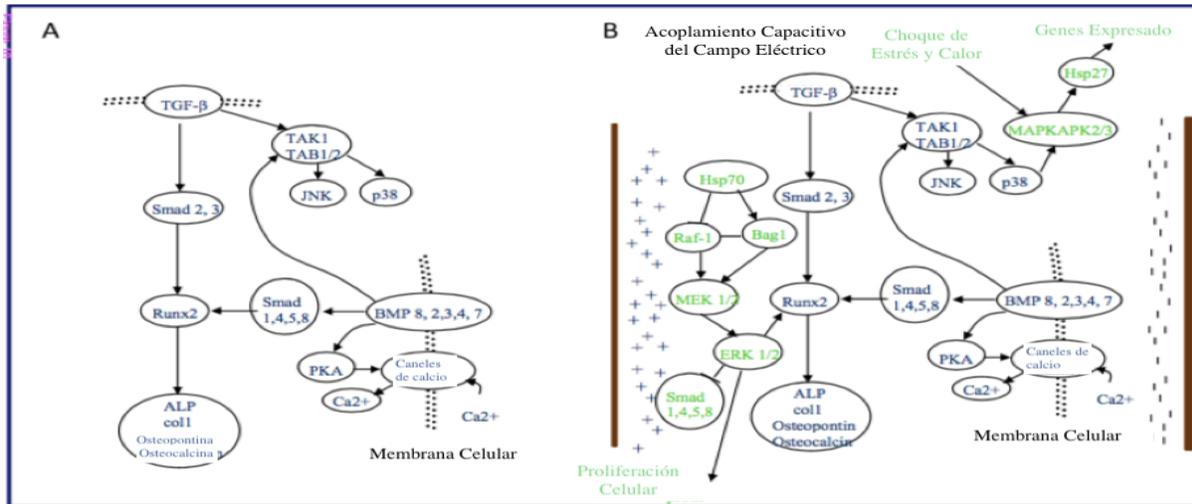


Figura 13. Esquema de los efectos biológicos por la presencia de campo eléctrico. En la figura se muestra una nueva idea acerca de cómo afecta la electroestimulación al mecanismo de la osteogénesis. A) proceso estándar de la osteogénesis. B) Proceso de la osteogénesis afectado por el campo eléctrico, en el cual podemos decir que el cultivo trabaja como un capacitor que almacena carga a través de las varillas del sistema de estimulación lo que provoca un una mayor proliferación, expresión de otros genes debido al choque de estrés, consecuencia del cambio de temperatura.

También se ha realizado un estudio acerca del efecto sinérgico de la electroestimulación exógena y endógena en la diferenciación osteogénica de CTM humanas sembradas en andamios de seda realizado por Anil s. Cakmak, Sonner Cakmak, entre otros. El objetivo del estudio fue investigar el potencial de diferenciación osteogénica de (CTM) cultivadas en andamios de seda en respuesta a diferentes modos de electroestimulación, lo estímulos fueron de 60 KHz, con valor de 100 a 500 mV/cm y en presencia de compuestos moduladores de electrofisiología (monensina y glibenclamida, que son efectivos en canales de voltaje regulados en la membrana celular) en este estudio los investigadores concluyeron que “Los campos eléctricos y los agentes farmacológicos dirigidos a los canales iónicos se pueden usar como alternativas a la estimulación mecánica y factores de crecimiento en los resultados de regulación de células y tejidos.”

Al comparar estos estudios podemos notar que en ambos, la corriente eléctrica influye en cultivo al cambiar el comportamiento interno del medio, y este repercute en un aumento de la proliferación y a su vez realiza cambios químicos debido a la energía y a la electroforesis, al existir reacciones químicas las características de físicas del medio también cambian. Estos cambios también se notaron en un experimento realizado por Juan li Yan, Jian Zhou, *et al.* En este estudio en el cual se aplicaron campos magnéticos alternos de 0.6 a 3.6 mT con una frecuencia 50 Hz, a las células osteoblásticas, diariamente durante un lapso de 90 min durante 3 días, en condiciones normales de proliferación. Según los resultado los cultivos expuesto con campos magnéticos obtuvieron mayor proliferación y calcificación, sobre todo en los valores de 0.6 mT ,1.8 mT y 3.6 mT. En otro estudio parecido realizado por jian Zhou, Lei-Guo Ming, Zhe wei y *et al* emplearon valores parecidos, con la diferencia en la duración del estímulo y duración del experimento. Emplearon duraciones de 30 min diarios durante 15 días en condiciones normales de proliferación. Obtuvieron mayor proliferación y calcificación en los valores de 1.8 mT y 3.6 mT. También se mostró la presencia de mayor cantidad de células que expresaban Bmp-2.

Los procesos que son afectado por el EMF (campo electromagnético) incluye la migración celular, proliferación, expresión de factores de crecimiento, señales de óxido nítrico y más. Los efectos que se han demostrado son empleados en rango de 30 a 300 KHz y de baja frecuencia de 3 a 30 Hz.

A continuación se muestra un resumen de (Fisher, 2015) las pruebas realizadas con campos electromagnético en cultivo celular y los efectos a los que se le relacionó (Figura 14) .

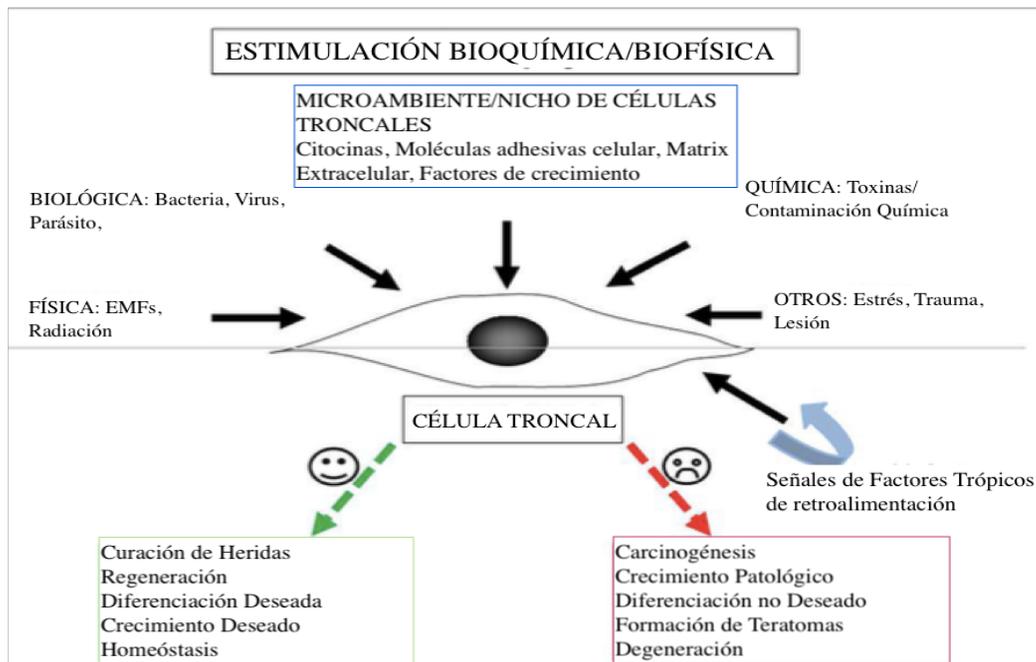


Figura 14. Microentorno de las células troncales. El resultado total de los factores físicos, químicos y biológicos pueden contribuir en el desarrollo de la regeneración o en enfermedades degenerativas (How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts, 2016, Aleksandra Maziarz).

En la Tabla 4 se muestran otros experimentos realizados con campos magnéticos.

Tabla 9. Experimentos realizados con campo magnéticos expuestos a células en proceso osteogénico. Los experimentos muestran que el tipo de campo y tiempo de estimulación pueden afectar de forma directa la presencia de matriz extracelular y expresión de genes.

Tipos de células troncales	Características del campo electromagnético	Duración de la exposición	Tipo de diferenciación	Efectos de estimulación	Referencias
Estimulación Senoidal					
BM-CTMs (origen fetal)	Densidad del flujo magnético= 20 mT Frecuencia= 50 Hz	12 por día, durante 23 días	Osteogénesis	1.- Decremento del metabolismo y el crecimiento del CTM. 2.- No afecta a la diferenciación	Yan et al. 2010 [38]
ASCs	Densidad del flujo magnético= 1mT Frecuencia= 30/44 Hz (Efectos positivos) 7.5 Hz (Efectos negativos)	8h por día	Osteogénesis	1.-Alteración en la expresión a nivel ALP 2.- Alteración en niveles de diferenciación osteogénica. 3.- alteración el la expresión de marcadores osteogénicos 4.- Aumento de la mineralización de matriz extracelulares.	Kang et al. 2013 [6]
Estimulación cuadrática (Pulsaciones)					
BM-CTMs	Densidad del flujo magnético= 1.1 mT Frecuencia= 30/44 Hz (Efectos positivos) 7.5 Hz (Efectos negativos)	30 minutos al día por 21 días	Osteogénesis	1.-Alteraciones en los genes morfológicos. 2.- incremento de la expresión ALP y incremento de los marcadores de actividad osteogénica. 3.- Estimulación de diferenciación osteogénica. 4.- Mejora de la mineralización de la matriz extracelular.	Lou et al. 2012[7]
BM-CTMs	Densidad de flujo magnético: 1.8 - 3 mT	8 horas por 14 días	Osteogénesis	1.- Aceleración de la proliferación celular 2.- Alteración en el ciclo celular. 3.- Incremento del nivel de expresión del ALP. 4.- Mejoramiento de la diferenciación osteoblástica.	
BM-CTMs	Tiempo de pulsación de 300 μ s, Frecuencia = 7.5 Hz Densidad del flujo magnético= 0.13 mT	2 hora al día por 14 días	Osteogénesis	1.- Dependencia del tiempo a la alteración en la tasa de proliferación. 2.- Estimulación de la expresión de la actividad del ALP al séptimo día. 3.-Mejoramiento de la expresión de genes osteogénesis (Runx2/Cbfa1 y ALP) durante la diferenciación osteoblastica	Tsa et al. 2009
BM-CTMs	Tiempo de pulsación = 1 μ s Tiempos de relajación = 5 ms Densidad de flujo magnético = 0.1 mT Frecuencia =15 Hz	Exposición continúa.	Osteogénesis	1.- Incremento de la mineralización de la matriz. 2.- Actividad del ALP sin alteración. 3.- Aumento de los reguladores de los marcadores genéticos de la osteogénesis (BMP-2, OC, OPG, IBSP, MMP-1, MMP-3. 4.- Estimulación de la osteogénesis.	Jansen et al. 2010 [41]
BM-CTMs	Tiempo de pulsaciones = 1 μ s Tiempos de relajación = 5 ms Densidad de flujo magnético = 0.1 mT Frecuencia 15 Hz	Exposición continúa.	Osteogénesis	1.- Incremento de la tasa de viabilidad 2.- No provoca efecto de osteoinducción	Kaivosoja et al. 2015 [47]
BM-CTMs	Numero de pulsaciones = 20 Tiempos de relajación = 4.5 ms Densidad de flujo magnético = 1.8 mT(incremento de 0 al 1.8 mT cada 200 μ s en paso y acenso de 0 mT en 25 μ s durante cada pulsación) Frecuencia 15 Hz	8 hora cada día durante el periodo de cultivo	Osteogénesis	1.- Mejora la tasa de proliferación. 2.- Incremento de la densidad de las células. 3.- Alteración del ciclo celular.	Sun et al. 2009 [21]
BM-CTMs	Numero de pulsaciones= 20 Tiempos de relajación= 4.5 ms Densidad de flujo magnético = 1.8 mT(incremento de 0 al 1.8 mT cada 200 μ s en paso y acenso de 0 mT en 25 μ s durante cada pulsación) Frecuencia 15 Hz	8 hora cada día durante el periodo de cultivo	Osteogénesis	1.- Incrementa la proliferación celular. 2.- Incrementa la expresión y actividad de la ALP. 3.- Dependiente del tiempo alterando los marcadores de la osteogénesis (BMP-2, Cbfa 1, COL I, OC) Mejoramiento de la mineralización de la matriz extracelular	Sun et al. 2010 [33]

BM-CTMs/ASCs	Numero de pulsaciones = 10 Tiempo de pulsaciones = 1.3ms Densidad de flujo magnético = 1.5 mT Frecuencia = 75 Hz	durante el tiempo de diferenciación (28 días)	Osteogénesis	1.- Incremento de la actividad de ALP. 2.- Incremento de la expresión Oc. 3.- Inducción ASC de la diferenciación osteogénica. 4.- Mejoramiento de la mineralización de la matriz extracelular.	Ongaro et al. 2014[49]
BM-CTMs	Tiempo de relajación = 4.5 ms Numero de pulsaciones = 20 Densidad de flujo magnético = 1.6 mT incremento de 0 al 1.8 mT cada 200 μ s en paso y acenso de 0 mT en 25 μ s durante cada pulsación) Frecuencia 15 Hz	8 horas al día por 24 días	Osteogénesis	1.- Incremento de la sinérgica de la actividad del ALP por arriba del la BMP-2 2.- Mejoramiento de la estimulación a efecto de la BMP-2 en OC.	Schwartz et al. 2008[40]
Pulsaciones EMF y simples pulsaciones EMF					
ASCs	PEMF> Tiempo de relajación = 67.1ms Numero de pulsaciones= 21 Tiempo de la pulsación = 5.61ms Densidad de Flujo magnético = 2mT Frecuencia = 15 Hz SPEMF Tiempo de explosión = 5 s Numero de pulsaciones = 30 Tiempo de pulsaciones = 5 ms Densidad de flujo magnético = 1 T	PEMF= 8 h/día SPEMF = 3 min/día	Osteogenico/condrogenico	No afecta en la viabilidad celular Incrementa la deposición de la matriz cartilaginosa con ambos estímulos. Mejora la expresión de genes de condrocitos (SOX-9, COL II y agregano) en ambos casos. Mejora la expresión de genes matriciales de hueso(OC, COL I) solo con la PEMF	

2.3.6. Efecto de los campos magnéticos en las células

Para entender los efectos de los campos magnéticos sobre la célula, se tienen que conocer los tipos de materiales que existen según su efecto sobre el campo magnético. Existen 3 clasificaciones: ferromagnético, paramagnético, diamagnéticos.

Los ferromagnéticos son aquellos materiales que al exponerse al campo permanecen magnetizadas por un tiempo prolongado, esta característica dependiendo del material, ejemplos de estos materiales son el neodimio, hierro, aleaciones que contenga níquel, cobalto o elementos de la familia de las tierras raras. En la naturaleza existen estructuras

que poseen magnetitas, éstas se presentan en especies que emplean los campos magnéticos para poder orientarse.

Los paramagnéticos son materiales que se magnetizan en presencia de campo magnético y tienden a decaer en cuestión de segundos. En la naturaleza, esta propiedad la exhiben estructuras proteicas o moléculas que posean metales en su estructura.

Los diamagnéticos son materiales que crean un campo magnético proporcional y de sentido opuesto en presencia de un campo magnético externo, por lo que estos materiales atenúan la intensidad del campo magnético. Esta clase de material se encuentra en muchos organismos, sin embargo, son diamagnéticos débiles.

En diversas investigaciones se han demostrado que los materiales con organización polimérica en forma de tubos presentan características diamagnéticas y se alinean con el campo magnético. En la figura 15 se muestran ejemplos de estructuras tubulares que se alinean en presencia de un campo magnético.

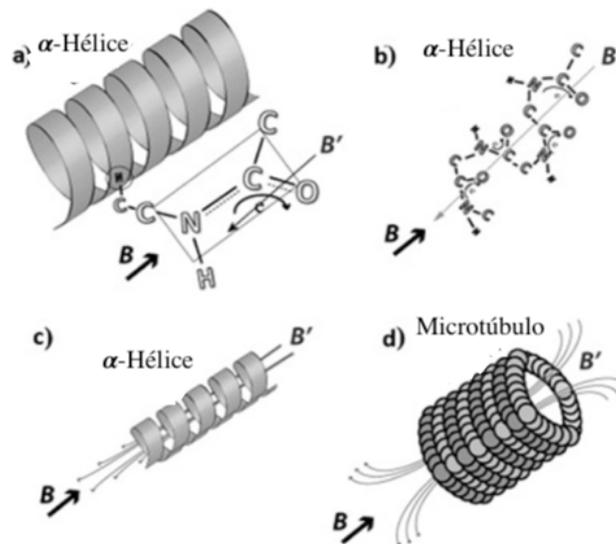


Figura 15. Estructuras biológicas con propiedades diamagnéticas. Cadenas proteicas que presentan estructuras α -hélice (a), (b) y (c). Los microtubulos del citoesqueleto también son afectados por el campo magnético (d).

De una forma general los campos magnéticos afectan diferentes componentes celulares como son las membranas, citoesqueleto, mitocondrias y al núcleo como se observa en la Figura 16 de Zablott *et al*, 2016.

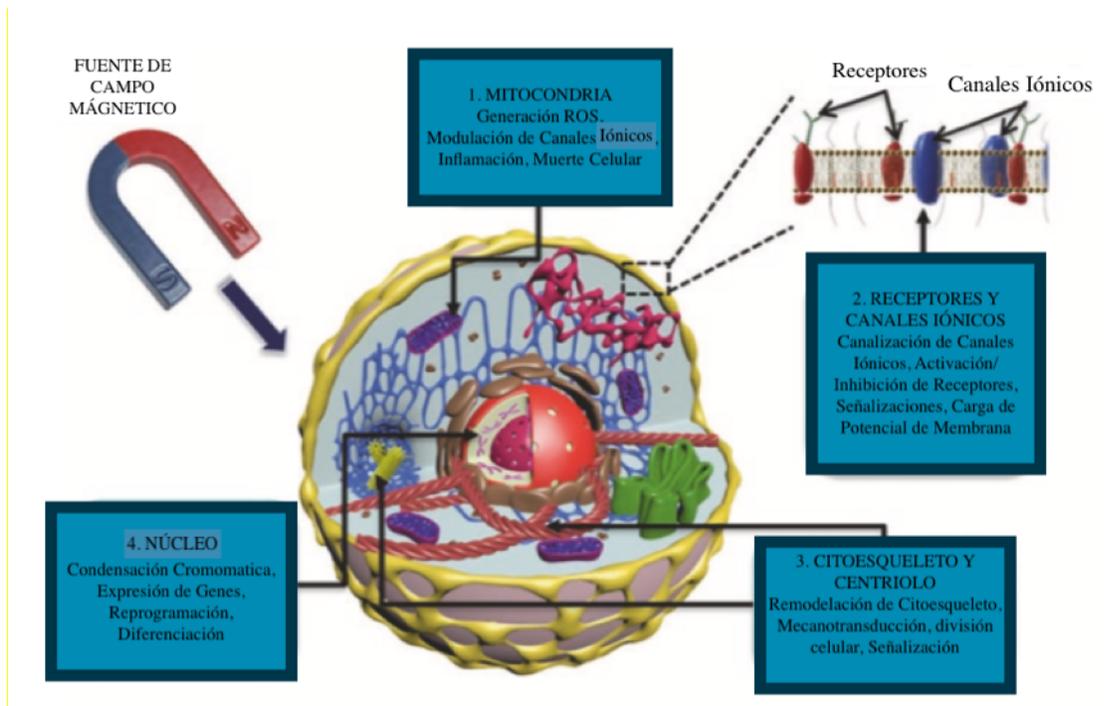


Figura 16. Esquema general de los efectos del campo magnético en la célula y sus posibles aplicaciones. Los campos magnéticos poseen diferentes efectos que al ser controlados poseen potenciales aplicaciones en el área médica como el tratamiento de tumores, modulación de la respuesta inmunológica, tratamiento a enfermedades neurodegenerativas, Ingeniería tisular, terapia con células troncales.

En cultivos celulares se han mostrado que las células se orientan a favor del campo magnético, se han realizado pruebas en eritrocitos. En el experimento emplearon campos de 1 T y 8 T. Las células se organizaron a diferentes grados dependiendo de la intensidad, la células estimuladas por 8 T poseían mayor cantidad de células orientadas a comparación con el control y las células estimuladas con 1 T. Estos tipos de pruebas se han realizado con diversas estirpes y el resultado es variable tanto en función de la intensidad como en duración del estímulo. Las células se orientaron como se muestra en la Figura 17.

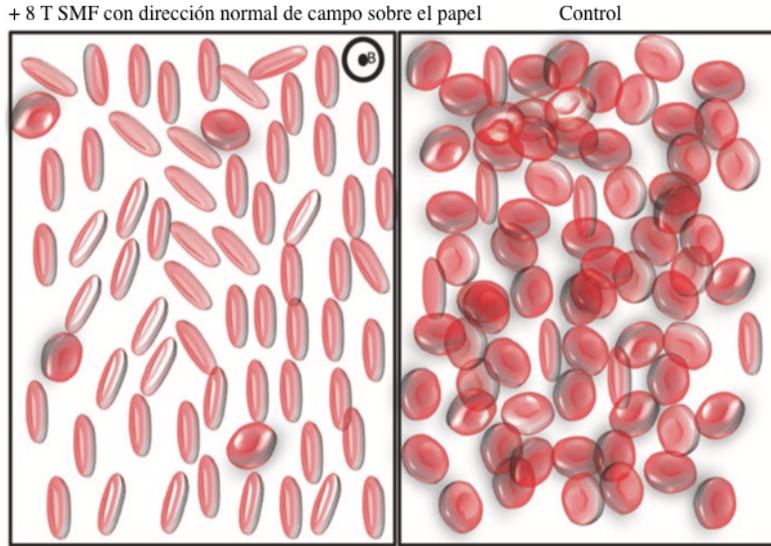


Figura 17. Orientación de Eritrocitos. En esta imagen se aprecia que el efecto de campos sobre la células es notorio.

2.3.6.1. Efectos magnéticos en la membrana celular

La presencia de campo magnético permite que los fosfolípidos de la membrana se reorienten permitiendo que los canales iónicos posean una alta afinidad. Esto se debe a la presencia de mayor cantidad de iones y ordenamiento de las estructuras de la membrana. El estímulo produce que las células posean mayor cantidad de canales aumentando la permeabilidad a ciertas moléculas. Al paso del tiempo la membrana aumenta su rigidez, debido al estrés que sufren (Figura 18).

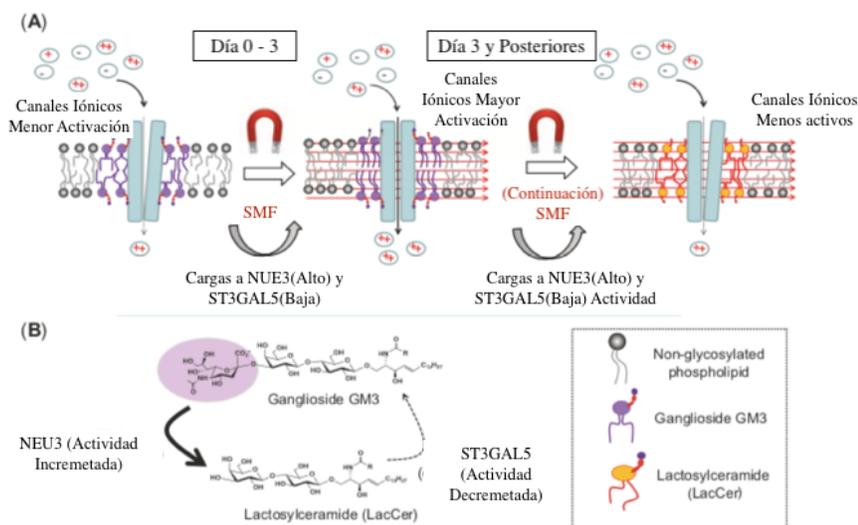


Figura 18. Efecto del campo magnético en células neuronales. La presencia de campo magnético modifica la estructura de membrana permitiendo que los iones puedan atravesarla con mayor facilidad. Muestra que la membrana cambia su estructura después de 3 días disminuyendo el paso de iones. Se le ha relacionado el incremento de la actividad NEU3 y el decremento de ST3GAL5 al producir lactosilceramida(LacCer) a partir de Ganglioside (GM3).

Los campos magnéticos estáticos para estimulación se clasifican dependiendo del nivel de intensidad. Se clasifican en bajos (< 1 mT), moderados (1 mT – 1 T), fuertes (1 – 20 T) y ultra fuertes (> 20 T). (Huizhen Wang, 2017).

2.3.6.2. Efectos magnéticos a nivel cromosoma y ADN.

Los cambios genéticos son uno de los aspectos más estudiados, esto se debe a su importancia en el estudio de la diferenciación celular. La activación de genes es el principal factor a estudiar cuando se quiere verificar si una célula se diferencia a un determinado linaje. Las células se pueden diferenciar de forma directa y/o indirecta a partir de estímulos eléctricos, lo que representa una modificación en el ADN de las células. Por lo cual, una de las grandes preocupaciones en la estimulación eléctrica, son las mutaciones o lateraciones genéticas que son perjudiciales para el paciente e impredecibles. Ante esta duda, se han realizado experimentos en los cuales muestran que los estímulos eléctricos aumentan la síntesis de ADN pero no hay mutaciones debido a campos estáticos. Sin embargo, podrían causar daños a nivel ADN debido a la cantidad de energía que liberan. Los experimentos realizados con 7 T empleando SMTs mostraron que la estructura de ADN no resultan dañada. En el 2014 el investigador Teodori encontró que el daño en el ADN causado por una radiación X podría prevenirse con una exposición de 80 mT SMT. Se piensa que SMT provee el potencial perdido de la membrana mitocondrial debido a los rayos X.

2.3.6.3 Efectos intracelulares por especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son radicales de alta activación, iones y moléculas que poseen un electrón no apareado en su capa más externa. ROS

incluye oxígenos libres (O_2^- , $-OH$, NO^- , etc.) y no radicales (H_2O_2 , N_2O_2 , $ROOH$, $HOCl$, etc.)

Se sabe que los niveles bajos de ROS pueden actuar como una señalización molecular, especialmente como oxidante de grupos tiol en proteínas, modificando su estructura y sus funciones, también es responsable de activar algunas reacciones en cascada en respuesta a expresiones génicas, proliferación celular, apoptosis y otros procesos intracelulares. Cuando ROS se encuentra en niveles elevados dentro de la célula, afecta moléculas proteicas, lípidos y ADN, interrumpiendo procesos normales de la célula. Se han realizado comparaciones entre células sanas y células cancerígenas, los resultados revelaron que ROS, dependiendo del nivel ROS puede disminuir la velocidad de crecimiento de células cancerígenas.

Las ROS están presentes en los procesos fisiológicos, la formación de ROS pueden ser enzimático y no enzimático. En el organismo se produce principalmente O_2 , el cual se genera durante la respiración y la formación de ATP en la mitocondria. Por lo que los ROS son moléculas presentes dentro de las actividades celulares. La eliminación de ROS se da en procesos de desintoxicación enzimática como el Superóxido dismutasa (SOD) y en procesos no enzimáticos incluyendo la glutatión (GHS), vitaminas A, C y E cuyas funciones son disminuir la oxidación y el estrés oxidativo. Los niveles de ROS en el organismo desempeña un papel importante en la diferenciación celular (Wang & Zhang, 2017).

Los ROS son efectos secundarios de los campos magnéticos, esto se debe a la energía que transmiten debido al cambio de moléculas, como se discutirá en el capítulo 3. El estrés oxidativo es una consecuencia directa del aumento de ROS en los nichos celulares que da como resultado la diferenciación celular en osteoblastos como fue mencionado en el apartado 2.3.6. Los ROS tienen una amplia relación con el cambio de pH y produce cambios en la selectividad de la membrana celular (Wang & Zhang, 2017) (F. Brown, Chawla, & M.D.C. Perera, 2017).

2.3.6.4. Efecto en ATP y calcio.

En el 2008 Buchenko y Kuznetsov reportaron interacciones magnéticas en la síntesis de ATP *in vitro*. Ellos encontraron que la síntesis de ATP puede incrementar significativamente debido a las SMTs de 55 y 80 mT en presencia de iones de magnesio (Mg^{+2}). Este fenómeno depende de la intensidad, tiempo de exposición y del tipo de células.

Otra sustancia afectada por el campo magnético, es el calcio, este elemento es considerado uno de los iones más importante debido a su participación en la activación de diversas rutas fisiológicas y especialmente como molécula transductora en diversas vías de señalización. La presencia de calcio en cultivos de CTMs, contribuye a la diferenciación osteogénica, mientras la presencia de calcio dentro de la célula produce la diferenciación a células de músculo esquelético (Huizhen Wang, 2017).

2.4. Características Eléctricas

La corriente eléctrica es un fenómeno físico que describe el comportamiento de un flujo de electrones que pasan a través de un área determinada. La corriente no es la única variable que define el comportamiento de los cargas. Por otra parte, el voltaje describe la fuerza que se emplea para mover un conjunto de cargas, la resistividad y la conductividad como propiedades intrínsecas que poseen los materiales, ambas están íntimamente relacionadas, ya que una es la inversa de la otra; por lo cual la conductividad se puede definir como la facilidad que tiene el material de conducir cargas eléctricas y la resistividad es la dificultad que tiene la corriente de pasar a través de un material (T. Ulaby & Ravaioli, 2015).

Existen otras variables que definen el comportamiento de las cargas, dichas variables son descritas dependiendo del tipo de corriente, las cuales son corriente directa (CD) o corriente alterna (CA). La Figura 19 se muestra la morfología de las señales y sus características en la Tabla 4.

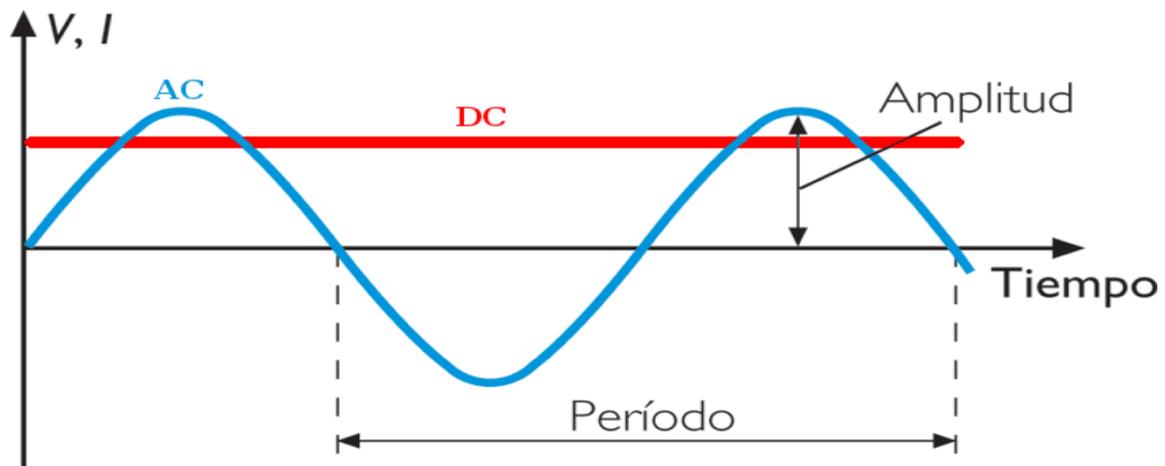


Figura 19. Tipos de corriente. La línea azul representa la corriente alterna que varía su amplitud en función del tiempo. La línea roja es la corriente directa la cual mantiene su valor de forma continua durante un lapso de tiempo.

Tabla 10. Características de la corriente alterna y directa. La variación de la amplitud representa un aumento de factores que pueden llegar a definirla

CD	CA
<ul style="list-style-type: none"> • Valor constante. • Amplitud • Puede estar en función de voltaje o corriente 	<ul style="list-style-type: none"> • Valor que cambia en función del tiempo. • Amplitud • Frecuencia • Fase • Forma de onda • Puede estar en función de voltaje o corriente • Período

A partir de esta primera clasificación la teoría electromagnética nos dice que al existir una corriente eléctrica, también existe un campo magnético y que están intrínsecamente relacionados. Por lo cual, un aumento o disminución de la amplitud, frecuencia u otro valor afecta a los otros dos de la misma manera.

Como se mencionó anteriormente, la corriente eléctrica es la sumatoria total acotada de forma lineal, superficial o volumétrica. La densidad de corriente conocida como J representa la densidad de cargas que se mueven a través de área dentro de un medio polarizado (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017). La dirección de la corriente convencional está determinado por la polarización del material, como se mencionará en el capítulo 4. Esto quiere decir, que la corriente parte del gradiente positivo al gradiente negativo, cuyo sentido es opuesto a la trayectoria de los electrones, los cuales viajan del punto más negativa del conductor hasta el punto más positivo como se visualiza en la Figura 20.

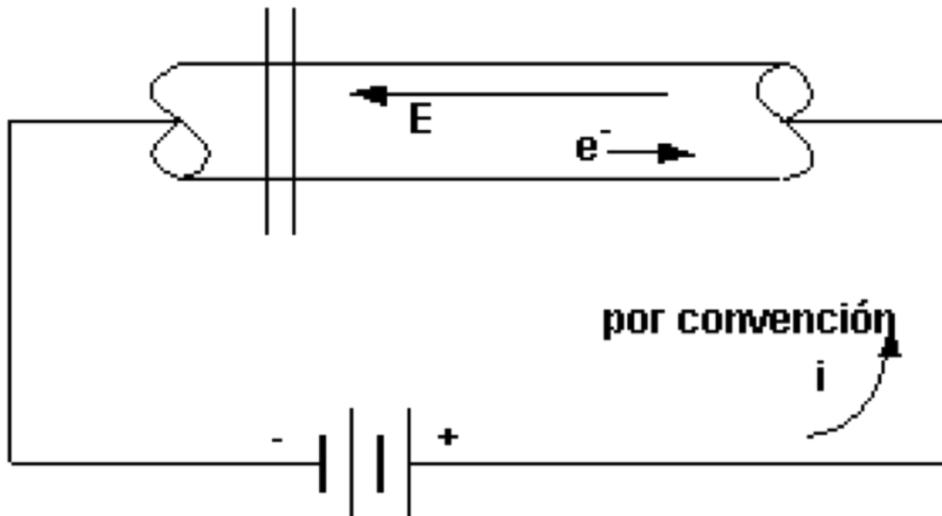


Figura 20. La dirección de la corriente convencional. La corriente se puede entender como aquel flujo de cargas positivas que compensa el flujo de electrones que van en sentido opuesto.

Como se sabe, el movimiento de un cuerpo como en este caso un conjunto de partículas requiere un energía para poder transportarse, esta energía se le conoce como voltaje o tensión eléctrica y su unidad es el volts (V) (Ecuación 2).

$$V_{AB} = \int_A^B E \cdot dl = El \quad (2)$$

Donde V_{AB} el tensión almacenada entre el punto A y B. E es el campo eléctrico y l la distancia más corta entre A y B.

La presencia mínima de dos cargas eléctricas produce atracción entre ellas, el valor de la Fuerza de atracción está definida por la ley de Coulomb. La cual dice: “la fuerza entre dos cargas es directamente proporcional a las magnitudes de las cargas e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que las separa”. El comportamiento de las cargas se puede visualizar en la Figura 21 (T. Ulaby & Ravaioli, 2015).

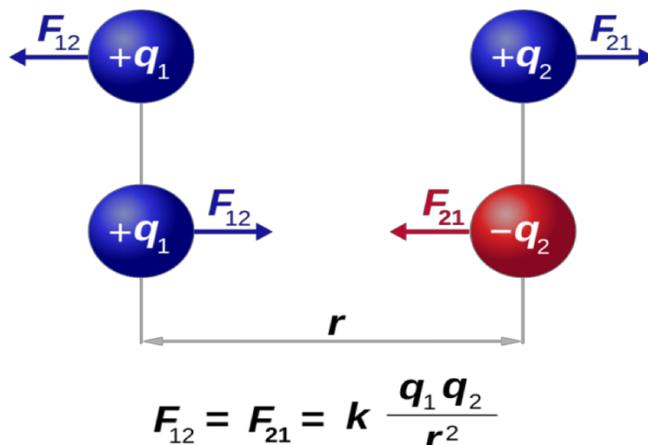


Figura 21. La ecuación de Coulomb. Describe el comportamiento de la atracción de las cargas a partir de la distancia r, las características eléctricas del medio implican emplear la constante de Coulomb (k), y con la proporción de las cargas (qxq), considerando que el valor negativo significa atracción y positivo repulsión.

El comportamiento de la fuerza del campo eléctrico se puede apreciar, como la interacción de dos o más campos de diferente cargas (Figura 22).

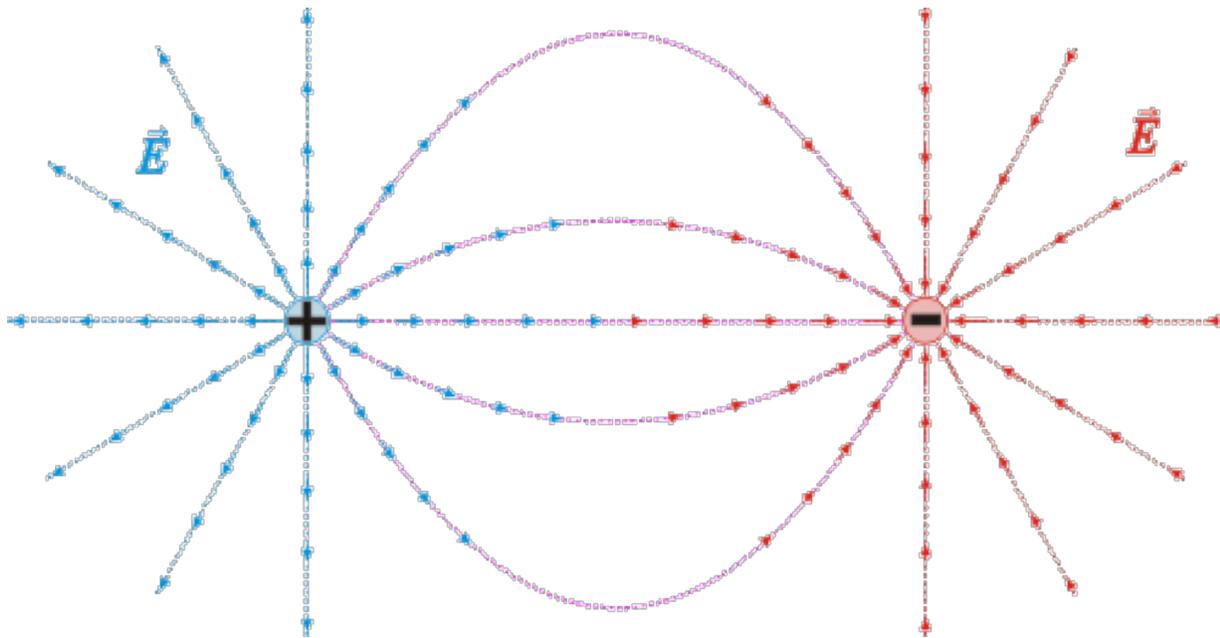


Figura 22. Las Fuerzas de coulomb. Describen la atracción que pueden poseer dos o más cargas en un mismo medio.

Para solucionar problemas referentes al campo eléctrico originado por una corriente eléctrica constante, se requiere emplear otro tipo de leyes y estos dependerán de la perspectiva del problema, la más conocida se encuentra la ley de gauss, la cual nos dice: *“El flujo del campo eléctrico a través de cualquier superficie cerrada es igual a la carga q contenida dentro de la superficie, dividida por la constante ϵ ”* (T. Ulaby & Ravaioli, 2015). Matemáticamente se visualiza como (Figura 23) (Ecuación 3):

$$E \times S = q/\epsilon \quad (3)$$

Donde E es el campo eléctrico, S es la superficie total de la figura, q es la carga total que contiene la Figura 23 y ϵ_0 es la permitividad eléctrica, la cual describe la propiedad que

tiene el material para atenuar la intensidad del campo eléctrico (T. Ulaby & Ravaioli, 2015).

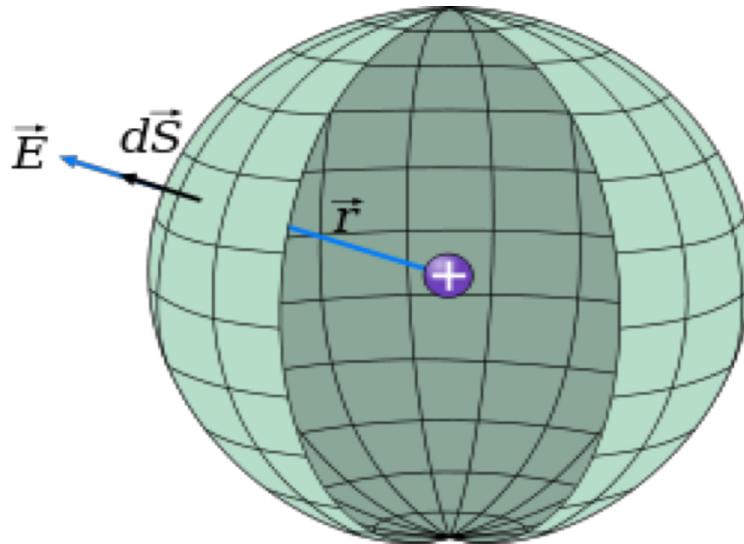


Figura 23. La ley de Gauss. Se puede visualizar cómo una carga encerrada en una figura o superficie, la cual puede variar dependiendo de la necesidad del problema

Existe una familia de fórmulas empleadas para la descripción de la interacción de las cargas. Estas ecuaciones son las ecuaciones de Maxwell. Las cuales están compuestas por las leyes de Faraday, Gauss, Ampere y del flujo del campo magnético (tabla 5) (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017).

Tabla 6. Leyes de Maxwell. Las cuales pueden emplear de forma integral o diferencial.

	Forma Integral	Forma Diferencial
Ley de Gauss	$\oiint_s \vec{D} \cdot d\vec{S} = q \quad (4)$	$\nabla \cdot \vec{D} = \rho \quad (5)$
Ley de Faraday	$\oint_c \vec{E} \cdot d\vec{L} = -\frac{\partial}{\partial t} \iint_s \vec{B} \cdot d\vec{S} \quad (6)$	$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (7)$
Flujo del campo Magnético	$\oiint_s \vec{B} \cdot d\vec{S} = 0 \quad (8)$	$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (9)$
Ley de Ampère	$\oint_c \vec{H} \cdot d\vec{l} = I + \frac{\partial}{\partial t} \iint_s \vec{D} \cdot d\vec{S} \quad (10)$	$\nabla \times \vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (11)$

Las leyes de Maxwell (Ecuación 4-11) se pueden describir de dos manera distintas la forma integral, empleado para representar la ecuación en función de la distancia o

superficie cerrada. Y de forma diferencial en función de la variación en tiempo o en un espacio físico (T. Ulaby & Ravaioli, 2015).

2.4.1. Ley de Gauss

Como se ha mencionado anteriormente, esta ley visualiza a la carga dentro de una figura para obtener el campo eléctrico al emplear la permitividad eléctrica, esta ecuación se puede apreciar desde otra perspectiva como lo muestra la figura de las ley de Maxwell, en este caso la función de un la densidad de flujo eléctrico (D), él cual se define como la cantidad de flujo eléctrico (Ψ_e), él cual expresa la cantidad de flujo eléctrico que pasa por una área, originado por un campo eléctrico que pasa a través de un superficie definida (S). Como se aprecia en la Figura 23.

Y de forma diferencial dice que el comportamiento del campo eléctrico en un determinado medio posee diferentes valores para cada punto espacial, en otras palabras la distancia y la relación del punto de análisis con la ubicación de la carga afecta al valor del campo eléctrico en dicho punto, por lo cual dentro de un determinado medio el campo eléctrico cambia de intensidad dependiendo de su origen geográfico, a este cambio se le conoce como divergencia del campo eléctrico. La ecuación de Gauss se visualiza en función de la divergencia del campo eléctrico como en un mapa de nivel (Figura 24).

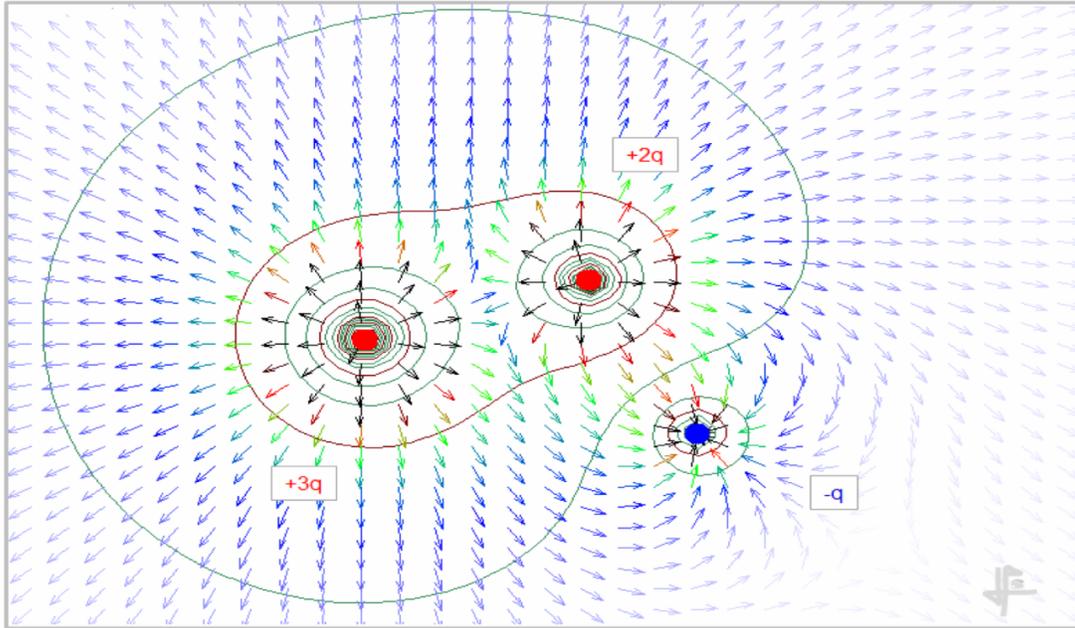


Figura 24. La ecuación de Gauss en forma diferencial. Se visualiza como un conjunto de flechas que divergen desde las cargas y que simbolizan las líneas del campo eléctrico, la interacción de los campos eléctricos se definen con la dirección de los gradientes, y la fuerza de campo eléctrico se simboliza con el cambio de color de las flechas y la aparición de niveles de intensidad que describen líneas equipotenciales (rutas que no poseen cambio en su valor eléctrico).

2.4.2. Ley de Faraday

El postulado de la ley de Faraday dice que “la intensidad del campo eléctrico en un región de densidad de flujo magnético variable en el tiempo, es por consiguiente no conservativo y no se puede expresar como el gradiente negativo de un potencial escalar”, en otras palabras la variación del campo magnético implica un cambio del campo eléctrico y ambas funciones no se expresan como un valor absoluto, sino como una ecuación que las relaciona en función del tiempo y del sentido del gradiente, el cual implica ubicarlo en un medio físico que la defina. Esta se emplea en su forma integral (Tabla 5), cuando se requiere ver el problema desde una perspectiva de la distancia recorrida por el campo eléctrico en función del campo magnético que varía en el tiempo.

Esta ecuación también se emplea para determinar la fuerza electromagnética (F.E.M), que se utiliza para producir movimientos mecánicos a partir de la interacción de cargas eléctricas (Figura 25) (T. Laurencin, Khan, & Veronick, 2014).

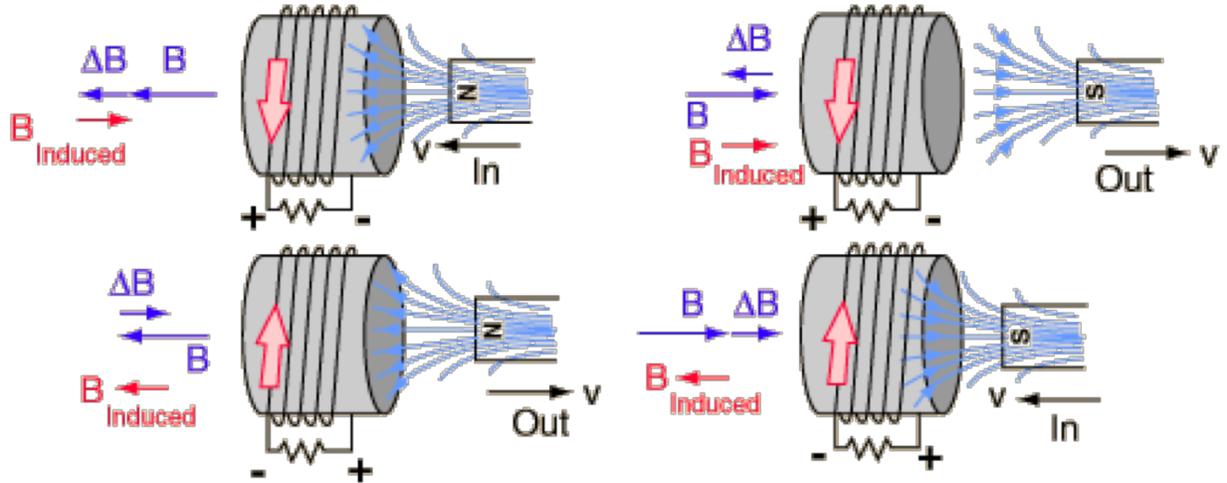


Figura 25. La ley de Faraday. Con la ecuación de Faraday se puede pensar en cuatro casos posibles, estos casos demuestran en primer lugar el papel que desempeña la dirección y sentido del campo magnético y eléctrico. El cambio de la dirección de la corriente implica un cambio de sentido en la F.E.M. y viceversa.

La ecuación en forma diferencial (Figura 23) muestra que el campo eléctrico y el campo magnético son fenómenos perpendiculares que se influyen de forma espacial, como se ha mencionado anteriormente también influye la diferencial del tiempo (Ecuación 12).

$$\nabla \times \vec{E} = \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (12)$$

2.4.3. El Flujo del campo magnético.

El flujo magnético es un fenómeno que converge (Figura 26), es decir, toda sus líneas de flujo cambiarán su dirección para poder reencontrarse, a diferencia del campo eléctrico que es un fenómeno que siempre diverge. Las ecuaciones se representan tanto en forma integral, como diferencial (Tabla 6), dicen que el flujo del campo magnético inicia y termina en el mismo punto. Ambas ecuación ven al problema desde diferentes puntos de vista. En la integral se visualiza como una carga encerrada en una figura y de ella no existe ninguna línea de flujo que no regrese a su punto de inicio; en la forma diferencial

se habla de la trayectoria que siguen dichas líneas de flujo (López Rodríguez, 2013)(Figura 26).

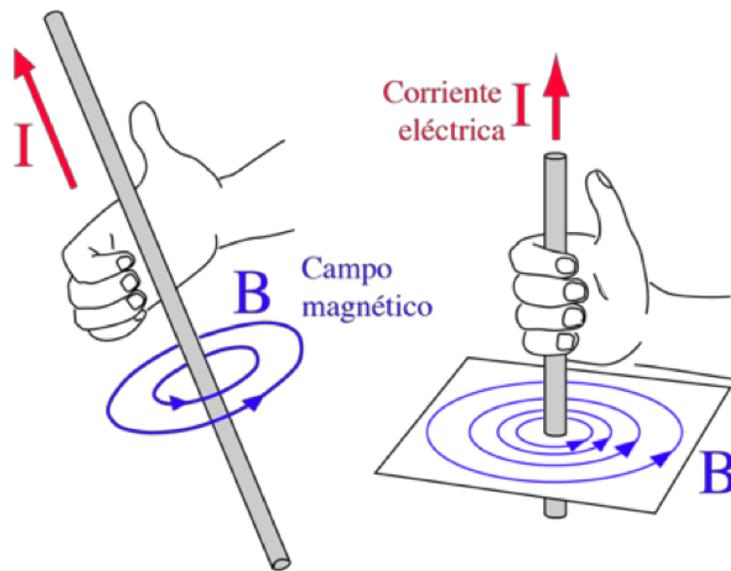


Figura 26. La dirección del campo magnético. El flujo de campo magnético es perpendicular al flujo de la corriente eléctrica (Regla de la mano derecha).

2.4.4 Características eléctricas de los materiales:

- Permitividad eléctrica relativa (ϵ_r): Es un parámetro eléctrico que se caracteriza por afectar la intensidad del campo eléctrico dentro de un medio comparado con el efecto de la permitividad eléctrica del vacío (Ecuación 13).

$$\epsilon = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \quad (13)$$

Cuando un medio posee mayor permitividad eléctrica, se puede afirmar que dicho medio disminuye el efecto del campo eléctrico al disminuir su intensidad, en el caso contrario mientras la permitividad tiende a 1, el campo eléctrico tenderá a permanecer constante en el medio (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017).

- Resistividad (ρ): Es una característica intrínseca del medio que cuantifica la oposición del material al paso de la corriente eléctrica. Su inversa se llama conductividad (σ) y se describe como la cuantificación de la facilidad que tiene el material de conducir la corriente eléctrica (Ecuación 14).

$$\rho = 1/\sigma \quad (14)$$

Cuando la resistividad ρ tiende a 0 es un conductor perfecto, pero cuando la resistividad tiende a infinito se trata de un dieléctrico perfecto (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017). La conductividad se calcula a parti de la siguiente ecuación (Ecuación 15):

$$\sigma = \frac{\ell}{RS} \quad (15)$$

Donde ℓ que la longitud del material, R la resistencia y S el área transversal.

- Impedancia (Z): La impedancia se presenta con un número complejo ($Rz\beta$) él cual posee un parte real llamada resistencia (R), dicha resistencia se diferencia de la resistividad por ser una característica extrínseca , por lo cual la resistencia está definida por las dimensiones del medio (Ecuación 16).

$$R = \rho/A \quad (16)$$

La segunda parte de la impedancia representa el valor imaginario (β), este describe la diferencia del ángulo o fase que posee la señal de entrada con respecto a la señal de salida, hablando estrictamente cuando se emplea corriente alterna, en caso contrario la parte imaginario se vuelve 0 (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017).

- Permeabilidad magnética (μ): Es una característica análoga de la permitividad eléctrica que afecta al campo magnético, es decir, la permeabilidad magnética del medio afecta a la intensidad del campo magnético (Ecuación 17).

$$\mu = \mu_0 \cdot \mu_r \quad (17)$$

Cuando el valor de la permeabilidad es mayor a 1 significa que el material deja pasar con mayor facilidad el campo magnético y lo amplifica, cuando dicho material posee una permeabilidad cercana a 1 su comportamiento es neutro. En caso contrario, cuando es menor a 1 lo atenúa (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017).

- Tiempo de relajación (τ): Es el tiempo requerido para que el medio deje de sentir los efectos de la corriente (Ecuación 18).

$$\tau = \varepsilon/\sigma \quad (18)$$

2.4.5. Campos magnetostáticos

La Teoría electromagnética tiene tres ramas importantes, las cuales son la electrostática, la magnetostática y la Dinámica. Cada una posee sus propias condiciones (Tabla 6). Para la tesis se contempló la electrostática y la magnetostática. Se emplean campos estáticos cuando las cargas se encuentran suspendidas en un espacio geográfico específico, o en caso que las partículas se muevan en una velocidad constante, de tal manera que la densidad volumétrica de las cargas libres (ρ_v) y la densidad de corriente (J) son constantes en el tiempo (Mrozynski & Stallein, 2013).

Tabla 7. Ramas de la Teoría Electromagnética. Para el estudio del comportamiento eléctrico es importante contemplar el valor tiempo debido a que este factor describe comportamientos de mayor complejidad (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017)(Ecuación 19 y 20).

Rama	Condición	Cantidad de campo (Unidades)
Electrostática	Cargas estacionarias ($\partial q/\partial t=0$)	Intensidad de campo eléctrico E (V/m) Densidad de flujo eléctrico D (C/m ²) D=εE (19)
Magnetostática	Corrientes constantes ($\partial I/\partial t=0$)	Densidad de flujo magnético B (T) Intensidad de campo magnético H (A/m) B=μH (20)
Dinámica (Campos variables con el tiempo)	Corrientes variables con el tiempo ($\partial I/\partial t \neq 0$)	E, D, B y H (E, D) acoplados a (B, H)

Las principales leyes que rigen los campos magnetostáticos son: La ley de Biot-Savart y la ley de Ampere .

2.4.6. Ley de Biot-Savart

La ley establece que el cambio de la intensidad del campo magnético dH producido en el punto P, multiplicado por la corriente I al recorrer una longitud dl , es proporcional al producto ldl y al seno del ángulo α , que se encuentra entre un elemento y la línea que une a P con el elemento, y es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia R entre P y el elemento. Para esta ecuación existen 3 maneras de usarla (K. Hobbie & J. Roth, 2015) (Ecuación 21, 22, 23):

Corriente lineal $H = \int \frac{Id\vec{L} \times \vec{a}_R}{4\pi R^2} \quad (21)$

Corriente superficial $H = \int \frac{dS\vec{K} \times \vec{a}_R}{4\pi R^2} \quad (22)$

Corriente Volumétrica. $H = \int \frac{dv\vec{J} \times \vec{a}_R}{4\pi R^2} \quad (23)$

2.4.6. Ley del Ampere

Esta ley se considera como una de las más importantes, relaciona directamente el valor del flujo magnético y el flujo de la corriente eléctrica en el tiempo (Ecuación 24).

$$\oint \vec{H} \cdot d\vec{l} = I + \frac{\partial}{\partial t} \int_S \vec{D} \cdot d\vec{S} \quad (24)$$

Como se ha mencionado anteriormente, tanto en fuerza eléctrica como en campos eléctricos, existe un elemento crucial para la determinación de sus valores netos; es decir, las propiedades eléctricas del medio. Estas propiedades pueden afectar dependiendo del tipo de corriente que se este trabajando (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017).

2.4.7. Densidad de Flujo magnético

La densidad de flujo magnético B es la cantidad de líneas magnéticas que origina un campo magnético y se representa como el flujo magnético Ψ_m que pasa a través de una superficie S. Y el flujo magnético es la cantidad de líneas de flujo que pasan a través de un área. En la cual el flujo magnético (Ψ_m) está en webers (Wb) y la densidad del flujo magnético está en Wb/m² o Tesla (T). Las líneas de flujo magnético describen una trayectoria tangencial a todas los puntos de un campo magnético. En un campo

electrostático, el flujo que pasa a través de una superficie cerrada es igual a la carga encerrada, es decir (Ecuación 25):

$$\psi_e = \oint \mathbf{D} \cdot d\mathbf{S} = Q \quad (25)$$

Debido a esto, es posible tener cargas aisladas y las líneas de flujo eléctrico no son necesariamente cerradas. A diferencia de las líneas de flujo magnéticas éstas siempre se cierran sobre sí mismas, recordando que esto se debe a que no se puede separar el polo sur del polo norte de un material magnetizado (Toh, 2013).

2.4.8. Fuerzas y momentos de torsión magnéticos

La fuerza magnética de F_m es la fuerza que ejerce sobre una partícula cargada, se mueve a una velocidad u . La cual se representa con la siguiente ecuación (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017) (Ecuación 26) :

$$\mathbf{F}_m = q\mathbf{u} \times \mathbf{B} = quB \sin \theta \quad (26)$$

donde θ es el ángulo entre \mathbf{u} y \mathbf{B} . Cuando \mathbf{u} y \mathbf{B} forman un ángulo de 90° ($\theta = 90^\circ$) el vector F_m alcanza su máximo valor y cuando \mathbf{u} con respecto a \mathbf{B} forman un ángulo de 180° ($\theta = 0^\circ$ o 180°) posee una fuerza de 0.

Como se ha mencionado con anterioridad, los campos eléctricos y magnéticos no se pueden aislar, la presencia de uno evidencia la existencia del otro. Por lo cual, las fuerzas ejercidas por ambas se denomina fuerza electromagnética, la cual se representa con la siguiente ecuación (Ecuación 27):

$$\mathbf{F}_t = \mathbf{F}_e + \mathbf{F}_m = q\mathbf{E} + q(\mathbf{u} \times \mathbf{B}) = q(\mathbf{E} + \mathbf{u} \times \mathbf{B}) \quad (27)$$

La fuerza obtenida en la ecuación anterior se conoce como fuerza de Lorentz. Las fuerzas eléctricas y magnéticas presentan varias diferencias importantes (Toh, 2013) (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017).

1. Las fuerzas eléctricas siempre tienen el mismo sentido que el campo eléctrico. En cambio las fuerzas magnéticas actúan de forma perpendicular al campo magnético.
2. Las fuerzas eléctricas actúa sobre partículas estáticas o en movimiento. Y la fuerzas magnéticas sólo actúan sobre partículas en movimiento.
3. Las fuerzas eléctricas requieren de energía para mover una carga, en tanto la fuerza magnética no. Esto se debe a que el campo magnético solo es capaz de cambiar la dirección de las partículas, pero no su rapidez.

2.4.9. Las fuerzas de torsión

Es aquella fuerza que aplica el campo magnético a una carga en movimiento, la cual desvía su trayectoria original, esta torsión está dada por el producto cruz de la distancia entre el eje de trayectoria original de la partícula con respecto a la nueva trayectoria, a esta distancia se le conoce como brazo de momento Y al producto cruz se le conoce como momento de torsión, el cual está dado en Nm (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017) (Ecuación 28).

$$\mathbf{T} = \mathbf{d} \times \mathbf{F} \quad (28)$$

2.4.10. Potencial magnético vectorial

El potencial magnético vectorial es una característica análoga a la diferencia de potencial que produce un campo eléctrico ($\mathbf{E} = \nabla V$). Como se ha mencionado, los campo magnéticos son convergentes, es decir, que $\nabla \cdot \mathbf{B} = 0$. El potencial magnético vectorial representa las líneas de flujo magnético que actúan en una cierta distancia, como se representa de forma vectorial debido a que define la trayectoria del campo magnético en un cierto punto (Ecuación 29). El potencial magnético vectorial está dado en Wb/m² (López Rodríguez, 2013).

$$\mathbf{B} = \nabla \times \mathbf{A} \quad (29)$$

Empleando la ley de Ampere \mathbf{B} se sustituye por $\mu\mathbf{J}$, donde \mathbf{A} es el potencial vectorial

2.4.11. Inductancia

El inductor es un dispositivo que posee la capacidad de almacenar energía similar al capacitor, con la diferencia que este lo almacena en forma de corriente. El inductor tiene la características de mantener el valor de la corriente en el tiempo (López Rodríguez, 2013).

La propiedad que tiene un material de mantener la corriente eléctrica se llama inductancia (L), la cual puede ser autoinductancia que representa el enlace de flujo magnético de una bobina o circuito consigo mismo; y la inductancia mutua, que implica la producción de una corriente en elemento a partir de la interacción de un campo magnético de otro elemento (Ecuación 30). La unidad de autoinductancia es el Herios (H) y se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$L = \Lambda/I \quad (30)$$

2.4.12. Energía magnética

La energía magnética es análoga a la energía eléctrica y esta energía es la requerida para llevar a un inductor con corriente desde cero a una corriente determinada. Se expresa de la siguiente manera (Lüttgens, Lüttgens, & Schubert, 2017) (Ecuación 31 y 32):

$$W = \frac{1}{2}LI^2 \quad (31)$$

Y la densidad de energía magnética es igual a:

$$\omega_m = \frac{1\mu H^2 V}{2} \quad (32)$$

2.5.- Características del Medio Celular.

Los medios celulares son medios artificiales preparados con componentes purificados o de sustancias orgánicas. Este medio debe poseer características físico-químicas ideales para mantener los procesos fisiológicos de la célula.

2.5.1.- Características Químicas y biológicas

Existen diversos tipos de medios celulares y cada uno se emplea de forma diferentes, esto dependiendo de las necesidades que requieran cada uno de los estirpes celulares. Los medio de cultivos poseen aminoácidos, vitaminas, glucosa, hormonas, factores de crecimiento, antibióticos, anti fúngicos, entre otros. El principal disolventes del medio de cultivo es agua. Las moléculas de forma a partir de interacción covalentes formando grupos órganos conformado principalmente de carbono (C), oxígeno (O), hidrogeno (H). Las biomoléculas se caracteriza en forma estructuras complejas que se ordenan y se constituye de interacciones de atracción eléctricas como los puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de Van der Waals, también conocidos como enlaces débiles.

Aminoácidos: Son monómeros que se conforman por una amino, un ácido carboxílico, un carbono α , hidrógeno y un radical, debido a su estructura posee 3 formas una iónica, catiónica y Zwitterion, por lo cual se puede comportar de forma neutra. Los aminoácidos son los monómeros para la formación de péptidos, proteínas secundarias helicoidales $-\alpha$ o laminas plegadas- β , proteínas terciarias como muchas enzimas o estructuras cuaternarias como la hemoglobina. La cual mantiene sus estructuras debido a enlaces débiles. La proteínas son empleadas como módulos receptores de moleculares señalizadoras.

Lípidos: Son estructuras hidrofóbicas por lo que son moléculas no polares conformadas por enlaces covalentes. Se pueden encontrar de forma saturada cuando no poseen doble

enlace e insaturada cuando posee enlaces dobles. Estas se encuentra en la membrana celular, en muchas hormonas y bioseñales.

Bases nitrogenadas : Son monómeros conformado de una azúcar y una base nitrogenadas. Se caracteriza por posee un complemento, el cual se enlaza a través de enlaces débiles. Son empleadas como mensajero e instructivo para la fabricación de biomoléculas dentro de las células en forma de ADN o ARN en cualquiera de sus tipos.

Carbohidrato: son estructuras conformadas de azúcares, su principal uso es la alimentación y almacenamiento de energía, dentro del medio celular se encuentra en el suero fetal bovino.

2.5.2.- Características Físicas

Como se ha mencionado con anterioridad la corriente eléctrica es la tasa de transporte de carga que pasa por un punto específico a través de un área determinada ($1 \text{ A} = 1 \text{ C/s}$). Y respeta la ley de Ohm, la cual nos dice que la corriente que pasa a través de un material es igual a la razón de voltaje que almacena con respecto a su resistencia eléctrica.

La ley anterior para el caso de los gases y los líquidos no funciona. Esto se debe a que los portadores positivos y negativos que están presentes en el medio. Por consecuencia, la ley de Ohm se debe modificar en función de la densidad de corriente $J \text{ (A/m}^2\text{)}$ (Ecuación 33).

$$J = \sigma E \quad (33)$$

Existen diferencias de comportamiento molecular debido al estado de agregación de la materia. Cuando la materia es sólida y existe presencia de campo eléctrico la fuerza produce una aceleración constante en los portadores. Pero en el caso contrario, cuando el medio es líquido o gaseoso los portadores positivos y negativos colisionan, por lo que se presentan cambios de dirección aleatorias. Esto se refleja en una velocidad constante

de los portadores. La velocidad del corrimiento (U) es directamente proporcional a la intensidad del campo eléctrico (Ecuación 34).

$$U = \mu_e E \quad (34)$$

Donde, μ_e es la movilidad, se mide en $m^2/V.s$.

2.5.2.1 Polarización de un dieléctrico

Los medios dieléctricos se polarizan en presencia de una diferencia de potencial produciendo una densidad de flujo eléctrico D y un campo eléctrico E . Se puede entender la polarización al analizar una molécula de un dieléctrico, el cual posee dos regiones de cargas sobrepuestas una positiva y una negativa, como se observa en la Figura 27. En presencia de una diferencia de potencial la región positiva se mueven hacia el gradiente negativo creando un campo E en la misma dirección, mientras la región negativa se mueve en sentido opuesto a él. A la separación entre las dos cargas se le llama polarización y el nivel de polarización se observa a través de la distancia entre las dos regiones.

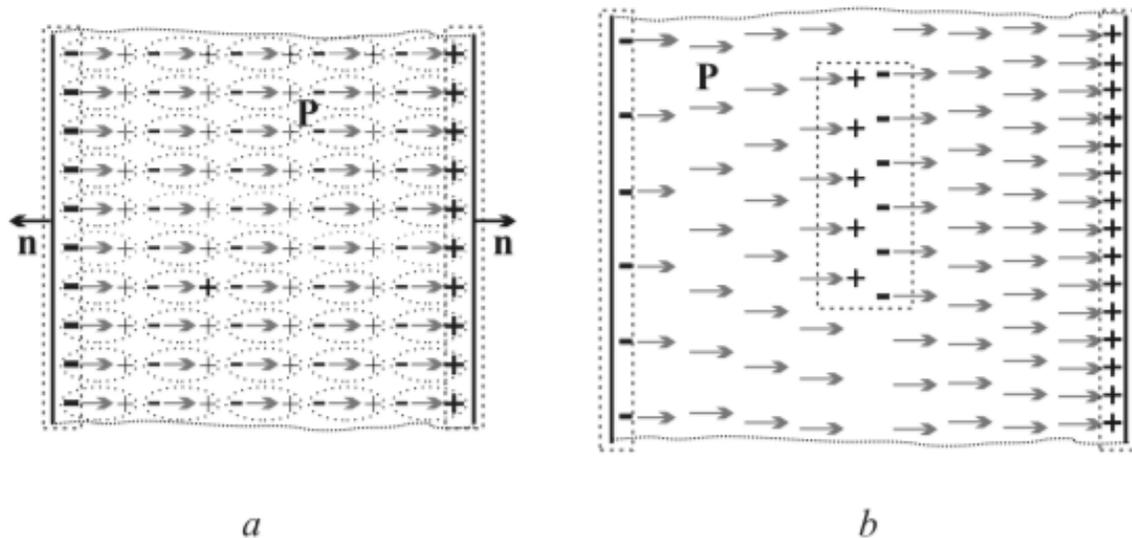


Figura 27. Polarización de un medio dieléctrico. Los medio dieléctricos poseen una determinada orientación sin presencia de un diferencial de potencial (a) y cuando existe la presencia de potencial esta distribución cambia provocando campo electrico que reordena las cargas (b).

Este desplazamiento puede ser representado por un momento eléctrico dipolar $P=Qd$. Igual que el resorte en la ley de Hook, la polarización es un fenómeno que almacena energía por medio del movimiento de las regiones en un medio dieléctrico.

En un volumen definido de un dieléctrico polarizado contiene N momento dipolares P. La polarización se define como el momento polar por unidad de volumen(C/m^2) (Ecuación 35).

$$P = \lim_{\Delta v \rightarrow 0} \frac{Np}{\Delta C} \quad (35)$$

Esto hace suponer que existe una distribución uniforme de los momentos eléctricos dipolares en todo el volumen. De forma macroscópica se puede observar la polarización a través de las siguientes ecuaciones (Ecuación 36, 37, 38):

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (36)$$

$$\vec{P} = \chi_e \epsilon_0 \vec{E} \quad (37)$$

$$\vec{D} = \epsilon_0 (1 + \chi_e) \vec{E} = \epsilon_0 \epsilon_r \vec{E} \quad (38)$$

Considerando que χ_e es la susceptibilidad eléctrica, ϵ_0 es la permitividad eléctrica en el vacío y ϵ_r es la permitividad relativa del material. Estas condiciones se cumplen cuando se habla de un material isotrópico.

2.5.2.2. Capacitancia de un dieléctrico

Es la capacidad que tiene un material de almacenar energía, esta energía depende de su capacidad de polarización. La capacitancia se describe con la siguiente ecuación (Ecuación 39):

$$C = Q/V \quad (39)$$

Donde C es la capacitancia, Q la carga que almacena y V el voltaje. La capacitancia está dada en Faradio (F) = 1 C/V y solo depende de la geometría del sistema y de las propiedades del dieléctrico.

En un condensador de placas paralelas separadas por una distancia d, a las cuales se les aplica un voltaje V, creando un campo eléctrico E proporcional a las características del medio dieléctrico que las separa y a su vez se crea un densidad de flujo eléctrico en dirección **a**, descrita por la dirección de las placas que originan el campo eléctrico (Ecuación 40).

$$\vec{D} = \epsilon_0 \epsilon_r \vec{E} = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{V}{d} \vec{a} \quad (40)$$

Como se ha mencionado anteriormente, el voltaje es la energía requerida para mover un conjunto de cargas. En condensador también posee un voltaje necesario para mover las cargas, polarizando el material dieléctrico. A partir de un capacitor se puede saber la cantidad de voltaje para mover una cierta cantidad de cargas (Ecuación 41).

$$v = q/C \quad (41)$$

El movimiento de cargas realiza un trabajo dado por la siguiente ecuación (Ecuación 42).

$$dW = v dq = \frac{q}{C} dq \quad (42)$$

El trabajo realizado para cargar un capacitor está dado por (Ecuación 43):

$$W = \int \frac{q}{C} dq = \frac{q^2}{2C} \quad (43)$$

Sustituyendo $C = Q/V$, donde V es el voltaje final de W . Se escribe de la siguiente manera (Ecuación 44).

$$W = 1/2CV^2 \quad (44)$$

El capacitor se define también a partir de la propiedad eléctrica del dieléctrico que la contiene y de sus dimensiones, $C = \epsilon A/d$ donde ϵ es la permitividad eléctrica del material y A es el área transversa de las placas y d la distancia entre ellas. Es a través de estas ecuaciones que se puede determinar la densidad de energía electrostática que se almacena en el condensador (Ecuación 45).

$$\omega_e = \frac{1}{2} \epsilon \frac{A}{d} (Ed)^2 = \frac{1}{2} \epsilon E^2 (Ad) \quad (45)$$

La densidad de energía electrostática ω es la energía potencial provocada por un campo electrostático W por unidad de volumen (J/m^2) (Ecuación 46).

$$\omega_e = \frac{1}{2} \epsilon E^2 V \quad (46)$$

2.5.2.3. Tipos de dieléctricos

Diferentes dieléctricos se comportan de distintas formas al variar el desplazamiento de las cargas y a la susceptibilidad de medio al ser afectado por un campo externo. Los dieléctricos se pueden clasificar de la siguiente manera:

Dieléctricos con polarización permanente:

Son aquellos dieléctricos que presentan polarización sin la necesidad que exista una diferencia de potencial, ejemplo de estos materiales son los imanes.

Dieléctricos lineales y no lineales:

Estos dieléctricos poseen una susceptibilidad y permitividad eléctrica que depende de la intensidad del campo eléctrico. Los materiales ferromagnéticos poseen esta propiedad.

Dieléctricos isótropos y anisótropos

Los isotrópicos son aquellos que poseen susceptibilidad y permitividad eléctrica no dependiente de la dirección y sentido del campo eléctrico. Y en el caso contrario se llaman anisótropos.

Dieléctricos homogéneos

Son dieléctricos que sus valores de susceptibilidad y permitividad eléctrica no dependen del punto de análisis, es decir, su propiedad será uniforme en todo el medio. Cuando el material no cumple esta característica se llama no homogéneos.

2.5.2.4. Ruptura en un dieléctrico

El aumento de la diferencia de potencial en un dieléctrico, aumenta la intensidad de campo eléctrico y cuando este presenta niveles muy altos puede liberar electrones o iones que al acelerar producen una corriente eléctrica. Los electrones y iones acelerados provocan la ionización de otras sustancias. Normalmente esta corriente puede llegar a niveles tan altos que provoca que el dieléctrico se destruya y este fenómeno se le conoce como ruptura de un dieléctrico. Existen dos tipos de ruptura la intrínseca y la térmica. La ruptura intrínsecas se origina cuando existe una gran cantidad de electrones libres que provocan que otros átomos también liberen electrones, produciendo un reacción encadena que finaliza con la destrucción del dieléctrico.

En el caso de la ruptura térmica, esta se origina debido a corriente eléctrica que aumenta la energía de las moléculas produciendo un calentamiento del material; si dicho material no logra disipar el calor, como consecuencia esta energía produce reacciones químicas que modifican al dieléctrico llevando al dieléctrico a la ruptura. Existe una intensidad de

campo eléctrico máxima que puede soportar un dieléctrico a esta característica se le conoce como rigidez dieléctrica. (López Rodríguez, Electromagnetismo 1, 2013)

2.5.2.5. Dieléctricos con polímeros

El comportamiento eléctrico de los mecanismos de transporte iónicos en polímeros es un tema con muy poca información. El aumento de la conductividad iónica plantea dos problemas generales para el análisis del espectro. Por un lado, la conductividad en corriente directa ($\sigma / \epsilon_0\omega$) supera la pérdida dieléctrica medida, lo que dificulta la resolución de otros procesos de relajación. Por otro lado, el fenómeno de polarización eléctrica (EP) asociado a la alta conductividad también interfiere con el análisis de la parte real de la permitividad. Además, cuando está presente la separación de microfases, que es a menudo el caso de los polímeros cargados, se deben considerar complicaciones adicionales. Por lo tanto, el análisis del espectro dieléctrico de electrolitos de polímeros requiere un cuidado especial (Wang Y. , 2016). En la Figura 28 se observa el comportamiento de la permeabilidad relativa en dieléctricos poliméricos que interactúan con iones.

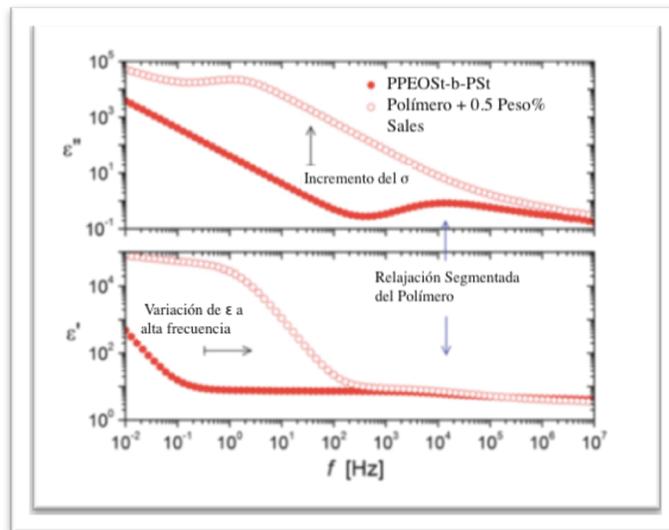


Figura 28. Permitividad eléctrica de polímero con iones. En esta imagen se presenta el caso de un polímero (poli (óxido de polietileno-estireno) -b-poliestireno) después de la adición de sal (LiClO_4). La adicción de iones aumenta el nivel de permitividad eléctrica.

3. Problemática

Las enfermedades degenerativas representan un problema grave que enfrenta la sociedad Mexicana al ser el causante del 50% de las muertes en el país. Muchas de estas enfermedades no poseen tratamiento y los tratamientos existentes solo disminuyen su velocidad o disminuyen sus síntomas (VERGARA, 2018) . Las causas relacionadas a estos problemas son factores encontradas en el nicho celular de las células troncales, los cuales producen alteraciones en la activación de genes, dando como resultado la modificación de las proteínas, cambio en la velocidad de proliferación y disminución de su capacidad de diferenciación. Algunos de los tratamientos eficaces requieren la inserción de andamios bioactivos que regulen la regeneración de tejidos, sin embargo, los andamios no siempre representan una alternativa viable debido a que se requiere la inserción en el área afectada.

4. Justificación

En la actualidad existen estudios dedicados a experimentar con células troncales en proceso de diferenciación, al ser estimuladas con corriente eléctrica. Muchos de estos estudios han revelado cambios morfológicos y de proliferación, así como cambios en la expresión de genes. Estos hallazgos resultan prometedores para ser empleados en futuras terapias. Sin embargo, la falta de estudios desde un punto de vista físico, limita el análisis de los factores físicos y químicos involucrados en la obtención de estos cambios, esto con el fin de encontrar los límites útiles en la experimentación y probar su reproducibilidad en otros entornos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General.

Determinar las propiedades eléctricas involucradas en los cambios morfológicos, genéticos y de proliferación en la diferenciación de células trocales a osteoblastos al ser estimuladas con campo magnéticos.

5.2. Objetivos específicos.

2. Investigar el estado del arte acerca de la diferenciación de células trocales y los estudios acerca de las expresiones genéticas más importantes.
3. Determinar las características eléctricas del medio osteogénico.
4. Realizar electroestimulaciones en las células troncales en proceso de diferenciación durante los primeros 14 días.
5. Determinar las propiedades eléctricas de la células troncales de pulpa dental.
6. Realizar pruebas de proliferación en los diferentes cultivos empleados.
7. Analizar los cambios morfológicos de las células durante su proceso.
8. Determinar las características eléctricas del medio celular y medio osteogénico.

6. Hipótesis

La modificación de características eléctricas de nicho celular a través de estímulos magnetostáticos influyen en la diferenciación de células troncales de pulpa dental a osteoblastos.

7. Material y métodos

Protocolo 1. Cultivo y expansión de células troncales mesenquimales de pulpa dental.

Para el experimento fueron empleadas células troncales de pulpa dental que fueron obtenidas de un tercer molar. Fueron sembradas por método del explante. Las células extraídas fueron cultivadas en condiciones estándar de cultivo utilizando medio D-MEM 15 con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico-antimicótico y 1% de glutamina. Las células fueron expandidas en cajas de cultivo de 25 mm² con 2 mL del D-MEM hasta obtener un total de 1 millón de células y fueron recuperadas por tripsinización, de las cuales 480 mil células fueron empleadas en el primer ensayo y las demás fueron congelada y empleadas para el segundo ensayo. Las células recuperadas para ambos experimentos fueron sembradas en 4 placas de 24 pocillos con una concentración de 5 mil células por 300 µL de D-MEM. Al día siguientes fueron lavadas dos veces con amortiguador de fosfatos (PBS) que contienen 1% de antibiótico-antimicótico, para remover todas las células que no sobrevivieron al proceso de recuperación (Figura 29).



Figura 29. Expansión del cultivo celular. Los cambios de medio y tripsinización fueron realizados en una campana laminar con el uso de material estéril.

Protocolo 2. Ensayo de estimulación eléctrica.

Las placas fueron asignadas a un determinado nivel de estimulación magnética. Las cuales fueron realizadas con imanes de neodimio (1 T), imanes de ferrita (600 mT) y un inductor de hierro (1 mT); para experimentar con los estímulos magnéticos mencionados en el apartado 2.3.6.1.

Para el estudio se realizaron dos ensayos donde se emplearon 4 placas en el primero; una para cada estímulo y una de control que no fue estimulada por ningún campo magnético. Para el segundo ensayo se emplearon 3 placas una por cada estímulo.

Los ensayos de estimulación se dividieron en dos periodos, el primero tuvo una duración de 4 días seguidos y se estimularon por 30 minutos, y el segundo de 3 días sin estimulación.

Se realizaron dos ciclos de estimulación en el primer ensayo y para el segundo se realizó un solo ciclo. En la Figura 30 se observa la distribución de los pocillos en ambos ensayos.

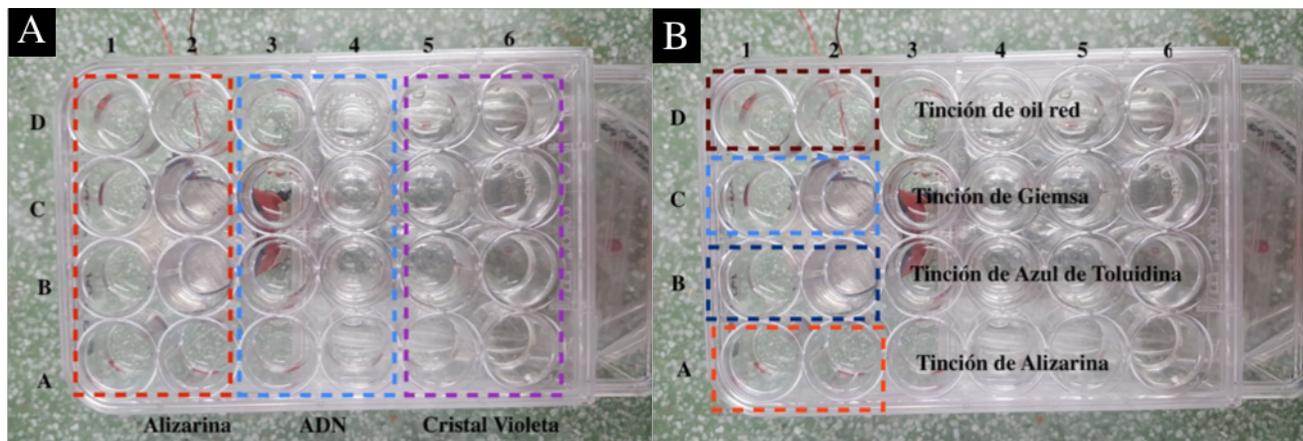


Figura 30. Distribución de los cultivos en una placa de 24 pocillos. La imagen A muestra la distribución de pocillos para los experimentos del ensayo 1 y la imagen B muestra la distribución de los pocillos para el ensayo 2.

Protocolo 3. Tinción con rojo de alizarina.

Para la tinción de depósitos de calcio, primero fue retirado el medio que contenía. Para quitar posibles contaminantes fueron lavadas dos veces con 300 μ L de PBS, posteriormente fueron fijados con PFA al 4% durante 1 hora. Para retirar el PFA fueron lavadas otras dos veces con 300 μ L de PBS. Al teñirla se emplearon 300 μ L de rojo de alizarina al 2% durante 4 minutos. Para retirar el exceso de colorante fueron lavadas 3 veces con agua destilada y durante 5 minutos por cada lavada. Al concluir la tinción fueron observadas en el microscopio para observar los depósitos de calcio en los días 0, 7 y 14.

Protocolo 4. Tinción con Azul de Toluidina

Para la identificación de tejido cartilaginoso fue empleado la tinción con azul de Toluidina, la cual tiñe compuestos de la matriz extracelular como grupos de proteoglicanos y glicosaminoglicanos propios del cartílago. Primero fue retirado el medio que contenía. Para quitar posibles contaminantes fueron lavadas dos veces con 300 μ L de PBS, posteriormente fueron fijados con HCl con concentración molar de 0.1% durante 5 minutos. Luego fueron teñidos con 300 μ L de azul de toluidina durante 1 hora con 30 minutos. Para retirar el exceso de colorante fueron lavadas con 300 μ L de HCl con concentración molar de 0.1% durante 5 minutos. Por último fue retirado el exceso de HCl empleando agua destilada durante 5 minutos. La tinción fue realizada el día 7.

Protocolo 5. Tinción con Oil Red

El Oil Red es un colorante empleado para teñir lípidos. Su principal uso es el reconocimiento de cuerpos lipídicos. Primero se fijan los cultivos como se ha mencionado en el protocolo 3. Luego fueron lavados con isopropanol al 60% durante 1 minuto. Posteriormente fueron tenidos con 300 μ L de solución Oil Red durante 5 minutos. Se repitió el lavado con isopropanol y finalmente fueron lavadas con Agua destilada. La tinción fue realizada el día 7.

Protocolo 6. Tinción con Cristal Violeta

El Cristal violeta fue empleado para identificar la morfología de las células al poder resaltar la membrana celular, la membrana nuclear entre otros componentes. Para esta tinción fueron fijados como lo menciona el protocolo 3. Posteriormente fueron teñidas con 300 μL de Cristal violeta durante 5 minutos dentro de la incubadora. Posteriormente fueron lavadas 2 veces con agua destilada. En el primer experimento fueron teñidos los días 0, 7, 14. En el segundo experimento el día 7.

Protocolo 7. Tinción con Giemsa

Fue empleada la Tinción de Giemsa. Una tinción especializada para la identificación de diferentes morfologías. Primero fueron fijadas las células con PFA durante 1 hora y media. Después fueron teñidas con 150 μL de giemsa por pocillo, al transcurrir 2 minutos fueron diluidos y agitados con agua destilada por 2 minutos. Por último fue retirado el colorante diluido y luego fueron lavadas con agua desionizada.

Protocolo 8. Proliferación celular.

Para la Proliferación celular, fueron sembrados 5 mil células en 100 μL en placas de 96 pocillos. Se colocó una placa por cada tipo de estímulo y una placa de control negativo y positivo. Al control positivo fueron cultivadas las células de forma normal y al control negativo fueron alimentadas con etanol para detener su crecimiento. Los estímulos se realizaron 3 días seguidos. Después de cada estímulo fueron agregados 20 μL de resazurina por pocillo. El estudio se realizó por triplicado. Luego fueron incubados durante una hora en la incubadora, para evitar que la luz descompusiera la resazurina. Por último fueron leídas en un lector de placa de absorbancia y posteriormente se les cambió el medio.

Protocolo 9. Elección de estímulos eléctricos.

Para estudiar el comportamiento de las células bajo efectos de estímulos eléctricos, fue necesario valorar si se llevaban a cabo por corriente eléctrica o campo magnético. Las pruebas de estimulación con corriente eléctrica fueron realizadas con estímulos de 32 μA en corriente continua, empleado electrodos de inserción de 20 μm diseñadas para lectura y estimulación eléctrica. Las estimulaciones se realizaron en lapsos de 30 minutos, los cuales determinaron que existe cambios al existir cuerpos de proteínas desnaturalizadas.

Protocolo 10.- Selección de transductores

Para la selección de componentes fueron evaluadas las propiedades magnéticas de diversos materiales con el fin de poder diseñar y construir transductores que se puedan emplear para el estudio. Fueron analizados materiales paramagnético como la ferrita sin magnetizar, magnetita, hierro y acero inoxidable. El tamaño del sensor y tipo de bobina fueron seleccionados al tamaño y forma que se consiguieron en el momento, esto debido a la falta de disponibilidad. Al final se decidió emplear un inductor senoidal con hierro dulce con capacidad de crear campo eléctrico cercanos a los 1 mT. Para poder comparar el efecto de la intensidad del campo se decidió emplear imanes de ferrita y neodimio. Los cuales crean campos de 1 T y 600 mT respectivamente (Figura 31).

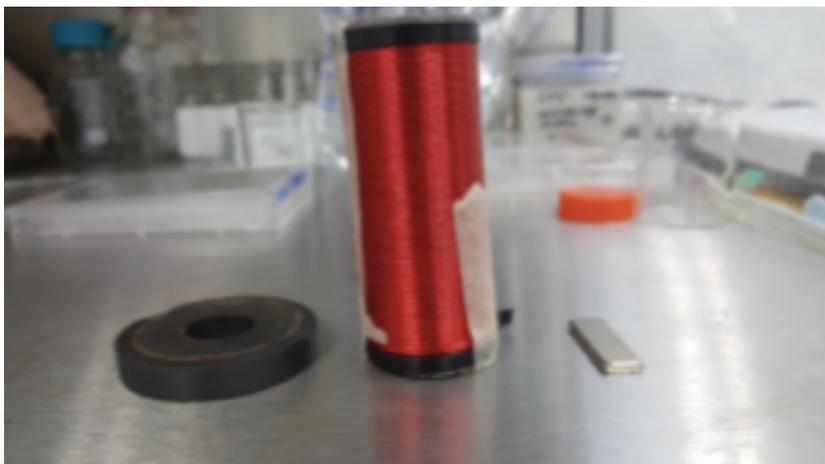


Figura 31. Selección de transductores. Los imanes de Neodimio, Ferrita e Inductor.

Protocolo 11. Medición eléctrica del cultivo celular

Para medir las características eléctricas fue empleado un medidor RCL a 1 V con 100 Hz de frecuencia y un multímetro (Truper). Fueron medidos los valores de corriente, voltaje, resistencia, inductancia y capacitancia a través del uso de placa paralelas y en el caso de la inductancia, un inductor senoidal (Figura 32). Fueron medidos los medios DMEM 15 con suero fetal bovino sin estímulo, con estímulo de neodimio, inductor, ferrita y el medio osteogénico, el cual contiene medio DMEM con suero fetal bovino al 10%, 0.0025 g de ácido ascórbico, 0.11 de β -glicinafosfato y 50 μ L de Dexametasona.

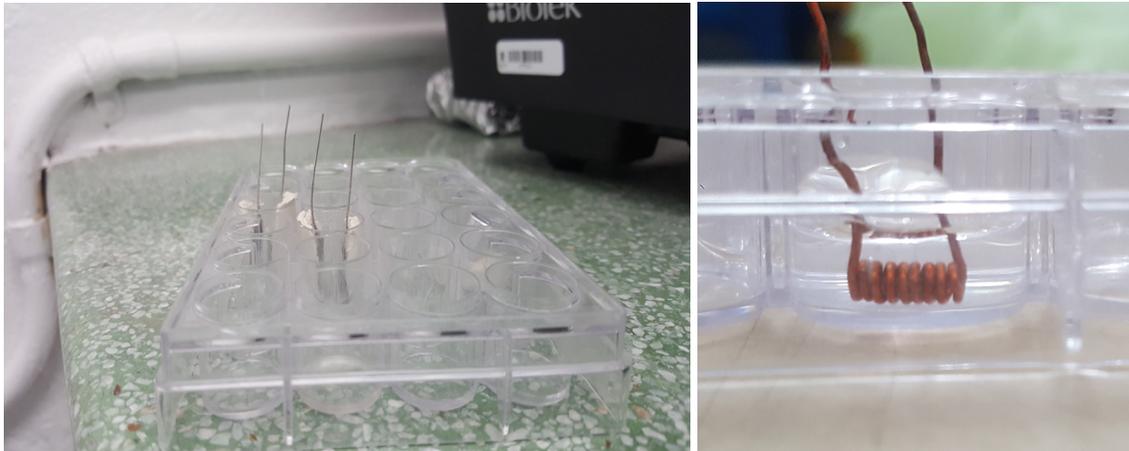


Figura 32. Medición de Medios. Las características eléctricas del medio fueron medidos a través del uso de placas paralelas. Y la medición de las características magnéticas a través del uso de una bobina senoidal.

Protocolo 12. Medición del pH

Después de cada estimulación de 30 minutos, el medio fue retirado de la placa y se recolectaron 2 ml de medio en un tubo Falco. Se midió el nivel de pH a una temperatura de 25° C. Para poder visualizar los cambios químicos dentro del medio por el campo magnético. Para medir el pH se empleó un potenciómetro (BK Precision, 889B).

Protocolo 13. Medición de la característica eléctrica de la célula.

Para la medición de características eléctricas de las células fue necesario expandir un cultivo a 1 millón de células. El cultivo fue tripsinizado y centrifugado para extraer las células. Luego fueron decantadas y colocadas en un caja de Petri para formar un botón de 1 cm de largo, por último fue medida la capacitancia y resistencia por medio de un multímetro.

Protocolo 14. Cálculos de características del medio y estímulo.

Los valores seleccionados fueron lo siguientes:

La Ferrita produce un campo magnético de valor cercano a 600 mT , de acuerdo a la información del proveedor (Mercadolibre, 2018).

El neodimio produce un campo magnético de 1 T, de acuerdo a la información del proveedor (Fmagnet Xinfeng, 2012).

Para obtener un valor en el rango de los militeslas fue empleo una bobina senoidal, el cual fue prestada por el CINVESTAV.

Para calcular el valores de campo del inductor senoida fue empleada la formulas (Ecuación 47).

$$B = \frac{\mu NI}{L} \quad (47)$$

Donde N es el número de vueltas, I es la corriente que circulo en el inductor, μ es la permeabilidad magnética y L es la longitud. Empleando la Ecuación 17 para calcular la permeabilidad relativa del medio

$$\mu = \mu_0 \cdot \mu_r \quad (17)$$

$$N = 34$$

$$L = 0.089 \text{ m}$$

$$I = 10 \text{ mA}$$

La permeabilidad relativa del hierro es de 200 (Referencia).

$$\mu_r = 200$$

$$\mu = \mu_0 \mu_r = (200)(4\pi \times 10^{-7} \text{ N/A}^2) = 251 \mu\text{N/A}^2$$

El valor del campo magnético es de 1 mT.

Calculo de las características eléctricas.

Con los valores obtenidos a través del método de la placa paralela (Voltaje, resistencia, corriente y capacitancia) y de la bobina senoidal (Inductancia). Fue posible obtener las siguientes características eléctricas del medio:

Conductividad:

Empleando la Ecuación 15 y conociendo las dimensiones de las placas paralelas:

$$\sigma = \frac{\ell}{RS} \quad (15)$$

Campo Eléctrico:

El campo eléctrico se calcula a través del voltaje registrado empleado la Ecuación 2

$$V_{AB} = \int_A^B E \cdot dl = El \quad (2)$$

Definiendo los parámetros l y despejando la Ecuación 2, obtenemos la Ecuación 2a

$$E = \frac{V_{AB}}{l} \quad (2a)$$

La cuales se empleó para calcular los valores de intensidad de campo eléctrico.

Permitividad eléctrica:

La permitividad del campo eléctrico se calcula a partir de los valores de R y C, sabiendo que el tiempo de relajación (τ) es igual al producto de R y C. Igualando la Ecuación 18 y

$$\tau = \varepsilon/\sigma \quad (18)$$

$$\tau = RC \quad (48)$$

Si τ es igual al producto de RC , entonces:

$$\varepsilon = RC\sigma \quad (18a)$$

Densidad de corriente

La densidad de corriente se calculó a partir de la conductividad y el campo eléctrico, empleando la Ecuación 33:

$$J = \sigma E \quad (33)$$

Densidad de flujo:

La densidad de flujo eléctrico se determina partir del voltaje y la capacitancia de medio, lo cual representa la carga encerrada (Ecuación 49).

$$\psi_e = Q = CV \quad (49)$$

Densidad de flujo eléctrico:

La densidad de flujo eléctrico se obtiene definido la superficie a partir de la ecuación (Ecuación 25).

$$\psi_e = \oint \mathbf{D} \cdot d\mathbf{S} = Q \quad (25)$$

Y despejando la Ecuación 11 obtenemos la Ecuación 11a:

$$D = \frac{\psi_e}{S} \quad (25a)$$

Susceptibilidad eléctrica:

La susceptibilidad eléctrica se obtiene de la densidad de flujo D a partir de la Ecuación 40.

$$\vec{D} = \epsilon_0 \epsilon_r \vec{E} \quad (40)$$

La densidad de flujo posee dos partes el efecto que posee el campo eléctrico con respecto a la permitividad eléctrica del vacío y a la polarización del medio (Ecuación 36).

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (36)$$

Despejando la Ecuación 36 podemos calcular la polarización del medio, considerando que los vectores de campo eléctrico y densidad de flujo alcanza su máximo valor.

$$D - \epsilon_0 E = P \quad (36a)$$

Con el valor de la polarización se puede calcular la susceptibilidad del medio, al despejar la Ecuación 37:

$$\vec{P} = \chi_e \epsilon_0 \vec{E} \quad (37)$$

Calculo de las características magnéticas

Para las características magnéticas se empleo el protocolo 10. Se caracterizaron los estímulos magnéticos y el efecto del estímulo en un pocillo.

Permitividad magnética:

Empleando el inductor senoidal como lo indica el protocolo 10. Los valores de inductancia fueron obtenidos por un medidor RLC(BK Precision, 889B).

$$L = \frac{N^2 \mu S}{l} \quad (49)$$

Despejando la Ecuación 49 se obtiene :

$$\mu = \frac{Ll}{N^2S} \quad (49a)$$

Intensidad del campo magnético:

Con los valores del campo magnético de cada estímulo y calculando los valores de permeabilidad magnéticos, se obtuvieron los valores de la intensidad del campo magnético por medio de la Ecuación 20.

$$B = \mu H \quad (20)$$

Despejando la Ecuación 20, se obtuvo H.

$$H = B/\mu \quad (20a)$$

Permeabilidad magnética relativa:

La permeabilidad relativa del medio se calculó a partir de la Ecuación 17.

$$\mu = \mu_r \mu_0 \quad (17)$$

despejando μ_r de la Ecuación 17, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\mu_r = \frac{\mu}{\mu_0} \quad (17a)$$

Densidad de Flujo magnético:

La densidad del flujo magnético se calculó por medio de la Ecuación 25.

$$\psi_m = BS \quad (25)$$

Conociendo las dimensiones del pocillo $S = 0.00402 \text{ m}^2$.

Cálculo de la Energía

La energía fue caracterizada para entender que efectos químicos puede tener debidos al estímulo y al campo eléctrico del medio.

Densidad de energía eléctrica:

La densidad de energía originada por las características eléctricas del medio, se calcularon a partir de la Ecuación 46.

$$\omega_e = \frac{1}{2} \varepsilon E^2 V \quad (46)$$

La densidad de energía magnética se calcula a partir de la Ecuación 32.

$$\omega_m = \frac{1}{2} \mu H^2 V \quad (32)$$

Las fuerzas de Lorenz fueron calculadas para observar la fuerza que fue necesaria para producir la electroforesis en cada uno de los tipos de estímulo; Se considera la carga neta producida por la polarización del medio antes del estímulo y posterior al estímulo. Para establecer la movilidad neta de las partículas en el medio, se calculó el valor del tiempo de relajación, empleando la Ecuación 11.

$$\tau = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (11)$$

La movilidad μ_e es igual al inverso del tiempo de relajación.

$$\mu_e = \frac{1}{\tau} \quad (11b)$$

La carga neta de los medio se obtuvo a partir de la Ecuación 39:

$$C = Q/V \quad (39)$$

Despejando se obtiene la carga.

$$Q = CV \quad (39a)$$

La fuerza de Lorentz se calcula a partir de la Ecuación 27.

$$\mathbf{F}_t = \mathbf{F}_e + \mathbf{F}_m = q\mathbf{E} + q(\mathbf{u} \times \mathbf{B}) = q(\mathbf{E} + \mathbf{u} \times \mathbf{B}) \quad (27)$$

Donde fueron considerados los valores eléctrico del medio sin estímulo y las características del estímulo, y se visualiza como la fuerza inicial.

La fuerza final se calculó a partir de campo magnético y la características eléctricas del medio posteriores al estímulo.

Calculo de las características de las células.

Considerando el modelo ECIS, que muestra que los componentes celulares se comportan de forma eléctrica, se considera que la capacitancia C y resistencia R de 1 millón de células, representan la sumatoria en serie de 1 millón de capacitores y resistencias del mismo valor, por lo la ecuación que la representan son las siguientes:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_1} + \frac{1}{C_2} \quad (40)$$

Considerando que todas las células poseen la misma capacitancia, la C_1 , C_2 hasta $C_{1\text{millón}}$ poseen el mismo valor C_n , por lo cual la suma se representa con la siguiente ecuación.

$$\frac{1}{C} = 1000000 \frac{1}{C_n} \quad (41)$$

Despejando la Ecuación 41 se obtiene la siguiente ecuación:

$$Cn = 1000000C \quad (42)$$

En el caso de la resistencia eléctrica la suma de resistencia se representa de la siguiente manera:

$$R = R_1 + R_2 \quad (43)$$

Considerando que la resistencia de todas las células poseen las misma resistencia, es decir, la resistencia R_1 , R_2 hasta $R_{1 \text{ millón}}$ poseen el mismo valor R_n , R queda representada con la siguiente ecuación:

$$R = 1000000R_n \quad (44)$$

Despejando la Ecuación 44 se obtiene la siguiente ecuación:

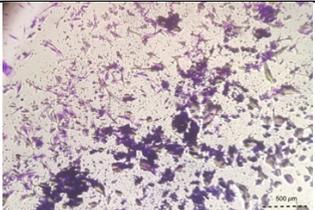
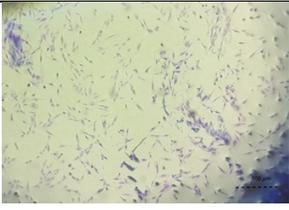
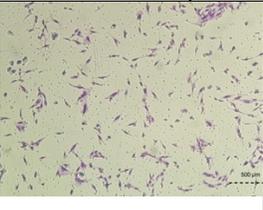
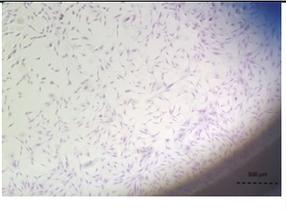
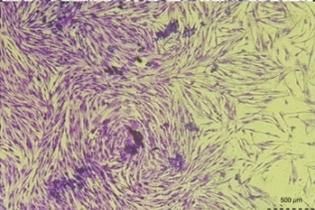
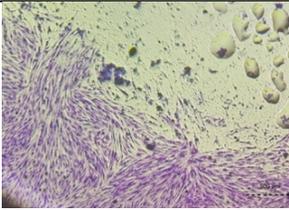
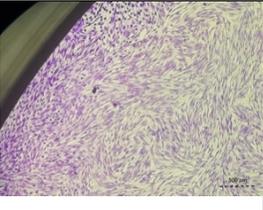
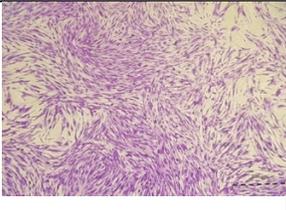
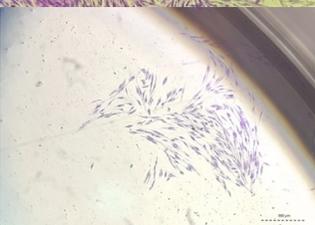
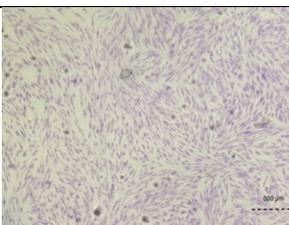
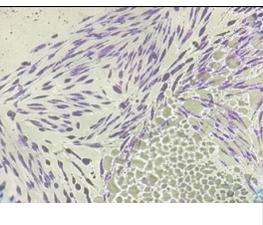
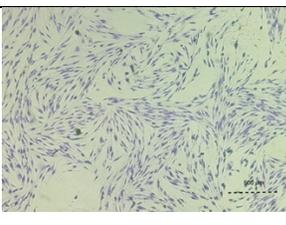
$$R_n = \frac{R}{1000000} \quad (45)$$

7. Resultados

7.1. Análisis Morfológico con Cristal violeta.

Para la identificación de estructuras se emplearon los protocolos 3 y 6. Para la visualización de los cultivos fue empleado un microscopio invertido con lentes de 4x, 10x y 20x. Los resultados con la tinción de cristal violeta se visualizan en la Tabla 8.

Tabla 8. Tabla comparativa de la morfología celular. Se observaron cada una de las placas en los días 1, 7 y 14. Como se observa, en el día 7 se obtuvo la mayor fluctuación de células. Al llegar al día 14 el cultivo está en declive.

	Estimulación baja(Inductor)	Estimulación Media (Imán de Ferrita)	Estimulación Alta (Imán de Neodimio)	Células de control
Día 1				
Día 7				
Día 14				

Desde el primer día del experimento, se observaron cuerpos amorfos que se colorearon de un tono violeta, lo cual determina que poseen componentes de la membrana celular (Figura 33)

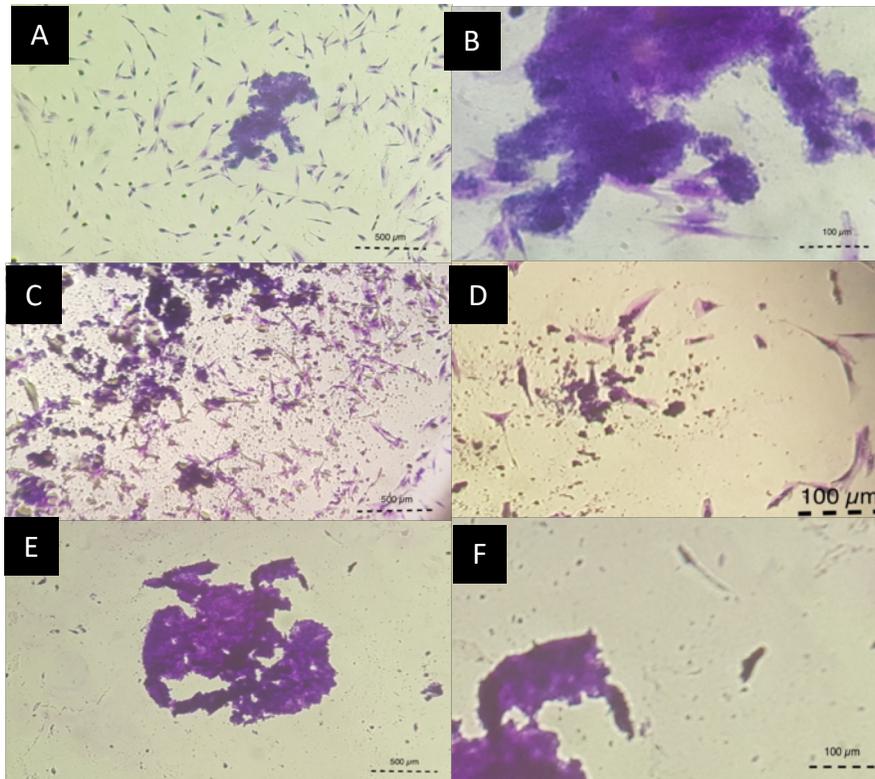


Figura 33. Tinción de cuerpo amorfo. Las fotos tomadas en el microscopio muestran la presencia de cuerpos extraños en placa que se sometían a estimulación. Se observó mayor cantidad en los cultivos con neodimio (e y f). En segundo lugar los cultivos con ferrita (c y d) y en menor cantidad los cultivos con inductor (a y b).

El tamaño de estos cuerpos amorfos tienen una relación directa con la cantidad de células presentes en su proximidad. Los cultivos estimulados con el inductor presentan células completas y células de forma circular, las cuales perdieron gran parte de su membrana. En el caso de los cultivos con ferrita se observó el aumento de la cantidad de estos cuerpos y la disminución de células cercanas. Con el neodimio aparecieron cuerpos amorfos de mayor tamaño, menor cantidad o nula cantidad de células en su cercanía. Como se observa en la Tabla 6, los cuerpos amorfos disminuyeron su presencia en las tinciones posteriores hasta casi desaparecer.

En el día 7 del experimento las células proliferaron ocupando casi toda la totalidad de los pocillos y con presencia de diversas morfologías celulares. Principalmente células

alargadas de longitudes de entre 200 μm a 400 μm (Figura 34) y células con forma hexagonal redondeada (Figura 35) y células con o sin proyecciones (Figura 36)

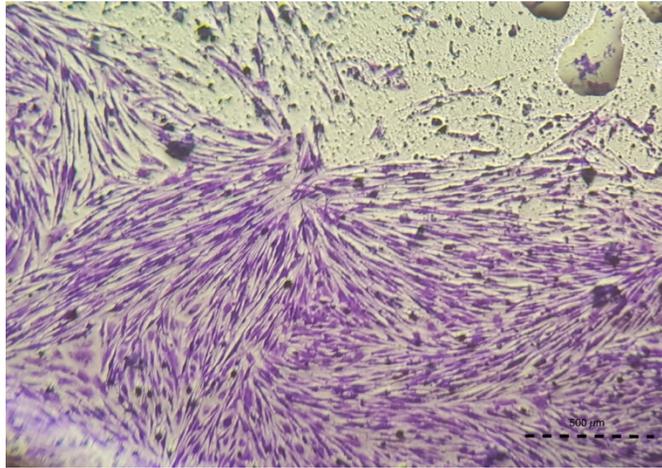


Figura 34. Células alargadas. Estas células tienen a distribuirse de forma paralela lo cual describe una orientación ordenada. En todos los pocillos donde se presentaron también aparecieron otros tipos de morfología. La foto fue tomada de la placa de estimulación con ferrita y fue en esta placa donde se presentó mayor cantidad de ellas.

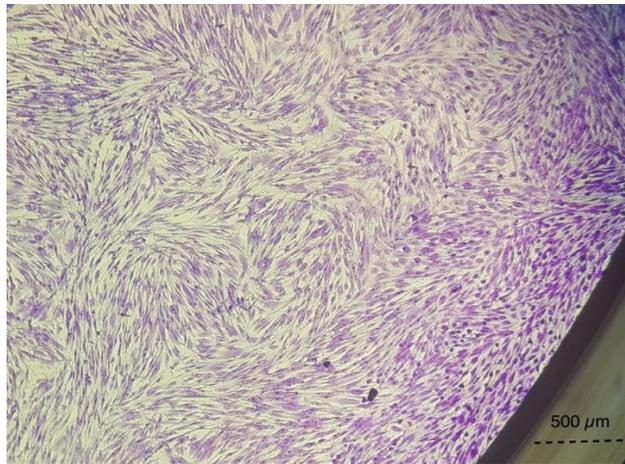


Figura 35. Células con forma hexagonal. Estas células se presentaron con mayor cantidad en cultivos estimulados con ferrita, Esta morfología se presentó con mayor densidad en células cercanas a los bordes del cultivo y en espacios pequeños redondeados donde existen células alargadas. La foto fue tomada de la placa estimulada con ferrita.

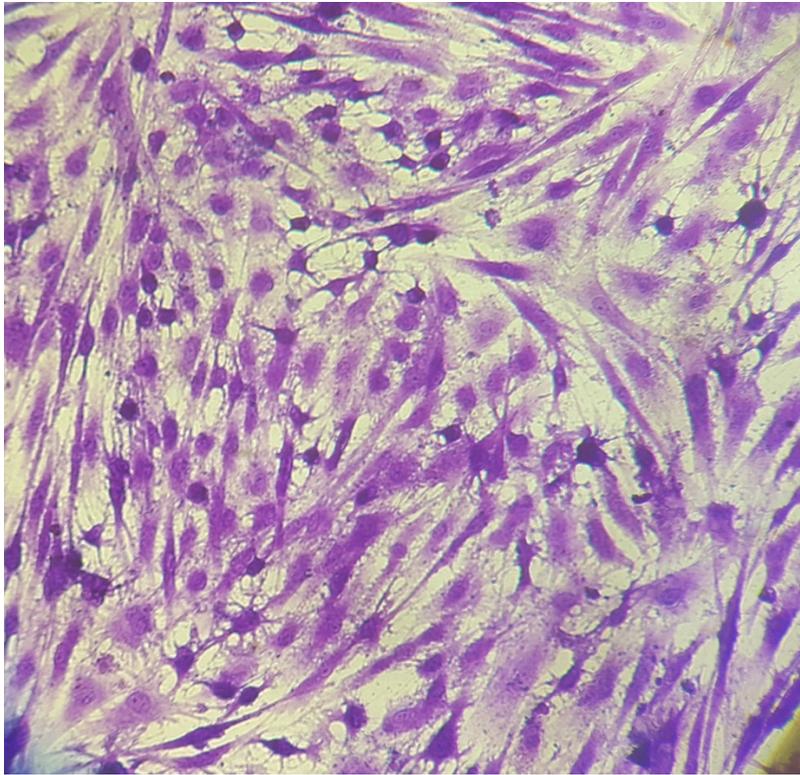
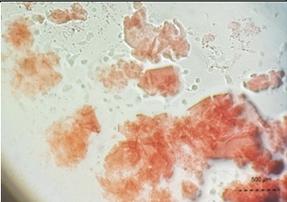
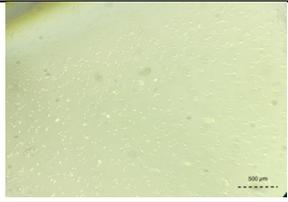
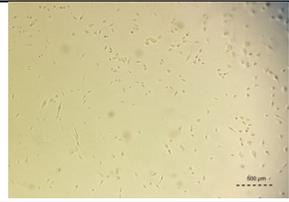
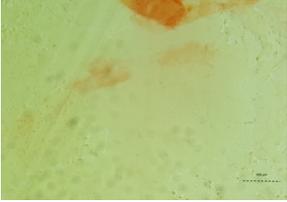
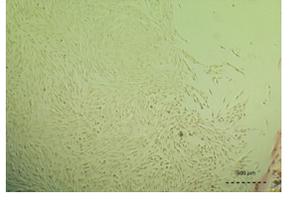
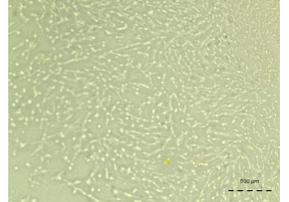
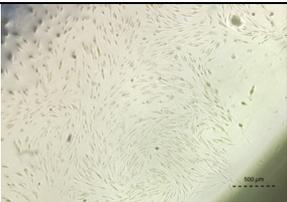
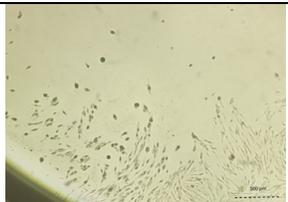
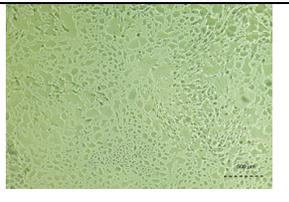
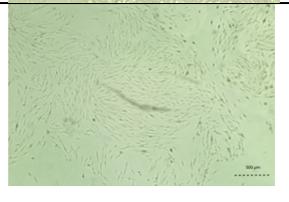


Figura 36. Células con proyecciones. Estas células se presentaron en casi todos los cultivos y se ubicaron en grupos y en los bordes de los pocillos. Las proyecciones se originaban principalmente en los extremos de las células, los cuales tienden a ramificarse con prolongaciones del mismo tamaño o con mayor longitud. La foto fue tomada en la placa estimulada con neodimio.

7.2. Análisis de depósitos de Calcio con Rojo de Alizarina

Se pudieron observar diversos cuerpos que poseían moléculas de calcio, como se ve en la tabla 9.

Tabla 9. Análisis de depósitos de calcio. Se presentaron en algunos pocillos principalmente con estimulación de un inductor.

	Estimulación baja (Inductor)	Estimulación Media (Imán de Ferrita)	Estimulación Alta (Imán de Neodimio)	Células de control
Día 1				
Día 7				
Día 14				

La tinción reveló la existencia de diversos cuerpos, similares a los cuerpos observados en el análisis morfológico (Figura 37). Pero debido a su forma no muestran la existencia de depósitos de calcio.

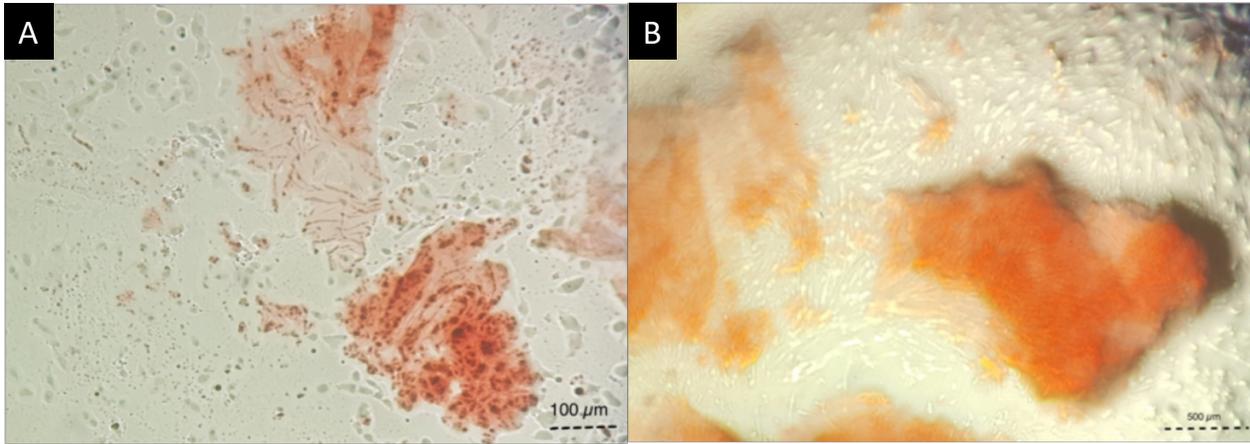


Figura 37. Presencia de Calcio. La presencia de calcio fue observada en forma de capas entre las células (A) y encima de ellas (B). Se presentaron en todas la placas que fueron estimuladas magnéticamente. La foto (A) fue tomada de la placa estimulada con un inductor y la foto (B) fue tomada de la placa estimulada con ferrita.

La presencia de calcio también se observó dentro de la célula principalmente en los núcleos y cerca de ellos, como se observa en la Figura 38.

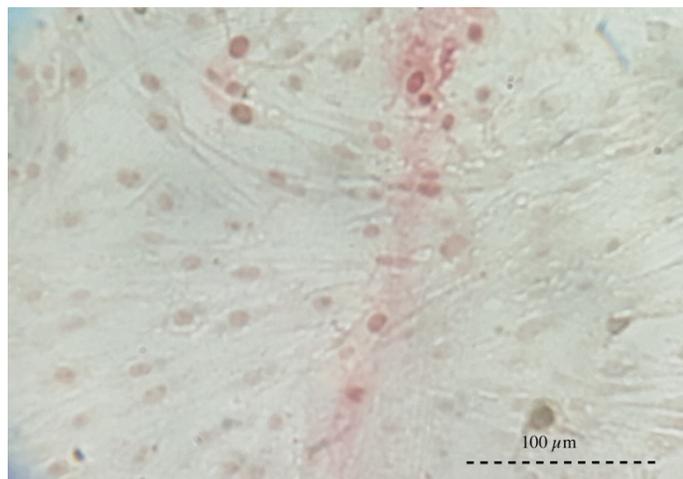
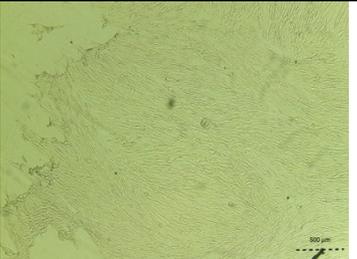
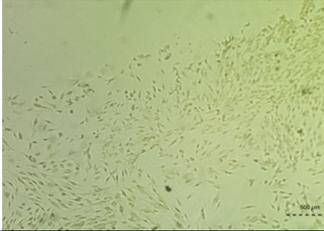
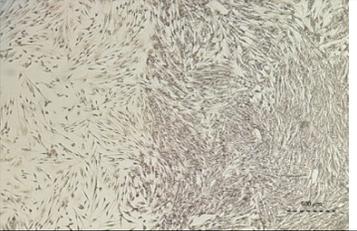
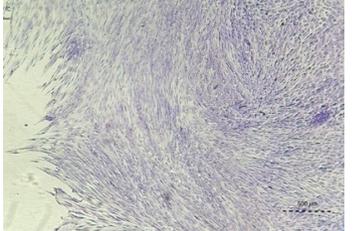
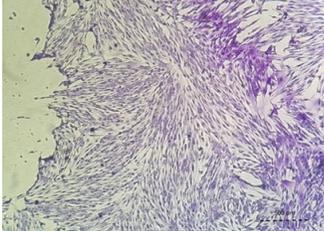
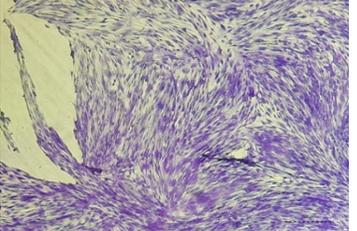
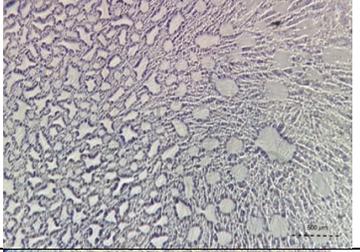
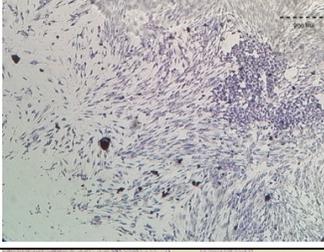
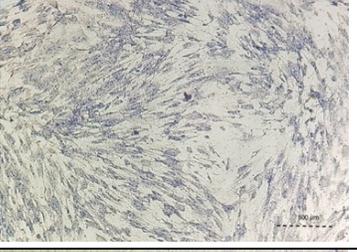
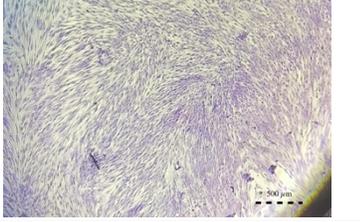
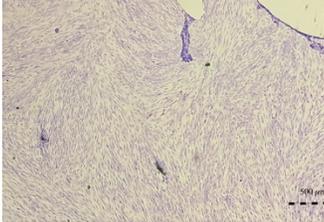
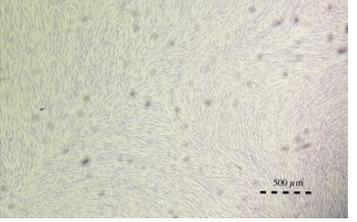


Figura 38. Depósitos de Calcio. Los depósitos de calcio se presentaron en algunas regiones dentro de la célula tiñendo sus núcleos. La foto fue tomada de una placa estimulada por neodimio.

7.3. Tinciones del Ensayo 2

Se emplearon tinciones para determinar la existencias de células cartilagosas, neuronales y musculares. En la tabla 10 se observa los resultados de las tinciones.

Tabla 10. Tinciones del experimento 2. Las tinciones fueron realizadas en el día 7. En ellas se aprecia la presencia muy baja de lípidos y la nula aparición de depósitos de calcio, el Azul de toluidina muestra presencia de redes, conexiones de las células y núcleos celulares con la tinción de Giemsa.

Tinciones	Neodimio	Ferrita	Inductor
Oil Red			
Rojo de alizarina			
Cristal violeta			
Azul de Toluidina			
Tinción de Giemsa			

Los resultados del experimento mostraron la presencia de células redondeadas, las cuales presentan depósitos de lípidos (Figura 38). Con la tinción de azul de toluidina se aprecia de forma detallada de las células redondeadas (Figura 39).

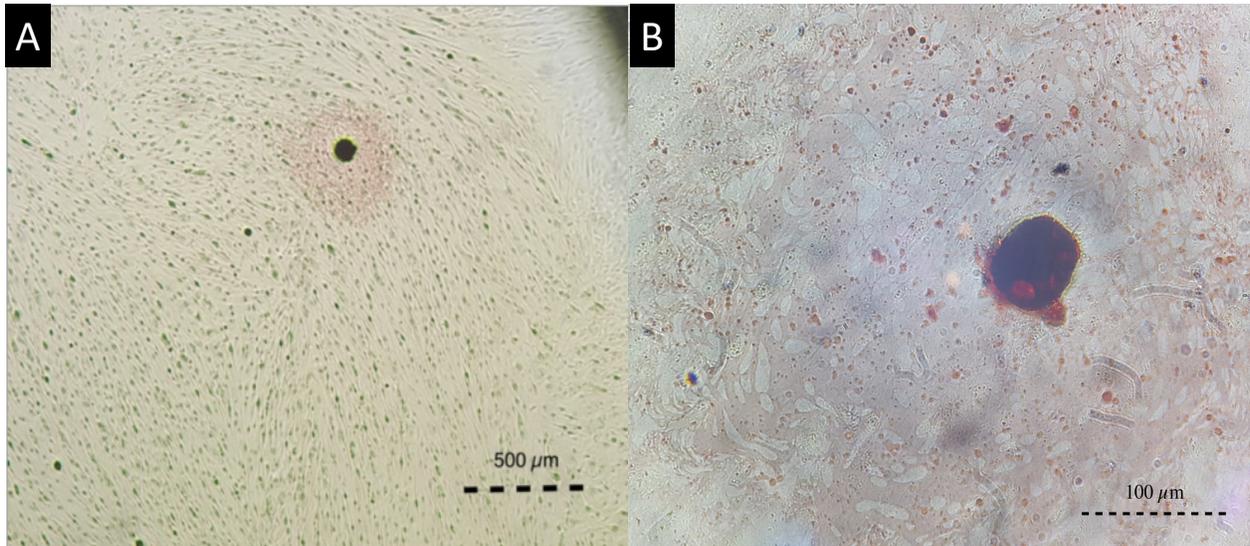


Figura 39. Depósitos de lípidos. La coloración roja observada es de moléculas lipídicas presentes en el medio extracelular (B). Entre las células se pueden observar depósitos de lípidos en forma de gotas (B). Las fotos (A) y (B) fueron tomadas de la placa estimulada con neodimio en el día 7.

Analizando otros pocillos fueron observadas células parecidas a las de la imagen 39. Estas fueron encontradas en la tinción de azul de toluidina (Figura 40).

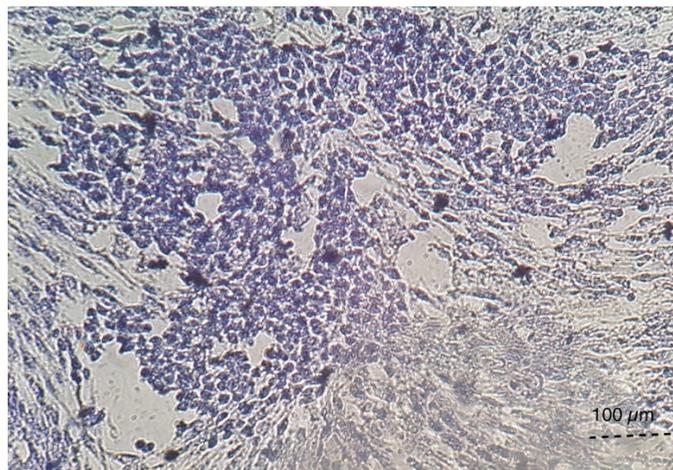


Figura 40. Células redondeadas. Estas células se presentan en grupos relativamente grandes y a comparación con el primer ensayo, estas no poseen proyecciones. La foto fue tomada de la placa estimulada con ferrita en el día 7.

Al continuar analizando las imágenes del la tinción azul de toluidina se observaron redes de células que poseían anclajes entre ellas (Figura 41 a).

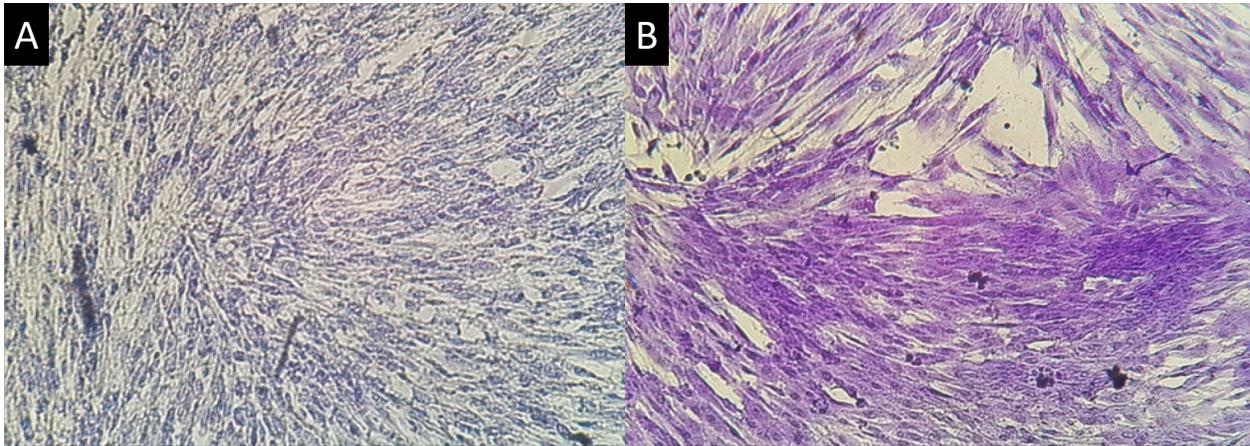


Figura 41. Acoplamiento celular. Las células se entrelaza disminuyendo el espacio extracelular formando tejidos maduros. Esta integración se observó en todas la placas estimuladas magnéticamente. La foto (A) fue tomada en la placa estimulada con neodimio y la foto (B) fue tomada en la placa estimulada con ferrita, ambas en el día 7.

En algunas tinciones se observó la presencia de células sin adición al plástico, estas células poseían puntos de anclaje con otras células vecinas, esto muestra que están formado tejido maduro (Figura 41 b). Y en este caso, la unión del anclaje permite tener células sin adición al plástico (Figura 42).

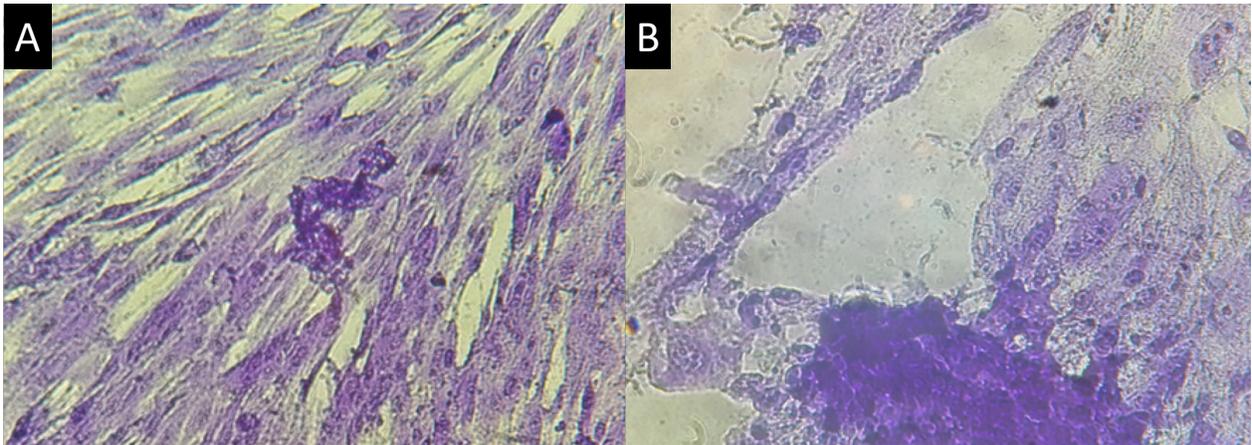


Figura 42. Desprendimiento del suelo. Las células presentes en estas fotos muestra la formación de células que se adhieren de otras células sin adherencia al plástico. Lo cual origina la formación de nuevas capas celulares. Las fotos fueron tomadas de la placa estimulada con ferrita.

En las tinciones con Giemsa, se observó la presencia de células multinucleares y células de coloración más intensa (Figura 43).

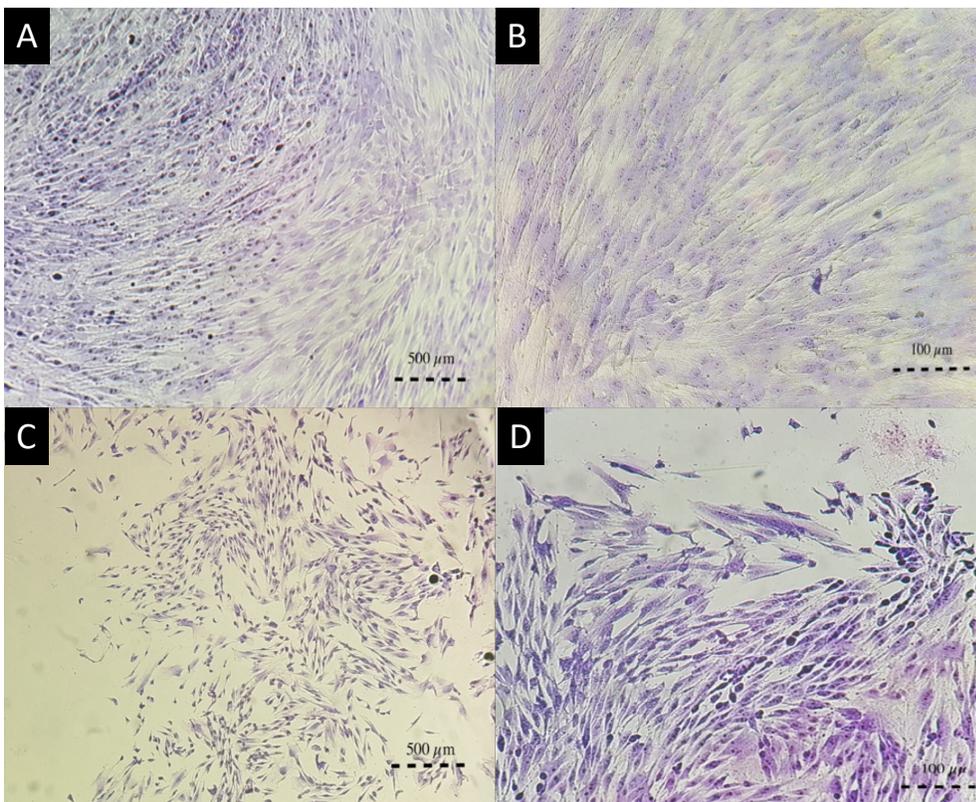


Figura 43. Núcleos celulares. La tinción de Giemsa mostró la presencia de células con múltiples núcleos y células con un núcleo. La fotos (a) y (b) fueron tomadas del pocillo estimulado con ferrita y las fotos (c) y (d), fueron tomadas del pocillo estimulado con inductor, todas en el día 7.

Los cultivos presentaron estructura de matriz extracelular debajo de ellas formando conexiones entre las células, como se observa en la Figura 44.

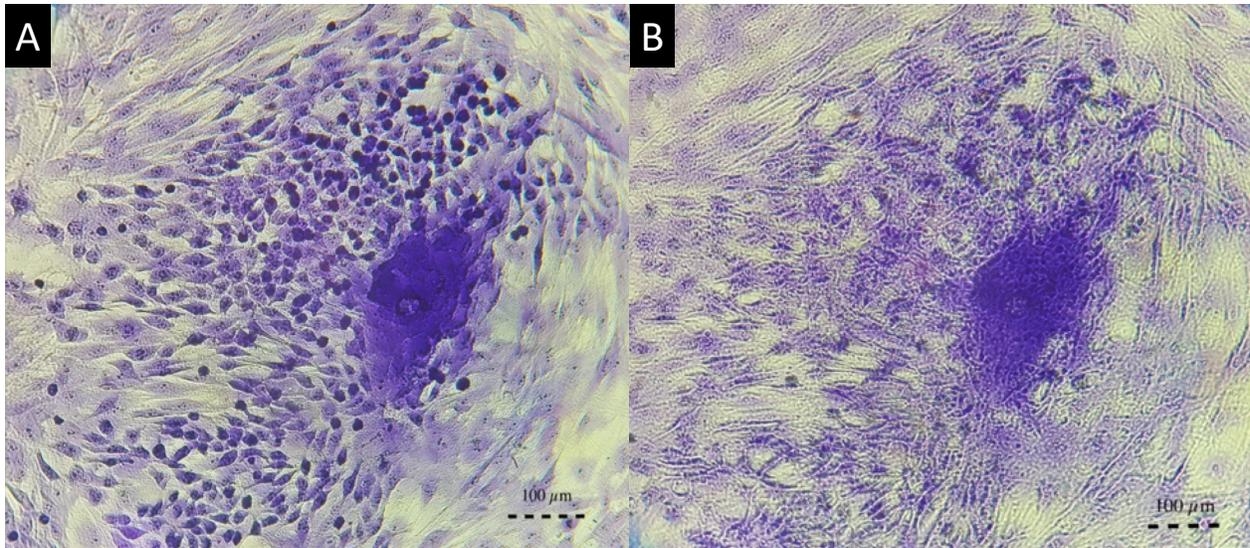


Figura 44. Canales celulares. En diversas foto se encontraron canales formados por matriz extracelular que intercomunica a las células circulares, las fotos fueron tomadas del pocillo estimulado con neodimio en el día 7.

Se observaron células que se encontraban suspendidas y se mantenía unidas debido a proteínas de anclaje con otras células, como se muestra en la figura 45.

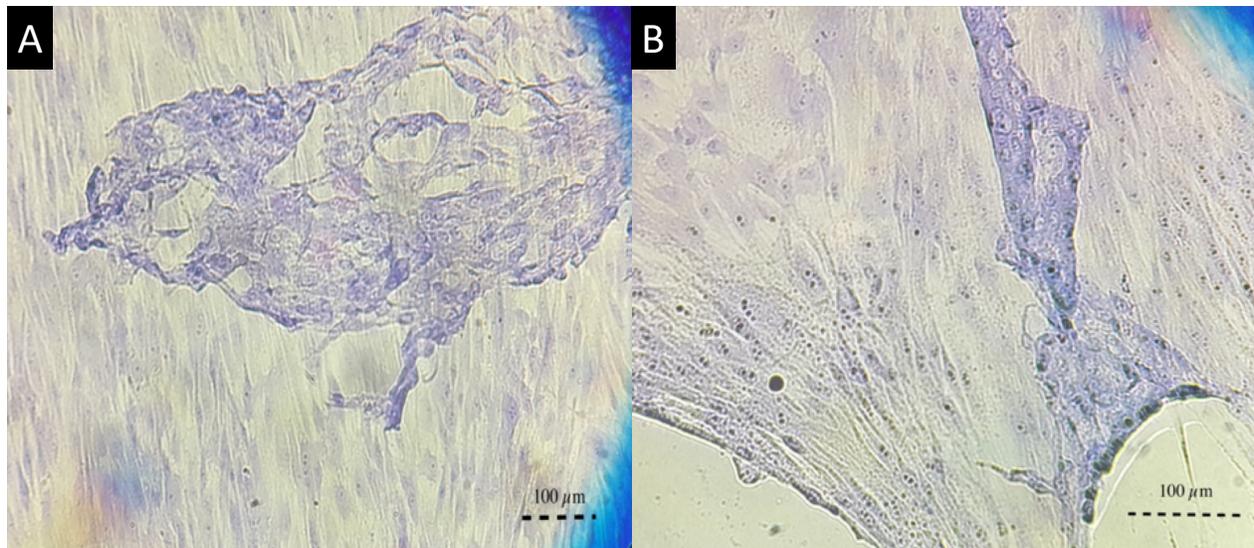


Figura 45. Células ancladas. La tinción mostró la presencia de múltiples células interconectadas, semejando una monocapa de tejido, las fotos fueron tomadas del pocillo estimulado con ferrita en el día 7.

7.4. Efecto del campo magnético sobre la proliferación celular

La prueba de proliferación se realizó durante 3 días seguidos empleando resazurina para ver el crecimiento de la población celular por cada estímulo, en la figura 46 se observa el comportamiento de los cultivos.

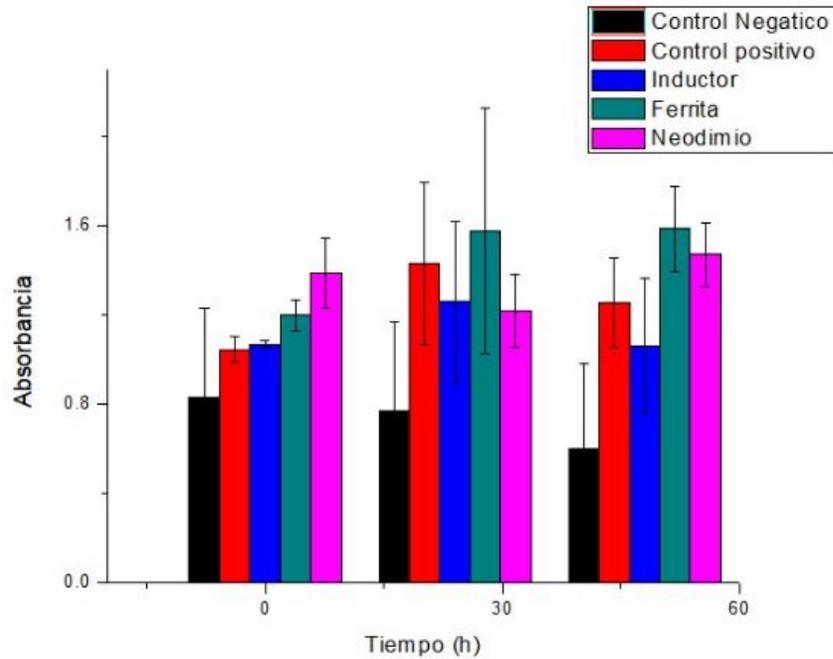


Figura 46. Proliferación celular. En la gráfica se aprecia el periodo de crecimiento celular de un cultivo. El control positivo es un cultivo sin estímulo y el control negativo es un cultivo que se le agregó etano para frenar su crecimiento. Las población celular de los pocillos estimulados siguió creciendo.

Al comparar la diferencia de control negativo con respecto al valor de los demás medio se obtuvo el siguiente análisis (Figura 47).

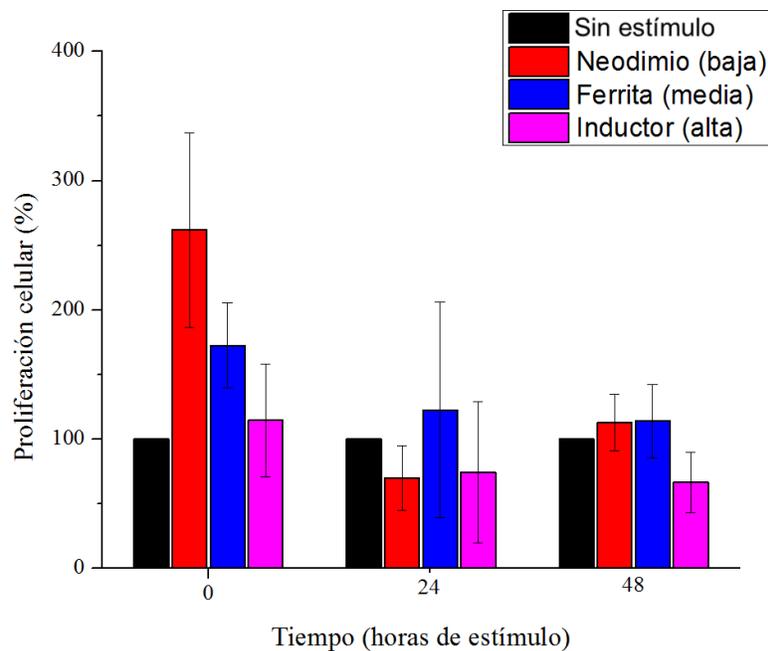


Figura 47. Proliferación celular en porcentaje respecto al control negativo. La grafica muestra la diferencia del nivel de absorbancia obtenidos en el análisis.

4.5. Efecto del campo de Magnético sobre el pH

La estimulación del campo magnético provoca modificaciones del pH, los cuales se observan a continuación en la Figura 48.

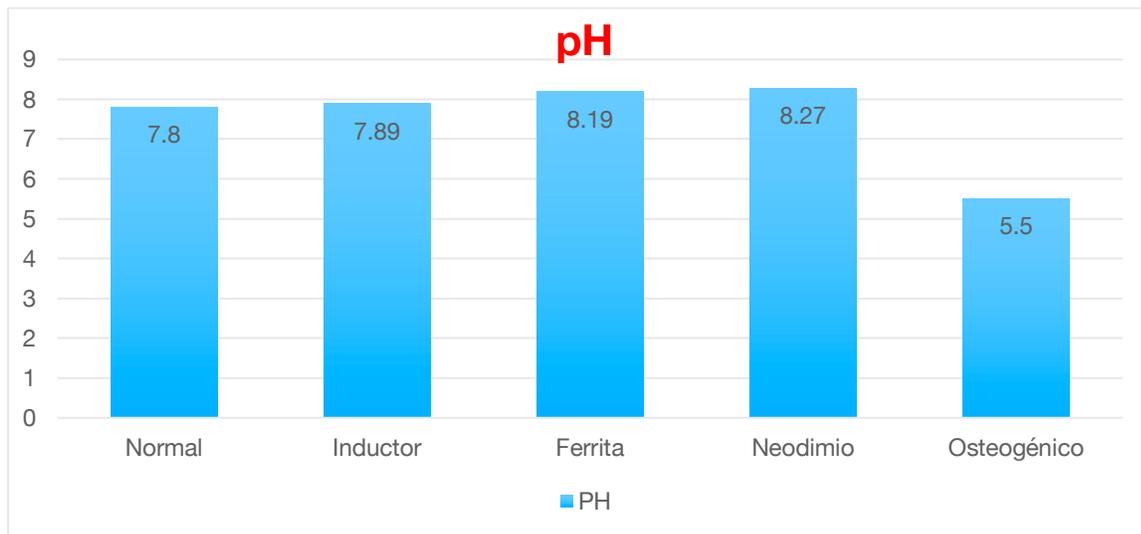


Figura 48. pH de los Medios. La interacción de los campos magnéticos modifican el potencial de hidrogeno. Normal(Medio sin estímulo), Inductor(Medios estimulado con inductor), Ferrita (Medio estimulado con ferrita), Neodimio (Medio estimulado con neodimio) y Medio Osteogénico.

7.6. Mediciones eléctricas de los medios celulares.

Estos son los siguientes valores eléctricos de los medio después de 30 minutos de estímulo y sin estímulo, como se observa en la tabla 11.

Tabla 11. Valores eléctricos del medio celular DMEM con estímulo, medio DMEM sin estímulo y Medio Osteogénico.

Estímulo	V	C	σ	E	D	L	ϵ	ϵ_r	P
0 mT	50 mV	10.50 μ F	4.81 mS	5.55 V/m	5.833 μ C/m ²	0.11 μ H	10.6 μ F/m	1.197 M	58.8 $\times 10^{-6}$
Inductor senoidal	70 mV	11.5 μ F	1.02 mS	7.77 V/m	4.813 μ C/m ²	0.12 μ H	60.93 μ F/m	6.81 M	473.4 $\times 10^{-6}$
Ferrita	85 mV	10.27 μ F	1.2 mS	15.55 V/m	8.45 μ C/m ²	0.147 μ H	53.89 μ F/m	6.05	833.3 $\times 10^{-6}$
Neodimio	230 mV	10.80 μ F	2.9 mS	25 V/m	14.11 μ C/m ²	0.148 μ H	552 μ F/m	62. 68	13.8 $\times 10^{-3}$
Medio osteogénico sin estímulo	41 mV	9.08 μ F	.037 mS	4.5 V/m	.3 μ C/m ²	0.18 μ H	0.066 μ F/m	6776	0.06 $\times 10^{-6}$

Las características magnéticas empleadas por los estímulos magnéticos se observan en la Tabla 12.

Tablas 12. Características magnéticas de los estímulos.

Estímulo	B	H	μ	μ_r	ψ_m	S
0 mT	0 T	0 A/m	1.26 μ H/m	1	0.11 μ H	4.02 μ m ²
Inductor Senoidal	0.001 T	796 A/m	1.26 μ H/m	1	0.12 μ H	4.02 μ m ²
Ferrita	0.6 T	477000 A/m	1.26 μ H/m	1	0.147 μ H	4.02 μ m ²
Nedimio	1 T	796000 A/m	1.26 μ H/m	1	0.148 μ H	4.02 μ m ²
Medio osteogénico sin estímulo	0 T	0 A/m	1.26 μ H/m	1	0.18 μ H	4.02 μ m ²

7.7. Energía potencial durante el estímulo

Durante el estímulo las partículas cambian su dirección provocando que el medio se polarice almacenando energía. Considerando las condiciones iniciales del medio sin estímulo, la energía cinética por cada estímulo son las siguientes:

La densidad de energía esta dada por (Figura 49):

$$\omega_m = \frac{1}{2} \mu H^2$$

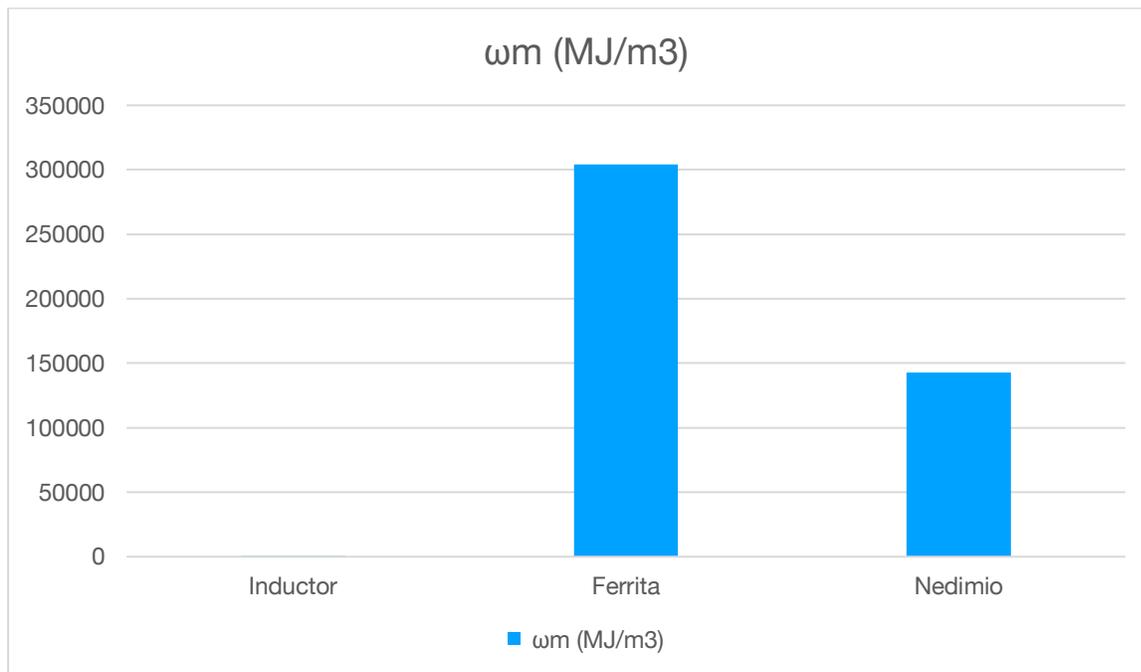


Figura 49. Densidad de energía magnética. Los estímulos magnéticos agregan energía a las moléculas iónicas dependiendo de la intensidad del campo.

En la Figura 50 se observa la energía suministrada por los estímulos por pocillo:

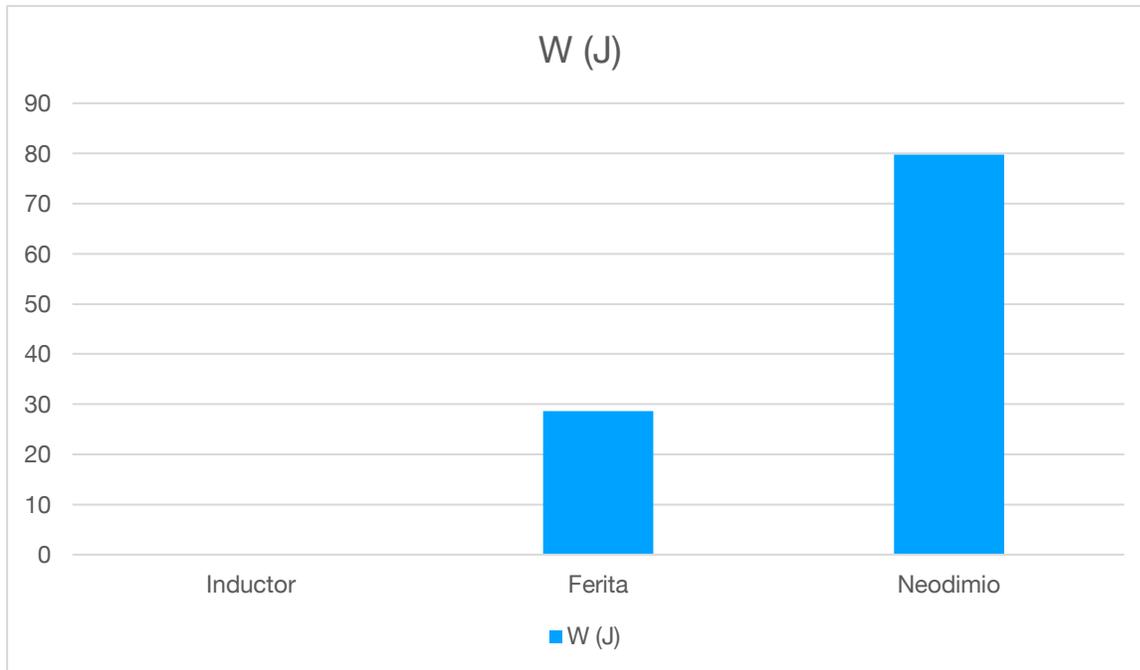


Figura 50. Densidad de energía por pocillos durante el estímulo.

4.8. Energía potencial después del estímulo

Después el medio se estabiliza al reordenarse y disminuyendo su energía, por lo cual se modifica la energía potencial de las partículas del medio. Considerando las características del medio después del estímulos y la energía de los medios sin estímulo.

La densidad de energía esta dada por (Figura 51):

$$\omega_e = \frac{1}{2} \epsilon E^2$$

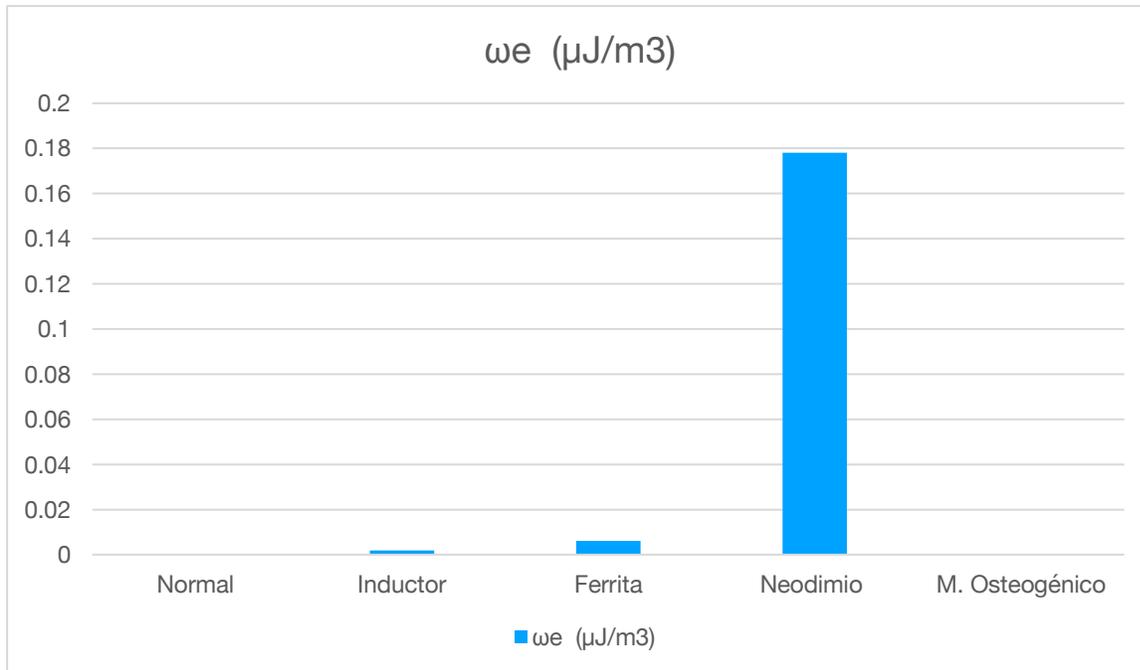


Figura 51. Densidad de energía después del estímulo. Al cambiar el movimiento de partículas se reorganizan los átomos aumentando la intensidad del campo eléctrico al aumentar la densidad de energía eléctrica.

4.9. Efecto de campo magnético sobre la Fuerza de Lorenz

Como se mencionó en el capítulo 3, el campo magnético modifica la dirección de las partículas en un medio dieléctrico. La fuerza que modifica la dirección de los portadores se denomina Fuerza de Lorenz. Para este cálculo se empleó el valor del campo eléctrico de cada medio, para ver la fuerza alcanzada después del estímulo. Y al calcular la fuerza inicial se consideraron las características del medio sin estímulo (Tabla 13).

$$\mathbf{F}_t = \mathbf{F}_e + \mathbf{F}_m = q\mathbf{E} + q(\mathbf{u} \times \mathbf{B}) = q(\mathbf{E} + \mathbf{u} \times \mathbf{B})$$

Tabla 13. Fuerza magnética y eléctricas de lo estímulos. La movilidad de partículas es similar al valor de tiempo de relajación del medio.

Estímulo	$\tau = \sigma/\epsilon$	μ_q	$q = C \cdot V$	F_t Inicial	F_t Final
0 mT	2.22 ms	453 m/s	528 nC	2.91 μ N	2.91 μ N
1 mT	34 ms	28.7 m/s	805 nC	2.93 μ N	4.49 μ N
600 mT	42 ms	23.6 m/s	872 nC	10.3 μ N	17.2 μ N
1 T	100 ms	5.24 m/s	2.48 μ C	5.66 μ N	26.8 μ N
Medio osteogénico sin estímulo	1.59 ms	630 m/s	401 nC	1.8 μ N	1.8 μ N

7.10. Características eléctricas de la célula.

Las características eléctricas de la células se obtuvieron a través del protocolo 10. Un 1 cm de células obtuvieron $C= 13$ nF y $R=2$ M Ω .

Y el valor de cada C y R por cada células, considerando que la capacitancia y la resistencia están en serie. Los valores son $R= 2$ Ω y $C= 13$ μ F.

8. Discusión de resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, fue posible observar que el campo magnético puede provocar que las células troncales se diferencien en diversos linajes, como se muestra en las figuras 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 40.

Debido a su morfología las células presentan semejanza con los neuroblastos como se observa en la figura 34. La presencia de moléculas del grupo proteoglicanos apunta a la presencia principalmente de células de cartílago, especialmente condrocitos como se observa en la figura 37. Y se consideran también la presencia de células musculares debido a su forma alargada; y la presencia de proteoglicanos como se observa en la figura 32.

La presencia de depósitos de lípidos en algunas células, como se muestra en la figura 36 indica la presencia de células adiposas. La tinción de giemsa reveló la presencia de células multinucleares, células con núcleo de mayor tamaño y uninucleares (figura 40); lo cual contribuye a demostrar que existen diversos linajes dentro de un mismo cultivo. La tinción con rojo de alizarina mostró la presencia de cuerpos de calcio que fueron acumulados debido al movimiento de iones y membranas celulares, esto debido a células muertas (Figura 31). Según el estudio de la proliferación los campos eléctricos no provocan la muerte celular al presentar mayor nivel de absorbancia al compararlo con el control positivo (Figura 42), debido a este análisis las membranas celulares encontradas en los cuerpos amorfos se deben a células que no sobrevivieron al sembrando.

La coloración de calcio dentro de la célula (figura 38) es considerado como un factor que favorece a la diferenciación de células neuronales y células musculares (Zhang, Yarema, & Xu, 2017). La presencia de las diferentes morfologías que se encontraron en los cultivos que fueron estimulados con los tres niveles de intensidad de campos magnéticos, revelan que dependiendo del nivel de campo se presenta el número de células diferenciadas y la presencia de cuerpos amorfos de mayor tamaño compuestos de membranas celulares y calcio (Tabla 8 y 9). La presencia de diversos linajes demuestra que las características eléctricas que favorece a la diferenciación de un determinado linaje, no están regidas por las características generales de estímulos, sino en la interacción de los componentes a nivel celular.

Los campos magnéticos son responsables de la presencia de cuerpos de calcio que se forman debido a la polarización del medio (tabla 11), como se ha mencionado con anterioridad, dependiendo de la intensidad del campo es el tamaño que toman estos cuerpos amorfos, los cuales se deben a las fuerzas de Lorentz que se producen en el medio estimulado (tabla 11 y 12). Los cuerpos de calcio se formaron durante el estímulo debido a la presencia del campo eléctrico (tabla 11). Al analizar los valores de permitividad del medio celular se observa que poseen valores altos, esto se debe a la presencia de diversos iones y polímeros que contiene el medio (Wang Y. , 2016), cuando comparamos los valores eléctricos antes y después de la estimulación se observa que el nivel de permitividad eléctrica aumenta, esto se debe principalmente a la modificación de múltiples especies moleculares y su reordenamiento.

El medio DMEM posee una alta capacidad de almacenar energía debido a su alta permitividad eléctrica. En la tabla 11, se observa que los valores de permitividad eléctrica son distintos debido a la existencia de modificaciones en su estructura química que principalmente se debe a la liberación de ROS, las cuales producen una liberación de oxígeno en forma de gas y a su vez estos reaccionan con el medio cambiando su nivel de pH (Figura 45). El cambio de pH a un nivel más básico afecta directamente la permeabilidad de la membrana celular al paso de los iones debido a la presencia de ROS que se puede observar en las mediciones de pH (F. Brown, Chawla, & M.D.C. Perera, 2017).

9. Conclusión

Al inicio del proyecto, se realizaron estímulos eléctricos en cultivo a través de corrientes eléctricas, para observar el comportamiento del medio y los cambios morfológicos al direccionar la corriente a través del cultivo; esto con el fin de estudiar los efectos del movimiento de iones a través de la membrana celular. Sin embargo, al realizar las estimulaciones los medios se contaminaban debido al contacto directo con las células.

Al principio de la mediciones eléctricas en cultivo celular, se trato de diseñar un equipo para poder obtener los valores eléctricos de la célula y estudiar la distribución de cargas dentro del cultivo, sin embargo, el prototipo no se pudo terminar debido a la falta de electrodos de MEA (Microelectrode Array) y sistema de soporte estable.

En conclusión, esta Investigación demuestra que los estímulos eléctricos a partir de campos magnéticos son capaces de diferenciar a las células troncales de pulpa dental en diferentes linajes, lo cual a su vez demuestra que las características eléctricas influyen en el proceso de diferenciación celular y que estas características se debe estudiar con mayor determinación a un nivel celular.

En este estudio, aunque se observa la presencia de calcio no se llegó a determinar la presencia de osteoblastos, esto debido a la duración del experimento y a la disponibilidad de materiales para la identificación de genes, para determinar la presencia de actividad de morfogénesis propias de la osteogénesis (CBFA-1). También se muestra que la intensidad de campos magnéticos es directamente proporcional (1 mT, 600 mT y 1T) a la formación de tejido maduro y de la alineación de las células; . Los estímulos además de orientar a las células también producen cambios químicos, difusión de iones, desnaturalización de proteínas, generación de ROS, cambios de permeabilidad en la membrana; resultado de la polarización eléctrica (473.4×10^{-6} , 833.3×10^{-6} , 13.8×10^{-3}); los cuales también son responsables de los cambios morfológicos en los cultivos y posiblemente precursores de la diferenciación La presencia de diversos linajes celulares

muestran que la interacción del campo magnético y el medio celular son punto claves para el estudio de la diferenciación.

De acuerdo con estos resultados, el uso de la caracterización del medio de forma eléctrica y uso de campos magnéticos pueden ser posibles soluciones para el tratamiento contra enfermedades degenerativas. Por lo cual, se requiere un mayor estudio sobre la característica eléctricas de los nicho dentro del cuerpo y el estudio de los efectos del campo en células, tejidos y órganos maduros.

10. Referencias

- Lüttgens, G., Lüttgens, S., & Schubert, W. (2017). *Static Electricity*. Weinheim, Germany: Wiley-VCD.
- Chengcai Zheng, Y. Z. (2017). Bone Marrow Stem Cells: Source, Characterization, Isolation, Culture, and Identification. Em X. J. Kunlin Jin, *Bone Marrow Stem Cell Therapy for Stroke* (pp. 37-54). Singapore: Springer.
- Lodish, H., Berk, A., & Chris, A. K. (2016). *Molecular Cell Biology*. New York, USA: w. h. freeman.
- López Rodríguez, V. (2013). *Electromagnetismo I*. Madrid, España: UNED.
- Lv., F.-J., S. Tuan, R., M.C. Cheung, K., & Y.L.Leung, V. (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells*, 1408 - 1419.
- Abjornson, C., Yoon, B., & M. Lane, J. (2014). Bone Graft Substitutes: Classifications and Orthopedic Applications. Em C. Laurencin, & T. Jiang, *Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering* (pp. 12 - 21). Rosemort: AAOS.
- Ajaykumar Vishwakarma, J. R. (2017). The Need to Study, Mimic, and Target Stem Cell Niches. Em J. M. AJAYKUMAR VISHWAKARMA, *Biology and Engineering of stem cells niches* (pp. 1- 14). Londres, Inglaterra: Academic Press.
- Arjmand Monireh, A. A. (29 de enero de 2017). Osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells cultured on nanofibrous scaffold improved in the presence of pulsed electromagnetic field. *Journal of Cellular Physiology*, 1061-1070.
- atricia Arriba-Tutusaus, F. H. (2014). Signaling Pathways Maintaining Stemness in Adult Hematopoietic Stem Cells. Em K. Turksen, *Adult stem cells* (pp. 1-13). Ottawa, Canada: Humana Press.
- Bruce Alberts, A. J. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (5 ed., Vols. --). Abingdon, --, Reino unido: Garland Science.
- Burgess, R. (2013). Introduction of stem cells. Em S. Sell, *Stem cells Handbook* (pp. 1-29). New York, USA: Humana Press.
- Burgess, R. (2013). Introduction to stem cell. Em S. sell, *Stem Cells Handbook* (pp. 1-22). Albany, NY, USA: Springer.
- Demirci, S., Doğan, A., & Şahin, F. (2016). Dental Stem Cells vs. Other Mesenchymal Stem Cells: Their Pluripotency and Role in Regenerative Medicine. Em D. S. Cells, Şahin, *Fikrettin; Doğan, Ayşegül; Demirci, Selami;* (pp. 109 - 123). Istanbul, Turkey: Springer.
- Digel Ilya, T. A. (2011). The Emperor's New Body: Seeking for a Blueprint of Limb Regeneration in Humans. Em M. S. Artmann Gerhard M., *Stem cell Engineering* (pp. 40 - 72). Jülich : Springer.
- F. Brown, M., Chawla, U., & M.D.C. Perera, S. (2017). Membrane Lipid-Protein Interactions Michael. Em R. M. Epand, & R. Jean-Marie, *The Biophysics of stem cells* (pp. 61-85). Hamilton: Springer.
- Fisher, B.-N. B. (2015). In Vivo Techniques and Strategies for Enhanced Vascularization of Engineered Bone. Em E. M. Brey, *Vascularization, Regenerative Medicine and tissue Engineering* (pp. 263-282). New York: CRC Press.
- Fmagnet Xinfeng. (2012). *Fmagnet Xinfeng*. Obtido de Fmagnet Xinfeng: <http://www.imanes-de-neodimio.com/im-n-bloque-de-neodimio-p931.html>

- Grimnes, S., & G Martinsen, Ø. (2015). *Bioimpedance and Bioelectricity basics*. San Diego: Elsevier.
- Huizhen Wang, X. Z. (2017). Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular sciences*, 1-20.
- Iguchi, M., & J. Ilegbusi, O. (2014). *Basic Transport phenomena in Materials Engineering*. Sapporo: Springer Japan.
- iofbonehealth. (2017). *iofbonehealth*. Obtido de iofbonehealth: https://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/media/PDFs/Regional%20Audits/2012-Latin_America_Audit-Mexico-ES_0_0.pdf
- K. Hobbie, R., & J. Roth, B. (2015). *Intermediate physics for Medicine and Biology*. Michigan, USA: Springer.
- Keith L. Moore, M. G. (2016). *The developing Human clinically oriented embryology*. Philadelphia: 10th.
- Keith L. Moore, T. P. (2016). *the developing human, Clinically oriented embryology* (10 ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Khojasteh, A., Nazeman, P., & Rezai Rad, M. (2016). Dental Stem Cells in Oral, Maxillofacial and Craniofacial Regeneration. Em F. Şahin, A. Doğan, & S. Demirci, *Dental Stem Cells* (pp. 143 - 168). Istanbul, turkey: Springer.
- Mauro Krampera, J. G. (15 de Septiembre de 2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *archives-ouvertes*, 1054-61.
- Mercadolibre. (2018). *Mercado libre* . Obtido de Mercado libre: https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-586357170-iman-ferrita-dona100-x-50-x-20-mm-8000-gauss-_JM?quantity=1
- Moore Keith L., P. T. (2016). *The developing Human, clinical oriented embriology* (10 ed.). Philadelphia, Philadelphia: Elsevier.
- Mrozynski, G., & Stallein, M. (2013). *Electromagnetic Field Theory*. Paderborn, Germany: Springer vieweng .
- Neslihan Taşlı, P., Aydın, S., & Şahin, F. (2016). Immunomodulatory Properties of Stem Cells Derived from Dental Tissues. Em F. Şahin, A. Doğan, & S. Demirci, *Dental Stem Cells* (pp. 29-30). Istanbul, Turkey: Springer.
- Plonsey, R., & Barr, R. C. (2000). *Bioelectricity*. New York, ----, Estados Unidos: Springer; Business Media New York.
- Paolo Di Nardo, M. M. (2011). Engineering the Stem Cell Niche and the Differentiative Micro- and Macroenvironment: Technologies and Tools for Applying Biochemical, Physical and Structural Stimuli and Their Effects on Stem Cells . Em G. M. Hescheler, *Stem cells Engineering* (pp. 41-51). Berlin : Springer.
- R. Cooper, P. (2016). Dental and Craniofacial Tissue Stem Cells: Sources and Tissue Engineering Applications. Em F. Şahin, A. Doğan, & S. Demirci, *Dental Stem Cells* (pp. 1-28). Istanbul, Turkey: Springer.
- Scott P. Bruder, A. I. (2013). Bone Regeneration through Cellular Engineering. Em R. L. Robert Lanza, *Principles of tissue engineering* (Vol. 2, pp. 686-696). New York: Academic Press.
- Spyropoulou, A., & K. Basdra, E. (2013). Osteoblasts under Mechanical Strain. Em H. Scheurer, *Osteoblasts* (pp. 1- 32). New York, USA: Nova Science Publishers.
- T. Laurencin, C., Khan, Y., & Veronick, J. (2014). Bone Graft Substitutes: Past, Present, and Future. Em C. T. Laurencin, & J. Tao, *Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering* (pp. 1-7). Rosemont: AAOS.

- T. Ulaby, F., & Ravaioli, U. (2015). *Fundamentals of applied electromagnetics* (Vol. 7). New Jersey: Pearson.
- To'a Salazar Georgina, O. O. (2013). Review of biophysic factors affecting osteogenic differentiation of human adult adipose-derived stem cells. *BiopHys Rev*, 5, 11-28.
- Toh, T.-C. (2013). *Electromagnetic Theory for Electromagnetic Compatibility Engineers*. New York, USA: CRC Press.
- Ute Bissels, D. E. (2013). Characterization and Classification of Stem Cells. Em G. Steinhoff, *Regenerative Medicine* (2nd Edition ed., pp. 79-105). Rostock, Alemania: Springer .
- Wanda Lattanzi, C. B. (2012). Genes and Molecular Pathways of the Osteogenic Process. Em Y. Linn, *Osteogenesis* (pp. 21 - 56). Roma, Italy: Intechweb.
- Wang, H., & Zhang, X. (2017). Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species . *Internacional Journal of Molecular sciences* , 1-20.
- Wang, Y. (2016). Ionic Transport and Dielectric Relaxation in Polymer Electrolytes. Em M. Paluch, *Dielectric Properties of Ionic Liquids* (pp. 131 - 156). Katowice, Poland: Springer.
- Witkowska-Zimny, M. (2012). Transcriptional Control of Osteogenesis. Em Y. Lin, *Osteogenesis* (pp. 1- 16). Rijeka, Croatia: INTECH.
- Y., K. K., S., L., & C., Z. e. (2015). Cells for musculoskeletal tissue engineering. Em N. Syam, F. Joseph, & L. Cato, *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces* (pp. 25 - 38). Cambridge: Elsevier.
- Zhang, X., Yarema, K., & Xu, A. (2017). *Biological Effects of Static Magnetic Fields*. Hefei: Springer.

11. Anexos

Glosario

ϵ_r	Permitividad eléctrica relativa
ϵ_0	Permitividad eléctrica del vacío
ϵ	Permitividad eléctrica
ρ	Resistividad
σ	Conductividad
Ω	Resistencia
Ω	Ohm (Unidad de Resistencia)
Z	Impedancia
μ	Permeabilidad magnética
ρ_v	Densidad volumétrica de cargas libre
J	Densidad de corriente eléctrica
E	Campo eléctrico
D	Densidad de Flujo
B	Campo magnético
H	Intensidad de campo magnético
Ψ_m	Densidad de flujo magnético
Ψ_e	Densidad de flujo eléctrico
Wb	Weber (Unidad de flujo magnético)
T	Tesla (Unidad de campo magnético)
S	Superficie
Q	Carga eléctrica
F_m	Fuerza magnética
F_e	Fuerza de campo magnético
U	Energía
μ_e	Movilidad de cargas
μ_r	Permeabilidad magnética relativa
μ_0	Permeabilidad magnética del vacío
μ	Permeabilidad magnética
θ	Ángulo
PBS	Amortiguador de fosfato
W_m	Energía Magnética
W_e	Energía eléctrica
C	Capacitancia
L	Inductancia
F	Faradio (Unidad de capacitancia)
H	Henrio (Unidad de Inductancia)
N	Newton (Unidad de fuerza)
ω_m	Densidad de energía magnética
ω_e	Densidad de energía eléctrica