

**PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**  
**Estudio del efecto de la magnetoterapia en la cicatrización de**  
**heridas en un modelo celular**

**Caruso, María Paula – LU 1029663**

Licenciatura en Biotecnología

**Del Grosso, Agustina María – LU 1025843**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Prada, Federico, UADE**

Co-Tutor:

**Tropeano, Francisco, UADE**

Colaborador/es:

**Pérez, Adrián, UADE**

**Junio de 2015**



**UADE**

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## CONTENIDO

<b>CONTENIDO.....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1.1. ESTRUCTURA DEL INFORME.....	7
1.2. ANTECEDENTES .....	7
1.3. MAGNETOTERAPIA .....	9
1.4. DISPOSITIVOS DE ELECTROMEDICINA.....	13
1.5. CULTIVOS CELULARES.....	16
1.5.1. HISTORIA.....	16
1.5.2. MÉTODOS DE CULTIVO.....	20
1.6. MODELO BIOLÓGICO SELECCIONADO .....	21
1.7. CICATRIZACIÓN .....	22
1.8. TÉCNICA DE SCRATCHING CELULAR.....	24
1.8.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN .....	27
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
2.3. RELEVANCIA DEL PROYECTO .....	28
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
4.1. LUGAR DE TRABAJO: CUARTO DE CULTIVOS CELULARES .....	29
4.2. LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA .....	33
4.3. LABORATORIO DE ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES .....	34
4.4. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO .....	36
4.5. PROCEDIMIENTO GENERAL .....	42
4.6. PROTOCOLOS .....	43
4.6.1. LÍNEA CELULAR UTILIZADA .....	43
4.6.2. MEDIO DE CULTIVO Y BUFFERS UTILIZADOS.....	44
4.6.3. REPIQUE DE UNA MONOCAPA .....	44
4.6.4. ESCALADO.....	44
4.6.5. MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR .....	45

4.6.6. CONTEO CELULAR EN CÁMARA DE NEUBAUER .....	46
4.7. ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR.....	46
4.8. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES .....	49
4.8.1. MEDICIÓN DE SUPERFICIE LIBRE MEDIANTE MÉTODO MANUAL .....	49
4.8.2. MEDICIÓN DE SUPERFICIE LIBRE MEDIANTE SOFTWARE JS1.....	49
4.9. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.....	53
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
5.1. ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR.....	58
5.1.1. MEDICIÓN DE SUPERFICIE LIBRE MEDIANTE SOFTWARE JS1.....	59
5.1.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES .....	59
5.1.1.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	60
5.1.2. CUANTIFICACIÓN MANUAL DEL ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR .....	62
5.1.2.1. CONSIDERACIONES GENERALES .....	62
5.1.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
5.2. PROLIFERACIÓN CELULAR.....	65
5.2.1. CONSIDERACIONES GENERALES .....	66
5.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	67
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>
I. PROTOCOLOS .....	82
I. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO.....	82
II. PREPARACIÓN DE PBS.....	82
III. REPIQUE DE UNA MONOCAPA CELULAR .....	83
IV. CONGELADO DE CÉLULAS.....	83
V. DESCONGELADO DE CÉLULAS.....	84
VI. CONTEO CELULAR EN CÁMARA DE NEUBAUER.....	85
II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO – COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS .....	86
I. ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR MEDIANTE SOFTWARE JS1 .....	86
II. ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR MEDIANTE MÉTODO MANUAL .....	91
III. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.....	95
III. TABLAS.....	100
I. TABLAS DE LAS MEDICIONES POR SOFTWARE DEL ENSAYO DE MIGRACIÓN .....	100
II. TABLAS DE LAS MEDICIONES POR MÉTODO CASERO DEL ENSAYO DE MIGRACIÓN .....	101
III. TABLAS DE LAS MEDICIONES DEL ENSAYO DE PROLIFERACIÓN .....	102

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro tutor, Federico Prada, Director de las carreras de Biotecnología y Bioinformática de la Universidad Argentina de la Empresa, por habernos guiado día tras día con amabilidad, entusiasmo y dedicación.

A nuestro co-tutor, Francisco Tropeano, por apoyar este proyecto y colaborar e instruirnos en su área de conocimiento.

A Adrián Pérez, alumno de la carrera de Bioinformática en la universidad por el desarrollo del software de procesamiento de imágenes, herramienta fundamental para el análisis de resultados del presente trabajo.

A Pablo Negri, Profesor Adjunto en la universidad e Investigador Asistente en CONICET, por colaborar en el desarrollo del software de procesamiento de imágenes.

A los técnicos de laboratorio, Fernando Mendoliccio y José Ignacio Fernández, por habernos recibido día a día en el laboratorio con paciencia, buena predisposición y cordialidad.

A Adriana Pérez, Profesora de la universidad, por su colaboración en la parte bioestadística del trabajo.

A nuestras familias, por habernos apoyado incondicionalmente en todo momento, por estar con nosotras y acompañarnos con amor y cariño.

A todos aquellos que no nombramos y que participaron directa o indirectamente e hicieron posible la elaboración de este trabajo.

## RESUMEN

La magnetoterapia es una práctica de medicina alternativa que implica el uso de campos magnéticos estáticos o alternos sobre el cuerpo humano. Se utiliza ampliamente en kinesiología, para su aplicación en heridas y lesiones de tejidos. Muchos autores afirman que reduce el tiempo de curación de una lesión. Sin embargo, los resultados de las investigaciones sobre los efectos magnéticos son ambiguos, y las justificaciones respecto al uso de magnetismo siguen siendo contradictorias.

La línea celular CHO (*chinese hamster ovary cell*) es un modelo biológico ampliamente utilizado en investigación y biotecnología debido a su versatilidad y fácil manipulación, su corto tiempo de generación y su heterogeneidad cariotípica. Esto la convierte en una línea celular apropiada para su empleo en cultivos celulares *in vitro* así como en diferentes clases de estudios. En este trabajo, se llevó a cabo el estudio del efecto de la magnetoterapia en el modelo mencionado, trabajando en las instalaciones de UADE Labs.

Partiendo de la base de las ventajas que presenta trabajar con un modelo experimental *in vitro* de cultivos celulares, y teniendo en cuenta que la terapia magnética resulta cada vez más utilizada para aplicaciones médicas, se apunta a estudiar si la misma provoca efectos en la cicatrización, lo cual implicaría un nuevo aporte a este área de investigación que presenta una controversia importante.

Partiendo de la hipótesis inicial de que la magnetoterapia acelera el proceso de cicatrización, se analizaron en este trabajo dos variables que podrían verse influenciadas por el tratamiento mencionado, la migración y la proliferación.

Las imágenes del ensayo de *scratching* celular fueron analizadas con el software JS1. El mismo fue diseñado especialmente para este trabajo y permitió cuantificar el porcentaje de ocupación y cierre de la herida generada.

La migración celular, evaluada mediante la técnica de *scratching*, no se vio afectada significativamente por la aplicación de una hora de tratamiento magnético en contacto directo. De la misma manera, la proliferación tampoco se vio incrementada bajo las mismas condiciones de tratamiento.

Las conclusiones de este proyecto son que este tratamiento magnético no genera efectos en el proceso de cicatrización de heridas, al menos en las condiciones evaluadas.

## ABSTRACT

Magnet therapy is an alternative medicine practice that involves the use of static or alternating magnetic fields on the human body. Magnetic therapy is widely used in kinesiology for application on wounds and tissue injury. Many authors state that it reduces the injury healing time. However, the research's results of the magnetic effects on the skin and tissue repair are ambiguous, and justifications regarding the use of magnetism remain contradictory.

The CHO cell line (*chinese hamster ovary cell*) is a biological model widely used in research and biotechnology due to its versatility and easy handling, together with the fact of their short generation time and their karyotypic heterogeneity, which makes it an appropriate cell line for *in vitro* use in cell culture as well as in different kinds of studies. This work was carried out to study the effect of magnetic therapy in an *in vitro*, working in the UADE Labs installations.

On the basis of the advantages of working with an *in vitro* experimental model of cell culture, and considering that magnetic therapy is being increasingly used for medical applications, it aims to study whether it causes effects in wound healing, which would involve a new contribution to this research area which presents a major controversy.

Based on the initial hypothesis that magnetic therapy accelerates the wound healing process, in this research there are analyzed two variables that could be influenced by the mentioned treatment, migration and proliferation.

Cell migration, evaluated by the technique of scratching, was not significantly affected by the application of an hour of magnetic treatment in direct contact. In the same way, proliferation was not increased under the same treatment conditions.

Cell scratching images were analyzed with JS1 software. This software was specially designed for this work and allowed to quantify the percentage of occupation and wound closure.

The conclusion of this project is that this magnetic treatment does not produce effects on the wound healing process, at least under the tested conditions.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ESTRUCTURA DEL INFORME

En el presente informe se incluyen una serie de apartados. En la *introducción*, se detallan los antecedentes, junto con la descripción de la magnetoterapia, una breve introducción a los dispositivos de electromedicina. A su vez se incluye una explicación del modelo biológico a utilizar y de la técnica con la cual se evalúa el proceso de cicatrización. A continuación se presentan los *objetivos* y la *relevancia del proyecto*. Luego se incluye una sección de *hipótesis* y seguida de esta otra de *metodología* en la que se describen los protocolos empleados y otros procedimientos experimentales. Se presentan los *resultados* obtenidos en función del análisis estadístico realizado, llevando a la elaboración de las *conclusiones* y la *discusión* final. En la sección *bibliografía* se citan los recursos literarios utilizados para el desarrollo de este proyecto final. Se incluye una sección de *anexos* conteniendo información adicional, que puede ser de interés para tener una visión más detallada del tema.

### 1.2. ANTECEDENTES

Muchas culturas ancestrales, entre las que se encuentran la china, la hindú, la árabe, la hebrea y las antiguas dinastías egipcias, utilizaban imanes por sus propiedades terapéuticas. Algunas leyendas cuentan que Cleopatra, para retrasar el proceso de envejecimiento, dormía con una piedra imán sobre la frente. En el siglo III a.C., Aristóteles escribió acerca de las propiedades curativas de los imanes naturales, que llamaba "imanes blancos".

Luego, en el siglo I d.C., Plinio el Viejo, historiador romano, habló sobre la utilización de los imanes para curar los problemas oculares. Durante ese mismo siglo, algunos geománticos chinos empezaron a documentar los efectos sutiles del campo magnético terrestre en la salud humana y la enfermedad después de utilizar brújulas de gran precisión para la exploración de las condiciones geomagnéticas (Warnke 1996).

En el siglo II, el célebre médico Galeno recomendaba el empleo de imanes para tratar el estreñimiento y diversos trastornos dolorosos, mientras que en el siglo IV, Marcel, el filósofo y médico francés, aconsejaba llevar un imán alrededor del cuello para aliviar los dolores de cabeza. En el siglo VI, Alejandro de Tralles utilizaba imanes para tratar el dolor de

---

las articulaciones. Después, durante el siglo X, el médico islámico Ibn Sina, afirmó que era capaz de tratar la depresión mediante la terapia magnética. Alrededor del año 1000, un médico persa documentó la utilización de imanes para aliviar dolencias como la gota y los espasmos musculares ([www.ohani.cl](http://www.ohani.cl)).

Un gran número de médicos y sanadores utilizaron los imanes para curar diferentes problemas médicos hasta el siglo XVI, cuando el célebre médico Paracelso no sólo abogó por los imanes para curar trastornos específicos, sino que además describió con detalle los diversos efectos curativos de las polaridades magnéticas en los seres vivos. De hecho, él fue uno de los primeros en postular que la propia Tierra era un gran imán ([www.ohani.cl](http://www.ohani.cl))

En 1777 la Real Sociedad francesa de medicina examinó los estudios sobre curación magnética realizados por el abad francés Le Noble. Sus informes sobre los efectos de los tratamientos magnéticos fueron tan favorables que concluyeron que el imán parecía destinado a desempeñar un papel tan importante en la práctica y la teoría médica como el que estaba comenzando a tener en el campo de la física experimental. Sin embargo, unos pocos años después esa misma entidad condenó la obra sobre "magnetismo animal" de Franz Anton Mesmer, quien utilizaba "pases magnéticos" en sus pacientes al tiempo que aplicaba la energía del "magnetismo humano" por contraposición a las piedras imán magnéticas. Mesmer entendía la curación magnética según una teoría astrológica según la cual el sol, la luna e incluso la tierra poseen energías magnéticas sutiles que pueden influir en el sistema nervioso humano y proporcionar energía al cuerpo. Sus teorías se asemejaban mucho a las de Paracelso, puesto que ambos afirmaban que existe un fluido magnético o una fuerza de la naturaleza invisible y sutil que se intercambia entre el cielo y la Tierra, y que dicha fuerza magnética puede curar y proporcionar energía a los seres vivos ([www.ohani.cl](http://www.ohani.cl))

Mesmer sostenía que el ser humano posee una clase de magnetismo específico, que él denominó "magnetismo animal" para distinguirlo de la limadura de hierro o "ferromagnetismo", y continuó su labor desarrollando técnicas que permitieran captar y utilizar ese tipo de energía con el objeto de curar a sus pacientes (Rinker 1997). Fue él, junto a otros científicos quienes permitieron que los desarrollos sobre el magnetismo medicinal continuaran durante el 1900.

El mayor defensor de la terapia magnética durante la segunda mitad del siglo XIX fue el doctor C., J. Thacher. Este médico explicaba que la energía de la vida provenía de la fuerza



---

magnética del sol y era conducida a través de la sangre debido a su alto contenido en hierro. En 1954, Linus Pauling recibió el Premio Nobel de Química por sus descubrimientos sobre las propiedades magnéticas de la hemoglobina, una sustancia presente en la sangre que contiene hierro ([www.ohani.cl](http://www.ohani.cl)).

Podría decirse que la magnetoterapia no empieza a desarrollarse de forma realmente eficiente hasta que a partir del siglo XIX se avanza en el estudio del electro magnetismo, cuando sujetos como Faraday, Hertz y Gauss, propician con sus investigaciones el desarrollo de esta potente y eficaz terapia. Michael Faraday, por ejemplo, demostró el comportamiento de un imán alrededor de una corriente. Fue el fundador del biomagnetismo y la magnetoquímica. Confirmó que toda la materia es magnética, es decir, la materia es atraída o repelida por un campo magnético (Bassett, et al. 1981), (Harré 1979).

La magnetoterapia tiene que esperar hasta el siglo XX para mostrarse en toda su eficacia, el advenimiento de los microprocesadores y de la investigación espacial colocarán a esta terapia física en un lugar privilegiado dentro de las múltiples posibilidades del tratamiento y la recuperación de las más diversas patologías. Si bien no fue comprendido durante su época, en el siglo XX los investigadores hallaron pruebas de que tal vez Mesmer no se encontraba tan lejos de la verdad en la relación con sus afirmaciones sobre el magnetismo animal. Tan sólo unos ochenta años después, el famoso químico francés Louis Pasteur documentó los descubrimientos que había realizado en relación con los efectos de los imanes en el proceso de fermentación. Pasteur se percató de que si colocaba un imán cerca de una cuba de fermentación llena de fruta, el proceso de fermentación era más rápido. En aquella misma época Samuel Hahnemann, el creador de la homeopatía, también experimentó con los imanes con fines terapéuticos y acabó defendiendo el uso de los imanes para tratar un gran número de trastornos de la salud ([www.ohani.cl](http://www.ohani.cl)).

Hoy en día la magnetoterapia se utiliza en patologías tales como: osteoporosis, reumatismos, tendinitis, fracturas y todo tipo de procesos inflamatorios ([www.ohani.cl](http://www.ohani.cl)).

### **1.3. MAGNETOTERAPIA**

La magnetoterapia es una práctica de medicina alternativa que implica el uso de campos magnéticos estáticos o alternos sobre el cuerpo humano. Sus efectos consisten, esencialmente, en un aumento de la permeabilidad de la membrana a los iones en las células

de los tejidos blandos (Guillen, et al. 1985).

Los principales efectos que posee el campo magnético que le permiten ser utilizados en procesos terapéuticos son efectos bioestimulantes, analgésicos, antiinflamatorios y antiedematosos. El campo magnético puede ser utilizado en el tratamiento de enfermedades (Guillot 2002) tales como:

- Alteraciones pasajeras de la circulación sanguínea cerebral después de un trauma.
- Neuritis en diferentes localizaciones, dolores fantasmas y polineuritis vegetativa.
- Ganglionitis inflamatoria de los troncos simpáticos.
- Enfermedades isquémicas ligeras y de grado medio del corazón, endoarteritis y arteriosclerosis oclusiva de los vasos de las piernas y los brazos.
- Insuficiencia venosa crónica, incluidas alteraciones tóxicas.
- Asma bronquial y neumonías prolongadas.
- Enfermedades ulcerosas del estómago y del duodeno.
- Hepatitis subaguda, incluida la viral, y pancreatitis subaguda.
- Osteocondrosis.
- Enfermedades distróficas e inflamatorias de las articulaciones, fracturas de huesos tubulares y del maxilar inferior.
- Dermatitis crónica, psoriasis y esclerodermia.
- Heridas de tejidos blandos.
- Otitis aguda, amigdalitis, odontalgia y flemones posoperatorios, entre otras.

Según el Dr. Bassett, el desarrollo de la vida está ligado a las radiaciones magnéticas, y tanto las plantas como el hombre y los animales son afectados para bien o para mal por este fenómeno, el cual en numerosas ocasiones es inevitable (C. A. Bassett 1962). Por esta razón resultaría importante conocer de qué modo influye el campo magnético sobre los seres vivos. También, cómo el hombre puede manipularlo y obtener beneficios de sus propiedades, ya sea por aplicación directa o por el desarrollo de sistemas y equipos que mejoren la calidad de la vida en general (Guillot 2002).

El efecto de la magnetoterapia en la cicatrización ha recibido apoyo fundamentalmente por los efectos observados en la curación de fracturas óseas. Sin embargo, también se utiliza en el tratamiento de lesiones de los tejidos y la piel, aunque en estos casos, carece de la misma

---

fuerza de apoyo (Mc Cluer 2008).

En los últimos años, la terapia magnética se ha utilizado para su aplicación en heridas y lesiones de tejidos. Se cree que la aplicación de un campo magnético no sólo reduce el tiempo de curación de una lesión en el tejido, sino que también actúa como un analgésico local (Eccles 2005). Sin embargo, los resultados de la investigación sobre los efectos magnéticos sobre la piel y la reparación de tejidos son ambiguos (Concannon, et al. 2008), y las justificaciones respecto al uso de magnetismo en estos casos siguen siendo contradictorios (Johnston 2000). Debido a esta ambigüedad, los investigadores continúan esforzándose para determinar si el éxito de la terapia magnética en las heridas es biológicamente inducido o un resultado del efecto placebo, ya que si bien no se han encontrado efectos secundarios nocivos, la eficacia del tratamiento sigue siendo poco clara.

Los defensores incluyen a Concannon, Henry y Yee quienes basados en su experiencia, sostienen que es un tratamiento eficaz disminuyendo el tiempo de curación en ambos, tejidos y piel de ratas (M. J. Concannon, et al. 2008). La investigación en esta área, sin embargo, carece de ensayos bien ejecutados y bien diseñados en humanos, porque, aunque se han alcanzado conclusiones que apoyan el uso del magnetismo, estas se han hecho a partir de los estudios realizados en ratas y otros animales debido al problema bioético de causar intencionalmente injurias en seres humanos.

El uso del magnetismo como una forma de tratar las heridas derivaría del hecho que los seres humanos somos seres electromagnéticos (Johnston 2000). Se ha descubierto un clúster de magnetismo cercano a la glándula pineal junto con otro descubrimiento reciente de un circuito electromagnético de la piel. Al afectar el magnetismo de estas dos áreas, se especula que el flujo sanguíneo se puede acelerar, además de los cambios en la producción de hormonas. Mediante la alteración de la producción de hormonas y aumentar el flujo sanguíneo a la zona lesionada, el tiempo de curación y la cantidad de dolor que se siente puede reducirse, además de muchos otros efectos de salud positivo (Johnston 2000). Sin embargo, el mecanismo de acción todavía no es claro, y debido a las contradicciones en los resultados experimentales existentes, y a la falta de entendimiento con respecto a los procesos biológicos alterados por este tipo de terapias, las frustraciones en este campo son muchas (Ratterman, et al. 2002).

Se han realizado varios estudios en los últimos años para investigar el papel que los

---

campos magnéticos estáticos pueden desempeñar en el área de la salud. Los estudios sin sesgo de terapia magnética son problemáticos, ya que la magnetización se puede detectar fácilmente, por ejemplo, por las fuerzas de atracción sobre objetos que contienen hierro. Debido a esto, los estudios donde ni los pacientes ni los investigadores saben quién está recibiendo tratamiento y quién un placebo es complicado de realizar (Finegold, et al. 2006), (Harlow, et al. 2004). Por ejemplo, en 2009 se publicaron los resultados de un ensayo cruzado controlado por placebo doble ciego aleatorio sobre el uso de muñequeras magnéticas para la osteoartritis. Este ensayo mostró que las muñequeras magnéticas son ineficaces en el tratamiento del dolor, la rigidez y la función física en la osteoartritis. Los autores concluyeron que los beneficios informados son muy probablemente atribuibles a los efectos placebos inespecíficos (Richmond, et al. 2009).

Por otro lado, se realizó también una amplia revisión de la literatura científica mundial y de revistas científicas relacionadas con la magnetoterapia desde una perspectiva de enfermería para conocer el estado actual de esta terapia con respecto al manejo del dolor. En esta revisión se concluyó de manera similar a lo que ocurrió con revisiones anteriores que si bien la magnetoterapia está ganando popularidad, se carece de evidencia científica que sustente la eficacia de esta terapia. Se requieren más estudios para poder entender los efectos que el magnetismo puede tener en el cuerpo y los posibles beneficios o peligros que pueden resultar de su uso (Ratterman, et al. 2002).

Uno de los interrogantes existen en relación a la terapia magnética es su utilidad en la reducción de los dolores que acompañan una lesión. Un meta-análisis que pretendía revisar los resultados de estudios anteriores en esta área de investigación, con el fin de aclarar muchas de las conclusiones contradictorias, fue realizado por Brown, Ernst y Pittler. Para ello, los investigadores reunieron todos los ejemplos de ensayos clínicos aleatorios que databan hasta marzo de 2007, de 7 bases de datos que incluyen MEDLINE, EMBASE, AMED (Allied y Complementaria Medicine Database), CINAHL, Scopus, la Cochrane Library y el National Research Register del Reino Unido. El cambio medio en el dolor como resultado de los cambios experimentales fue el principal resultado que se evaluó. Se identificaron 29 ensayos dentro de estas revistas, 9 de ellos incluyendo ensayos controlados con placebo. De estos nueve estudios, ninguno mostró un aumento significativo en la reducción del dolor como resultado de la terapia magnética. De esta manera, la revisión de la literatura, según la

evaluación de Brown, Ernst y Pittler, no halló pruebas suficientes para apoyar el uso del magnetismo como analgésico en el tratamiento de heridas (Pittler, et al. 2007). Sin embargo, debe considerarse que el número de experimentos incluidos en esta revisión se vio limitado por los resultados poco fiables de muchos experimentos respecto a la terapia magnética. Un meta-análisis de la literatura sería más exacto si se dispusiera de investigaciones más confiables en este campo.

El segundo de los interrogantes asociados con el uso del magnetismo es su efectividad en la reducción del tiempo necesario para la cicatrización de la herida. Con el objetivo de esclarecer esto se han realizado investigaciones, en su mayoría en animales, en las cuales se buscaba comparar el tiempo de cicatrización cuando se utiliza la terapia magnética y cuando no se hace uso de esta terapia. Para esto, Concannon *et al.* tomaron 33 ratas y las dividieron en 3 grupos. Uno de ellos recibió un verdadero tratamiento magnético, el segundo un tratamiento magnético “falso” y el tercero no recibió nada. Las heridas fueron infligidas en el dorso de estas ratas (lugar donde también se colocaron los imanes). Las ratas heridas del grupo que recibieron tratamiento magnético sanaron en un promedio de 15 días, mientras que los otros dos grupos curaron en un promedio de 20 días. Esta diferencia significativa entre la terapia magnética y los grupos de placebo apoya el uso de imanes en la reducción de tiempo de curación (Concannon, et al. 2008). Sin embargo, Concannon *et al.* llevaron su investigación un paso más allá y compararon estos resultados con otros disponibles en la literatura y encontraron que existen muchos estudios contradictorios. Aunque este estudio encontró que la terapia magnética es una terapia útil en el tratamiento de heridas en ratas, muchos estudios muestran resultados que se oponen a estos hallazgos.

Pese al reporte de que algunos individuos han respondido favorablemente al tratamiento, el cual consiste en someterse un corto periodo de tiempo a campos magnéticos, aún se la considera una pseudociencia, ya que ningún estudio ha comprobado su eficacia más allá del efecto placebo. En resumen no existe un apoyo suficiente para validar el uso de la terapia magnética en la cicatrización de tejidos y heridas de la piel, especialmente en seres humanos.

#### **1.4. DISPOSITIVOS DE ELECTROMEDICINA**

Algunos autores sugieren que el cuerpo humano posee, además de un sistema

circulatorio para la sangre y la linfa, otro para electricidad. La técnica de acupuntura, por ejemplo, inserta metales en determinados puntos “claves” para influenciar este flujo circulatorio de electricidad (Mae-Wan, et al. 1994).

La investigación del Dr. Robert Becker encontró que muchos tejidos del cuerpo son semiconductores y que existe una corriente eléctrica en las heridas que debe estar presente para que se pueda dar la cicatrización. (Becker, et al. 1985). El Dr. Becker también descubrió el efecto de la plata en el cuerpo humano (Becker, et al. 1985). Entre otros ejemplos, el dispositivo generador de frecuencias Zapper de la Dra. Hulda Clark utiliza frecuencias eléctricas para matar parásitos y microorganismos. Ella testeó millones de frecuencias con el objetivo de descubrir la frecuencia de resonancia real de los patógenos para luego destruirlos con la misma frecuencia (Clark 1995).

Por otra parte, el generador de frecuencias múltiple del Dr. Lakhovsky se indica para promover la salud mediante la estimulación de todas las células en el cuerpo (Lakhovsky 1988). En otros casos, existen protocolos que utilizan corrientes eléctricas para desactivar virus, bacterias, hongos, parásitos y micotoxinas del cuerpo.

Las diversas modalidades de electromedicina que han aparecido en los últimos tiempos presentan una serie de ventajas que han hecho que este tipo de dispositivos se conviertan en una opción considerada por muchos individuos. Entre ellas, podemos mencionar que estos dispositivos:

- No son invasivos.
- No buscan sustituir funciones naturales del cuerpo para curarlo.
- Son fáciles de usar, y por ello, no se requiere de ser profesional para emplearlos.
- Pueden ser utilizados por más de una persona.
- Son relativamente económicos, teniendo en cuenta su alcance y ámbito de aplicación

Las terapias de electromedicina pueden utilizar muchas partes del espectro electromagnético: la corriente eléctrica, magnetismo, luz visible, infrarrojo lejano (FIR), ultravioleta (UV), y calor en forma de longitudes de onda específicas.

Diferentes empresas ofrecen una gran variedad de dispositivos de electromedicina para diversas aplicaciones, tanto para rehabilitación como para estética. Entre ellas, podemos

mencionar:

- Alta frecuencia
- Carboxiterapia
- Desincrustador ultrasónico
- Electroporación
- Electroterapia
- Láser terapéuticos
- Iontoforesis
- Magnetoterapia
- Microdermoabrasión
- Onda corta terapéutica
- Ozonoterapia
- Presoterapia
- Radiofrecuencia
- Terapia enférmica
- Termoterapia
- Ultrasonido
- Ondas de choque
- Ultracavitación

Estas empresas promocionan sus productos en páginas web, en las cuales estos dispositivos son presentados como productos innovadores para la salud, con diseños inteligentes y combinados con soluciones inteligentes para mejorar la salud de quienes hagan uso de ellos. En la **Figura 1** se muestran algunos de los equipos ofrecidos en la web:



Figura 1. Equipos ofertados en la web. (Fuente: [www.meditea.com/es/home](http://www.meditea.com/es/home))

## 1.5. CULTIVOS CELULARES

### 1.5.1. HISTORIA

El cultivo de tejidos (cultivo de células y de órganos) comenzó a principios del siglo XX (Harrison, et al. 1907) (Carrel 1912) como un método para estudiar el comportamiento de células animales sin tener en cuenta las variaciones que podrían surgir como consecuencia del trabajo, tanto durante la homeostasis normal como bajo la tensión de un experimento.

En un principio, la técnica consistía en partir de fragmentos de tejidos disgregados, y el crecimiento se encontraba restringido a la migración radial de las células a partir de dichos fragmentos. La disgregación de las células explantadas y el subsecuente plaqueo de las mismas fueron demostrados por primera vez por Peyton Rous (Rous 1916). No fue hasta la década de 1950 que la tripsina (enzima peptidasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis), comenzó a utilizarse para el subcultivo, siguiendo los procedimientos descritos por Renato Dulbecco para obtener cultivos en monocapa (Dulbecco 1952).

George Otto Gey estableció la primer línea celular continua humana, HeLa (Gey, et al.



1952), la cual fue posteriormente clonada por Teodoro Puck (Puck, et al. 1955). El cultivo de células comenzó a utilizarse más en ese momento debido a la introducción de antibióticos, lo que facilitaban la propagación de las líneas celulares a largo plazo, pese a que muchas personas ya advertían contra su uso continuo debido al riesgo asociado de esconder contaminaciones (Parker 1961). Además, esta también fue la década en la cual se dio lugar al desarrollo de los medios definidos (Morgan, et al. 1954) (Parker, et al. 1954) (Eagle 1959) (Waymouth 1959), los cuales llevaron en última instancia al desarrollo de los medios libres de suero (Ham 1963) (Ham 1965).

Ross Granville Harrison eligió a la rana como fuente de tejido para la creación de nuevas líneas celulares, ya que tal vez consideró que era más probable que el crecimiento ocurriera con esta fuente que con los tejidos de mamíferos (Harrison et al. 1907). Posiblemente, esta elección se debió a que es un animal de sangre fría y por lo tanto no se requeriría de incubación, y también debido a que la regeneración de los tejidos es más común en este tipo de vertebrados. Pese a que su técnica inició una ola de interés en el cultivo de tejidos *in vitro*, pocos siguieron su ejemplo en la selección de especies. El estímulo de la ciencia médica llevó a un mayor interés por los animales de sangre caliente, debido a que en ellos tanto el desarrollo normal como las patologías guardan similitud con las que se encuentran en los humanos.

La accesibilidad de los diferentes tejidos, muchos de los cuales crecían bien en cultivo, convirtió al huevo de gallina embrionado la opción preferida para la generación de cultivos, pero el desarrollo de la cría de animales de experimentación, particularmente con cepas genéticamente puras de roedores, hizo que los mamíferos comenzaran a ser el material de elección. El tejido de roedores presentaba la ventaja de producir líneas celulares continuas (Earle, et al. 1943) y un considerable repertorio de tumores trasplantables. El desarrollo de la tecnología de ratones transgénicos (Beddington 1992), (Peat, et al. 1992) junto con el conocimiento de la genética de estos animales impulsó a la selección de este animal como el favorito.

Por otro lado, la demostración de que los tumores humanos también podían dar lugar a líneas celulares continuas, tales como las HeLa (Gey, et al. 1952) generó interés en los tejidos humanos, ayudado después por los estudios de Leonard Hayflick sobre el tiempo de vida finito de células en cultivo (Hayflock, et al. 1961) y los requisitos de virólogos y genetistas

moleculares para trabajar con material humano. El cultivo de células humanas se vio estimulado por el desarrollo de diferentes medios selectivos libres de suero para tipos celulares específicos. (R. I. Freshney 2010)

A pesar de que por muchos años los vertebrados inferiores y los invertebrados fueron ignorados para la generación de cultivos, recientemente, las necesidades de la agricultura y el control de plagas han fomentado estudios toxicológicos y virológicos en insectos. Sumado a esto, los desarrollos de la ingeniería genética sugieren que líneas celulares de insectos con baculovirus y otros vectores podrían ser útiles líneas celulares productoras gracias a la posibilidad de insertar largas secuencias genómicas en el ADN viral y a un reducido riesgo de propagación de virus humanos patogénicos. (R. I. Freshney 2010)

Inicialmente la producción de vacunas y la comprensión de la neoplasia fueron las necesidades que impulsaron el desarrollo del cultivo de tejidos. Estas técnicas se vieron promovidas por diversas mejoras técnicas (oferta comercial de medios de cultivo, mayor control de las contaminaciones con antibióticos y equipamiento de filtración de aire). Por otro lado, aunque la mayoría de las personas acepta la idea de que es necesaria la utilización de animales en algunos casos tales como en los ensayos preclínicos o de nuevos productos farmacológicos, existe una preocupación generalizada de que el uso extensivo de los mismos para cosmética u actividades similares no es moralmente justificable. Por lo tanto, existiría un apoyo cada vez mayor a los ensayos *in vitro*. Sin embargo, la adopción de este tipo de ensayos aún requiere de la validación apropiada y de la aceptación general (R. I. Freshney 2010).

Las principales ventajas del cultivo de tejidos son la capacidad para controlar el entorno físico-químico (pH, temperatura, presión osmótica, y la tensión de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub>) y la capacidad para controlar las condiciones fisiológicas, que tienen que mantenerse relativamente constante. Se debe tener en cuenta que el entorno fisiológico no siempre puede ser definido, por ejemplo este es el caso cuando las líneas celulares requieren de suplementos pobremente definidos, que pueden contener hormonas, u otros estimulantes e inhibidores. En la **Tabla I** se listan otras ventajas de los cultivos celulares.

**Tabla I. Ventajas de los cultivos celulares.** (Tabla adaptada de “*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*”, R. Ian Freshney. John Willer & Sons Inc., 6<sup>th</sup> Edition, 2010)

<b>Categoría</b>	<b>Ventajas</b>
<b>Ambiente fisicoquímico</b>	Control del pH, temperatura, osmolaridad, disolución de gases
<b>Condiciones fisiológicas</b>	Control de hormonas y concentración de nutrientes
<b>Microambiente</b>	Regulación de matriz, interacción célula-célula, difusión gaseosa
<b>Homogeneidad de la línea celular</b>	Disponibilidad de medios selectivos, clonado celular
<b>Caracterización</b>	Disponibilidad de técnicas (perfiles de ADN, tinciones) para caracterización de manera sencilla
<b>Preservación</b>	Almacenamiento en nitrógeno líquido
<b>Reactivos</b>	Ahorro de reactivos (volumen reducidos y bajos costos)
<b>Mecanización</b>	Posibilidad de mecanizar mediante microtitulación y robótica
<b>Escala</b>	Posibilidad de incrementar sustancialmente el número de replicas
<b>Tiempo</b>	Ensayos de tiempo reducido
<b>Uso de animals</b>	Permite reducir el uso de animales para ensayos de citotoxicidad, evaluación de productos de la industria farmacéutica y cosmética

La mayoría de las diferencias en el comportamiento entre las células en cultivo y su contraparte *in vivo* surgen de la disociación de las células de una geometría tridimensional y su propagación en un sustrato bidimensional. Como resultado del cultivo, interacciones específicas entre las células características del tejido se pierden. Además, cuando se forma una línea celular, esta posiblemente represente sólo uno o dos tipos celulares y con esto muchas de las interacciones heterotípicas célula-célula se pierden. Por otro lado, el ambiente de cultivo también carece de varios de los componentes que participan en la regulación homeostática *in vivo*, en particular de los sistemas nervioso y endócrino. Sin este control, el metabolismo de las células *in vitro* puede ser más constante que *in vivo*, pero a su vez puede no ser realmente representativo del tejido del cual fueron extraídas. Esto ha llevado a la inclusión de diferentes hormonas en los medios de cultivo. La baja tensión de oxígeno debido a la carencia de un transportador como la hemoglobina lleva a que, *in vitro*, el metabolismo energético ocurra gracias a la glucólisis, y si bien el ciclo del ácido cítrico es funcional, no

tiene un papel principal. Pese a la existencia de estas diferencias, muchas vías de señalización específicas y funciones especializadas son expresadas en las células en cultivo y, siempre y cuando los límites de estos modelos se tengan en cuenta, el cultivo de tejidos puede ser una herramienta muy valiosa.

### 1.5.2. MÉTODOS DE CULTIVO

Hay tres métodos principales de iniciar un cultivo (Schaffer 1990):

1. El **cultivo de órganos** implica que la arquitectura característica del tejido *in vivo* se mantiene, al menos en parte, en cultivo. Para esto, el tejido se cultiva en una interfase gas-líquido la cual favorece la retención de la forma tridimensional.
2. En un cultivo de **explanto primario**, un fragmento de tejido se coloca en una interfase vidrio/plástico-líquido donde, tras la adhesión, se promueve la migración en el plano de un sustrato sólido.
3. El **cultivo de células** implica que el tejido es disgregado mecánica o enzimáticamente en una suspensión de células, la cual puede ser cultivada como una monocapa adherida a un sustrato sólido o como una suspensión en el medio de cultivo. Los cultivos de células pueden derivarse tanto de explantos primarios como de células dispersas en suspensión. Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído, recibe el nombre de *cultivo primario*. Los cultivos primarios representan poblaciones heterogéneas con respecto a las diferencias en los tipos de células y los estados de diferenciación. El proceso de desdiferenciación comienza en el momento en el que las células son separadas de su tejido parental, de modo que un cultivo primario es un sistema dinámico en un estado constante de cambio. Este tipo de cultivos requiere medios de cultivos muy ricos en nutrientes, suplementados con suero y otros componentes no definidos. Por todo esto, se trata de sistemas cuya estandarización es muy complicada (Hartung, et al. 2002). Una monocapa o una suspensión celular con un índice de crecimiento significativo puede ser dispersada por tratamiento enzimático o por simple dilución y vuelta a sembrar o subcultivado en frascos nuevos. Esto constituye lo que se denomina *subcultivo* o pasaje, y los cultivos derivados son el comienzo de una *línea celular*.

La creación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica un aumento en

el número total de células durante varias generaciones (duplicaciones de población) y el predominio final de las células o los linajes celulares con una alta capacidad proliferativa, resultando en un alto grado de uniformidad en la población de células. La línea debe ser caracterizada, y las características se mantendrán durante la mayor parte de su vida finita. La derivación de *líneas celulares continuas* o establecidas implica con frecuencia un cambio genotípico o *transformación*, el cual con frecuencia se relaciona a una mayor tasa de proliferación y una mayor eficiencia de plaqueo. (R. I. Freshney 2010)

Cuando se seleccionan células de un cultivo, ya sea por clonación o por otro método, la sublínea se conoce como *cepa celular*. Se requiere entonces una caracterización detallada. Tanto las líneas como las cepas celulares pueden propagarse como una monocapa adherente o en suspensión. Cultivo en monocapa significa que las células crecen adheridas a un sustrato. El término dependencia de anclaje significa que la adhesión a un sustrato y frecuentemente cierto grado de esparcimiento o *spreading* sobre el mismo es un requisito para la proliferación celular. El cultivo en monocapa es el modo de cultivo más común para la mayoría de las células. Los cultivos en suspensión derivan de células que pueden sobrevivir y proliferar sin necesidad de anclaje, habilidad que está restringida a las células hematopoyéticas, líneas celulares transformadas y células transformadas provenientes de tumores malignos (R. I. Freshney 2010).

Debido a que pueden propagarse como monocapa o como una suspensión celular uniforme, los cultivos celulares poseen muchas ventajas en cuantificación, caracterización o para replicar el muestreo; las técnicas de cultivo celular permiten el estudio de las propias células, su metabolismo, el control del ciclo celular, la modulación de la expresión génica, el cultivo de virus, la clonación y el estudio de numerosos aspectos relacionados con el cáncer y su diagnóstico, por citar sólo algunos ejemplos, sin embargo, no retienen las interacciones célula-célula ni célula-matriz que si mantienen los cultivos de órganos (R. I. Freshney 2010).

Actualmente se encuentran disponibles una gran variedad de líneas celulares cuya utilización depende principalmente del objetivo que se persiga en la investigación. (R. I. Freshney 2010).

## 1.6. MODELO BIOLÓGICO SELECCIONADO

**En el caso de este proyecto en particular la línea seleccionada es la línea celular**

**CHO (*chinese hamster ovary cell*), por ser ampliamente utilizada en investigación, sumado a que se encontraba disponible en la universidad junto con todos los reactivos necesarios para su manipulación.**

La línea celular CHO (*chinese hamster ovary cell*) es ampliamente utilizada en biotecnología, siendo principalmente empleada en la producción de proteínas recombinantes para tratamientos terapéuticos (Omasa, et al. 2010). Fue en 1919 cuando, a modo de sustitución de los ratones en la investigación, fueron utilizados por primera vez los hamsters chinos. Las tareas del Dr. George Yerganian y otros colegas para domesticar a estos hámsteres a mediados del siglo XX trajeron consigo que, durante su cría en cautiverio, muchos individuos desarrollasen enfermedades degenerativas, debido al estrecho parentesco de los animales que se cruzaban. No obstante, la aparición de tales enfermedades degenerativas aumentó el interés en el estudio de su genética (G. Yerganian 1985). Además, en este tiempo los investigadores concluyeron que el bajo número de cromosomas de los hamsters chinos ( $2n=22$ ) los convertía en modelos ideales para el estudio en cultivos celulares (Tijo, et al. 1958). En el año 1957, el científico George T. Puck en el laboratorio del Dr. Yerganian de Boston en la Fundación de Investigación del Cáncer aisló un ovario de una hembra de hámster chino y estableció una nueva línea celular (Wurm, et al. 2011). Luego se demostró su resistencia y la posibilidad de su empleo en cultivos celulares *in vitro*. Dicho descubrimiento, junto con el hecho de su corto tiempo de generación y de su heterogeneidad cariotípica, las convirtió en una línea celular apropiada para diferentes clases de estudios.

## 1.7. CICATRIZACIÓN

Una herida se define como una alteración o daño de la estructura anatómica y la función normal (Robson, et al. 2001). Esta puede ser desde una simple interrupción en la integridad del epitelio de la piel o puede ser más profunda, que se extienda en el tejido subcutáneo con daños en otras estructuras como tendones, músculos, vasos, nervios, órganos parenquimatosos y hasta el hueso (Alonso, et al. 1996).

Las heridas pueden surgir de procesos patológicos que comienzan de manera externa o interna en el órgano implicado. Pueden ser causadas de forma accidental o intencionada o pueden ser el resultado de un proceso de enfermedad. En todos los casos, las heridas interrumpen el ambiente local dentro del tejido, lo que resulta en el sangrado, la contracción

---

de los vasos, la coagulación, la activación del complemento y otras respuestas inflamatorias (Lazurus, et al. 1994) (Bischoff, et al. 1999) (Robson 1997).

La **cicatrización** es un proceso dinámico y complejo que implica una serie de eventos coordinados que incluyen sangrado, coagulación, la iniciación de una respuesta inflamatoria aguda en la zona de la lesión inicial, la regeneración, la migración y la proliferación de las células del tejido conectivo y la parénquima, así como la síntesis de proteínas de matriz extracelular, remodelado de parénquima nueva y el tejido conectivo y la distribución de colágeno (Labler, et al. 2006) (Rivera, et al. 2007).

La cicatrización de heridas comienza en el momento de la lesión, e implica tanto a poblaciones celulares residentes en la zona como a células migratorias, matriz extracelular y la acción de mediadores solubles. Los mecanismos subyacentes al proceso descrito anteriormente implican mediadores inflamatorios y factores de crecimiento, interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que gobiernan la proliferación celular, migración y diferenciación, eventos involucrados con epitelización, fibroplasia y la angiogénesis, contracción de la herida y remodelado. Estos mecanismos se inician en el momento de la lesión física y continúan durante todo el proceso de reparación (Robson, et al. 2001) (Labler, et al. 2006) (Broughton, et al. 2006) (Jespersen 1988) (Pool 1977) (Lawrence 1998).

Se dice que una herida está completamente curada cuando el aspecto del tejido y la estructura anatómica y funcional son normales, dentro de un período de tiempo razonable. La mayoría de las heridas son generalmente el resultado de lesiones simples; sin embargo, algunas heridas no cicatrizan de manera oportuna y ordenada. Múltiples factores sistémicos y locales pueden enlentecer el curso de cicatrización de una herida al causar perturbaciones en los procesos de reparación, lo que resulta en una lesión crónica o en heridas que no cicatrizan (Robson, et al. 2001) (Strecker-McGraw, et al. 2007).

La cicatrización de heridas se lleva a cabo en todos los tejidos y órganos del cuerpo. Muchos de estos procesos de reparación son comunes a todos los tejidos. Aunque el proceso de cicatrización es un proceso continuo, se divide arbitrariamente en diferentes fases con el fin de ayudar a la comprensión de los procesos fisiológicos que tienen lugar en la herida y en los tejidos circundantes (Richardson 2004). Además, es un proceso complejo que implica interacciones coordinadas entre el sistema inmune y diversos sistemas biológicos. Se trata de una cascada de pasos y eventos regulados cuidadosamente y con precisión que se



correlacionan con la aparición de diferentes tipos celulares en la herida (Attinger, et al. 2006) (Broughton, et al. 2006) (Hunt, et al. 2000) (Glat, et al. 1997).

Dentro de una herida en un momento dado, pueden existir partes que estén en diferentes etapas de la cicatrización (Bischoff, et al. 1999) (Richardson 2004) (Komarcevic 2000) (Broughton, et al. 2006).

Los diversos procesos de reparación tisular aguda, que se activan por la lesión del tejido, pueden ser unidos en una secuencia de cuatro fases dependientes del tiempo (Vanwijck 2001) (Degreef 1998) (Attinger, et al. 2006) (Broughton, et al. 2006) (Hunt, et al. 2000):

- (i) **Coagulación y hemostasis**, comenzando inmediatamente después de la lesión;
- (ii) **Inflamación**, que comienza poco después; y consiste tanto en la respuesta inflamatoria temprana como tardía
- (iii) **Proliferación**, que abarca los principales procesos de cicatrización (**migración** de fibroblastos, síntesis de colágeno, angiogénesis, protrusión, adhesión, tracción y epitelización)
- (iv) **Remodelación**, en el que la formación de tejido cicatricial se lleva a cabo, y que puede durar hasta un año o más.

Es de importancia el estudio de la cicatrización de heridas ya que esto mismo ocupa un lugar notable en las patologías cotidianas de millones de personas. Cualquier daño generando lesión a los tejidos siempre afecta el medio ambiente local. La respuesta a una herida implica distintos procesos de la cicatrización que se desencadenan por la lesión del tejido y engloba, como se mencionó, cuatro fases continuas, incluyendo la coagulación y la hemostasis, inflamación, proliferación y remodelación. Hoy en día, existen maneras sencillas para simular una herida y poder así estudiar y analizar factores que influyan y tengan algún efecto en acelerar o no su cicatrización.

## 1.8. TÉCNICA DE SCRATCHING CELULAR

El ensayo de *scratching* celular *in vitro* es un método económico, sencillo y bien desarrollado, que permite medir la migración celular (Lampugnani 1999). Es simple, reproducible y permite medir parámetros básicos del proceso de migración, tales como la velocidad o la polaridad. El método está basado en la observación de que tras la creación de



una estría artificial, llamada "*scratch*" (rasgadura) en una monocapa celular confluyente, las células en el borde de la abertura creada se moverán hacia el espacio libre para cerrarla, hasta que nuevamente se establecerán contactos célula-célula (Cory 2011). Lo que ocurre es que, cuando una monocapa celular es interrumpida, las células que forman la misma responden a la interrupción de los contactos célula-célula y al aumento de la concentración de factores de crecimiento en el margen de la herida generada, cicatrizando la misma, mediante una combinación de procesos de migración y proliferación (Wong, et al. 1988), (Zahm, et al. 1997). Estos procesos reflejan tanto el comportamiento individual de las células como las propiedades de las mismas siendo parte de la monocapa. Para el cierre de la herida, las células se polarizan hacia la misma, inician la protrusión, migran y finalmente la cierran.

Este tipo de ensayos ha sido utilizado con múltiples tipos celulares y, dado el hecho mencionado anteriormente de que el cierre de la herida se produce siguiendo un patrón característico, no sólo es utilizado para el estudio del proceso de migración, sino también para estudiar otros procesos tales como la polarización o la remodelación de la matriz extracelular. (Lu, et al. 2004) (Huang, et al. 2003). Asimismo, este ensayo de cicatrización ha sido ampliamente adaptado y modificado para estudiar los efectos de una variedad de condiciones experimentales, entre ellas, downregulación de un gen o la exposición a reactivos químicos, en la migración y proliferación de células de mamíferos. Diferentes factores que alteren la movilidad o el crecimiento de las células pueden llevar a incrementar o reducir la velocidad del cierre de la herida (Chen 2011).

Para el caso en el cual el objetivo es estudiar la migración, una de las principales ventajas de este simple método es que el mismo imita lo que ocurre durante un proceso de migración celular *in vivo*. Otra ventaja, es que se trata de una técnica adecuada para estudiar la regulación de la migración celular en función de las interacciones célula-matriz extracelular o célula-célula. Esto último lo diferencia de otros métodos, en los cuales durante la preparación de las células en suspensión para el ensayo se interrumpen dichas interacciones. Además, el ensayo es también compatible con varias técnicas de microscopía, incluyendo aquellas que permiten visualizar células vivas, y de esa manera es posible analizar eventos de señalización intracelular que puedan darse durante el proceso de migración, por ejemplo la visualización de proteínas marcadas con GFP (*green fluorescent protein*). Por otro lado, no sólo es probablemente el método más simple para estudiar la migración celular *in vitro*, sino

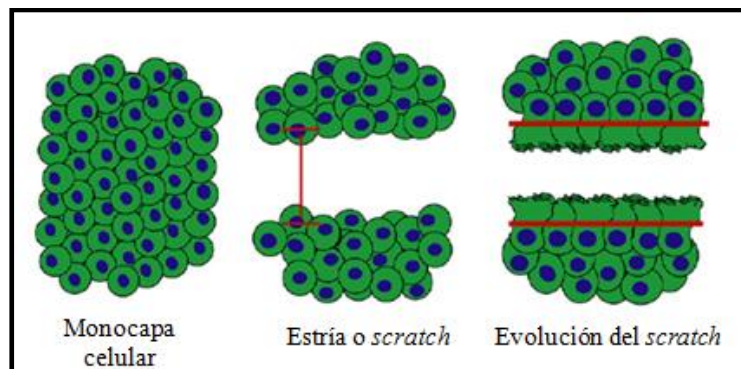
que también utiliza reactivos y otros suministros que se encuentran comúnmente en todo laboratorio de cultivos celulares.

Sin embargo, este método también presenta desventajas y limitaciones en comparación con otros de los métodos disponibles para el mismo fin. Dentro de las desventajas puede mencionarse que este ensayo, si bien es muy sencillo, lleva más tiempo. Para empezar, porque se requieren de entre 24-48 horas para dar lugar a la formación de la monocapa celular y luego entre 48-72 horas más para que se dé el cierre de la estría. Además, se requieren un número importante de células y de reactivos, y por ello, no será el método de elección si alguno de estos es faltante. Pese a estas limitaciones, este ensayo es uno de los más elegidos para estudiar procesos de migración celular en el laboratorio por las mencionadas ventajas, es sencillo, no requiere equipamiento específico y todos los materiales suelen estar disponibles sin limitación en la mayoría de los laboratorios (Lian, et al. 2007).

Además de monitorear la migración de poblaciones celulares homogéneas, el ensayo también puede ser adaptado para medir la migración de células individuales que se encuentren en el borde del scratch.

El paso básico incluye la generación de una estría (*scratch*) sobre una monocapa de células utilizando para ello un tip estéril, seguido esto de la toma de fotografías, desde el comienzo y en intervalos regulares de tiempo durante la migración celular, hasta que el *scratch* se haya cerrado (Chen 2012). Finalmente se procede a comparar las imágenes y así cuantificar la migración de las células.

En la **Figura 2** se muestra una ilustración que representa el antes y el después de la intervención de la monocapa celular generando así la estría o *scratch*:



**Figura 2. Ilustración de la intervención de una monocapa celular para la generación del scratch.** (Figura adaptada del artículo: A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. Yarrow JC, et al. BMC Biotechnology; Sep 2004, 4:21)

### **1.8.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN**

Las imágenes o los datos del ensayo de *scratching* celular *in vitro* pueden ser cuantificados de diferentes maneras. Habitualmente se utiliza una técnica tradicional, en la cual se procede a medir de manera manual la amplitud de la estría a los distintos tiempos de interés. Una forma más estandarizada de cuantificar los datos es mediante la utilización de softwares, adquiriendo las licencias correspondientes a los mismos.

En este proyecto se evaluará la generación de una herramienta informática para la cuantificación de los datos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

En el presente proyecto final se plantea como objetivo general evaluar los efectos de la magnetoterapia en la cicatrización de heridas en un modelo biológico celular.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Partiendo del objetivo general, se plantean una serie de objetivos específicos, que incluyen:

- Poner a punto el cultivo celular del modelo biológico seleccionado.
- Caracterizar el dispositivo electrónico.
- Seleccionar los parámetros electromagnéticos para aplicar sobre el cultivo elegido.
- Diseñar los protocolos de trabajo y seleccionar los controles adecuados para cada uno de los mismos.
- Desarrollar, en colaboración con Bioinformática, un software que permita el análisis de las imágenes y la cuantificación de los datos.
- Puesta en marcha de los ensayos biológicos y evaluar los resultados mediante las herramientas estadísticas adecuadas.

### **2.3. RELEVANCIA DEL PROYECTO**

El presente trabajo permitió estudiar el efecto de la magnetoterapia sobre un modelo de cicatrización de heridas en células de mamíferos. Los resultados ayudarán a comprender los fundamentos fisiológicos en los cuales se basan muchos de los tratamientos existentes que utilizan esta estrategia. Asimismo, el proyecto brindará una mirada objetiva que podría aportar valor y respaldo científico a estos dispositivos usados ampliamente en el país y en el mundo.

Los resultados de este proyecto sentaron las bases para futuros trabajos de investigación en el área de la genómica y la proteómica de la cicatrización de heridas tratadas con magnetoterapia.

### 3. HIPÓTESIS

*La magnetoterapia acelera el proceso de cicatrización en un modelo de monocapa in vitro de células CHO.*

La hipótesis que se propone comprobar en el presente trabajo es que el empleo de una terapia alternativa, tal como lo es la magnetoterapia tiene un efecto positivo en el proceso de cicatrización de heridas.

### 4. METODOLOGÍA

#### 4.1. LUGAR DE TRABAJO: CUARTO DE CULTIVOS CELULARES

En el 9° piso de los UADE Labs se encuentra el cuarto de cultivos celulares (Figura 3), un espacio destinado al trabajo con modelos biológicos celulares *in vitro*. Este laboratorio se encuentra apropiadamente equipado para facilitar el manejo y experimentación con dichos modelos.

Por cuestiones de bioseguridad este cuarto cuenta con una entrada compuesta por un *hall* o cuarto de pre-cultivo delimitado por una doble puerta diseñada para evitar la entrada de contaminaciones y el posible escape de patógenos con los que se experimenta. A su vez, este espacio es utilizado por los operadores para cambiar su vestimenta ya que dentro del cuarto de cultivos es obligatorio el uso de guardapolvo, cofia, cubrecalzado y barbijo para evitar ingresar contaminantes que pudieran posteriormente perjudicar el trabajo realizado en el lugar.



**Figura 3. Cuarto de cultivos celulares.** Disposición del equipamiento (Fotografía tomada en los UADE Labs).

El cuarto de cultivos celulares está equipado con un microscopio invertido para observación de las placas y células, una estufa con suministro de dióxido de carbono y humedad adecuada, dos cabinas de seguridad nivel II, controladores de pipetas (*pipet-aids*) y otros elementos para manipuleo de las células, tal como se detalla a continuación. La **Figura 4** muestra algunos de los materiales de trabajo presentes en el cuarto de cultivos celulares.

Equipamiento del cuarto de cultivos celulares:

- Cabinas de bioseguridad de tipo II (ESCO Class II BSC): La principal ventaja de trabajar en una cabina de seguridad, también llamada campana de flujo laminar, es que el área de trabajo se encuentra protegido de polvo y contaminación, gracias a un flujo constante y estable de aire filtrado sobre la superficie de trabajo. Existen dos tipos de cabinas, la de flujo horizontal y la de flujo vertical. En estas últimas, el aire fluye desde la parte superior de la campana hacia la superficie de trabajo, habiendo pasado previamente por un filtro que permite la retención de partículas contaminantes, y luego puede o bien recircular o no hacerlo (R. Freshney 2010) Este tipo de cabinas, proveen

protección al operador, especialmente en los casos de las de tipo II, tal como la que se encuentra en el cuarto de cultivos en este caso. Una cabina de seguridad de tipo II debe ser utilizada cuando se trabaja con modelos biológicos potencialmente peligrosos, entre ellos cultivos derivados de primates o humanos, o cultivos infectados por virus, por ejemplo. **(Figura 4A)**

- Microscopio invertido (Olympus CKX41): Es un microscopio cuya estructura está invertida en comparación al microscopio convencional. La fuente de luz está ubicada por encima de la platina y el principio de funcionamiento y formación de la imagen es el mismo que el del microscopio tradicional. El microscopio invertido permite observar organismos o tejidos en cultivo sin una preparación previa, favoreciendo el monitoreo del estado de crecimiento, comportamiento, cambios morfológicos y posibles contaminaciones microbiológicas. Este microscopio cuenta además con un tubo en el cual se puede colocar una cámara fotográfica que va a permitir registrar estas observaciones mediante la toma de fotografías. (R. Freshney 2010) **(Figura 4B)**
- Estufa (SANYO CO<sub>2</sub> incubator): Estufa acondicionada a una temperatura de 37°C y un porcentaje de humedad que permite el crecimiento y conservación de las células en cuestión. Además, presenta un suministro de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que ayuda a mantener el pH del medio de las células en crecimiento utilizándose el sistema buffer carbonato-bicarbonato. El tamaño de la misma permite el trabajo en simultáneo de distintos equipos de trabajo, pues se cuenta con espacio suficiente para mantener el orden dentro de la misma. La temperatura y otros parámetros pueden ser ajustados si es necesario (R. Freshney 2010). **(Figura 4C)**
- Baño termostático (VICKING Modelo Masson D): Es utilizado para templar ciertos reactivos o medios de cultivo, que deben ser almacenados en heladera pero al momento de su uso, requiere que se encuentren a mayores temperaturas, para no afectar la viabilidad y posterior desarrollo de las células. **(Figura 4D)**
- Centrífuga clínica de mesada: En ocasiones las suspensiones celulares requieren una centrifugación, bien sea para aumentar la concentración celular o para eliminar algún reactivo; por ejemplo, durante el proceso de descongelado la centrifugación tiene por objeto eliminar cualquier resto de DMSO que pueda permanecer y que sería tóxico para la célula. Es aquí donde este artefacto se hace necesario. La velocidad de la

centrífuga debe ser seleccionada de manera que permita la sedimentación de las células sin promover la aglutinación del pellet, lo cual implicaría que las células se dañen. (R. Freshney 2010) (**Figura 4E**)

- Controladores de pipetas (Pipet-aid model 4000-220-TC): Consiste en un sistema de manejo de líquidos con mango y una bomba externa. Permiten mejorar considerablemente la velocidad y precisión del pipeteo, el cual constituye una de las tareas más frecuentes requeridas en el trabajo con cultivos celulares. Contiene un filtro en el sitio en el cual se introduce la pipeta con el objeto de minimizar la transferencia de contaminantes, algunos de los cuales pueden ser o bien descartables o bien reutilizables tras su esterilización. (R. Freshney 2010) (**Figura 4F**)
- Heladera: La mayoría de los reactivos se almacenan en la heladera a 4°C. Esta heladera se encuentra exclusivamente en este cuarto con el objetivo de almacenar separadamente estos reactivos del resto de los mismos que se utilizan en el laboratorio.
- Freezer a -70°C: Si bien este freezer no se encuentra dentro del cuarto de cultivos, es utilizado para almacenar ciertas drogas, reactivos o productos de los cultivos, que requieren ser mantenidos a estas temperaturas. A su vez, es en este freezer donde se almacenan las células durante algunas horas previas a su introducción en el tanque de nitrógeno que se encuentra a -196 ° C.
- Lámparas UV: Las luces ultravioletas son útiles para esterilizar el aire del cuarto de cultivos, o en el caso de las que se encuentran presentes en las cabinas de seguridad, permiten la esterilización de la superficie de trabajo luego de cada uso.
- Otros equipos y herramientas: Dentro del cuarto de cultivos celulares se encuentran una serie de elementos de uso diario que permiten mayor comodidad a la hora de trabajar con células. Por un lado, se utilizan recipientes de descarte con hipoclorito de sodio (lavandina), para desechar pipetas, reactivos o restos celulares. Además, se cuenta con gradillas que son utilizadas para el sostén de tubos falcon y micropipetas con sus respectivos tips para el manipuleo de pequeños volúmenes. También se dispone de anotadores donde se registra el trabajo diario, fibras permanentes para realizar los rótulos correspondientes a las placas y reactivos, cestos de basura, una bacha destinada al lavado de herramientas de trabajo, y frascos con aplicadores de etanol 70°, utilizados para la desinfección de las mesadas de trabajo, y del espacio de



trabajo en el interior de las cabinas de bioseguridad, tanto al comienzo como al finalizar el trabajo con los cultivos celulares.

- Tanque de N<sub>2</sub>



**Figura 4. Elementos de trabajo del cuarto de cultivos.** (A) Flujo laminar. (B) Microscopio invertido. (C) Estufa. (D) Baño termostático. (E) Centrifuga. (F) Elementos complementarios al trabajo de cultivos celulares, pipeteador automático, pipetas, tips, gradillas y eppendorf. (Fotografías tomadas en los UADE Labs).

## 4.2. LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

Además del cuarto de cultivos celulares también se utilizó el laboratorio de biotecnología y microbiología del 9° piso de los UADE Labs (**Figura 5**). En él, se dispone de amplio equipamiento, mesadas de trabajo, pizarras para discutir el diseño de los experimentos

y resultados, entre otros elementos.

Nuestra principal tarea dentro del mismo fue la preparación de medios de cultivo y PBS, entre otros reactivos. Para ello, se hizo uso del autoclave, del flujo laminar, bomba hidráulica (bomba de vacío), balanzas analíticas para pesaje de reactivos, vasos de precipitados de distintas medidas, espátulas de metal, varillas de vidrio para agitación, y otros reactivos de laboratorio.



**Figura 5. Laboratorio de biotecnología y microbiología.** Se observan las mesadas de trabajo del laboratorio, donde se efectuaron las actividades anteriormente descritas. (Fotografía tomada en los UADE Labs).

### 4.3. LABORATORIO DE ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES

Además del cuarto de cultivos celulares y de las instalaciones del laboratorio de biotecnología y microbiología, también se utilizó el laboratorio del 11° piso de los UADE Labs (**Figura 6**), en donde, con la cooperación del tutor del presente proyecto, Dr. Federico Prada, y del co-tutor, Ing. Francisco Tropeano, se realizaron mediciones tendientes a

determinar ciertos parámetros del dispositivo magnético que fue utilizado para el tratamiento de los ensayos que se realizaron posteriormente.

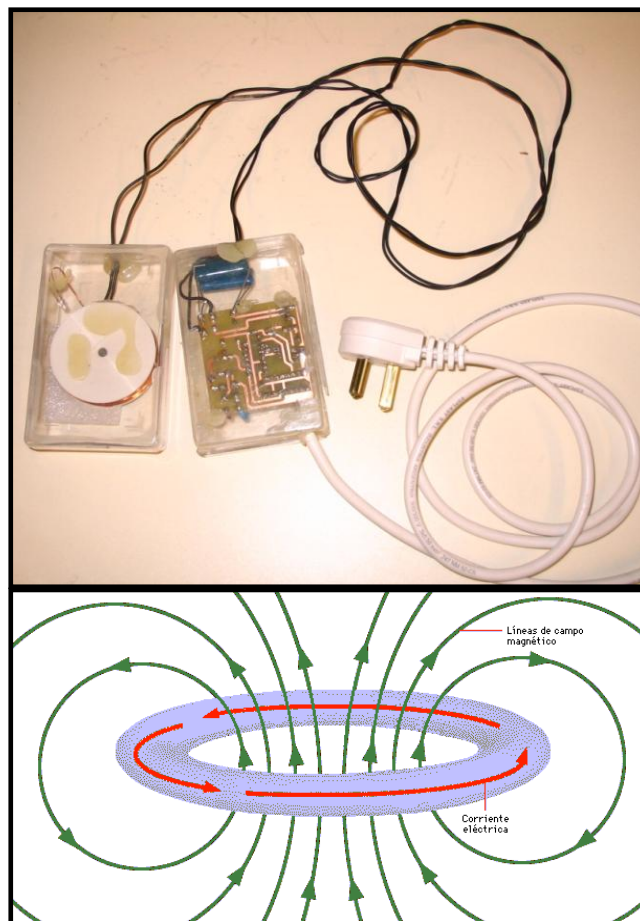


**Figura 6. Laboratorio de investigación, modelado y simulación, electrónica y telecomunicaciones.** Se observan las mesadas de trabajo del laboratorio, donde se efectuaron las actividades anteriormente descritas. (Fotografía tomada en los UADE Labs).

Entre estos parámetros se midieron la frecuencia y la intensidad del campo magnético. Como resultado, se determinó que la intensidad del campo magnético que recibirían las células sería de 10 gauss. En cuanto a la frecuencia, se determinó una frecuencia baja, de 10 Hz (Hertz).

En la **Figura 7**, se muestra el dispositivo magnético que fue utilizado y un esquema del campo magnético que el mismo genera. Como puede verse, el mismo consiste en un compartimento que contiene una bobina solenoide de características especiales, para lograr un campo magnético perpendicular a la superficie, y otro compartimento en el cual se encuentra una placa que contiene los circuitos eléctricos necesarios para el funcionamiento del dispositivo. El compartimento que contiene la bobina está perfectamente sellado con el

objetivo de evitar que el mismo se dañe en el momento en el que se aplica el tratamiento a las placas, dado que esto ocurre en el interior de la estufa en donde el porcentaje de humedad y la temperatura son altos. Por otro lado, a diferencia de otros dispositivos de esta clase donde es posible regular la intensidad del campo magnético, este equipo no permite dicha manipulación. Este equipo es un modelo comercial que se encuentra actualmente a la venta en el mercado, con la diferencia que el utilizado en este trabajo fue realizado con materiales de bajo costo sin modificar las propiedades ni características fundamentales del mismo.



**Figura 7. Arriba, dispositivo magnético utilizado.** Este equipo es una réplica de un equipo comercializado actualmente en el mercado. **Abajo, esquema del campo magnético que genera.**

#### 4.4. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO

Previo a comenzar con los ensayos, se debieron determinar diferentes variables. Estas incluyeron:

- Número inicial de células



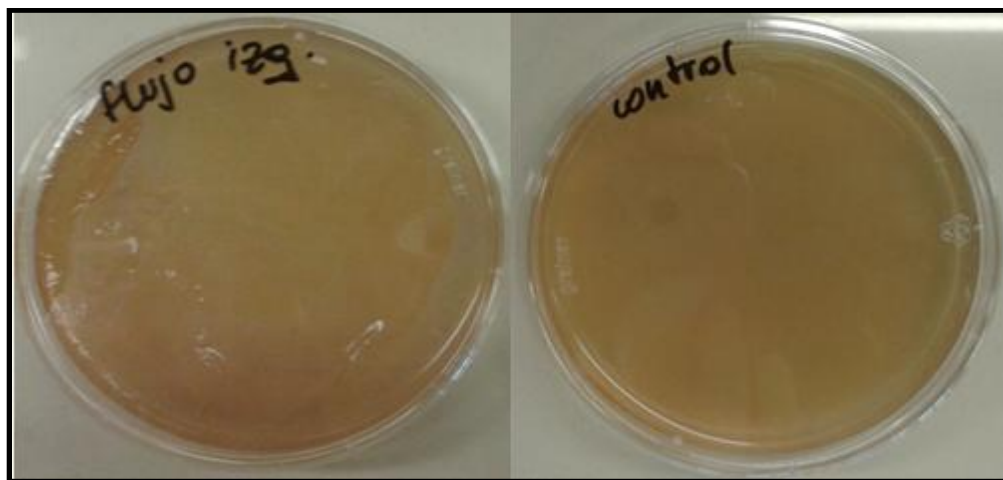
- Stock celular
- Tiempo de tratamiento
- Intensidad del tratamiento

El trabajo comenzó entonces con la **puesta a punto del cultivo celular**. La elección de la línea se basó, tal como ya se mencionó, fundamentalmente en su amplio uso en investigación, sumado a que se encontraba disponible en la universidad junto con todos los reactivos necesarios para su manipulación. Estas células crecen adheridas a un sustrato y por ello es necesario brindarles una superficie sobre la cual puedan adherirse y de esa manera reproducirse, ocupando todo el espacio disponible en la superficie provista. Se utilizaron placas especiales para cultivo celular del tipo p100 y MW6 (placas o policubetas de 6 pocillos).

Se comenzó con la **amplificación** de dicha línea. El objetivo era generar un stock para disponer de una cantidad suficiente de células con el mismo número de pasajes (de esta manera trabajar en una misma condición), con las cuales luego realizar la totalidad de los ensayos del presente trabajo de investigación. En este proceso de amplificación y congelado surgieron varios inconvenientes.

Uno de los principales problemas fueron las contaminaciones bacterianas. Las mismas perjudican e interfieren en el crecimiento celular, pudiendo llegar a producir, incluso, la muerte de la totalidad de las células de interés. Con el fin de detectar el origen de dichas contaminaciones se realizaron una serie de controles. Por un lado, se realizaron controles de los flujos laminares. El objetivo era verificar el correcto funcionamiento de los mismos y comprobar si las contaminaciones observadas eran producto de una deficiencia en el filtrado del aire. Se procedió a dejar placas con agar LB abiertas en el interior de cada uno de los flujos por 4 horas, y placas con agar LB cerradas fuera de los flujos como control, y posteriormente se las incubó por 24 horas. Tras la incubación se evaluó el crecimiento bacteriano. Se concluyó que los equipos funcionaban correctamente debido a la ausencia de crecimiento bacteriano (**Figura 8**). Por otro lado, se procedió a evaluar la posible contaminación del medio de cultivo y del suero que se estaban utilizando. En este caso, se sembró medio de cultivo completo (10% SFB) en tubos con medio LB líquido estéril y se incubó en agitación por 24 horas. La evaluación del crecimiento bacteriano se realizó en

forma visual donde la turbidez sería indicativa del mismo. Al no observarse turbidez, se concluyó la ausencia de contaminación bacteriana y con ello se confirmó la esterilidad del medio de cultivo y del suero. Una vez realizados los mencionados análisis de aire y de reactivos, se optó por comenzar a trabajar con antibiótico-antimicótico, el cual evita la proliferación bacteriana y fúngica. De esta manera se logró solucionar el inconveniente.



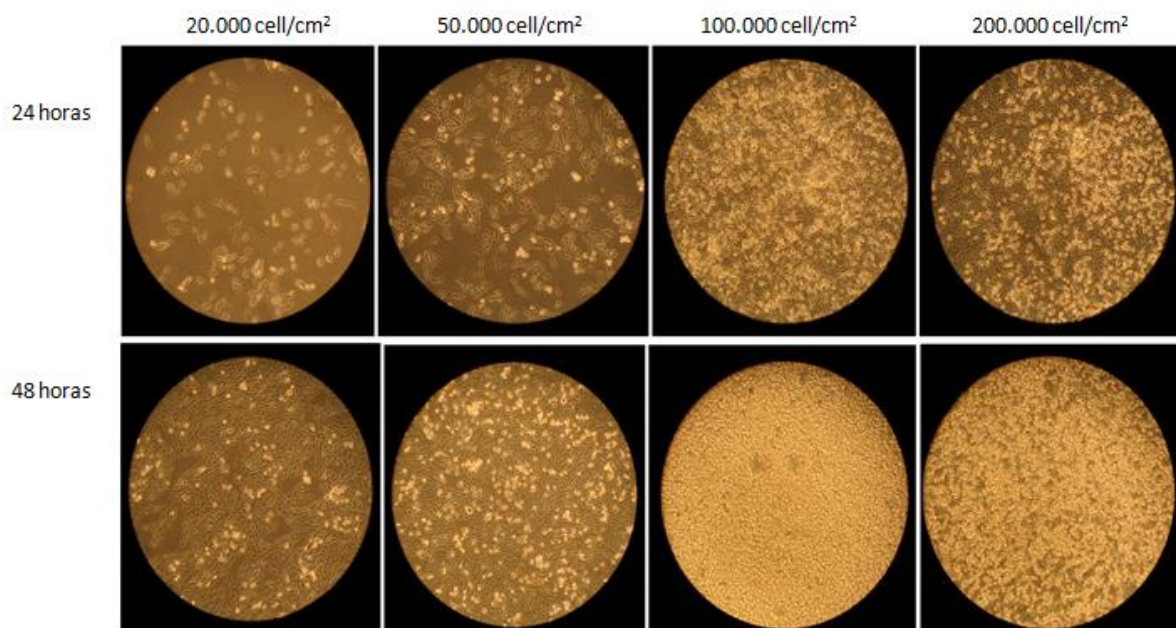
**Figura 8. Placas realizadas para el control de aire en cabinas de seguridad.** En la presente imagen, se muestra la placa de Agar-LB tras 24 horas de incubación en estufa, junto con su respectivo control. No se observa presencia de crecimiento bacteriano.

Otro inconveniente que fue necesario solucionar surgió durante el proceso de **congelado** para la generación del stock celular, dado que la viabilidad resultante era prácticamente nula. Dicho proceso es estresante para las células y por ende hay probabilidades de que un alto porcentaje de las mismas mueran durante este. En este caso, se debió repetir el procedimiento en varias ocasiones y adecuar el protocolo, por ejemplo modificando las condiciones de temperatura durante el proceso, así como aumentando el porcentaje de suero fetal bovino empleado en la solución de congelamiento. A la hora de adecuar el protocolo se buscó verificar también si el problema estaba relacionado con el paso del pasaje de las células del freezer al tanque de nitrógeno y su conservación en el mismo. Para esto, se probó con el congelado de dos viales. Durante las primeras 24 horas, tal como lo menciona el protocolo, ambos fueron mantenidos en el freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pasado este tiempo, uno de los viales fue descongelado, mientras el otro se colocó en tanque de nitrógeno. El descongelado del primero arrojó buenos resultados y un porcentaje de viabilidad aceptable. Al

día siguiente, se descongeló el segundo vial que ahora se encontraba en el tanque de nitrógeno. Al no observarse diferencias entre las células provenientes de cada vial se descartó que el problema se debiera a este paso del protocolo. Así, finalmente se alcanzó el objetivo inicial y se generó un **stock de 18 crioviales de células CHO de idéntico pasaje**.

Una vez generado el ya mencionado stock, se procedió a determinar la cantidad inicial de células a plaquear en cada pocillo, de modo de obtener a las 24 hs la confluencia ideal (80-90%) para la realización del protocolo de *scratching* celular. Para ello, se realizaron dos ensayos fundamentales.

En primer lugar, se realizó una curva de **cantidad de células** plaqueadas, en la cual se sembraron entre 20.000 y 200.000 células/cm<sup>2</sup>, y se observó la evolución de las mismas a través del tiempo. En la siguiente imagen (**Figura 9**) se muestran las fotos capturadas a las 24 y 48 horas, en las cuales se puede visualizar tanto la cinética de crecimiento como la confluencia de las células:

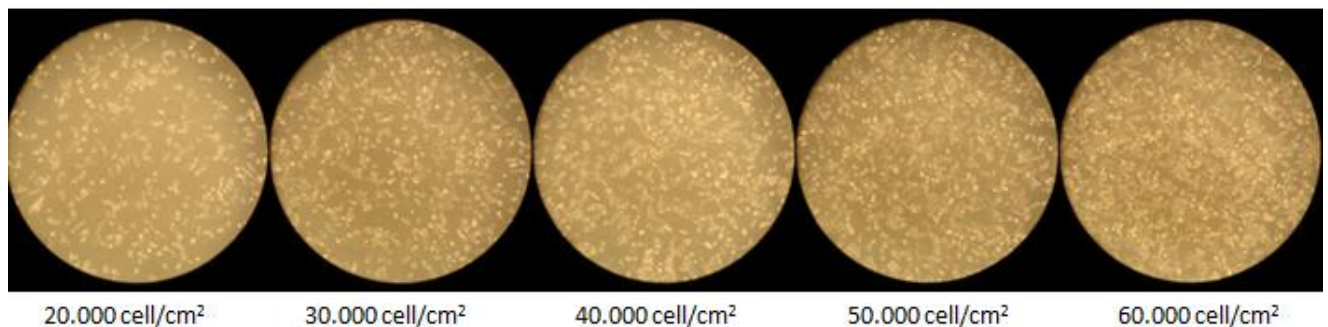


**Figura 9. Primer puesta a punto de la cantidad de células.** En la presente imagen se muestra la evolución de las células tras 24 y 48 horas del plaqueo. Cada pocillo partió de una cantidad inicial diferente de células, y se observó la confluencia alcanzada a los diferentes tiempos.

Como se puede observar en la **Figura 9**, en los pocillos en los cuales se plaquearon inicialmente 100.000 y 200.000 células/cm<sup>2</sup> existe una gran cantidad de células muertas con

forma redondeada y sin adhesión al sustrato, tanto a las 24 como a las 48 horas. Por otro lado, en el pocillo en el cual se habían sembrado 50.000 células/cm<sup>2</sup> al comienzo también a las 48 horas se observa gran mortalidad celular; sin embargo, a las 24 horas la confluencia aparentaba ser un poco menor a la apropiada y necesaria para la realización de la estría. La cantidad inicial de células óptima según el ensayo anterior estaría entre 20.000 y 50.000 células/cm<sup>2</sup> o incluso una cantidad aún mayor, y por lo tanto se optó por extender el valor a 60.000 células/cm<sup>2</sup>

Para una mejor puesta a punto y mayor precisión en la cantidad de células iniciales a sembrar se realizó luego un segundo ensayo, similar al anterior, pero en el cual se sembraron cantidad de células escalonadas entre 20.000 y 60.000 células/cm<sup>2</sup> y se observó su evolución. Debido a que la estría se realiza luego de 24hs de incubación en estufa, fue este el tiempo en el cual se evaluó la confluencia para determinar la cantidad inicial a plaquear. En la **Figura 10** se muestran las fotos del crecimiento de las mismas a las 24 horas para cada cantidad inicial de células:



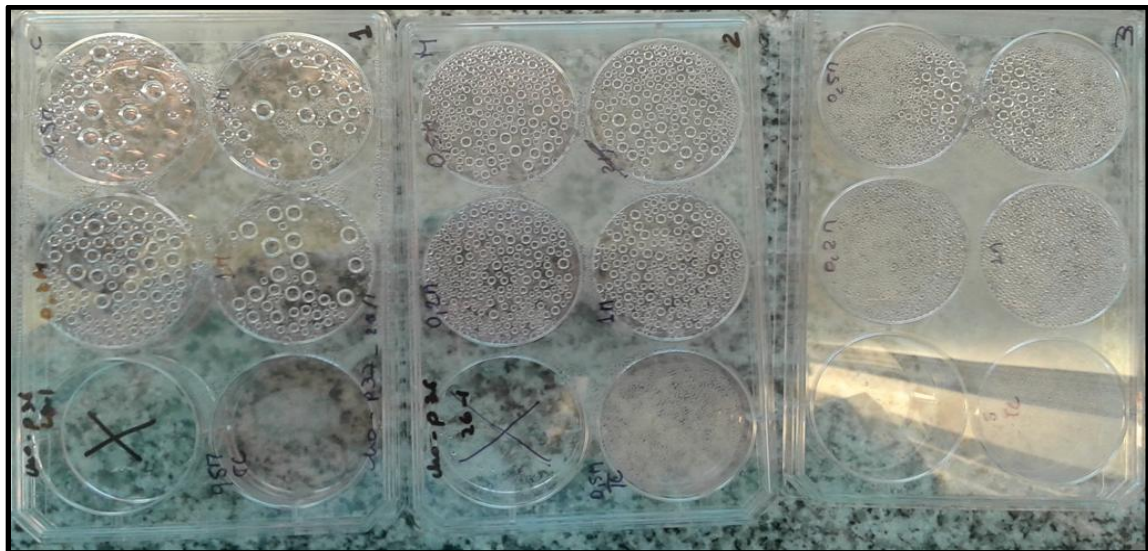
**Figura 10. Segunda puesta a punto de la cantidad de células.** En la presente imagen se muestra la evolución de las células tras 24 horas del plaqueo. Cada pocillo partió de una cantidad inicial diferente de células, y se observó la confluencia alcanzada a las 24 horas.

Debido a que para la realización del protocolo de scratching se necesita una confluencia del 80-90% y basándonos en los ensayos realizados, se decidió que **inicialmente se sembrarían 60.000 células/cm<sup>2</sup> en los pocillos de una placa MW6.**

Por otro lado, se buscó determinar el **tiempo adecuado de tratamiento** con el equipo de magnetoterapia. En primer lugar, se realizaron tratamientos de 24 horas, en los cuales el equipo se encontraba en contacto directo con la placa. Los mismos no resultaron viables ya que las células morían. Se estima que la muerte fue producto de la gran evaporación del



medio de cultivo observada, lo cual podría haber generado cambios a nivel de pH, concentración de sales y otros nutrientes. Dicha evaporación se veía como gotas de condensado en la tapa superior de las placas; posiblemente debida a la diferencia de temperatura entre la base de las mismas (mayor temperatura generada por el equipo de magnetoterapia) y la tapa (menor temperatura). Una vez descartada la posibilidad de un tratamiento como el anterior se procedió a evaluar no sólo diferentes tiempos sino también diferentes distancias al equipo. En este caso, se realizó un ensayo en el cual el tiempo de exposición fue de 24 horas, pero se sumaban dos placas cuya distancia al equipo era mayor. Este ensayo constituyó en apilar 3 placas MW 6 sembradas de la misma manera, y aplicar el tratamiento magnético colocando el equipo en contacto directo con la placa inferior. De este modo dicha placa recibía un tratamiento de mayor intensidad y la segunda y la tercera placa, estando a una mayor distancia del equipo, recibían un campo de menor intensidad. Sin embargo, pese a esta modificación, se siguió observando un alto grado de evaporación y condensación tal como se mencionó anteriormente (**Figura 11**).



**Figura 11. Puesta a punto del tratamiento.** Placas MW 6 en las cuales puede observarse el alto grado de condensación posterior a la aplicación de 24 horas de tratamiento magnético a diferentes distancias del equipo. Dichas placas fueron tratadas a la vez y a diferentes distancias al equipo se logró colocando el mismo en la parte inferior y apilando las placas.

Con este resultado, se concluyó que la distancia no reducía lo suficiente la intensidad del tratamiento, por lo cual no sería una variante viable para los fines del experimento debido a que hasta la placa más alejada presentaba un alto grado de condensación y muerte celular.

Entonces, dicha posibilidad de cambio en la distancia al equipo no fue utilizada en los ensayos. Finalmente se optó por probar un tratamiento en contacto directo y con un tiempo de exposición de 8 horas. En resumen:

- Con un tratamiento de 24 horas en contacto directo se observaba que todas las células morían.
- Con un tratamiento de 24 horas a distintas distancias se observaba que todas las células morían.
- Con un tratamiento de 8 horas en contacto directo se observaba que todas las células morían.

Basándonos en lo anterior, se decidió reducir el **tiempo de exposición a 1 hora**. Dicho tiempo de tratamiento se seleccionó basándonos en el hecho de que los **tratamientos kinesiológicos realizados actualmente en seres humanos consisten en sesiones de entre 30-60 minutos**. De esta forma se logró evitar la evaporación y condensación del medio y por ende la alta mortalidad celular.

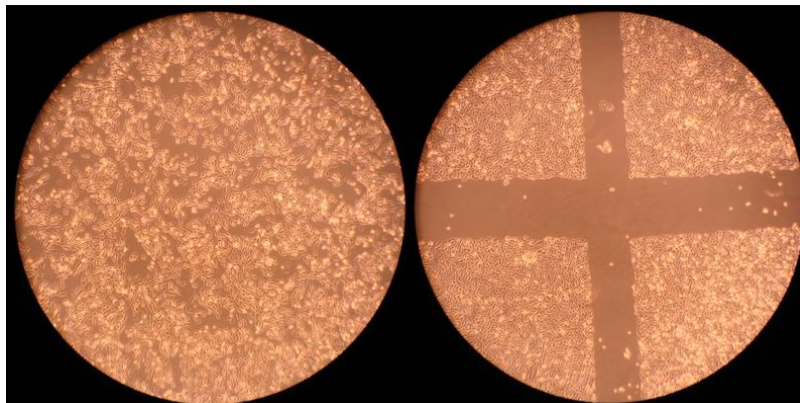
Una vez seleccionada la cantidad exacta de células a sembrar y el tiempo de exposición, se procedió al descongelado, conteo y sembrado. A las 24hs se realizó el *scratching*, según se indica en el protocolo más adelante (**ver protocolo de *scratching* celular en la sección de metodología**). Una vez realizada la estría se procede a la aplicación del tratamiento de 1 hora de magnetoterapia y el seguimiento con fotos a distintos tiempos para evaluar el avance de la misma. En este punto se observó la aparición de un gran número de células muertas que se despegaban de la placa y se observaban flotando en la superficie como resultado de una proliferación excesiva. Para solucionar esto, ya que no se podía reducir la cantidad inicial de células a sembrar por ser la cantidad que se necesitaba para obtener la confluencia adecuada para la realización del *scratch*, se decidió que luego de realizar la estría se cambiaría el medio de cultivo empleado (medio 10% SFB) por otro con un **porcentaje menor de suero fetal bovino (2%)**, (procedimiento que se realiza habitualmente en estos ensayos) para lograr reducir entonces la tasa de proliferación.

#### 4.5. PROCEDIMIENTO GENERAL

Tras la puesta a punto se comenzó con el experimento propiamente dicho. El trabajo en el laboratorio partió de un vial de células CHO congelado, que fue en principio

amplificado y posteriormente conservado en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Lo primero, con el objetivo de dar lugar a las réplicas biológicas con las cuales se llevaría a cabo el ensayo completo, y lo segundo a fin de mantener a la línea amplificada sin perturbaciones, teniendo en cuenta que a dicha temperatura se detiene el metabolismo celular. De esta manera se amplificaron y criopreservaron 18 viales. Partiendo de cada vial se llevaron a cabo cada uno de los ensayos realizados. Cada uno de estos viales fue considerado una réplica biológica.

Cada uno de los ensayos comenzó con el descongelado de un vial. Posteriormente se llevaba a cabo el conteo de las células presentes en el mismo utilizando para ello la Cámara de Neubauer, y en función de este recuento se sembraban la cantidad de células ya seleccionadas (600.000) en un pocillo de una placa MW6. Tras 24 horas, con las células ya adheridas al sustrato se procedió a la realización del scratch en forma de cruz (**Figure 12**), la aplicación del tratamiento de magnetoterapia y la posterior toma de fotos a distintos tiempos.



**Figure 12. Scratch en forma de cruz.** En la figura se muestra el antes (izquierda) y el después (derecha) de la realización de la estría sobre la monocapa celular confluyente.

Cada uno de los pasos anteriormente mencionados se realizó en base a los protocolos que se explicarán en las próximas secciones del presente informe.

## 4.6. PROTOCOLOS

### 4.6.1. LÍNEA CELULAR UTILIZADA

En el caso de este proyecto en particular la línea seleccionada es la línea celular CHO (*chinese hamster ovary cell*). Dichas células provienen de tejido epitelial de ovario de la especie *Cricetulus griseus* y se utiliza el pasaje número 45, con un nivel de bioseguridad II.

#### 4.6.2. MEDIO DE CULTIVO Y BUFFERS UTILIZADOS

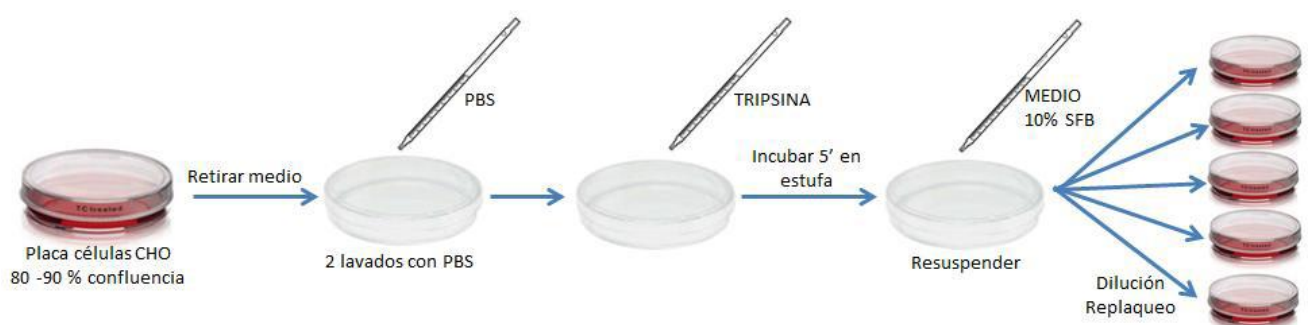
La provisión de los nutrientes se logró mediante el medio de cultivo empleado. El medio utilizado fue el DMEM/F-12 (Dulbecco and Freeman 1959) (Dulbecco's Modified Eagle Medium), el cual era adicionado a las placas conteniendo las células previo a la incubación de las mismas en condiciones propicias para su crecimiento (Estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Se prepara el medio y se esteriliza por filtración siguiendo la receta en el **anexo I**.

El buffer fosfato salino (PBS) utilizado (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma) se prepara y esteriliza mediante autoclave siguiendo la receta en el **anexo I**.

#### 4.6.3. REPIQUE DE UNA MONOCAPA

Cuando las células requieren la adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento se realiza en una única capa celular (monocapa). Esta monocapa crecerá hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie) y luego el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células pueden comenzar a degenerarse, despegarse y morir. Por ello, se hace necesario dividir, replaquear o propagar las células. El protocolo de repique de una monocapa celular se presenta en el **anexo I**.

A continuación se muestra un esquema (**Figura 13**) que resume el protocolo de repique y amplificación de una monocapa celular:



**Figura 13. Esquema protocolo de repique y amplificación de una monocapa celular.**

#### 4.6.4. ESCALADO

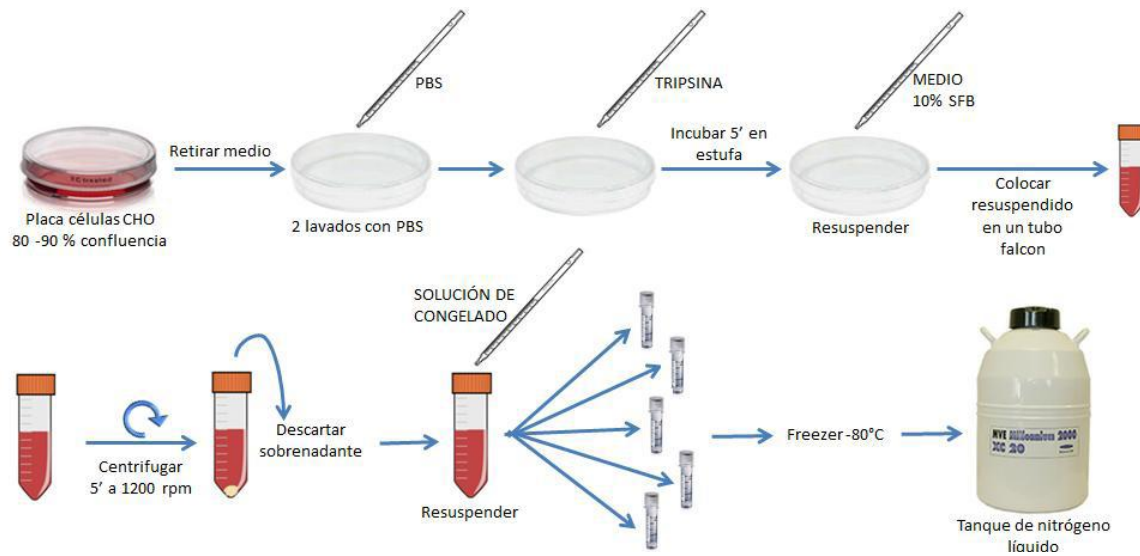
Para la amplificación y generación del stock celular inicial, se partió de una placa con un 90% de confluencia, la cual se repicó y dividió en tantas placas de cultivo como fue

necesario de acuerdo a la cantidad de viales a congelar. En este caso, para la generación del stock se dividió en 6 placas. Un día después, tras la tripsinzación, las mismas se reunieron en un único tubo falcon y posteriormente fueron congeladas. Se consideró que por cada placa con una confluencia de un 80-90% se congelarían 3 viales, obteniendo así un stock inicial de 18 viales.

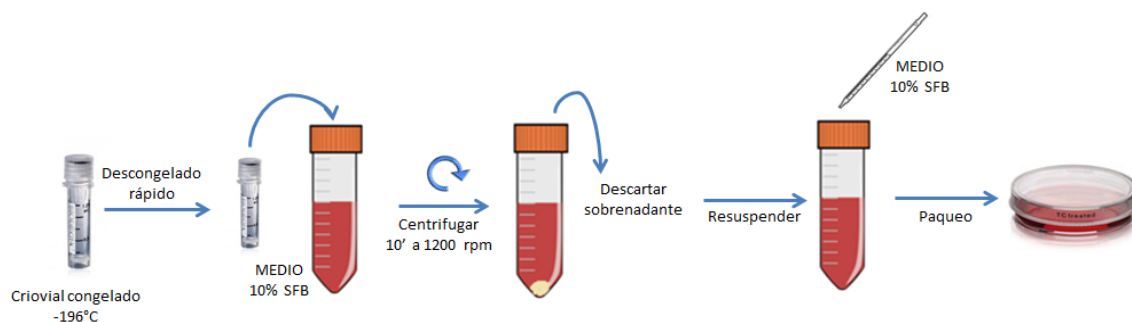
#### 4.6.5. MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR

Uno de los métodos de preservación por tiempo indefinido de células es por medio de la congelación en nitrógeno líquido. Los protocolos para el congelado y descongelado de células se presentan en el **anexo I**.

En la **Figura 14** y la **Figura 15** se muestran los esquemas que resumen los protocolos de congelado y descongelado de células:



**Figura 14. Esquema de protocolo de congelamiento celular.** A partir de este protocolo se logró obtener el stock de viales de células en un mismo pasaje que se utilizaron para realizar los ensayos.



**Figura 15. Esquema protocolo de descongelado de células.**



#### 4.6.6. CONTEO CELULAR EN CÁMARA DE NEUBAUER

La cámara de Neubauer es un instrumento utilizado para realizar el recuento de células en un medio líquido, que puede ser un cultivo celular.

Se realizan en este trabajo recuentos de células viables utilizando tripan blue.

A partir del número de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la retícula, se calcula la concentración de células en la muestra líquida aplicada, mediante el empleo de la siguiente fórmula (**Ecuación 1**):

$$\frac{n^{\circ} \text{ cells}}{\text{ml}} = \frac{n^{\circ} \text{ cells contadas por campo}}{n^{\circ} \text{ de campos}} * 10 * 1000 * \text{Factor de dilución}$$

**Ecuación 1. Cálculo para el número de células por cámara de Neubauer.**

El protocolo de conteo en cámara de Neubauer se presenta en el **anexo I**.

#### 4.7. ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR

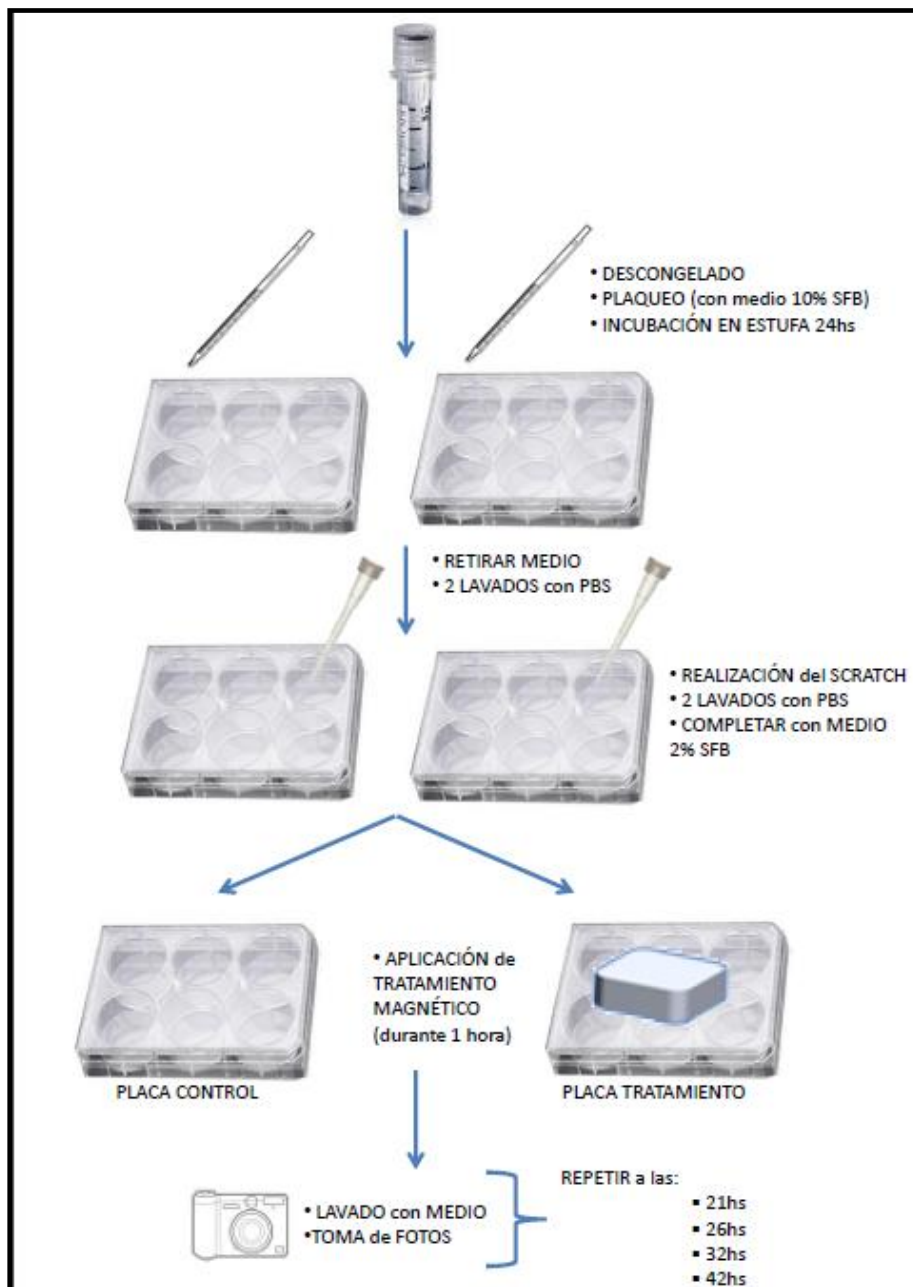
De acuerdo con la puesta a punto realizada se decidió plaquear 60.000 células/cm<sup>2</sup> en cada pocillo de una placa MW6, dado que se consideró que este era el número adecuado para lograr una confluencia del 80-90% a las 24 hs del cultivo, siendo este valor el necesario para realizar el *scratch* o estría y luego comenzar los tratamientos (magnético o control sin tratar) en el cual una de las placas sería sometida a tratamiento con el dispositivo electromagnético y la otra sería el control sin tratamiento magnético. De esta manera, tras el conteo celular se tomaba un volumen del resuspendido tal que tuviera este número de células y se lo plaqueaba. Luego se completaba el pocillo a 4 ml utilizando medio de cultivo 10% SFB. El crecimiento celular se producía mientras las placas se incubaban en una estufa a 37°C, y 5% CO<sub>2</sub>.

Cada ensayo consistía entonces en descongelar un vial, y sembrar un pocillo en cada una de dos placas MW6. Una de ellas sería luego seleccionada al azar para recibir tratamiento magnético (una única sesión de una hora), representando la “**placa magneto**” y la otra, que no recibiría tratamiento alguno, representaba la “**placa control**”.

Una vez obtenidas las placas como se explicó en el párrafo anterior, y habiendo llegado a la confluencia óptima tras 24 horas de incubación, se realizó sobre cada una de las

monocapas una estría o *scratch* en forma de cruz. Se decidió realizarlo en forma de cruz para poder identificar fácilmente una misma zona en donde luego se tomarían las fotos, pudiéndose fotografiar siempre la misma región. Por último, las fotos fueron tomadas en los tiempos 0, 21, 26, 33 y 42 horas posteriores al tratamiento magnético.

A continuación se muestra un esquema (Figura 16) que resume el protocolo de *scratching* celular:



**Figura 16. Esquema protocolo de ensayo de scratching celular.** Esquema explicando protocolo de scratching celular, aplicación de tratamientos y toma de fotos. Se descongelaron 12 tubos y se sembraron a partir de cada uno un pocillo “control” y otro “magneto” en placas separadas.

Este ensayo fue repetido con doce viales, siendo cada uno considerado una réplica biológica, fueron así doce ensayos independientes.

Las fotos del experimento completo fueron finalmente analizadas a fin de ver el efecto que el empleo de los campos magnéticos tenía en el proceso de cicatrización.

El protocolo completo del ensayo de *scratching* celular se presenta a continuación:

Metodología:

- A. Retirar el medio de cultivo de cada una de las pocillos
- B. Realizar dos lavados con 2 ml de PBS.
- C. Realizar el *scratch* empleando tips estériles, apoyado de manera perpendicular sobre las placas y moviéndolos en la dirección necesaria se trazaba una línea y luego se cruzaban sobre esta otra perpendicular, de manera de formar una cruz.
- D. Realizar dos lavados con 2ml de PBS.
- E. Agregar 2ml de medio 2% SFB.  
Se decidió utilizar en este punto medio 2% SBF para que las células recibieran el suministro necesario de suero, pero a su vez lograr reducir la tasa de proliferación y poder visualizar fundamentalmente la migración de las células. Además, con esto se buscó evitar la alta tasa de mortalidad celular producto de la proliferación excesiva.
- F. Aplicar a la “placa magneto” el tratamiento de magnetoterapia durante 1 hora en contacto directo, dentro de la estufa a 37°C y 100% humedad. La “placa control” se coloca en estufa, alejada y no recibe tratamiento.
- G. Luego de retirar el equipo de magnetoterapia, se procede a la toma de fotos a tiempo cero. Tomar fotos de uno de los brazos de la cruz y registrar a cuál de ellos se fotografió. Se deberán tomar todas las fotos siguientes al mismo brazo y manteniendo el mismo campo.
- H. Pasadas 21 horas de la realización de la estría, realizar dos lavados con 2ml de medio sin suero y temporizado a 37°C.
- I. Tomar fotos al campo elegido en el punto G. (tiempo 21 horas)
- J. A las 26 horas de la realización de la estría, realizar dos lavados con 2ml de medio sin suero y temporizado a 37°C.
- K. Tomar fotos al campo elegido en el punto G. (tiempo 26 horas)



- L. A las 32 horas de la realización de la estría, realizar dos lavados con 2ml de medio sin suero y temporizado a 37°C.
- M. Tomar fotos al campo elegido en el punto G. (tiempo 32 horas)
- N. A las 42 horas de la realización de la estría, se realizan dos lavados con 2ml de medio sin suero y temporizado a 37°C.
- O. Tomar fotos al campo elegido en el punto G. (tiempo 42 horas)

#### **4.8. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES**

##### **4.8.1. MEDICIÓN DE SUPERFICIE LIBRE MEDIANTE MÉTODO MANUAL**

Para el análisis de las imágenes en forma manual se realizó una medición de las mismas de manera tradicional o casera (mediciones a doble ciego) y se realizó posteriormente el análisis estadístico, para comparar este con los resultados obtenidos mediante el análisis realizado habiendo utilizado el software (explicado a continuación).

El proceso de análisis de imágenes consistió en dos etapas. En primer lugar, se procedió a renombrar todas las fotos, de manera que al momento de medirlas se desconocía a que ensayo, tiempo y tratamiento pertenecían las mismas. Con este procedimiento se buscó evitar incluir en la medición posibles sesgos que podrían existir si se conoce el resultado esperado. La segunda etapa consistió en medir la amplitud de la estría en cada una de las fotos, ordenadas de manera aleatoria, utilizando para ello una regla y obteniendo un resultado en centímetros. Este procedimiento fue realizado por duplicado, por distintas personas.

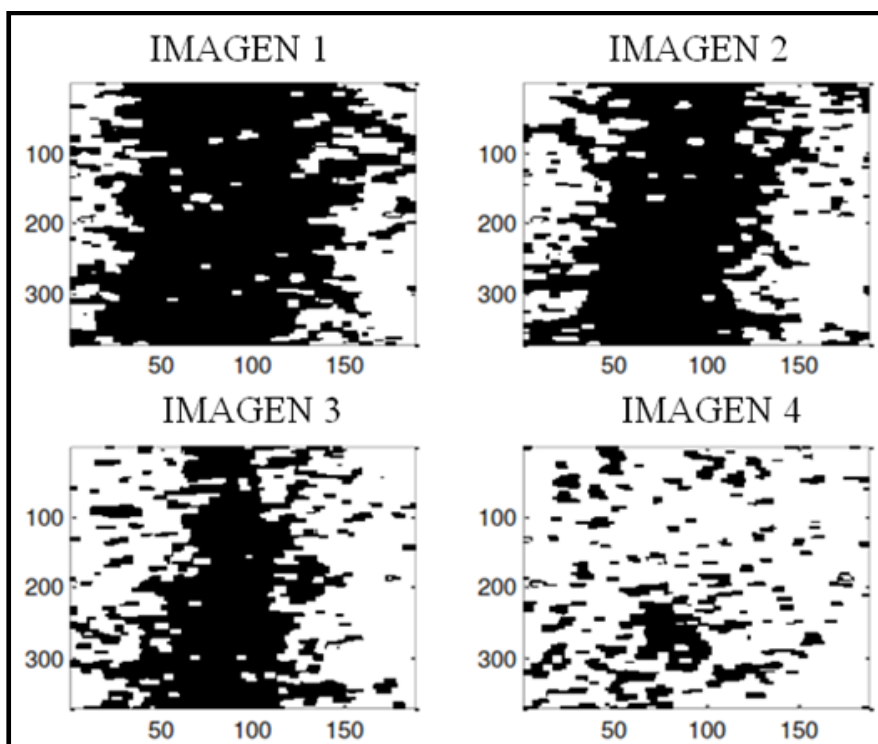
##### **4.8.2. MEDICIÓN DE SUPERFICIE LIBRE MEDIANTE SOFTWARE JS1**

El análisis de las imágenes obtenidas como resultado del ensayo de scratching celular se realizó utilizando el Software JS1.py, un software de reconocimiento de imágenes para cálculos biológicos, el cual fue especialmente creado por Adrian Pérez, estudiante de Bioinformática la Universidad Argentina de la Empresa, para el fin propuesto. En esta oportunidad el modulo JS1 calcula el espacio de una imagen, ya sea completa o de una región seleccionada por el usuario.

El mismo utiliza una técnica de binarización de la imagen, es decir, convierte dicha imagen en lenguaje binario de ceros y unos para detectar cambios en los pixeles que la

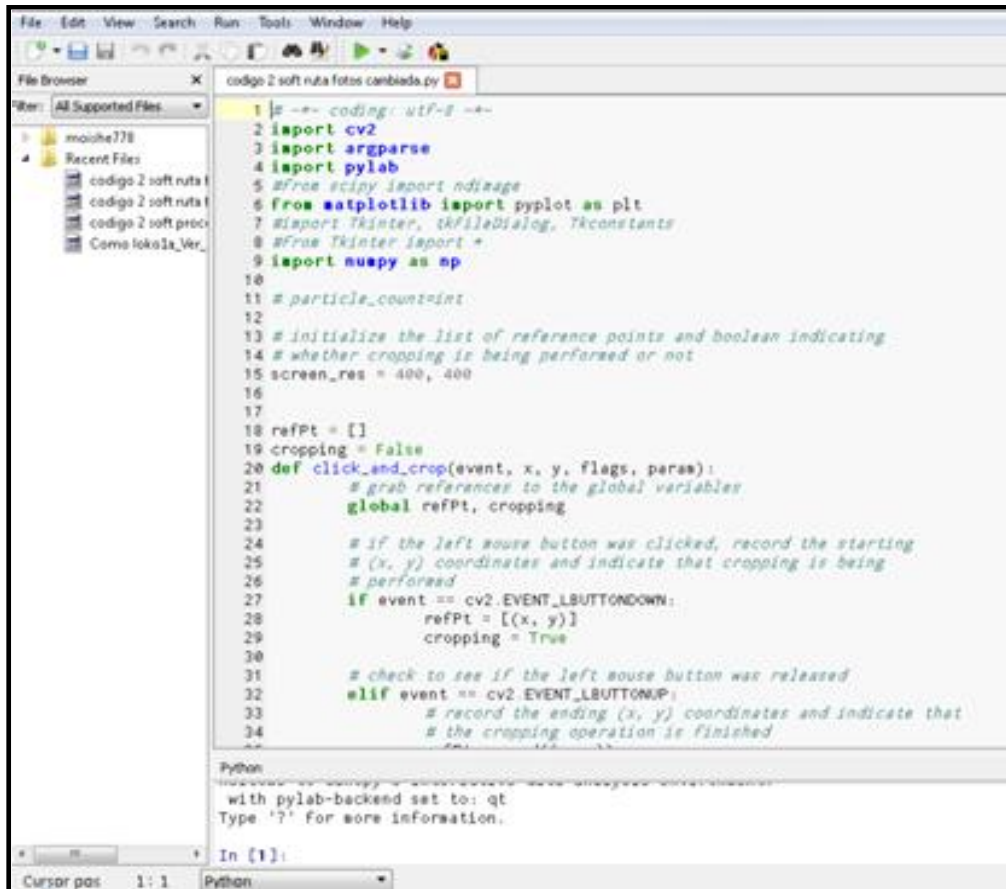
componen y de esta manera poder realizar cálculos sobre ella en forma individual o dentro de una secuencia.

En este caso el cálculo de espacio ocupado en una imagen es expresado en porcentaje. En la **Figura 17** se observa una imagen muestra. Así es como “ve” y calcula la superficie JS1, comparando y restando la imagen 1 a la imagen 2, y así sucesivamente en una secuencia. En el tema en cuestión, con JS1 es posible determinar la ocupación de un espacio y obtenerlo en forma de porcentaje.



**Figura 17. Cálculo de superficie por JS1.** El programa compara y resta imágenes. En la figura, se observa una comparación modelo.

El uso del programa implica varios pasos. En primer lugar, se debe indicar la ruta de la secuencia de imágenes que se desean analizar. En la pantalla principal en donde se realiza esto mismo se pueden observar las líneas de comando con los códigos que dirigen el software (**Figura 18**).



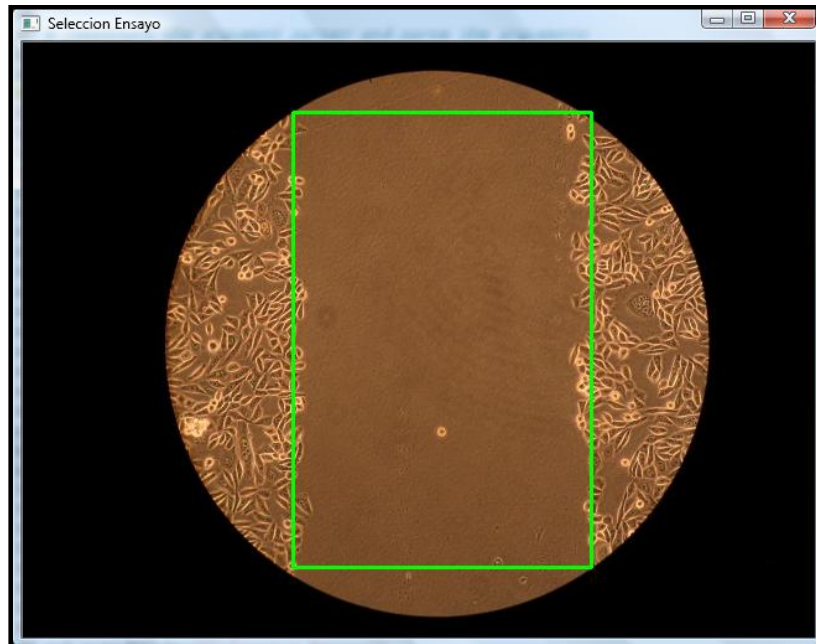
```

1 | # -*- coding: utf-8 -*-
2 | import cv2
3 | import argparse
4 | import pylab
5 | #from scipy import ndimage
6 | from matplotlib import pyplot as plt
7 | import Tkinter, tkFileDialog, Tkconstants
8 | #from Tkinter import *
9 | import numpy as np
10 |
11 | # particle_count=int
12 |
13 | # initialize the list of reference points and boolean indicating
14 | # whether cropping is being performed or not
15 | screen_res = 400, 400
16 |
17 |
18 | refPt = []
19 | cropping = False
20 | def click_and_crop(event, x, y, flags, paras):
21 |     # grab references to the global variables
22 |     global refPt, cropping
23 |
24 |     # if the left mouse button was clicked, record the starting
25 |     # (x, y) coordinates and indicate that cropping is being
26 |     # performed
27 |     if event == cv2.EVENT_LBUTTONDOWN:
28 |         refPt = [(x, y)]
29 |         cropping = True
30 |
31 |     # check to see if the left mouse button was released
32 |     elif event == cv2.EVENT_LBUTTONUP:
33 |         # record the ending (x, y) coordinates and indicate that
34 |         # the cropping operation is finished

```

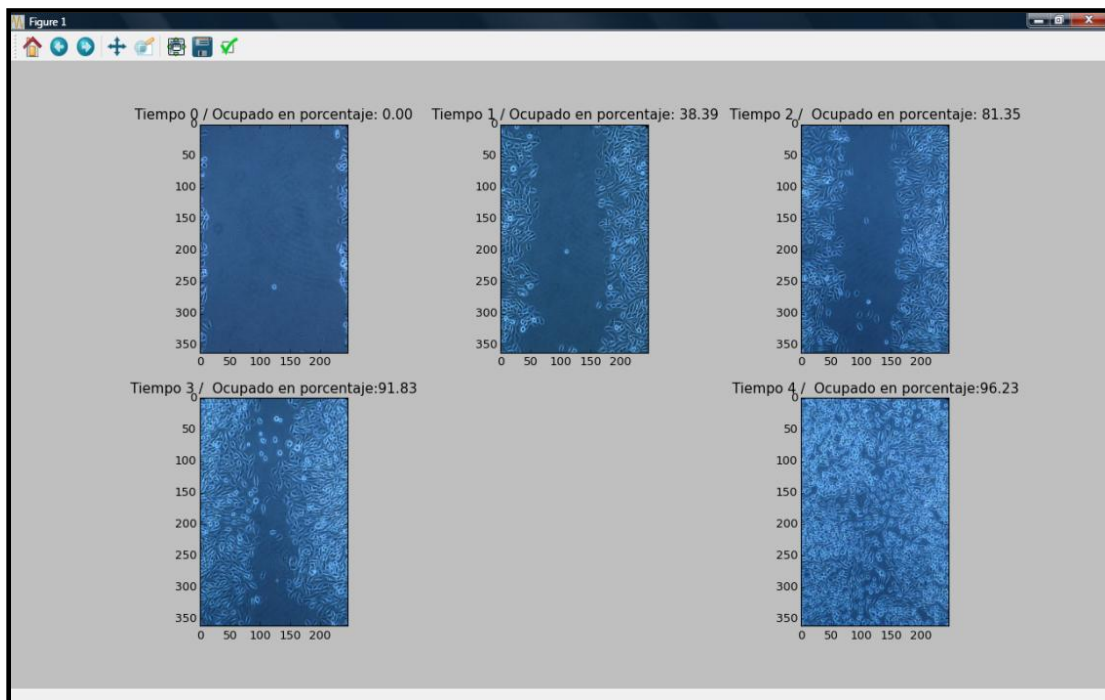
Figura 18. Pantalla principal del software de procesamiento de imágenes JS1.

En segundo lugar, una vez ingresadas las rutas de las imágenes se debe presionar el botón de *play* (▶). Como resultado, se abre una nueva pantalla, en la cual se puede observar la foto a tiempo cero. Esta pantalla tiene como principal función permitir la selección del área total de interés, en nuestro caso, la de la *estría*, cuya evolución en el tiempo se desea evaluar (Figura 19). Si la región seleccionada no es la deseada, se puede deshacer presionando la tecla “R” y volver a seleccionar. En cuanto sea correcta la selección, la misma se confirma presionando la tecla “C”. Una vez realizado esto, el programa se ocupa de comparar la región elegida entre todas las fotos de la secuencia.



**Figura 19. Pantalla de selección de la región a analizar.** La zona seleccionada se visualiza comprendida dentro de un recuadro verde.

Finalmente, nos arroja la pantalla con los resultados obtenidos. Por un lado, se pueden observar las regiones que fueron comparadas y por otro lado, se obtiene un resultado numérico, correspondiente al porcentaje de ocupación a los distintos tiempos (**Figura 20**).



**Figura 20. Pantalla de resultados arrojada por el software de procesamiento de imágenes.**

---

#### 4.9. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Si bien el objetivo principal de este proyecto era evaluar el efecto de la magnetoterapia en la cicatrización de heridas mediante el estudio de la migración de células en cultivo, se decidió incorporar además un ensayo de proliferación para determinar si, en las mismas condiciones que en el ensayo de migración, el tratamiento tenía algún efecto sobre este proceso, el cual también está implicada la cicatrización de una herida.

En este caso la proliferación celular se midió mediante el ensayo de viabilidad por MTS. Este, es un ensayo de punto final que se basa en la reducción metabólica del compuesto [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) a un compuesto coloreado de color marrón (formazán) que es soluble en el medio de cultivo. Esta reducción probablemente es realizada por NADPH o NADH producido por enzimas deshidrogenasas mitocondriales metabólicamente activas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. Partiendo del supuesto que todas las células poseen el mismo número de mitocondrias, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

En este caso, para el ensayo se empleó un kit comercial que permite determinar el número de células viables en ensayos de proliferación (Cell Titer 96TM AQueous One Solution Cell Proliferation Assayisopropanol, de Promega). Consta de un compuesto tetrazolio (MTS) y un reactivo que acopla electrones (PMS, metilsulfato de fenazina).

Tal como se mencionó en el párrafo anterior, el MTS es biorreducido por enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas a formazán soluble en medio de cultivo. La cantidad producida de este producto se mide en un espectrofotómetro a 490 nm y la absorbancia se considera proporcional al número de células vivas. Para determinar a qué número de células se corresponde cada absorbancia, se plaqueó 4 horas antes del ensayo una curva con un número conocido de células que luego fueron sometidas al mismo tratamiento con MTS durante dos horas y finalmente su absorbancia medida en un espectrofotómetro a 490 nm.

Este ensayo se llevó a cabo partiendo de 3 crioviales, representando cada uno de ellos una réplica biológica, y a su vez cada ensayo independiente (1 criovial) se realizó por sextuplicado técnico (6 pocillos de la MW96 por vial).

Tal como se detalla en el protocolo a continuación se sembraron 8 placas, de las cuales

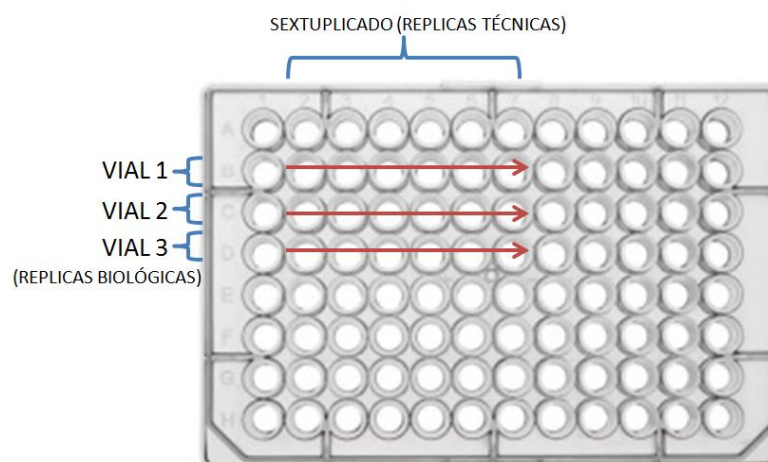
4 representaron finalmente las “**placas control**” y las 4 restantes las “**placas magneto**”. El objetivo de hacer estas placas por separado era poder llevar a cabo el ensayo de viabilidad por MTS a diferentes tiempos. Un primer tiempo fue tras la aplicación inmediata del equipo de magnetoterapia (tiempo 0 horas), y luego tras 26, 33 y 45 horas de dicha aplicación. Los mismos fueron seleccionados para poder evaluar la proliferación a los mismos tiempos en los que se tomaron las fotografías en el ensayo de *scratching* celular.

A continuación se presenta el protocolo que se utilizó para el ensayo de viabilidad por MTS:

Metodología:

Día 1:

- A. Descongelar tres viales de células CHO.
- B. Contar en cámara de Neubauer.
- C. Sembrar 2500 células por pocillo de una placa MW96 y completar a 100µL con medio completo (medio de cultivo 10% SFB). Se sembraron 8 placas MW96, 4 de ellas serían seleccionadas al azar para ser sometidas al tratamiento con el equipo de magnetoterapia, mientras que las 4 restantes no recibirían dicho tratamiento representando así los controles. El esquema de sembrado de cada placa se presenta en la **Figura 21**.
- D. Incubar en estufa a 37°C, y atmósfera saturada de vapor y 5% CO<sub>2</sub> por 24 hs.

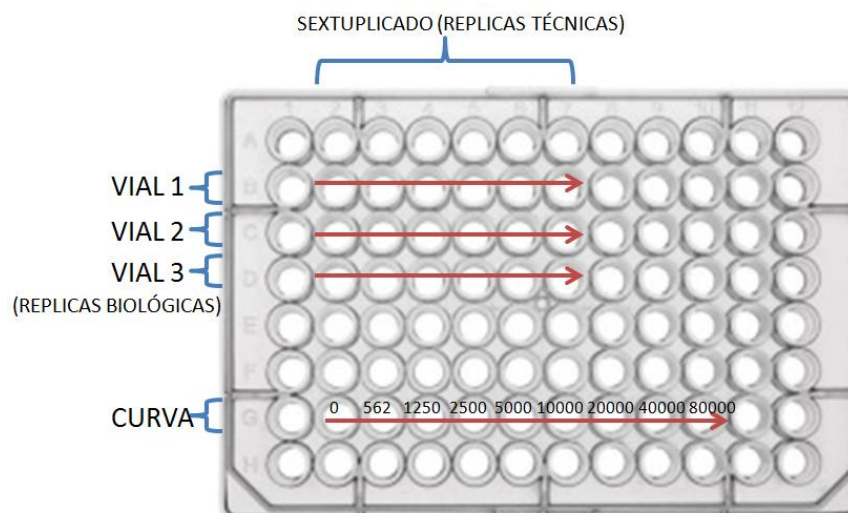


**Figura 21. Esquema de plaqueo de réplicas.**



Día 2:

- A. Retirar el medio de cultivo de las placas MW96 y cambiar por medio 2% SFB.
- B. Realizar el tratamiento con el equipo de magnetoterapia durante 1 hora sobre 4 de ellas. En este caso se contaba con un solo equipo y los tratamientos se realizaron de manera secuencial.
- C. Sobre una de las placas que no recibieron tratamiento magnético se siembra la curva de calibrado 4 horas antes de comenzar con el ensayo de MTS. El objetivo de la curva es luego poder calcular el número de células viables en cada pocillo. Para esta, se realizaron diluciones seriadas desde 80.000 células a 0 células<sup>1</sup>. Es esquema de sembrado se muestra en la **Figura 22**.



**Figura 22. Esquema de plaqueo de replicas y curva celular.**

- D. Descongelar la solución 5X de MTS (Cell Titer 96TM AQueous One Solution Cell Proliferation Assayisopropanol, de Promega) que se encuentra en freezer a -20°C y al reparo de la luz.
- E. Preparar una solución 1X de MTS en PBS. Se utilizan 100µL de solución 1X por cada pocillo de una placa MW96.
- F. Tomar dos placas MW96, una control y otra magneto y retirar el medio de cultivo de

<sup>1</sup> No se incorporó en la curva un pocillo con 231 células debido al pequeñísimo volumen que se debía tomar, y considerando que no se esperaba obtener valores tan bajos como resultado del ensayo. Por eso, en la curva luego del sembrado del volumen correspondiente a 562 células, el siguiente pocillo representa 0 células.

las MW96 con una pipeta multicanal.

- G. Dispensar 100µL de solución 1X por cada pocillo sembrado de una placa multiwell 96, utilizando para ello una pipeta multicanal.
- H. Incubar las placas MW96 en estufa a 37°C, y atmósfera saturada de vapor y 5% CO<sub>2</sub>, reparadas de la luz durante 2 hs.
- I. Medir absorbancia a 490 nm en el lector de ELISA.
- J. Repetir puntos A – I en tiempos 26, 33 y 45 horas tras la aplicación del tratamiento magnético (y el respectivo control sin tratar).

En la **Figura 23** se muestra un esquema representativo del ensayo de viabilidad por MTS:



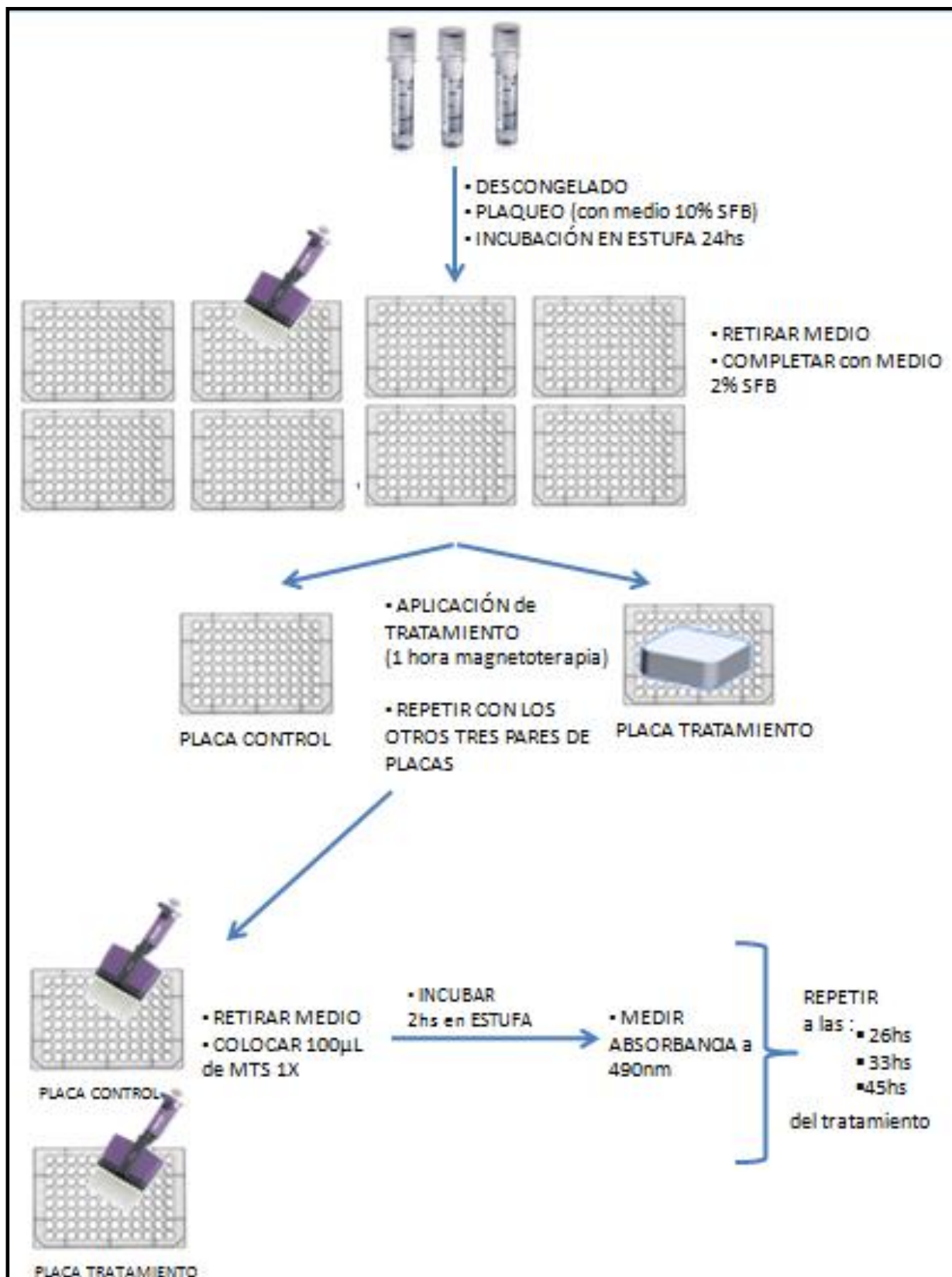
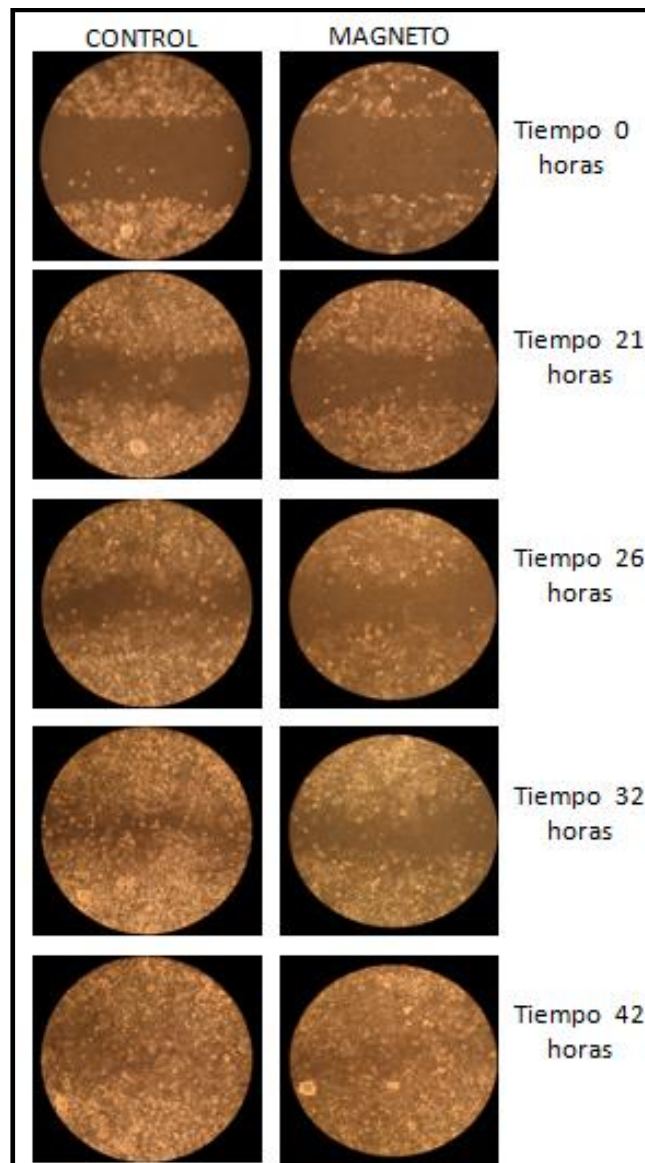


Figura 23. Esquema del ensayo de viabilidad por MTS.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR

A continuación se presenta una serie de imágenes representativas del ensayo de migración realizado (**Figura 24**). En las mismas se puede observar cómo va progresando el cierre de la herida o estría generada a través del paso del tiempo. El posterior análisis de estas imágenes se llevó a cabo mediante dos metodologías diferentes, una forma manual y otra mediante la utilización del software JS1.



**Figura 24. Fotografías representativas de un ensayo modelo de *scratching* celular.** Se observan las imágenes tomadas a los distintos tiempos posteriores al tratamiento. En la columna izquierda corresponde a aquellas que no recibieron tratamiento (control) y en la derecha tratadas con magnetoterapia (magneto).

### **5.1.1. MEDICIÓN DE SUPERFICIE LIBRE MEDIANTE SOFTWARE JS1**

El análisis de las imágenes obtenidas como resultado del ensayo de scratching celular se realizó utilizando el Software JS1.py, un software de reconocimiento de imágenes para cálculos biológicos, el cual fue especialmente creado por Adrian Pérez, estudiante de Bioinformática la Universidad Argentina de la Empresa, para el fin propuesto. El modulo JS1 fue diseñado para que calcule el espacio de una imagen, ya sea completa o de una región seleccionada por el usuario.

#### **5.1.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES**

En primer lugar, fue necesario identificar las variables. La unidad experimental en este caso es cada placa MW 6, donde de cada pocillo se obtiene un dato independiente. La variable respuesta es el porcentaje de ocupación, que permite evaluar la migración celular, objetivo principal de este ensayo. Esta es una variable cuantitativa continua. Los datos fueron normalizados al tiempo 0 para evitar tener en cuenta sesgos, debido a que por cuestiones técnicas no todas las estrías tenían la misma amplitud inicial. De esta manera, en lugar de trabajar con una medida de área se trabajó con porcentaje, considerando que a tiempo 0 el porcentaje de ocupación era del 0% en todos los casos, independientemente de la amplitud de la estría. La variable independiente es el tratamiento asignado, que responde a la aplicación, o no, del tratamiento de 1 hora de magnetoterapia.

El modelo estadístico utilizado para el análisis de los porcentajes de ocupación obtenidos fue la prueba T para muestras dependientes o pareadas. Las muestras se consideran de esta forma porque para cada ensayo independiente (el cual implica que una placa sea sometida a tratamiento magnético y la otra no) las células provienen de un mismo vial. Así, se cuenta con 10 pares de datos<sup>2</sup>. El azar intervino al momento de asignar los tratamientos a los individuos dentro de cada bloque. Esta prueba se asegura que las variables confusoras se distribuyen por igual en ambos grupos, ofreciendo una gran ventaja cuando los individuos son heterogéneos. Es más eficiente y ofrece mayor precisión.

En primera instancia se procedió a realizar la estadística descriptiva de los datos; tras

<sup>2</sup> Los datos de los ensayos 7 y 11 no fueron tenidos en cuenta para el análisis estadístico debido a que en el primer caso existió un error en el procesamiento de imágenes, arrojando el software datos erróneos debido a falta de contraste en una de las imágenes y en el segundo caso por un error en la realización del ensayo, obteniéndose datos erróneos.

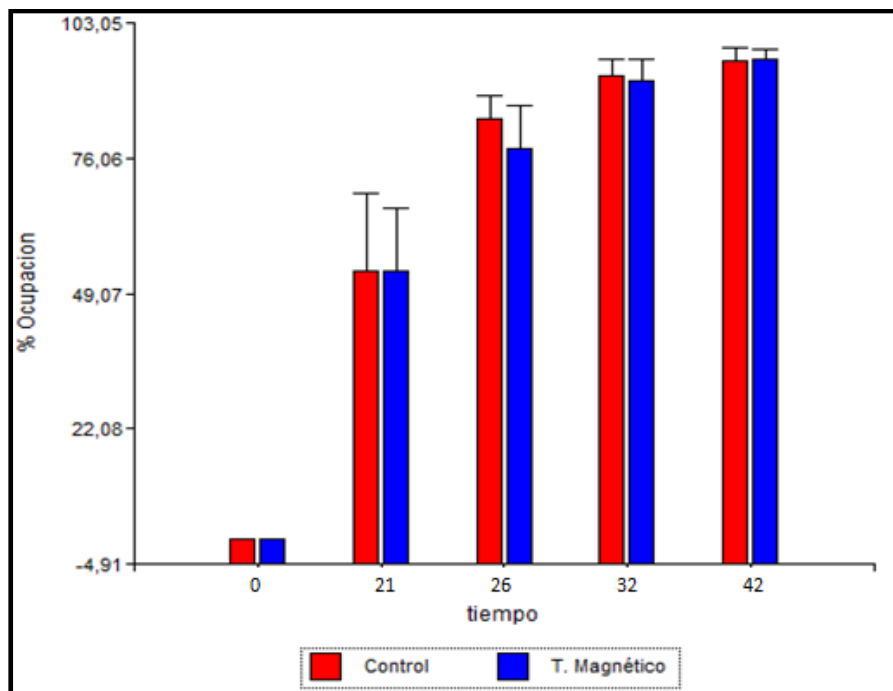
la misma, se comprobó que los supuestos de la prueba estadística a realizar se cumplieran (**ver anexo II**). Para la prueba T para muestras dependientes o pareadas se deben cumplir los siguientes supuestos: las muestras deben ser aleatorias, las observaciones independientes, la escala de la variable debe ser al menos de intervalo y las variables deben distribuirse normalmente. Se consideraron significativas aquellas pruebas con  $p\text{-valor} < 0,05$ .

En todos los ensayos, el análisis estadístico fue realizado utilizando el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

### 5.1.1.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En función de las mediciones realizadas con el Software JS1, se procedió al análisis estadístico de los datos.

En primer lugar se realizó una representación gráfica de los resultados mediante gráficos de barra correspondientes a cada tiempo (**Figura 25**):



**Figura 25. Representación gráfica de los resultados.** Gráfico de barras del porcentaje de ocupación en los tiempos 0, 21, 26, 32 y 42 horas. Permiten comparar el comportamiento de la variable tanto entre el caso en control y el tratamiento magnético. Se trabajó con 10 réplicas biológicas ( $n=10$ ). Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Es posible observar que para ninguno de los tiempos parecieran existir diferencias entre el tratamiento magnético y el control. Las barras mostrando alturas similares entre los

grupos nos llevan a esta inferencia.

Una vez verificados los supuestos (**anexo II**), se concluyó que es posible aplicar la prueba T para muestras dependientes o pareadas para los tiempos 21, 32 y 42 horas. A continuación se presentan los resultados de las mismas (**Tabla II**):

**Tabla II. Resultados de las pruebas T para muestras dependientes o pareadas para los tiempos 21, 32 y 42 horas.** Se consideraron significativas aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ . Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Obs(1)	Obs(2)	n*	Media(dif)	DE(dif)**	T	P-valor (Unilateral D)
% Ocupación Control tiempo 21hs	% Ocupación Magneto tiempo 21hs	10	-1,31	26,53	-0,16	0,5602
% Ocupación Control tiempo 32hs	% Ocupación Magneto tiempo 32hs	10	0,4	6,1	0,2	0,4212
% Ocupación Control tiempo 42hs	% Ocupación Magneto tiempo 42hs	10	-0,55	4,01	-0,44	0,6637

\*n: Población de cada tratamiento

\*\*D.E.: Desvío estándar

Debido al incumplimiento del supuesto de normalidad, para el tiempo 26 horas (**anexo II**) se decidió utilizar la prueba no paramétrica Wilcoxon para muestras dependientes o pareadas. En este último caso, el procedimiento se basa en ordenar los datos y calcular rangos. A continuación se presenta el resultado de la misma (**Tabla III**):

**Tabla III - Resultados de la prueba de Wilcoxon para muestras dependientes o pareadas para el tiempo 26 horas.** Se consideraron significativas aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ . Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Obs(1)	Obs(2)	n*	Suma(R+)	E(R+)	Var(R+)	Z	p(2 colas)
% Ocupación Control tiempo 26hs	% Ocupación Magneto tiempo 26hs	10	38	27,5	96,25	1,07	0,2954

\*n: Población de cada tratamiento

Según los resultados de las pruebas T pareadas y la prueba Wilcoxon pareada, todos los p-valores son mayores al nivel de significancia establecido (0,05) y por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula. Con esto se concluye que **no existe evidencia muestral que indique que el tratamiento magnético tiene efectos sobre la migración celular en las condiciones estudiadas.**

## 5.1.2. CUANTIFICACIÓN MANUAL DEL ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR

### 5.1.2.1. CONSIDERACIONES GENERALES

En primer lugar, fue necesario identificar las variables. La unidad experimental en este caso es cada placa MW 6, donde de cada pocillo se obtiene un dato independiente. La variable respuesta es el porcentaje de ocupación, que permite evaluar la migración celular, objetivo principal de este ensayo. Esta es una variable cuantitativa continua. Los datos fueron normalizados al tiempo 0 para evitar tener en cuenta sesgos, debido a que por cuestiones técnicas no todas las estrías tenían la misma amplitud inicial. De esta manera, en lugar de trabajar con la medida de centímetros realizada se trabajó con porcentaje, considerando que a tiempo 0 el porcentaje de ocupación era del 0% en todos los casos, independientemente de la amplitud de la estría. La variable independiente o explicatoria es el tratamiento asignado, que responde a la aplicación, o no, del tratamiento de 1 hora de magnetoterapia.

El modelo estadístico utilizado para el análisis de los porcentajes de ocupación obtenidos fue la prueba T para muestras dependientes o pareadas. Las muestras se consideran de esta forma porque para cada ensayo independiente las células provienen de un mismo vial. Así, se cuenta con 11 pares de datos<sup>3</sup>. El azar intervino al momento de asignar los tratamientos a los individuos dentro de cada bloque. Esta prueba se asegura que las variables confusoras se distribuyen por igual en ambos grupos, ofreciendo una gran ventaja cuando los individuos son heterogéneos. Es más eficiente y ofrece mayor precisión.

En primera instancia se procedió a realizar la estadística descriptiva de los datos; tras la misma, se comprobó que los supuestos de la prueba estadística a realizar se cumplieran (**anexo II**). Para la prueba T para muestras dependientes o pareadas se deben cumplir los siguientes supuestos: las muestras deben ser aleatorias, las observaciones independientes, la escala de la variable debe ser al menos de intervalo y las variables deben distribuirse normalmente. Se consideraron significativas aquellas pruebas con  $p < 0,05$ . En todos los ensayos, el análisis estadístico fue realizado utilizando el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

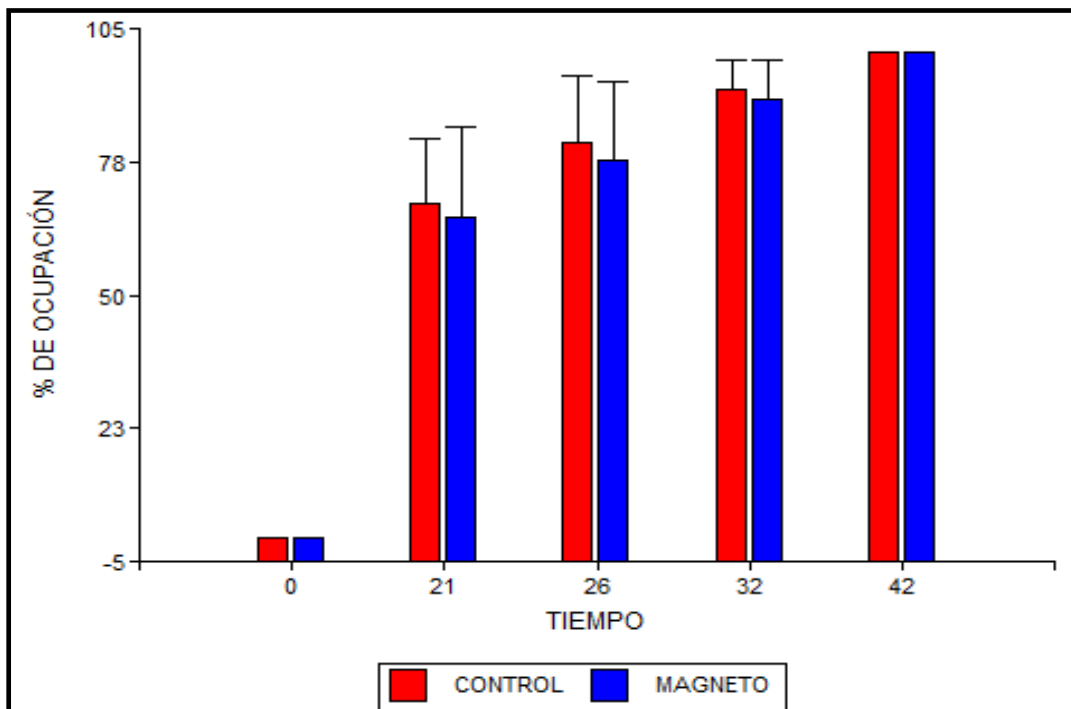
---

<sup>3</sup> Los datos de uno de los ensayos no fueron tenidos en cuenta ya que existió un error en la realización del ensayo, obteniéndose datos erróneos.

### 5.1.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En función de las mediciones realizadas, se procedió al análisis estadístico de los datos.

En primer lugar, se realizó una representación gráfica de los resultados mediante gráficos de barra correspondientes a cada tiempo (**Figura 26**):



**Figura 26. Representación gráfica de los resultados.** Gráficos de barras del porcentaje de ocupación en los tiempos 21, 26 y 32 horas. Permiten comparar el comportamiento de la variable tanto entre el caso en control y el tratamiento magnético. Se trabajó con 11 réplicas biológicas (n=11). Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Es posible observar que para ninguno de los tiempos parecieran existir diferencias entre el tratamiento magnético y el control; esto se infiere ya que las barras muestran alturas similares entre los grupos.

Una vez verificados los supuestos (**anexo II**), se concluyó que es posible aplicar la prueba T para muestras dependientes o pareadas para los tiempos 21, 26 y 32 horas. A continuación se presentan los resultados de las mismas (**Tabla IV**):



**Tabla IV. Resultados de las pruebas T para muestras dependientes o pareadas para los tiempos 21, 26 y 32 horas.** Se consideraron significativas aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ . Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Obs(1)	Obs(2)	n*	media(dif)	DE(dif)**	T	p(Unilateral D)
% Ocupación Control tiempo 21hs	% Ocupación Magneto tiempo 21hs	11	5	19,51	0,85	0,2076
% Ocupación Control tiempo 26hs	% Ocupación Magneto tiempo 26hs	11	3,64	15,69	0,77	0,2300
% Ocupación Control tiempo 32hs	% Ocupación Magneto tiempo 32hs	11	2,27	6,53	1,15	0,1375

\*n: Población de cada tratamiento

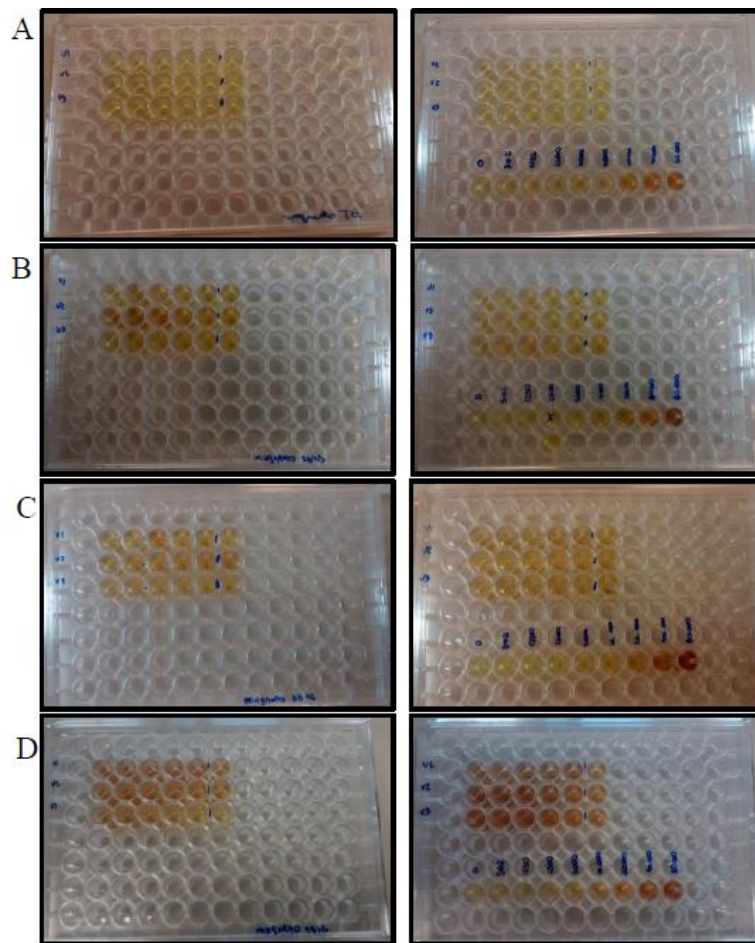
\*\*D.E.: Desvío estándar

Según los resultados de las pruebas T pareadas, todos los p-valores son mayores al nivel de significancia establecido (0,05) y por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula. Con esto se concluye que no existe evidencia muestral que indique que el tratamiento magnético afecta la migración celular.



## 5.2. PROLIFERACIÓN CELULAR

Tal como se menciona en el punto H del protocolo del ensayo de viabilidad por MTS, una vez que se coloca la solución 1X de MTS las placas se incuban durante 2 horas en estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> reparadas de la luz, previo a la medición de las absorbancias. Una vez retiradas de la estufa, las placas se observaron tal como lo demuestra la siguiente **Figura 27**:



**Figura 27. Imágenes de las placas tratadas y sus respectivos controles, obtenidas tras la incubación con MTS.** Se observan a la izquierda las placas que fueron tratadas con 1 hora de magnetoterapia. Del lado derecho, las placas control, que también incluyen las curvas de calibrado. Se observan las placas sometidas al ensayo de viabilidad por MTS tras los tiempos 0 (A), 26 (B), 33 (C) y 45 (D) horas posteriores al tratamiento (magnético o control).

En la **Figura 27** se puede observar como con el paso del tiempo se da lugar a una mayor reducción del compuesto, lo cual se evidencia como un color marrón más oscuro en las sucesivas placas. Esto también se evidencia claramente en las curvas de calibrado, en donde el

---

último pocillo, el cual posee el mayor número de células de la curva se observa mucho más oscuro que los demás.

En este caso, entonces, se midieron las absorbancias (ver tabla en **anexo III**) de cada una de las placas luego del ensayo con MTS. Como se mencionó en el protocolo de la sección 8, este último fue realizado a diferentes tiempos (0, 26, 33 y 45 horas) luego de finalizado el tratamiento (tratamiento magnético y su respectivo control sin tratamiento magnético).

Las absorbancias obtenidas responden a un número de células, obtenido gracias al sembrado de una curva de calibración.

### **5.2.1. CONSIDERACIONES GENERALES**

En primer lugar, fue necesario identificar las variables. La unidad experimental en este caso es cada placa MW 96, donde de cada pocillo se obtiene un dato independiente. La variable respuesta es la absorbancia medida en cada uno de los pocillos, la cual indica el número de células a distintos tiempos posteriores al tratamiento, y que permite evaluar la proliferación celular, objetivo principal de este ensayo. Esta es una variable cuantitativa continua. La variable independiente o explicatoria es el tratamiento asignado, que responde a la aplicación, o no, del tratamiento de 1 hora de magnetoterapia. El azar intervino al asignar las placas a cada tratamiento (tratamiento magnético o control) y en la asignación del tiempo posterior al tratamiento de magnetoterapia al cual se realiza el ensayo de viabilidad de MTS y las correspondientes mediciones de absorbancia (es decir, a que tiempo se sacrifica cada placa).

El modelo estadístico utilizado para el análisis de las absorbancias obtenidas fue la prueba T para muestras dependientes o pareadas. Las muestras se consideran de esta forma porque para cada ensayo independiente las células provienen de un mismo vial. Así, se cuenta con 3 pares de datos. En este caso, se realizaron sextuplicados técnicos de los cuales se obtiene un valor promedio que es el que finalmente se utiliza para el análisis estadístico. El azar intervino al momento de asignar los tratamientos a los individuos dentro de cada bloque. Esta prueba se asegura que las variables confusoras se distribuyen por igual en ambos grupos, ofreciendo una gran ventaja cuando los individuos son heterogéneos. Es más eficiente y ofrece mayor precisión.

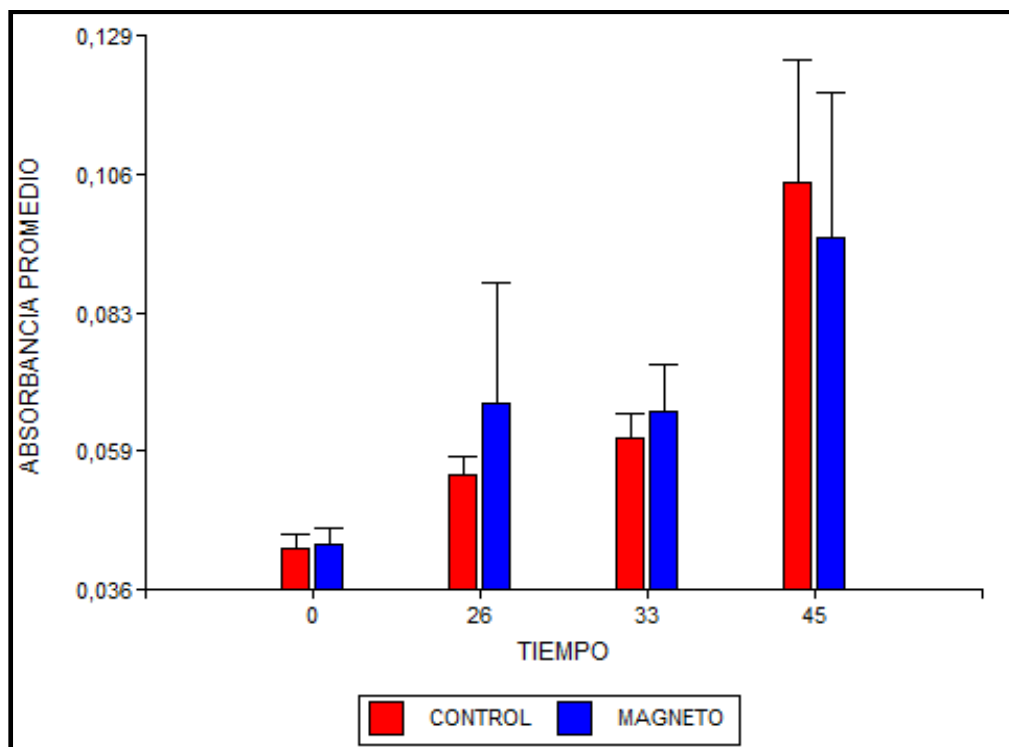
En primera instancia se procedió a realizar la estadística descriptiva de los datos; tras

la misma, se comprobó que los supuestos de la prueba estadística a realizar se cumplieran (**anexo II**). Para la prueba T para muestras dependientes o pareadas se deben cumplir los siguientes supuestos: las muestras deben ser aleatorias, las observaciones independientes, la escala de la variable debe ser al menos de intervalo y las variables deben distribuirse normalmente. Se consideraron significativas aquellas pruebas con  $p\text{-valor} < 0,05$ .

En todos los ensayos, el análisis estadístico fue realizado utilizando el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

### 5.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar se realizó una representación gráfica de los resultados mediante gráficos de barra correspondientes a cada tiempo (**Figura 28**):



**Figura 28. Representación gráfica de los resultados.** Gráficos de barras de las absorbancias medidas (n=3) en los tiempos 0, 26, 33 y 45 horas. Permiten comparar el comportamiento de la variable tanto entre el caso en control y el tratamiento magnético. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Es posible observar que para ninguno de los tiempos en los que se realizó el ensayo de viabilidad por MTS parecieran existir diferencias entre el tratamiento magnético y el control

(sin tratamiento magnético). Las barras muestran alturas similares entre los grupos en todos los casos, y es esto lo que nos lleva a realizar la inferencia anterior.

Una vez verificados los supuestos (**anexo II**), se concluyó que es posible aplicar la prueba T para muestras dependientes o pareadas para los tiempos 26, 34 y 45 horas. A continuación se presentan los resultados de las mismas (**Tabla V**):

**Tabla V - Resultados de las pruebas T para muestras dependientes o pareadas para los tiempos 26, 33 y 45 horas.** Se consideraron significativas aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ . Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Obs(1)	Obs(2)	n*	media(dif)	DE(dif)**	T	P-valor (Unilateral D)
Absorbancia control en tiempo 26 horas	Absorbancia magneto en tiempo 26 horas	3	-0,01	0,02	-0,91	0,7703
Absorbancia control en tiempo 33 horas	Absorbancia magneto en tiempo 33 horas	3	-4,30E-03	0,01	-1,28	0,8357
Absorbancia control en tiempo 45 horas	Absorbancia magneto en tiempo 45 horas	3	0,01	0,04	0,46	0,3468

\*n: Población de cada tratamiento

\*\*D.E.: Desvío estándar

Debido al incumplimiento del supuesto de normalidad, para el tiempo 0 horas se decidió utilizar la prueba no paramétrica Wilcoxon para muestras dependientes o pareadas. En este último caso, el procedimiento se basa en ordenar los datos y calcular rangos. A continuación se presenta el resultado de la misma (**Tabla VI**):

**Tabla VI - Resultados de la prueba de Wilcoxon para muestras dependientes o pareadas para el tiempo 26 horas.** Se consideraron significativas aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ . Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Obs(1)	Obs(2)	n*	Suma(R+)	E(R+)	Var(R+)	Z	P (2 colas)
Absorbancia control en tiempo 0 horas	Absorbancia magneto en tiempo 0 horas	3	0	3	3,38	-1,63	0,234

\*n: Población de cada tratamiento

Según los resultados de las pruebas T pareadas y la prueba Wilcoxon pareada, todos los p-valores son mayores al nivel de significancia establecido (0,05) y, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula. Con esto se concluye que **no existe evidencia muestral que indique que el tratamiento magnético afecta la proliferación celular en las condiciones estudiadas.**

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación fueron logrados mediante la utilización de un modelo *in vitro* de células en cultivo con la línea celular CHO (*chinese hamster ovary cell*), aplicando la técnica de *scratching* celular. El objetivo planteado fue analizar el efecto de la magnetoterapia en el proceso de cicatrización de heridas en un modelo *in vitro*. Dicho diseño experimental fue elegido en base a que posee importantes ventajas, tales como la posibilidad de controlar el ambiente fisicoquímico, lograr la homogeneidad de las muestras, se trata de un ensayo de bajo costo y que puede ejecutarse utilizando materiales comunes en un laboratorio. Sin embargo, se deben considerar también las limitaciones que surgen del uso de este modelo, es decir, como consecuencia de trabajar *in vitro* (en monocapa, en dos dimensiones) y con un único linaje celular. Estas no son un impedimento a este tipo de ensayos, sino que simplemente deben ser consideradas a la hora de la evaluación de los resultados.

El proceso de cicatrización de una herida es un proceso biológico complejo y esencial, que permite que se restaure la funcionalidad del tejido luego de cualquier herida (Muñoz Soriano, et al. 2014) y en el cual se encuentran involucradas un número considerable de células de diferentes linajes, cada una de las cuales juega un rol específico y necesario (Shaw, et al. 2009). Existen ensayos simples y ampliamente utilizados para evaluar este proceso que se encuentran ya estandarizados. En la actualidad, se están desarrollando una gran cantidad de modelos de cultivo equivalentes a la piel en 3D (generalmente utilizan queratinocitos crecidos en una capa alimentadora de fibroblastos dentro de un gel de colágeno) para evaluar cicatrización de heridas (Marquardt, et al. 2015), (Bell, et al. 1983), (Kandyba, et al. 2010), (Küchler, et al. 2010). Sin embargo, en esta investigación en particular se decidió trabajar en cultivo 2D (en monocapa) con una sola línea celular, por lo que se lograron evaluar procesos de reparación individuales, como la proliferación o la migración celular. Los resultados y las conclusiones alcanzadas estuvieron directamente influenciados por las condiciones anteriormente mencionadas. Con este acercamiento se concluyó que el tratamiento magnético no tenía efectos sobre el modelo de cicatrización evaluado ni tampoco sobre la proliferación. Sin embargo, cabe mencionar que estos resultados pueden variar en caso de modificar el modelo utilizado. Entonces, creemos que se podría lograr un mejor acercamiento al proceso biológico de la cicatrización mediante la utilización de líneas celulares humanas, y más aún si

se utilizan cultivos mixtos que representan mejor el proceso en cuestión.

En la bibliografía se describen variadas técnicas que tienen por objetivo la generación de una herida para posteriormente evaluar el proceso de cicatrización. Entre los métodos encontrados podemos mencionar los mecánicos, químicos, eléctricos y ópticos (Riahi, et al. 2012). En este trabajo de investigación se optó por la utilización de la técnica de *scratching* (método mecánico y manual), principalmente debido a que es sencillo y económico. Cada una de las técnicas descritas en la bibliografía presentan ventajas y limitaciones como a su vez diferentes alcances; en este trabajo de investigación la técnica seleccionada pareció la adecuada en función de los objetivos planteados y por ende los resultados obtenidos se encuentran sujetos a esta elección. No obstante queda abierta la posibilidad de que modificando el acercamiento experimental los resultados varíen. Por ejemplo, un método óptico tal como la ablación laser permitiría automatizar la generación de heridas reproducibles con diferentes formas.

En relación al estudio de la aplicación de campos magnéticos estáticos para evaluar su influencia en la cicatrización, nuestro trabajo es inédito. Al momento de la escritura del mismo, no se encontraron en la bibliografía acercamientos experimentales en los cuales se haya trabajado en modelos *in vitro*. No obstante en un estudio realizado en condiciones similares a las planteadas en este trabajo se trabajó con ratones, generándoles una herida superficial y aplicándoles tratamiento magnético evaluando así el tiempo de cicatrización. En contraste con nuestros resultados, observaron diferencias significativas a favor del tratamiento magnético, en ese caso el mismo aceleró la cicatrización de la herida generada (M. J. Concannon, et al. 2008). Consideramos que en este caso los resultados varían respecto a lo observado en nuestro trabajo probablemente debido a que al trabajar en un modelo animal es posible evaluar otras variables dentro del proceso de cicatrización. Como bien mencionamos, en dicho proceso intervienen múltiples poblaciones celulares, entre ellas células del sistema inmunológico que pueden afectar considerablemente los resultados y al no estar presentes, no se pudieron evaluar en nuestro modelo *in vitro*.

Por otro lado, el estudio de la aplicación de campos magnéticos estáticos para evaluar su influencia en la proliferación nuestro trabajo también es novedoso. No se encontraron artículos en la bibliografía que mencionaran como esta variable se encuentra influenciada por campos magnéticos. Particularmente, en este trabajo de investigación, se decidió incorporar el

análisis de esta variable considerando que los resultados obtenidos hubieran tenido mayor importancia en caso de haberse observado que la terapia magnética favorecía o aumentaba la velocidad de cierre de la estría en el ensayo de *scratching* celular.

En nuestro trabajo de investigación, el tipo de tratamiento elegido (tiempo de aplicación del dispositivo magnético) se basó principalmente en los tratamientos kinesiológicos de magnetoterapia realizados en humanos, pese a que se estaba trabajando en un modelo *in vitro* y con células de otra especie. Esta elección se debió justamente a la falta de bibliografía en estos modelos.

Con respecto al análisis de los datos obtenidos, en los trabajos encontrados en la bibliografía que utilizaban la técnica de *scratching* celular el mismo se realizaba con softwares disponibles en la web, como ser el Image Pro-Plus software (Lian, et al. 2007). En este trabajo de investigación se incluyó la creación de un software para el análisis de las imágenes. Además se optó por realizar un análisis manual con el cual contrastar los resultados obtenidos mediante el programa. Tras estos análisis se verificó que los resultados eran concordantes, llegando a las mismas conclusiones.

Si bien existen muchos reportes que sostienen que los tratamientos magnéticos favorecen diferentes aspectos de la cicatrización también se encuentran resultados opuestos. Esta contradicción, junto con los resultados que hemos obtenido tras los ensayos realizados, dificulta poder concluir de manera universal sobre esta temática. En este trabajo de investigación, no se lograron observar resultados a favor de estos tratamientos. Se considera de importancia no solo continuar con este tipo de investigaciones, sino también mejorar el diseño experimental de las mismas para obtener resultados más concluyentes. La importancia de los mismos radica en que hoy en día este tipo de tratamientos alternativos son ampliamente utilizados, y sin embargo, no existen evidencias claras a favor de los mismos.

Para inferir si la magnetoterapia tiene efectos sobre la cicatrización en los humanos, es necesario un análisis más profundo teniendo en cuenta otras variables y utilizando otros modelos biológicos como ser otros tipos de cultivos, moscas, peces o mamíferos. Si bien se ha estudiado el efecto de un tratamiento similar al utilizado en los humanos, no se puede concluir que la misma no genera ningún tipo de efectos.

Se proponen para futuros proyectos diferentes alternativas. Por un lado, sumar la utilización de otras líneas celulares e incluso el modelo de *Drosophila Melanogaster*, el cual



se encuentra disponible en los UADE Labs y cuenta con numerosos estudios de cicatrización *in vivo* en bibliografía. Asimismo, se propone modificar el diseño del equipo de magnetoterapia para así poder aplicar fuerzas homogéneas a los seis pocillos de un MW6 permitiendo simplificar la aplicación del tratamiento.

En el caso de encontrar diferencias significativas utilizando los nuevos acercamientos experimentales se propone evaluar, mediante experimentos de genómica y proteómica, potenciales diferencias a nivel de expresión génica y/o proteica, causadas por la exposición a frecuencias magnéticas.

## 7. CONCLUSIONES

El presente trabajo final de investigación tuvo como objetivo evaluar los efectos de la magnetoterapia en la cicatrización de heridas en el modelo biológico de *células CHO*. Para lograr dicho fin, se plantearon y cumplieron una serie de objetivos específicos, entre ellos, la puesta a punto del modelo biológico, la evaluación y aplicación del dispositivo electrónico y la confección de protocolos experimentales.

Partiendo de la hipótesis que la magnetoterapia provoca efectos positivos en la cicatrización en el modelo biológico celular CHO:

- Se puso a punto el modelo de *scratching* celular en el modelo biológico de células CHO.
- Se evaluaron los efectos de la magnetoterapia en la cicatrización y la proliferación.
- Se realizó un tratamiento de una hora de aplicación. (Este tiempo fue seleccionado tanto por limitaciones del modelo biológico utilizado, como también por ser este el tiempo de tratamiento que se suele aplicar en humanos).
- Se generó un software para el análisis de las imágenes.

Como resultado de los ensayos:

- Con el tiempo de tratamiento elegido (1 hora de tratamiento magnético) y siendo la misma evaluada mediante la técnica de *scratching*, no se encontraron diferencias en el **proceso de migración** celular en ninguno de los tiempos observados (0, 21, 26, 32 y 42 horas). De esta manera, se concluye que en estas condiciones la magnetoterapia no afecta la migración celular en un proceso de cicatrización y así la hipótesis fue descartada.
- En lo referente al ensayo de **proliferación**, con el tiempo de tratamiento elegido (1 hora de tratamiento magnético) y siendo la misma evaluada mediante el ensayo de viabilidad por MTS, no se encontraron diferencias en este proceso celular en ninguno de los tiempos observados (0, 26, 33 y 45 horas). De esta manera, se concluye que en estas condiciones la magnetoterapia no favorece la proliferación celular.

**De este trabajo de investigación se concluye que, la magnetoterapia, aplicándose una única sesión de una hora de tratamiento, que es la que podría asemejarse a la empleada en tratamientos kinesiológicos en humanos, no genera efectos, ni positivos ni negativos en la migración celular en el modelo de *Células CHO*. Por otro lado, también se concluye que, bajo las mismas condiciones, tampoco aumenta ni disminuye la proliferación celular.**

## BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J E, J Lee, and A R Burgess. "The management of complex orthopaedic injuries." *Surg Clin North Am* 76 (1996): 879–903.
- Attinger, C E, J E Janis, J Steinberg, and et al. "Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants." *Plast Reconstr Surg* 117(7 suppl) (2006): 72S–109S.
- Bassett, C A. "Current concepts of bone formation." *J Bone Joint Surg* 44 n.6 (Sep 1962): 1217-44.
- Bassett, CA, SN Mitchell, and SR Gaston. "Treatment of nonunited tibial diaphyseal fracture with pulsing electromagnetic fields." *J Bone Joint Surg* 63 n.4 (Apr 1981): 511-23.
- Becker, R O, and G Selden. *The Body Electric. Electromagnetism and the Foundation of Life*. Morrow, New York: William Morrow and Company, 1985.
- Beddington, R. "Transgenic mutagenesis in the mouse." *Trends Genet.* 8 n.10 (October 1992): 345-347.
- Bell, E, et al. "The reconstitution of living skin." *J Invest Dermatol.* 81 Suppy1 (Jul 1983): 2-10.
- Bischoff, M, L Kinzl, A Schmelz, and et al. "The complicated wound. Unfallchirurg." 102 (1999): 797–804.
- Broughton, G 2nd, J E Janis, C E Attinger, and et al. "Wound healing: an overview." *Plast Reconstr Surg* 117(7 suppl) (2006): 1–32.
- Broughton, G, J E Janis, and C E Attinger. "The basic science of wound healing." *Plast Reconstr Surg* 117(7 suppl) (2006): 12S–34S.
- Carrel, A. "On the permanent life of tissues outside the organism." *J. Exp. Med.* 15 n.5 (May 1912): 516–528.
- Chen, Y. "Scratch Wound Healing Assay." *Bio-protocol* 1 n.5 (Aug 2011).
- —. *Scratch Wound Healing Assay. Bio-protocol* 2(5): e100. 2012. [www.bio-protocol.org/e100](http://www.bio-protocol.org/e100) (accessed May 5, 2015).
- Clark, H R. *The cure for all Diseases*. New Century Press, 1995.
- Concannon, Matthew J, Steven L Henry, Glorie Yee, and et al. "The effect of

magnetic fields on wound healing. Experimental Study and Review of the Literature.” *Eplasty* 8 n.40 (July 2008).

- Cory, G. “Scratch-wound assay.” *Methods Mol Biol.* 769 (2011): 25-30.
- Degreef, H. “How to heal a wound fast.” *Dermatol Clin* 16 (1998): 365–375.
- Dulbecco, R. “Production of plaques in monolayers of tissue cultures by single particles of an animal virus.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 38 n.8 (Aug 1952): 747-752.
- Dulbecco, R, and G Freeman. “Plaque formation by the polyoma virus.” *Virology* 8 n.3 (July 1959): 396–397.
- Eagle, H. “The specific amino acid requirements of mammalian cells (stain L) in tissue culture.” *J. Biol. Chem.* 214 n.2 (Jun 1959): 839-52.
- Earle, W R, E L Schilling, T H Stark, N P Straus, M F Brown, and E Shelton. “Production of malignancy in vitro. IV: The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells.” *J. Natl. Cancer Inst.* 4 n.2 (1943): 165–212.
- Eccles, N K. “A critical review of randomized controlled trials of static magnets for pain relief.” *J Altern Complement Med* 11 n.3 (Jun 2005): 495-509.
- Finegold, L, and B L Flamm. “Magnet therapy.” *BMJ*, no. 332 n.7532 (January 2006): 4.
- Freshney, R I. “Defined Media and Supplements.” Chap. 8 in *Culture of Animal Cells. A Manual of basic technique and specialized applications.*, by R I Freshney, (732):107-108. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Freshney, R I. “Introduction - Historical Background.” Chap. 1 in *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, by R I Freshney, 1 - 6. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Freshney, R I. "Introduction - Types of Tissue Culture." Chap. 1 in *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, by R I Freshney, 8- 10. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Freshney, R.I. “Equipment and Materials.” Chap. 4 in *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, by R.I. Freshney, 30-50. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Gey, G. O., Coffman, W. D., & Kubicek, M. T. “Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.” *Cancer Research*

12 (1952): 364–365.

- Glat, P M, and M T Longaker. “Wound healing.” *Grabb and Smith’s Plastic Surgery* (Aston SJ, Beasley RW, Thorne CH, eds), no. 5th edn (1997): 3–12.
- Guillen, P, J M Madrigal, A Madroñero, J I Pitillas, J M Galvez, and J Llopis. “Aplicaciones clínicas de los campos magnéticos. Magnetoterapia y magnetosteogenia.” *Rev Esp de Cir Ost.* 20 (1985): 257-279.
- Guillot, J D Z. *Revista Cubana de Medicina General Integral. La magnetoterapia y su aplicación en medicina.* Feb de 2002.
- [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252002000100009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252002000100009) (último acceso: Abril de 2015).
- Ham, R G. “An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines.” *Exp. Cell Res.* 29 (Feb 1963): 515-26.
- Ham, R G. “Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53 (Feb 1965): 288-293.
- Harlow, T, C Greaves, A White, L Brown, A Hart, and E Ernst. “Randomised controlled trial of magnetic bracelets for relieving pain in osteoarthritis of the hip and knee.” *BMJ* 329 n.7480 (Dec 2004): 1450-4.
- Harré, R. *El método de la ciencia.* Madrid: H. Blume, 1979.
- Harrison, R G, M J Greenman, F P Mall, and C M Jackson. “Observations on the living developing nerve fiber.” *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1907: 140–143.
- Hartung, T, et al. “Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1.” *Altern Lab Anim.* 30 (2002): 407-414.
- Hayflock, L, and P S Moorhead. “The serial cultivation of human diploid cell strains.” *Exp. Cell Res.* 25 n.3 (Dec 1961): 585–621.
- Huang, C, Z Rajfur, C Borchers, M D Schaller, and K Jacobson. “JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration.” *Nature* 424 n. 6945 (Jul 2003): 219–223.
- Hunt, T K, H Hopf, Z Hussain, and et al. “Physiology of wound healing.” *Adv Skin Wound Care* 13 (2000): 6–11.
- Jespersen, J. “Pathophysiology and clinical aspects of fibrinolysis and inhibition of coagulation. Experimental and clinical studies with special reference to women on oral contraceptives and selected groups of thrombosis prone patients.” *Dan Med Bul* 35

(1988): 1-33.

- Johnston, L. *Magnetic healing: What's the attraction?*. 2000 йил Apr. [www.healingtherapies.info/magnetic\\_healing.htm](http://www.healingtherapies.info/magnetic_healing.htm) (accessed 2015 йил Abril).
- Kandyba, E, M Hodgins, P Martin, and et al. "A versatile murine 3D organotypic model to evaluate aspects of wound healing and epidermal organization." *Methods Mol Biol.* 585 (2010): 303-312.
- Komarcevic, A. "The modern approach to wound treatment." *Med Pregl [in Croatian]* 53 (2000): 363–368.
- Küchler, S, et al. "3D-wound healing model: influence of morphine and solid lipid nanoparticles." *J Biotechnol* 148 n.1 (Jul 2010): 24-30.
- Labler, L, L Mica, and L Härter. "Influence of V.A.C.-therapy on cytokines and growth factors in traumatic wounds." *Zentralbl Chir* 131(suppl 1) (2006): S62–S67.
- Lakhovsky, G. *The Secret of Life: Electricity, Radiation and Your Body*. 1988.
- Lampugnani, M G. *Cell migration into a wounded area in vitro*. Vol. 96, in *Methods in Molecular Biology. Adhesion Protein Protocols*, edited by Corada Monica Dejana Elisabetta, 177-182. Humana Press, 1999.
- Lawrence, W T. "Physiology of the acute wound." *Clin Plast Surg* 25 (1998): 321–340.
- Lazurus, G S, D M Cooper, and D R Knighton. "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing." *ArchDermatol* 130 (1994): 489–493.
- Lian, C C, A Y Park, J L Guan, and et al. "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nature Publishing Group* 2 n. 2 (March 2007): 329 - 333.
- *Life Technologies*. [www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10010031](http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10010031) (accessed 2015 йил 10-3).
- Lu, K V, K A Jong, A K Rajasekaran, T F Cloughesy, and P S Mischel. "Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line." *Lab Invest.* 84 n.1 (Jan 2004): 8–20.
- Mae-Wan, H, A P Fritz, and U Warnke. "History of Bioelectromagnetism." Chap. 1 in



*Bioelectrodynamics and Biocommunication*, by Fritz Albert Popp, Ulrich Warnke Mae-Wan Ho, 436. Singapore: World Scientific, 1994.

- Marquardt, Y, et al. “Characterization of a novel standardized human three-dimensional skin wound healing model using non-sequential fractional ultrapulsed CO2 laser treatments.” *Lasers Surg Med.* 47 n.3 (Mar 2015): 257-65.
- Mc Cluer, M. *The Appeal of Magnetic Therapy*. 2008 йил Oct. <http://healthpsych.psy.vanderbilt.edu/2008/MagneticTherapy.htm>. (accessed 2015 Abril).
- Morgan, J G, H J Morton, and R C Parker. “Nutrition of animal cells in tissue culture; Initial studies on a synthetic medium.” *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73 n.1 (Jan 1954): 1-8.
- Muñoz Soriano, V, S Lopez Domenech, N Paricio, and et al. "Why mammalian wound-healing researchers may wish to turn to Drosophila as a model." *Exp. Dermatol* 23 n.8 (Aug 2014): 538-542.
- Omasa, T, M Onitsuka, and W D Kim. “Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells.” *Curr Pharm Biotechnol.* 11 n.3 (Apr 2010): 233-40.
- Parker, R C. “Methods of tissue culture.” (Pitman Medical) 3rd ed (1961).
- Parker, R C, G M Healy, and D C Fisher. “Nutrition of animal cells in tissue culture. VII. Use of replicate cell cultures in the evaluation of synthetic media.” *Canad. J. Biochem. Physiol.* 32 n.3 (May 1954): 306-18.
- Peat, N, S J Gendler, N Lalani, T Duhig, and J Taylor-Papadimitriou. “Tissue-specific expression of a human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mice.” *Cancer Res.* 52 (Apr 1992): 1954–1960.
- Pittler, M H, E M Brown, and E Ernst. “Static magnets for reducing pain: systematic review and meta-analysis of randomized trials.” *CMAJ.* 177 n.7 (Sep 2007): 736-742.
- Pool, J G. “Normal hemostatic mechanisms: a review.” *Am J Med Technol* 43 (1977): 776–780.
- Puck, T T, and P I Marcus. “A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supp.” *Proc. Natl Acad Sci USA* 41 n.7 (Jul 1955): 432 - 437.
- Ratterman, R, J Secrest, B Norwood, and A P Chien. “Magnet therapy: what's the

attraction?" *J Am Acad Nurse Pract.* 14 n.8 (Aug 2002): 347-353.

- Riahi, Reza, Yongliang Yang, Donna D. Zhang, and Pak Kin Wong. "Advances in Wound-Healing Assays for Probing Collective Cell Migration." *Journal of Laboratory Automation* 17 n.1 (Feb 2012): 59–65.
- Richardson, M. "Acute wounds: an overview of the physiological healing process." *Nurs Times* 100 (2004): 50–53.
- Richmond, S. J., et al. "Therapeutic effects of magnetic and copper bracelets in osteoarthritis: A randomised placebo-controlled crossover trial." *Complementary Therapies in Medicine* 17 n.5-6 (Dec 2009): 249–256.
- Rinker, F. *La fuerza invisible*. London: Mason Service Publishing, 1997.
- Rivera, A E, and J M Spencer. "Clinical aspects of fullthickness wound healing." *Clin Dermatol* 25 (2007): 39–48.
- Robson, M C. "Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria." *Surg Clin North Am* 77 (1997): 637–650.
- Robson, M C, D L Steed, and M G Franz. "Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories." *Curr Probl Surg* 38 (2001): 72–140.
- Rous, P J. "A method of obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells." *J. Exp. Med.* 23 n.4 (Apr 1916): 549-555.
- Schaffer, W I. "Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics." *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 26 n.1 (Jan 1990): 97-101.
- Shaw, T J, and P Martin. "Wound repair at a glance." *Journal of Cell Science* 122 (Sep. 2009): 3209-3213.
- Strecker-McGraw, M K, T R Jones, and D G Baer. "Soft tissue wounds and principles of healing." *Emerg Med Clin North Am* 25 (2007): 1–22.
- Tijo, J H, and T T Puck. "'Genetics of somatic mammalian cells. II. chromosomal constitution of cells in tissue culture.'" *J. Exp. Med.* 108 (Aug 1958): 259–271.
- Vanwijck, R. "Surgical biology of wound healing." *Bull Mem Acad R Med Belg* 115 (2001): 175–184.
- Warnke, U. *Historia del empleo terapéutico de campos magnéticos en medicina*. Buenos Aires: Campos Magnéticos en Medicina. Biología-Diagnóstico-Terapia.,

1996.

- Waymouth, C. “Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (Strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB752/1).” *J. Natl. Cancer Inst* 22 n.5 (May 1959): 1003-17.
- Wong, M K, and A I Gotlieb. “The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization.” *J Cell Biol.* 107 n.5 (Nov 1988): 1777-1783.
- Wurm, F M, and D Hacker. “"First CHO genome.".” *Nat Biotechnol.* 29 n. 8 (Aug 2011): 718–20.
- *www.ohani.cl.* [www.ohani.cl/historiamagnetismo.htm](http://www.ohani.cl/historiamagnetismo.htm) (accessed 2014 йил Dic).
- Yerganian, G. *The biology and genetics of Chinese Hamster.* Vol. 935. Nueva York: Michael M Gottesman, 1985.
- Zahm, J M, et al. “Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium.” *Cell Motil Cytoskeleton.* 37 n.1 (1997): 33-43.

---

## ANEXOS

### I. PROTOCOLOS

#### i. Preparación de medio de cultivo

La receta para la preparación del medio de cultivo se detalla a continuación:

- A. Para la preparación de un litro (1 litro) se deben pesar 12gr de medio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium).
- B. Pesar a su vez 2,438gr de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ).
- C. Agregar agua destilada esterilizada mediante autoclave
- D. Agitar con varilla de vidrio durante 5 minutos.
- E. Medir y controlar que el pH sea correcto ( $\text{pH}=7$ )

Una vez preparado el mismo tal como se explicó se procede a la esterilización por filtración como se detalla a continuación:

- A. Se limpia el flujo laminar con Espadol y luego con alcohol.
- B. Se utiliza el sistema de filtración previamente armado con una membrana de nylon estéril individual (Gamafil S.A.) de 0,22 micrones y esterilizado mediante autoclave. Se introduce el mismo en el flujo laminar.
- C. Se conecta el sistema con una bomba hidráulica para generación de vacío.
- D. Se coloca el medio líquido preparado en la parte superior.
- E. Se enciende la bomba.
- F. La fracción filtrada se coloca en frascos estériles.

#### ii. Preparación de PBS

La receta para la preparación de un litro de PBS de cultivo se detalla a continuación:

- A. Pesar 9,6gr de PBS en polvo Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma.
- B. Disolver por completo el polvo en un litro de agua.
- C. Agitar con varilla de vidrio.
- D. Dispensar en frascos.
- E. Esterilizar en autoclave.

### iii. Repique de una monocapa celular

A continuación se presenta el protocolo que se utilizó para realizar el repique de la monocapa celular al momento en el cual la placa hubiera alcanzado la confluencia:

- A. Retirar el medio de cultivo. Descartar.
- B. Realizar dos lavados con PBS 1X.
- C. Agregar una cantidad suficiente de tripsina para cubrir la monocapa.
- D. Incubar en la estufa a 37° hasta observar levantamiento de células (3-7min).
- E. Frenar la acción de la tripsina con medio 10% de SFB.
- F. Pipetear suavemente hasta obtener una suspensión celular homogénea.
- G. Colocar la suspensión en un tubo falcon de 15ml.
- H. Dividir la suspensión en tantas placas de cultivo como sea necesario.
- I. Agregar el volumen de medio de cultivo adecuado para la placa que se esté utilizando.
- J. Pipetear suavemente para homogeneizar.
- K. Llevar a la estufa de 37°.

### iv. Congelado de células

A continuación se presenta el protocolo que se utilizó para realizar el congelado de las células y de esa manera generar el stock inicial:

#### Metodología:

- A. Chequear los siguientes ítems en el cultivo:
  - a. Optimo crecimiento en fase logarítmica.
  - b. Crecimiento libre de contaminaciones.
  - c. Presencia de características típicas de la línea.
- B. Preparar la solución de congelamiento con los siguientes componentes:
  - a. 30% SFB
  - b. 10%DMSO
  - c. 60% medio de cultivo
- C. Mantener en hielo hasta el momento de uso.
- D. Retirar el medio de cultivo de la monocapa.
- E. Realizar dos lavados con PBS 1X.

- F. Agregar una cantidad suficiente de tripsina para cubrir la monocapa.
- G. Incubar en la estufa a 37° hasta observar levantamiento de células (3-7min).
- H. Frenar la acción de la tripsina con medio 10% de SFB.
- I. Pipetear suavemente hasta obtener una suspensión celular homogénea.
- J. Colocar la suspensión en un tubo falcon.
- K. Repetir pasos A a J para todas las placas que se deseen congelar y reunir todas los resuspendidos en un mismo tubo.
- L. Centrifugar durante 5 minutos a 1200 rpm.
- M. Descartar el sobrenadante
- N. Resuspender el pellet de células en la solución de congelamiento.
- O. Colocar 1 ml de la suspensión celular conteniendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  cs/mL (ver protocolo de recuento en la sección 5.6) por vial de plástico
- P. Posicionar los viales en los dispositivos de congelamiento. Estos dispositivos deben estar acondicionados con algodón. El objetivo es que la temperatura de cada vial descienda lentamente en 1°C por minuto aproximadamente. Llevar al freezer de -70°C por 24 horas.
- Q. Colocar los viales en el tanque de nitrógeno (196°C).

**v. Descongelado de células**

A continuación se presenta el protocolo que se utilizó para el descongelado de las células:

Metodología:

- A. Tomar un vial de células congeladas y descongelarlo rápido colocándolo en el baño termostático a 37°C o mantenerlo en la mano haciendo movimientos rotatorios leves, o bajo canilla con agua apenas tibia. Anotar el nombre de la línea y número de pasaje.
- B. Rociarlo con etanol 70% y llevarlo bajo la campana.
- C. Tomar un tubo falcon de 15 ml y cargar con pipeta 9 ml de medio de cultivo termostatzado a 37°.
- D. Destapar cuidadosamente el vial de células y con pipeta de 5 o 2 ml pasar las células al tubo falcon de 15 ml.

- E. Tapar el tubo falcon y centrifugar las células a 1.200 rpm por 10 minutos o hasta observar un pellet celular en la base del tubo.
- F. Rociar el tubo falcon con etanol 70% y llevarlo nuevamente a la campana de flujo laminar.
- G. Retirar por inversión el medio de cultivo y resuspender por pipeteo suave para no generar burbujas el pellet de células con 7 ml de medio de cultivo con suero. Con este material resuspendido se procede al conteo celular de acuerdo al protocolo mencionado en el apartado siguiente.
- H. Plaquear la cantidad de células deseadas en las placas. Rotular con el nombre de la línea, pasaje y fecha.
- I. Incubar en estufa a 37°C.

#### **vi.    Conteo celular en cámara de Neubauer**

A continuación se presenta el protocolo que se utilizó para el conteo de las células en cámara de Neubauer:

##### Metodología:

- A. Tomar una pequeña alícuota del resuspendido celular obtenido (20µL). Y agregarle 10µL de azul de tripán. La coloración con azul de tripán permite distinguir las células viables de las que no lo son, dado que estas últimas han perdido su permeabilidad selectiva y se tiñen de azul mientras que las células viables permanecen incoloras.
- B. Lavar la cámara de Neubauer con abundante agua, secar y luego rociarla con etanol 70°. Mojar los bordes de la cámara con agua y colocar el vidrio encima.
- C. Tomar 10 ul de la suspensión de células con tripan blue y cargar la cámara de Neubauer.
- D. Contar las células viables (incoloras con refringencia verdosa) contenidas en cada uno de los cuadrados y estimar la concentración de células en la suspensión utilizando la fórmula planteada anteriormente. Este valor será representativo del número de células viables contenidas en 1 ml de suspensión.



## II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO – COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS

### i. ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR MEDIANTE SOFTWARE JS1

Para poder aplicar la prueba T se deben analizar los datos y verificar los supuestos.

En primer lugar, se analizó la estadística descriptiva a partir de las medidas resumen, las cuales describen estadísticamente a los datos de las variables, e incluyen la media, mediana, el coeficiente de variación, desvío estándar, el mínimo y máximo valor (**Tabla VII**).

**Tabla VII. Medidas resumen de la variable en estudio.** Estadística descriptiva del porcentaje de ocupación en los diferentes tiempos, según el tiempo de toma de fotografía. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Variable	n*	Media	D.E.**	Var(n-1)***	CV****	Mín.	Máx.	Mediana
% Ocupación Control T0	10	0	0	0		0	0	0
% Ocupación Magneto T0	10	0	0	0		0	0	0
% Ocupación Control T21	10	53,59	15,52	240,96	28,97	32,44	75,34	51,28
% Ocupación Magneto T21	10	54,9	13,97	195,11	25,44	38,04	75,44	55,53
% Ocupación Control T26	10	83,78	4,49	20,14	5,36	78,59	92,26	82,54
% Ocupación Magneto T26	10	77,88	8,51	72,42	10,93	58,19	85,21	81,08
% Ocupación Control T32	10	92,05	3,9	15,22	4,24	86,18	97,88	92,69
% Ocupación Magneto T32	10	91,66	4	16,03	4,37	80,43	93,79	92,84
% Ocupación Control T42	10	95,23	2,94	8,62	3,08	91,04	99,14	95,88
% Ocupación Magneto T42	10	95,78	2,1	4,4	2,19	90,1	97,88	96,26

\*n: Población de cada tratamiento

\*\* DE: Desvío estándar

\*\*\* Var(n-1): Varianza

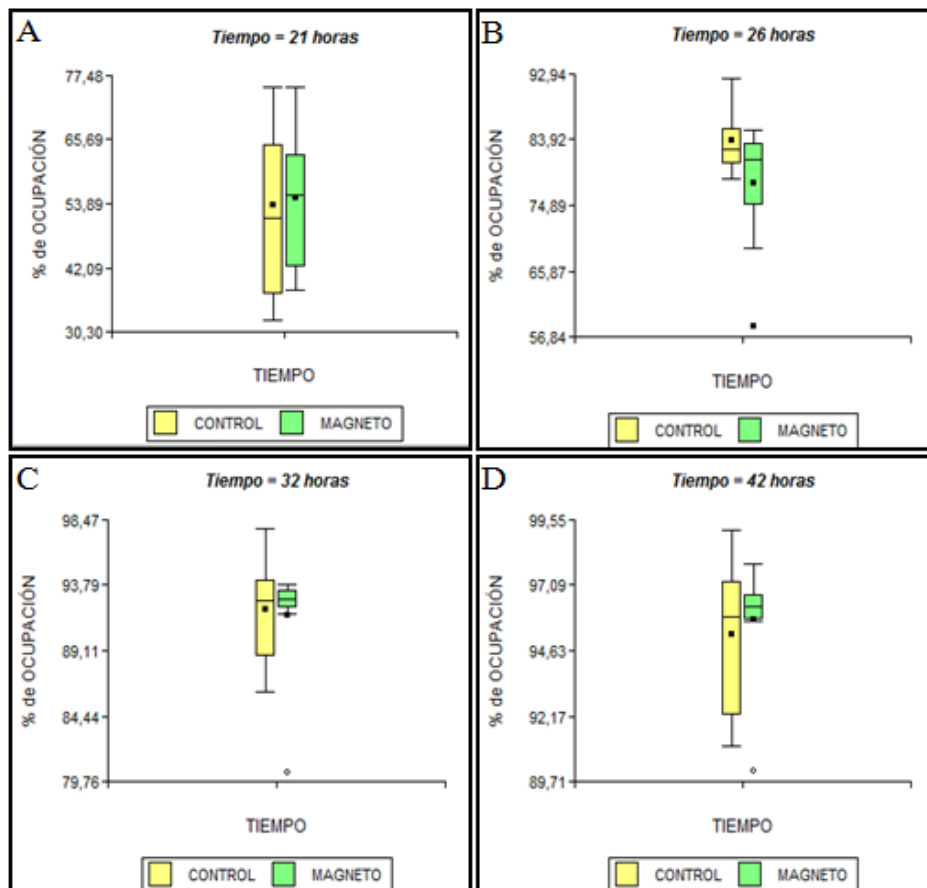
\*\*\*\*CV: Coeficiente de variación

Tendencia central: Se comparan algunas de las medidas mencionadas, las cuales son la media y mediana. De acuerdo a lo que se puede ver en la **Tabla VII**, a tiempo 0 el porcentaje medio de ocupación era del 0% y es igual en el caso del control y en el caso del tratamiento magnético, dado que los datos fueron normalizados al tiempo 0. Con el paso del tiempo el porcentaje medio de ocupación aumenta, tal como se esperaba dado que las células migran y ocupan el espacio libre. El porcentaje de aumento se nota muy similar en el caso del control y en el caso del tratamiento, con variaciones muy pequeñas. En el caso de las medianas el comportamiento es similar.

Variabilidad: Se evalúa teniendo en cuenta el desvío estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (CV). El desvío estándar varía a medida que pasa el tiempo. Este describe en

promedio cuánto se alejan los datos de la media. Se observa que el desvío va disminuyendo en el tiempo. Esto puede tener que ver con que con el paso del tiempo las células llegan a ocupar prácticamente la totalidad del espacio, y los datos que se obtienen son más parejos en todos los casos. El coeficiente de variación indica la relación entre el desvío estándar y la media, y permite medir la dispersión de los datos independientemente de las unidades que se utilicen. Es aceptable hasta un valor de 20% de CV, por lo tanto podemos decir que los datos parecerían ser homogéneos, dado que a excepción de un caso (a tiempo 21 horas), todos los demás coeficientes de variación observados son inferiores a un valor del 20%.

La descripción gráfica de la muestra se realizó a través de los gráficos de Box-plot que se presentan en la figura a continuación (**Figura 29**). Este tipo de gráficos nos permite observar la relación entre la media y la mediana así como también la presencia de datos atípicos.



**Figura 29. Estadística descriptiva del ensayo de migración.** Box-plot del porcentaje de ocupación, a tiempo 21 (A), 26 (B), 32 (C) y 42(D) horas. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Las medias de los datos de las variables son similares a sus medianas correspondientes en casi todos los casos. Tal como se esperaba, se observa que los valores de tendencia central aumentan con el paso del tiempo.

En los box-plot se observan tres datos atípicos u outliers, todos estos aparecen en los casos en que las muestras fueron sometidas al tratamiento magnético y corresponden a los tiempos 26, 32 y 42 horas posteriores al tratamiento.

Una vez efectuada la estadística descriptiva de los datos, se procedió a realizar el análisis estadístico mediante la prueba elegida. Para la prueba T de muestras dependientes o pareadas se plantearon las hipótesis estadísticas. Para cada uno de los tiempo se planteó una hipótesis de no efecto o nula ( $H_0$ ), la cual supone que no hay una variación entre las condiciones evaluadas o, dicho de otra forma, que no hay efecto producido por el tratamiento. A su vez, se planteó para cada tiempo una hipótesis de efecto ( $H_1$ ), la cual suele coincidir con la hipótesis de experimentación planteada en un trabajo de investigación. Aplicado a este ensayo en particular, sería:

$H_0$ : El tratamiento magnético no tiene efecto en el proceso de migración celular.

$$\begin{aligned} \mu \text{ diferencia a tiempo 21 horas} &= 0 \\ \mu \text{ diferencia a tiempo 26 horas} &= 0 \\ \mu \text{ diferencia a tiempo 32 horas} &= 0 \\ \mu \text{ diferencia a tiempo 42 horas} &= 0 \end{aligned}$$

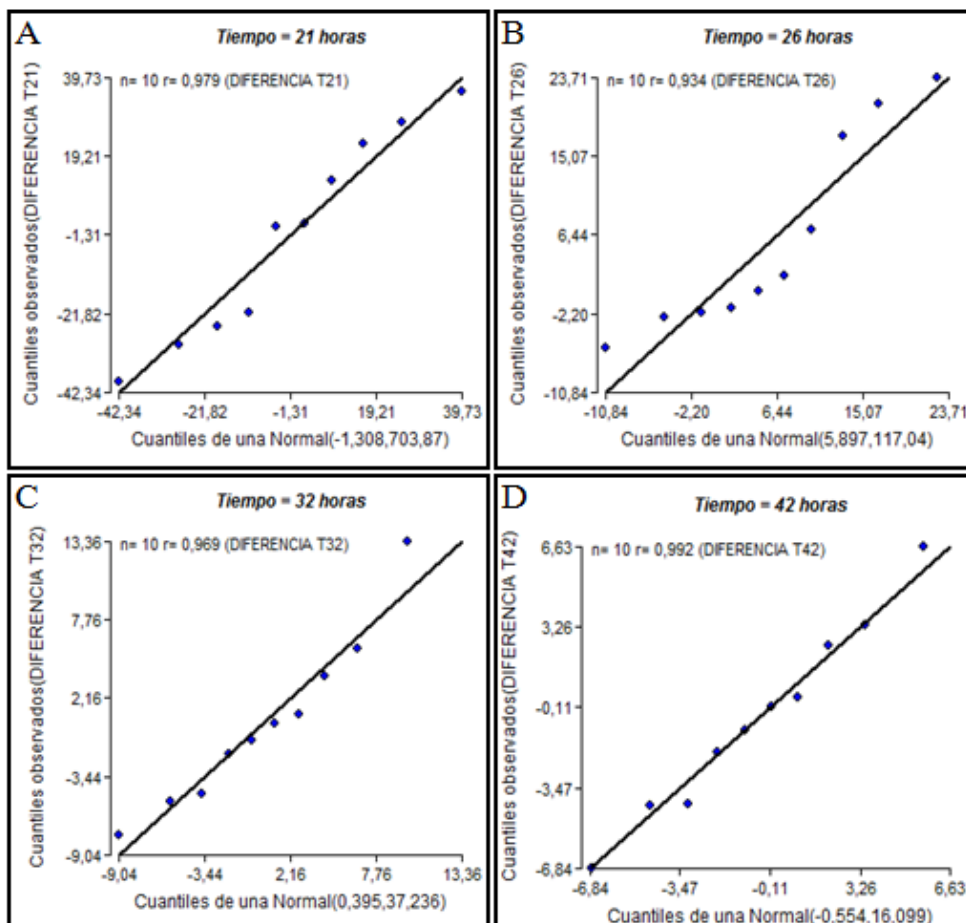
$H_1$ : El tratamiento magnético si tiene efecto en el proceso de migración celular

$$\begin{aligned} \mu \text{ diferencia a tiempo 21 horas} &\neq 0 \\ \mu \text{ diferencia a tiempo 26 horas} &\neq 0 \\ \mu \text{ diferencia a tiempo 32 horas} &\neq 0 \\ \mu \text{ diferencia a tiempo 42 horas} &\neq 0 \end{aligned}$$

Previo a la aplicación de la prueba estadística, se procedió a verificar que se cumplan los supuestos necesarios para poder utilizarla. En este ensayo, la escala de la variable es de razón, las muestras son aleatorias y las observaciones son independientes. Para analizar la normalidad de las variables se dispone de un método gráfico y de otro analítico. Para el primero, se realiza un gráfico Q-Q plot, en el cual se observa cuán bien se ajustan los datos a

una recta, sugiriendo una distribución normal. Para el método analítico, se procede a realizar la prueba de Shapiro-Wilks.

En el gráfico Q-Q plot que se presenta debajo (**Figura 30**), se observa cómo se encuentran distribuidas las diferencias respecto a la recta  $X=Y$ . En este caso, cuando se hace habla de “diferencias”, nos referimos al valor obtenido de la resta entre el % de ocupación en la muestra que no recibió tratamiento magnético y el porcentaje de ocupación en la misma muestra que si recibió tratamiento, en un mismo tiempo, y se realiza de dicha manera debido a que la prueba estadística así lo requiere. Analizando los mismos es posible advertir que en los tiempos 21, 32 y 42 horas, los datos parecen ajustarse a una distribución normal. Sin embargo, no se percibe lo mismo en el tiempo 26 horas.



**Figura 30. Gráficos Q-Q plot de las diferencias en los distintos tratamientos.** Q-Q plot de las diferencias en los tiempos 21 (A), 26 (B), 32 (C) y 42 (D) horas. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Para confirmar lo observado anteriormente, se procedió a realizar la prueba analítica de Shapiro-Wilks. En esta prueba, se plantea como hipótesis nula ( $H_0$ ) que las diferencias se comportan normalmente:

$H_0$ : Las diferencias (% de ocupación control a tiempo n - % de ocupación magneto a tiempo n) poseen buen ajuste a una distribución normal.

La condición de rechazo de  $H_0$  es que el p-valor obtenido sea menor al nivel de significación establecido (0,05). En caso de rechazarse se concluye que las diferencias de la variable no se comportan normalmente.

A continuación se presenta la tabla obtenida con los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (**Tabla VIII**):

**Tabla VIII. Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks.** Se consideraron significativas aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ . Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Variable	n*	Media	D.E.**	W	p(Unilateral D)
Diferencia del % de ocupación a tiempo 21 horas	10	-1,31	26,53	0,91	0,402
Diferencia del % de ocupación a tiempo 26 horas	10	5,9	10,82	0,83	0,044
Diferencia del % de ocupación a tiempo 32 horas	10	0,4	6,1	0,95	0,744
Diferencia del % de ocupación a tiempo 42 horas	10	-0,55	4,01	0,98	0,955

\*n: Población de cada tratamiento

\*\*D.E.: Desvío estándar

Como se puede observar en la **Tabla VIII**, se cumple el supuesto de normalidad en los tiempos 21, 32 y 42 horas, habiéndose obtenido un p-valor mayor al nivel de significación establecido (0,05). Sin embargo, se concluye que en el tiempo 26 horas no se cumple la normalidad, lo cual se infiere en función de que el p-valor obtenido es inferior al nivel de significación establecido.

**ii. ENSAYO DE SCRATCHING CELULAR MEDIANTE MÉTODO MANUAL**

Para poder aplicar la prueba T se deben analizar los datos y verificar los supuestos.

En primer lugar, se analizó la estadística descriptiva a partir de las medidas resumen, las cuales describen estadísticamente a los datos de las variables, e incluyen la media, mediana, el coeficiente de variación, desvío estándar, el mínimo y máximo valor (**Tabla IX**).

**Tabla IX. Medidas resumen de la variable en estudio.** Estadística descriptiva del porcentaje de ocupación, según el tiempo de toma de fotografía. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Variable	n*	Media	D.E.**	Var(n-1)***	CV****	Mín.	Máx.	Mediana
% de Ocupación Control T0	11	0	0	0		0	0	0
% de Ocupación Magneto T0	11	0	0	0		0	0	0
% de Ocupación Control T21	11	68,45	13,96	194,87	20,39	52	92	67
% de Ocupación Magneto T21	11	63,45	17,48	305,67	27,55	43	91	56
% de Ocupación Control T26	11	79,64	13,43	180,25	16,86	55	92	86
% de Ocupación Magneto T26	11	76	16,22	263	21,34	52	94	81
% de Ocupación Control T32	11	91,91	5,61	31,49	6,11	81	100	93
% de Ocupación Magneto T32	11	89,64	8,36	69,85	9,32	78	100	88
% de Ocupación Control T42	11	100	0	0	0	100	100	100
% de Ocupación Magneto T42	11	100	0	0	0	100	100	100

\*n: Población de cada tratamiento

\*\* DE: Desvío estándar

\*\*\* Var(n-1): Varianza

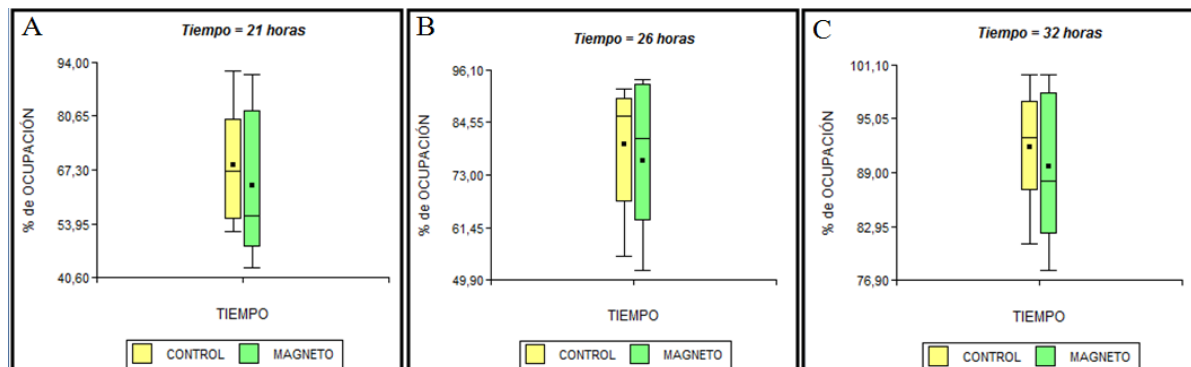
\*\*\*\*CV: Coeficiente de variación

Tendencia central: Se comparan algunas de las medidas mencionadas, las cuales son la media y mediana. De acuerdo a lo que se puede ver en la **Tabla IX**, a tiempo 0 el porcentaje medio de ocupación era del 0% y es igual en el caso del control y en el caso del tratamiento magnético, dado que los datos fueron normalizados al tiempo 0. Con el paso del tiempo el porcentaje medio de ocupación aumenta, tal como se esperaba dado que las células migran y ocupan el espacio libre. El porcentaje de aumento se nota muy similar en el caso del control y en el caso del tratamiento, con variaciones muy pequeñas. En el caso de las medianas el comportamiento es similar.

Variabilidad: Se evalúa teniendo en cuenta el desvío estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV). El desvío estándar varía a medida que pasa el tiempo. Este describe en

promedio cuánto se alejan los datos de la media. Se observa que el desvío va disminuyendo en el tiempo. Esto puede tener que ver con que con el paso del tiempo las células llegan a ocupar prácticamente la totalidad del espacio, y los datos que se obtienen son más parejos. El coeficiente de variación indica la relación entre el desvío estándar y la media, y permite medir la dispersión de los datos independientemente de las unidades que se utilicen. Es aceptable hasta un valor de 20% de CV, por lo tanto podemos decir que los datos parecerían ser homogéneos, dado que a excepción de un caso (a tiempo 21 horas, del tratamiento magnético), todos los demás coeficientes de variación observados son inferiores a un valor del 20%.

La descripción gráfica de la muestra se realizó a través de los gráficos de Box-plot que se presentan en la figura a continuación (**Figura 31**). Este tipo de gráficos nos permite observar la relación entre la media y la mediana así como también la presencia de datos atípicos.



**Figura 31. Estadística descriptiva del ensayo de migración.** Box-plot del porcentaje de ocupación, a tiempo 21 (A), 26 (B) y 32 (C) horas. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Las medias de los datos de las variables son similares a sus medianas correspondientes en casi todos los casos. Tal como se esperaba, se observa que los valores de tendencia central aumentan con el paso del tiempo. En los box-plot no se observan datos atípicos u outliers.

Una vez efectuada la estadística descriptiva de los datos, se procedió a realizar el análisis estadístico mediante la prueba elegida. Para la prueba T de muestras dependientes o pareadas se plantearon las hipótesis estadísticas. Para cada uno de los tiempo se planteó una hipótesis de no efecto o nula ( $H_0$ ), la cual supone que no hay una variación entre las condiciones evaluadas o, dicho de otra forma, que no hay efecto producido por el tratamiento.



A su vez, se planteó para cada tiempo una hipótesis de efecto ( $H_1$ ), la cual suele coincidir con la hipótesis de experimentación planteada en un trabajo de investigación. Aplicado a este ensayo en particular, sería:

$H_0$ : El tratamiento magnético no tiene efecto en el proceso de migración celular.

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 21 horas} = 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 26 horas} = 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 32 horas} = 0$$

$H_1$ : El tratamiento magnético si tiene efecto en el proceso de migración celular

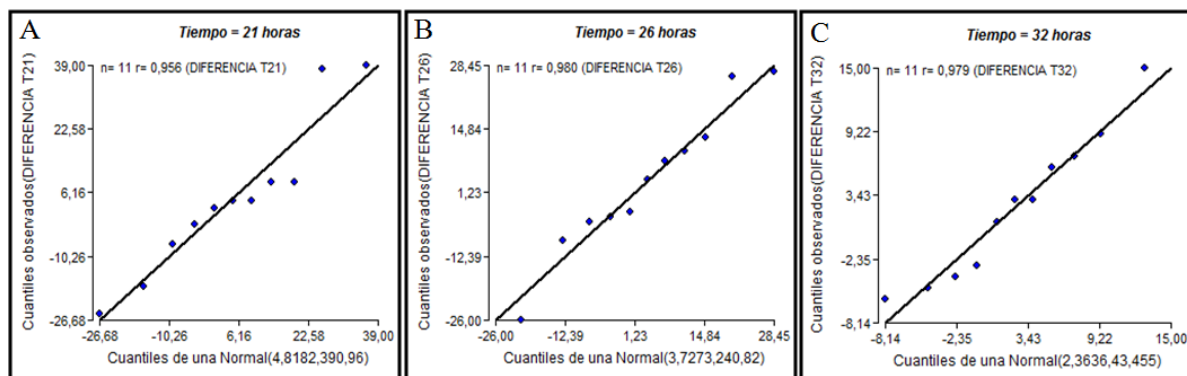
$$\mu \text{ diferencia a tiempo 21 horas} \neq 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 26 horas} \neq 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 32 horas} \neq 0$$

Previo a la aplicación de la prueba estadística, se procedió a verificar que se cumplan los supuestos necesarios para poder utilizarla. En este ensayo, la escala de la variable es de razón, las muestras son aleatorias y las observaciones son independientes. Para analizar la normalidad de las variables se dispone de un método gráfico y de otro analítico. Para el primero, se realiza un gráfico Q-Q plot, en el cual se observa cuán bien se ajustan los datos a una recta, sugiriendo una distribución normal. Para el método analítico, se procede a realizar la prueba de Shapiro-Wilks.

En el gráfico Q-Q plot que se presenta debajo (**Figura 32**), se observa cómo se encuentran distribuidas las diferencias respecto a la recta  $X=Y$ . Analizando los mismos es posible advertir que en los todos los tiempos los datos parecen ajustarse a una distribución normal.



**Figura 32. Gráficos Q-Q plot de las diferencias en los distintos tratamientos.** Q-Q plot de las diferencias a tiempo 21 (A), 26 (B) y, 32 (C) horas. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Para confirmar lo observado anteriormente, se procedió a realizar la prueba analítica de Shapiro-Wilks. En esta prueba, se plantea como hipótesis nula ( $H_0$ ) que las diferencias se comporta normalmente:

$H_0$ : Las diferencias (% de ocupación control a tiempo n - % de ocupación magneto a tiempo n) poseen buen ajuste a una distribución normal.

La condición de rechazo de  $H_0$  es que el p-valor obtenido sea menor al nivel de significación establecido (0,05). En caso de rechazarse se concluye que las diferencias de la variable no se comportan normalmente.

A continuación se presenta la tabla obtenida con los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (**Tabla X**):

**Tabla X. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks.** Esta prueba permite evaluar la normalidad de la variable. Se consideraron significativas aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ . Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Variable	n*	Media	D.E.**	W	p(Unilateral D)
Diferencia del % de ocupación a tiempo 21 horas	11	4,82	19,77	0,9	0,311
Diferencia del % de ocupación a tiempo 26 horas	11	3,73	15,52	0,95	0,800
Diferencia del % de ocupación a tiempo 32 horas	11	2,36	6,59	0,93	0,571

\*n: Población de cada tratamiento

\*\*D.E.: Desvío estándar

Como se puede observar en la **Tabla X**, se cumple el supuesto de normalidad en todos los tiempos (21, 26 y 32 horas) habiéndose obtenido un p-valor mayor al nivel de significación establecido (0,05).

### iii. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Para poder aplicar la prueba T antes se deben analizar los datos y comprobar los supuestos.

A continuación se analizó la estadística descriptiva a partir de las medidas resumen, las cuales describen estadísticamente a los datos de las variables, e incluyen la media, mediana, el coeficiente de variación, desvío estándar, el mínimo y máximo valor (**Tabla XI**).

**Tabla XI. Medidas resumen de la variable en estudio.** Estadística descriptiva de la variable absorbancia, según el tiempo de realización del ensayo de viabilidad por MTS. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Variable	n*	Media	D.E.**	Var(n-1)***	CV****	Mín.	Máx.	Mediana
<b>Abs. control T0</b>	3	0,043	2,50E-03	6,30E-06	5,9	0,04	0,05	0,04
<b>Abs. magneto T0</b>	3	0,043	3,10E-03	9,30E-06	7,05	0,04	0,05	0,04
<b>Abs. control T26</b>	3	0,055	3,10E-03	9,30E-06	5,52	0,05	0,06	0,06
<b>Abs. magneto T26</b>	3	0,067	0,02	4,10E-04	30,08	0,05	0,09	0,06
<b>Abs. control T33</b>	3	0,061	4,00E-03	1,60E-05	6,59	0,06	0,07	0,06
<b>Abs. magneto T33</b>	3	0,066	0,01	6,50E-05	12,31	0,06	0,07	0,07
<b>Abs. control T45</b>	3	0,104	0,02	4,20E-04	19,7	0,08	0,12	0,11
<b>Abs. magneto T45</b>	3	0,095	0,02	6,00E-04	25,87	0,07	0,11	0,11

\*n: Población de cada tratamiento

\*\* DE: Desvío estándar

\*\*\* Var(n-1): Varianza

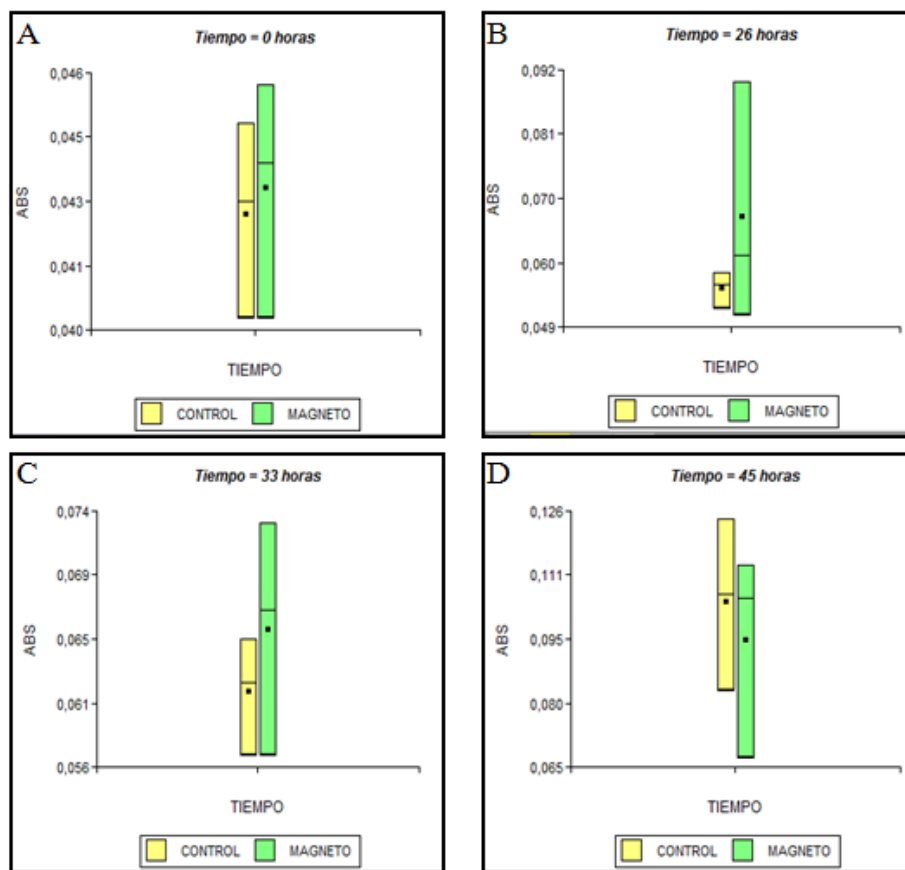
\*\*\*\*CV: Coeficiente de variación

Tendencia central: Se comparan algunas de las medidas mencionadas, las cuales son la media y mediana. De acuerdo a lo que se puede ver en la **Tabla XI**, a tiempo 0 la absorbancia media es de 0,043 y es igual en el caso del control y en el caso del tratamiento magnético. En el tiempo 26 horas es de 0,055 en el caso del control, y de 0,067 en el caso del tratamiento magnético. En el tiempo 33 horas la absorbancia media del control es de 0,061, mientras que en el tratamiento de 0,066 y finalmente, en el tiempo 45 horas de 0,104 para el control y de 0,095 en el caso del tratamiento magnético; es decir que las absorbancias medias van aumentando a medida que aumenta el tiempo al cual se realiza el ensayo de viabilidad con MTS, y parecen aumentar en forma pareja y ser similares entre los casos control y tratamiento magnético, sugiriendo que no hay diferencias entre los mismos.

Variabilidad: Se evalúa teniendo en cuenta el desvío estándar (D.E.) y el coeficiente

de variación (CV). El desvío estándar es variado en los diferentes tiempos posteriores al ensayo. Describe en promedio cuánto se alejan los datos de la media, y se observa que en los casos de los tiempos mayores el mismo es mayor. El coeficiente de variación indica la relación entre el desvío estándar y la media, y permite medir la dispersión de los datos independientemente de las unidades que se utilicen. Es aceptable hasta un valor de 20% de CV, por lo tanto podemos decir que los datos parecen ser homogéneos en la mayoría de los casos, ya que, a excepción de un caso, los valores del CV no superan el 20%.

La descripción gráfica de la muestra se realizó a través de los gráficos de Box-plot que se presentan a continuación (**Figura 33**). Este tipo de gráficos nos permite observar la relación entre la media y la mediana así como también la presencia de datos atípicos.



**Figura 33. Estadística descriptiva del ensayo de viabilidad por MTS.** Box-plot de la absorbancia medida en cada caso en función tiempo, a tiempo 0 (A), 26 (B), 33 (C) y 45 (D) horas. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Las medias de los datos de las variables son similares a sus medianas correspondientes en casi todos los casos. Tal como se puede evidenciar en la **Tabla XI**, los desvíos estándar son muy pequeños, y es por ello que no se pueden apreciar en los gráficos anteriores. Se observa que los valores de tendencia central aumentan con el paso del tiempo. En el box-plot no se observan datos atípicos.

Una vez efectuada la estadística descriptiva de los datos, se procedió a realizar el análisis estadístico mediante la prueba elegida. Para la prueba T de muestras dependientes o pareadas se plantearon las hipótesis estadísticas. Para cada uno de los tiempo se planteó una hipótesis de no efecto o nula ( $H_0$ ), la cual supone que no hay una variación entre las condiciones evaluadas o, dicho de otra forma, que no hay efecto producido por el tratamiento. A su vez, se planteó para cada tiempo una hipótesis de efecto ( $H_1$ ), la cual suele coincidir con la hipótesis de experimentación planteada en un trabajo de investigación. Aplicado a este ensayo en particular, sería:

$H_0$ : El tratamiento magnético no tiene efecto en la proliferación celular.

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 0 horas} = 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 26 horas} = 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 33 horas} = 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 45 horas} = 0$$

$H_1$ : El tratamiento magnético si tiene efecto en la proliferación celular.

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 0 horas} \neq 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 26 horas} \neq 0$$

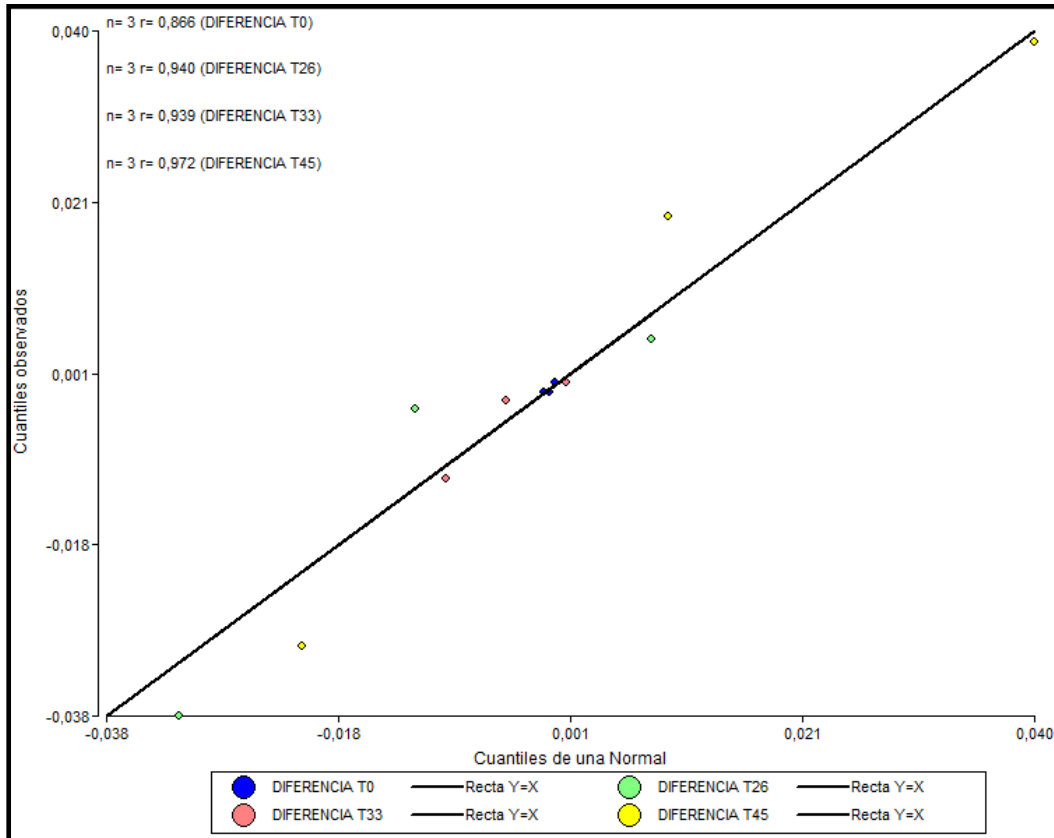
$$\mu \text{ diferencia a tiempo 33 horas} \neq 0$$

$$\mu \text{ diferencia a tiempo 45 horas} \neq 0$$

Previo a la aplicación de la prueba estadística, se procedió a verificar que se cumplan los supuestos necesarios para poder utilizarla. En este ensayo, la escala de la variable es de razón, las muestras son aleatorias y las observaciones son independientes. Para analizar la normalidad de las variables se dispone de un método gráfico y de otro analítico. Para el primero, se realiza un gráfico Q-Q plot, en el cual se observa cuán bien se ajustan los datos a una recta, sugiriendo una distribución normal. Para el método analítico, se procede a realizar

la prueba de Shapiro-Wilks.

En el gráfico Q-Q plot que se presenta debajo (**Figura 34**), se observa cómo se encuentran distribuidas las diferencias respecto a la recta  $X=Y$ . Analizando los mismos es posible observar que en todos los tiempos los datos parecen ajustarse a una distribución normal.



**Figura 34. Gráfico Q-Q plot de las diferencias en los distintos tiempos.** Q-Q plot de las diferencias en los tiempos 0 (azul), 26 (verde), 33 (rosa) y 45 (amarillo) horas. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Para confirmar lo observado anteriormente, se procedió a realizar la prueba analítica de Shapiro-Wilks. En esta prueba, se plantea como hipótesis nula ( $H_0$ ) que las diferencias se comporta normalmente:

$H_0$ : Las diferencias (promedio de absorbancias control a tiempo  $n$  – promedio de absorbancias magneto a tiempo  $n$ ) poseen buen ajuste a una distribución normal.

La condición de rechazo de  $H_0$  es que el  $p$ -valor obtenido sea menor al nivel de significación (0,05). En caso de rechazarse se concluye que las diferencias de la variable no se

comportan normalmente.

A continuación se presenta la tabla obtenida con los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (**Tabla XII**):

**Tabla XII. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks.** Esta prueba permite evaluar la normalidad de la variable. Se consideraron significativas aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ . Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Variable	n*	Media	D.E.**	W	p(Unilateral D)
Diferencia de absorbancias en tiempo 0 horas	3	-6,70E-04	5,80E-04	0,75	<0,0001
Diferencia de absorbancias en tiempo 26 horas	3	-1,00E-02	0,02	0,88	0,3344
Diferencia de absorbancias en tiempo 33 horas	3	-4,30E-03	0,01	0,88	0,3245
Diferencia de absorbancias en tiempo 45 horas	3	0,01	0,04	0,94	0,5451

\*n: Población de cada tratamiento

\*\*D.E.: Desvío estándar

Como se puede observar en la **Tabla XII**, se cumple el supuesto de normalidad en los tiempos 26, 33 y 45 horas, habiéndose obtenido un p-valor mayor al nivel de significación establecido (0,05). Sin embargo, se concluye que en el tiempo 0 horas no se cumple la normalidad, lo cual se infiere en función de que el p-valor obtenido es inferior al nivel de significación establecido.



### III. TABLAS

#### i. TABLAS DE LAS MEDICIONES POR SOFTWARE DEL ENSAYO DE MIGRACIÓN

**Tabla XIII. Datos completos de las mediciones del ensayo de migración realizadas mediante software.**

ENSAYO	TRATAMIENTO	% de OCUPACIÓN				
		Tiempo 0	Tiempo 21	Tiempo 26	Tiempo 32	Tiempo 42
1	CONTROL	0	50,98	83,18	92,77	96,13
1	MAGNETO	0	38,04	81,27	91,78	96,22
2	CONTROL	0	75,34	85,21	94,14	97,21
2	MAGNETO	0	39,09	78,21	93,74	96,92
3	CONTROL	0	64,85	92,26	96,68	98,82
3	MAGNETO	0	42,19	74,9	92,99	96,3
4	CONTROL	0	73,21	89,91	97,88	99,14
4	MAGNETO	0	44,92	69,03	92,2	95,82
5	CONTROL	0	49,68	81,9	93,79	96,73
5	MAGNETO	0	48,72	58,19	80,43	90,1
6	CONTROL	0	37,17	79,34	92,6	95,62
6	MAGNETO	0	62,34	80,9	93,44	96,7
7	CONTROL	0	67,36	86,68	89,08	93,07
7 <sup>4</sup>	MAGNETO	0	97,44	72,33	93,83	98,16
8	CONTROL	0	51,58	78,59	86,18	91,04
8	MAGNETO	0	72,92	84,57	93,79	97,88
9	CONTROL	0	35,84	80,55	86,96	91,54
9	MAGNETO	0	75,44	83,12	92,21	95,76
10	CONTROL	0	32,44	85,46	88,65	92,2
10	MAGNETO	0	62,36	85,21	93,31	96,32
11 <sup>5</sup>	CONTROL	0	36,51	82,86	89,75	93,55
11	MAGNETO	0	62,69	83,64	92,12	95,15
12	CONTROL	0	64,8	81,35	90,88	93,85
12	MAGNETO	0	62,95	83,38	92,69	95,8

<sup>4</sup> Los datos de este ensayo no fueron tenidos en cuenta debido a que existió un error en el procesamiento de imágenes, arrojando el software datos erróneos debido a falta de contraste en una de las imágenes.

<sup>5</sup> Los datos de este ensayo no fueron tenidos en cuenta ya que existió un error en la realización del ensayo, obteniéndose datos erróneos.

**ii. TABLAS DE LAS MEDICIONES POR MÉTODO CASERO DEL ENSAYO DE MIGRACIÓN**

**Tabla XIV. Datos completos de las mediciones del ensayo de migración realizadas mediante método casero.**

ENSAYO	TRATAMIENTO	% de OCUPACIÓN				
		Tiempo 0	Tiempo 21	Tiempo 26	Tiempo 32	Tiempo 42
1	CONTROL	0	55	70	86	100
1	MAGNETO	0	46	57	79	100
2	CONTROL	0	60	90	93	100
2	MAGNETO	0	56	64	84	100
3	CONTROL	0	87	90	94	100
3	MAGNETO	0	48	83	88	100
4	CONTROL	0	92	92	97	100
4	MAGNETO	0	54	64	82	100
5	CONTROL	0	52	62	81	100
5	MAGNETO	0	43	52	78	100
6	CONTROL	0	55	55	87	100
6	MAGNETO	0	62	81	87	100
7	CONTROL	0	57	67	90	100
7	MAGNETO	0	53	63	93	100
8	CONTROL	0	80	90	97	100
8	MAGNETO	0	82	94	100	100
9	CONTROL	0	71	86	91	100
9	MAGNETO	0	88	91	97	100
10	CONTROL	0	67	85	95	100
10	MAGNETO	0	91	94	100	100
11 <sup>6</sup>	CONTROL	0	74	100	100	100
11	MAGNETO	0	94	96	98	100
12	CONTROL	0	77	89	100	100
12	MAGNETO	0	75	93	98	100

<sup>6</sup> Los datos de este ensayo no fueron tenidos en cuenta ya que existió un error en la realización del ensayo, obteniéndose datos erróneos.

**iii. TABLAS DE LAS MEDICIONES DEL ENSAYO DE PROLIFERACIÓN**

**Tabla XV. Datos completos de las mediciones del ensayo de proliferación.**

TIEMPO (horas)	ENSAYO 1		ENSAYO 2		ENSAYO 3	
	ABS CONTROL	ABS MAGNETO	ABS CONTROL	ABS MAGNETO	ABS CONTROL	ABS MAGNETO
0	0,046	0,049	0,049	0,051	0,039	0,041
	0,045	0,046	0,045	0,052	0,044	0,043
	0,043	0,043	0,048	0,045	0,041	0,038
	0,043	0,044	0,042	0,045	0,039	0,041
	0,041	0,041	0,044	0,042	0,038	0,037
	0,042	0,043	0,044	0,043	0,038	0,038
<b>PROMEDIO TIEMPO 0</b>	0,043	0,044	0,045	0,046	0,040	0,040
26	0,061	0,058	0,054	0,120	0,059	0,056
	0,064	0,077	0,053	0,102	0,058	0,050
	0,060	0,061	0,054	0,092	0,056	0,051
	0,055	0,057	0,049	0,077	0,053	0,051
	0,055	0,056	0,050	0,070	0,052	0,051
	0,055	0,057	0,054	0,080	0,060	0,048
<b>PROMEDIO TIEMPO 26</b>	0,058	0,061	0,052	0,090	0,056	0,051
33	0,066	0,077	0,059	0,071	0,062	0,060
	0,070	0,061	0,062	0,068	0,060	0,056
	0,060	0,089	0,062	0,070	0,054	0,055
	0,065	0,062	0,065	0,070	0,063	0,058
	0,069	0,060	0,063	0,074	0,052	0,056
	0,057	0,052	0,059	0,082	0,052	0,056
<b>PROMEDIO TIEMPO 33</b>	0,065	0,067	0,062	0,073	0,057	0,057
45	0,093	0,120	0,158	0,114	0,121	0,082
	0,081	0,111	0,141	0,129	0,122	0,076
	0,085	0,109	0,140	0,105	0,106	0,069
	0,079	0,127	0,103	0,102	0,102	0,065
	0,093	0,117	0,105	0,090	0,099	0,057
	0,067	0,093	0,095	0,087	0,084	0,051
<b>PROMEDIO TIEMPO 45</b>	0,083	0,113	0,124	0,105	0,106	0,067