

### ***Zona proliferativa.***

Bajo la dirección de alguna señal desconocida, las células de la zona germinal ingresan a la zona proliferativa (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003). Aquí los condrocitos adoptan una apariencia aplanada y comienzan a dividirse (Ballock & O'Keefe, 2003).

Esta zona es rica en matriz, y allí los condrocitos aplanados sufren división celular en dirección longitudinal organizándose en columnas, dirigiendo el crecimiento en una dirección específica (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003; Williams, Robson, & Shalet, 1998; Abad, et al., 2002).

La mayoría de divisiones celulares ocurren en esta zona, la cual contiene a los condrocitos madre, a los cuales siguen las células hijas arregladas a manera de columna bajo ellas (Anderson, Hodges, Aguilera, Missana, & Moylan, 2000).

### ***Zona de maduración.***

En esta zona, la síntesis de matriz extracelular permite que las células que acaban de dividirse se separen entre ellas (Ballock & O'Keefe, 2003). Posteriormente, en algún momento dado, ya sea por un número establecido de divisiones celulares, o por cambios en la exposición a factores de crecimiento, los condrocitos en proliferación pierden su capacidad de dividirse y comienzan a diferenciarse para convertirse en pre-hipertróficos (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003; Williams, Robson, & Shalet, 1998).

### ***Zona hipertrófica.***

En esta zona, la división celular se detiene y los condrocitos comienzan su diferenciación terminal (Ballock & O'Keefe, 2003). Esta se encuentra asociada a un gran incremento en el volumen celular, un marcado incremento en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, y la síntesis y secreción de colágeno tipo X, el cual se encuentra únicamente en la zona hipertrófica de las placas de crecimiento (Ballock & O'Keefe, 2003). Es importante mencionar, que la hipertrofia de los condrocitos tiene un rol importante en el crecimiento longitudinal del esqueleto; siendo responsable del 44-59% del crecimiento de los huesos largos (Ballock & O'Keefe, 2003).

### ***Osificación endocondral.***

Las placas de crecimiento son estructuras esencialmente a vasculares que dependen de vasos sanguíneos ubicados en la zona metafiseal para obtener oxígeno y nutrientes para el metabolismo celular (Ballock & O'Keefe, 2003). Sin embargo, el proceso de mineralización, en combinación con una baja tensión de oxígeno, atrae vasos sanguíneos (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003). De este modo, al final de la pubertad, los condrocitos hipertróficos son invadidos por capilares, y finalmente el cartílago es reemplazado por hueso altamente vascularizado, proceso que se conoce como osificación endocondral (Suzuki, Takase, Takigawa, Uchida, & Shimomura, 1981; Karimian, et al., 2013).

A su vez, la mineralización de la matriz extracelular del cartílago ocurre en un patrón direccional, entre las columnas de condrocitos hipertróficos, donde el mineral que se va depositando consiste principalmente de hidroxapatita (Ballock & O'Keefe, 2003).

En la osificación endocondral, los condrocitos hipertróficos finalmente desaparecen por apoptosis, proceso que se lleva a cabo, a medida que la placa de crecimiento se calcifica (Hughes & Boyce, 1997; Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003; Williams, Robson, & Shalet, 1998). De este modo, mientras el esqueleto se aproxima a su madurez, la tasa de crecimiento longitudinal del hueso disminuye y la proliferación de condrocitos en la placa de crecimiento también (Ballock & O'Keefe, 2003). En los humanos y otros mamíferos, la placa de crecimiento es completamente resorbida luego de la pubertad, dando como resultado la fusión de la epífisis a la metáfisis (Ballock & O'Keefe, 2003).

#### **Moléculas y hormonas que participan en el crecimiento óseo.**

La eliminación de hueso, o resorción, es tarea de los osteoclastos, mientras que la función de los osteoblastos es la de formar hueso nuevo. Sin embargo, ambos procesos no son regulados independientemente (Manolagas, 2000). El desarrollo y diferenciación de los osteoblastos y osteoclastos están controlados por factores de crecimiento y citoquinas producidas en el micro ambiente de la médula ósea, al igual que moléculas de adhesión mediadoras de interacciones célula-célula y célula-matriz (Manolagas, 2000).

Varias hormonas sistémicas y señales mecánicas también ejercen potentes efectos en el desarrollo y diferenciación de los osteoblastos y osteoclastos (Manolagas, 2000). La proliferación y diferenciación de los precursores de las líneas celulares del hueso es controlada por una variedad de factores, los cuales incluyen a la hormona

paratiroidea (PTH), la 1,25-dihidroxitamina D y los esteroides sexuales (Hughes & Boyce, 1997).

### ***Factores de crecimiento.***

Los factores de crecimiento poli peptídicos aparentan desarrollar un rol importante en el desarrollo y crecimiento del tejido óseo (Hauschka, Mavrakos, Iafrazi, Doleman, & Klagsbrun, 1986). Es por ello que cabe mencionar, que el hueso posee una serie de factores de crecimiento, dentro de los cuales se encuentran las BPMs, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factores de crecimiento insulínicos I y II (IGF I/II), y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Salgado, Coutinho, & Reis, 2004).

Los huesos son órganos únicos debido a su abundante matriz extracelular mineralizada, la cual puede secuestrar y modular la acción biológica de factores de crecimiento a través de modos complejos de liberación y presentación a células blanco (Hauschka, Mavrakos, Iafrazi, Doleman, & Klagsbrun, 1986).

### ***Proteínas morfo genéticas del hueso (BPMs).***

Las células osteoprogenitoras pluripotentes producen una clase de proteínas conocidas como BPMs, por sus siglas en inglés (bone morphogenetic proteins), las cuales están íntimamente ligadas al colágeno (Braddock, Houston, Campbell, & Ashcroft, 2001). Estas proteínas pertenecen a la súper familia de factores de crecimiento peptídicos, y en conjunto con otros factores de crecimiento, citoquinas, y hormonas, inducen la migración, proliferación y diferenciación de células

mesenquimales en células formadoras de hueso (Braddock, Houston, Campbell, & Ashcroft, 2001).

Un ejemplo de estas proteínas es la BPM-4, que es sintetizada por osteoblastos y es capaz de estimular la actividad de la fosfatasa alcalina y la expresión de la osteocalcina; ambos están asociados con el desarrollo fenotípico del osteoblasto maduro (Patterson, et al., 2006). Otro ejemplo es la BPM-2, que estimula el crecimiento longitudinal del hueso mediante el incremento de la proliferación de condrocitos en la placa de crecimiento, su hipertrofia, y la síntesis de matriz cartilaginosa (De Luca, et al., 2001).

### ***Hormonas.***

Las hormonas sistémicas que mayormente regulan el crecimiento longitudinal del hueso durante la infancia son la hormona de crecimiento (GH), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I), las hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ), y los glucocorticoides (GC), mientras que durante la pubertad los esteroides sexuales (andrógenos y estrógenos) contribuyen mayormente en este proceso (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003; Williams, Robson, & Shalet, 1998).

Adicionalmente, las dos principales hormonas del sistema homeostático del calcio, llamadas PTH y 1,25-dihidroxitamina  $D_3$  ( $1,25-(OH)_2D_3$ ), son potentes estimuladoras de la formación de osteoclastos (Manolagas, 2000). Estas hormonas poseen la habilidad para estimular el desarrollo de los osteoclastos y regular la absorción y excreción de calcio desde el intestino y riñón, respectivamente; siendo los elementos clave para una homeostasis del calcio extracelular (Manolagas, 2000).

*Hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) y hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ).*

Después del nacimiento, la GH es un importante modulador del crecimiento longitudinal del hueso, y junto con el IGF-I, son los jugadores centrales en el eje hipotálamo – hipofisiario de la placa de crecimiento (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003). La secreción de GH desde la hipófisis está estrechamente controlada por la actividad estimuladora de la somatocrina (GHRH) y la actividad inhibidora de la somatostatina, las cuales son liberadas por el hipotálamo (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003). Una vez liberada, la GH actúa sobre su tejido blanco, ya sea directamente, o por medio de dos intermediarios: IGF-I e IGF-II (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003).

Las hormonas tiroideas, por su parte, influyen la secreción de GH, e interactúan con la vía GH-IGF-I a nivel de la placa de crecimiento (Van Der Eerden, Karperien, & Wit, 2003).

*Hormona paratiroidea (PTH).*

Existen dos propiedades importantes del calcio que todos los vertebrados requieren para controlar las concentraciones de este ion libre en los fluidos corporales. Estas son la habilidad del calcio para ligarse a proteínas, y la muy baja solubilidad de los fosfatos de calcio (Talmage & Talmage, 2007). Estas dos propiedades son procesos reversibles, por lo tanto involucran una fase de equilibrio (Talmage & Talmage, 2007).

La PTH, usualmente se considera que actúa incrementando la salida de calcio desde el mineral óseo por medio de la estimulación de la actividad osteoclástica (Talmage & Talmage, 2007). Es así, como la PTH incrementa la tasa de resorción ósea, por lo tanto, incrementa la tasa de remodelación ósea (O'Brien, et al., 2008). De cualquier modo, la liberación de calcio desde el hueso no puede incrementar la concertación de calcio en el líquido extracelular, a menos que exista también un cambio en el nivel de equilibrio establecido por la reacción de las proteínas de la superficie ósea (Talmage & Talmage, 2007).

#### *1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.*

Las acciones dependientes de receptores de la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> han mostrado promover la absorción de calcio a nivel intestinal, suprimir la transcripción de genes encargados de la producción de PTH, regular la expresión de proteínas de la matriz ósea, y promover la diferenciación de osteoclastos (Demay, Sabbagh, & Carpenter, 2007). Sin embargo, la mayor contribución de la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> a la maduración del esqueleto es que promueve la absorción de calcio a nivel intestinal y provee un ambiente metabólicamente óptimo para el crecimiento de los huesos (Demay, Sabbagh, & Carpenter, 2007).

#### *Otros.*

La calcitonina, es otra hormona que regula los huesos, inhibe el desarrollo y la actividad de los osteoclastos y promueve la apoptosis de los mismos (Manolagas, 2000).

Algunas moléculas de adhesión también están involucradas en la migración de células progenitoras de osteoblastos y osteoclastos desde la médula ósea a lugares de

remodelación ósea; al igual que la polarización celular de los osteoclastos, y la iniciación y cese de la resorción ósea (Manolagas, 2000).

### **Metodología**

Este estudio se desarrolló en una estancia en Cumbayá – ciudad de Quito, Ecuador; 70°11'33.11" S; 78°25'42.70"O; 2374 msnm (Google Earth). Se utilizaron 40 cobayos criollos, del criadero San Sebastián de Pastocalle (Vía Laso – Cotopaxi, Ecuador). Se seleccionaron 20 machos de 2 meses de edad y 20 hembras de un mes de edad; estas edades se escogieron debido a que los machos alcanzan la pubertad a los 3-4 meses de edad y la hembras a los 2-3 meses (Suckow, Stevens, & Wilson, 2012).

Los cobayos fueron divididos en cuatro grupos: 1) 10 machos que recibieron tratamiento con PEMFs; 2) 10 machos testigo; 3) 10 hembras que recibieron tratamiento con PEMFs; y 4) 10 hembras testigo; los cuatro grupos se mantuvieron por separado. Todos los cobayos fueron sometidos a los mismos factores ambientales, de manejo, y nutricionales.

### **Tratamiento con PEMFs**

Los cobayos macho seleccionados para recibir tratamiento (n=10) fueron tratados desde los dos meses de edad y los cobayos hembra (n=10) a partir del primer mes de edad. El esquema de tratamiento duró dos meses, que es el tiempo estándar previsto por la literatura para el crecimiento de los cobayos (Suckow, Stevens, & Wilson, 2012). Los dos grupos que recibieron tratamiento fueron expuestos a campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia a diario, durante 2 meses.

Se utilizó un equipo para magnetoterapia marca Seakit, modelo Micro 5, en conjunto con un solenoide para magnetoterapia de 25 cm de diámetro y cuatro bobinas planas. El equipo fue modulado para hacer las terapias diarias, alternando 50 y 100 Hz de modo pulsante durante una hora (como recomendación del Licenciado Fernando Gallego, experto en fisioterapia durante cuarenta y nueve años).

### **Estudio Radiológico**

Se tomaron placas radiográficas de control cada 10 días (como recomendación de la Dra. Graciela Mabel Sterin, Presidenta de la Asociación de Fisiología Veterinaria en Argentina), tanto a los grupos con tratamiento, como a los de control (n=40). Se utilizó una máquina de rayos- X marca Medical X-Ray Radiography System, modelo Sharp Ray LWGF.

Las placas radiográficas fueron tomadas con 50 mA y 50 kV, y se utilizaron proyecciones cráneo caudal y medio lateral del miembro posterior izquierdo; específicamente del fémur y de la tibia. Las placas fueron descargadas y editadas con un procesador digital. Después se realizaron mediciones morfo métricas digitales de los huesos largos del miembro posterior izquierdo (fémur y tibia) con el programa del procesador digital para revelado de placas radiográficas. Las mediciones fueron trazadas desde el punto más distal hasta el punto más proximal de ambos huesos y fueron registradas en centímetros.

Adicionalmente se analizaron y compararon, a manera de análisis radiológico, las placas de todos los grupos para observar si se produjeron cambios a nivel de la placa de

crecimiento (Tabla 1.).

### **Análisis Estadístico**

Este estudio es de tipo cuasi experimental y descriptivo, ya que se manipuló la variable de los animales tratados versus los animales testigo. También es un estudio de tipo cuantitativo, ya que con las mediciones realizadas de los huesos largos, se obtuvo la posibilidad de cuantificar los resultados. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA de dos factores, para establecer si existió una diferencia significativa entre las mediciones del grupo de cobayos tratados con magnetoterapia vs. el grupo de cobayos testigo (Tabla 2).

Adicionalmente se calculó el nivel de riesgo, de que el cartílago de crecimiento se vea afectado por la magnetoterapia, a partir del análisis de riesgo epidemiológico (Tabla 3). Para ello, se utilizaron los datos de las mediciones morfo métricas de la tibia, y se utilizó la fórmula de riesgo relativo.

**Tabla de contención para el cálculo de riesgo relativo**

	Enfermos	Sanos	
Expuestos	a	b	a + b
No expuestos	c	d	c + d
	a + c	b + d	n = a + b + c + d

(Casal & de Antonio, 1999).

El riesgo relativo correspondería a:

$$RR = \frac{\left(\frac{a}{a+b}\right)}{\left(\frac{c}{c+d}\right)}$$

(Casal & de Antonio, 1999).

## Resultados

**Tabla 1.** Interpretación radiológica de las placas de rayos – X realizadas cada 10 días a todos los cobayos en estudio

Control radiológico	Fecha	Hallazgos
1	09-08-2013 Machos (n=20) 10-07-2013 Hembras (n=20)	Se realizaron placas radiográficas de los huesos fémur y tibia, del miembro posterior izquierdo (MPI) de todos los individuos en estudio; se utilizaron las proyecciones cráneo caudal y medio lateral. Este estudio radiológico simple, fue realizado el primer día de estudio, por lo tanto todos los individuos se encontraban en las mismas condiciones (ninguno fue expuesto todavía a la magnetoterapia). En las imágenes se pudo observar placas de crecimiento amplias, compatibles con una radiodensidad normal encontrada en animales durante su etapa de desarrollo.
2	19-08-2013 Machos (n=20) 20-07-2013 Hembras (n=20)	Se realizaron placas radiográficas del fémur y de la tibia, del miembro posterior izquierdo (MPI) de todos los individuos en estudio; se utilizaron las proyecciones cráneo caudal y medio lateral. Este estudio radiológico simple, fue realizado a los 10 días de haber realizado el tratamiento con magnetoterapia a los grupos seleccionados. En las imágenes se observó que no existía una diferencia aparente, a nivel de cartílago de crecimiento entre el grupo de cobayos con tratamiento y el grupo testigo.
3	29-08-2013 Machos (n=20) 30-08-2013 Hembras (n=20)	Se realizaron placas radiográficas, de fémur y tibia, en el MPI de todos los individuos en estudio; se utilizaron las proyecciones cráneo caudal y medio lateral. Este estudio radiológico simple, fue realizado a los 20 días de haber realizado el tratamiento con magnetoterapia a los grupos seleccionados. Las placas analizadas no mostraron diferencias apreciables a nivel de núcleos de crecimiento entre los grupos expuestos a la magnetoterapia y los grupos testigo.
4	08-09-2013 Machos (n=20) 09-09-2013 Hembras (n=20)	Se realizaron placas radiográficas del los huesos fémur y tibia, del MPI de todos los individuos en estudio; se utilizaron las proyecciones cráneo caudal y medio lateral. Este estudio radiológico simple, fue realizado a los 30 días de haber realizado el tratamiento con magnetoterapia a los grupos seleccionados. En las imágenes se pudo observar que no existían cambios aparentes entre las placas de crecimiento de los grupos tratados y los grupos testigo.
5	18-09-2013 Machos (n=20) 19-09-2013 Hembras (n=20)	Se realizaron placas radiográficas del fémur y de la tibia, del MPI de todos los individuos en estudio; se utilizaron las proyecciones cráneo caudal y medio lateral. Este estudio radiológico simple, fue realizado a los 40 días de iniciado el tratamiento con magnetoterapia a los grupos seleccionados. En las imágenes no se pudieron observar cambios atribuibles a los PEMFs, en las placas de crecimiento de los grupos tratados a diferencia de los grupos testigo.
6	28-09-2013 Machos (n=20) 29-09-2013 Hembras (n=20)	Se realizaron placas radiográficas de fémur y tibia, del MPI de todos los individuos en estudio; se utilizaron las proyecciones cráneo caudal y medio lateral. Este estudio radiológico simple, fue realizado a los 50 días de haber establecido una terapia con PEMFs a los grupos seleccionados. Las imágenes analizadas no mostraron diferencias aparentes a nivel de cartílago de crecimiento entre los cobayos con tratamiento y los cobayos testigo.
7	08-10-2013 Machos (n=20) 09-10-2013 Hembras (n=20)	Se realizaron placas radiográficas del los huesos fémur y tibia, del MPI de todos los individuos en estudio; se utilizaron las proyecciones cráneo caudal y medio lateral. Este estudio radiológico simple, fue realizado a los 60 días de haber realizado el tratamiento con magnetoterapia a los grupos seleccionados y fue el último control radiológico del estudio. En las imágenes, a nivel de cartílago de crecimiento, se pudo observar que no se produjeron cambios aparentes que se puedan atribuir a la magnetoterapia entre los grupos tratados y los grupos testigo.

Las placas radiográficas se encuentran en el Anexo 1.

**Autor:** Verónica Garcés

**Tabla 2.** Análisis de varianza (ANOVA) de las medias obtenidas a partir de la medición de los huesos de los cobayos expuestos a magnetoterapia durante dos meses vs. el grupo testigo de cobayos

		Fémur			Tibia		
	Ho	F <sub>tab</sub>	F <sub>cal</sub>	P	F <sub>tab</sub>	F <sub>cal</sub>	P
CC	Sx. vs. L	4,26	1,42	0,24	4,26	7,11	0,01
	Tx. vs. L	4,26	2,13	0,16	4,26	0,31	0,58
ML	Sx. vs. L	4,26	3,78	0,06	4,26	7,11	0,01
	Tx. vs. L	4,26	0,08	0,78	4,26	0,31	0,58

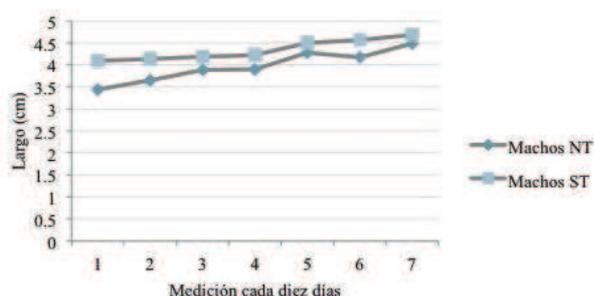
**CC** proyección cráneo caudal, **ML** proyección medio lateral, **Ho** hipótesis nula, **Sx. vs. L** no hay efecto del sexo sobre el largo del hueso, **Tx. vs. L** no hay efecto del tratamiento sobre el largo del hueso, **F<sub>tab</sub>** valor de Fisher tabulado, **F<sub>cal</sub>** valor de Fisher calculado, **P** probabilidad.

Los valores se presentan en centímetros.

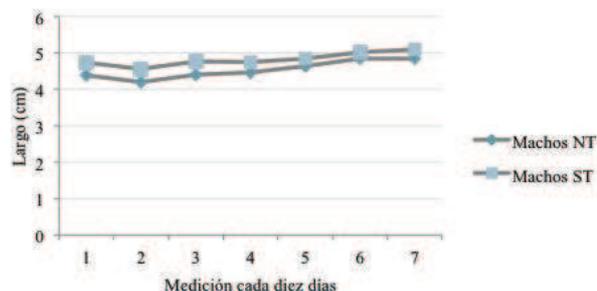
**Autor:** Verónica Garcés

## Crecimiento longitudinal del fémur

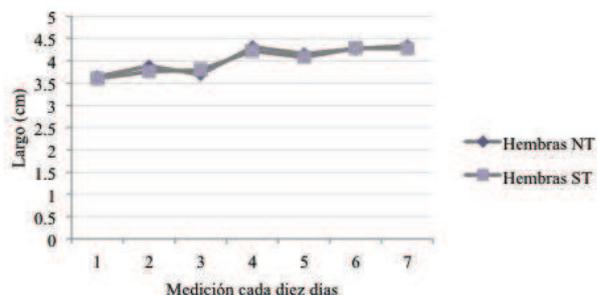
### A Proyección cráneo caudal



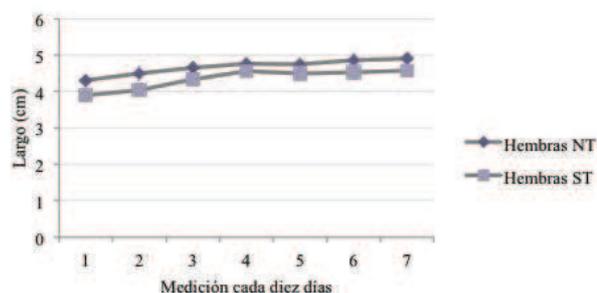
### B Proyección medio lateral



### C Proyección cráneo caudal



### D Proyección medio lateral

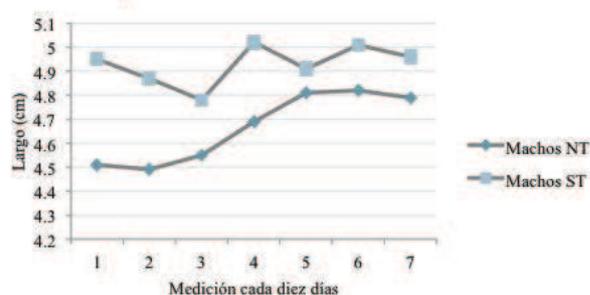


**Figura 1.** Comparación del crecimiento longitudinal del fémur entre cobayos expuestos a un tratamiento con PEMFs (n=20) y un grupo testigo (n=20). El grupo experimental fue expuesto a una hora diaria de magnetoterapia durante dos meses, alternando frecuencias de 50 y 100 Hz. Se realizaron placas radiográficas, del fémur izquierdo de todos los animales (n=40), y se realizaron mediciones desde la zona más distal hasta la zona más proximal de este hueso. La figura se elaboró a partir de las medias obtenidas de cada uno de los grupos. **A.** Crecimiento longitudinal del fémur, en proyección cráneo caudal, de los machos con y sin tratamiento. **B.** Crecimiento longitudinal del fémur, en proyección cráneo caudal, de las hembras con y sin tratamiento. **C.** Crecimiento longitudinal del fémur, en proyección medio lateral, de los machos con y sin tratamiento. **D.** Crecimiento longitudinal del fémur, en proyección medio lateral, de las hembras con y sin tratamiento.

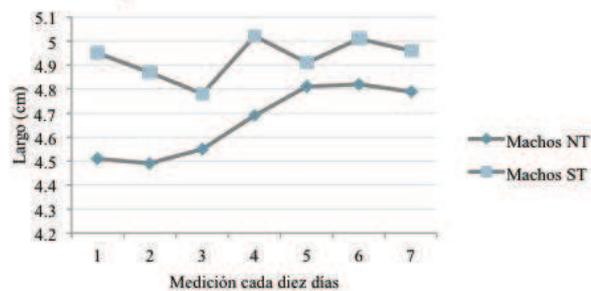
**Autor:** Verónica Garcés

## Crecimiento longitudinal de la tibia

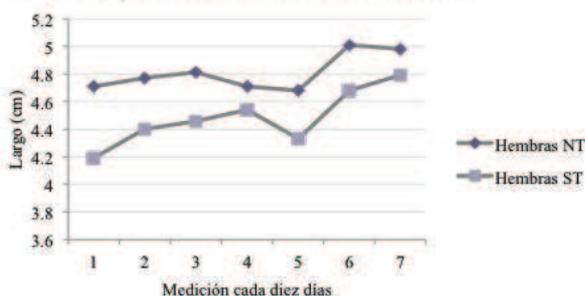
### A Proyección cráneo caudal



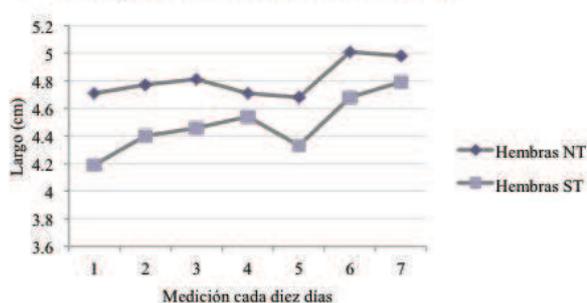
### B Proyección medio lateral



### C Proyección cráneo caudal



### D Proyección medio lateral



**Figura 2.** Comparación del crecimiento longitudinal de la tibia entre cobayos expuestos a un tratamiento con PEMFs (n=20) y un grupo testigo (n=20). El grupo experimental fue expuesto a una hora diaria de magnetoterapia, durante dos meses, alternando frecuencias de 50 y 100 Hz. Se realizaron placas radiográficas, de la tibia izquierda de todos los animales (n=40), y se realizaron mediciones desde la zona más distal hasta la zona más proximal de este hueso. La figura se elaboró a partir de las medias obtenidas de cada uno de los grupos. **A.** Crecimiento longitudinal de la tibia, en proyección cráneo caudal, de los machos con y sin tratamiento. **B.** Crecimiento longitudinal de la tibia, en proyección cráneo caudal, de las hembras con y sin tratamiento. **C.** Crecimiento longitudinal de la tibia, en proyección medio lateral, de los machos con y sin tratamiento. **D.** Crecimiento longitudinal de la tibia, en proyección medio lateral, de las hembras con y sin tratamiento.

**Autor:** Verónica Garcés