

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

**Departamento de Microbiología,
Medicina Preventiva y Salud Pública**

**EFFECTOS DE LOS CAMPOS
ELECTROMAGNÉTICOS PULSADOS
(PEMF) EN EL CULTIVO DE LAS
STEM CELLS CIRCULANTES**

TESIS DOCTORAL

Ignacio Gómez Ochoa

Zaragoza, 2009



Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

D. LUIS LARRAD MUR y D. PABLO GÓMEZ OCHOA

INFORMAN:

Que la presente memoria titulada **“EFECTOS DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS PULSADOS (PEMF) EN EL CULTIVO DE LAS STEM CELLS CIRCULANTES”** de la que es autor el licenciado en Medicina y Cirugía, D. Ignacio Gómez Ochoa, ha sido realizada bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas para ser presentada y defendida como Tesis Doctoral.

Zaragoza, Enero del 2009

Prof. Dr. D. Luis Larrad Mur

Prof. Dr. D. Pablo Gómez Ochoa

A mis padres, motor de mi vida

A mis directores, Luis y Pablo, muchas gracias por vuestra ayuda y por vuestro cariño. No podría haber llevado a cabo esta aventura sin vuestro apoyo.

A Encarna, muchas gracias por tu paciencia, tus conocimientos y tu dedicación, sin tí no hubiera sido posible hacer esta Tesis.

A Javier Miana, por tu inestimable ayuda y por hacerme más fácil el viaje por el mundo del análisis estadístico.

Al Servicio de Medicina Física y Rehabilitación del Hospital Clínico Lozano Blesa de Zaragoza, por facilitarme el desarrollo de esta Tesis.

A mis amigos, Adrián, Fernando, José Manuel, Ana y David, muchas gracias por vuestro apoyo incondicional.

A mis padres, a Pablo, a Cristina y a Jacobito, esta Tesis es vuestra, ya que sin vuestro cariño y comprensión nunca se podría haber llevado a cabo.

ÍNDICE

INDICE

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.- LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS EN BIOMEDICINA..	3
1.1.- La corriente eléctrica, la brújula y el descubrimiento del Electromagnetismo.....	3
1.2.- La radiación electromagnética.....	6
1.3.- Los efectos biológicos de la radiación electromagnética.....	12
1.3.1. Efectos biológicos y efectos adversos para la salud.....	12
1.3.2. Mecanismos de acción celular de los campos electromagnéticos.....	18
1.4.- Los campos magnéticos.....	22
1.5.- El uso clínico de los campos magnéticos.....	25
2.- LAS STEM CELL CIRCULANTES.....	28
2.1.- Introducción.....	28
2.2.- Caracterización celular.....	30
2.3.- Regulación celular de las Stem Cell.....	33
2.4. Fibroblast-like circulantes.....	35
2.5.- Mesenchymal Stem Cell.....	46

3.- PEMF Y LOS CULTIVOS CELULARES.....	53
3.1.- Introducción.....	53
3.2.- Metodología de irradiación y condiciones de cultivo.....	55
II. OBJETIVO DEL ESTUDIO.....	83
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	87
1.- CULTIVOS CELULARES EN MEDIO LÍQUIDO.....	87
1.1.- Obtención de muestras y separación celular.....	87
1.2.- Condiciones de cultivo y procesamiento.....	89
2.- PROTOCOLO DE IRRADIACIÓN.....	94
2.1.- Características del generador PEMF.....	94
2.2.- Condiciones y secuencia de irradiación.....	95
3.- MÉTODOS DE EVALUACIÓN.....	97
3.1.- Cuantificación y Morfología.....	97
3.2.- Inmunocitoquímica.....	99
3.3.- Test de Reducción del NBT.....	104
3.4.- Cuantificación de citoquinas.....	107
3.5.- Análisis estadístico.....	119

IV. RESULTADOS	123
1.- ESTRUCTURA DE LOS RESULTADOS.....	123
2.- CULTIVO DE CMN DE SANGRE PERIFÉRICA.....	124
2.1. Cuantificación del crecimiento y de la morfología.....	124
2.2. Inmunocitoquímica.....	126
2.3. Test del NBT.....	127
2.4. Citoquinas.....	128
3.- EFECTOS DE LA IRRADIACIÓN PEMF EN LOS CULTIVOS CELULARES LOS DÍAS 14 Y 21.....	131
3.1. Cuantificación del crecimiento y de la morfología.....	131
3.2. Test del NBT.....	135
3.3. Citoquinas.....	137
V. DISCUSIÓN	153
1.- LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS FIBROBLASTOS-LIKE: MITAD CONJUNTIVO, MITAD MACRÓFAGO.....	153
2.- UN NUEVO PROTOCOLO DE IRRADIACIÓN: MENOS DOSIS, MENOS TIEMPO Y RESULTADOS EQUIVALENTES..	159
3.- LA IRRADIACIÓN CON PEMF AUMENTA EL CRECIMIENTO Y NO CAMBIA LAS CÉLULAS.....	166

VI. CONCLUSIONES.....173

VII. BIBLIOGRAFÍA.....177

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS EN BIOMEDICINA

1.1.- La corriente eléctrica, la brújula y el descubrimiento del Electromagnetismo

La electricidad y el magnetismo estuvieron juntos en la antigüedad, aunque no lo sabían, porque 600 años antes de J.C., Tales de Mileto descubrió que frotando la piel de un animal con un trozo de ámbar -“ electrón”- adquiría la propiedad de atraer objetos. Sin embargo las propiedades de los imanes naturales de Tesalia y Magnesia y los primeros estudios científicos de la electricidad realizados por Sir Williams Gilbert

- médico de la corte de la reina Isabel- en los primeros años del siglo XVII, siguieron caminos independientes, y hasta el siglo XIX no se evidenció la relación tan estrecha entre los campos eléctricos y los campos magnéticos que fue el origen de un nuevo campo científico: el Electromagnetismo.

Todo empezó cuando Hans Christian Oersted, profesor de Ciencias de la Universidad de Copenhague, realizaba una demostración científica en 1820 y observó que al conectar la corriente eléctrica a través de un hilo conductor, se movía la aguja de una brújula colocada sobre una peana de madera [1].

Cinco años más tarde, André-Marie Ampère, matemático y físico francés, publica la *Teoría matemática de los fenómenos electrodinámicos*, en la que expone la Ley de Ampère, que describe las influencias entre dos corrientes eléctricas que circulan por elementos conductores: atraen entre sí a los elementos conductores cuando son paralelas y se repelen si son antiparalelas; esta fuerza de atracción/repulsión es directamente proporcional a la intensidad de las corrientes e inversamente proporcional a la distancia entre ellas [2].

Un paso más en el desarrollo del electromagnetismo lo dio Michael Faraday en 1831 al descubrir lo que él denominó el fenómeno de la inducción electromagnética, que señalaba la producción de una fuerza electromotriz en un medio o cuerpo expuesto a un campo magnético variable, o bien en un medio móvil respecto a un campo magnético estático. Lo enunció como la ley de Faraday que establece que la magnitud del voltaje inducido es proporcional a la variación del flujo magnético [3].

En 1864, James Clerk Maxwell, establece las ecuaciones de Maxwell, que relacionan matemáticamente los campos eléctricos y los campos magnéticos, otorgándoles la misma naturaleza de onda que la de la luz, y denominándose a partir de entonces, *ondas electromagnéticas* [4]. Y después ya vinieron descubrimientos en cascada que supusieron el auge del nuevo campo científico. Algunos de los más significativos fueron el descubrimiento del efecto fotoeléctrico (emisión de electrones por un material cuando se le ilumina con radiación electromagnética) descrito por Heinrich Hertz en 1887, la creación del primer generador de corriente alterna por Nicola Tesla en 1888, y el desarrollo en los años siguientes de bobinas capaces de generar descargas eléctricas de largo alcance (bobinas Tesla).

Un paso más fue la creación del término “radiación electromagnética”, originado a partir de la medición de la carga del electrón ($e = 1,602\ 176\ 487(40) \times 10^{-19}$ Culombios) por Robert Andrews Millikan entre 1910 y 1917, y tras la investigación llevada a cabo por Hendrik Antoon Lorentz sobre la influencia del magnetismo en la radiación.

En 1905 Albert Einstein publica la teoría de la relatividad especial, que surge de la observación de que la velocidad de la luz en el vacío es igual en todos los sistemas de referencia inerciales, es decir,

cuando las leyes del movimiento cumplen la conservación del momento lineal (magnitud vectorial que surge del producto de la masa del cuerpo multiplicada por su velocidad en un momento dado). La teoría de la relatividad ha contribuido al esclarecimiento de las ecuaciones de Maxwell para los campos electromagnéticos, y en concreto permite comprender la unidad esencial de los campos eléctricos y magnéticos.

1.2.- La radiación electromagnética

El movimiento de las cargas eléctricas en un metal conductor origina ondas de campo eléctrico y magnético llamadas ondas electromagnéticas (EM) que se propagan a través del espacio vacío a la velocidad c de la luz (c : 300.000 Km/s), sin embargo los campos eléctricos y magnéticos pueden existir de manera independiente, y entonces se conocen como campos estáticos (v.gr. campos eléctricos originados durante una tormenta antes de la aparición del rayo).

Los campos electromagnéticos se describen en términos de intensidad del campo eléctrico y/o de la densidad del flujo magnético, utilizándose el Voltio/metro como unidad de intensidad del campo

eléctrico y el Tesla o el Gauss como medidas de la intensidad del flujo magnético (1 Tesla: 10.000 Gauss).

La radiación electromagnética tiene la naturaleza de un fenómeno ondulatorio, y se caracteriza por su longitud de onda y por su frecuencia. La *longitud de onda* (λ), es la distancia que existe entre los puntos correspondientes a un ciclo completo de la onda electromagnética y se mide en metros, mientras que la *frecuencia* es el número de ondas electromagnéticas que pasan por un punto en un segundo, y su unidad es el Hertz (Hz).

La longitud de onda y la frecuencia se relacionan mediante la fórmula:

$$c: \lambda \times f$$

c : velocidad de la luz (300.000 Km/s)

λ : longitud de onda (m)

f : frecuencia (Hz)

Como el valor de la velocidad de la luz (c) es constante, la longitud de onda de las señales electromagnéticas de alta frecuencia es muy corta, mientras que las señales de baja frecuencia tienen una longitud de onda muy larga.

La radiación electromagnética también se puede considerar como el flujo de unas partículas llamadas fotones, y esta dualidad onda-corpúsculo hace que cada fotón tenga una energía directamente proporcional a la frecuencia de la onda asociada, expresada por la relación de *Planck*:

$$E: h \times \nu$$

E: energía del fotón

h: constante de Planck: $6.6260693 (11) \times 10^{-34} \text{ J x s}$

ν : frecuencia de la onda asociada

Esta relación explica porque al aumentar la frecuencia de una onda electromagnética, se genera una mayor energía del fotón asociado a ella. La unidad que mide esta energía es el electrón-voltio (eV).

La clasificación de las radiaciones electromagnéticas, según los efectos biológicos, distingue entre *radiaciones no-ionizantes* y *radiaciones ionizantes*.

La ionización es el fenómeno que produce el desplazamiento de los electrones de los átomos y de las moléculas, y puede ocasionar cambios moleculares que desemboquen en alteraciones del ADN celular.

Los rayos X y los rayos Gamma, dos ejemplos de radiaciones ionizantes porque tienen fotones de alta energía, desencadenan alteraciones moleculares y daño biológico, precisamente porque su absorción produciría el fenómeno de la ionización.

En contraposición a estos efectos, las radiaciones no-ionizantes no son capaces de provocar genotoxicidad, aunque pueden ser nocivas para el organismo vivo al provocar efectos térmicos de calentamiento y corrientes eléctricas que pueden alterar la función del sistema nervioso y del sistema muscular [5].

La clasificación de los *campos electromagnéticos no ionizantes* de nuestro entorno, en función de su origen y de su frecuencia (f), incluye los siguientes grupos:

* *Fuentes que generan campos de frecuencias inferiores a 3 kHz ($0 \text{ Hz} \leq f < 3 \text{ kHz}$)*

i) Campos estáticos (0 kHz)

- Trenes de levitación magnética, sistemas de resonancia magnética y los sistemas electrolíticos en aplicación industrial-experimental.

ii) Campos de frecuencias extremadamente bajas ($30 \text{ Hz} \leq f < 300 \text{ Hz}$)

- Equipos relacionados con la generación, transporte o utilización de la energía eléctrica de 50 Hz, líneas de alta y media tensión y aparatos electrodomésticos.

iii) Campos con frecuencia de 300 Hz a 3 kHz

- Cocinas de inducción, antenas de radiodifusión modulada y equipos de soldadura de arco.

* *Fuentes de campos de radiofrecuencia ($3 \text{ kHz} \leq f < 300 \text{ GHz}$)*

i) Desde 3 kHz a 30 kHz (VLF)

- Antenas de radionavegación y radiodifusión modulada, monitores de ordenador, sistemas antirrobo.

ii) Desde 30 kHz a 300 kHz (LF)

- Pantallas, antenas de radiodifusión, comunicaciones marinas y aeronáuticas, radiolocalización.

iii) Desde 300 kHz a 3 MHz (HF)

- Radioteléfonos marinos, radiodifusión AM, termoselladoras.

iv) Desde 3 MHz a 30 MHz

- Antenas de radioaficionados, aparatos para diatermia quirúrgica, sistemas antirrobo.

v) Desde 30 MHz a 300 MHz (VHF)

- Antenas de radiodifusión, frecuencia modulada, antenas de estaciones de televisión, sistemas antirrobo.

vi) Desde 300 MHz a 3 GHz (UHF)

- Teléfonos móviles, antenas de estaciones base de telefonía móvil, hornos de microondas, aparatos para diatermia quirúrgica, sistemas antirrobo.

vii) Desde 3 GHz a 30 GHz (SHF)

- Antenas de comunicaciones vía satélite, radares, enlaces por microondas.

viii) Desde 30 GHz a 300 GHz (EHF)

- Antenas de radionavegación, radares, antenas de radiodifusión.

1.3.- Los efectos biológicos de la radiación electromagnética

1.3.1. Efectos biológicos y efectos adversos para la salud

Hay evidencias claras de que las ondas electromagnéticas producen cambios en el ser vivo, efectos biológicos, que en algunas circunstancias pueden desembocar en efectos adversos para la salud.

El efecto biológico es el cambio fisiológico detectable en un sistema vivo tras la exposición a la radiación electromagnética, y se convierte en *efecto adverso para la salud* cuando el efecto biológico producido tras la exposición a la radiación electromagnética produce algún tipo de detrimento de la salud.

En la actualidad tienen especial relevancia las investigaciones sobre la influencia de los campos de Radiofrecuencia (RF) en los sistemas biológicos, y la eventual producción de efectos adversos para la salud. Los datos más significativos de los que se dispone son los siguientes:

*) Campos de RF mayores de 10 GHz: Este tipo de radiaciones son absorbidas por la superficie de la piel y es escasa la energía que llega a los tejidos inferiores. La exposición a estos campos de RF por encima

de 10 GHz se valora en términos de la intensidad del campo, medida como densidad de potencia en vatios por metro cuadrado. Para que estos campos produzcan efectos perjudiciales para la salud, como cataratas o quemaduras cutáneas, se necesitan densidades de potencia superiores a 1000 w/m^2 . Estas densidades de potencia tan elevadas no existen en un entorno propio de la vida diaria, sino en zonas en las que está prohibida la presencia humana (v.gr. proximidades de radares muy potentes).

*) Campos de RF entre 1MHz y 10 GHz: Producen efectos térmicos de calentamiento sobre el sistema biológico expuesto, e incluso con niveles muy bajos de radiación consiguen un pequeño aumento de la temperatura local del organismo expuesto a esta radiación [6, 7], que puede ser compensado por los sistemas termoreguladores del organismo, sin que el individuo llegue a apreciar el cambio de temperatura.

*) Campos de RF inferiores a 1MHz: Inducen cargas y corrientes eléctricas que pueden estimular las células nerviosas y musculares del organismo. Se miden en términos de densidad de corriente (Amperios/m²), habitualmente de 10 mA/m^2 . Si las corrientes que inducen estos campos de RF exceden de forma significativa el nivel normal de actividad eléctrica del organismo, para lo que deben de superar los 100 mA/m^2 , pueden producir efectos adversos para la salud.

*) Campos eléctricos de muy baja frecuencia (ELF): Existen en presencia de una carga eléctrica, con independencia de que haya corriente eléctrica. Este tipo de campo eléctrico penetra muy poco en el cuerpo humano, aunque algunos estudios han sugerido la relación entre la exposición a estos campos y el desarrollo de cáncer en niños [8].

*) Campos magnéticos de ELF: Se producen siempre que haya una corriente eléctrica, penetrando en el organismo sin apenas atenuación. Algunos estudios epidemiológicos asocian este tipo de campos con el desarrollo de enfermedades hematopoyéticas en niños [9], por lo que al igual que en los campos eléctricos ELF, se están realizando investigaciones para establecer su grado de influencia sobre los sistemas celulares.

El modo de vida actual hace inevitable la presencia de numerosas fuentes de producción de campos de RF en nuestro entorno, tales como monitores y pantallas de ordenador, aparatos de radio AM, FM, microondas, dispositivos de enlace por satélite, etc..., y por ello hay que subrayar la importancia de las investigaciones que se están haciendo.

Aunque hay controversia sobre los eventuales efectos adversos de la RF, y existe un grupo numeroso de expertos que no admiten la posibilidad de que los campos de RF provoquen otro tipo de respuesta biológica que no sea la térmica, no se excluyen los potenciales efectos

adversos para la salud, especialmente cuando la **tasa específica de absorción (SAR)** -medida en watos / kilogramo de masa- es superior a 4w/Kg.

Se está realizando múltiples estudios epidemiológicos y experimentales, reseñados por Goldsmith y Habash [10, 11] :

*) Estudios epidemiológicos: no existe evidencia científica epidemiológica que relacione la exposición a bajas dosis de campos de RF y la aparición de cáncer (Tabla 1)

*) Estudios experimentales:

a) Efectos genotóxicos y efectos cancerígenos: en los últimos estudios se concluye, que la exposición a campos de RF de intensidad inferior a los niveles que producen efectos térmicos, no generan alteraciones mutagénicas (Tabla 2). Sin embargo están siendo estudiados algunos factores por su posible relación con la producción de efectos genotóxicos tras la exposición a campos de radiofrecuencia (RF). Se consideran especialmente significativos la melatonina, el ión calcio, la ornitina decarboxilasa (ODC), la proteinkinasa, la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa [12] y los radicales libres que intervienen en el metabolismo mitocondrial [13].

b) Efectos sobre el sistema nervioso: existen pocos estudios concluyentes que hasta el momento hayan mostrado indicios de posibles

efectos no térmicos a nivel del sistema nervioso. Se han observado efectos sobre el encefalograma y en la actividad colinérgica de los animales, pero se desconoce como pueden interferir sobre la salud (Tabla 3).

Autor	Condición	Exposición RF	Resultados
Szmigielski	Personal militar expuesto a RF	RF de radares	Tasas altas de leucemia y linfoma
Hocking	Proximidad a torres de TV	Calculada. No mediciones	Alta incidencia de leucemia en adultos y niños
Dolk	Proximidad a una torre de FM-TV	No mediciones	Cáncer de piel y leucemia en adultos en radio de 2 Km
Dolk	Proximidad a veinte torres de FM-TV	No mediciones	No asociación cáncer-distancia a las antenas

Tabla 1. Estudios epidemiológicos

Autor	Condición	Exposición RF	Resultados
Lai & Singh	Ratas, in vivo	2,4 GHz, 0,6 -1,2 w/kg	Rotura bandas ADN células nerviosas
Mayalpa	Ratas, in vivo	Intento réplica Lai & Singh	No efectos detectados sobre ADN
Cain	Cultivos células fibroblásticas	2,45GHz 1-12,5 w/kg	No efectos genotóxicos
Maes	Cultivos células sanguíneas humanas	954 MHz, 1,5 w/Kg	Potencia daño genético provocado por cancerígeno químico
Scarfi	Cultivos de leucocitos	90 GHz 70 w/Kg	Potencia daño genético provocado por cancerígeno químico
UNEP WHO IRPA	Estudios <i>in vitro</i> (revisión)	RF diferentes frecuencia e I	No daño ADN, salvo RF capaces elevar temperatura cultivo
Verschaeve & Maes	Estudios <i>in vitro</i> o in vivo (revisión)	RF diferentes frecuencia e I	No daño ADN, salvo RF capaces elevar temperatura sistema biológico
Brusick	Estudios <i>in vitro</i> o in vivo (revisión)	RF diferentes frecuencia e I	Efectos genotóxicos solo para RF que generan hipertermia

Tabla 2. Estudios experimentales: efectos genotóxicos

Autor	Condición	Exposición RF	Resultados
UNEP WHO IRPA	Estudios in vivo (revisión)	RF diferentes frecuencias e I	No cambios barrera H-E
UNEP WHO IRPA	Gatos y conejos	RF moduladas en amplitud	Alteraciones en el EEG
Neubauer Salford	Ratas	915 MHz-2,45 GHz	Incremento permeabilidad barrera H-E
Lai	Ratas	2,7 GHz 0,6 w/kg	Alteración actividad colinérgica

Tabla 3. Estudios experimentales: efectos sobre el SNC

1.3.2. Mecanismos de acción celular de los campos electromagnéticos

Los trabajos experimentales indican que es a nivel celular donde actúan los campos electromagnéticos, aunque sus receptores específicos sean todavía desconocidos [14]. La membrana celular que separa dos compartimentos hídricos, el espacio intracelular y el intersticial, no es

impermeable, y posee canales por los que discurren fácilmente los iones K^+ y Cl^- (sin gasto de energía) y con más dificultad el ión Na^+ (con gasto de energía). En el espacio extracelular predominan las cargas positivas por el acúmulo de iones K^+ y Na^+ , mientras que en el intracelular predominan las cargas negativas (Cl^- y aniones proteicos negativos) ocasionando una polarización de la membrana, con una diferencia de potencial entre el espacio intra y extracelular de -70 a -90 mv. dependiendo de la célula. En la regulación de esta diferencia de potencial, juega un papel esencial la bomba sodio-potasio, que es capaz de expulsar hacia el exterior el exceso de iones sodio y de incorporar a su interior los iones potasio que habían salido al exterior por difusión simple. Es un mecanismo activo que consume una gran cantidad de energía y de oxígeno, y que se altera en los procesos inflamatorios, en los que se produce una caída del potencial de membrana, invirtiéndose la bomba sodio-potasio, lo que lleva a una entrada masiva de iones sodio y agua, y a una salida de iones potasio, que puede llevar a la necrosis celular cuando el potencial de membrana desciende de -30 mv.

En el organismo vivo, muchos átomos y moléculas se comportan como dipolos magnéticos, que no tienen porque ser esféricos, pudiendo orientarse por su diámetro menor hacia el canal celular y atravesarlo, y

mediante fuerzas externas, por ejemplo los campos magnéticos, cambiar la orientación de estos dipolos magnéticos.

Hay diversas hipótesis para explicar la acción de los campos magnéticos sobre las células, y parece localizarse en los siguientes niveles:

- a) Aportando energía a la bomba sodio-potasio, equilibrando el potencial de membrana con el mínimo gasto de oxígeno.
- b) Cambiando la orientación de los dipolos magnéticos.
- c) Restableciendo el equilibrio iónico de la membrana celular, actuando a nivel de los canales de sodio [15] y de calcio [16].
- d) Mediante el efecto piezoeléctrico: En los años 60 el físico japonés Fukada [17], descubrió que las fibras de colágeno se comportan como cristales, confiriéndole al hueso propiedades piezoeléctricas, por las que cuando está sometido a una carga axial, aparecerán cargas eléctricas negativas sobre la concavidad y positivas sobre la convexidad. Estas cargas se almacenan en la masa ósea modificando su nivel eléctrico (fenómeno de “electret”). Haimovici [18] observó que en las fracturas óseas, la formación del callo óseo se iniciaba en la zona cóncava (cargada negativamente) mientras que en la zona convexa existía una zona de falta de reacción e incluso se producía la reabsorción ósea. En

la actualidad se piensa que la acción de los campos magnéticos en la formación del callo óseo, se debe tanto a la acción magnética directa como a la acción eléctrica del campo inducido. Además, para la formación del callo óseo se precisa que haya un aumento en la producción de colágeno, y en este sentido se ha comprobado como los campos magnéticos son capaces de estimular a las células productoras de colágeno (fibroblastos y miocitos) [19].

- e) Activación de efectos metabólicos: Los campos magnéticos estimulan la síntesis de ácido hialurónico, aumentan la formación de fibroblastos y activan la acción vascular y circulatoria. Los estudios de Warnke, llevados a cabo mediante termografía, demostraron la acción de los campos magnéticos sobre la circulación sanguínea [20].

1.4.- Los campos magnéticos

Hasta el siglo XIX, el único magnetismo que se conocía era el de la naturaleza, procedente de las magnetitas (imanes naturales de mineral rico en hierro), pero a partir del descubrimiento de la relación entre los campos eléctricos y los campos magnéticos (ley de Ampère), se empiezan a generar campos magnéticos al aplicar corriente eléctrica directa sobre un conductor. El movimiento de estas cargas eléctricas genera un campo electromagnético alrededor del conductor, propagando una onda hacia el exterior en las tres dimensiones.

Los aparatos de magnetoterapia son dispositivos que generan un campo preferentemente magnético (nunca $< 90\%$) y en el que pueden ser controlados los parámetros intensidad, frecuencia, tiempo, forma de la onda y sentido del campo. Como conductores de la corriente eléctrica, para la formación de los campos magnéticos (efecto electromagnético), se utilizan solenoides de campo interior o bobinas de proximidad (Imagen 1).



Imagen 1. Solenoide de 30 cm

El predominio absoluto del campo magnético sobre el campo eléctrico, distingue estos aparatos de los de electromagnetoterapia, en los que los campos magnéticos y eléctricos generados presentan valores similares.

Los parámetros imprescindibles, que deben de calcularse siempre para definir las características del campo magnético, son la intensidad y la polaridad. La intensidad del campo magnético generado por una corriente continua (corriente galvánica) se obtiene con la siguiente fórmula:

Intensidad del Campo Magnético

número de espiras bobina × Intensidad corriente (amperios)

Diámetro de la bobina (cm)

La polaridad del campo magnético se obtiene usando imanes naturales y fijos marcados previamente con Norte y Sur, de tal forma que conociendo la polaridad de un imán y sabiendo que las líneas de fuerza magnética emergen del Norte y vuelven al Sur por el exterior del solenoide, en el interior del mismo seguirán el camino inverso.

La clasificación de los campos magnéticos se basa en parámetros tales como la polaridad y la duración del pulso, que en definitiva van a determinar los tres tipos de campos magnéticos.

a) Campos magnéticos continuos: Es un tipo de campo generado por una corriente continua que mantiene siempre la misma polaridad (N)-(S).

b) Campos magnéticos alternos: Están compuestos por ondas sinusoidales positivas y negativas, y naturalmente la polaridad (N)-(S) cambia constantemente a la misma frecuencia que las ondas eléctricas.

c) Campos magnéticos pulsados (PEMF): Pueden estar compuestos por pulsos cuadrangulares, sinusoidales o triangulares, pero

mantienen siempre la misma polaridad (N)-(S) durante el tiempo que duran los pulsos [21].

Recientemente [22] se ha diseñado un generador de PEMF, para el estudio de los condrocitos, que permite programar la forma de las ondas, con un microcontrolador Atmel ATMEGA 168, para conseguir campos magnéticos entre 0.5 mT y 4.5 mT, con pulsos de 6 ms a 100 ms y un ciclo útil del 1% al 100%.

1.5.- El uso clínico de los campos magnéticos

En 1979, la FDA (the Food and Drug Administration) aprobó el uso de los campos electromagnéticos pulsados (PEMF) para el tratamiento de los retardos de consolidación de fracturas [23]. En la práctica clínica, los generadores de campos magnéticos más utilizados son los solenoides de núcleo de aire, ya que producen campos magnéticos más homogéneos, de baja y media intensidad (0-100 Gauss) y pulsantes (0-100 Hz). Las densidades de campo o intensidad empleadas son incapaces de producir toxicidad celular, mientras que el empleo de

intensidades más altas debe realizarse con extrema precaución y con experimentación animal previa.

Se han descrito múltiples entidades nosológicas en las que se puede aplicar la terapia magnética, pero tanto la evidencia científica como la clínica señalan al aparato músculo-esquelético, al aparato vascular, a la piel y al sistema nervioso periférico como las principales dianas, en las que la terapia con campos magnéticos se ha mostrado más eficaz.

a) Aparato músculo-esquelético: las patologías músculo-esqueléticas (alteraciones tendinosas, ligamentarias y musculares) son el campo de aplicación más frecuente de la terapia con campos magnéticos después del de la estimulación ósea. En la última revisión Cochrane sobre el uso de la magnetoterapia, se ha observado que la osteoartritis de rodilla es la entidad que más se beneficia de éste tratamiento [24]. La pseudoartrosis y los retardos de consolidación ósea tras fractura son las indicaciones principales de la magnetoterapia, y hay múltiples estudios sobre el uso de campos magnéticos y la estimulación osteoblástica, que comprueban la disminución del plazo de recuperación de los pacientes con retardos de consolidación, destacando los de Haimovici [18] y los de Bassett en 1985 [25].

b) Aparato vascular: se han obtenido excelentes resultados con el uso de campos magnéticos a intensidades elevadas en la patología venosa periférica (flebitis y úlceras varicosas). A intensidades más bajas también se observan unos resultados muy satisfactorios, tanto subjetivos (disminución del dolor) como objetivos (mejoría flujo medido por doppler y teletermografía) en el tratamiento de las arteriopatías crónicas obstructivas de miembros inferiores.

c) Piel y anejos: los trabajos llevados a cabo por Patiño y cols. [26] demostraron una mayor rapidez de cicatrización de las heridas provocadas en ratas con la aplicación de campos magnéticos pulsados de 20 mT de intensidad. En estudios posteriores, se ha comprobado que el uso conjunto de campos magnéticos pulsados y láser, disminuyen todavía más los plazos de cicatrización. La dermatitis atrófica es otra entidad que responde bien al uso de campos magnéticos a intensidades bajas (15-20 Gauss).

d) Sistema nervioso periférico: debido a la acción proangiogénica y de estimulación neurógena, son las neuropatías periféricas las que más se benefician del uso de los campos magnéticos pulsados. Musaei y cols. [27] observaron una mejoría clínica y electroneurográfica en pacientes con polineuropatía diabética en estadios iniciales, tratados con campos electromagnéticos pulsados (frecuencia de 10 Hz) y de baja intensidad.

2.- LAS STEM CELL CIRCULANTES

2.1.- Introducción

El concepto Stem Cell (SC) define la capacidad que tienen algunas células para renovarse y para dar lugar a células especializadas [28]. Los mecanismos implicados en la proliferación y la diferenciación específica (“committed”) son muy complejos y en gran parte desconocidos.

Las primeras evidencias que demostraron la presencia de precursores capaces de reconstituir la hematopoyesis se produjeron en los años 60, cuando Till y Mc Culloch [29] trasplantaron médula ósea sana a ratones singénicos sometidos a irradiación letal. A los diez días se detectaron colonias celulares en el bazo de los receptores, que posteriormente se diferenciaban hacia las tres series hematopoyéticas. A estas células multipotenciales se les denominó CFU-S (*colony-forming-unit spleen*) [29, 30].

Estas células no identificables morfológicamente mantenían una relación lineal entre la cantidad de células infundidas y las colonias producidas, lo que sugería el carácter clonal [31], demostrando además

su capacidad para autorenovarse [32] y diferenciarse hacia las demás líneas celulares.

Estos hechos perfilaron a las CFU-S del ratón como células germinales de la hematopoyesis, multipotenciales [33,34] con características heterogéneas de densidad, tamaño, adherencia y capacidad de autorenovación y diferenciación [35-38].

En 1978 Fausner y Messner [39] cultivando células de médula ósea humana en medio de metilcelulosa, demostraron la presencia de células germinales capaces de autorenovarse y de diferenciarse hacia todas las líneas hematopoyéticas.

A este progenitor pluripotencial se le denominó CFU-GEMMeg (unidad formadora de colonias granulocíticas, eritroides, macrofágicas y megacariocíticas) y se le consideró el equivalente humano de la CFU-S murina.

Desde entonces el estudio de las SC ha tenido un progreso tan significativo que ha llevado hasta la actual “medicina regenerativa” teniendo como eje básico los trasplantes de progenitores hematopoyéticos inicialmente de origen medular y después de sangre periférica. Está bien establecido que las funciones de las SC incluyen el mantenimiento de la homeostasis celular en equilibrio con la apoptosis y la regeneración del tejido dañado, sin embargo, no están claros los

mecanismos implicados por las dificultades que presenta la demostración de las características de las SC cultivadas y el proceso de diferenciación hacia líneas tisulares.

2.2.- Caracterización celular

Basados en la funcionalidad observada en los cultivos de SC, se han establecido cuatro tipos que reflejan sobre todo su capacidad de diferenciación [40].

- **SC Totipotente** : es capaz de producir todos los tejidos y por definición está presente en el óvulo fecundado. Es el ejemplo más evidente de SC embrionaria, capaz de desarrollar las tres capas germinales: mesodermo, endodermo y ectodermo.

- **SC Pluripotente** : reproduce más de 200 tipos celulares y fueron aisladas por primera vez en 1998 a partir de embriones y tejidos fetales [41]. Recientemente han sido descritas las MSC (Mesenchymal Stem Cell) como células pluripotentes [42].

- **SC Multipotente** : da lugar a todos los tipos celulares de un mismo tejido. Es lo que ocurre con los progenitores hematopoyéticos (HSC).

- **SC Unipotente** : se diferencia exclusivamente hacia una línea celular de un tejido, v.gr. las CFU-Meg que sólo pueden evolucionar hacia megarioblastos/megacariocitos.

La separación entre Stem Cell Embrionarias (SCE) y Stem Cell Adultas (SCA) está basada en la localización y en su potencialidad de diferenciación.

Las SCE están en el blastocisto y en el embrión antes de su implantación en el útero y su capacidad de diferenciación es ilimitada. Las SCA son células indiferenciadas localizadas en tejidos adultos diferenciados y con unas posibilidades de diferenciación limitadas. Los rasgos diferenciales de estos dos tipos están reseñados en la Tabla 4.

La lista de tejidos adultos que contienen SC Adultas está creciendo e incluye médula ósea, sangre periférica, cerebro, médula espinal, vasos sanguíneos, músculo esquelético, córnea,...

**STEM CELL ADULTA (SCA) vs STEM CELL EMBRIONARIA
(SCA)**

	ESC	SCA
Tejido origen	Blastocisto	Presente en diferentes tejidos
Propiedades	Proporcionan ilimitadas células simétricas sin diferenciar	Mantener la homeostasis durante toda la vida del organismo
Cariotipo	No alteraciones cromosómicas	No alteraciones cromosómicas
Potencialidad	Pluripotente, dando ecto, meso y endodermo	Multipotente (HSC) Unipotente (SC de la piel) Excepción: MAPc (Multipotent Adult Progenitor cells)
Clonicidad	Una célula reproduce una colonia de células idénticas con las propiedades de la original (clon). Expresan transcripción del factor Oct-4	Una célula reproduce una colonia de células diferenciales sin las propiedades de la original. Mecanismos moleculares desconocidos
Ciclo celular	Sin G1 La mayoría del tiempo en fase S (síntesis de DNA) No necesita estímulo externo	Estado quiescente Necesita estímulo externo

Tabla 4. Tomado de Lemoli, RM y cols . 2005

2.3.- Regulación celular de las Stem Cell

La mayoría de la información sobre SC adultas humanas procede de estudios de células de médula ósea y sangre periférica, que en los últimos años ha incluido la identificación de la MSC, que es el microambiente que permite el desarrollo de la hematopoyesis y es capaz de diferenciarse en tejidos originados de las tres capas germinales.

Hasta ahora se considera como un hecho probado que la proliferación y diferenciación de las stem cells adultas sigue una secuencia progresiva que parte de la stem cell quiescente y que por la influencia de las citoquinas y del microambiente entran en ciclo celular [43].

Sin embargo a pesar de que esta concepción es la más generalizada y de la que parten la mayoría de las hipótesis experimentales, no hay un modelo único para definir la evolución de las SC, y aunque casi siempre se da por hecho que hay una jerarquía progresiva en los estadios de maduración y diferenciación (*modelo jerárquico*), en los últimos años tiende a contraponerse este modelo a otro más abierto que incluye la posibilidad de que una misma SC pueda volver sobre sus pasos y cambiar el fenotipo para hacerse más inmadura

(*modelo cinético*) [44], tal como queda reflejado en la Figura 1 modificada de Lemoli, RM y cols. 2005 [40].

MODELOS DE REGULACIÓN DE LAS STEM CELL ADULTAS

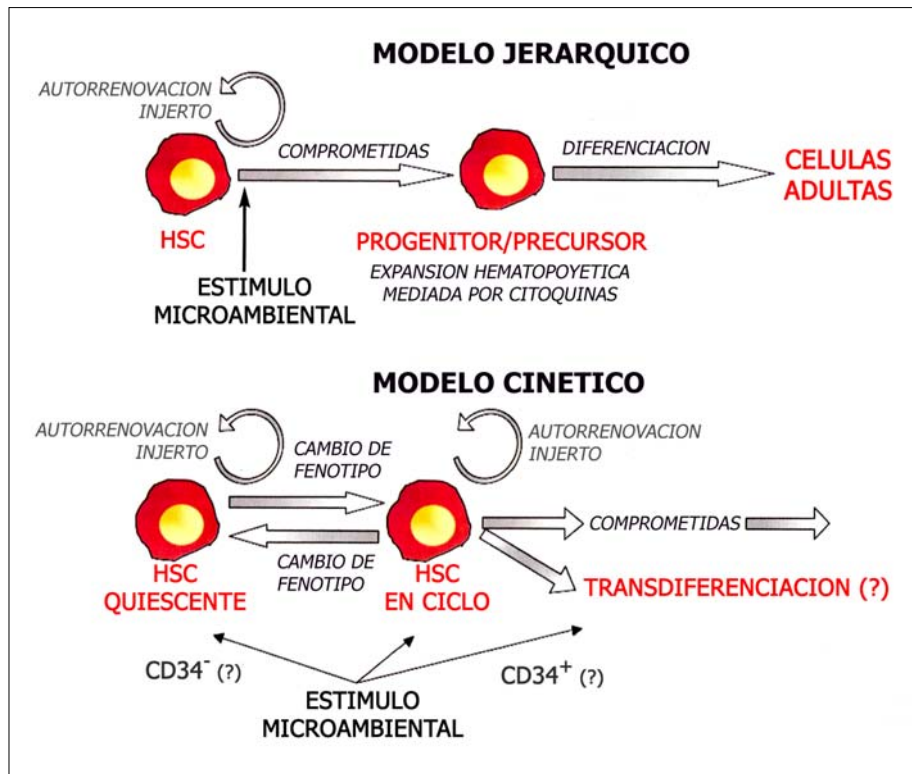


Figura 1. Modelos de regulación de las SC Adultas.

Modificado de Lemoli, RM; Haematologica 2005.

2.4. Fibroblast-like circulantes

Los fibroblastos son viejos conocidos, que se originan en el mesénquima embrionario y que luego en el tejido conjuntivo adulto reparan las lesiones. La producción de lesiones en el tejido subcutáneo de la rata probaba la rápida aparición de las células de sangre periférica y posteriormente de otras células alargadas con morfología fibroblástica, que siempre se atribuyeron al reclutamiento que se producía en el tejido conectivo adyacente a la lesión. Sin embargo, ya en 1902 Maximow describió la metaplasia de monocito a fibroblasto en exudados estériles de conejos, aunque el mismo reconocía que era una aportación difícilmente aceptable para los hematólogos más ortodoxos. Por las mismas fechas Alexis Carrel también comunicó el hallazgo de fibroblastos a partir del cultivo de monocitos, pero la metodología no estaba clara, y en 1935, JK Moen, usando los mismos cofres de Carrel, observa algunas “colonias típicas de fibroblastos”, al seguir el crecimiento de células mononucleares obtenidos por irradiación de la pleura en cerdos. En los años 1930 al 1940 se propuso a los linfocitos, previamente transformados en monocitos, como posibles precursores del fibroblasto, afirmación que no pasó de una mera elucubración [45].

La consideración del fibroblasto como una célula circulante fue un concepto que despertó una fuerte oposición, y desde luego quedó bastante relegada en los años siguientes, con alguna excepción como la observación de Petrakis [46], que describía la presencia de un “mesenchymal progenitor cell pool” en las células mononucleares de sangre periférica y la presencia de partículas de tinta India en los macrófagos primero y en los fibroblastos después. Desafortunadamente estos hallazgos no tuvieron la relevancia adecuada y el concepto del fibroblasto originado en sangre periférica siguió relegado.

Aunque su nombre refleja la morfología fusiforme característica (*fiber-blastos*), también se identificaron formas redondeadas con alguna prolongación citoplasmática y otras variantes achacables a la edad que distinguen entre el fibroblasto joven y el fibroblasto viejo o Fibrocyte. La realidad es que la morfología del fibroblasto parece ser muy variopinta, como sus funciones, y los nombres se han ido sucediendo para ajustarse a los hallazgos. En 1957, Theodore T. Puck introdujo el término Fibroblast-like en un estudio [47] sobre el crecimiento clonal *in vitro* de células humanas con morfología fibroblástica para integrar las variaciones morfológicas de los fibroblastos y diferenciarlos de las células epitelioideas, pero el nombre hizo fortuna, y desde entonces se

viene usando para referirse a las formas fibroblásticas con funciones de stem cell [48].

Desde luego, el gran salto en la comprensión de la fisiología de los fibroblastos se produjo con la introducción de los métodos de cultivo de médula ósea humana a largo plazo [49], con sus tres fases típicas de crecimiento (fase mieloide, fase esférica y fase fibroblástica) y su sistematización sobre substratos de vidrio [37] en los años 50. Pero aún tuvieron que pasar casi treinta años para que se caracterizaran las células de médula ósea formadoras de colonias de fibroblastos (F-CFC) en cultivos en medio líquido, con inmunofluorescencia usando anticuerpos monoespecíficos para la presencia y distribución de la fibronectina y los tipos de colágeno [50, 51]. También se hicieron estudios morfológicos comparativos en cultivos de médula ósea obtenidos de humanos, perros y ratones [52] y se describieron las relaciones de los fibroblastos medulares con la activación de la CSF y el crecimiento de CFU-GM en enfermos de aplasia medular [53], su influencia en la regulación de la linfopoyesis canina [54] o la posibilidad de que los fibroblast-like de embrión de ratón, tuvieran la capacidad de diferenciarse en macrófagos [54].

La identificación de los fibroblast-like / F-CFC en cultivos de médula ósea y de distintos tejidos en humanos y animales, contrastaba con la ausencia de estos mismos hallazgos en la sangre periférica, y en

ninguno de los cultivos en medio líquido de humanos, perros o ratones [54] se pudo demostrar la presencia de células fibroblásticas. Los Fibroblast-like aún eran invisibles en la sangre periférica.

Los Fibroblastos/Fibroblast-like aparecen en los cultivos de monocitos de sangre periférica. En 1987 al cultivar células adherentes de sangre periférica de origen humano, Gómez-Casal y cols. [55], describieron la presencia de células fibroblásticas al 5º día del cultivo, observando la formación de colonias F-CFC a los quince días de la incubación (Imagen 2). Se usó una modificación a la metodología de Kaneko y cols. [56] para los cultivos de células medulares y se hizo un intento de caracterización citoquímica (peroxidasa, fosfatasa alcalina, esterasas y NBT test) e inmunológico (OKT3, OKT9, OKT10, OKT11....) que no registró diferencias con los fibroblastos obtenidos de médula ósea, y que demostraba positividad al NBT test, al anticuerpo monoclonal D-Macrophage y a la alfa-naftil acetato esterasa sugiriendo la existencia de actividad fagocítica. También se estudió la incidencia de los fármacos y de algunas enfermedades en el comportamiento del cultivo y se evidenció que el diclofenaco sódico y la mepivacaína inhibían su crecimiento mientras que la hidrocortisona a dosis de 0.05 mg/ml incrementaba la proliferación fibroblástica. Algunas hemopatías como la leucemia mieloide crónica y los linfomas no Hodgkin o los

tratamientos citostáticos previos también modificaban su comportamiento en cultivo [57].

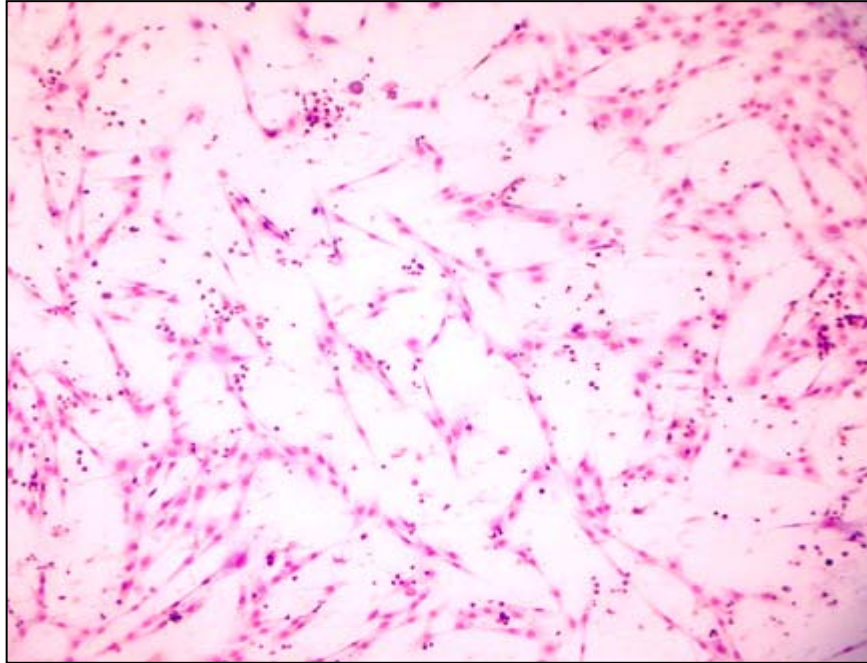


Imagen 2. Células fibroblastoides al 5° día de cultivo. Tinción de May-Grünwald-Giemsa.

En 1997 Bucala [58] describió una nueva subpoblación de leucocitos que mediaba la reparación tisular, formada por fibrocitos en cultivos de células adherentes de sangre periférica humanas y de ratón. Siguió la metodología habitual, incluyendo la adición de un 20% de suero bovino fetal (SBF) y la depleción de células no adherentes por

aspiración y a intervalos semanales los cultivos eran repuestos con medio fresco. Los estudios morfológicos se realizaron después de 6 semanas de cultivo, incluyendo inmunofluorescencia, análisis FACS y análisis por microscopio electrónico. Las células proliferantes tenían una morfología en forma de huso muy similar a la de los fibroblast-like y desde entonces fueron bautizadas como Fibrocytes. El análisis con FACS requería la recolección de las células por raspado suave y trituración e incubación directa con anticuerpos. La observación de los resultados identifica a los Fibrocytes con el siguiente patrón:

- **Positivo** : Colágeno I y III, Vimentina, Fibronectina,
CD11,CD18,CD34,CD45,CD71
- **Negativo** : Esterasas, Citokeratina, F. Von Willebrand,
Desmin, CD14,CD33,CD38,CD25,CD54,CD56

Del análisis de estos datos, y especialmente de la positividad al CD34, a la Vimentina y al Colágeno I, surgió la hipótesis que atribuye al Fibrocyte la identidad de una población circulante de precursores fibroblásticos no comprometidos o indeferenciados que probablemente

tendría un origen medular. Por primera vez los Fibroblast/Fibroblast-like se hacían visibles en sangre periférica con el nombre de Fibrocytes.

Las señas de identidad del Fibrocyte. La expresión de marcadores de superficie de los fibrocytes se fue completando en los 10 años siguientes a su descubrimiento, hasta lograr un perfil muy específico. Pilling et al en 2003 [59] partiendo de PBMC depleccionadas de células T con anti-CD3, células B con anti-CD19, monocitos anti-CD14 o todas APCs con anti-HLA de clase II, y luego cultivadas en condiciones libres de suero, demostró que los Fibrocytes crecían a las 72 horas cuando no se habían excluido los monocitos y las APC. La determinación de marcadores de superficie la hizo a los 5 días de cultivo, mediante inmunohistoquímica; -en los estudios anteriores se hicieron a las seis semanas y con FACS-, y ampliando los marcadores de 31 a 58. Los resultados fueron equivalentes con la excepción de la α -actina de músculo liso y el CD11a que en el estudio inicial eran negativos. El nuevo perfil de identidad de los Fibrocytes, que extendía el fenotipo a los receptores de quimioquinas y a la familia de las integrinas quedó nuevamente establecido:

- **Positivo** : CD11a;CD11b;CD45;CD80;CD86;MHC clase II; colágeno I; fibronectina; receptores de las quimioquinas (CCR3;CCR5;CCR7;CXCR4 y actina α de músculo liso). Integrinas (CD49a,CD49b,CD49e,CD29,CD61 y CD18)
- **Negativo** : CD1a;CD3;CD19,CD38. Integrinas (α 3, α 4, α 6, α 4 β 7, α E y Ag cutáneo asociado a linfocito)

Aunque los criterios de identificación de los Fibrocytes cada vez son mas específicos, los mecanismos implicados en su diferenciación aún son en gran parte desconocidos. Se han descrito algunos factores plasmáticos que inhiben la diferenciación de los Fibrocytes, y en este mismo sentido se evalúa el papel del Serum Amyloid P (SAP) en la diferenciación del fibrocyte. Se comprobó que la presencia en el plasma de niveles de SAP entre 10 y 0.1% producía una disminución significativa de los fibrocytes que volvían a proliferar rápidamente a una concentración plasmática del 0.01% o cuando se calentaba el suero a 95°C. También se observó que los agregados de IgG tenían capacidad para inhibir la diferenciación del fibrocyte, sugiriendo la hipótesis de que la activación de los receptores para Fc de la IgG, el mismo sitio donde se une el SAP, podría ser una señal específica para la diferenciación

fibrocítica, porque estos hechos no ocurrían con los agregados de IgA, IgE or IgM [60].

Por otra parte se han resaltado las condiciones que favorecen la diferenciación de los fibrocytes en humanos y en ratones, subrayando el papel relevante de las células T y de la TGF- β 1 [61]. Desde luego los linfocitos T son imprescindibles para la diferenciación fibrocítica, y se comprueba que la proporción óptima CD14+/célula T es 3:1; también se observa que la adición de TGF- β 1 (1-10 ng/ml) en los cultivos, entre los días 3 y 10, produce un gran acúmulo de fibrocytes e incrementa la expresión del Colágeno I de manera dosis-dependiente. El papel del TGF- β 1 se extiende a promover la diferenciación morfológica y funcional de los miofibroblastos [62] y a aumentar la contractilidad y la expresión de α -actina de músculo liso de manera dosis-dependiente, como se comprueba en los cultivos con colágeno a los que pueden contraer un 20%, en contraste con las PBMC.

Los fibrocytes también tienen la capacidad de segregar citocinas inflamatorias, y el estudio del mRNAs de células aisladas procedentes de lesiones implantadas en ratones, que expresan IL-1 β , IL-10, TNF- α , MIP-1 α , MIP- β , MIP-2, PDGF-A, TGF- β 1 y M-CSF [63], o factores proangiogénicos incluyendo VEGF, bFGF, IL-8, PDGF y factores de

crecimiento hematopoyético que promueven la proliferación endotelial [64].

Se descubre la implicación del Fibrocyte en la inmunidad y en algunas enfermedades. La evidencia que proporcionó la citometría de flujo de que los fibrocytes expresan marcadores de superficie implicados en la presentación antigénica como las moléculas de clases II HCM (HLA-DP, DQ y DR), moléculas estimuladoras (CD80,CD86) y moléculas de adhesión (CD11a,CD45,CD58), sugería la implicación de los fibrocytes en la inmunidad. Para comprobar la capacidad de los fibrocytes para activar células T alogénicas en una reacción mixta de leucocitos, se comparó con la capacidad presentadora de antígenos de los monocitos y de las células dendríticas, y los resultados medidos por la intensidad fluorescente relativa con ficoeritrina-conjugada o isotiocianato conjugado con mABs, demostraron que los fibrocytes inducían una respuesta más elevada que los monocitos y menor que la de las células dendríticas.

También se estudió la respuesta funcional *in vivo* con fibrocytes purificados de ratón, provocando una lesión en los ganglios linfáticos regionales, y se detectó un 5% de los fibrocytes marcados en el ganglio linfático poplíteo [65]. Estos datos incluyen a los fibrocytes como una célula potente presentadora de antígenos.

La relación entre la respuesta inflamatoria y la localización de los fibrocytes en tejidos fibróticos hace sospechar su implicación en la patogenia de un gran número de enfermedades [66] y en los últimos años se ha observado su espectacular crecimiento en los pacientes quemados, en relación directa con el nivel de TGF- β 1 y la superficie quemada (mayor del 30%) [67], su actuación en una nueva enfermedad llamada dermatopatía nefrogénica fibrosante [68], y se le reserva un lugar relevante en la leishmaniasis [69].

El papel de los fibrocytes en la enfermedad sigue incrementándose y ya se les asocia con lesiones cutáneas, fibrosis pulmonar, tumores, queloides y en general en todos los procesos que incluyen fibrosis patológica [70]. Recientemente también se le ha adjudicado la regeneración del tejido pulmonar, incluyéndolos en la patogenia de la neumonía intersticial idiopática [71].

2.5.- Mesenchymal Stem Cell

Las **MPSC** (Stem Cells Progenitoras Mesenquimales) son células multipotentes capaces de diferenciarse en varios tejidos mesenquimales, como son el óseo, cartilaginoso, graso, tendinoso y muscular. El estudio de las MPSC abre una alternativa a las SC embrionarias (ES) y a su aplicación terapéutica.

“Mesenchyme” deriva, principalmente, del tejido mesodérmico embrionario y da lugar a gran número de células del tejido conectivo del adulto. Generalmente, en esta definición se incluyen los fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, miocitos [72].

Los términos MPC y MSC poseen características comunes, como son la autoregulación, la diferenciación en varias líneas a partir de una célula, y la reconstitución de los tejidos de los cuales deriven, de ahí muchas veces la dificultad de diferenciarlos. En la médula ósea las MSC interactúan célula-célula con el sistema hematopoyético para su proliferación y diferenciación.

La dificultad radica en la identificación de marcadores de superficie de las MSC o MPC, y si éstas son capaces de reparar los tejidos mesenquimales dañados. Existen marcadores celulares comunes

(CD 34+, CD 38-, HLA DR-) entre las HSC y MSC pudiendo postularse un origen común. Posteriormente, la expresión del marcador de superficie CD50, determina el origen de una serie celular u otra.

De tal manera, las células CD50- ,CD34+ dan lugar a la línea mesenquimal y las CD50+, CD34+ dan lugar a la línea hematopoyética [73].

Se acepta que el inmunofenotipo de las MSC presenta antígenos HLA de clase I siendo negativos para el HLA-DR. La tabla 5 recoge el patrón inmunofenotípico de las MSC según algunos autores [74].

Tras la demostración y caracterización de las MSC en médula ósea, se plantea la posibilidad de que estas células progenitoras estén presentes en sangre periférica.

Los primeros intentos para encontrar la MSC circulantes se hicieron en colecciones de precursores celulares de sangre periférica (PBPC) que habían sido movilizados con GM-CSF, y desde luego los resultados fueron contradictorios, porque unas veces no se detectaban, y cuando se encontraban se achacaban a un “salto” de las MSCs medulares movilizadas. Fernández y cols. en 1997 [75] describieron células del estroma en los PBPC de 14 pacientes con cáncer de mama, movilizados con G-CSF y GM-CSF; sin embargo Lazarus y cols. no consiguieron reproducir estos resultados [76] y Wexler y cols. [77] y Koc and Lazarus

[78] tampoco lograron demostrar la presencia de MSCs en sangre periférica y en el cordón umbilical. Recientemente da Silva Meirelles y cols. [79] en cultivos a largo plazo de ratón adulto, consiguieron generar MSCs en casi todos los órganos y en los grandes vasos y sin embargo no las detectaron en sangre periférica.

En contra de estos hallazgos, los trasplantes hematopoyéticos de progenitores periféricos han aportado las primeras evidencias de la presencia de MSCs circulantes. Villaron y cols. [80] demostraron el injerto de MSCs alógenicos de sangre periférica en la médula ósea de 2 enfermos con mieloma transplantados y también las detectaron en PBPC movilizados, y Dickhut y cols. [81] comprobaron trasplantando productos de leucaféresis, que todas las MSCs circulantes del receptor eran del donante; resultados similares fueron registrados por Poloni y cols. [82] a los 60 días del trasplante.

También se han ensayado varios métodos para mejorar la selección de estas MSCs circulantes. Tondreau y cols. [83] comparó varios métodos de separación que incluyeron la adhesión al plástico, sola y suplementada con suero bovino fetal, y la selección con anticuerpos monoclonales de CD135-positivos. Observó que la fracción de células CD135 contenía más células mesenquimales y con un mayor potencial proliferativo que las obtenidas por adherencia al plástico. La utilización

de microcamas de fibrina también parece conseguir un buen rendimiento en la selección, especialmente cuando hay pocas células [84].

En los últimos años se han ido acumulando evidencias que sugieren claramente la presencia de MSCs en sangre periférica, aunque aún no dispongamos de un perfil identificador unánime ni podamos explicar los mecanismos implicados en su movilización y en su diferenciación.

INMUNOFENOTIPO DE LAS MSC

POSITIVO	NEGATIVO
CD 29 , CD 44	CD 45 , CD 34
CD 105 , CD 106	CD 14 , CD 80
CD 166 , CD 13	CD 86
HLA clase I	HLA - DR

Tabla 5. Inmunofenotipo de las MSC

La interacción de las MSCs con el sistema inmune, modulando la respuesta CD4+, está ampliamente documentada y tiene una gran relevancia. Observaciones clínicas muy relevantes demuestran que la

infusión de MSCs expandidas en cultivo reduce la incidencia y severidad de la GVHD en el trasplante hematopoyético e incluso se ha descrito la resolución de un caso con GVHD refractario al tratamiento [85]. Aún se desconoce el alcance del papel de las MSCs en el sistema inmune, y hay controversias sobre los mecanismos que utiliza. Estudios previos, *in vitro*, ya habían documentado el efecto de la adición de MSCs en la alorreactividad de los linfocitos T, que iba desde una pequeña inhibición hasta una estimulación de la proliferación de la reacción mixta de linfocitos (MLR). Se comprobó que la acción de estas MSCs procedente de médula ósea de sujetos sanos tenían un efecto inhibitorio en relación con el número de MSCs usadas: Entre 10 y 100 células conseguían una supresión leve y entre 10.000 y 40.000 células conseguían una inhibición total. También se observó que la estimulación del MLC con Fitohemaglutinina, Concaivalina o proteína A, conseguía que con un pequeño número de MSCs se lograra una estimulación de la proliferación, mientras que un número elevado seguía produciendo una inhibición [86].

Para explicar la supresión de la reactividad de las células T frente a los aloantígenos se propuso inicialmente un mecanismo dependiente de contacto célula a célula [87]; sin embargo recientemente se ha responsabilizado de esta supresión a una o varias moléculas solubles

capaces de actuar a través de una membrana, y que no son influidas por el tratamiento previo de las MSCs con INF- α , ni con la adición al cultivo de IL-1 α , IL-1 β y TNF- α [88]. Para extender el estudio del papel inmunoregulador de las MSCs, especialmente en el ámbito del trasplante hematopoyético, se diseñó un estudio con MSCs de médula ósea humana expandidas ex vivo, que contrastando con otros ensayos no estaban irradiadas para no introducir variables que pudieran afectar a la supervivencia celular o a su diferenciación [74]. Se valoró la respuesta inmune en cultivos mixtos linfocitarios (MLC) primarios y secundarios cuantificando la diferenciación de las células dendríticas (DC), la expansión de los linfocitos T y linfocitos Natural Killer (NK) y la actividad citotóxica. Los resultados evidenciaron la fuerte inhibición de la diferenciación de las DC1 sobre las DC2 -más del 80% de las DC co-expresaban CD11/CD123-, una disminución dosis-dependiente de las células NK y de los linfocitos T –especialmente de los CD8-, y un descenso de la actividad citotóxica mediados por linfocitos citotóxicos-antígeno A4 (CTLA-4). También se contrastó el uso de 1/3 de MSCs alogénicas con el 100% de MSCs autólogas, comprobando que son más eficientes las alogénicas de un sujeto no relacionado que las autólogas, lo

que podría tener evidente utilidad en la prevención de las complicaciones inmunes de los trasplantes.

La inmunidad humoral también está siendo explorada en relación con el papel inmunomodulador de las MSC, y recientemente [89] se ha comprobado que las MSC de origen medular inhiben la proliferación y la diferenciación de los linfocitos B de sangre periférica anulando la síntesis de las inmunoglobulinas. Se sugiere que el mecanismo principal de esta supresión es un factor soluble (hMSC) capaz de atravesar las membranas.

Parece claro que cada vez hay más evidencias que le achacan a las MSCs un papel muy significativo como inmunomodulador, y con las aportaciones más recientes se comprueba que sus dianas son muy diversas tanto en la inmunidad celular como en la humoral. La potencialidad del uso clínico de las MSC va adquiriendo relevancia [72, 90], habiéndose comprobado su utilidad terapéutica en modelos animales como en la distrofia muscular [91], los defectos segmentarios óseos [92] o en las lesiones meniscales [93]. En los últimos años se ha iniciado su uso preclínico y clínico en humanos habiéndose descrito las primeras observaciones en la reparación de cartílago [94] y del hueso [95].

3.- PEMF Y LOS CULTIVOS CELULARES

3.1.- Introducción

Los Campos Electromagnéticos Pulsados de baja frecuencia (PEMF) tienen una significativa utilidad clínica en la consolidación ósea de las fracturas con retardo de crecimiento óseo y en la mejoría del dolor y de la función en la osteoartritis de rodilla. Aunque las propiedades terapéuticas de los PEMF son bien conocidas, la secuencia y mecanismos por los cuales aumentan el crecimiento óseo acelerando la formación del callo y disminuyendo el dolor en la patología inflamatoria articular no están suficientemente aclarados. En la década de los 80, Hinsenkamp [96] y Smith [97] demostraron en estudios in vivo, el aumento de los niveles de glucosaminglicanos (GAGs) tras la exposición a PEMF del cartílago embrionario de ratón y del cartílago inmaduro de conejo. Posteriormente, Wilmot [98] y Guizzardi [99], en estudios histológicos, comprobaron que la exposición a PEMF aceleraba el crecimiento de los cóndilos mandibulares en ratas de 28 días de vida, y mejoraba la organización del callo óseo en las artrodesis vertebrales de ratas adultas.

Los resultados de los cultivos celulares irradiados con PEMF, han señalado el aumento de la proliferación celular, de la síntesis y secreción de multitud de factores de crecimiento, aunque los datos no son concluyentes y en muchos casos son además contradictorios. Este conflicto de resultados puede ser atribuido a las diferencias en los protocolos de irradiación (diferentes tipos de campos electromagnéticos, campos eléctricos, frecuencia, intensidad, tiempo de irradiación, orientación del campo en relación con el cultivo y forma de la onda), de las condiciones de cultivo (especialmente el uso de células primarias, transformadas o su grado de activación y diferenciación) y a otros factores biológicos asociados, que subrayan la heterogeneidad de los métodos empleados [100].

El objetivo prioritario de la mayoría de los estudios de la acción de los PEMF en los cultivos celulares, trata de aclarar los mecanismos por los que se modifica el comportamiento de las células y su respuesta clínica, lo que condiciona la necesidad de establecer protocolos, que valoren las características de la irradiación (intensidad, frecuencia, tiempo de exposición), las condiciones de los cultivos (tipo celular, medios de cultivo, factores estimulantes celulares), y la definición de criterios homogéneos que permitan la valoración precisa de la proliferación y diferenciación celular *in vitro*.

3.2.- Metodología de irradiación y condiciones de cultivo

En los años 80 se publicaron las primeras observaciones sobre los efectos de los campos electromagnéticos pulsados (PEMF) en los cultivos celulares [101] [102] [103] [104] y desde entonces se han ido diseñando experimentos destinados a identificar los mecanismos celulares afectados por la irradiación. Naturalmente, en estos estudios, uno de los factores más relevantes son las características de los campos pulsados.

Las diferencias registradas en las condiciones de irradiación y de cultivo tienen una gran variabilidad (Tabla 6 y Tabla 7).

Autor	Aparato	Duración pulso	Frecuencia	ICM	ICE	Tiempo
Sakai y cols. (1991)	Bobina Helmholtz	76 ms	6,4 Hz	0,4 mT	No consta	5d cont. 5 d altern.
Pezzetti y cols. (1999)	Igea	1,3 ms	75 Hz	2,3 mT	2 mV	18 y 24 horas
De Mattei y cols. (1999)	Igea	1,3 ms	75 Hz	2,3 mT	2 mV	18 y 24 horas
De Mattei y cols. (2001)	Igea	1,3 ms	75 Hz	2,3 mT	2 mV	1-18 horas; 1-6 días
Hannay y cols. (2005)	2 bobinas separadas	5 ms	15 Hz	1,3 mT	15 mV	8 h/día 1,2,3; 24 h/día 1; 24 h/día 2; 24 h/día 3
Chang y cols. (2006)	PIC/16C54	300 μ s	7,5 Hz	0,22 y 0,065T/s	3 mV	1,8 y 16 h
Kuan-jung Li et al. (2007)	Model PA-950 Union Electronics	300 μ s	7,5 Hz	0,13; 0,24 y 0,32 mT	No consta	20 minutos al día / 4 d
Jahns y cols. (2007)	2 bobinas Helmholtz en paralelo	No consta	10-100; 370-500 Hz	3,14; 5,42; 1,69; 0,74; 0,85; 5,42	0,0039-0,0450 mV	6 horas
Stolfa y cols. (2007)	No consta	15 μ s	21,2 MHz	0,6 T	0,1 V	72 h
Tsai y cols. (2007)	No consta	300 μ s	7,5 Hz	0,13, 0,24 y 0,32 mT	No consta	2 y 8 h

Tabla 6. Protocolos de irradiación

ICM: Intensidad campo magnético; ICE: Intensidad campo eléctrico

Autor	Células	Condiciones	Determinaciones	Técnica
Sakai y cols. (1991)	Condrocitos (humanos/ conejo)	Colágeno en medio Ham F- 12 + SBF	Síntesis de DNA Síntesis de GAG	Timidina-H ³ A.Sulfúrico-S ³⁵
Pezzetti y cols. (1999)	Condrocitos humanos	Eagle's MEM + SBF	Síntesis de DNA	Timidina-H ³
De Mattei y cols. (1999)	Línea TE-85, MG-63 y osteoblastos	Eagle's MEM + SBF	Síntesis de DNA	Timidina-H ³
De Mattei y cols. (2001)	Condrocitos humanos	Eagle's MEM + SBF	Síntesis de DNA	Timidina-H ³
Hannay y cols. (2005)	Línea SaOS- 2 humano	MEM + SBF	Proliferación Diferenciación	Leucina-H ³ FA
Chang y cols. (2006)	Osteoclastos (rata)	MEM + SBF	Apoptosis	DNA-Yoduro de propidio
Jahns y cols. (2007)	Condrocitos humanos	Medio CGM	Morfología	Software ImageJ
Kuan-Jung Li y cols. (2007)	Osteoblastos (rata Wistar)	Dulbecco's modificado Eagle + SBF	Proliferación TGF- α 1, PGE2 FA	Software MICD ELISA
Stolfa y cols. (2007)	Condrocitos humanos	MEM + SBF	Viabilidad celular	MTT-Test
Tsai y cols. (2007)	Osteoblastos (rata)	No consta	Proliferación Diferenciación	Contaje celular FA

Tabla 7. PEMF en cultivos celulares

SBF: Suero Bovino Fetal; GAG: Glucosaminglicanos; MEM: Minimum Essential Medium; FA: Fosfatasa Alcalina

Los mecanismos de acción de los campos electromagnéticos pulsados (PEMF) sobre el tejido óseo y cartilaginoso, favoreciendo la consolidación ósea, son desconocidos. Norton [101], tras radiar con PEMF un cultivo de tejido mixto compuesto predominantemente por tejido condroblástico, observó que aumentaba la velocidad de confluencia celular y la actividad de la lisozima cartilaginosa. Esta activación podría ser el mecanismo por el que los PEMF favorecerían el aumento del crecimiento endocondral en la reparación ósea.

La exposición a los PEMF de los fibroblastos sinoviales y células mononucleares fue estudiado por Murray y cols. en 1988 [102] y comprobó que se producía un descenso en la liberación de 2 hidrolasas lisosómicas fibroblásticas y que no se alteraban los niveles de citoquinas producidas por la población de células mononucleares.

La orientación de la irradiación de los PEMF es uno de los factores que influye en el aumento de la proliferación y síntesis de matriz extracelular de los condrocitos. Elliott y cols. [103] sobre un cultivo de condrocitos articulares de origen bovino, observaron que la orientación vertical de la irradiación PEMF reducía hasta un 50% la proliferación celular y la orientación horizontal no la afectaba, mientras que los cambios de orientación no producían efectos significativos sobre la síntesis de la matriz extracelular.

Norton y cols. [104], estudiaron la acción del PEMF sobre el cultivo mixto de condroblastos de epífisis tibial, de esternón y de fibroblastos procedentes de la piel. Observaron que la irradiación producía un descenso de la síntesis proteica en los condroblastos esternales, y no detectaban cambios en la de los fibroblastos.

El efecto de los PEMF sobre los cultivos de linfocitos fue estudiado en 1991 por Khalil y cols. [105] que comprobó como la exposición durante 72 horas, producía una supresión de la actividad mitótica y una elevada incidencia de aberraciones cromosómicas.

Sakai y cols. en 1991 [106] diseñaron un estudio para evaluar las diferencias entre la estimulación intermitente y continua con el PEMF en condrocitos. Utilizaron pulsos repetitivos a ráfagas de 76 ms con intensidades del campo magnético de 0,4 mT. Estas ondas electromagnéticas eran similares a las corrientes generadas por el hueso en vivo como respuesta a la deformación mecánica. La valoración se hizo en un grupo control, un grupo con irradiación continua durante 5 días y un tercer grupo con irradiación intermitente durante 12 horas diarias también 5 días.

Se cultivaron células de cartílago costal de conejos blancos de Nueva Zelanda y cartílago articular humano procedente de la reconstrucción quirúrgica del pulgar en pacientes con polidactilia. Se valoró la

proliferación celular midiendo la incorporación de Timidina- H^3 al DNA y la síntesis de glicosaminoglicanos (GAG) con la incorporación de Ácido Sulfúrico- S^{35} . Estas determinaciones se hicieron al 5° día de la estimulación con PEMF. También se suplementó el medio de cultivo con lidocaína y adriamicina para cuantificar el impacto sobre las alteraciones de membrana y del núcleo. Los resultados demostraron que la irradiación intermitente aumentaba claramente la proliferación celular e incrementaba la síntesis de GAG en relación con el grupo control. Sin embargo, la estimulación continua no revelaba diferencias significativas con el grupo control. Se comprobó que la alta concentración de lidocaína hacía más evidente el efecto del PEMF, mientras que la adición de adriamicina no registraba diferencias entre el grupo estimulado y el grupo control.

Las características de las células formadoras y remodeladoras del hueso también se ven afectadas por la exposición al PEMF. Bodamyali y cols. [107] radiaron con PEMF durante 15, 30 ó 60 minutos un cultivo de osteoblastos de calota de rata recién nacida, observando un incremento, directamente proporcional al tiempo de irradiación, de la mineralización de los nódulos óseos y de la transcripción del RNAm de las proteínas morfogenéticas del hueso BMP-2 y BMP-4.

El efecto de la irradiación con PEMF sobre la remodelación ósea fue estudiado por Shankar y cols. [108] sobre una población celular de osteoblastos de rata cocultivados con osteoblastos-like. La exposición al PEMF duplicaba la reabsorción ósea, mientras que la irradiación sobre los osteoclastos aislados no producía un aumento significativo de dicha reabsorción. El aumento de la reabsorción ósea se produciría por el efecto inhibitorio del PEMF sobre la calcitonina.

Pezzetti y cols. [109] y De Mattei y cols. [110] [111] plantearon varios experimentos con el objetivo de valorar los efectos del PEMF en cultivos celulares identificando las condiciones de máxima inducción, el tiempo de exposición mínimo eficaz, la acción de la exposición prolongada y el papel del suero bovino fetal en la proliferación celular.

El generador de ondas electromagnéticas utilizado fue el Igea (Carpi, Italia), que producía pulsos de 1,3 ms con una frecuencia de 75 Hz, un campo magnético de 2,3 mT y un campo eléctrico de 2 mV detectado con una bobina estándar.

La irradiación se realizaba dentro de la estufa y los cultivos control se mantenían en la misma estufa a una distancia a la que no se detectaban campos magnéticos o en otra estufa.

Los cultivos se realizaron con las condiciones habituales, utilizando medio de Eagle adicionado con pronasa y colagenasa cuando se

sembraba cartílago. En todos los casos, el medio se suplementó con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10%. La proliferación celular en los cultivos se cuantificó con la incorporación de Timidina- H^3 y la determinación del DNA total por métodos fluorométricos.

El estudio de las condiciones de exposición para valorar los máximos efectos sobre la proliferación celular se hizo en condrocitos humanos procedentes de cirugía reparadora del cartílago articular y nasal [109]. Se mantuvieron en cultivo durante 3 a 4 semanas hasta conseguir la confluencia y se utilizó como marcador específico del fenotipo de los condrocitos la expresión del colágeno tipo II por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El incremento máximo de la síntesis de DNA inducido por PEMF se registró con 18 horas de exposición tanto en los condrocitos articulares como en los de origen nasal. El SBF parece jugar un papel esencial en la síntesis del DNA, de tal forma que con concentraciones del 10% se obtienen niveles de proliferación en ambos grupos mucho más elevados que con concentraciones de 0,5%.

La determinación del tiempo mínimo de exposición al PEMF para obtener efectos biológicos, se estudió sobre una línea celular de osteosarcoma humano, TE-85 y MG-63, proporcionada por el Centro di Biotecnologie Avanzate (Génova, Italia) y el Istituto Ortopedici Rizzoli (Bologna, Italia), y sobre osteoblastos de sujetos sanos [110]. En las

líneas celulares TE-85 y MG-63 se utilizaron periodos comprendidos entre 10 minutos y 36 horas, observando que con 10 minutos no se obtenían efectos medibles y que con 30 minutos, 9 horas y 24 horas se registraba un aumento significativo de la incorporación de Timidina- H^3 no claramente relacionada con la duración del tiempo de exposición. También se comprobó que la ausencia de SBF tiene poca incidencia en el incremento de incorporación de Timidina- H^3 ; las dos líneas celulares de osteosarcoma comparten el mismo patrón de respuesta aunque en la línea MG-63 se detecta una menor intensidad. En el cultivo de osteoblastos de humanos sanos se detectó una relación directa entre el tiempo de exposición y la incorporación de Timidina- H^3 , comprobando que por debajo de 6 horas no se producían efectos y que el tiempo mínimo de exposición estaba entre 6 y 9 horas. No se hizo un grupo sin SBF porque su ausencia impide los efectos del PEMF.

Los efectos de la exposición prolongada al PEMF, intentando trasladar las observaciones clínicas en el tratamiento de la osteoartritis, se hicieron valorando la respuesta proliferativa de condrocitos obtenidos de cartílago articular, procedentes de cirugía de fracturas femorales recientes [111]. Se hicieron dos grupos que identificaban experimentos a corto plazo entre 1 y 18 horas y experimentos a largo plazo entre 1 y 6 días, que a su vez se dividían en dos subgrupos con baja densidad celular

(7500 células/pocillo) y cultivos subconfluentes con alta densidad (30000 células/pocillo).

En los experimentos a corto plazo no se observaron diferencias de incorporación de Timidina- H^3 con exposiciones de 1 y 6 horas. Sin embargo, con 9 y 18 horas hay un incremento significativo de síntesis de DNA, algo menor en los cultivos con alta densidad celular. El mayor incremento de incorporación de Timidina- H^3 en relación con los controles, se produce a las 18 horas de exposición.

En los experimentos a largo plazo también se observaron diferencias significativas con la utilización del PEMF. En los cultivos control el patrón de proliferación tiene una fase de incremento hasta el tercer día, una fase estacionaria en el tercer y cuarto día y un suave descenso hasta los seis días. Las células expuestas al PEMF tienen un patrón de crecimiento similar con un incremento de la síntesis de DNA durante los tres primeros días significativamente más elevado que en los controles y a partir del cuarto día no se observan diferencias. La adición de SBF el tercer día de cultivo induce un incremento de la incorporación de Timidina- H^3 tanto en los controles como en las células expuestas al PEMF.

La acción del PEMF y del óxido nítrico (ON) en la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos (línea celular MC3T3-E1) fue

valorada en los estudios de Diniz y cols. [112] [113]. Los niveles de DNA y de fosfatasa alcalina (FA) estaban incrementados en los grupos radiados en ausencia del inhibidor del ON lo que sugería que este efecto sobre la proliferación y la diferenciación estaría mediado por la síntesis de ON. La administración de PEMF en los estadios de osteoblastos más inmaduros aumenta la diferenciación y la proliferación, disminuyendo la formación de tejido óseo si se administra durante la fase de mineralización.

El estudio de la diferenciación y de la secreción de citoquinas (TGF- β 1, PGE2) en un cultivo de osteocitos-like (MLO-Y4) tras la irradiación con PEMF fue realizado por Lohmann y cols. [114]. La irradiación de los cultivos 8 horas durante los días 1, 2 o 4, producía un incremento de la FA (diferenciación) y de los factores TGF- β 1 y PGE2, sin que se detectase ningún efecto sobre la proliferación celular.

Toricelli y cols. [115] estudiaron los efectos del PEMF cuando interaccionan los osteoblastos humanos (línea celular MG63) con sustitutos biomiméticos de húmero como el poli-metimetacrilato (PMMA) y el PMMA con fosfato alfa tricálcico (PMMA + α -TCP), cuantificándose la FA, la TGF- β 1, la IL-6 y el MTT-Test. La irradiación con PEMF tenía un efecto negativo en los osteoblastos en PMMA

mientras que se incrementaba la FA, el TGF- β 1 y disminuía la IL-6 en la interacción osteoblastos-PMMA + α -TCP.

Las características y la influencia de la irradiación con PEMF en los receptores de Adenosina A(3) de los neutrófilos humanos fue estudiada por Varani y cols. [116] que observaron un incremento de la densidad y de la actividad funcional de los receptores A(3) de la adenosina.

El efecto del PEMF en la formación de osteoclastos-like a partir de células de médula ósea de ratas Wistar adultas fue estudiado por Kyle Chang y cols. [117], utilizando un generador PIC/16C54 (Microchip Technology Chandler, AZ) que con una frecuencia de 7,5 Hz en pulsos de 300 μ s de duración, generaba campos magnéticos de 0.13, 0.24 y 0.32 mT y eléctricos inducidos de 4.8, 8.7 y 12.2 μ V/cm.

Se sembraron 1×10^6 células por placa, a las que se les cambiaba diariamente el medio de cultivo durante 8 días. Desde el día 10 hasta el día 18 se irradiaron con PEMF durante 30 minutos, 2 horas y 8 horas diarias. La determinación de citoquinas (TNF- α , IL-1 β y PGE-2) en el medio de cultivo se hizo con el método ELISA. Se detectó una correlación clara entre la irradiación con PEMF y la cuantificación de las citoquinas en dependencia del campo eléctrico inducido, de tal forma que

con 4.8 $\mu\text{V}/\text{cm}$ se producía un incremento del 50% y con 12.2 $\mu\text{V}/\text{cm}$ disminuían un 27%.

El mismo grupo describió en 2006 [118] la relación del PEMF con la velocidad de la apoptosis en osteoclastos de rata. Utilizaron el mismo generador de PEMF con tiempos de exposición de 1, 8 y 16 horas señalando los puntos de control a las 24, 48 y 72 horas de la irradiación. La apoptosis en los osteoclastos de la médula ósea de rata Wistar, cocultivados con osteoblastos, se valoró con una tinción por fluorescencia con DNA-ioduro de propidio. Se concluyó que 1 hora de irradiación no producía cambios, y sin embargo con 8 y 16 horas en el punto de corte de 48 horas había un incremento significativo de la apoptosis que no se producía ni a las 24 ni a las 72 horas.

En los trabajos de Chang y cols. [119] se valoró la formación de osteoclastos en las células de médula ósea de ratas ovariectomizadas después de ser expuestas a PEMF. Los resultados demostraron que la estimulación con PEMF inhibía la osteoclastogénesis y los factores TNF, IL-1 β y la IL-6.

El papel potencial de la estimulación con PEMF en la angiogénesis terapéutica fue valorado por Tepper y cols. [120] sobre un cultivo de células endoteliales y fibroblastos procedentes de vena

umbilical humana. La exposición con PEMF producía cambios en la quimiotaxis celular, un aumento de la proliferación y un incremento importante de la síntesis de factor fibroblástico de crecimiento β -2 (FGF-2) y de otros factores angiogénicos (angiopoyetina-2, trombopoyetina y factor de crecimiento epidermoide).

El estudio de los mecanismos de estimulación del PEMF en los osteoblastos, especialmente dirigido a su diferenciación, fue realizado por Walter Hong-Shong Chang y cols. [121]. Utilizaron un generador de campos magnéticos de una frecuencia de 15 Hz, una intensidad de 0.1 mT controlada con un sistema EPRI EMDEX II (Enertech Co., Campbell, CA). La irradiación se hizo 8 horas al día durante 14 días, con control diario de la frecuencia y de la amplitud.

Se sembraron osteoblastos-like obtenidos por digestión de la calota de ratón ICR recién nacido (5×10^5 células por pocillo), y se incubaron en las condiciones habituales. La proliferación se valoró los días 3, 5, 7 y 14 del cultivo con un test colorimétrico que detecta la conversión del difeniltetrazolio bromide en formazán (MTT). La diferenciación celular se evaluó cuantificando los niveles de fosfatasa alcalina (FA) en el medio de cultivo. La tinción de Kossa señaló los nódulos de calcificación, y la expresión de genes diana como Colágeno tipo I, Osteocalcina,

Osteopontina, Osteoprogerina, RANKL y α -actina se cuantificó por PCR en el RNA-m aislado de los osteoblastos con trizol.

Los resultados demostraron un aumento de la proliferación sobre el control, 34%, 11% y 13% los días 3, 5 y 7 de cultivo respectivamente. El día 14 no había diferencias. La FA siempre estaba disminuida en el grupo PEMF con respecto al grupo control. La mineralización no registró diferencias con el grupo control y tampoco había diferencias en la expresión génica, salvo en la Osteoprogerina que estaba sobreexpresada y en la RANKL que estaba infraexpresada.

Chang y cols. [122] estudiaron el efecto del PEMF sobre el cultivo de células de médula ósea de ratas adultas, valorando el número de osteoclastos (identificados mediante la fosfatasa resistente al ácido tartárico), la producción de osteoprotegerina (OPG), RANKL y la concentración de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Concluyeron que la estimulación con PEMF a diferentes intensidades puede regular la osteoclastogénesis, la reabsorción ósea y la concentración de OPG, RANKL y M-CSF en el cultivo de células procedentes de médula ósea.

El papel relevante de las poliaminas (PA) en los procesos de síntesis y de diferenciación de las proteínas de los osteoblastos fue

estudiado por De Mattei y cols. [123]. Evaluaron la acción del PEMF en las PA y en la activación de los genes c-myc y c-fos de una línea celular de osteosarcoma (MG-63), y observaron que después de 1 hora de exposición, el gen c-myc se activa y luego permanece subregulado, mientras que los niveles de RNAm del gen c-fos se incrementan en la primera media hora y luego descienden.

Gwynne Hannay y cols. [124] trasladaron los protocolos clínicos del tratamiento de las fracturas con PEMF, a los cultivos celulares para valorar el desarrollo óseo. Las características de la irradiación incluían pulsos de 5 ms de duración, con una frecuencia de 15 Hz y una intensidad 1,3 mT. El periodo total de irradiación fue de 3 días distribuidos en 4 grupos (grupo I: 8 horas diarias los días 1, 2 y 3; grupo II: 24 horas el día 1; grupo III: 24 horas el día 2 y grupo IV: 24 horas el día 3).

Se utilizó una línea celular de osteosarcoma humano (SaOS-2 de ATCC No: HTB-85, Manassas, VA, USA) cultivada en las condiciones habituales e irradiadas dentro de la estufa. La proliferación se evaluó con la incorporación de Leucina- H^3 y la diferenciación se cuantificó midiendo los niveles de FA en el medio de cultivo.

Los datos obtenidos no demostraron diferencias entre los 4 protocolos de irradiación, sin embargo evidenciaron una reducción de la proliferación y

un aumento de la diferenciación con incremento de la FA, en las células expuestas al PEMF.

La respuesta de una línea de osteoblastos MC3T3-E1 y de fibroblastos murinos embrionarios a la irradiación con PEMF fue estudiada por Patterson y cols. [125], utilizando un generador “Physio-Stim[®]” (Orthofix, Inc., McKinney, TX, USA) aprobado por la FDA para el tratamiento clínico de las fracturas. La exposición al PEMF incrementaba ligeramente el TGF- β 1 el primer día y no modificaba la PGE2; sin embargo, tanto en los osteoblastos como en los fibroblastos se producía un incremento de la quinasa mTOR (mammalian target of rapamycin) tras la irradiación. Este hecho sugiere que el PEMF actúa de una forma similar a los factores solubles de crecimiento, activando una vía única de señales intracelulares.

En los trabajos de Sakai y cols. [126] se demuestra que la acción del PEMF sobre cultivos de osteoblastos MC3T3 no depende únicamente de la intensidad del campo magnético, eléctrico y de la frecuencia de las ondas de pulso, sino también de la morfología de la onda electromagnética. Comprobaron que la utilización de una onda electromagnética octogonal producía una disminución en la producción de colágeno tipo I en la matriz extracelular.

La actividad de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) promoviendo la diferenciación de los osteoblastos fue estudiada por Selvamurugan y cols. [127] valorando el efecto del uso simultáneo de BMP-2 y los PEMF sobre el cultivo de osteoblastos primarios de rata. El uso conjunto demostró un incremento de los tres marcadores -FA, colágeno tipo I y osteocalcina- usados para valorar la proliferación celular.

Zhang y cols. analizaron [128] la respuesta del cultivo de osteoblastos de rata r/n a la exposición a campos electromagnéticos rectangulares (REMF), triangulares (TEMF), sinusoidales (SEMF) y pulsados (PEMF), observando que la irradiación con PEMF aumentaba la proliferación celular y la mineralización ósea e inhibía la diferenciación osteoblástica.

La búsqueda de la intensidad óptima de irradiación para conseguir el mayor crecimiento osteoblástico fue el objetivo del estudio diseñado por Kuan-Jung Li [100]. Se utilizó un sistema PIC/16C5X (Microchip Technology, AZ, USA) que producía pulsos de 300 μ s con intensidades de 0.13 mT, 0.24 mT y 0.32 mT que a su vez, cada uno de los pulsos, disponía de tres intensidades distintas de campos eléctricos inducidos. La irradiación tenía una duración de 20 minutos los días 1, 2 y 3, dentro de

la estufa y con los campos magnéticos paralelos al plano de los cultivos celulares.

Los osteoblastos primarios obtenidos por digestión con colagenasa de la calota de ratas Wistar r/n se cultivaron en medio de Dulbelcco con un 10% de SBF y con las condiciones habituales. A las 24 horas de cada irradiación se hizo un conteo celular (tinción con Hematoxilina-Eosina) con un sistema analizador de imagen MICD (MICD Software Series Image Research Inc, Ontario, Canadá), y se cuantificaron por ELISA TGF- β 1 y PGE2 en el medio de cultivo y la FA de las células por espectrofotometría a 405 nm.

Los resultados demostraron que el campo eléctrico más eficiente estaba comprendido entre 2 y 4 mV/cm que lograba una proliferación un 20% más alta que el grupo control. El TGF- β 1 también se elevaba significativamente a partir del 2º día de irradiación, mientras que la PGE2 se incrementaba hasta el 2º día y después descendía hasta el día 4. El comportamiento de FA intracelular seguía el mismo patrón del TGF- β 1.

También se han descrito cambios en la morfología de los condrocitos sometidos a la irradiación con PEMF. Janhs y cols. en 2007 [23], utilizando como generador una bobina de Helmholtz situada dentro de la estufa, programó el estudio de 6 grupos con distintas características

de irradiación que incluían: campos eléctricos inducidos entre 0.0039 y 0.0450 mV/cm, distancias al centro de la bobina entre 0.25 y 2.25 cm, frecuencias entre 10 y 500 Hz e intensidades entre 0.74 y 5.42 mT. El tiempo de exposición empleado para todos los grupos fueron 6 horas.

Los condrocitos se obtuvieron de cóndilos femorales de pacientes sometidos a cirugía, tratados inicialmente con colagenasa y sembrados hasta la confluencia, y posteriormente tripsinizados para ser resembrados. El estudio morfológico se hizo con un software de imagen (ImageJ) antes del PEMF y a intervalos de 1 hora.

Se comprobó que los parámetros de irradiación más eficaces eran 0.0039 mV/cm, 3.14 mT y 100 Hz de frecuencia. Observaron que después de 6 horas de PEMF disminuía la superficie de contacto de los condrocitos y cambiaba la forma. En el grupo control menos del 5% tenía morfología esférica y tras la irradiación el 79% adquirirían la forma redonda.

Stolfá y cols. [129], evaluaron la viabilidad de los condrocitos humanos en cultivo con un 20% de SBF tras 72 horas continuas de estimulación con PEMF. El MTT test reveló que no había incremento significativo en relación con los controles.

Tsai y cols. [130], estudiaron la proliferación y diferenciación *in vitro* de osteoblastos de calota de rata Wistar r/n en un soporte de un polímero de ácido láctico y glicólico (PLGA). La irradiación durante 2 y

8 horas diarias con PEMF (7.5 Hz de frecuencia y 0.13, 0.24 y 0.32 mT de intensidad), conseguía un aumento de proliferación los días 6 y 12 y una disminución el día 18 cuando se utilizaban 8 horas de estimulación. Los grupos tratados con PEMF con una intensidad de 0.32 mT inhibían la proliferación celular, pero elevaban la actividad de la FA, independientemente del tiempo de estimulación.

La acción de la estimulación conjunta de PEMF y BMP-2 en los cultivos de células mesenquimales humanas, producía un incremento de la osteogénesis (aumento de la FA y de la osteocalcina), como se comprobó en los trabajos de Schwartz y cols. [131]. Este efecto sinérgico PEMF+BMP-2 era más intenso entre los días 12 y 20, sugiriendo que el PEMF mejora la respuesta de las células mesenquimales a la BMP-2 *in vivo*.

El uso clínico de PEMF para el tratamiento de la osteoartritis está ampliamente extendido, aunque no están claros los mecanismos celulares y hay evidencias contradictorias de los estudios *in vitro*. Schmidt-Rohlfing y cols. [132] en un cultivo de condrocitos humanos de pacientes con osteoartritis, evaluaron los efectos de la exposición a PEMF (2 mT de intensidad y 16.7 Hz de frecuencia) 24 horas durante 14 días, y no encontraron diferencias significativas en la producción de

colágeno tipo II ni en la expresión génica del agrecan entre el grupo expuesto y el grupo control.

Martino y cols. [133] investigaron la acción de los PEMF sobre la proliferación y mineralización ósea de los osteoblastos, y comprobaron que la estimulación de la línea osteoblástica SaOS-2 no afectaba a la actividad metabólica ni al número de células, sin embargo incrementaba la formación de nódulos mineralizados.

El efecto del PEMF sobre los receptores de adenosina A1, A2A, A2B y A3 en el cultivo de condrocitos y fibroblast-like bovinos fue evaluada por Varani y cols.[134]. Los resultados demostraron una sobre regulación de los receptores A2A y A3 ligada a un aumento de su actividad funcional.

PROLIFERACIÓN		DIFERENCIACIÓN				OSTEOGÉNESIS	
+	-	+	-	+	-	+	-
Mattei (1998) Chang (2004) Li (2007) Tsai (2007) Zhang (2007) Salvamurugan (2007)	Martino (2008)	Diniz (2002) Tsai (2007)	Zhang (2007)	Bodaniyali (1998) Martino (2008)	Diniz (2002)		
FA	Colág.I	TGFβ1	IL-6	PGE2	OPGE	RANKL	mTOR
+	-	+	-	+	+	-	+
Torricelli (2003)	Sakai (2006)	Torricelli (2003) Li (2007)	Torricelli (2003)	Li (2007)	Chang (2004)	Chang (2004)	Patterson (2006)

Tabla 8. Efectos biológicos del PEMF. Osteoblastos

SINT.PROT	GAG	COLAG.II	AGRECAN	A2/A3	LISOZIMA
+	+	0	0	+	+
Norton (1988)	Sakai (1991)	Schmid-Rholfing (2008)	Schmid-Rholfing (2008)	Varani (2008)	Norton (1998)

Tabla 9. Efectos biológicos del PEMF. Condrolastos/Condrocitos

PROLIFERACIÓN	TNF-α/IL-1β/PGE2	APOPTOSIS	OSTEOCLASG E.	REABSORCIÓN
+ Chang (2003)	Chang (2003)	+ Chang (2006)	- Chang (2004)	+ Shankar (1998)
PROLIFERACIÓN			MORFOLOGÍA	CONFLUENCIA
+ Sakai (1991) Pezzetti (1999) De Mattei (2001)	- / 0 Elliott (1988) Stolffa (2007) viabilidad		Jahns (2007)	+ Norton (1988)

Tabla 10. Efectos biológicos del PEMF. Osteoclastos

CÉLULAS	DETERMINACIONES		
FIBROBLASTOS	Hidrolasas Murray (1988)	Fenotipo Norton (1988)	mTor Patterson (2006)
MSC	Osteogénesis (PEMF + BMP-2) Schwartz (2008)		
C.ENDOTEL.	FGF-2 Tepper (2004)		
OSTEOCITOS	FA/TGF- β 1/PG2/Proliferación Lohmann (2003)		
M.O.	Osteoclastogénesis/OPG/RANKL/CFG-M Chang (2005)		
CMN	Citoquinas Murray (1988)		
NEUTROFILOS	Receptores A3 de la Adenosina Varani (2003)		
LINFOCITOS	Mitosis/Alteraciones cromosómicas Khalil (1991)		

Tabla 11. Efectos biológicos del PEMF. Otras células

OBJETIVO DEL ESTUDIO

II. OBJETIVO DEL ESTUDIO

En los últimos años han ido tomando protagonismo las Stem Cells (SC) embrionarias que tienen la máxima potencialidad para generar líneas celulares, aunque aún no tengamos claro los mecanismos de inducción y control de su diferenciación. Sin embargo, las SC adultas fueron las primeras en ser identificadas – SC Hematopoyéticas – y a las que además se les dio un uso clínico generalizado.

La identificación más reciente de SC Mesenquimales en diversos tejidos y la versatilidad que demuestran estas células para producir múltiples líneas celulares, especialmente hueso y cartílago, vuelve a demostrar la relevancia de las SC adultas y la posibilidad de integrarlas como parte del tratamiento regenerativo.

Los Campos Electromagnéticos Pulsados (PEMF) son ampliamente utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de patologías osteomusculares, aunque los mecanismos implicados no están todavía aclarados.

El diseño de este trabajo intenta establecer las condiciones de cultivo y la metodología para la evaluación del grupo de las SC adultas y

del grupo de las SC adultas expuestas a PEMF, con el estudio de los siguientes objetivos:

- 1.- Estandarización de las condiciones de cultivo de las células mononucleares (CMN) de sangre periférica en medio líquido y de su irradiación con Campos Electromagnéticos Pulsados (PEMF).
- 2.- Identificación morfológica de los tipos celulares y evaluación de la proliferación e inmunofenotipo celular.
- 3.- Valorar los cambios de actividad celular inducidos por los PEMF mediante la cuantificación de citoquinas y de la capacidad fagocítica.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- CULTIVOS CELULARES EN MEDIO LÍQUIDO

1.1.- Obtención de muestras y separación celular

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 25 donantes de sangre sanos, con edades comprendidas entre 24 y 61 años.

Se extrajeron 10 ml. de sangre por venopunción en tubo estéril con heparina libre de conservantes (Heparina Rovi al 5%) que fueron procesadas de forma inmediata después de la extracción. Para el aislamiento de las células mononucleares (CMN) se diluyeron las muestras al 50% en suero salino isotónico, vertiéndose 7 ml. de esta dilución sobre 3 ml. de Ficoll de densidad 1077 evitando la formación de turbulencias.

Se centrifugaron a 400 g durante 30 minutos consiguiéndose una interfase de CMN que se retiraba con pipeta Pasteur, y se lavaba tres veces con medio de cultivo McCoy's 5A centrifugando cada vez durante 5 minutos a 400 g.

La cuantificación de las células se hizo en un contador Coulter Counter®. El cultivo de las CMN se realizó sobre una modificación de las técnicas descritas por Gordon D y Kaneko [56]. Sobre placas de Petri de 35 mm. de diámetro se sembraron 1×10^6 CMN en 3 ml. de medio de cultivo McCoy's 5 A suplementado con antibióticos (100 UI/ml de penicilina) y Suero Bovino Fetal descomplementado y estéril al 20%. De cada muestra se sembraron 20 placas incluyendo en 10 de ellas un porta estéril que permitió el posterior estudio inmunocitoquímico. Todas las manipulaciones de las muestras se hicieron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar horizontal.

1.2.- Condiciones de cultivo y procesamiento

Las células mononucleares aisladas se sembraron (1×10^6) en medio líquido sobre 20 placas de Petri de 35 mm. de diámetro por cada caso (500 placas). Se establecieron dos grupos: el grupo control (C), que no recibía ninguna intervención, y el grupo radiado (R), que fue sometido a la irradiación con PEMF. De las 20 placas sembradas para cada caso, 12 placas pertenecían al grupo control y 8 placas pertenecían al grupo radiado. Para la determinación de los anticuerpos monoclonales se utilizaron 10 de las 20 placas por caso, depositando en el fondo de cada placa un porta estéril.

A los 7, 14 y 21 días, en todos los casos, se determinaron los siguientes parámetros: cuantificación, morfología, actividad fagocítica por NBT-Test, inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales/FAFA y cuantificación de citoquinas en el sobrenadante del cultivo.

Para el reconocimiento de cada placa se diseñó una etiqueta que comprendía:

1) número de caso, 2) destino (Giemsa, NBT, Monoclonal), 3) grupo control o grupo radiado y 4) día de cultivo que se saca de la estufa y se realizan las pruebas; v.gr., la placa **2GiemsaC14** pertenecería al caso 2

del grupo control y que fue sacada de la estufa el día 14 y tiñéndose con May-Grünwald-Giemsa. La Figura 2 recoge la distribución de las placas de un caso.

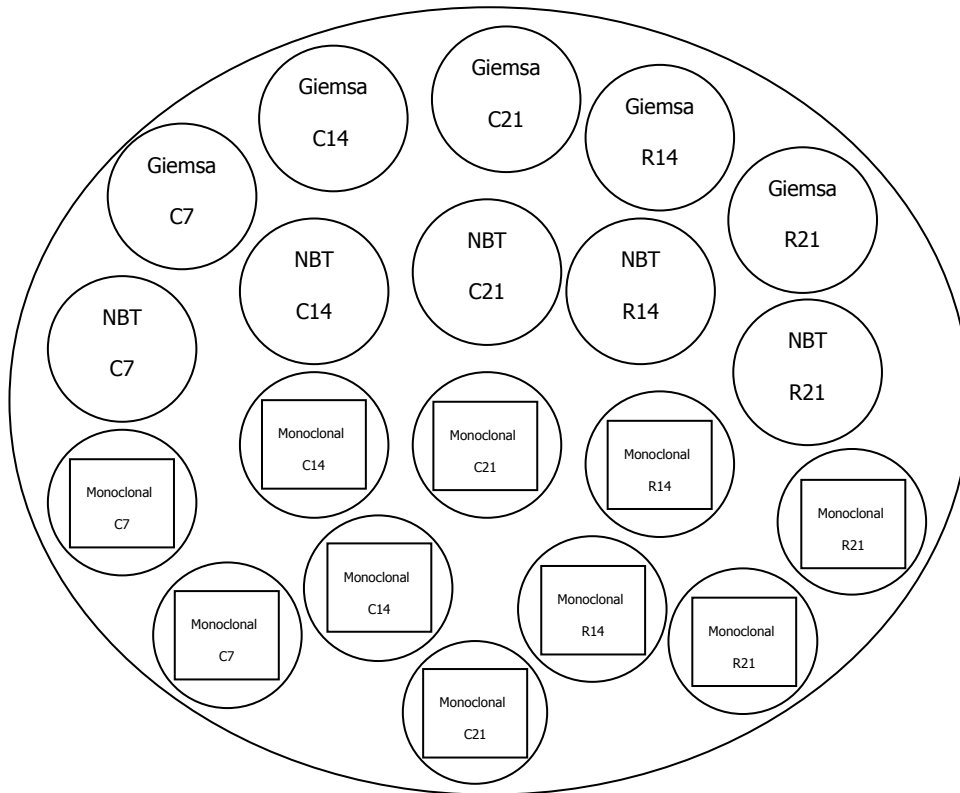


Figura 2. Distribución de las placas por cada caso sembrado

La siembra de las 20 placas/caso se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar horizontal, incubándose en una estufa de cultivo a 37° C, presión de CO₂ al 5% y humedad a saturación.

Al 7° día de incubación se sacaron 4 placas (GiemsaC7, NBTC7, Monoclonal1C7, Monoclonal2C7) de la estufa para realizar las determinaciones correspondientes. Se recogió el sobrenadante de la muestra C7, antes de teñirla con Giemsa, en 2 balines y se congelaron a -20° C para la cuantificación posterior de citoquinas. A las 16 placas restantes se les retiraba la mitad del medio cambiándose por medio fresco. A las placas GiemsaR14, GiemsaR21, NBTR14, NBTR21, Monoclonal1R14, Monoclonal2R14, Monoclonal1R21 y Monoclonal2R21 se las irradió con PEMF en una segunda estufa de cultivo bajo las mismas condiciones. Tras la irradiación las placas volvían a la primera estufa.

Al 8° y 9° día de cultivo, las placas GiemsaR14, GiemsaR21, NBTR14, NBTR21, Monoclonal1R14, Monoclonal2R14, Monoclonal1R21 y Monoclonal2R21 se volvieron a radiar en la segunda estufa con PEMF.

El día 14 de cultivo se retiraron 8 placas (GiemsaC14, NBTC14, Monoclonal1C14, Monoclonal2C14, GiemsaR14, NBTR14, Monoclonal1R14, Monoclonal2R14) de la estufa de cultivo. De las

placas GiemsaC14 y GiemsaR14 se recogió el sobrenadante en balines conservándolos a -20° C para su posterior estudio. A las 8 placas restantes (GiemsaC21, NBTC21, Monoclonal1C21, Monoclonal2C21, GiemsaR21, NBTR21, Monoclonal1R21 y Monoclonal2R21) se les cambió el medio de cultivo por medio fresco.

El día 21 se recogió el sobrenadante de las placas GiemsaC21 y GiemsaR21 en 2 balines para conservarlos a -20° C para su posterior estudio inmunocitoquímico. Se retiraron las 8 últimas placas para la realización de las determinaciones correspondientes al 21 día de cultivo.

El cronograma del experimento se muestra en la Tabla 12.

CRONOGRAMA

Día de cultivo	Acción
1	Siembra de las 20 placas por caso
7	Se sacan 4 placas de la estufa (GiemsaC7, NBTC7, Monoclonal1C7, Monoclonal 2C7) Recogida de 2 balines de sobrenadante para determinación de citoquinas (C7) Cambio de medio a las 16 placas restantes 1 ^{er} día de irradiación del grupo R
8	2 ^o día de irradiación del grupo R
9	3 ^{er} día de irradiación del grupo R
14	Se sacan 8 placas de la estufa (GiemsaC14, NBTC14, Monoclonal1C14, Monoclonal2C14, GiemsaR14, NBTR14, Monoclonal1R14, Monoclonal2R14) Recogida de 2 balines de sobrenadante para determinación de citoquinas (C14,R14) Cambio de medio a las 8 placas restantes
21	Se sacan 8 placas de la estufa (GiemsaC21, NBTC21, Monoclonal1C21, Monoclonal2C21, GiemsaR21, NBTR21, Monoclonal1R21, Monoclonal2R21) Recogida de 2 balines de sobrenadante para determinación de citoquinas (C21,R21)

Tabla 12. Cronograma del Experimento

2.- PROTOCOLO DE IRRADIACIÓN

2.1.- Características del generador PEMF

Para la irradiación con campos electromagnéticos pulsados se utilizó el generador modelo PMT ASA s.r.l. tipo S, con código F90241 (Arcugnano (VI), Italia).

Este modelo necesita una tensión de alimentación de 230V con una frecuencia de red eléctrica de 50/60 Hz para generar campos magnéticos pulsados con una intensidad máxima de 0,015 T (150 Gauss) y una frecuencia de repetición del impulso de hasta 100 Hz. Los campos magnéticos se aplicaron con un solenoide portátil de 30 cm. de diámetro usado en clínica para el tratamiento de la patología osteoarticular. En el display del generador (Imagen 3) se modificaron los parámetros frecuencia del impulso (medido en Herzios y con un rango de 0,5-100), la intensidad del campo magnético (cuantificada en % de la intensidad máxima) y el tiempo de aplicación del campo magnético.



Imagen 3. Generador PEMF Modelo PMT ASA s.r.l

2.2.- Condiciones y secuencia de irradiación

Se utilizaron como parámetros variables de la irradiación la intensidad del campo magnético, la frecuencia de pulso y el tiempo de irradiación.

- *Intensidad del campo magnético:* Se medía en porcentaje de máxima intensidad del generador (0,015 T). La intensidad de los campos magnéticos utilizada en el protocolo de irradiación fue de 2,25 mT (15% de la intensidad máxima).
- *Frecuencia de pulso:* 50 Hz (impulsos/segundo)
- *Tiempo:* la duración de cada sesión de irradiación fue de 15 minutos.

Al inicio del experimento se midió con el Gaussímetro PCE-G28® (PCE Group, Albacete, España) de sonda triaxial, la intensidad de los campos magnéticos generados dentro del solenoide.

La irradiación con PEMF se realizó los días 7, 8 y 9 del cultivo, con el solenoide dentro de la segunda estufa. En cada sesión de irradiación se sacaban las placas GiemsaR14, GiemsaR21, NBTR14, NBTR21, Monoclonal1R14, Monoclonal2R14, Monoclonal1R21 y Monoclonal2R21 de la primera estufa, y se radiaban durante 15 minutos en la segunda estufa. Las placas se colocaban en la parte medial del solenoide, para que los campos magnéticos incidieran perpendicularmente a las placas. Al término de cada sesión, las placas radiadas volvían a la primera estufa.

3.- MÉTODOS DE EVALUACIÓN

3.1.- Cuantificación y Morfología

El conteo de las células cultivadas y su clasificación morfológica se realizó sobre las muestras control (C7, C14 y C21) y sobre las muestras radiadas (R14 y R21), con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000-S® con un sistema fotográfico Nikon DIGITAS SIGHT DS-Fi1® y el programa de visualización Nikon NIS-Elements software® (Imagen 4).

- *Cuantificación:* se utilizó un objetivo de 10 aumentos y el recuento celular se hizo sobre 20 campos de cada placa procesados por un programa informático (Contador Biomédico Software®) que determinaba la media de las células de todos los campos y expresaba el resultado final en células/milímetro cuadrado.

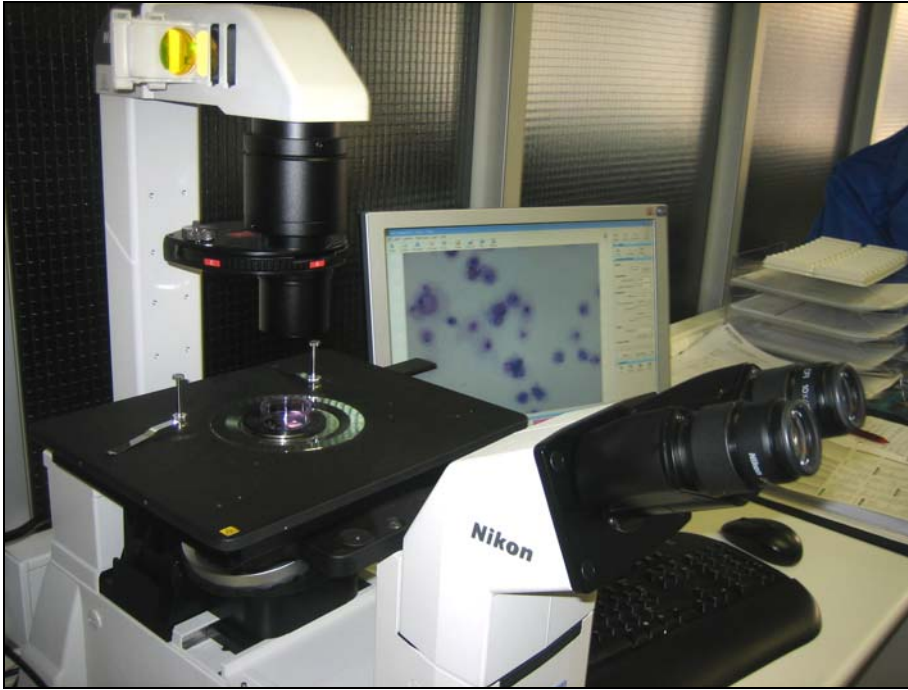


Imagen 4. Microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000-S®

- *Morfología*: se contabilizaron 200 células en cada placa de cultivo distribuyéndolas según su morfología en células redondas (cuando no tenían prolongaciones citoplasmáticas relevantes), células alargadas (con morfología fibroblasto-like) y células multinucleadas. El resultado se expresó con el porcentaje de cada grupo.

3.2.- Inmunocitoquímica

La identificación de los marcadores de superficie de las células cultivadas en medio líquido, se realizó con anticuerpos monoclonales heterólogos específicos para cada receptor celular (Tabla 13). Se determinó la positividad celular frente a los siguientes anticuerpos monoclonales:

- **Vimentina:** se utilizó la clona V9 del monoclonal antibody mouse anti-swine vimentin ® (code N1521 y NP018, laboratorio DakoCytomation), cuyo inmunógeno procede de la vimentina purificada de cristalino de cerdo y el isotipo de la inmunoglobulina es la IgG₁ Kappa. La clona V9 reacciona con el filamento intermedio de la vimentina (masa molecular de 57 KD), que forma parte de las células mesenquimales (fibroblastos, condrocitos, células endoteliales y células de la musculatura lisa vascular).
- **Citokeratina:** las citokeratinas humanas son proteínas insolubles en agua con pesos moleculares entre 40.000 y

68.000 Daltons, que se localizan en el citoesqueleto de las células epiteliales. La positividad celular a citokeratina se determinó mediante el uso de la clona AE1 y AE3 del monoclonal antibody to cytokeratin cocktail ® (basic and acidic, ab No. 071M, laboratorio BioGenex), con la keratina epitelial humana como inmunógeno y la IgG₁ de ratón como inmunoglobulina.

- **CD34:** el antígeno CD34 se expresa en las células progenitoras hematopoyéticas humanas, incluyendo los progenitores mieloides y linfoides, así como en las células de pacientes con leucemia mieloide aguda de mal pronóstico. En el experimento se empleó la clona CLB-MD34.2 del anticuerpo monoclonal PeliCluster CD34 ® (art. No M1636, laboratorio Sanquin).
- **CD41:** el anticuerpo monoclonal PeliCluster CD41 ® (clona CLB-tromb/7, 6C9, art. No M1538, laboratorio CLB) reconoce el complejo intacto gp IIb/IIIa de las plaquetas y fue

utilizado para la identificación de megacarioblastos, megacariocitos y plaquetas.

- **CD61:** el complejo CD61 / CD41 ejerce un papel fundamental en la regulación de la adhesión y la agregación plaquetaria durante la hemostasia. El antígeno CD61 es un marcador selectivo de precursores plaquetarios. En nuestro estudio, se usó el anticuerpo monoclonal Mouse Anti-Human CD61 ® (code no. M0753, laboratorio DakoCytomation).
- **CD68:** el CD68 es una glicoproteína transmembrana (110 KD) que se expresa en los monocitos humanos y en los macrófagos tisulares. Se utilizó el anticuerpo monoclonal Mouse Anti-Human CD68 ® (clona PG-M1, code no. N1576, NP037, laboratorio DakoCytomation), con inmunógeno derivado de células de Gaucher de bazo.

La visualización de la positividad se hizo con la técnica FAAFA (fosfatasa alcalina anti fosfatasa alcalina) conjugada con Streptovidina sobre muestras (células del porta del fondo de las placas de medio

líquido) congeladas previamente a -20° C y envueltas en papel de aluminio.

Para su preparación se descongelaban retirando la envoltura pasados 30 minutos y al mismo tiempo se descongelaban los anticuerpos monoclonales y se ponía el sustrato del Fast-Red a temperatura ambiente. También se preparaba una solución de trabajo TBS (Concepta cod. Co523 V2LT) ph 7,6 al 1/10 de concentración en volumen.

La fijación de las muestras se hacía con acetona (Merck) durante 10 minutos, y se dejaban secar 15 minutos, aplicando a continuación el anticuerpo monoclonal, que se incubaba 60 minutos en una cámara húmeda. Después se lavaba con TBS 1/10 y se quitaba el exceso de líquido y se añadían 3 gotas del reactivo LINK (Anticuerpo puente rabbit anti-mouse, Biogenex HK-340-9K) cubriendo las extensiones e incubando durante 20 minutos en la cámara húmeda. Se realizaba otro lavado con TBS 1/10, retirando el exceso de líquido, aplicando el reactivo LABEL (complejo enzimático fosfatasa alcalina-streptavidina, Biogenex HK-330-59K), cubriendo las extensiones e incubando 20 minutos en la cámara húmeda. Se volvía a lavar otras dos veces con TBS 1/10 y se cubrían las extensiones con CHROMOGEN (colorante Fast-Red, Biogenex HK 182-5K), incubando 40 minutos en la cámara húmeda.

Después se volvía a lavar por inmersión, tiñendo finalmente las preparaciones con Hematoxilina durante 10 minutos, para contrastar. Tras el último lavado se montaban las extensiones (Aquatex 108562, Merck) y se dejaban secar.

AC MONOCLONALES	CÉLULAS DIANA
Vimentina	Células Mesenquimales
Citokeratina	Citoesqueleto de las células epiteliales
CD34	Células progenitoras hematopoyéticas
CD41	Megacarioblastos, megacariocitos y plaquetas
CD61	Precursores plaquetarios
CD68	Monocitos y macrófagos tisulares

Tabla 13. Anticuerpos Monoclonales y células diana

3.3.- Test de Reducción del NBT

Aunque comenzó a usarse en 1967 por Baehner y Nathan como diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica de la infancia, pronto su uso se extendió a todos los estados en que presumiblemente debiera existir alguna alteración en el funcionalismo leucocitario; de esta forma el NBT test pasó a ser una prueba funcional del leucocito circulante, especialmente en la patología inflamatoria e infecciosa.

La base morfológica, citoquímicamente apreciable, del NBT test se sitúa en el cambio de coloración que sufre el nitroazul de tetrazolio, de amarillo en su forma soluble a azul oscuro al reducirse a formazán insoluble, claramente apreciable por microscopía óptica. La membrana intacta del leucocito no es permeable al NBT, siendo necesaria la producción de cambios en ésta para que pueda ser atravesada. Para lograr la permeabilización se requiere la presencia de factores tales como bacterias o productos derivados de ellas, complejos antígeno-anticuerpo o una interacción del complemento; todo ello condiciona la relación entre la reducción del NBT y la capacidad bactericida de los granulocitos. La penetración del NBT al interior de la célula se realiza por fenómenos de pinocitosis como corresponde a un cuerpo soluble. La reducción se

produce en el interior de la vacuola fagocítica por medio de la NADPH-oxidasa (Figura 3).

El conocimiento del mecanismo a través del cual se produce la reducción del NBT, implica la necesidad de admitir la integración de las condiciones que la hagan factible, es decir, la presencia de factores permeabilizadores de la membrana y también la normalidad de la función fagocítica que permita dicha reducción.

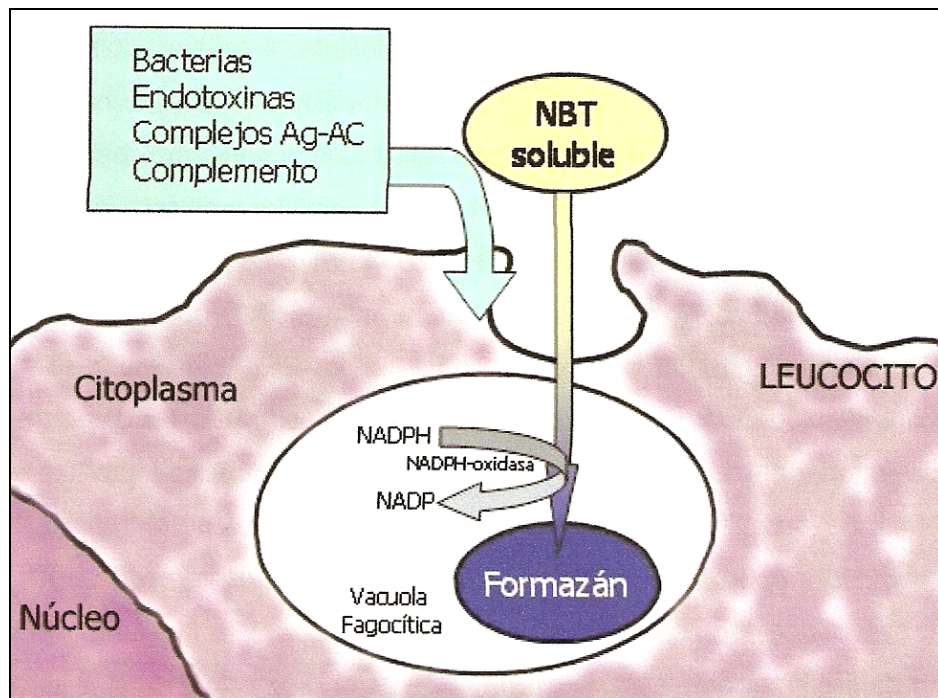


Figura 3. Esquema de la reducción celular del Nitroazul de Tetrazolio

La técnica del NBT puede realizarse a partir de muestras sin anticoagulantes o con sangre coagulada [136]. En este estudio, las muestras eran las células cultivadas sobre portas estériles colocados en el fondo de las placas de Petri, y toda la metodología del NBT-Test se realizaba directamente sobre las células cultivadas, en fresco, con un desarrollo paralelo al que se utiliza con los leucocitos obtenidos de sangre periférica.

La incubación de las células cultivadas se realizó añadiendo solución NBT al 0,1% de concentración en tampón fosfato durante 15 minutos en una estufa a 37°C, con una presión parcial de CO₂ del 5% y humedad a saturación y se continuó la incubación otros 15 minutos a temperatura ambiente.

Después de los 30 minutos, se utiliza como tinción de contraste y sin ninguna fijación previa la solución de Giemsa diluida (dos gotas de solución comercial de Giemsa Merck® por ml de agua destilada) durante 10 minutos.

Para valorar la reducción del NBT se cuentan 100 células, cuya morfología sea inequívoca y huyendo de los acúmulos celulares, contabilizando como positivas las que muestren acúmulo citoplasmático de formazán; su número total define el índice de reducción del NBT.

3.4.- Cuantificación de citoquinas

Las citoquinas (citokinas o citocinas) son proteínas de bajo peso molecular que median e interactúan entre células de diferente naturaleza, denominándose inicialmente según las células que las producían: *linfocinas*, *monocinas* o *interleucinas* cuando eran producidas por linfocitos, monocito-macrófagos o por los leucocitos polimorfonucleares. Posteriormente, se determinó que estas proteínas con capacidad de mediación celular eran sintetizadas por células del sistema inmune (macrófagos, linfocitos T, células NK) y células no pertenecientes al sistema inmune (fibroblastos, células endoteliales), por lo que se les agrupó bajo el término de citoquinas. Este término incluye a interleuquinas, quimioquinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral.

La determinación de las citoquinas se realizó con el Kit Milliplex™ MAP (Millipore, NYSE: MIL) usando la tecnología Luminex x-MAP®. La tecnología Luminex para la detección y cuantificación de RNA o proteínas diana, se basa en el sistema x-MAP (Multi-Analyte Profiling beads) , que incluye la combinación de:

- 1.- Microesferas teñidas con fluorocromos
- 2.- Citometría de flujo
- 3.- Doble sistema láser para excitar la fluorescencia
- 4.- Sistema digital de lectura y procesamiento de la señal

1.- El sistema x-MAP utiliza microesferas de poliestireno de 5.6 μ de diámetro, teñidas internamente con 100 combinaciones distintas de fluorocromos, con un espectro que va del rojo al infrarrojo (“bead”). Cada bead tiene un espectro infrarrojo único que permite su identificación (Figura 4).

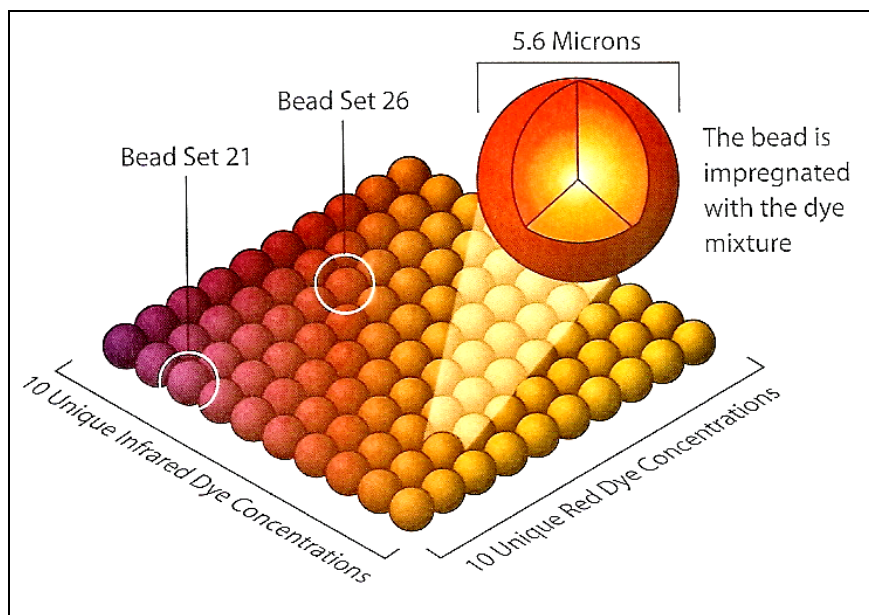


Figura 4. Microesfera de poliestileno con tinción interna

Tomado de Panomics, Inc.

La preparación de los beads para la determinación de citoquinas requiere la unión de un anticuerpo específico para cada citoquina al bead, lo que consigue que cada bead quede identificado por dos marcadores: el espectro infrarrojo y el anticuerpo específico contra la citoquina. Los siguientes pasos de la técnica incluyen (Figura 5):

- a) Incubación de los beads con la muestra (sobrenadante de suero en nuestro experimento), para atrapar la citoquina investigada.
- b) Adición de un anticuerpo de detección sobre el que luego se fijará la Streptavidina(SA)-Phycoerythrin(PE).
- c) Incubación con SAPE como marcador de fluorescencia

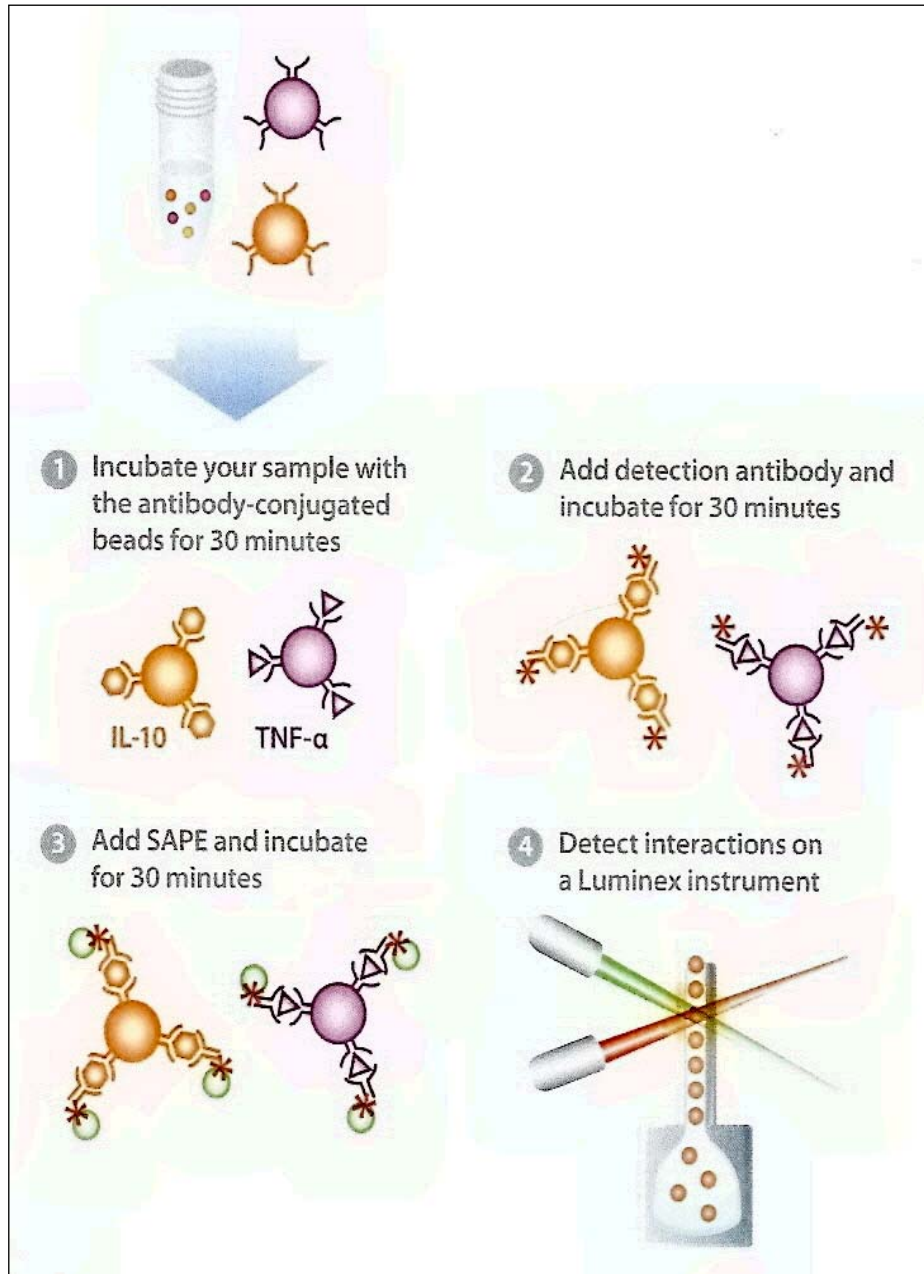


Figura 5. Marcación de los beads

Tomado de Panomics, Inc.

2.- La citometría de flujo detecta los bead de manera individual, como si se tratasen de células, identificando cada bead por su color y por la intensidad de su fluorescencia PE.

3.- Para el proceso de lectura se utilizaron dos láser; un láser verde para el ensayo, de 532 nm, que estimula la tinción de Phycoerythrina (Streptavidina-Phycoerythrin) y un láser rojo clasificador, de 635 nm, que identifica las bead (Figura 6).

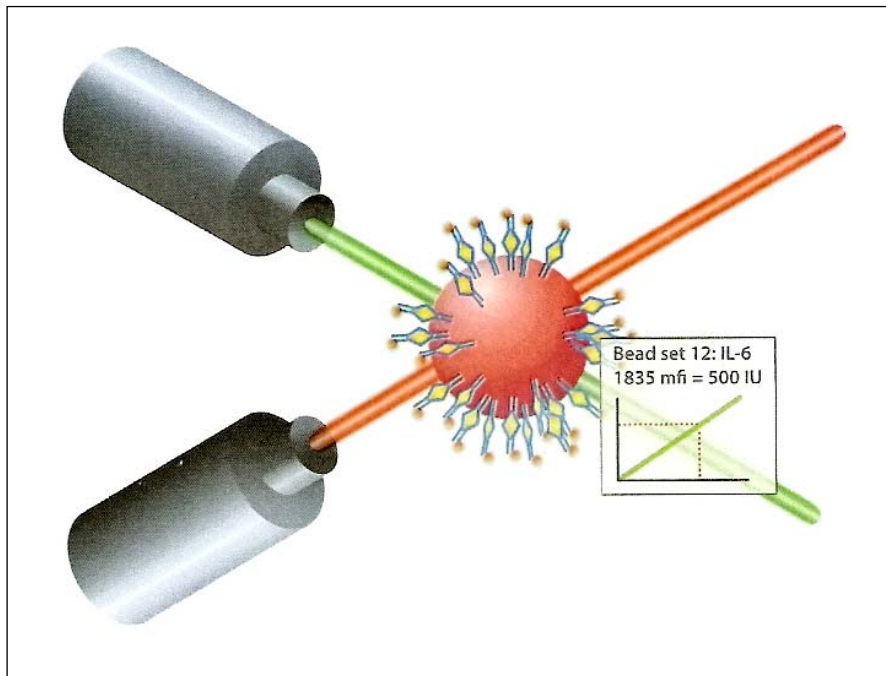


Figura 6. Detección de los bead

Tomado de Panomics, Inc.

4.- El sistema digital Luminex de lectura incluye cuatro detectores, que miden la fluorescencia de las muestras, identifican y discriminan los bead únicos de los bead agregados.

El Kit MilliplexTM MAP diseñado para este estudio, incluía las siguientes citoquinas (Tabla 14):

- **IL-1 β** : la IL-1 era conocida como el factor activador de los linfocitos (LAF), que provocaba el aumento de la proliferación celular y de la síntesis de IL-2, relacionándose con la estimulación de monocitos y macrófagos, y posteriormente con otros tipos celulares. En 1985, se confirmó que la IL-1 está compuesta por tres tipos diferentes de proteínas: la IL-1 α , la IL-1 β (ambas con función proinflamatoria) y la IL-1RA (receptor antagonista que bloquea la activación inmunitaria).

- **IL-2**: activa la proliferación de linfocitos T y de los linfocitos B. La IL-2 es producida por las células Th1 y es responsable de la respuesta celular (activación de linfocitos T_c e hipersensibilidad

de tipo retardada), destinada a responder a la agresión de parásitos intracelulares (virus, protozoos y algunas bacterias).

- **IL-4:** sintetizada por las células T activadas, basófilos y por los mastocitos. El receptor de esta interleukina también se activa con la IL-13, compartiendo la función de diferenciación de las células T CD4+ en células tipo Th2. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que activan la respuesta humoral e inactivan la respuesta celular.

- **IL-5:** se conoce también como factor de diferenciación de los eosinófilos (EDF). Esta citoquina activa a los linfocitos T y en su estructura presenta dominios semejantes a los encontrados en el GM-CSF, M-CSF, IL-2, IL-4 y en la hormona de crecimiento.

- **IL-6:** es producida por los fibroblastos, células T activadas, monocitos-macrófagos activados y por las células endoteliales. Está directamente implicada en la respuesta que ocurre después de una infección o daño celular, teniendo un papel tan importante en la respuesta inflamatoria aguda, como la IL-1 y el TNF- α .

- **IL-7:** es un factor estimulante de crecimiento de las células linfoides, sobretodo, de las células pre-B, pro-B y células T inmaduras. La IL-7 activa la proliferación de las células CD4+, CD8+ y estimula la actividad tumoricida de los monocitos/macrófagos.

- **IL-8:** pertenece a la familia de citoquinas con bajo peso molecular y con función quimiotáctica (quimioquinas). Su principal papel es iniciar y promover las reacciones inflamatorias, activando los neutrófilos, los basófilos y las células T.

- **IL-10:** es producida por las células T CD4+, los timocitos, las células B, los macrófagos, los mastocitos y por los keratinocitos. La IL-10 estimula el crecimiento de las stem cells, mastocitos y timocitos y promueve el desarrollo de las células T citotóxicas y activa la secreción de inmunoglobulinas.

- **IL-12:** es un factor de crecimiento de las células T activadas y las células NK. También induce la producción de IFN γ y de TNF- α por las células T y células NK.

- **IL-13:** tiene múltiples efectos sobre la diferenciación y función de los monocitos y de los macrófagos, estimula la producción de anticuerpos, induce cambios en la morfología de los monocitos y suprime su función citotóxica.

- **IFN α :** Los interferones (IFN) poseen propiedades inmunomoduladoras y antiproliferativas, pero fueron sus propiedades antivirales las que primero llamaron la atención y las que hoy en día sirven como base para los bioensayos. Los IFN no actúan aisladamente, sino que interaccionan con las demás citoquinas. Los IFN se clasifican en cinco grupos que incluyen el IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- τ e INF- ω .

- **GM-CSF:** estimula el crecimiento y diferenciación de los precursores celulares granulocito-macrofágicos, aunque también actúa en la serie roja y plaquetar.

- **TNF- α :** es un mediador de la inflamación local, con un importante papel en el sistema inmunitario. La liberación de TNF- α produce la activación local del endotelio vascular,

provocando la producción de óxido nítrico con la posterior vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que aumenta el reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, activa los linfocitos T y B y también aumenta la adhesión plaquetaria.

ORIGEN Y EFECTOS DE LAS CITOQUINAS SELECCIONADAS

CIT	ORIGEN	PRINCIPALES EFECTOS
IL-1 β	Monocitos-macrófagos	Fiebre (pirógeno endógeno), sueño, anorexia, inflamación, expresión de CD 54 en las células endoteliales y liberación del factor tisular, activación linfocitaria, producción de IL-6 Y CSF
IL-2	Células T	Induce la proliferación de la célula T, coestimula la proliferación y diferenciación de la célula B
IL-4	Células T y Mastocitos	Induce la proliferación del mastocito, proliferación de la célula hematopoyética pluripotencial
IL-5	Células T y Mastocitos	Induce la proliferación de la célula T y la generación de LTC, coestimula la proliferación de la célula B, sinergiza con la IL- 3 en la proliferación del mastocito, estimula la producción de Ig E e Ig G 4, induce la expresión y liberación de CD 23, la clase II del CMH en la células B, cambia de TH a TH2
IL-6	Monocitos y Fibroblastos	Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de Ig A
IL-7	Células de la médula ósea y del estroma tímico	Pirogénica, induce la proliferación de plasmocitomas e hibridomas, aumenta la producción de Ig, la clase I en los fibroblastos, acción con la IL-2 en la producción de Proteínas de Fase Aguda por lo hepatocitos, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de la célula hematopoyética, induce la diferenciación del LTc. Induce la proliferación de las células pro y pre B de los linfocitos inmaduros
IL-8	Monocitos, células endoteliales, macrófagos, Fibroblastos	Induce la quimiotaxis y activación de neutrófilos y células T

IL-10	Células T	Induce la proliferación de algunas células T, potencia la proliferación del mastocito inducida por la IL-3
IL-12	Células del microambiente hematopoyético	Estimula la producción de Ac, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de megacariocitos, estimula los progenitores del macrófago
IL-13	Monocitos, macrófagos, algunas células B y mastocitos	Activa a las NK para secretar IFN-gamma, cambia TH a TH1, inhibe la producción de Ig E inducida por la IL-4
IFN γ	Linfocitos	Coestimula la producción de la célula T, induce la secreción de la IL-6, IL-8 y G-CSF a partir de las células endoteliales, epiteliales y fibroblástica
GM-CSF	Células T, endoteliales, Macrófagos y fibroblastos	Estimulación de la proliferación y diferenciación de precursores mieloides, potencia las funciones de neutrófilos y monocitos maduros (lisis y fagocitosis)
TNF- α	Fibroblastos, células NK, neutrófilos, astrocitos, células endoteliales y células del músculo liso	Proinflamatorio, antitumoral. Agente neovascularizante y estimulante de la resorción ósea

Tabla 14. Panel de las citoquinas seleccionadas

3.5.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó para las variables crecimiento (células/mm²), morfología (porcentaje células redondas, alargadas y multinucleadas), capacidad fagocítica (positividad al NBT Test) y cuantificación de citoquinas (pg/ml). La inmunocitoquímica (anticuerpos monoclonales heterólogos específicos) se hizo para la identificación de los marcadores de superficie de las células cultivadas, pero los datos obtenidos no fueron evaluados desde un punto de vista estadístico.

La normalidad de las distribuciones fue analizada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el ANOVA con prueba *post-hoc* de Scheffé para encontrar las diferencias significativas entre las medias de las variables estudiadas.

Se utilizó el programa SPSS 12.5 (versión 12.5, SPSS Inc., Chicago. IL, USA) y el programa GraphPad Prism 5.0 (versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego. CA, USA). El nivel de significación se consideró para un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1.- ESTRUCTURA DE LOS RESULTADOS

Las muestras de este estudio fueron distribuidas en 2 grupos: a) *grupo no radiado*, al que se le realizó el seguimiento durante todo el periodo de cultivo, haciendo las determinaciones los días 7, 14 y 21; y b) *grupo radiado con PEMF*, al que se le realizaron las determinaciones los días 14 y 21, utilizando como controles las muestras de los días 14 y 21 del grupo no radiado.

La descripción de los resultados de los parámetros evaluados respeta la secuencia descrita en el apartado de Material y Métodos, incluyendo la cuantificación del crecimiento (células/mm²), las variaciones morfológicas (células redondas, alargadas y multinucleadas), el NBT Test y la determinación de citoquinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ , GM-CSF y TNF- α).

2.- CULTIVO DE CMN DE SANGRE PERIFÉRICA

2.1. Cuantificación del crecimiento y de la morfología

La valoración del crecimiento (células/mm²) y la morfología (porcentaje de células redondas, alargadas y multinucleadas) se realizó los días 7, 14 y 21 del cultivo celular.

Se registró un crecimiento celular progresivo durante los 21 días del cultivo, con un incremento de las células alargadas el día 14 y de las células multinucleadas el día 21.

Los resultados correspondientes se recogen en la Tabla 15, que expresa el crecimiento (media \pm derivación estándar) y la morfología celular (media \pm DE) obtenidos los días 7, 14 y 21.

CRECIMIENTO/MORF. (células/mm² / %)	Día 7	Día 14	Día 21
Crecimiento	9,75 \pm 2,28	20,50 \pm 2,48	25,11 \pm 2,31
Células redondas	91,36 \pm 3,01	76,16 \pm 4,75	84,76 \pm 3,64
Células alargadas	8,64 \pm 3,01	19,40 \pm 4,42	4,96 \pm 1,59
Células multinucleadas	0 \pm 0	4,44 \pm 1,23	10,28 \pm 2,76

Tabla 15. Crecimiento (media \pm DE) y Morfología (media \pm DE) de las muestras no radiadas

Se hizo un ANOVA para la valoración estadística de los resultados mostrando diferencias muy significativas ($p<0,01$) del crecimiento y la morfología celular los días 7, 14 y 21. Posteriormente, se hizo un test de Scheffe, encontrando diferencias muy significativas ($p<0,01$) del crecimiento celular los días 7, 14 y 21, siendo especialmente significativo ($p<0,01$) entre los días 7 y 21. Se observaron unas diferencias muy significativas ($p<0,01$) en las células redondas, alargadas y multinucleadas, entre los días 7, 14 y 21; siendo especialmente significativas en las células multinucleares en los días 7 y 21.

2.2. Inmunocitoquímica

La evaluación de los datos inmunocitoquímicos se hizo asignando un valor arbitrario a cada marcador celular, de acuerdo con los datos publicados en la literatura. En la Tabla 16 están recogidos estos resultados.

MARCADORES	Día 7	Día 14	Día 21
Vimentina	++	++	++
Citoqueratina	-	-	-
CD 34	+	+	+
CD 68	++	++	++
CD 61	-	-	-
CD 41	-	-	-

Tabla 16. Inmunocitoquímica del cultivo

* Los símbolos representan no expresión (-) e incremento del nivel de expresión (+, ++)

2.3. Test del NBT

El NBT Test fue utilizado para la valoración de la capacidad fagocítica celular y su unidad de medición fue el porcentaje de células positivas a la reacción con el nitroazul de tetrazolio. Se registró una disminución muy significativa el día 14 del cultivo.

En la Tabla 17 se muestran los resultados (media \pm DE) del NBT Test global y del NBT Test según la morfología celular en los días 7, 14 y 21.

NBT Test (% positivos)	Día 7	Día 14	Día 21
NBT Test global	67,44 \pm 16,41	52,52 \pm 13,90	59,32 \pm 13,74
NBT Test c. redondas	53,88 \pm 16,46	50,48 \pm 12,22	72,04 \pm 11,63
NBT Test c. alargadas	46,12 \pm 16,46	47,48 \pm 12,13	25,08 \pm 12,02
NBT Test c. multinucleadas	0 \pm 0	2,04 \pm 1,34	2,88 \pm 1,94

Tabla 17. NBT Test (media \pm DE) de las muestras no radiadas

A partir de los datos obtenidos se realizó un ANOVA encontrándose diferencias muy significativas ($p < 0,01$) en los grupos

estudiados; y mediante un test de Scheffe se demostraron diferencias muy significativas ($p < 0,01$) del NBT Test global entre los días 7 y 14. También fueron muy significativos ($p < 0,01$) los resultados de las células redondas y de las células alargadas entre los días 7 y 21 y entre los días 14 y 21.

El NBT Test de las células multinucleadas mostró diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre los días 7 y 14, y entre los días 7 y 21.

2.4. Citoquinas

La determinación de citoquinas se realizó mediante la tecnología Luminex x-MAP®, utilizándose como unidad de medida los pg/ml, con una curva de calibración del sistema de 0,13 pg/ml a 2000 pg/ml. Se excluyeron a las citoquinas IL-5 (<0,13 pg/ml), IL-6 (>2000 pg/ml), IL-7 (<0,13 pg/ml), IL-8 (>2000 pg/ml), IL-12 (<0,13 pg/ml) e IL-13 (<0,13 pg/ml), para la valoración estadística de sus resultados.

Se observaron cuatro patrones de comportamiento:

- 1) Aumento progresivo durante todos los días del cultivo del GM-CSF.

- 2) Descenso progresivo durante todo el cultivo de la IL-1 β , IL-2 y de la IL-10.
- 3) Incremento el día 14 del cultivo del IFN- γ .
- 4) Valor máximo el día 14 y mínimo el día 21 del cultivo del TNF- α .

Los datos de la cuantificación de las citoquinas (media \pm DE) los días 7, 14 y 21, se muestran en la Tabla 18.

CITOQUINAS (pg/ml)	Día 7	Día 14	Día 21
IL-1 β	387,70 \pm 341,30	152,60 \pm 94,37	49,05 \pm 38,47
IL-2	8,10 \pm 5,99	6,15 \pm 7,80	5,31 \pm 5,16
IL-4	2,42 \pm 2,71	4,61 \pm 6,72	3,31 \pm 4,60
IL-10	187,10 \pm 154,60	164,40 \pm 135,60	135,30 \pm 140,40
IFN- γ	104,20 \pm 152,20	182,50 \pm 276,10	95,02 \pm 131,70
GM-CSF	61,38 \pm 40,92	107,80 \pm 92,94	126,40 \pm 172
TNF- α	340,30 \pm 282,10	373,50 \pm 320,40	199,60 \pm 92,13

Tabla 18. Cuantificación de citoquinas (media \pm DE) en muestras no radiadas

El ANOVA realizado demostró diferencias muy significativas ($p < 0,01$) para las citoquinas IL-2, IL-10, IFN- γ , GM-CSF y el TNF- α ; no encontrando diferencias significativas ($p > 0,05$) en el análisis de los resultados de la IL-4. El test de Scheffé encontró diferencias muy significativas ($p < 0,01$) para la IL-2 y la IL-1 β entre el día 7 y 14, y entre el día 7 y 21; para la IL-10 entre los días 7, 14 y 21; para el IFN- γ entre el día 7 y 14, y entre el día 7 y 21; para el GM-CSF entre el día 7 y 14, y entre el día 7 y 21; y para el TNF- α entre los días 7, 14 y 21.

3.- EFECTOS DE LA IRRADIACIÓN PEMF EN LOS CULTIVOS CELULARES LOS DÍAS 14 Y 21

3.1. Cuantificación del crecimiento y de la morfología

La cuantificación del crecimiento (células/mm²) y de la morfología (células redondas, células alargadas y células multinucleadas) de las muestras radiadas el día 7, 8 y 9, se hizo los días 14 y 21 del cultivo.

Se observó un crecimiento celular muy significativo en las muestras radiadas, comparadas con los controles. También se registró una disminución muy significativa de las células alargadas el día 14 en las muestras irradiadas.

Los datos obtenidos (media \pm DE) se recogen en las Tabla 19, 20 y en los Gráficos 1,2 que expresan el crecimiento (media \pm derivación estándar) y la morfología celular (media \pm DE) obtenidos los días 14 y 21.

CRECIMIENTO/MORFOLOGÍA (células/mm² / %)	Día 14 No radiadas	Día 14 Radiadas
Crecimiento	20,50 ± 2,48	52,32 ± 3,11
Células redondas	76,16 ± 4,75	92,68 ± 1,43
Células alargadas	19,40 ± 4,42	5 ± 1,32
Células multinucleadas	4,44 ± 1,23	2,32 ± 1,28

Tabla 19. Día 14: Crecimiento (media ± DE) y Morfología (media ± DE) de las muestras radiadas

CRECIMIENTO/MORFOLOGÍA (células/mm² / %)	Día 21 No radiadas	Día 21 Radiadas
Crecimiento	25,11 ± 2,31	94,72 ± 7,03
Células redondas	84,76 ± 3,64	91,12 ± 1,92
Células alargadas	4,96 ± 1,59	4,20 ± 1,38
Células multinucleadas	10,28 ± 2,76	4,68 ± 1,38

Tabla 20. Día 21: Crecimiento (media ± DE) y Morfología (media ± DE) de las muestras radiadas

Se encontraron diferencias muy significativas ($p < 0,01$) para las variables crecimiento y morfología tras la realización de un ANOVA. El test de Scheffe arrojó los siguientes resultados:

- Crecimiento: se hallaron diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre las muestras radiadas y no radiadas en los días 14 y 21.
- Morfología: a) existían diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre las células redondas de las muestras radiadas y las células redondas de las muestras no radiadas obtenidas los días 14 y 21; b) entre las células alargadas de las muestras radiadas y las células alargadas no radiadas obtenidas el día 14 existían diferencias muy significativas ($p < 0,01$) y c) se evidenciaron diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre las células multinucleadas de las muestras radiadas y las células multinucleadas de las muestras no radiadas obtenidas el día 14 y el día 21.

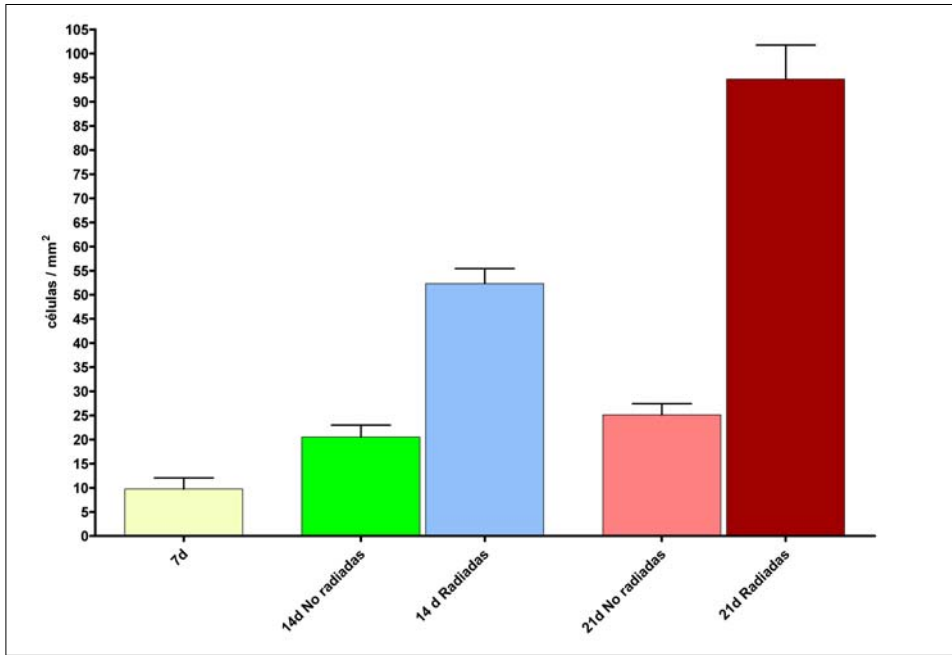


Gráfico 1. Crecimiento celular (media ± DE)

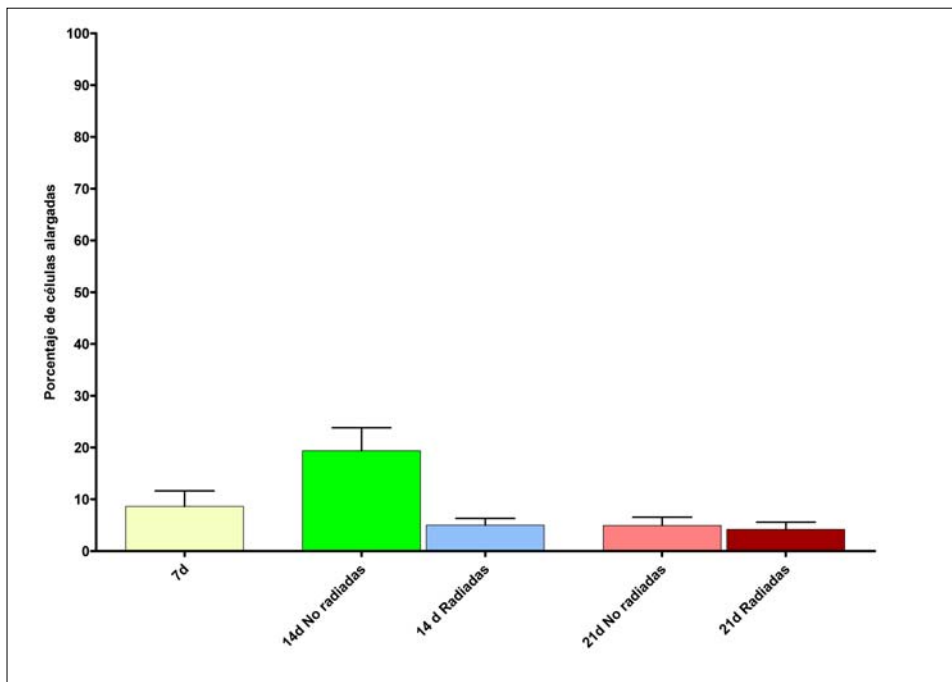


Gráfico 2. Células alargadas (media ± DE)

3.2. Test del NBT

El análisis de varianza (ANOVA) mostró que no existían diferencias significativas en el NBT Test global (sin diferenciar morfología celular) entre las muestras radiadas y las no radiadas; encontrando diferencias muy significativas ($p < 0,01$) en el NBT Test de células redondas, alargadas y multinucleadas.

No se observaron variaciones significativas del NBT Test en las muestras irradiadas.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 21, 22 y en el Gráfico 3, que expresan el porcentaje de células positivas al test del NBT (media \pm DE).

NBT Test (% positivos)	Día 14	Día 14
	No radiadas	Radiadas
NBT Test global	52,52 \pm 13,90	50,68 \pm 17,44
NBT Test c. redondas	50,48 \pm 12,22	75,48 \pm 13,02
NBT Test c. alargadas	47,48 \pm 12,13	24,52 \pm 13,02
NBT Test c. multinucleadas	2,04 \pm 1,34	0 \pm 0

Tabla 21. Día 14: NBT Test (media \pm DE) de las muestras radiadas

NBT Test (% positivos)	Día 21	
	No radiadas	Radiadas
NBT Test global	59,32 ± 13,74	51,96 ± 9,67
NBT Test c. redondas	72,04 ± 11,63	73,76 ± 11,13
NBT Test c. alargadas	25,08 ± 12,02	26,24 ± 12,74
NBT Test c. multinucleadas	12,88 ± 1,94	0 ± 0

Tabla 22. Día 21: NBT Test (media ± DE) de las muestras radiadas

En el test *post-hoc* de Scheffe se hallaron diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre las muestras de células redondas radiadas y las células redondas no radiadas cuantificadas el día 14, así como entre las muestras de células alargadas radiadas y no radiadas cuantificadas el día 14. También se encontraron diferencias muy significativas ($p < 0,01$) en el NBT Test de las células multinucleadas entre las muestras radiadas y las no radiadas leídas el día 14 y 21.

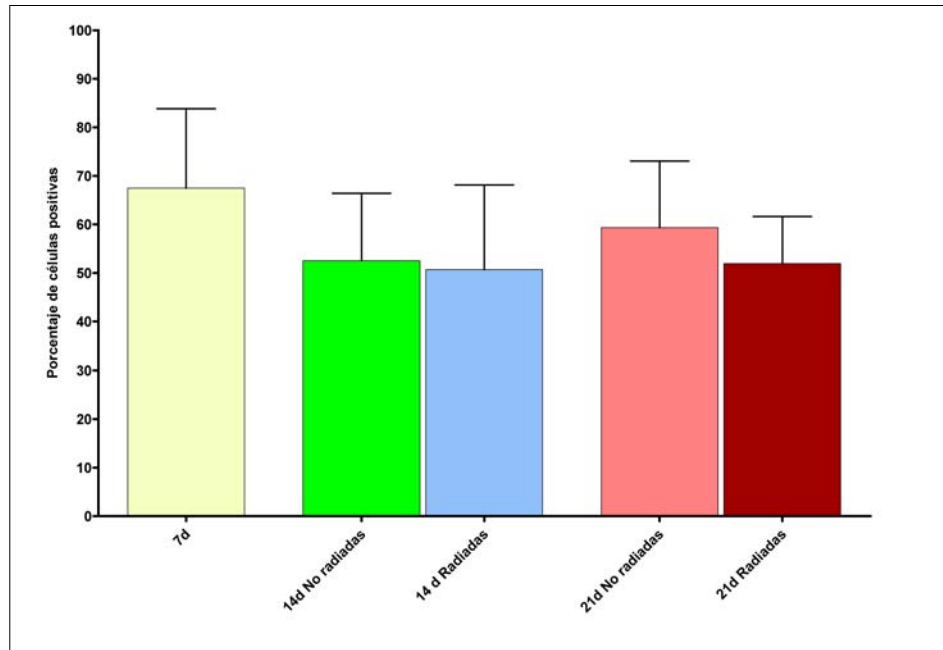


Gráfico 3. NBT Test (media ± DE)

3.3. Citoquinas

La cuantificación de las citoquinas en el sobrenadante del cultivo, para valorar la incidencia de la irradiación en el cultivo celular, se hizo comparando los niveles de citoquinas el día 14 entre las células no radiadas y las células radiadas, y comparándolos también el día 21 entre las células radiadas y las células no radiadas. Se registraron los siguientes patrones:

- 1) La irradiación no produjo ningún cambio significativo en la IL-2, IL-4, GM-CSF e IFN- γ .
- 2) La IL-1 β y el TNF- α disminuyeron con la irradiación el día 14 y el día 21.
- 3) La IL-10 aumentó en las muestras radiadas el día 21.

La valoración estadística mediante un ANOVA de los resultados, reflejó diferencias muy significativas ($p < 0,01$) en la IL-1 β , el TNF- α ; y diferencias significativas ($p < 0,05$) en la IL-10. No existían diferencias significativas entre las determinaciones de la IL-2, IL-4, GM-CSF y el IFN- γ . Los datos se recogen en la Tabla 23, 24 y en los Gráficos 4, 5, 6, 7, 8 y 9, que muestran la concentración (pg/ml) de citoquinas (media \pm DE) en el sobrenadante del medio de cultivo los días 14 y 21.

CITOQUINAS (pg/ml)	Día 14	
	No radiadas	Radiadas
IL-1 β	152,60 \pm 94,37	46,86 \pm 46,82
IL-2	6,15 \pm 7,80	7,03 \pm 11,16
IL-4	4,61 \pm 6,72	1,51 \pm 0,81
IL-10	164,40 \pm 135,60	103,70 \pm 155,70
IFN- γ	182,50 \pm 276,10	256,60 \pm 381,30
GM-CSF	107,80 \pm 92,94	66,23 \pm 104,10
TNF- α	373,50 \pm 320,40	246 \pm 174,20

Tabla 23. Día 14: Cuantificación de citoquinas (media \pm DE)

CITOQUINAS (pg/ml)	Día 21	
	No radiadas	Radiadas
IL-1 β	49,05 \pm 38,47	19,66 \pm 30,65
IL-2	5,31 \pm 5,16	1,91 \pm 2,12
IL-4	3,31 \pm 4,60	1,08 \pm 0,47
IL-10	135,30 \pm 140,40	195,60 \pm 166,50
IFN- γ	95,02 \pm 131,70	105,40 \pm 178,30
GM-CSF	126,40 \pm 172	135,20 \pm 163,60
TNF- α	199,60 \pm 92,13	159,80 \pm 91,26

Tabla 24. Día 21: Cuantificación de citoquinas (media \pm DE)

El test de Scheffe reflejó los siguientes resultados:

- a) IL-1 β : se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras radiadas y las muestras no radiadas, obtenidas los días 14 y 21.
- b) IL-10: se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras radiadas y las muestras no radiadas, obtenidas el día 21.
- c) TNF- α : se objetivaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras radiadas y las no radiadas, determinadas el día 14 y el día 21.

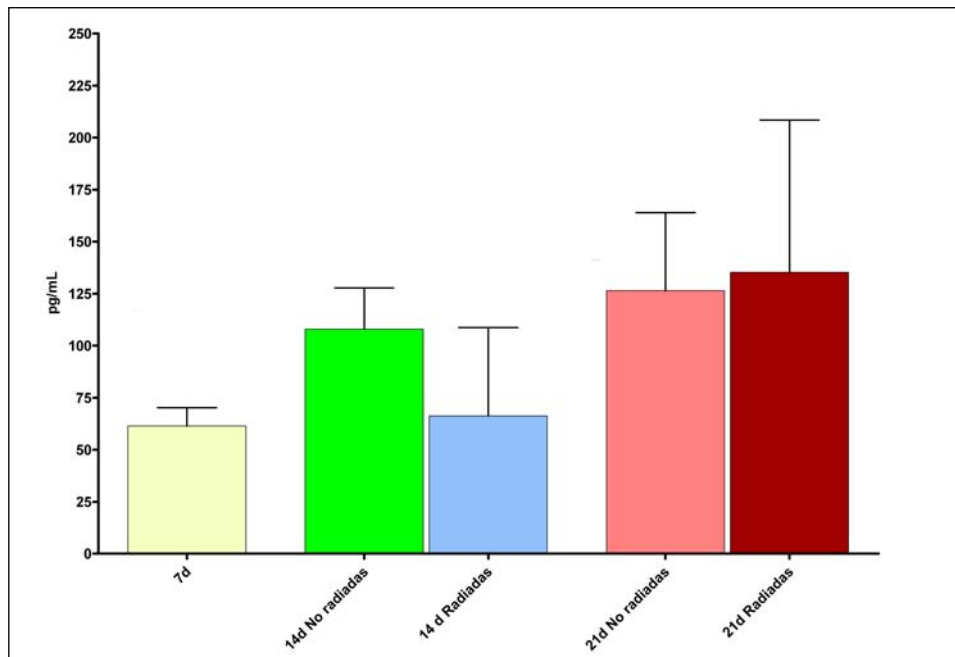


Gráfico 4. Niveles de GM-CSF (media \pm DE)

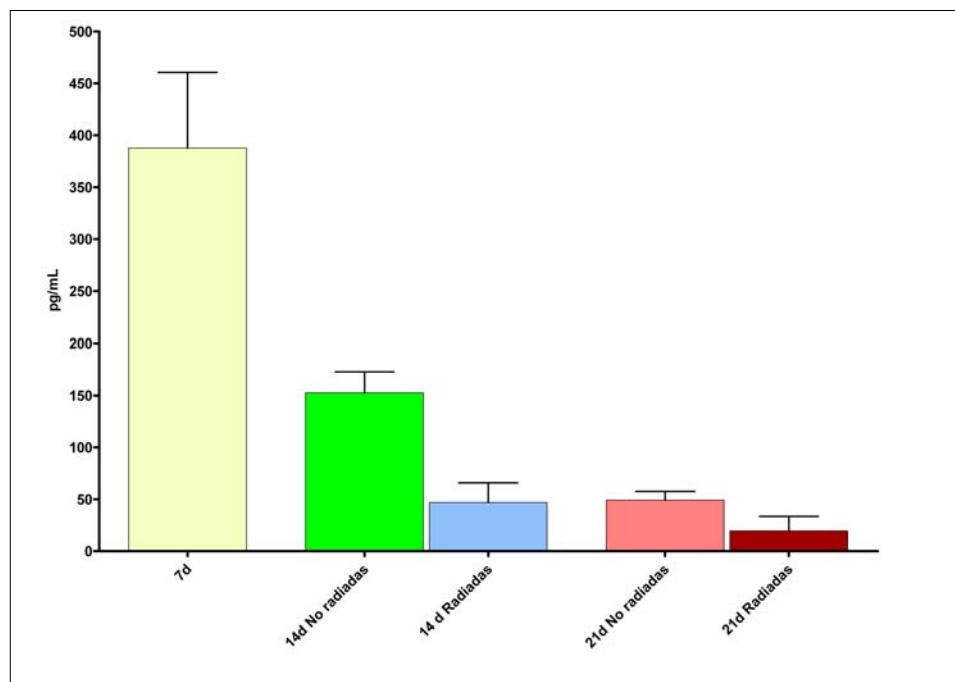


Gráfico 5. Niveles de IL-1 β (media \pm DE)

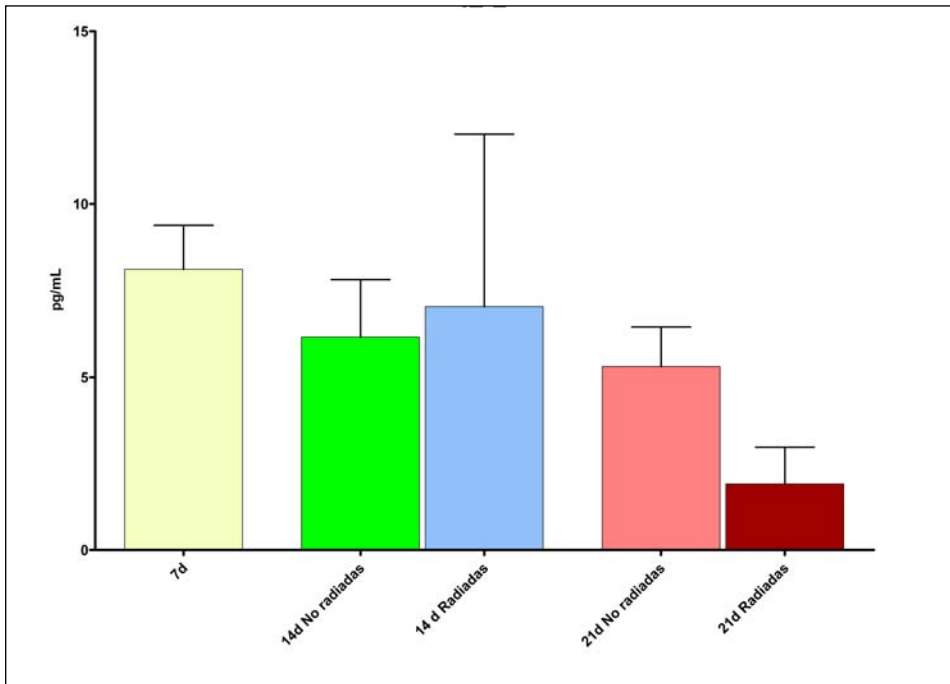


Gráfico 6. Niveles de IL-2 (media \pm DE)

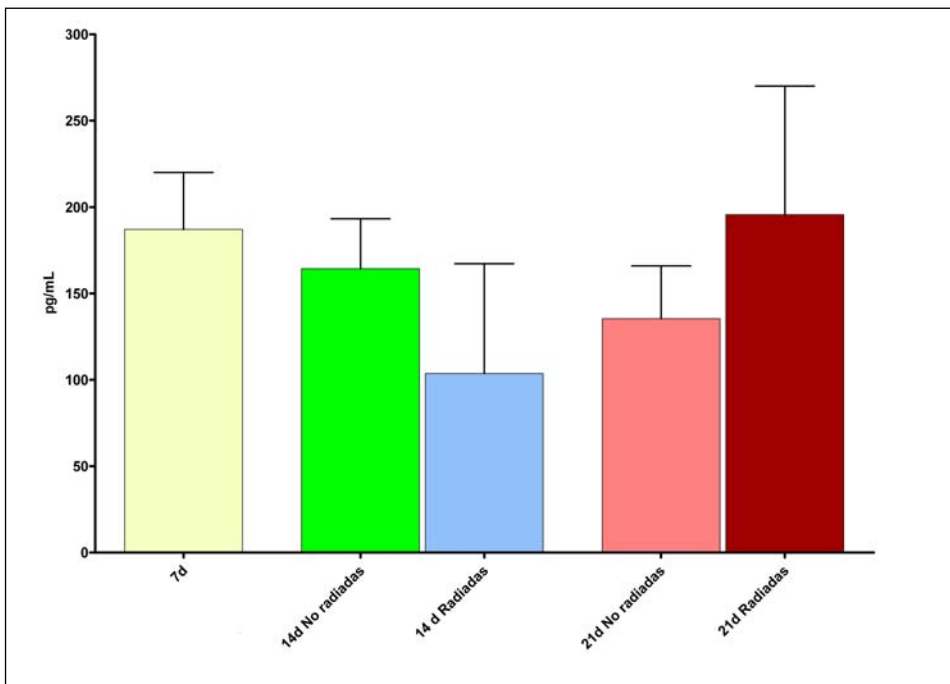


Gráfico 7. Niveles de IL-10 (media \pm DE)

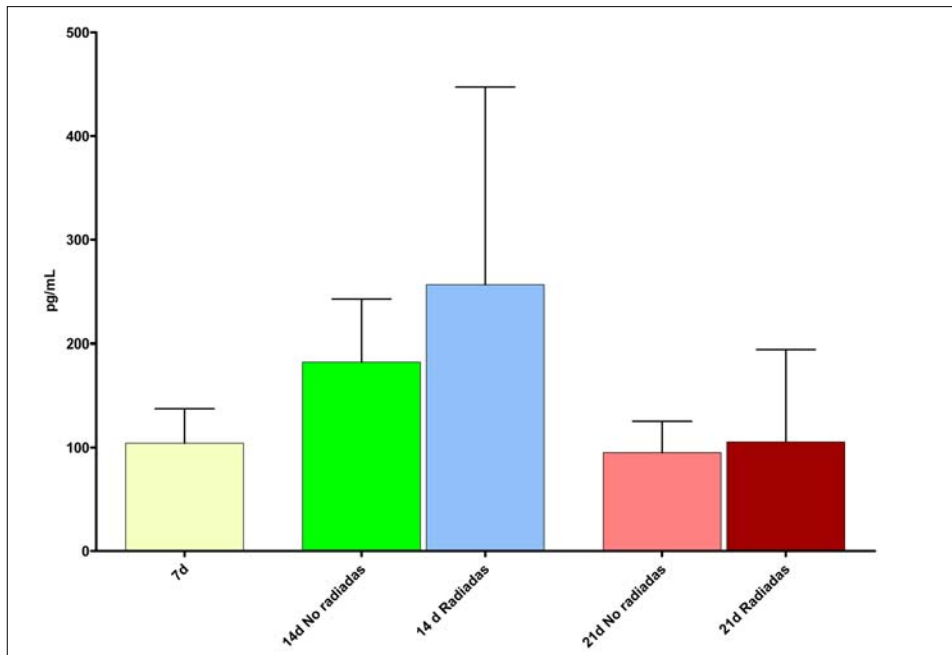


Gráfico 8. Niveles de IFN- γ (media \pm DE)

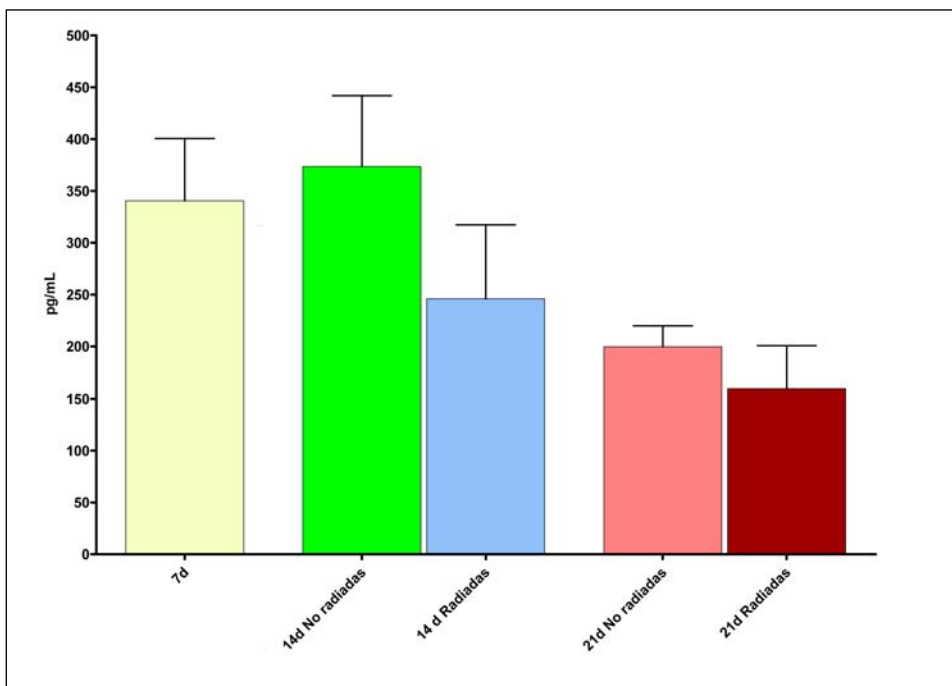


Gráfico 9. Niveles de TNF- α (media \pm DE)

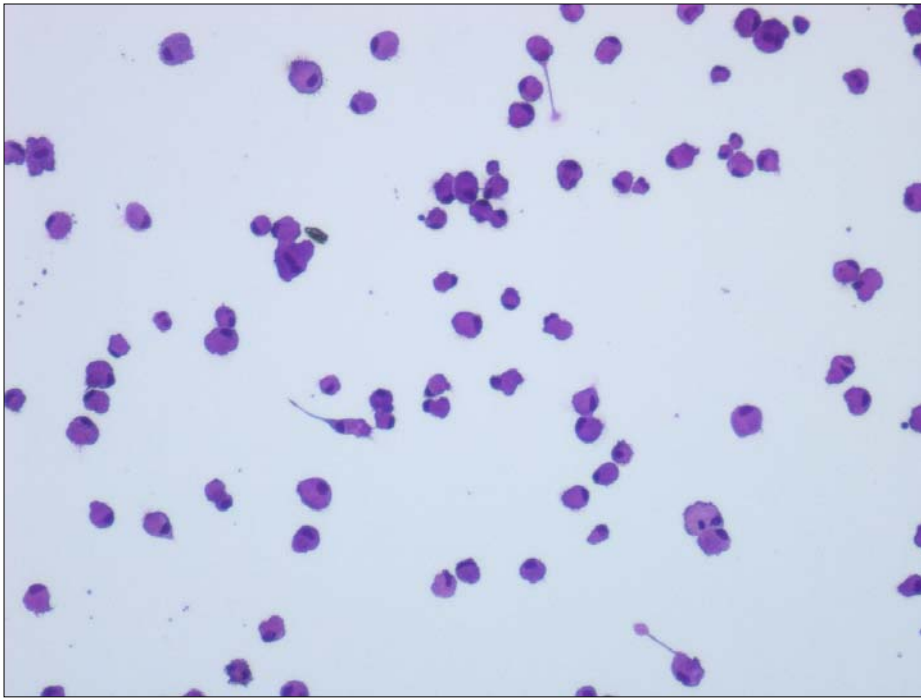


Imagen 5. Crecimiento día 7 del cultivo (X10 aumentos)

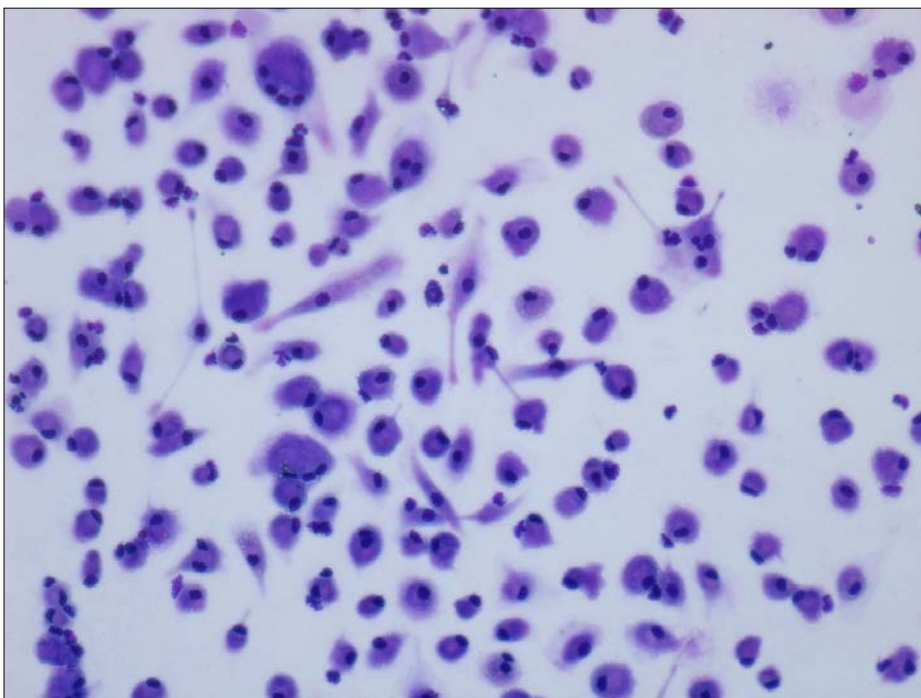


Imagen 6. Crecimiento día 14 en muestras no radiadas (X10 aumentos)

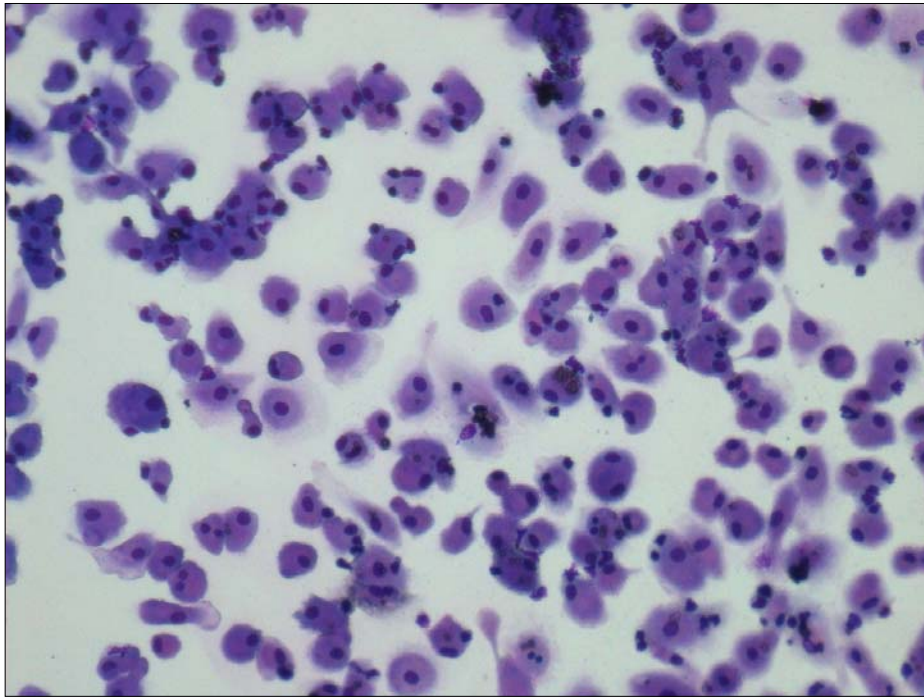


Imagen 7. Crecimiento día 14 en muestras radiadas (X10 aumentos)

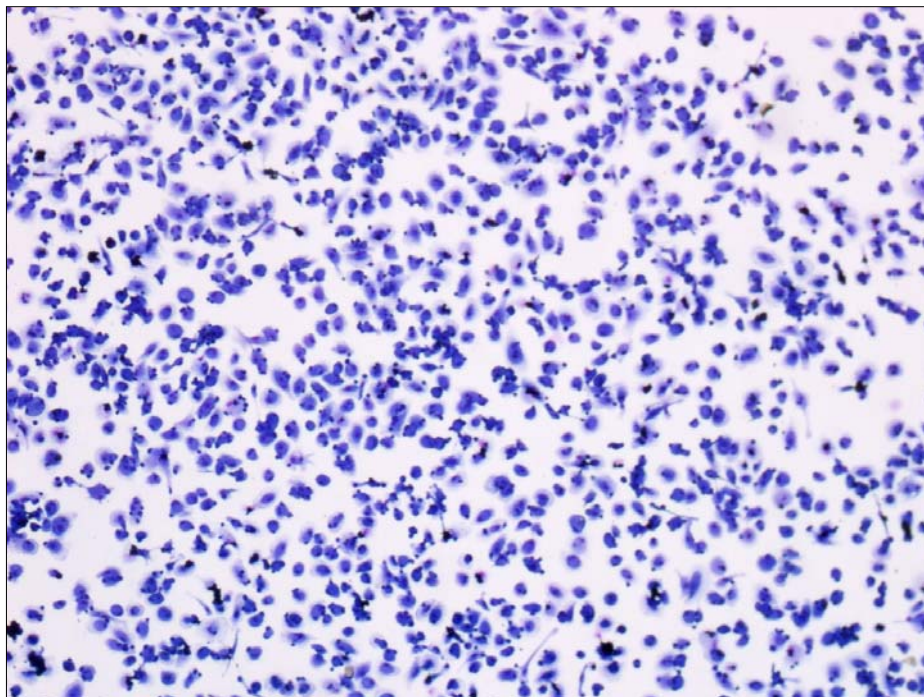


Imagen 8. Crecimiento día 21 en muestras no radiadas

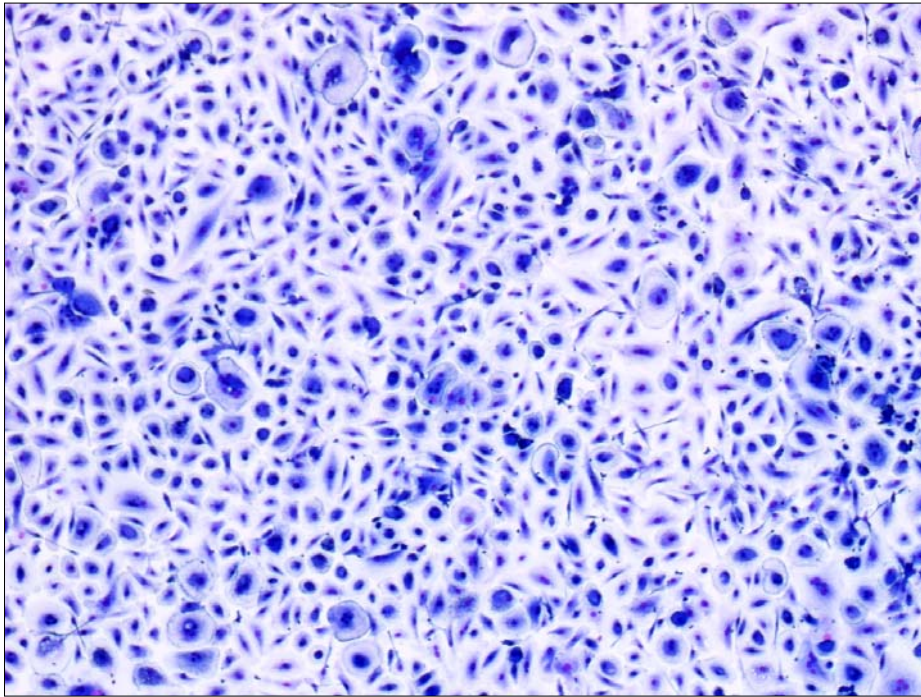


Imagen 9. Crecimiento día 21 en muestras radiadas

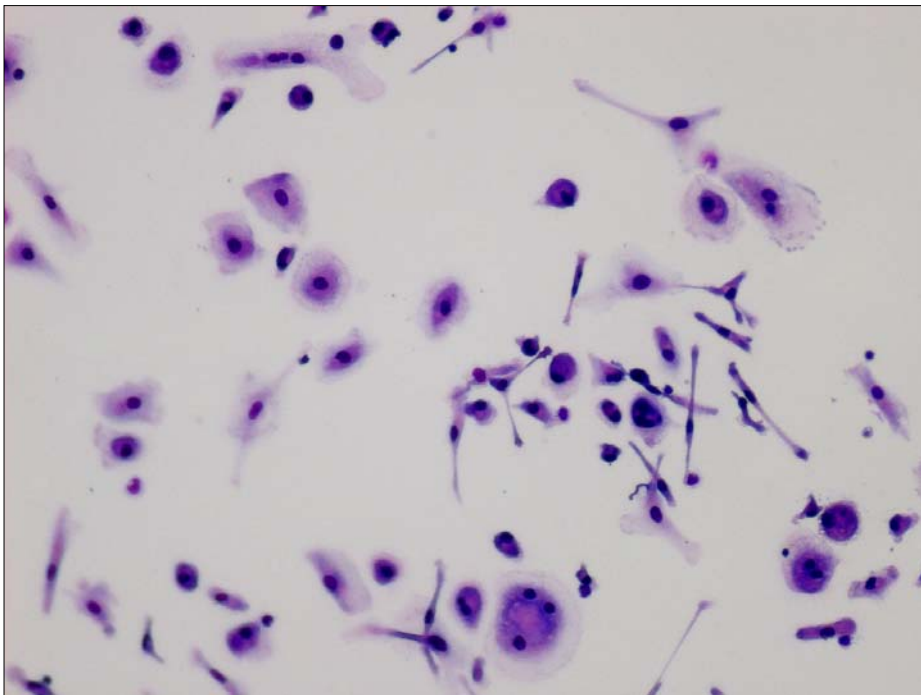


Imagen 10. Morfología celular (células redondas, c. alargadas y c. multinucleadas) día 14 de cultivo en muestras no radiadas

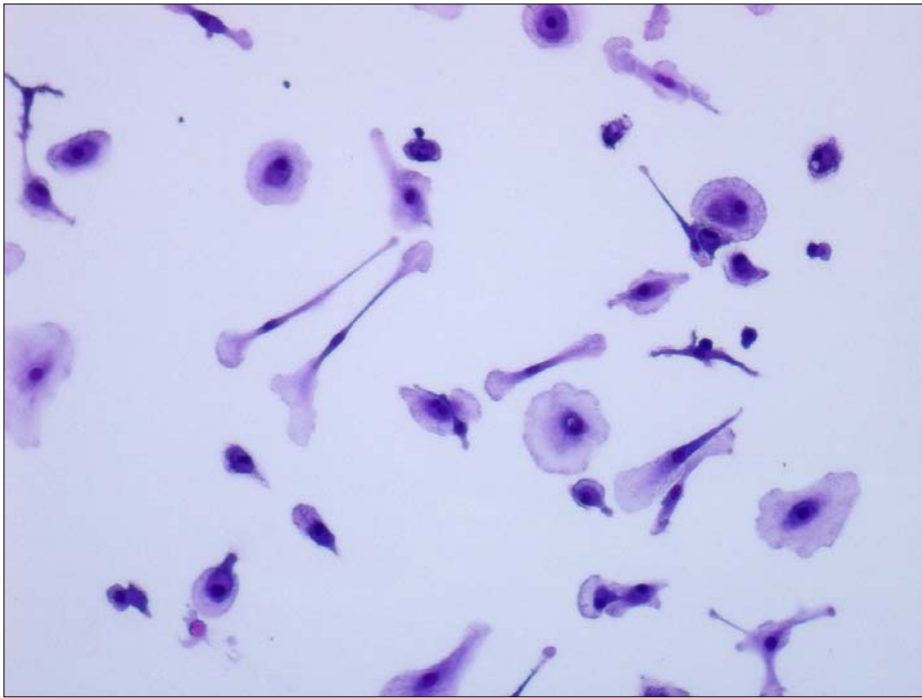


Imagen 11. Morfología celular (Fibroцитos X10 aumentos)



Imagen 12. Morfología celular (Fibroцитos X20 aumentos)

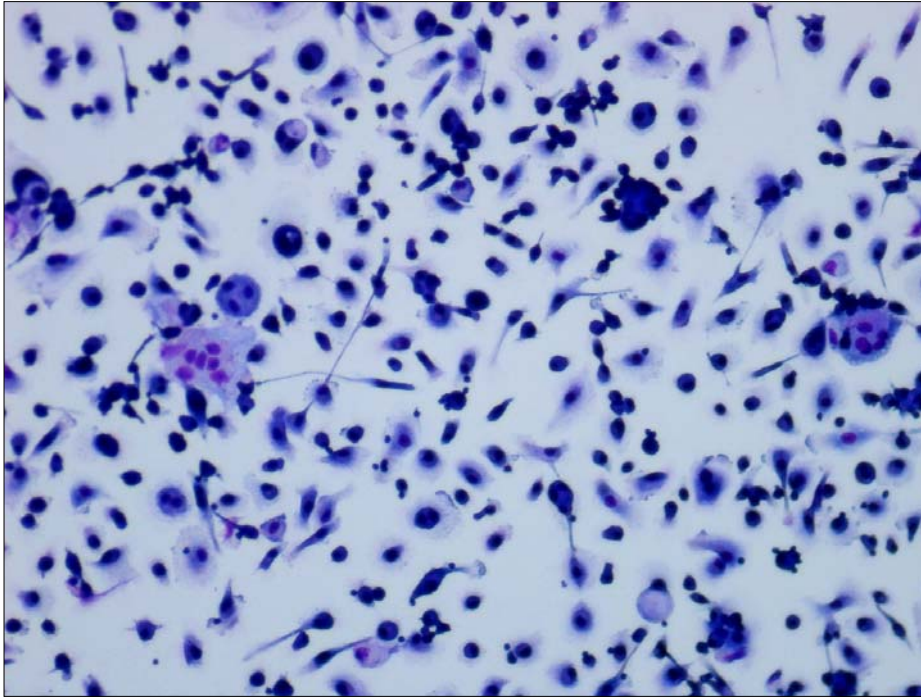


Imagen 13. Morfología celular (células multinucleadas X10 aumentos)

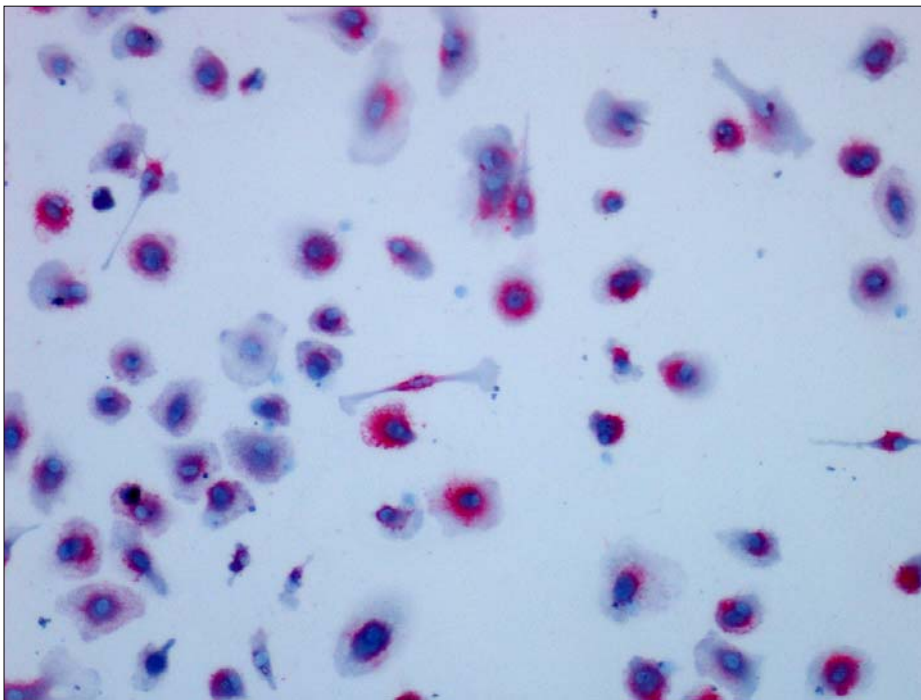


Imagen 14. Inmunocitoquímica. Células CD 68+

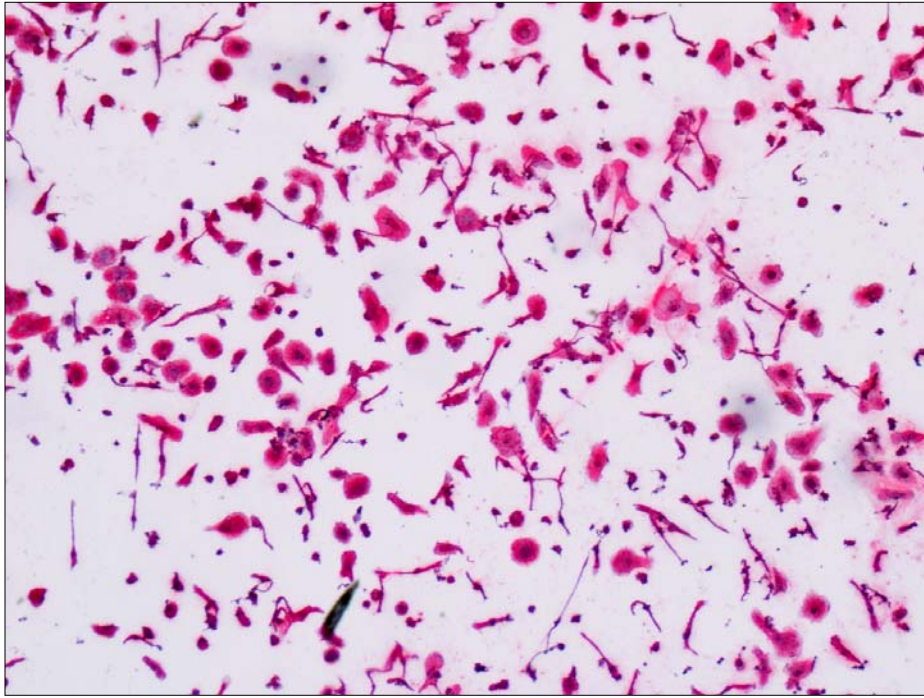


Imagen 15. Inmunocitoquímica. Células Vimentina +

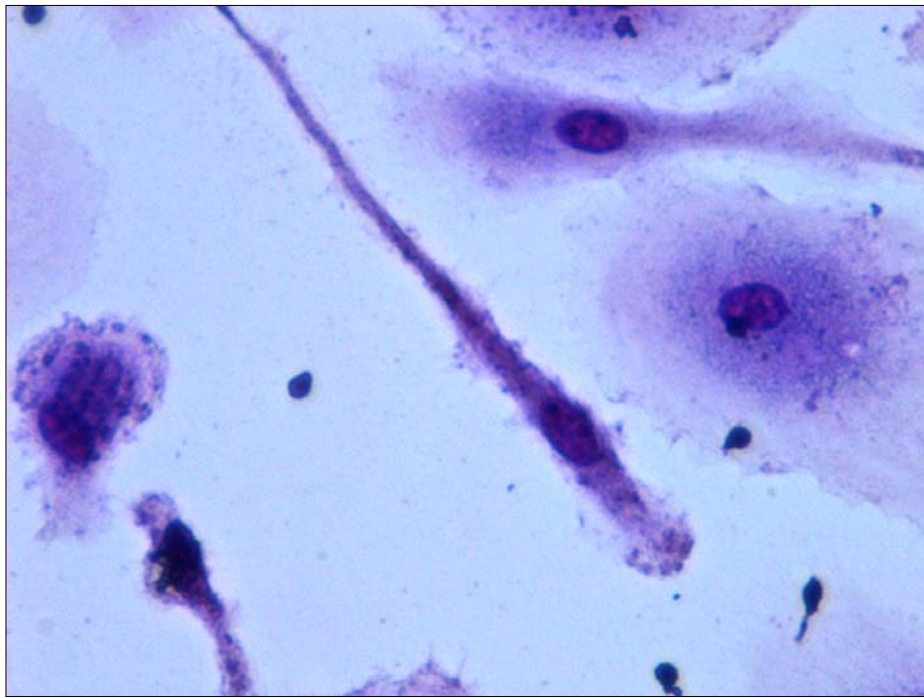


Imagen 16. Célula NBT Test +

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1.- LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS FIBROBLASTOS-LIKE: MITAD CONJUNTIVO, MITAD MACRÓFAGO

La mayor dificultad para la valoración del cultivo de las células mononucleares de sangre periférica radica en la falta de criterios de identificación definitivos de las células proliferantes. De hecho, hay una evidencia clara de que las células sembradas (CMN), comprenden linfocitos, monocitos y una pequeña cantidad (<1%) de células CD 34+. Sin embargo, a los 7, 14 y 21 días del cultivo se detecta una proliferación progresiva y heterogénea que incluye tres variedades morfológicas – células redondas, células alargadas y células multinucleadas – con características de CFU-F, Fibroblastos-like/fibroцитos, MSC, macrófagos, condrocitos y osteoclastos. Las proporciones son muy variables en cada caso sin que se conozcan los factores que condicionan este desarrollo; además, es necesario subrayar la falta de criterios inmunofenotípicos definitivos que permitan identificar de forma concluyente las poblaciones de células mesenquimales y fibroblastos-like. Parece claro, que el papel del CD 34 es importante para separar a los fibroblastos-like/fibroцитos

(CD 34+) [137] de las células mesenquimales (CD 34-) [138]. En los últimos años se están intentando definir los criterios de identidad de las células mesenquimales, o al menos, unos patrones mínimos que permitan su identificación, y en el año 2006 la International Society for Cellular Therapy propuso tres criterios mínimos para identificar a las células mesenquimales [139]: 1) deben de ser células adherentes al plástico cuando están en condiciones de cultivo estándar, 2) expresan CD 5, CD 73 y CD 90 y son negativas para marcadores hematopoyéticos CD 34, CD 45, CD 14 o CD 11b y 3) pueden diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Estos criterios mínimos pueden ser útiles cuando se están manejando exclusivamente poblaciones celulares muy homogéneas, sin embargo, el desarrollo del cultivo de células mononucleares si por algo puede definirse, es por la heterogeneidad de las poblaciones celulares de difícil identificación inmunofenotípica, en las que claramente predominan los fibroblastos-like/fibroцитos.

La característica más llamativa de los fibroцитos, que comparten con las células mesenquimales, es la adherencia al plástico en las condiciones de cultivo convencionales. También está bien asentado que los fibroцитos se originan a partir de los monocitos, tal como demuestra Pilling y cols. [59] al sembrar CMN de sangre periférica depleccionadas de linfocitos. Sin embargo, entre las incógnitas que plantea la

heterogeneidad del crecimiento celular y la variación de la intensidad de la proliferación en los casos individuales, se podría incluir el papel de los linfocitos como factores muy relevantes que actúan en la diferenciación de los fibrocitos; desde luego está bien establecido que los linfocitos T son imprescindibles para lograr la diferenciación de los fibrocitos [61], y probablemente haya otras células y también otros factores humorales, tal como señala recientemente Shao y cols. [140], que puedan desempeñar un papel similar. Precisamente, para preservar la acción de estos mecanismos de regulación en gran parte desconocidos, en el diseño de los cultivos de este estudio no se programaron métodos específicos para la eliminación de las células no adherentes, y su disminución quedaba condicionada exclusivamente al cambio semanal de la mitad del medio de cultivo. Esta característica metodológica es un hecho diferencial con la mayoría de los cultivos reseñados.

La identificación de los tipos celulares desarrollados en el cultivo no está suficientemente definida y desde luego detecta resultados contradictorios. Seguramente, la falta de marcadores únicos para cada tipo celular, dificulta extraordinariamente esta identificación al tener que recurrir a la combinación de paneles múltiples, algunos con una enorme cantidad de anticuerpos monoclonales, que llevan a conclusiones laberínticas. El estudio de los marcadores de los fibrocitos humanos

cultivados incluye hasta ahora más de 50 parámetros que recorren marcadores leucocitarios, monocíticos, linfoides, de células dendríticas, CMH, Stem Cell, Integrinas, receptores de membrana, productos de fibroblastos y otros marcadores como el vWF [141]. Estos datos demuestran claramente la ausencia de criterios específicos para la identificación del fibrocito, a lo que hay que sumar la incidencia de los múltiples métodos del procesamiento celular que incluyen despegamientos y tripsinizaciones. Para intentar minimizar estos efectos, en este estudio se eligió la valoración del inmunofenotipo mediante una técnica citoquímica con FAFA, intentando visualizar simultáneamente la morfología celular individual y la positividad del anticuerpo monoclonal. De la variedad de marcadores utilizados hay unanimidad en la literatura, en considerar la positividad de los fibrocitos a la Vimentina como un marcador específico [68]. En este estudio encontramos una positividad muy intensa y generalizada que incluía prácticamente al 100% de las células el día 7, 14 y 21 del cultivo. El origen monocítico de los fibrocitos, plantea la hipótesis del mantenimiento de las características macrofágicas durante la diferenciación. Este aspecto no estaba suficientemente aclarado, por lo que se incluyó en el estudio celular un marcador monocítico (CD 68), positivo en los monocitos humanos y en los macrófagos tisulares, y un test de actividad fagocítica que permitía

evaluar la capacidad bactericida de las células (NBT Test). Tanto el anticuerpo monoclonal CD 68 como el NBT Test fueron positivos en más del 80% de las células sin excluir ningún tipo morfológico. Este hecho que hasta ahora no había sido señalado, parece demostrar la presencia de actividad macrofágica claramente visible en el fibrocito, lo que le convertiría en una célula que comparte características de las células derivadas del tejido conjuntivo y de los macrófagos.

La relación de las citoquinas con la diferenciación fibrocítica es muy estrecha, habiéndose descrito la producción de numerosas interleukinas especialmente citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-10, TNF, TGF- β 1, M-CSF) en los cultivos de fibrocitos [63]; también se ha valorado la incidencia de las citoquinas añadidas al cultivo celular en la diferenciación de los monocitos a fibrocitos. Se comprobó que la IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, IL-16, GM-CSF y TNF- α , no tienen un efecto significativo en la diferenciación fibrocítica, mientras que la IL-4, IL-13 y el IFN- γ actúan directamente en los monocitos para regular su diferenciación fibrocítica [140].

En el diseño del estudio se incluyó la evaluación de la secreción de citoquinas por las células cultivadas, para lo que se utilizó la metodología Luminex de alta sensibilidad, que cuantificaba los niveles de citoquinas

en el medio de cultivo los días 7, 14 y 21. Los datos más relevantes fueron:

- a) Las IL-6 e IL-8 están por encima de los 2000 pg/ml en todas las muestras, reflejando la presencia permanente de células fibroblásticas y macrofágicas.
- b) Las IL-12, IL-7, IL-13 y la IL-5 tienen rangos bajos, inferiores a 0,13 pg/ml, relacionados con poblaciones mínimas de células del estroma y de linfocitos T.
- c) Las IL-1 β , IL-2 y la IL-10 descienden desde el día 7 hasta el día 21.

Estos hechos son concordantes con los hallazgos morfológicos y citoquímicos, porque la IL-6 y la IL-8 están íntimamente implicadas con la respuesta inflamatoria-quimiotáctica y son producidas por monocitos y fibroblastos, mientras que las Interleukinas 2, 4, 5, 10 y el IFN- γ tienen origen linfocítico y sufren las variaciones de los linfocitos del cultivo. También es significativo el descenso desde el día 7 al día 21 del cultivo de las Interleukinas 1 β , 2 y 10, producidas por células macrofágicas.

2.- UN NUEVO PROTOCOLO DE IRRADIACIÓN: MENOS DOSIS, MENOS TIEMPO Y RESULTADOS EQUIVALENTES

El estudio de los efectos de la irradiación PEMF en los cultivos celulares se ha dirigido de forma casi exclusiva a poblaciones celulares osteoarticulares, naturalmente relacionadas con el uso clínico del PEMF. El mayor número de observaciones se hicieron sobre condrocitos humanos [109] [111] [23] [129] y en menor medida sobre líneas celulares de osteosarcoma [124]; también hay observaciones aisladas sobre otras células como fibroblastos [125], células endoteliales [120], células mesenquimales [131], e incluso neutrófilos [116]. No hemos encontrado en la literatura revisada ningún estudio que evaluase la acción de la irradiación PEMF en los fibroblastos-like/fibroцитos, y sin embargo es evidente el papel relevante de estas células por su condición de conjuntivo/macrófago en las afecciones inflamatorias osteoarticulares. Por otra parte, la localización de estas células en la sangre periférica que les permite el acceso a cualquier foco inflamatorio, y además, las hace susceptibles a las interacciones celulares y a los factores plasmáticos inmunomoduladores, las señalaron como un objetivo preferente de este estudio para evaluar el efecto de la irradiación PEMF.

Las condiciones de cultivo siguen las pautas habituales que incluyen la incubación en estufa a 37°C de temperatura, 5% de CO₂ y humedad a saturación. Sin embargo, el medio de cultivo utilizado en la mayoría de los trabajos revisados, fue el medio de Eagle MEM o alguna modificación del medio de Dulbecco. Hay que subrayar que estos cultivos estaban dirigidos a condrocitos y osteoblastos. En este estudio se utilizó el medio de McCoy 5A tal como se viene usando en el cultivo de fibrocitos sobre una modificación de las técnicas descritas por Gordon [135] y Kaneko [56]. Es una constante en todos los estudios realizados la utilización del suero bovino fetal (SBF), considerándolo un factor imprescindible para la diferenciación de las células cultivadas y especialmente relevante en el desarrollo del cultivo de fibrocitos. También se ha descrito la incidencia de la concentración del SBF en el efecto del PEMF sobre los condrocitos cultivados, señalando una relación directa entre la concentración del SBF y la proliferación [109]. Las concentraciones utilizadas se sitúan en torno al 10%, aunque en algún trabajo se usó SBF a una concentración del 20% [129]. Siguiendo las pautas previas de los cultivos de fibrocitos, en este estudio se utilizó el SBF a una concentración del 20%.

Los protocolos de irradiación PEMF en cultivos celulares presentan la mayor variedad de mezclas de frecuencias, intensidades,

duración y número de sesiones; probablemente esta característica hace especialmente difícil la comparación de los resultados y el hallazgo de unos criterios comunes que permitan explicar los efectos clínicos. Las frecuencias reseñadas en la literatura varían entre los 6.4 Hz [106] y los 500 Hz utilizados por Jahns [23]; naturalmente entre estos extremos hay una gran variedad de frecuencias, en las que predomina el uso de 75 Hz. Sin embargo, en el uso clínico de la irradiación PEMF en los retardos de consolidación ósea (principal indicación clínica de la terapia con PEMF) se utiliza una frecuencia de 50 Hz, que hemos extrapolado a este estudio. Las intensidades del campo magnético reseñadas en la literatura tienen una menor dispersión y la más usada es la de 2.3 mT [109] [110] [111]. Las especificaciones del generador PEMF utilizado en este estudio, permitía ajustar una intensidad de 2.25 mT que era el valor más aproximado al de los otros estudios. La duración de la irradiación, la distribución (continua/intermitente) y el número de sesiones representan la mayor heterogeneidad registrada en los protocolos de irradiación revisados. El tiempo de irradiación varía desde 24 horas consecutivas [110] hasta 20 minutos/día [100, 129]; el paralelismo de estas variables y su dispersión se mantiene también en la distribución de las sesiones que abarca todas las combinaciones de días continuos y alternos entre la dosis única [23] y la irradiación durante 6 días consecutivos [111]. En estudios

previos, planteados precisamente para evaluar la respuesta óptima con los mínimos tiempos de irradiación y sesiones, comprobamos que el protocolo con 15 minutos de irradiación durante 3 días consecutivos era el que presentaba los mejores resultados. Por otra parte, el diseño general del protocolo pretende ajustarse a las directrices del uso clínico de la irradiación PEMF adaptándola a los cultivos celulares.

Las determinaciones realizadas en los cultivos celulares para evaluar los efectos de la irradiación PEMF comparten la misma diversidad y dispersión que recogen los protocolos de irradiación. La dificultad para comparar resultados, ya de por sí, muy difícil en la literatura actual como reconocen los propios autores [111], aumenta cuando se trata de evaluar el efecto PEMF en el cultivo de fibroblastos-like/fibroцитos, del que no se han encontrado observaciones en la literatura revisada; esta ausencia de datos sitúa los cultivos de condrocitos como los antecedentes más próximos a los fibrocitos y por ello se han elegido como resultados de referencia para el análisis. La proliferación celular es el parámetro que se ha evaluado con mayor frecuencia, utilizando mayoritariamente la incorporación de Timidina- H^3 , que incluía la tripsinización y el despegamiento. Excepcionalmente, también se describe el uso del contaje celular como método de cuantificación, sin especificar sus características. Stolfa [129] mide la

viabilidad celular con el MTT Test y no encuentra diferencias significativas entre los controles y las células irradiadas con PEMF. La mayoría de los experimentos demuestran un incremento de la proliferación, pero con unos comportamientos muy heterogéneos que pueden ser atribuidos a cambios fenotípicos celulares [109], a niveles de densidad celular en el cultivo y a la duración de la irradiación [111], o incluso, a series con un número de muestras inferiores a 20 [106]. En los cultivos de fibrocitos se ha registrado un incremento progresivo de la proliferación postirradiación que se detecta el día 14 y el día 21. Se utilizó un Software de contaje celular que registraba el número de células por milímetro cuadrado sobre 20 campos de la placa, que suponían una muestra representativa del cultivo. Este método tenía la ventaja de que no exigía ninguna manipulación previa de las células cultivadas, valoraba a todas las células del cultivo in situ y requería exclusivamente una tinción con Giemsa que permitía estudiar sobre la misma muestra la morfología celular. En el cultivo de condrocitos humanos, continuando con los datos de referencia elegidos, también están reseñados en la literatura cambios morfológicos secundarios a la irradiación con PEMF. Jahns [23] señala la actuación de la irradiación PEMF sobre el citoesqueleto de los condrocitos alterando la funcionalidad de los microfilamentos de actina, que se concreta en cambios morfológicos visibles en microscopía óptica,

invirtiendo la evolución morfológica normal de los condrocitos que pasa de célula esférica a célula alargada y a célula estrellada. La morfología de los fibroblastos-like/fibroцитos es muy heterogénea y de hecho las células cultivadas presentan suficiente variabilidad morfológica como para requerir la separación en multitud de grupos; sin embargo, la necesidad de conseguir clasificaciones homogéneas que permitan la comparación aconseja simplificar estas separaciones. En la mayoría de los estudios sobre estos cultivos, la morfología suele incluir exclusivamente dos grupos celulares que separan a las células alargadas, con morfología fibroblastoide y con aspecto fusiforme, de las células redondas, en algunos casos con prolongaciones de pequeño tamaño y aspecto redondo o estrellado, que en realidad acaban incluyendo a todas las células del cultivo que no son fusiformes. En este estudio también se incluyen como células derivadas del cultivo con evolución osteoclástica o macrofágica un grupo de células multinucleadas que casi siempre representan un pequeño porcentaje y sólo en muestras aisladas tienen una presencia significativa. La evolución morfológica de los cultivos de fibroblastos-like/fibroцитos registra un predominio significativo de células redondas sobre células alargadas que en el día 14 disminuye al producirse un aumento de las células alargadas.

Las citoquinas parecen jugar un papel decisivo en el control de la proliferación y diferenciación de los fibrocitos [140], y hay algunos estudios que describen la capacidad de los fibroblastos-like/fibrocitos para producir citoquinas y factores de crecimiento [70], aunque no se ha realizado ningún estudio evaluando el efecto de la irradiación PEMF sobre esta producción. Utilizando como referencia la liberación de citoquinas postirradiación en los osteoblastos [100] y en los osteoclastos-like [117], cuantificadas por ELISA, se detectó un incremento del TNF- α , IL-1 β y PG-E₂ en relación con el reclutamiento de los osteoclastos-like y de la intensidad del campo eléctrico. En los osteoblastos, la irradiación PEMF induce un aumento de la liberación de la TGF- β 1 que no guarda relación con la intensidad del campo magnético. En este estudio se seleccionó un panel de 13 citoquinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ , CSF-GM Y TNF- α), realizadas con tecnología Luminex de alta sensibilidad, incluyendo la evaluación de patrones inflamatorios e inmunes.

3.- LA IRRADIACIÓN CON PEMF AUMENTA EL CRECIMIENTO Y NO CAMBIA LAS CÉLULAS

Los escasos estudios que valoran los efectos de la irradiación PEMF en la proliferación [106] [109] [111] y en los cambios morfológicos [23] del cultivo de condrocitos, se caracterizan porque comparten el aumento de proliferación como una constante de la irradiación PEMF y al mismo tiempo utilizan una variabilidad de parámetros de irradiación que no permite obtener un modelo común de protocolo de irradiación.

La cuantificación del aumento de proliferación varía entre 178%-190% a las 9 horas y el 244%-267% a las 18 horas cuando se usa irradiación continua [111], que no aumenta a partir del tercer día, aunque se prolongue el experimento, probablemente por déficit de factores de crecimiento. El uso de irradiación intermitente [106] parece conseguir mayores incrementos de proliferación que la irradiación continua.

La evaluación de los cambios morfológicos de los condrocitos tras irradiación PEMF está reseñada en el estudio de Jahns [23] que recoge la transformación de los condrocitos estrellados hacia formas esféricas, produciéndose un despegamiento del plástico, sin que estos efectos

disminuyesen al reducir el tiempo de irradiación. En estos experimentos se utilizaron frecuencias de 100 y de 500 Hz.

En los cultivos de fibroblastos-like/fibrociitos de este estudio también se observó un significativo aumento de la proliferación, progresivo desde el día 14 hasta el día 21, observando un descenso muy significativo de las células alargadas. En todos estos cultivos, se utilizó una frecuencia de irradiación de 50 Hz, durante 15 minutos en tres días consecutivos.

En este estudio también se cuantificó el efecto PEMF sobre la producción de citoquinas en el cultivo de fibroblastos-like/fibrociitos, utilizando un panel de 13 citoquinas y factores de crecimiento. No se encontraron referencias similares en la revisión de la literatura actual, por lo que no disponemos de parámetros de comparación. Las determinaciones se hicieron en el sobrenadante del cultivo, los días 14 y 21, valorando las placas control y las placas irradiadas. Los resultados más relevantes incluyen la disminución significativa de la IL-1 β y del TNF- α , así como el aumento de la IL-10 el día 21. Estos hechos sugieren la actuación del PEMF sobre las células linfoides residuales (aumento de la IL-10) y sobre la producción de citoquinas inflamatorias (descenso de la IL-1 β y del TNF- α), que podrían explicar la implicación del PEMF en

los efectos clínicos cuando se usa como tratamiento antiinflamatorio de la patología osteoarticular.

Por otra parte, aunque se registraron resultados muy diferentes en los valores medios de los niveles de IL-2, IL-4, GM-CSF e IFN- γ en las células irradiadas, no presentaban diferencias estadísticamente significativas, asumiendo que la irradiación PEMF no produce cambios en la producción de estas citoquinas.

El análisis de la evolución cronológica del cultivo, señala al día 14 como el punto de corte más relevante, que registra cambios muy significativos en la morfología celular y en la producción de citoquinas. En las células no radiadas se observó un aumento de la población de células alargadas acompañado de un aumento de los niveles de IFN- γ y TNF- α . Sin embargo, la irradiación con PEMF producía cambios celulares opuestos, que incluían la disminución de la población de células alargadas y el descenso del nivel de TNF- α .

Estos datos sugieren la implicación de las células alargadas (fibrocitos/fibroblast-like) en la producción de TNF- α y su relación clara con la producción de patología inflamatoria. Esta cronología subraya la existencia de un intervalo de 1-2 semanas entre la irradiación y los

efectos celulares, situación que curiosamente también se detecta en el uso clínico del PEMF.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1.- El cultivo de células mononucleares de sangre periférica produce fibroblast-like/fibrociitos con características de tejido conjuntivo y de células macrofágicas (morfología fibroblástica, Vimentina +, CD 68 + y NBT Test positivo).

2.- El patrón de producción de citoquinas durante el cultivo registra un aumento progresivo de los niveles de GM-CSF, un descenso también progresivo de la IL-2, IL-1 β y de la IL-10, y un incremento de IFN- γ y TNF- α el día 14.

3.- El protocolo de irradiación PEMF diseñado para este estudio con menores dosis y tiempos de irradiación, consigue resultados equiparables a los utilizados en protocolos anteriores.

4.- La irradiación con PEMF produce un incremento muy significativo de la proliferación celular, disminuyendo el número de células alargadas el día 14.

5.- No se detectaron cambios significativos en los marcadores citoquímicos ni en la capacidad fagocítica tras la irradiación PEMF.

6.- La irradiación PEMF no altera los niveles de IL-2, IL-4, GM-CSF e IFN- γ .

7.- Se observó una disminución muy significativa de los niveles de IL-1 β y de TNF- α en los cultivos irradiados con PEMF.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Diberner, B. Oersted and the Discovery of Electromagnetism. New York: Blaistell Pub. Co., 1962: 21.
2. Pearce Williams, L. Andre-Marie Ampere. Scientific American, 1989: 90.
3. Faraday, M. Experimental Researches in Chemistry and Physics. London: Richard Taylor and William Francis, 1990: 81-84.
4. Maxwell, J.C. A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. Royal Society Transactions, 1996. 155: 459.
5. Ubeda, A., Trillo M.A. Radiaciones RF de antenas de telefonía móvil y Salud Pública. Radioprotección, 1999. 20 (VII) : 24-36.
6. Foster, K.R., Glaser R. Thermal mechanisms of interaction of radiofrequency energy with biological systems with relevance to exposure guidelines. Health Phys, 2007. 92(6): 609-20.
7. Heynick, L.N., Merritt, J.H. Radiofrequency fields and teratogenesis. Bioelectromagnetics, 2003. Suppl 6: 174-86.
8. Crumpton, M.J., Collins, A.R. Are environmental electromagnetic fields genotoxic?. DNA Repair (Amst), 2004. 3(10): 1385-7.

9. McNally, R.J., Parker, L. Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma*, 2006. 47(4): 583-98.
10. Habash, R.W., Brodsky, L.M., Leiss, W., Krewski, D., Repacholi, M. Health risks of electromagnetic fields. Part II: Evaluation and assessment of radio frequency radiation. *Crit Rev Biomed Eng*, 2003. 31(3): 197-254.
11. Habash, R.W., Brodsky, L.M., Leiss, W., Krewski, D., Repacholi, M. Health risks of electromagnetic fields. Part I: Evaluation and assessment of electric and magnetic fields. *Crit Rev Biomed Eng*, 2003. 31(3): 141-95.
12. Behari, J., Paulraj, R. Biomarkers of induced electromagnetic field and cancer. *Indian J Exp Biol*, 2007. 45(1): 77-85.
13. Simkó, M., Mattsson, M.O. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses *in vitro*: possible immune cell activation. *J Cell Biochem*, 2004. 93(1): 83-92.
14. Funk, R.H., Monsees, T.K. Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review. *Cells Tissues Organs*, 2006. 182(2): 59-78.

-
15. Rosen, A.D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochem Biophys*, 2003. 39(2): 163-73.
 16. Baureus Koch, C.L., Sommarin, M., Persson, B.R., Salford, L.G., Eberhardt, J.L. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. *Bioelectromagnetics*, 2003. 24(6): 395-402.
 17. Fukada, E. Piezoelectricity in polymers and biological materials. *Ultrasonics*, 1968. 6(4): 229-34.
 18. Haimovici, N. Influence of the neoformation of bone tissue by means of low-frequency pulsed magnetic fields. *Prog Clin Biol Res*, 1982. 107: 247-55.
 19. Löschinger, M., Thumm, S., Hämmerle, H., Rodemann, H.P. Stimulation of protein kinase A activity and induced terminal differentiation of human skin fibroblasts in culture by low-frequency electromagnetic fields. *Toxicol Lett*, 1998. 96-97: 369-76.
 20. Rioja Toro, J. *Electroterapia y Electrodiagnóstico*. Universidad de Valladolid, 1993.
 21. Rodríguez Martín, J.M. *Electroterapia en fisioterapia*. Panamericana, 2000.

22. Jahns, M., Durdle, N.G., Lou, E., Raso, V.J. A programmable ramp waveform generator for PEMF exposure studies on chondrocytes. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2006. 1: 3230-3.
23. Jahns, M.E., Lou, E., Durdle, N.G., Bagnall, K., Raso, V.J., Cinats, D., Barley, R.D., Cinats, J., Jomha, N.M. The effect of pulsed electromagnetic fields on chondrocyte morphology. *Med Biol Eng Comput*, 2007. 45(10): 917-25.
24. Hulme, J., Robinson, V., DeBie, R., Wells, G., Judd, M., Tugwell, P. Electromagnetic fields for the treatment of osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(1): CD003523.
25. Bassett, C.A. The development and application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for ununited fractures and arthrodeses. *Clin Plast Surg*, 1985. 12(2): 259-77.
26. Patiño, O., Grana, D., Bolgiani, A., Prezzavento, G., Miño, J., Mirlo, A., Benaim, F. Pulsed electromagnetic fields in experimental cutaneous wound healing in rats. *J Burn Care Rehabil*, 1996. 17(6 Pt 1): 528-31.
27. Musaev, A.V., Guseinova, S.G., Imamverdieva, S.S. The use of pulsed electromagnetic fields with complex modulation in the treatment of patients with diabetic polyneuropathy. *Neurosci Behav Physiol*, 2003. 33(8): 745-52.

-
28. Weissman, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 2000. 100(1): 157-68.
29. Till, J.E., McCulloch, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 1961. 14: 213-22.
30. Meyskens, F.L.Jr., Kiefer, C.A., Holmes, D.K., Gerner, E.W. Separation of normal human bone marrow cells by counterflow centrifugal elutriation. I. Morphological analysis and subfractionation of neutrophilic granulocytes. *Exp Hematol*, 1979. 7(8): 401-10.
31. Becker, A.J., McCulloch, E.A., Till, J.E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 1963. 197: 452-4.
32. Harrison, D.E., Astle, C.M. Loss of stem cell repopulating ability upon transplantation. Effects of donor age, cell number, and transplantation procedure. *J Exp Med*, 1982. 156(6): 1767-79.
33. Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch L., McCulloch, E.A. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol*, 1967. 69(2): 177-84.
34. Till, J.E., McCulloch, E.A. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1980. 605(4): 431-59.

35. Haskill, J.S., McNeill, T.A., Moore, M.A. Density distribution analysis of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in bone marrow. *J Cell Physiol*, 1970. 75(2): 167-79.
36. Metcalf, D., Moore, A.S., Shortman, K. Adherence column and buoyant density separation of bone marrow stem cells and more differentiated cells. *J Cell Physiol*, 1971. 78(3): 441-50.
37. Woodliff, H.J. Glass substrate cultures of human blood and bone marrow cells. *Exp Cell Res*, 1958. 14(2): 368-77.
38. Worton, R.G., McCulloch, E.A., Till, J.E. Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J Exp Med*, 1969. 130(1): 91-103.
39. Fauser, A.A., Messner, H.A. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood*, 1978. 52(6): 1243-8.
40. Lemoli, R.M., Bertolini, F., Cancedda, R., De Luca, M., Del Santo, A., Ferrari, G., Ferrari, S., Martino, G., Mavilio, F., Tura, S. Stem cell plasticity: time for a reappraisal?. *Haematologica*, 2005. 90(3): 360-81.
41. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. 282(5391): 1145-7.

-
42. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002. 418(6893): 41-9.
43. Lemischka, I.R. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, 1997. 15 Suppl 1: 63-8.
44. Quesenberry, P.J., Colvin, G.A., Lambert, J.F. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood*, 2002. 100(13): 4266-71.
45. Majno, G. Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol*, 1998. 153(4): 1035-9.
46. Petrakis, N.L., Davis, M., Lucia, S.P. The *in vivo* differentiation of human leukocytes into histiocytes, fibroblasts and fat cells in subcutaneous diffusion chambers. *Blood*, 1961. 17: 109-18.
47. Puck, T.T., Cieciura, S.J., Fisher, H.W. Clonal growth *in vitro* of human cells with fibroblastic morphology; comparison of growth and genetic characteristics of single epithelioid and fibroblast-like cells from a variety of human organs. *J Exp Med*, 1957. 106(1): 145-58.
48. Zhao, Y., Glesne, D., Huberman, E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(5): 2426-31.

49. Berman, L., Stulberg, C.S., Ruddle, F.H. Long-term tissue culture of human bone marrow. I. Report of isolation of a strain of cells resembling epithelial cells from bone marrow of a patient with carcinoma of the lung. *Blood*, 1955. 10(9): 896-911.
50. Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 1980. 56(2): 289-301.
51. Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Jhanwar, S.C., Hamilton, J.A., Chiarieri, D., Meyers, P.A., et al. Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*, 1982. 59(5): 1046-54.
52. Wilson, F.D., Tavassoli, M., Greenberg, B.R., Hinds, D., Klein, A.K. Morphological studies on 'adherent cells' in bone marrow cultures from humans, dogs, and mice. *Stem Cells*, 1981. 1(1): 15-29.
53. Gordon, M.Y., Gordon-Smith, E.C. Bone marrow fibroblast function in relation to granulopoiesis in aplastic anaemia. *Br J Haematol*, 1983. 53(3): 483-9.
54. Klein, A.K., Lynch, J.A., Dyck, J.A., Shimizu, J.A., Fox, L.A., Stitzel, K.A. The influence of fibroblast-like cells derived from canine fetal hematopoietic tissues on the regulation of lymphohematopoiesis. *Int J Cell Cloning*, 1984. 2(1): 20-33.

-
55. Gomez-Casal, F. Isolation and culture of Fibroblast-like (F-CFU) from peripheral blood. *Sangre*, 1987. 32(5): 505.
56. Kaneko, S., Motomura, S., Ibayashi, H. Differentiation of human bone marrow-derived fibroblastoid colony forming cells (CFU-F) and their roles in haemopoiesis *in vitro*. *Br J Haematol*, 1982. 51(2): 217-25.
57. Yoldi, N. Estudio *in vitro* de las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) procedentes de sangre periférica. Influencia de fármacos. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 1990.
58. Bucala, R., Spiegel, L.A., Chesney, J., Hogan, M., Cerami, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*, 1994. 1(1): 71-81.
59. Pilling, D., Buckley, C.D., Salmon, M., Gomer, R.H. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol*, 2003. 171(10): 5537-46.
60. Pilling, D., Tucker, N.M., Gomer, R.H. Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes. *J Leukoc Biol*, 2006. 79(6): 1242-51.
61. Abe, R., Donnelly, S.C., Peng, T., Bucala, R., Metz, C.N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*, 2001. 166(12): 7556-62.

62. Vaughan, M.B., Howard, E.W., Tomasek, J.J. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res*, 2000. 257(1): 180-9.
63. Chesney, J., Metz, C., Stavitsky, A.B., Bacher, M., Bucala, R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol*, 1998. 160(1): 419-25.
64. Hartlapp, I., Abe, R., Saeed, R.W., Peng, T., Voelter, W., Bucala, R., et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *Faseb J*, 2001. 15(12): 2215-24.
65. Chesney, J., Bacher, M., Bender, A., Bucala, R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(12): 6307-12.
66. Chesney, J., Bucala, R. Peripheral blood fibrocytes: mesenchymal precursor cells and the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*, 2000. 2(6): 501-5.
67. Yang, L., Scott, P.G., Giuffre, J., Shankowsky, H.A., Ghahary, A., Tredget, E.E. Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Lab Invest*, 2002. 82(9): 1183-92.

-
68. Quan, T.E., Cowper, S., Wu, S.P., Bockenstedt, L.K., Bucala, R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(4): 598-606.
69. Grab, D.J., Salem, M.L., Dumler, J.S., Bucala, R. A role for the peripheral blood fibrocyte in leishmaniasis?. *Trends Parasitol*, 2004. 20(1): 12.
70. Quan, T.E., Cowper, S.E., Bucala, R. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*, 2006. 8(2): 145-50.
71. Lama, V.N., Phan, S.H. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proc Am Thorac Soc*, 2006. 3(4): 373-6.
72. Deans, R.J., Moseley, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 2000. 28(8): 875-84.
73. Waller, E.K., Olweus, J., Lund-Johansen, F., Huang, S., Nquyen, M., Guo, G.R., et al. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood*, 1995. 85(9): 2422-35.

74. Maccario, R., Podestá, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D., et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 2005. 90(4): 516-25.
75. Fernandez, M., Simon, V., Herrera, G., Cao, C., Del Favero, H., Minguell, J.J. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*, 1997. 20(4): 265-71.
76. Lazarus, H.M., Haynesworth, S.E., Gerson, S.L., Caplan, A.I. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother*, 1997. 6(5): 447-55.
77. Wexler, S.A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., Hows, J.M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 2003. 121(2): 368-74.
78. Koc, O.N., Lazarus, H.M. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant*, 2001. 27(3): 235-9.
79. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 11): 2204-13.

-
80. Villaron, E.M., Almeida, J., López-Holgado, N., Alcoceba, M., Sánchez-Abarca, L.I., Sánchez-Guijo, F.M., et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2004. 89(12): 1421-7.
81. Dickhut, A., Schwerdtfeger, R., Kuklick, L., Ritter, M., Thiede, C., Neubauer, A., et al. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol*, 2005. 84(11): 722-7.
82. Poloni, A., Leoni, P., Buscemi, L., Balducci, F., Pasquini, R., Masia, M.C., et al. Engraftment capacity of mesenchymal cells following hematopoietic stem cell transplantation in patients receiving reduced-intensity conditioning regimen. *Leukemia*, 2006. 20(2): 329-35.
83. Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells*, 2005. 23(8): 1105-12.
84. Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G., et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*, 2006. 37(10): 967-76.

85. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 2004. 363(9419): 1439-41.
86. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., Ringdén, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 2003. 57(1): 11-20.
87. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002. 99(10): 3838-43.
88. Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., Zernetkina, V., Majumdar, M.K., Beggs, K.J., Simonetti, B.W., et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*, 2005. 12(1): 47-57.
89. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2006. 107(1): 367-72.
90. Barry, F.P., Murphy, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(4): 568-84.

-
91. Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 1999. 401(6751): 390-4.
92. Rombouts, W.J., Ploemacher, R.E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*, 2003. 17(1): 160-70.
93. Murphy, J.M., Dixon, K., Beck, S., Fabian, D., Feldman, A., Barry, F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(3): 704-13.
94. Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M., Nilsson, A., Sjögren-Jansson, E., Lindhal, A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 2000(374): 212-34.
95. Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S.M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 2001. 344(5): 385-6.
96. Hinsenkamp, M.G., Rooze, M.A. Morphological effect of electromagnetic stimulation on the skeleton of fetal or newborn mice. *Acta Orthop Scand Suppl*, 1982. 196: 39-50.

97. Smith, R.L., Nagel, D.A. Effects of pulsing electromagnetic fields on bone growth and articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, 1983(181): 277-82.
98. Wilmot, J.J., Chiego, D.J. Jr., Carlson, D.S., Hanks, C.T., Moskwa, J.J. Autoradiographic study of the effects of pulsed electromagnetic fields on bone and cartilage growth in juvenile rats. *Arch Oral Biol*, 1993. 38(1): 67-74.
99. Guizzardi, S., Di Silvestre, M., Govoni, P., Scandroglio, R. Pulsed electromagnetic field stimulation on posterior spinal fusions: a histological study in rats. *J Spinal Disord*, 1994. 7(1): 36-40.
100. Li, J.K., Lin, J.C., Liu, H.C., Chang, W.H. Cytokine release from osteoblasts in response to different intensities of pulsed electromagnetic field stimulation. *Electromagn Biol Med*, 2007. 26(3): 153-65.
101. Norton, L.A. Effects of a pulsed electromagnetic field on a mixed chondroblastic tissue culture. *Clin Orthop Relat Res*, 1982(167): 280-90.
102. Murray, J.C., Lacy, M., Jackson, S.F. Degradative pathways in cultured synovial fibroblasts: selective effects of pulsed electromagnetic fields. *J Orthop Res*, 1988. 6(1): 24-31.
103. Elliott, J.P., Smith, R.L., Block, C.A. Time-varying magnetic fields: effects of orientation on chondrocyte proliferation. *J Orthop Res*, 1988. 6(2): 259-64.

104. Norton, L.A., Witt, D.W., Rovetti, L.A. Pulsed electromagnetic fields alter phenotypic expression in chondroblasts in tissue culture. *J Orthop Res*, 1988. 6(5): 685-9.
105. Khalil, A.M., Qassem, W. Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes *in vitro*: chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell kinetics. *Mutat Res*, 1991. 247(1): 141-6.
106. Sakai, A., Suzuki, K., Nakamura, T., Norimura, T., Tsuchiya, T. Effects of pulsing electromagnetic fields on cultured cartilage cells. *Int Orthop*, 1991. 15(4): 341-6.
107. Bodamyali, T., Bhatt, B., Hughes, F.J., Winrow, V.R., Kanczler, J.M., Simon, B., et al. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 250(2): 458-61.
108. Shankar, V.S., Simon, B.J., Bax, C.M., Pazianas, M., Moonga, B.S., Adebajo, O.A., et al. Effects of electromagnetic stimulation on the functional responsiveness of isolated rat osteoclasts. *J Cell Physiol*, 1998. 176(3): 537-44.
109. Pezzetti, F., De Mattei, M., Caruso, A., Cadossi, R., Zucchini, P., Carinci, F., et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on human chondrocytes: an *in vitro* study. *Calcif Tissue Int*, 1999. 65(5): 396-401.

110. De Mattei, M., Caruso, A., Traina, G.C., Pezzetti, F., Baroni, T., Sollazzo, V. Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells *in vitro*. *Bioelectromagnetics*, 1999. 20(3): 177-82.
111. De Mattei, M., Caruso, A., Pezzetti, F., Pellati, A., Stabellini, G., Sollazzo, V., et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on human articular chondrocyte proliferation. *Connect Tissue Res*, 2001. 42(4): 269-79.
112. Diniz, P., Soejima, K., Ito, G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide*, 2002. 7(1): 18-23.
113. Diniz, P., Shomura, K., Soejima, K., Ito, G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics*, 2002. 23(5): 398-405.
114. Lohmann, C.H., Schwartz, Z., Liu, Y., Li, Z., Simon, B.J., Sylvia, V.L., et al. Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *J Orthop Res*, 2003. 21(2): 326-34.

115. Torricelli, P., Fini, M., Giavaresi, G., Botter, R., Beruto, D., Giardino, R. Biomimetic PMMA-based bone substitutes: a comparative *in vitro* evaluation of the effects of pulsed electromagnetic field exposure. *J Biomed Mater Res A*, 2003. 64(1): 182-8.
116. Varani, K., Gessi, S., Merighi, S., Ianotta, V., Cattabriga, E., Pancaldi, C., et al. Alteration of A(3) adenosine receptors in human neutrophils and low frequency electromagnetic fields. *Biochem Pharmacol*, 2003. 66(10): 1897-906.
117. Chang, K., Chang, W.H., Wu, M.L., Shih, C. Effects of different intensities of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields on formation of osteoclast-like cells. *Bioelectromagnetics*, 2003. 24(6): 431-9.
118. Chang, K., Chang, W.H., Tsai, M.T., Shih, C. Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. *Connect Tissue Res*, 2006. 47(4): 222-8.
119. Chang, K., Hong-Shong Chang, W., Yu, Y.H., Shih, C. Pulsed electromagnetic field stimulation of bone marrow cells derived from ovariectomized rats affects osteoclast formation and local factor production. *Bioelectromagnetics*, 2004. 25(2): 134-41.

120. Tepper, O.M., Callaghan, M.J., Chang, E.I., Galiano, R.D., Bhatt, K.A., Baharestani, S., et al. Electromagnetic fields increase *in vitro* and *in vivo* angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *Faseb J*, 2004. 18(11): p. 1231-3.
121. Chang, W.H., Chen, L.T., Sun, J.S., Lin, F.H. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*, 2004. 25(6): 457-65.
122. Chang, K., Chang, W.H., Huang, S., Huang, S., Shih, C. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. *J Orthop Res*, 2005. 23(6): 1308-14.
123. De Mattei, M., Gagliano, N., Moscheni, C., Dellavia, C., Calastrini, C., Pellati, A., et al. Changes in polyamines, c-myc and c-fos gene expression in osteoblast-like cells exposed to pulsed electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 2005. 26(3): 207-14.
124. Hannay, G., Leavesley, D., Pearcy, M. Timing of pulsed electromagnetic field stimulation does not affect the promotion of bone cell development. *Bioelectromagnetics*, 2005. 26(8): 670-6.
125. Patterson, T.E., Sakai, Y., Grabiner, M.D., Ibiwoye, M., Midura, R.J., Zborowski, M., et al. Exposure of murine cells to pulsed electromagnetic fields rapidly activates the mTOR signaling pathway. *Bioelectromagnetics*, 2006. 27(7): 535-44.

-
126. Sakai, Y., Patterson, T.E., Ibiwoye, M., Midura, R.J., Zborowski, M., Grabiner, M.D., et al. Exposure of mouse preosteoblasts to pulsed electromagnetic fields reduces the amount of mature, type I collagen in the extracellular matrix. *J Orthop Res*, 2006. 24(2): 242-53.
127. Selvamurugan, N., Kwok, S., Vasilov, A., Jefcoat, S.C., Patridge, R.C. Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. *J Orthop Res*, 2007. 25(9): 1213-20.
128. Zhang, X., Zhang, J., Qu, X., Wen, J. Effects of different extremely low-frequency electromagnetic fields on osteoblasts. *Electromagn Biol Med*, 2007. 26(3): 167-77.
129. Stolfa, S., Skorvanek, M., Stolfa, P., Rosocha, J., Vasko, G., Sabo, J. Effects of static magnetic field and pulsed electromagnetic field on viability of human chondrocytes *in vitro*. *Physiol Res*, 2007. 56 Suppl 1: 45-9.
130. Tsai, M.T., Chang, W.H., Chang, K., Hou, R.J., Wu, T.W. Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. *Bioelectromagnetics*, 2007. 28(7): 519-28.
131. Schwartz, Z., Simon, B.J., Duran, M.A., Barabino, G., Chaudhri, R., Boyan, B.D. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 2008. 26(9): 1250-5.

132. Schmidt-Rohlfing, B., Silny, J., Woodruff, S., Gavenis, K. Effects of pulsed and sinusoid electromagnetic fields on human chondrocytes cultivated in a collagen matrix. *Rheumatol Int*, 2008. 28(10): 971-7.
133. Martino, C.F., Belchenko, D., Ferguson, V., Nielsen-Preiss, S., Qi, H.J. The effects of pulsed electromagnetic fields on the cellular activity of SaOS-2 cells. *Bioelectromagnetics*, 2008. 29(2): 125-32.
134. Varani, K., De Mattei, M., Vincenzi, F., Gessi, S., Merighi, S., Pellati, A., et al. Characterization of adenosine receptors in bovine chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes exposed to low frequency low energy pulsed electromagnetic fields. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(3): 292-304.
135. Gordon, M.Y., Dowding, C.R., Riley, G.P., Greaves, M.F. Characterisation of stroma-dependent blast colony-forming cells in human marrow. *J Cell Physiol*, 1987. 130(1): 150-6.
136. Ashburn, P., Cooper, M.R., McCall, C.E., DeChatelet, L.R. Nitroblue tetrazolium reduction. False positive and false negative results. *Blood*, 1973. 41(6): 921-5.
137. Barth, P.J., Westhoff, C.C. CD34+ fibrocytes: morphology, histogenesis and function. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2007. 2(3): 221-7.
138. Wagner, W., Ho, A.D. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*, 2007. 3(4): 239-48.

139. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): 315-7.
140. Shao, D.D., Suresh, R., Vakil, V., Gomer, R.H., Pilling, D. Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol*, 2008. 83(6): 1323-33.
141. Bellini, A., Mattoli, S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest*, 2007. 87(9): 858-70.

