

Estudio del Efecto de Campos Magnéticos en Citoesqueleto de Osteoblastos Humanos

Berenice Noriega-Luna*, Myrna Sabanero López**, Modesto Sosa Aquino*** y Mario Ávila-Rodríguez*

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la aplicación de Campos Magnéticos (CM) tanto pulsados (CMP) como estáticos (CME) en la morfología de osteoblastos humanos. El efecto de dichos campos ha sido medido por medio del análisis de la estructura de la β -tubulina, la cual es una proteína que forma parte del citoesqueleto celular. El campo magnético aplicado fue de 0.65 mT en el caso del CMP y de 0.5 mT en el caso del CME. La aplicación de los CM provoca alteración en el patrón de distribución normal de las redes de microtúbulos, dando lugar a la formación de agregados fluorescentes en la región cortical de la membrana celular. Las observaciones obtenidas con respecto a los cambios morfológicos de los osteoblastos, indican claramente que éstos son sensibles a la estimulación con CM, alterando su actividad celular a través de cambios en la estructura del citoesqueleto celular.

ABSTRACT

In this work are presented the results obtained from the application of magnetic fields (MF), both pulsed (PMF) and static (SMF), on the morphology of human osteoblasts. The effect of such fields has been evaluated through the analysis of the structure of the β -tubuline, which is protein that forms part of the cellular cytoskeleton. The applied fields were 0.65 mT and 0.5 mT for PMF and SMF, respectively. The application of the MF produces alterations in the pattern of normal distribution of microtubules, which gives rise to the formation of fluorescent aggregates in the cortical region of the cellular membrane. The obtained results with respect to the morphological changes in the osteoblasts clearly suggest that these are sensitive to stimulation with MFs, which alter its cellular activity through changes in cytoskeletal structures.

Recibido: 29 de Mayo de 2009
Aceptado: 6 de Noviembre de 2009

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un gran interés por entender los efectos de las interacciones entre campos electromagnéticos y sistemas biológicos, especialmente en seres humanos. Este interés ha sido patente en el caso de terapias basadas en la aplicación de campos magnéticos o electromagnéticos en células de hueso, las cuales han resultado exitosas, como lo mencionan Basset (1993) y Yamamoto y col., (2003).

Palabras clave:

Campo magnético pulsado; campo magnético estático; células óseas; citoesqueleto microtubular.

Keywords:

Pulsed magnetic field; static magnetic field; bone cells; microtubular cytoskeleton.

Las modificaciones celulares inducidas cuando un CM interactúa con los materiales biológicos dependen de la duración de la exposición al CM, la penetración en los tejidos, y la subsecuente generación de calor, que a su vez están relacionadas con la intensidad y frecuencia del CM, así como del tipo de CM aplicado ya sea estático (CME) o pulsado (CMP), de la forma de onda (sinusoidal o cuadrada) así como del estado biológico de las células expuestas (Walleczek y Liburdy, 1990). De esta manera diferentes efectos de la aplicación de los CM a células óseas han sido documentados, como lo es la osteogénesis al aplicar CM generados por bobinas de Helmholtz, repor-

* Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, C.P. 36050. Guanajuato, Gto., México, Correo electrónico: berenor@quijote.ugto.mx, avilam@quijote.ugto.mx

** Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, C.P. 36050. Guanajuato, Gto., México, Correo electrónico: myrna@quijote.ugto.mx

*** Departamento de Ingeniería Física, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato, Loma del Bosque 103, Col. Lomas del Campestre, León, Gto. C.P. 37150. Tel., Fax: (477) 7885100, Correo electrónico: modesto@fisica.ugto.mx

tada por Basset, (1968) y posteriormente por Otter y col. (2000). En tanto que Chang y Chang, (2001) han reportado el efecto de los CM sobre el metabolismo óseo, observando la inhibición de la pérdida trabecular en ratas ovariectomizadas. Dentro de este mismo contexto Chang y col (2003) reportan, dependiendo de la intensidad del campo aplicado, un aumento o una disminución en la cantidad de células como los osteoclastos en cultivos de médula ósea. Otros grupos de investigación (Sherry y col., 1991; Takayama y col., 1990) también han reportado efectos positivos a diferentes intensidades de estimulación, intervalos de frecuencia del CM y tiempos de exposición.

Los trabajos reportados con respecto al efecto de CMP en osteoblastos humanos indican que existe un incremento en la actividad de dichas células, como lo reporta Yamamoto y col (2003), teniendo impacto en su proliferación (De Mattei y col., 1999) y en su diferenciación (Takano-Yamamoto y col., 1992; Landry y col., 1997), en la expresión de las proteínas morfogénicas del hueso (Nagai y Ota, 1994; Bodamyali y col., 1998), en las matrices extracelulares (Heermeier y col., 1998), en la actividad de la fosfatasa alcalina (Vander Molen y col., 2000), así como en el flujo y absorción de calcio. Por su parte McLeod y Collazo (2000) reportan la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos al aplicar CMP.

Por otra parte, se ha descrito que la acción de los CME sobre sistemas biológicos es a nivel del transporte de iones en la membrana plasmática, específicamente en el caso del transporte del ion Ca^{2+} (Vander Molen y col., 2000; Rosen y col., 2003,). Según Rosen y col. (2003) la aplicación de CME tiene también un efecto sobre las estructuras proteicas constituyentes del citoesqueleto. Dentro de este contexto Repacholi y Greenbaum, (1999) y Teodori y col., (2002b) sugieren que el CM aplicado en sistemas biológicos ejerce sus efectos primarios en la membrana plasmática, esto en virtud de las propiedades bioeléctricas de la misma. De esta manera los cambios morfológicos y estructurales de la membrana plasmática (provocados por agentes externos como lo son los CM) se ven reflejados en las características estructurales y funcionales de las células, conduciendo, por ejemplo, a cambios en la forma celular, la organización del citoesqueleto, el flujo de iones, la distribución de receptores, la fagocitosis, etc.

A pesar del número creciente de publicaciones que abordan esta temática, no se tiene la certeza respecto a los factores que desencadenan la biomineralización celular, la regeneración del callo óseo y por lo tanto

la recuperación de fracturas. De esta manera, la realización de estudios sistemáticos que coadyuven a la elucidación del mecanismo de interacción de CM con células de hueso (osteoblastos) es de gran importancia. Así el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la aplicación de CM tanto pulsados como estáticos en la morfología de osteoblastos humanos. El efecto de dichos campos ha sido medido en este trabajo por medio de la β -tubulina, la cual es una proteína que forma parte del citoesqueleto celular y que tiene una participación importante en la formación de los polímeros fibrilares de la célula (microtúbulos), así como en diversos procesos vitales tales como la mitosis, la morfología, la cohesión, la protección, la movilidad celular y el transporte intracelular (Sheetz y col. 2006).

Otro aporte importante de este trabajo es el desarrollo de una metodología para evaluar el efecto del estrés celular (en este caso provocado por la aplicación de CM) sobre el fenotipo celular a través de marcadores específicos del citoesqueleto, como lo es la β -tubulina.

PARTE EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA

Para este estudio se empleó la línea celular MG-63 obtenida de American Type Culture Collection (ATCC), constituida por células osteoblásticas procedentes de un osteosarcoma humano. Dos grupos de células fueron utilizadas en los experimentos. El primer grupo fue expuesto a CMP, en tanto que el segundo grupo se expuso a CME. Un grupo de células de control fue utilizado en cada experimento. Una vez que las células fueron expuestas a los CM, se procedió a evaluar el efecto de éstos en la morfología de las células expuestas, utilizando como marcador la β -Tubulina, para su posterior observación en un microscopio óptico de epifluorescencia. La descripción detallada de cada una de las partes que conforman la metodología se describe a continuación.

Unidad de Estimulación Magnética Pulsada

La unidad de generación de CMP está diseñada con dos bobinas idénticas de 20 cm de diámetro ensambladas en una configuración de Helmholtz (Figura 1A). Estas bobinas funcionan alimentadas con corriente alterna con una frecuencia de 60 Hz, generando pulsos dentro de un intervalo de 1 a 500 ms con una periodicidad de 1 segundo. La corriente en la bobina es controlada por medio de una PC.

El software desarrollado para controlar el sistema fue diseñado en una plataforma en LabView y permite programar el periodo de repetición y el ancho de pulso de la onda magnética, utilizando para ello el puerto paralelo (Figura 1B).

Estos parámetros -periodo de repetición y ancho de pulso- determinan parcialmente las condiciones de exposición de las células a los campos magnéticos. Ambos parámetros pueden tener valores dentro del rango de 1 a 500 ms siempre que el ancho del pulso sea menor al

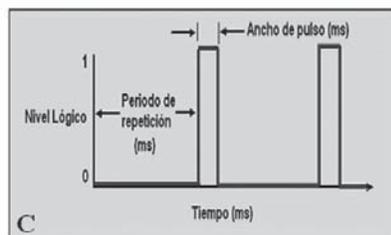
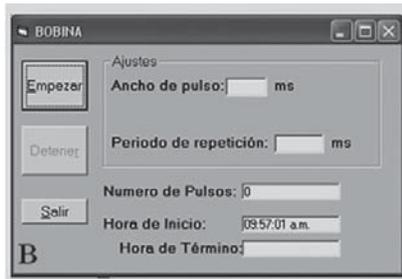


Figura 1. Unidad de Campo Magnético Pulsado. Se muestran bobina en configuración Helmholtz (A) y Software de control de parámetros de exposición (B y C).

periodo de repetición. Asimismo el software permite determinar el total de pulsos que recibirá la preparación biológica. El ancho de pulso determina el tiempo que este permanece en alto y el periodo de repetición el tiempo que permanece en bajo (Fig. 1C).

Unidad de Estimulación Magnética Estática

El sistema se basa en un arreglo cilíndrico de imanes permanentes, los cuales generan en el interior del cilindro un CME del orden de 0.5 mT. El sistema de estimulación esta soportado sobre un cilindro de cartón de 30 cm de altura (h), con un radio (r) de aproximadamente 12.5 cm. A su vez, este cilindro se encuentra montado sobre una plataforma de madera de simetría hexagonal, la cual tiene la función de equilibrar y mantener una posición vertical en el cilindro. Sobre la superficie exterior del cilindro se encuentran distribuidas uniformemente y en posición vertical, doce barras de madera idénticas con cavidades espaciadas cada 3 cm sobre los 30 cm de altura del cilindro (Figura 2A). De esta manera, existen 7 cavidades por barra de madera a ser ocupadas por los imanes permanentes. El sistema de estimulación esta constituido por imanes permanentes en forma de barra (2.5 cm x 2.5 cm x 1 cm) cuyo campo magnético no es dependiente del tiempo y se encuentra en el orden de 1 mT. Los imanes se encuentran montados sobre las cavidades de las barras de madera, de modo que se trabaja con un total de 84 imanes cuya distribución geométrica origina un campo estático homogéneo en el interior del cilindro. El experimento se efectuó en el centro del dispositivo cilíndrico. En esta región, el valor del CME debido a la configuración de los imanes fue del orden de 0.5 mT (Figura 2B).

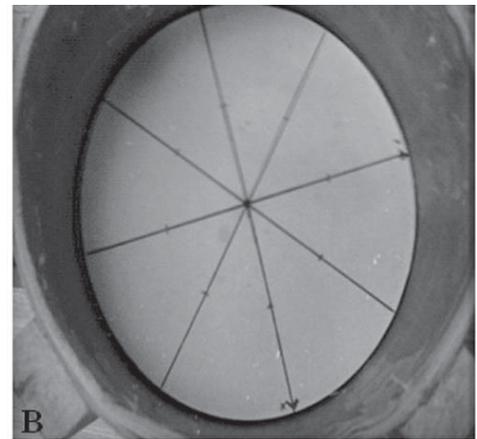


Figura 2. Unidad de Campo Magnético Estático. (A) Sistema de Imanes y (B) Zona interna del cilindro donde la intensidad del campo magnético está calibrada en 0.5 mT.

Cultivos Celulares

Para este estudio se empleó la línea celular MG-63 obtenida de American Type Culture Collection (ATCC), constituida por células osteoblásticas procedentes de un osteosarcoma humano. Las células se cultivaron en medio modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Media, marca Gibco, E.U.A.), con 10% de suero fetal bovino (marca Gibco, E.U.A.). A

este medio se agregaron los antibióticos penicilina y estreptomicina para evitar la contaminación por hongos o bacterias. Los cultivos se mantuvieron en un ambiente con atmosfera húmeda de CO₂ al 5% a una temperatura controlada de 37°C.

Condiciones de Exposición

Dos grupos de células fueron utilizadas en los experimentos. El primer grupo fue expuesto al CMP, (CMP de ondas senoidales generadas a una frecuencia de 4 Hz), durante 45 minutos. Esta condición de estímulo se logró cuando la muestra se colocaba en la región homogénea de la bobina de Helmholtz. Un segundo grupo fue expuesto al CME, colocado en la región donde la intensidad del CM fue de 0.5 mT, durante el mismo tiempo de exposición.

En ambos grupos de trabajo se contó con un cultivo control, el cual consistió en células de osteoblastos sin estímulo magnético pero en condiciones iguales de temperatura que los grupos sometidos al estímulo magnético.

Tinción de β -Tubulina

Para evaluar la morfología de las células se utilizó como marcador la β -tubulina. Una vez que las células han sido estimuladas (por CMP o CE) se realiza el análisis de la β -tubulina. Los ensayos se realizaron sobre laminillas cubreobjetos, con un número aproximado de 1×10^5 células/laminilla. Al término del ensayo experimental, las células se fijaron con p-formaldehído 4% (w/v) durante 30 minutos. Inmediatamente se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5% durante 3 minutos. Posteriormente las muestras fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti β -tubulina (Sigma) durante 1 hora en constante agitación y a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de incubación las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS. Consecutivamente las muestras se sometieron a una segunda incubación con el anticuerpo anti- ratón IgG conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 1 hora, a temperatura ambiente en oscuridad y en constante agitación. Finalmente, las preparaciones se observaron en microscopio de epifluorescencia (Filtro B exc. 450-490nm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 3 muestra las microfografías obtenidas por un microscopio óptico invertido, tanto de los grupo control (Figura 3A), así como los grupos estimulados por CMP (Figura 3B) y CME (Figura 3C).

Se puede observar que las células del grupo control (sin estimulación) presentan una morfología cuboide alargada con prolongaciones citoplásmicas (Figura 3A). En esta microfografía también se hacen evidentes las conexiones intercelulares.

Al aplicar el CMP existe una ligera variación en la morfología celular (Figura 3B). En cambio al aplicar el CME, las variaciones morfológicas de las células son más evidentes observándose una reducción del tamaño celular.

En la Figura 4 se muestran las microfografías de fluorescencia obtenidas cuando se realiza el seguimiento del efecto de CM en los osteoblastos uti-

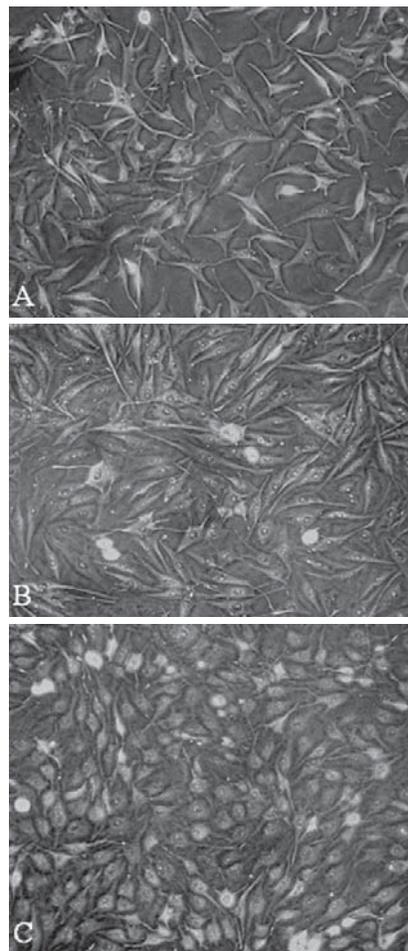


Figura 3. Micrografías de Osteoblastos Expuestos a CM. Se muestran células (A) control y expuestas a CMP y CME (B y C) respectivamente.

lizando como marcador la β -tubulina. En las microfografías del grupo control (Figura 4A) se puede observar claramente la distribución de las fibrillas de microtúbulos que radian del núcleo hacia el citoplasma y hacia la periferia de la membrana plasmática, delineando la morfología característica del osteoblasto. En las células expuestas a los CM (Figura 4B y 4C), se observan alteraciones en la distribución de los microtúbulos que se refleja en los cúmulos de fluorescencia en la región cortical de la membrana plasmática. Además parece que las uniones intercelula-

res desaparecen. Las alteraciones morfológicas son más evidentes en el caso de células expuestas a CME, en donde es muy clara la pérdida de las uniones intercelulares aunadas a una reducción considerable del tamaño celular.

El análisis de las Figuras 3 y 4 permite constatar que la aplicación de CMP y CME provocan cambios

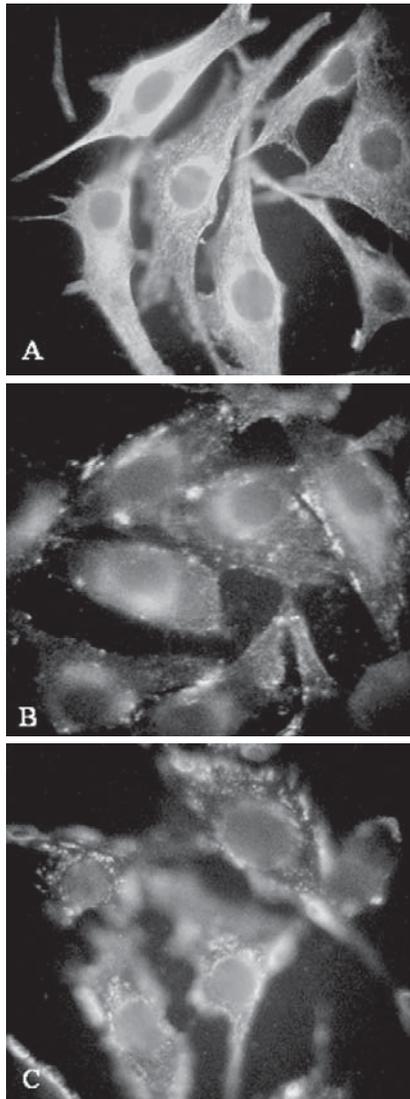


Figura 4. Citoesqueleto de microtúbulos de osteoblastos humanos expuestos a CM. Se muestran células control (A), expuestas a CMP (B) y CME (C).

en la morfología celular mostrando una alteración de las estructuras fibrilares del citoesqueleto. Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de CM provoca la desestabilización estructural de los microtúbulos conduciendo a la pérdida de conexiones intercelulares y provocando, al mismo tiempo la reducción del volumen del osteoblasto. Esta modificación tiene implicaciones a nivel de los procesos de la fisiología celular que involucran la dinámica de la membrana plasmática, como lo mencionan Sheetz y col. (2006).

Por otra parte, el CME induce una mayor alteración estructural en los osteoblastos. Dado que la intensidad de campo aplicada en cada tipo de CM no es muy diferente (0.65 mT en el caso del CMP y de 0.5 mT en el caso del CME), dicho efecto puede atribuirse al tipo de estimulación y no a la intensidad del campo aplicado.

A partir de los resultados de este estudio se puede decir que la aplicación de CM tiene una influencia evidente en la morfología de osteoblastos humanos. Por otra parte el uso de la β -tubulina como marcador permite observar los cambios provocados por los CM a nivel de citoesqueleto.

CONCLUSIONES

La aplicación de CM tanto pulsados como estáticos tiene un efecto en la morfología de las células de osteoblastos estudiadas, observado en el patrón de distribución de las redes de microtúbulos. Las observaciones obtenidas de los cambios morfológicos de los osteoblastos indican claramente que éstos son sensibles a la estimulación con CM, alterando su actividad celular a través de cambios en la estructura del citoesqueleto celular. Por otra parte, se observa que la estimulación CME provocó un mayor efecto en la morfología de los osteoblastos en comparación a la aplicación de CMP. Finalmente, la metodología propuesta por medio de la β -tubulina como marcador ha permitido dar un seguimiento adecuado del cambio morfológico a nivel de citoesqueleto.

REFERENCIAS

- Basset, C. A. (1968). Biological significances of piezoelectricity. *Calcif. Tissue RE*. 1: 2252-2257
- Bassett, C.A. (1993). Beneficial effects of electromagnetic fields. *J Cell Biochem* 51:387-393
- Bodamyali, T., Bhatt, B., Hughes, F.J., Winrow, V.R., Kanczler, J.M., Simon, B., et al. (1998). Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 250:458-461
- Chang, K. and Chang, W. H. (2001). The influence of pulsed electromagnetic field (PEMF) on osteopenia in an ovariectomized female rat model. Proceedings of the 23rd Annual Meeting of the Bioelectromagnetic Society, St Paul, Minnesota
- Chang, K., Chang, W. H., Wu, M.L., Shih, C. (2003). Effects of different intensities of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields on formation of osteoclast-like cells. *Bioelectromagnetics* 24(6):431-9
- De Mattei, M., Caruso, A., Traina, G.C., Pezzetti, F., Baroni, T., Sollazzo, V. (1999). Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro. *Bioelectromagnetics* 20:177-182
- Heermeier, K., Spanner, M., Trager, J., Gradinger, R., Strauss, P.G., Kraus, W., et al. (1998). Effects of extremely low frequency electromagnetic field (EMF) on collagen type I mRNA expression and extracellular matrix synthesis of human osteoblastic cells. *Bioelectromagnetics* 19:222-231

- Landry, P.S., Sadasivan, K.K., Marino, A.A., Albright, J.A. (1997). Electromagnetic fields can affect osteogenesis by increasing the rate of differentiation. *Clin Orthop* 338:262-270
- McLeod, K.J., Collazo, L. (2000). Suppression of a differentiation response in MC-3T3-E1 osteoblast-like cells by sustained, lowlevel, 30 Hz magnetic-field exposure. *Radiat Res* 153:706-714.
- Nagai, M., Ota, M. (1994). Pulsating electromagnetic field stimulates mRNA expression of bone morphogenic protein-2 and -4. *J Dent Res* 73:1601-1605
- Otter, M. W., McLeod, K. J., Rubin, C. T. (2000). Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. *Clin Orthop*, (355 suppl):S90-104
- Repacholi, M.H., Greenbaum, B. (1999). Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 20, 133-160
- Rosen, A. D. (2003). Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cellular Biochemistry Biophysics* 39:163-173
- Sheetz, M. P., Sable, J. E., Döbereiner, H. G. (2006). Continuous membrane cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 35:417-434
- Sherry, T.M., Pead M.J., Lanyon L.E. (1991). Modulation of bone loss during disuse by pulsed electromagnetic fields. *J Orthop Res* 9:600-608
- Takayama, K., Nomura, H., Tanaka, J., Zborowski, M., Harasaki, H., Jacobs, G.B., Malchesky, P.s., Licata, A.A., Nosei, Y. (1990). Effect of pulsing electromagnetic field on metabolically derived osteoporosis in rats: A pilot study. *ASAIO Trans* 36:M426-M428
- Takano-Yamamoto, T., Kawakami, M., Sakuda, M. (1992). Effect of a pulsing electromagnetic field on demineralized bone-matrixinduced bone formation in a bony defect in the premaxilla of rats. *J Dent Res* 71:1920-1925
- Teodori, L., Gohde, W., Valente, M. G., Tagliaferri, F., Coletti, D., Perniconi, B., Bergamaschi, A., Cerella, C. and Ghibelli, L., (2002). Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit stress-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Cytometry* 49:143-149
- Vander, M.A., Donahue, H.J., Rubin, C.T., McLeod, K.J. (2000). Osteoblastic networks with deficient coupling: differential effects of magnetic and electric field exposure. *Bone* 2:227-231
- Walleczek, J., Liburdy, R.P. (1990). Nonthermal 60-Hz sinusoidal magnetic field exposure enhances ⁴⁵CaCC uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Letters* 271, 157-160
- Yamamoto, Y., Ohsaki, Y., Goto, T., Nakasima, A., Iijima, T. (2003). Effects of Static Magnetic Fields on Bone Formation in Rat Osteoblast Cultures. *J Dent Res* 82(12):962-966, 2003