

Influencia del sexo del animal en el crecimiento de los huesos fémur y tibia en cobayos con tratamiento

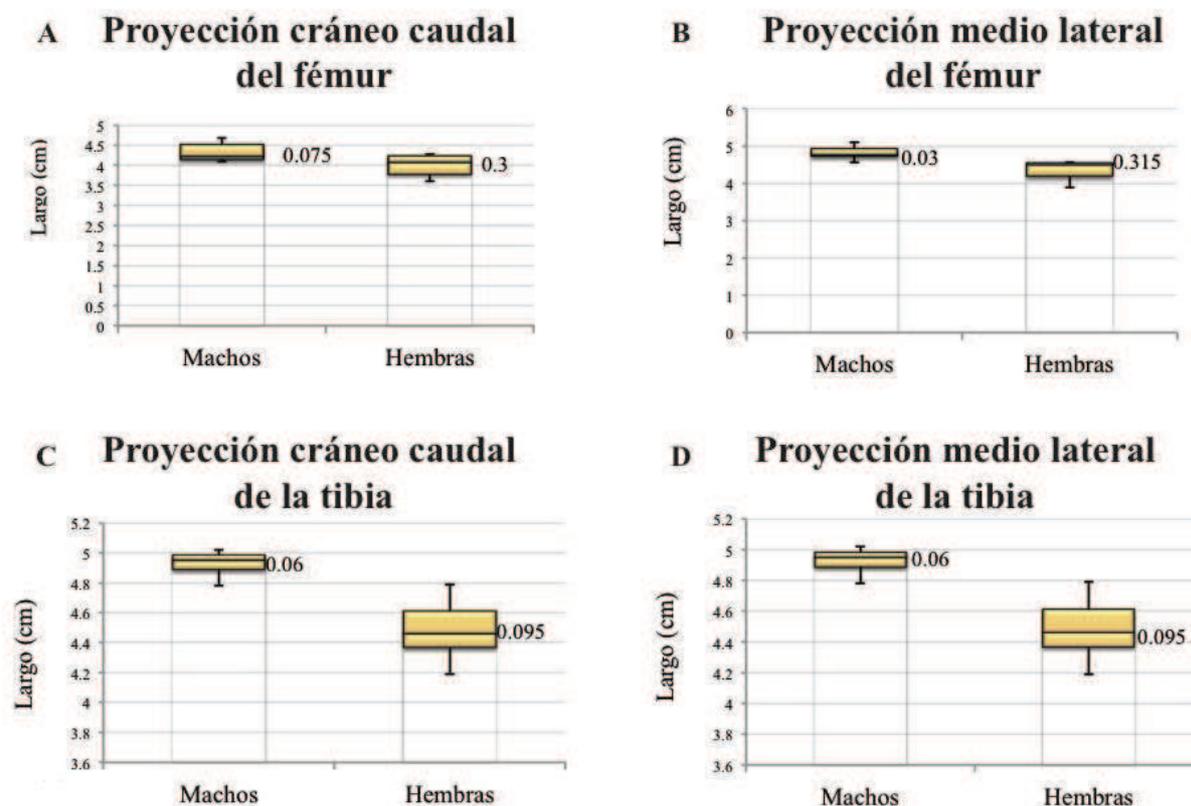


Figura 3. Efecto del tratamiento con PEMFs sobre el largo de los huesos en cobayos macho y hembra durante su etapa de desarrollo; el tratamiento se realizó por una hora al día, durante dos meses, alternando frecuencias de 50 y 100 Hz; (n=20). La figura se elaboró en base a mediciones realizadas en las placas radiográficas que se tomaron de todos los individuos cada 10 días. **A.** Comparación del largo del fémur, en proyección cráneo caudal, entre machos y hembras con tratamiento. **B.** Comparación del largo de fémur, en proyección medio lateral, entre machos y hembras con tratamiento. **C.** Comparación del largo de la tibia, en proyección cráneo caudal, entre machos y hembras con tratamiento. **D.** Comparación del largo de la tibia, en proyección medio lateral, entre machos y hembras con tratamiento.

Autor: Verónica Garcés

Efecto de los PEMFs sobre el crecimiento del fémur en el grupo experimental y testigo de machos y hembras

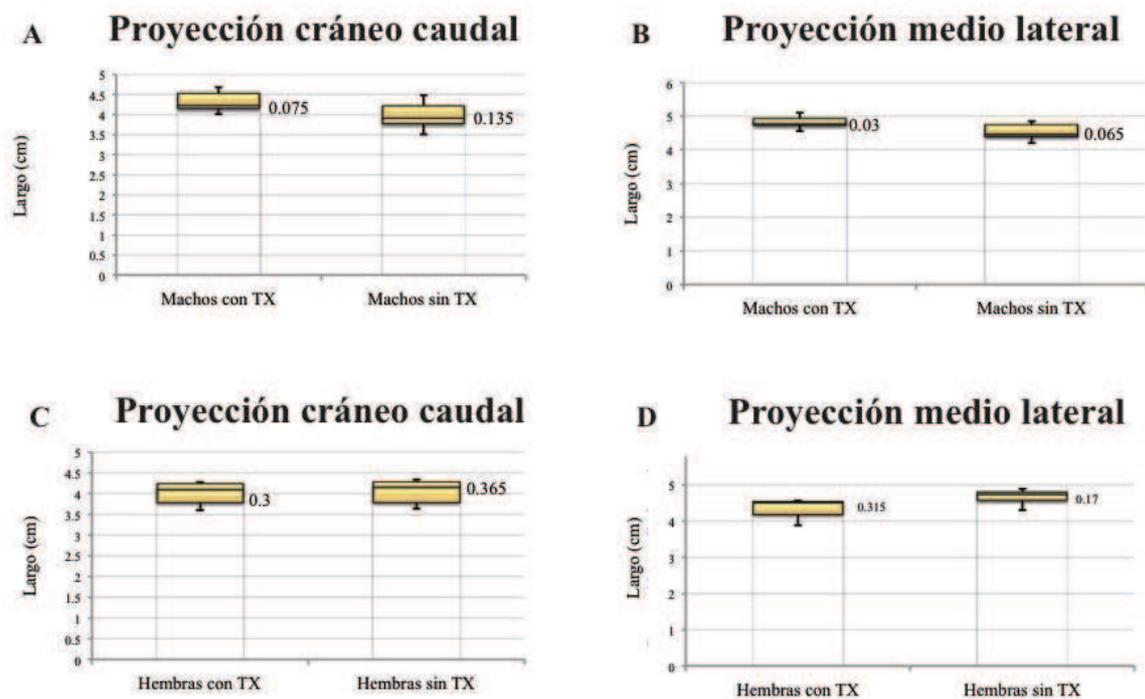


Figura 4. Comparación del efecto con PEMF sobre el crecimiento del fémur en el grupo de cobayos tratados (n=20) vs. el grupo testigo (n=20); el tratamiento se realizó por una hora al día, durante dos meses, alternando frecuencias de 50 y 100 Hz. La figura se elaboró en base a las mediciones realizadas en las placas radiográficas que se tomaron de todos los individuos cada 10 días. **A.** Comparación del largo del fémur, en proyección cráneo caudal, entre machos con tratamiento y machos sin tratamiento. **B.** Comparación del largo del fémur, en proyección medio lateral, entre machos con tratamiento y machos sin tratamiento. **C.** Comparación del largo del fémur, en proyección cráneo caudal, entre hembras con tratamiento y hembras sin tratamiento. **D.** Comparación del largo del fémur, en proyección medio lateral, entre hembras con tratamiento y hembras sin tratamiento.

Autor: Verónica Garcés

Efecto de los PEMFs sobre el crecimiento de la tibia en el grupo experimental y testigo de machos y hembras

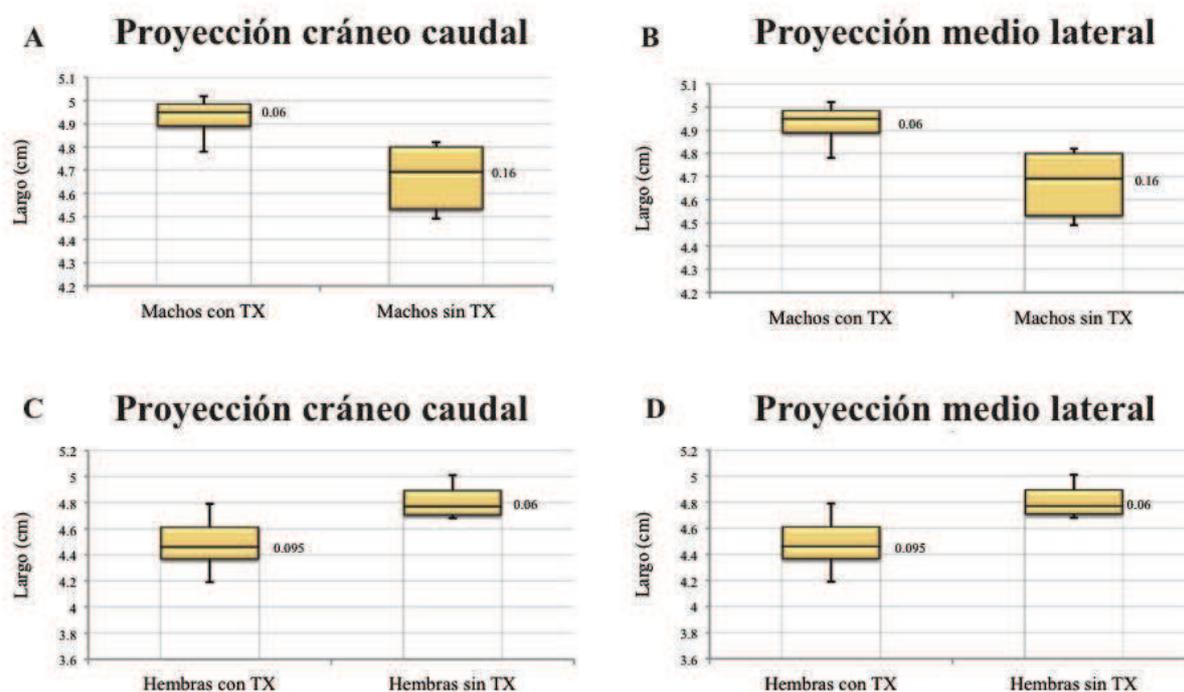


Figura 5. Comparación del efecto con PEMF sobre el crecimiento de la tibia en el grupo de cobayos tratados (n=20) vs. el grupo testigo (n=20); el tratamiento se realizó por una hora al día, durante dos meses, alternando frecuencias de 50 y 100 Hz. La figura se elaboró en base a las mediciones realizadas en las placas radiográficas que se tomaron de todos los individuos cada 10 días. **A.** Comparación del largo de la tibia, en proyección cráneo caudal, entre machos con tratamiento y machos sin tratamiento. **B.** Comparación del largo de la tibia, en proyección medio lateral, entre machos con tratamiento y machos sin tratamiento. **C.** Comparación del largo de la tibia, en proyección cráneo caudal, entre hembras con tratamiento y hembras sin tratamiento. **D.** Comparación del largo de la tibia, en proyección medio lateral, entre hembras con tratamiento y hembras sin tratamiento.

Autor: Verónica Garcés

Tabla 3. Cálculo de Riesgo Epidemiológico

Comparación	Sexo	RR
Cobayos con tratamiento	Machos	1
vs. Testigos	Hembras	1

El cálculo fue realizado en base a las medias del largo de la tibia, de los cobayos tratados con PEMFs vs. los cobayos testigo, del último control radiológico realizado (Anexo 2). **RR** Riesgo Relativo.

Autor: Verónica Garcés

Discusión

Los efectos del tratamiento con PEMFs sobre las placas de crecimiento fueron evaluados de tres modos: (1) mediante un análisis visual de las placas de rayos-X tomadas y la interpretación de hallazgos a manera de informes radiológicos; (2) mediante un análisis de varianza, ANOVA de dos factores, se evaluó el efecto de dos variables (sexo del animal y la aplicación o no de los PEMFs) y su interacción, donde los valores de $P < 0,05$ se considerarían estadísticamente significativos; y (3) mediante un cálculo de riesgo relativo, que nos indica la razón de las incidencias entre el grupo expuesto a la magnetoterapia y el grupo testigo.

Informe radiológico

Por medio del análisis de las placas radiográficas tomadas a todos los individuos en estudio (n=40), cada 10 días, en las proyecciones craneo caudal y medio lateral, se concluyó que no se evidencian efectos atribuibles a la magnetoterapia entre el grupo tratado vs. el grupo testigo (Tabla 1).

Análisis de varianza

El largo de los huesos fémur y tibia del grupo de cobayos con tratamiento no fue significativamente diferente al del grupo testigo, por lo tanto se concluye que no hubo un efecto del tratamiento con PEMFs sobre el largo de estos huesos (Tabla 2; Figura 4; Figura 5). Del mismo modo, al comparar el efecto del sexo sobre el largo del fémur y de la tibia, en los grupos de los machos y hembras con tratamiento, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Figura 3). Por este motivo se concluyó que tampoco existe un efecto de los PEMFs que sea dependiente del sexo del animal.

Riesgo Relativo

Los valores de riesgo relativo están comprendidos entre el intervalo de 0 a infinito. Un valor de RR mayor que 1 indica una asociación positiva entre el factor de exposición y la enfermedad y el valor 1 indica no asociación (Casal & de Antonio, 1999).

En el caso de este estudio se determinó como “enfermedad” a los valores que se encontraban bajo la media (menos dos desviaciones estándar; con ello se establecería que los valores se encuentren alejados de la distribución normal, por lo tanto los haría

diferentes a los demás y serían contados como afectados o “enfermos”) del grupo de animales sin tratamiento. Se utilizó la media del grupo de los no tratados como base para comparar el crecimiento normal de los huesos (Anexo 2).

Tanto en el grupo de machos, como en el de hembras, se calculó que el RR era 1, por lo tanto se concluyó que no hubo una asociación del tratamiento con PEMFs sobre el crecimiento de la tibia. Adicionalmente, como hallazgo del estudio, se encontró que la tibia medía lo mismo tanto en proyección cráneo caudal como en la proyección medio lateral (a diferencia del fémur); por este motivo se decidió hacer el cálculo del RR solamente en este hueso.

Análisis

La estimulación de la producción de hueso es a menudo requerida para tratar la pérdida de tejido óseo afectado por traumas, osteonecrosis, y tumores (Braddock, Houston, Campbell, & Ashcroft, *Born Again Bone: Tissue Engineering for Bone Repair*, 2001). Una terapia alternativa, para el tratamiento de fracturas, involucra el uso de PEMFs, los cuales han mostrado tener efectos en varios aspectos de la formación y curación del hueso (Braddock, Houston, Campbell, & Ashcroft, *Born Again Bone: Tissue Engineering for Bone Repair*, 2001).

Los EMFs exógenos pueden inducir una corriente eléctrica, en el sitio expuesto, a través de soluciones iónicas afectando el comportamiento celular (Trock, 2000; Bassett A. , 1993). De hecho, la estimulación de la condrogénesis y osteogénesis es una de las maneras en las que los PEMF afectan los estadios tempranos de la reparación ósea (Trock, 2000). Ello incluye la inducción de una proliferación de células óseas y

endotelio, la formación de capilares, la estimulación de formación de matriz, y la calcificación (Braddock, Houston, Campbell, & Ashcroft, *Born Again Bone: Tissue Engineering for Bone Repair*, 2001).

La aplicación de un EMF, como señal mecánica, puede ser utilizada para estimular el crecimiento de los osteoblastos. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables del incremento en el crecimiento celular luego de su estimulación con EMF siguen siendo desconocidos (Cornaglia, et al., 2006; Assiotis, Sachinis, & Chalidis, 2012). Por ejemplo, dentro de la línea celular de los osteoblastos, las subpoblaciones de células responden de diferente manera ante varias señales mecánicas (Clarke, 2008).

Se asume que los EMFs juegan un papel en la curación de una fractura por medio de los mismos principios que la aplicación de un estrés mecánico (Galkowski, Petrisor, Drew, & Dick, 2009; Assiotis, Sachinis, & Chalidis, 2012). Existen potenciales eléctricos en el hueso, incluyendo potenciales generados por estrés, los cuales ocurren cuando una porción de hueso es sujeta a una carga, haciendo que dicha porción se vuelva electronegativa, mientras que otras zonas no sujetas a la carga se vuelven electropositivas (Galkowski, Petrisor, Drew, & Dick, 2009).

La experiencia clínica, así como los estudios *in vitro* y con animales, sugieren que las condiciones iniciales en que los EMF llegan a su blanco, determinan si un bioefecto fisiológicamente significativo podrá llevarse a cabo (Markov, 2007). Por ejemplo, cuando un hueso fracturado recibe un tratamiento con PEMFs, los tejidos blandos circundantes reciben la misma dosis que el lugar de la fractura, pero la

respuesta fisiológicamente importante solo ocurre en el tejido óseo con daño, mientras que no se observan cambios en el tejido blando (Markov, 2007).

Este es un comportamiento crucialmente importante, que indica que los EMF son más efectivos cuando el tejido se encuentra fuera de equilibrio. Por lo tanto, los experimentos con individuos sanos no siempre son indicativos de la potencial respuesta en los individuos que son víctimas de una injuria (Markov, 2007). Esto podría explicar porqué no se encontró ningún efecto de los PEMFs en este estudio, ya que todos los animales eran individuos sanos.

Para la terapia con PEMFs, se genera una corriente por medio de una bobina, conducida por un generador de campo externo, resultando en la producción de un campo eléctrico secundario en el hueso (Galkowski, Petrisor, Drew, & Dick, 2009; Assiotis, Sachinis, & Chalidis, 2012). Tanto las características del campo magnético aplicado, como las propiedades biológicas de los tejidos, influyen el campo secundario inducido; sin embargo, la base para esta especificidad es desconocida (Galkowski, Petrisor, Drew, & Dick, 2009; Assiotis, Sachinis, & Chalidis, 2012; Iannacone, Pienkowski, Pollack, & Brighton, 1988).

La exposición a PEMFs en los sistemas biológicos ha mostrado que, en muchos casos, el estado biológico – funcional es de fundamental importancia para una interacción efectiva; la exposición a los campos puede generar un estímulo, inhibición, o ningún efecto, con parámetros idénticos del campo (Eichwald & Walleczek, 1996). Por ejemplo, las células del hueso y las del cartílago, pueden responder ante la misma señal de diferente manera (Aaron & Ciombor, 1993).

Por lo tanto, se sugiere que los efectos de una estimulación EM en la formación ósea puede ser dependiente del estado de maduración de las células estimuladas (Chang, Chen, Sun, & Lin, 2004). Adicionalmente, la forma de la célula puede ser un factor determinante en la respuesta celular a un EMF externo (Lee, Gowrishankar, Basch, Patel, & Golan, 1993). Estos enunciados podrían explicar el hecho de que en este estudio no se encontraron efectos de los PEMFs, ya que durante el crecimiento longitudinal del hueso existen células en diferentes estadios.

Del mismo modo, los efectos biológicos de la estimulación física no solo dependen de la duración del tratamiento, sino también de las características de la señal: intensidad, forma de onda, frecuencia y longitud (Massari, Caruso, Sollazzo, & Setti, 2009). Por lo tanto, la variabilidad en los resultados de los ensayos clínicos se debe principalmente a: (1) los atributos físicos de cada forma de onda del PEMF; (2) dispositivos actuales, aunque funcionan, no están optimizados para obtener resultados clínicos; y (3) la respuesta fisiológica individual hacia los PEMFs (Midura, et al., 2005).

A demás de todo lo mencionado, las señales de PEMFs empleadas por varios fabricantes en los Estados Unidos y Europa pueden tener diferentes formas de pulso, tiempos de subida y bajada de intensidad, amplitud de los pulsos y las tarifas de repetición de pulso (Polk, 2000).

Debido a que todas estas variables pueden tener un profundo efecto en la acción biológica de una señal en particular, es esencial el reporte de la efectividad o falta de la misma de los PEMFs dando una descripción exacta de la señal usada (Polk, 2000). Desafortunadamente, la literatura médica está repleta de ejemplos donde esta

información está incompleta o totalmente ausente (Polk, 2000). Hecho que explicaría la falta de uniformidad en resultados experimentales debido al amplio rango de parámetros y la variedad de especies animales utilizadas (Delgado, Leal, Monteagudo, & García, 1982).

El principal problema se debe, a que literatura que se ocupa del estímulo eléctrico y de la reparación, esta repleta de un arsenal desconcertante de modelos de sistemas, de situaciones clínicas, de configuraciones de la señal, y de los dispositivos usados (Aaron & Ciombor, 1993). Por lo tanto, no existe una configuración y dosis estándar para el uso de una terapia con PEMFs, lo cual podría determinar qué mecanismos de señalización transmembrana son activados (Galkowski, Petrisor, Drew, & Dick, 2009).

La revisión de literatura acerca de este campo es frustrante, no solo por los resultados contradictorios en estudios *in vitro* y en animales, sino también por la falta de ensayos clínicos bien diseñados y bien ejecutados (Henry, Concannon, & Yee, 2008). A continuación se muestran ejemplos de estudios contradictorios:

- En un estudio se concluyó que los PEMFs alteran la expresión fenotípica (producción de fosfatasa alcalina) de los condroblastos del esternón en un sistema *in vitro*, sin embargo, esta alteración no se produjo en condroblastos extraídos de la zona hipertrófica de epífisis tibiales (Norton, Witt, & Rovetti, 1988).
- Otro estudio realizado en ratas, encontró que los PEMF inducen el incremento de los niveles de BMP-2 y BMP-4, pero que este efecto fue directamente relacionado a la duración de exposición a los PEMFs (Bodamyali, et al., 1998).

- En los resultados de un estudio realizado en fibulas fracturadas de conejo, se indicó que se debían hacer mediciones frecuentes de la temperatura al realizar modelos in vitro para estudiar los efectos de los PEMFs; ya que pequeñas diferencias de temperatura inducidas por las bobinas usadas en la terapia pueden tener efectos estimuladores significativos; por lo tanto, los experimentos realizados deben llevarse a cabo bajo condiciones atérmicas estrictas (Iannacone, Pienkowski, Pollack, & Brighton, 1988).
- Los PEMFs poseen un efecto estimulador en los osteoblastos que se encuentran en etapas tempranas en cultivos celulares, más no en etapas posteriores, lo que sugiere que la formación de tejido óseo depende de la etapa de maduración de los osteoblastos (Diniz, Shomura, Soejima, & Ito, 2002).
- En un estudio realizado en condrocitos bovinos cultivados, se encontró que los PEMFs no tuvieron efecto en la síntesis de matriz extracelular, independientemente a la orientación de los condrocitos con respecto al campo aplicado (Elliot, Smith, & Block, 1988).
- Un estudio concluye, que las características espectrales y la salida de energía en tratamientos definidos con PEMFs determinan si se obtendrán respuestas bioactivas suficientes. Otro factor a ser considerado es el tiempo de inicio para el tratamiento con PEMFs (Midura, et al., 2005).
- En un estudio se realizaron 4 protocolos diferentes con PEMFs para ver los efectos de los mismos en ratas con osteoporosis. Como resultados se obtuvo que no hubo ningún cambio en el hueso de los animales tratados vs. los animales de control. De cualquier modo, debido a que otros estudios sí encontraron fuertes efectos, se concluyó que los PEMFs pueden ser muy efectivos bajo las circunstancias correctas (Van der Jagt, Van der Linden, Waarsing, Verhaar, &

Weinans, 2012).

- En un modelo realizado con perros, se evaluó el efecto de los PEMFs en la curación de fusiones espinales; se realizaron placas radiográficas de control y estudios histológicos, y se concluyó que la estimulación con PEMFs no tuvo efectos en los animales tratados en comparación a los animales de control (Kahanovits, Amoczky, Nemzek , & Shores, 1994).
- Otro estudio utilizó la exposición de huesos embrionarios a un tratamiento con PEMFs, y se encontró una aceleración en la maduración del cartílago, la cual precede inmediatamente, en la secuencia fisiológica normal, a la osificación endocondral; efectos de un incremento en la BMP-2 (Hinsenkamp & Collard, 2011).
- Los resultados de un estudio indican que, bajo una modulación específica de los PEMFs, se puede cambiar la composición de la matriz extracelular del cartílago, lo que aumenta la posibilidad de que ocurran efectos en procesos como la osificación endocondral en las placas de crecimiento (Aaron, Ciombor, & Jolly, 1989).

Con todas las ambigüedades mostradas, se llegó a la conclusión, de que es posible que esta investigación no haya encontrado interacción alguna de los PEMFs sobre el cartílago de crecimiento, ya sea por el estado fisiológico de los cobayos, por el tipo de equipo utilizado, o por el protocolo de magnetoterapia empleado.

Para el planteamiento de esta investigación, se analizó el hecho de que el crecimiento se ve influenciado por varios factores intrínsecos y extrínsecos, tales como la herencia, la genética, el medio ambiente, enfermedades, medicamentos, nutrición y

hormonas (Karimian, et al., 2013). Entre dichos factores, se encuentran las cargas mecánicas, que activan varios procesos celulares en los osteocitos, incluyendo la activación de genes, la producción de factores de crecimiento y la síntesis de matriz (Burger & Klein-Nulend, 1999). De este modo, el estímulo de los EMF incrementan la reparación ósea por la mediación de tres áreas a nivel celular: (1) interacciones complejas del ambiente físico; (2) factores de crecimiento; y (3) la cascada de señales de transducción (Haddad, Obolensky, & Shinnick, 2007).

Se han atribuido a los PEMF la capacidad de estimular la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, a demás de afectar varios receptores de membrana, incluyendo los de la PTH y del IGF-2 (Assiotis, Sachinis, & Chalidis, 2012; Mollon, da Silva, Busse, Einhorn, & Bhandari, 2008). Adicionalmente, los osteoblastos estimulados con PEMFs secretan factores de crecimiento tales como el BMP-2 y BMP-4, dando como resultado el incremento de matriz extracelular del cartílago y el hueso (Assiotis, Sachinis, & Chalidis, 2012; Mollon, da Silva, Busse, Einhorn, & Bhandari, 2008; Haddad, Obolensky, & Shinnick, 2007).

Estos fenómenos ocurren debido a que la estimulación con PEMFs produce la liberación de iones de calcio desde el retículo endoplásmico liso, lo que produce un incremento de este ion a nivel intracelular, el mismo que estimula una serie de respuestas enzimáticas que concluyen en la transcripción de genes de BMPs, de factores de crecimiento y colágeno (Massari, Caruso, Sollazzo, & Setti, 2009).

Por lo descrito anteriormente, en este estudio se planteó la hipótesis de que existe un efecto de los PEMFs sobre el cartílago de crecimiento, sin embargo se tuvo que rechazar esta hipótesis al no encontrar evidencia significativa que defienda lo

contrario. Los resultados de este estudio fueron similares al estudio realizado por Gürgül et al., (2008), en el cual se usaron huesos de ratas sanas; y no se encontraron diferencias significativas en el largo del fémur entre las ratas expuestas y el grupo control.

Adicionalmente, en este estudio se realizaron 2 figuras para observar el crecimiento longitudinal del fémur y de la tibia (Figura 1 y Figura 2 respectivamente), con las medias de los valores medidos, en cada uno de los 7 controles radiológicos realizados. En la figura correspondiente a la tibia, se encontró que en algunas de las mediciones, la curva de crecimiento de este hueso disminuía; evento que fisiológicamente no se puede explicar. Es por ello que se asume, que esta alteración en los datos pudo deberse a que varias personas intervinieron en la sujeción de los cobayos para la toma de placas radiográficas, y es posible que en algunos de los casos no se haya colocado en la posición exacta al animal, alterando los resultados de las mediciones morfo métricas.

Otros Hallazgos

Es importante reportar un hecho que se observó mientras se estaba aplicando la magnetoterapia a los individuos seleccionados para tratamiento. Los cobayos, después de un breve período del inicio de la terapia (5 – 10 min), empezaban a mostrar signos de relajación generalizada, como se indica en la sección de los efectos de la magnetoterapia. Esta relajación llegaba a ser tan evidente que casi todos los cobayos se quedaban profundamente dormidos hasta concluir la hora de terapia.

Conclusiones

En este estudio se concluyó que no existe un efecto significativo, atribuible a la magnetoterapia, sobre el cartilago de crecimiento en cobayos en desarrollo. Aunque los hallazgos de este estudio concuerdan con otros mencionados, existen artículos que prueban lo contrario. Estas diferencias pueden deberse principalmente a variaciones en la intensidad y rango de los PEMFs utilizados, a demás del uso de diferentes métodos en cada estudio.

Las comunidades médicas y científicas todavía carecen del entendimiento de que diferentes campos magnéticos, aplicados a diferentes tejidos pueden causar diferentes efectos (Markov, 2007). Sin embargo, la evidencia actual de ensayos aleatorizados es insuficiente para concluir que existe un beneficio de la estimulación electromagnética en mejorar la tasa de unión de fracturas y en disminuir el tiempo de curación (Mollon, da Silva, Busse, Einhorn, & Bhandari, 2008).

A pesar de que la estimulación con PEMFs ha sido evaluada en ensayos de fracturas con unión retardada, o no unión, el análisis del estudio de Mollon et al., (2008) indica que la evidencia actual proporciona poca justificación para el relativo amplio uso de los PEMFs en la curación de fracturas. Sin embargo, no podemos ignorar una fuerza universal, particularmente una que controla tantas reacciones químicas y eventos celulares (Gordon, 2007).

Recomendaciones

A pesar de que los resultados de este estudio indican que no existe un efecto de los PEMFs sobre el cartílago de crecimiento de cobayos en desarrollo, se recomienda la realización de estudios adicionales para asegurar que no existen efectos negativos al utilizar este tipo de terapia física en animales en crecimiento.

Sería conveniente realizar una recopilación de los estudios con otros resultados para generar una base de datos de metodologías, protocolos de magnetoterapia y estados fisiológicos; y con ello podrían plantearse nuevos estudios que comprueben su validez.

Como recomendación para estudios futuros, sería de gran ayuda anestesiar a los animales para tener más facilidad en el manejo y poderlos colocar en la posición precisa al momento de realizar las placas radiográficas. En un estudio similar se utilizaron conejos, los cuales fueron anestesiados con una inyección intramuscular de ketamina (25 mg/kg) y xilacina (5 mg/ kg) antes de la toma de placas (Karimian, et al., 2013).

Referencias Bibliográficas

- Aaron, R. K., & Ciombor, D. M. (1993). Therapeutic effects of electromagnetic fields in the stimulation of connective tissue repair . *Journal of Cellular Biochemistry* , 52, 42-46.
- Aaron, R. K., Ciombor, D. M., & Jolly, G. (1989). Stimulation of experimental endochondral ossification by low-energy pulsing electromagnetic fields. *Journal of Bone and Mineral Research* , 4 (2), 227-233.
- Abad, V., Meyers, J. L., Weise, M., Gafni, R. I., Barnes, K. M., Nilsson, O., et al. (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* , 143 (5), 1851-1857.
- Adey, W. R. (1993). Biological effects of electromagnetic fields . *Journal of Cellular Biochemistry* , 51, 410-416.
- Anderson, H. C., Hodges, P. T., Aguilera, X. M., Missana, L., & Moylan, P. E. (2000). Bone morphogenetic protein (BPM) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* , 48 (11), 1493-1502.
- Assiotis, A., Sachinis, N. P., & Chalidis, B. E. (2012). Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* , 7 (24), 1-6.
- Ballock, T., & O'Keefe, R. J. (2003). The biology of the growth plate . *The Journal of Bone & Joint Surgery* , 85 (4), 715-726.
- Bassett, A. (1993). Beneficial Effects of Electromagnetic Fields. *Journal of Cellular Biochemistry* , 51, 387-393.
- Bassett, C. (1989). Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *Crit. Rev Biomed Eng.* , 17 (5), 451-529.
- Bassett, C., Pawluk, R., & Pilla, A. (1974). Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science* , 184, 575-577.

- Batista, C. M., Soriano, B. I., & Bergés, L. E. (2011). Posibilidades, mecanismos de acción y retos de la terapéutica con campo electromagnético de extremada baja frecuencia contra la psoriasis. *MEDISAN* , 15 (12), 1775.
- Becker, R. O., & Marino, A. A. (2010). *Electromagnetism & life*. Los Angeles: Cassandra publishing.
- Bodamyali, T., Bhatt, B., Hughes, F. J., Winrow, V. R., Kanczler, J. M., Simon, B., y otros. (1998). Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblast in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* , 250, 458-461.
- Braddock, M., Houston, P., Campbell, C., & Ashcroft, P. (2001). Born Again Bone: Tissue Engineering for Bone Repair. *News Physiol. Sci.* , 16, 208-213.
- Burger, E. H., & Klein-Nulend, J. (1999). Mechanotransduction in bone - role of the lacunocanalicular network. *The FASEB Journal* , 13, S101-S112.
- Burger, E. H., Klein-Nulend, J., Van der Plas, A., & Nijweide, P. J. (1995). Function of osteocytes in bone - their role in mechanotransduction. *J. Nutr.* , 125, 2020S-2023S.
- Carrillo, J. M., Sopena, J. J., & Rubio, M. (2013). Estructura del tejido óseo y recuerdo anatómico. In J. M. Carrillo, & M. Rubio, *Manual práctico de traumatología y ortopedia en pequeños animales* (pp. 3-7). Buenos Aires: Inter-Médica.
- Casal, J., & de Antonio, E. M. (1999). *Problemas de epidemiología veterinaria*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cerrud, S. M., Narváez, M. Y., Muñoz, V., & Schouwenaars, R. (2005). Modelado del comportamiento mecánico del hueso (análisis de los efectos del grado de hidratación). *Ingeniería Mecánica Tecnología y Desarrollo* , 1 (6), 223-232.
- Chang, W. H., Chen, L. T., Sun, J. S., & Lin, F. H. (2004). Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* , 25, 457-465.
- Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* , 3, S131-S139.

- Cornaglia, A. I., Casasco, M., Riva, F., Farina, A., Fassina, L., Visai, L., et al. (2006). Stimulation of osteoblast growth by an electromagnetic field in a model of bone-like construct. *European Journal of Histochemistry* , 50 (3), 199-204.
- De Luca, F., Barnes, K. M., Uyeda, J. A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., et al. (2001). Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein - 2. *Endocrinology* , 142 (1), 430-436.
- Delgado, J. M., Leal, J., Monteagudo, J. L., & García, M. (1982). Embryological changes induced by weak, extremely low frequency electromagnetic fields. *J. Anat.* , 134 (3), 533-551.
- Demay, M. B., Sabbagh, Y., & Carpenter, T. O. (2007). Calcium and vitamin D: What is known about the effects on growing bone. *Pediatrics* , 119 (2), S141-S144.
- Diniz, P., Shomura, K., Soejima , K., & Ito, G. (2002). Effects of pulsed electromagnetic fiels (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblast. *Bioelectromagnetics* , 23, 398-405.
- Duarte, V., Torres, G., & Cerrolaza, M. (2011). Comportamiento Piezoeléctrico del hueso utilizando el método de elementos de contorno (MEC). *Mecánica Computacional* , 30, 3395-3402.
- Eichwald , C., & Walleczek, J. (1996). Activation-dependent and biphasic electromagnetic field effects: model based on cooperative enzyme kinetics in cellular signaling. *Bioelectromagnetics* , 17 (6), 427-435.
- Elliot, J. P., Smith, R. L., & Block, C. A. (1988). Time-varying magnetic fields: effects of orientation on chondrocyte proliferation. *Journal of orthopaedic research* , 6 (2), 259-264.
- Frey, A. H. (1990). Electromagnetic field interactions with biological systems. *The FASEB Journal* , 7, 272-281.
- Galkowski, V., Petrisor, B., Drew, B., & Dick, D. (2009). Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? *Indian J. Orthop* , 43 (2), 117-120.
- Gordon, G. A. (2007). Designed Electromagnetic Pulsed Therapy: Clinical Applications. *Journal of Cellular physiology* , 212, 579-582.

- Grace, K. L. (1998). The effects of pulsed electromagnetism on fresh fracture healing: osteochondral repair in the rat femoral groove. *Orthopedics* , 21 (3), 287-302.
- Guillen, P., Madrigal, J. M., Madroñero, A., Pitillas, J. I., Galvez, J. M., & Llopis, J. (1985). Aplicaciones clínicas de los campos magnéticos. Magnetoterapia y magnetosteogenia. *Rev. Esp. de Cir. Ost.* , 20, 257-279.
- Gürgül, S., Erdal, N., Yilmaz, S. N., Yildiz, A., & Ankarali, H. (2008). Deterioration of bone quality by long-term magnetic field with extremely low frequency in rats. *Bone* , 42, 74-80.
- Habash, R. (2010). *Bioeffects and therapeutic applications of electromagnetic energy*. University of Ottawa, School of Electrical Engineering and Computer Science. Ottawa: CRC press.
- Haddad, J. B., Obolensky, A. G., & Shinnick, P. (2007). The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and review of earlier work . *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* , 13 (5), 485-490.
- Hauschka, P. V., Mavrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E., & Klagsbrun, M. (1986). Growth factors in bone matrix, isolation of multiple types by affinity chromatography on heparine-sepharose. *The Journal of Biological chemistry* , 261 (27), 12665-12674.
- Hawking, S. W. (1989). *Historia del tiempo, del big bang a los agujeros negros*. Bogotá.
- Hawking, S., & Mlodinow, L. (2010). *El gran diseño*. Barcelona: Crítica.
- Heinegard, D., & Oldberg, A. (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *The FASEB Journal* , 3, 2042-2051.
- Henry, S. L., Concannon, M. J., & Yee, G. J. (2008). The Effect of Magnetic Fields on Wound Healing, Experimental Study and Review of the Literature. *Journal of Plastic Surgery* , 8, 393-399.