

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA

“Desarrollo de un sistema de estimulación magnética con ambiente controlado para el estudio de los efectos de radiación magnética de baja frecuencia en epitelios”

Tesis que presenta

Gonzalo Eduardo Domínguez Dyck

para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

en la Especialidad de

Ingeniería Eléctrica

Directores de la Tesis:

Dr. José Luis Reyes Sánchez
Dr. Pablo Rogelio Hernández Rodríguez

Dedicatorias

A Dios.

Por qué siempre estar primer lugar ya que nunca se aparta de mi lado.

A mi esposa Ana Laura

Por estar a mi lado en los mejores momentos, así como en las situaciones más complicadas y soportar tantos desvelos y no llegadas a la casa, tantas tardes sin salir por estar trabajando. Tu más que nadie sabes que no fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo, siempre me motivabas y me dabas palabras de esperanza. Muchas gracias por creer en mí, te amo.

A la memoria de mi Madre

A pesar de que no me viste graduar yo sé que tu confianza siempre estuvo en mí. Se que siempre estuviste orgullosa de mí y eso me sirvió para seguir adelante para no defraudarte. Hoy no estas con nosotros físicamente sin embargo te encuentras presente en mis pensamientos.

A mi familia

Por apoyarme en este proyecto de vida, aunque sea desde lejos. A mi papá Gonzalo Domínguez, a mi hermana Cristina y su esposo Javier, y a los 2 pequeños que alegran nuestras vidas, Iker e Ian.

Gonzalo Eduardo Domínguez Dyck

Autor

Agradecimientos

Al Dr. Pablo Rogelio por ver en mí ese potencial, desde la maestría ha sido mi guía y mi consejero. En verdad eso se aprecia mucho. Por tantas pláticas enriquecedoras y por formarme académicamente hasta convertirme en lo que soy hoy.

Al Dr. José Luis Reyes por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme apoyo para salir adelante.

Al Ingeniero Eladio, por ser un amigo, casi un padre y apoyo incondicional.

A Elsa Sánchez por brindarme la confianza en todo el trabajo que realizamos juntos en este proyecto, por tenerme paciencia y enseñarme muchas cosas biológicas que no entendía.

A mis sinodales, el Dr. Arturo Vera Hernández, Dr. Lorenzo Leija Salas, Dra. Laura Ivoone Garay Jiménez y Dra. Blanca Tovar Corona, por sus aportes y sugerencias para enriquecer este proyecto de investigación.

A mis compañeros de laboratorio y de materias, de quienes aprendí mucho y espero que ellos también lo hayan hecho de mí. A la Dra. Sandra Arias, el M. en C. Luis Manuel Martínez, al M. en C. Roberto Larraga, al M. en C. Luis Alberto Martínez y M. en C. Timoteo Cayetano.

Al pueblo de México, que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) me proporcionó una beca para realizar mis estudios en el CINVESTAV-IPN.

Sin ellos, este trabajo no se hubiera concretado.

CONTENIDO

Página

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT.....	VIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE.....	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2.1. <i>Hipótesis</i>	2
1.2.2. <i>Objetivos</i>	2
1.3. ESTRUCTURA DE LA TESIS	3
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE.....	5
2.1. EXPOSICIONES A CAMPO MAGNÉTICO Y ELECTROMAGNÉTICO DE EXTREMA BAJA FRECUENCIA EN LA VIDA COTIDIANA.....	5
2.1.1. <i>Impacto de los campos magnéticos en el ámbito social</i>	5
2.1.2. <i>Efectos negativos de la exposición de campos magnéticos en estudios epidemiológicos</i>	6
2.2. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA EXPOSICIÓN A CAMPOS MAGNÉTICOS DE EXTREMA BAJA FRECUENCIA	7
2.2.1. <i>Estudios in vivo</i>	7
2.2.2. <i>Estudios in vitro</i>	8
2.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS DE GENERACIÓN DE CAMPO MAGNÉTICO PARA EXPERIMENTACIÓN E INVESTIGACIÓN.....	9
2.3.1. <i>Campo magnético estático y variable en el tiempo</i>	9
2.3.2. <i>Campo magnético basado en bobinas</i>	9
2.4. FISIOLÓGÍA EPITELIAL.....	16
2.4.1. <i>Cultivos celulares (modelos de epitelio)</i>	18
2.5. CONDICIONES NORMALES DE CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO CELULAR.	18
2.6. TÉCNICAS DE MEDICIÓN PARA MODELOS DE BARRERA CELULAR <i>IN VITRO</i>	19
2.6.1. <i>Resistencia eléctrica Transepitelial</i>	19
2.6.2. <i>Impedancia eléctrica Transepitelial</i>	24
2.7. ENSAYO DE LA TÉCNICA DE “CIERRE DE HERIDA” PARA LA EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN CELULAR.	27
2.8. TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	27

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	30
3.1. DESARROLLO DE LA INSTRUMENTACIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3.1.1. <i>Generador de campo magnético</i>	30
3.1.2. <i>Sistema de medición de impedancia eléctrica transepitelial</i>	44
3.2. EXPERIMENTACIÓN PARA EVALUAR LOS EFECTOS DEL CAMPO MAGNÉTICO APLICADO EN CULTIVOS CELULARES	58
3.2.1. <i>Experimentos de medición de Impedancia</i>	58
3.2.2. <i>Regeneración de la monocapa celular mediante el ensayo de cierre de herida</i>	59
3.2.3. <i>Inmunofluorescencia</i>	60
 CAPÍTULO 4. PRUEBAS Y RESULTADOS.....	63
4.1. PRUEBAS Y RESULTADOS DE LA INSTRUMENTACIÓN DESARROLLADA.	63
4.1.1. <i>Pruebas del generador de campo magnético</i>	63
4.1.2. <i>Pruebas y resultados para el sistema de medición de impedancia eléctrica en monocapas celulares</i>	74
4.2. PRUEBAS Y RESULTADOS PARA EVALUAR EFECTOS DE LA APLICACIÓN DEL CAMPO MAGNÉTICO EN CULTIVOS CELULARES.	80
4.2.1. <i>Medición de Impedancia eléctrica</i>	80
4.2.2. <i>Cierre de herida</i>	83
4.2.3. <i>Inmunofluorescencia</i>	86
 CAPÍTULO 5. DISCUSIONES	93
5.1. AMBIENTE CONTROLADO	93
5.2. GENERADOR DE CAMPO MAGNÉTICO	93
5.3. MEDIDOR DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA TRANSEPIHELIAL.....	94
5.4. TÉCNICAS PROPUESTAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MONOCAPA CELULAR ANTE LA EXPOSICIÓN A LOS CAMPOS MAGNÉTICOS PULSADOS ...	94
5.4.1. <i>Impedancia eléctrica transepitelial</i>	94
5.4.2. <i>Cierre de la herida</i>	95
5.4.3. <i>Inmunofluorescencia</i>	96
 CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	97
 CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS	99
 REFERENCIAS.....	100

ANEXOS	110
ANEXO 1. PROCEDIMIENTOS Y DIAGRAMAS DE FLUJO.....	110
<i>Diagrama A1.1. Pasos para la simulación en Comsol Multiphysics®</i>	<i>110</i>
ANEXO 2. DESARROLLOS MATEMÁTICOS	111
ANEXO 3. PROGRAMAS DE LABVIEW	113
ANEXO 4. PROGRAMAS Y FUNCIONES EN MATLAB.	117
ANEXO 5. PROGRAMA DEL PIC16F84A	123
ANEXO 6. PIEZAS DETALLADAS DE LOS SISTEMAS DESARROLLADOS	124
ANEXO 7. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS.....	128
<i>A 7.1 Sembrado de células MDCK en filtros permeables.....</i>	<i>128</i>
<i>A 7.2 Procedimiento para el experimento comparativo con el dispositivo</i>	
<i>Millicell ERS-2 y el medidor de impedancia eléctrica.</i>	<i>131</i>
<i>A 7.3 Procedimiento experimental con campo magnético y medición de</i>	
<i>impedancia.....</i>	<i>132</i>
<i>A 7.4 Procedimiento de los experimentos para evaluar la toxicidad de nitrilo en</i>	
<i>células MDCK</i>	<i>132</i>
<i>A 7.5 Procedimiento para el experimento del ensayo de cierre de herida. ..</i>	<i>133</i>
<i>A 7.6 Procedimiento previo a la técnica de inmunofluorescencia</i>	<i>134</i>
<i>A 7.7 Procedimiento para la técnica de inmunofluorescencia.</i>	<i>135</i>
<i>A 7.8 Procedimiento para la esterilización de los sistemas desarrollados. ..</i>	<i>136</i>
ANEXO 8. EXPERIMENTO DE LA TOXICIDAD DEL NITRILLO	137
ANEXO 9. DIAGRAMAS Y CIRCUITOS ELECTRICOS	142
ANEXO 10. COMPARACIÓN DEL SISTEMA DESARROLLADO CONTRA EL MEDIDOR	
COMERCIAL DE TEER MILLICELL ERS-2	143
<i>Mediciones de TEER en diferentes circunstancias</i>	<i>143</i>
<i>Seguimiento de la monocapa celular mediante imágenes de microscopio. .</i>	<i>144</i>
<i>Seguimiento de la impedancia eléctrica transepitelial.....</i>	<i>145</i>
PUBLICACIONES.....	147
DEVELOPMENT OF A MAGNETIC-FIELD STIMULATION SYSTEM FOR CELL CULTURES IN	
SITU: SIMULATION BY FINITE ELEMENT ANALYSIS.....	147
DEVELOPMENT OF A SYSTEM FOR MEASURING AND CONTROLLING ENVIRONMENTAL	
PARAMETERS IN A CHAMBER FOR IN VITRO CELL CULTURES EXPERIMENTATION	154

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2.	Página
Fig. 2.1. Sistema de 5 bobinas tipo Rubens	10
Fig. 2.2. Sistema de 4 bobinas tipo Merritt.....	11
Fig. 2.3. Sistema de 4 bobinas tipo Alldred & Scollar	12
Fig. 2.4. Sistema de 3 bobinas tipo Merritt.....	12
Fig. 2.5. Configuración de bobinas Lee-Whiting	13
Fig. 2.6. Geometría del arreglo de bobinas Helmholtz.....	14
Fig. 2.7. Uniformidades del campo magnético en la región de trabajo los diferentes arreglos de bobinas.....	15
Fig. 2.8. Monocapa celular epitelial: (1) membrana apical, (2) membrana basolateral, (3) unión estrecha, (4) espacio intercelular , (5) membrana basal.	16
Fig. 2.9. Transporte a través del epitelio	17
Fig. 2.10. a) Células cultivadas en soportes sólidos como vidrio o plástico. b) Células cultivadas en filtros porosos.	20
Fig. 2.11. Diagrama del circuito eléctrico equivalente de una monocapa celular..	21
Fig. 2.12. Diagrama del circuito eléctrico reducido de la monocapa celular.	21
Fig. 2.13. Tipos de montaje para las mediciones de TEER, a) Medición mediante electrodos tipo <i>chopstick</i> , b) Medición mediante electrodo base y superior.....	22
Fig. 2.14. a) Forma correcta de colocar los electrodos, b) Error de colocación por ángulo , c) Error de colocación por profundidad.....	23
Fig. 2.15. Medidores comerciales de TEER.....	23
Fig. 2.16. Densidad celular y TEER de células MDCK en función del día de siembra ...	24
Fig. 2.17. Modelo eléctrico de la monocapa celular incluyendo capacitancia del electrodo y resistencia del medio de cultivo.	25
Fig. 2.18. (A) Espectro de la impedancia eléctrica de una monocapa a diferentes frecuencias. (B) Diagrama del circuito equivalente de una monocapa.....	26
Fig. 2.19. Arreglo multipozo del instrumento Cellzcope Nano analytics.....	26
Fig. 2.20. Migración celular con el método de ensayo de cierre de herida.	27
Fig. 2.21. Procedimiento de la técnica de inmunofluorescencia.	28
Fig. 2.22. Diferencia entre inmunofluorescencia directa e indirecta.....	29
Capítulo 3.	Página
Fig. 3.1. Diagrama general del generador de campo magnético.	31
Fig. 3.2. Esquema general de un arreglo de bobinas Helmholtz.....	32
Fig. 3.3. Vistas generadas en el software CAD para la visualización, construcción y ensamble del arreglo de bobinas Helmholtz.....	33
Fig. 3.4. Mallado de la simulación en COMSOL.	36

Fig. 3.5. Configuraciones del arreglo de bobinas a) Variación del radio de las bobinas, b) variación de la separación de las bobinas.	36
Fig. 3.6. Fotografía del prototipo físico del arreglo de bobinas Helmholtz	37
Fig. 3.7. Esquema del circuito de excitación de las bobinas Helmholtz.	39
Fig. 3.8. Distribución de sensores en la región de trabajo para el registro simultáneo del campo magnético..	41
Fig. 3.9. Panel frontal de la interfaz de usuario.....	43
Fig. 3.10. Panel frontal del programa en LabVIEW® para reproducir las secuencias almacenadas y enviarlas al circuito de excitación de las bobinas.	43
Fig. 3.11. Panel frontal del programa de visualización del campo magnético con el sensor central.....	44
Fig. 3.12. Diagrama general del sistema de medición de impedancia eléctrica... ..	45
Fig. 3.13. Cámara Multipozos para la Medición de Impedancia eléctrica	46
Fig. 3.14. Estructura de CAMMIE con cortes en 2 planos.	47
Fig. 3.15. Diagrama de flujo del medidor de impedancia eléctrica.....	49
Fig. 3.16. Circuito preliminares para la medición de impedancia.....	50
Fig. 3.17. Tarjeta electrónica final para la medición de impedancia eléctrica	50
Fig. 3.18. Jerarquía de programas en la interfaz gráfica de LabVIEW®.....	51
Fig. 3.19. Panel frontal de la interfaz desarrollada en LabVIEW® para la adquisición y presentación de valores de la impedancia eléctrica en las monocapas celulares.	52
Fig. 3.20. Modelo básico de la monocapa celular	53
Fig. 3.21. Comportamiento de la impedancia eléctrica de la monocapa celular en función de la frecuencia.	55
Fig. 3.22. Esquema comparativo entre algoritmos de aproximación de parámetros eléctricos de la monocapa.....	56
Fig. 3.23. Esquema comparativo del sistema comercial y el sistema desarrollado.	57
Fig. 3.24. Representación gráfica del protocolo experimental con campos magnéticos y toma de muestras de impedancia eléctrica transepitelial.	59
Fig. 3.25. Representación gráfica de la temporalidad de ejecución de los experimentos con campos magnéticos y toma de muestra para la inmunofluorescencia.	60

Capítulo 4.

Página

Fig. 4.1. Resultados de la simulación del campo magnético en el arreglo de bobinas Helmholtz.....	64
Fig. 4.2. Distribución del campo magnético y su correspondencia con el volumen de trabajo y las zonas de los filtros permeables.....	65
Fig. 4.3. Distribución uniforme de la densidad de flujo magnético (G) en la región correspondiente a los filtros con los cultivos celulares.	66
Fig. 4.4. Curvas de densidad de flujo magnético en proporción al número de vueltas. ...	67
Fig. 4.5. Curvas de densidad de flujo magnético variando el radio de las bobinas.	67

Fig. 4.6. Curvas de densidad de flujo magnético variando la distancia de separación de las bobinas.....	68
Fig. 4.7. Datos obtenidos de la simulación para distancias fuera del volumen de trabajo	69
Fig. 4.8. Densidad de flujo magnético medido desde el centro de las bobinas.....	71
Fig. 4.9. Señales de densidad de flujo magnético a temperatura ambiente superpuestas a diferentes frecuencias, a) $f < 5$ Hz, b) $60 \geq f \geq 5$ Hz.	72
Fig. 4.10. Respuesta del generador de campo magnético considerando la frecuencia y temperatura.....	73
Fig. 4.11. Medición de la temperatura durante 1 hora a 1 y 10 Hz.	73
Fig. 4.12. Comparativa de TEER del algoritmo desarrollado en Matlab con el algoritmo interno del sistema comercial CellZscope®.....	75
Fig. 4.13. Comparativa de la capacitancia de la monocapa celular del algoritmo desarrollado en Matlab con el algoritmo interno del sistema comercial CellZscope®.....	75
Fig. 4.14. Comparativa de la resistencia del medio/filtro del algoritmo desarrollado en Matlab con el algoritmo interno del sistema comercial CellZscope®.....	76
Fig. 4.15. Comparativa de TEER del sistema comercial CellZscope® y el sistema desarrollado.....	77
Fig. 4.16. Comparativa de la capacitancia de la monocapa celular C_{cl} del sistema comercial CellZscope® y el sistema desarrollado.	77
Fig. 4.17. Comparativa de la resistencia del medio del sistema comercial CellZscope® y el sistema desarrollado.	78
Fig. 4.18. Seguimiento de la TEER en las monocapas celulares a partir del momento de sembrado, *CM es cambio de medio.....	79
Fig. 4.19. Monitoreo de la TEER con modificaciones en el CO_2	80
Fig. 4.20. Comparativa de parámetros de impedancia eléctrica previa y posterior al tratamiento de campo magnético con magnitud de 10 G @ 60 Hz.	81
Fig. 4.21. Comparativa de parámetros de impedancia previa y posterior al tratamiento de campo magnético con magnitud de 50 G @ 60 Hz.	83
Fig. 4.22. Heridas captadas con microscopio, A, B) imágenes binarizadas para calcular el porcentaje de superficie cubierta por células, C) secuencia de evolución del cierre de la herida a lo largo del tiempo.....	84
Fig. 4.23. Porcentaje de confluencia de la herida a través del tiempo.	84
Fig. 4.24. Evolución del área de superficie de la herida.....	85
Fig. 4.25. Velocidad de cierre de la herida.....	85
Fig. 4.26. Inmunofluorescencia a) Cortes transversales, b) proyección máxima, C) Núcleos celulares, d) Proteína de la unión estrecha.	86
Fig. 4.27. a) Binarización de los núcleos celulares, b) Área de cada uno de los núcleos celulares, c) Histograma de circularidad de los núcleos celulares, d) Histograma del área de los núcleos celulares.	87
Fig. 4.28. Gráfica comparativa de densidad de células en cada etapa del experimento.....	88
Fig. 4.29. Gráfica comparativa de Área y forma circular de los núcleos celulares.....	88

Fig. 4.30. Comparativa de las proyecciones máximas del fluorocromo asociado con la presencia de CLDN1 50G @60Hz.	89
Fig. 4.31. Comparativa del promedio de intensidad de pixeles relacionados con la presencia de CLDN1 50G @60Hz.	90
Fig. 4.32. Inmunofluorescencia de control y tratamiento en las primeras 24 h de exposición a campo magnético 50G @60Hz.	90
Fig. 4.33. Inmunofluorescencia de control y tratamiento a las 48 h de exposición a campo magnético (24 h de exposición + 24 h de descanso) 50G @60Hz.	91
Fig. 4.34. Inmunofluorescencia de control y tratamiento a las 72 h de exposición a campo magnético (24 h de exposición + 24 h de descanso + 24 h de tratamiento) 50G @60Hz.	91
Fig. 4.35. Gráfica comparativa del promedio de intensidad de pixeles relacionados con la presencia de ZO-1 50G @60 Hz.	92

Anexos.

Fig. A. 1. Dimensiones de la superficie de contacto del electrodo medio.	112
Fig. A. 2. Panel del programa en LabVIEW para almacenar las secuencias de generación de campo en las bobinas Helmholtz.	113
Fig. A. 3. Panel del programa en LabVIEW para reproducir las secuencias almacenadas y enviarlas al circuito de potencia de las bobinas.	113
Fig. A. 4. Panel del programa para cargar las gráficas de TEER.	114
Fig. A. 5. Programa de comunicación entre el PIC y la tarjeta NI-USB.	114
Fig. A. 6. Programa para determinar los puntos en escala logarítmica	115
Fig. A. 7. Programa que mide y determina los valores de impedancia	115
Fig. A. 9. Programa que determina los componentes de las impedancias.	116
Fig. A. 10. Programa para generar automáticamente una ruta de guardado.....	116
Fig. A. 11. Dimensiones del cuadro de teflón.	124
Fig. A. 12. Dimensiones de la placa de acero inoxidable.	124
Fig. A. 13. Dimensiones del tornillo y tuerca de acrílico electrodo superior.....	125
Fig. A. 14. Dimensiones de la tapa de acrílico.....	125
Fig. A. 15. Dimensiones del electrodo de acero inoxidable.	126
Fig. A. 16. Dimensiones del carrete superior de las bobinas Helmholtz.	126
Fig. A. 17. Dimensiones carrete inferior de acrílico de las bobinas Helmholtz. ..	127
Fig. A. 18. Posicionamiento de los carretes de las bobinas Helmholtz.	127
Fig. A. 19. Monocapa celular confluyente en la caja Petri.	128
Fig. A. 20. Monocapa celular separándose por la acción del PBS.	129
Fig. A. 21. Células separadas y desprendidas del fondo de la caja Petri.	129
Fig. A. 22. Ejemplo de las células colocadas en la cámara de Neubauer.	129
Fig. A. 23. Filtros Transwell® y la colocación del medio de cultivo.....	130
Fig. A. 24. Células sembradas en los filtros.....	131
Fig. A. 25. Lesión de la monocapa celular.....	133

Fig. A. 26. Colocación de los cubreobjetos dentro del rack de PLA.	134
Fig. A. 27. Fotografías de las células con cada una de las concentraciones.....	138
Fig. A. 28. Imágenes de la Cámara de Neubauer.....	138
Fig. A. 29. Número de células en sobrenadante.....	139
Fig. A. 30. Imágenes del desprendimiento de la monocapa.	140
Fig. A. 31. Número de células levantadas con Tripsina.	140
Fig. A. 32. Diagrama esquemático de la tarjeta control del medidor de impedancia eléctrica.	142
Fig. A. 33. Comparativa de las mediciones de TEER con el sistema comercial Millicell ERS-2 en 2 condiciones y el Sistema de medición de impedancia eléctrica desarrollado. Se observan las mediciones realizadas en un periodo de 9 días.	144
Fig. A. 34. Evolución de la monocapa celular los días de cambio de medio a partir del momento de sembrado. * Indica la posición de la monocapa celular parcialmente confluyente.	145
Fig. A. 35. Gráficas de la magnitud de la impedancia eléctrica transepitelial a través de los días desde el sembrado.	146

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2.	Página
Tabla 2.1. Comparativa de los arreglos de bobinas [31].	14
Capítulo 3.	
Tabla 3.1. Características físicas del arreglo de bobinas.	38
Tabla 3.2. Modelo de ajuste de los datos de los sensores.	40
Tabla 3.3 Parámetros, abreviaturas, unidades y ecuaciones para cálculo del circuito equivalente de la impedancia eléctrica transepitelial.	53
Capítulo 4.	
Tabla 4.1. Densidad de flujo magnético en la región de interés.	66
Tabla 4.2. Respuesta de los sensores de efecto hall de las 10 series de mediciones y los resultados de la dispersión de los sensores, media (sd).	70
Tabla 4.3. Campo magnético durante una hora de exposición.	74
Tabla 4.4. Resultados de la prueba de wilcoxon matched-pairs signed rank para las comparaciones de los algoritmos	76
Tabla 4.5. Resultados de la prueba de Mann Whitney de las comparaciones del sistema comercial con el desarrollado	78
Tabla 4.6. Datos comparativos de teer y C_{cl} de tratamiento con campo magnético 10 G @ 60 HZ	81
Tabla 4.7. Datos comparativos de teer y C_{cl} de tratamiento con campo magnético 50 G @ 60 HZ	82
Anexos.	
Tabla A.1. Medidas de la colocación del electrodo en el sistema de medición de impedancia eléctrica.	111
Tabla A.2. Concentraciones de la solución de nitrilo para el tratamiento celular	137

RESUMEN

En este trabajo se presenta el desarrollo de una infraestructura para la estimulación magnética variable en el tiempo bajo un ambiente controlado, con el objetivo de estudiar los efectos de la radiación magnética de baja frecuencia en estructuras celulares, específicamente en células epiteliales.

Se ha reportado que los organismos vivos sufren alteraciones cuando son expuestos a estímulos magnéticos de baja frecuencia. Sin embargo, no estaba disponible una infraestructura para experimentación controlada que permitiera estudiar los efectos de la estimulación magnética *in situ*.

Se desarrolló un sistema para la estimulación magnética *in situ* que incluye un generador de campo magnético basado en un arreglo de bobinas Helmholtz, una interfaz gráfica de usuario, una etapa de control con sensores de retroalimentación y una etapa de potencia para la excitación de las bobinas del generador. El desarrollo se basó en la simulación de los parámetros físicos y magnéticos mediante el programa de análisis de elemento finito (COMSOL Multiphysics). La caracterización del prototipo físico se llevó a cabo midiendo los valores de densidad de flujo magnético en la región de trabajo, logrando una distribución uniforme que garantiza la homogeneidad del campo en los grupos experimentales.

El estudio de los efectos de la estimulación magnética en epitelios se llevó a cabo con el protocolo elaborado para este proyecto, que incluyó la medida de la impedancia eléctrica transepitelial toda vez que existe una relación directa entre el magnetismo y la dinámica de iones que se lleva a cabo en los epitelios. Para este fin, se desarrolló un dispositivo de medición de la impedancia eléctrica transepitelial. El protocolo incluyó además un ensayo del *cierre de la herida* para evaluar la migración y proliferación celular en las monocapas celulares y la técnica de inmunofluorescencia, para observar y cuantificar el proceso activo que se lleva a cabo en las uniones estrechas y el desplazamiento de iones a través de ellas. El uso de esta técnica también permitió determinar las características físicas de los núcleos celulares del epitelio.

Empleando las diferentes técnicas de medición, propuestas en el protocolo de experimentación, se observaron efectos no significativos entre las células tratadas y las células control en el parámetro de impedancia eléctrica transepitelial: Tampoco hubo diferencias en el estudio de la migración y proliferación celular. Cabe destacar que empleando la técnica de visualización celular con microscopía de confocal se observó una disminución en la expresión de la proteína CLDN1 y un aumento en ZO-1 en las primeras 24h de tratamiento con exposición de campos magnéticos de baja frecuencia.

Los resultados sugieren considerar un número mayor de opciones en los valores de los parámetros del campo magnético. En el caso de los resultados de transporte de iones en las uniones estrechas, plantean una continuidad y ampliación de los experimentos para obtener más información en esta línea.

ABSTRACT

This project has developed the necessary infrastructure for time-varying magnetic stimulation under a controlled environment, with the aim of studying the effects of the extremely low-frequency magnetic field radiation in epithelial cells.

It has been reported that living organisms suffer alterations when they are exposed to low-frequency magnetic stimuli. However, an infrastructure for controlled experimentation was not already available to study the effects of magnetic stimulation in situ.

An in situ magnetic stimulation system was developed which includes a magnetic field generator based on a Helmholtz coil array, a graphic user interface, a control stage with feedback sensors and a power supply for the coil array of the generator. The development was based on the simulation of the physic and magnetic parameters by the finite element analysis program (COMSOL Multiphysics). The physical prototype of the generator was characterized through the measurement of the magnetic flux density values in the working volume, where a uniform distribution was obtained guarantying the homogeneity of the magnetic fields in the experimental groups.

The study of the effects due to the magnetic field stimulation in epithelia was made with a specific protocol developed for this project, that included transepithelial electric impedance measurement since there is a direct relationship between magnetism and ions dynamics in epithelia. For this purpose, a transepithelial electrical impedance measurement device was developed. The protocol included a scratch wound assay to observe the migration and proliferation in cell monolayers and the immunofluorescence technique, with the aim of observing and quantifying the active process in the tight junctions and the ionic displacement through them. The use of this technique also allowed to monitor the cell nuclei of the epithelium.

Using the different measurement techniques proposed in the experimental protocol no significant effects were obtained between the treated cells and the control cells in the transepithelial electrical impedance, nor in the study of cell proliferation and migration. It should be noted that it was observed a decrease in protein expression of CLDN1 and an increase in ZO-1 in the first 24 hours of treatment with the exposure of low-frequency magnetic fields through the technique of cellular visualization with a confocal microscope.

The obtained results suggest an extension of the number of options in the values of the parameters of the magnetic field. The results of ion transportation in the tight junctions suggest that it is necessary to continue and carry out more experiments to obtain additional information in this line of research.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes y estado del arte.

La cercanía de las líneas de transmisión de energía eléctrica a las zonas urbanas y el uso de motores eléctricos y dispositivos electrodomésticos, hacen que cada día las personas se vean expuestas a los campos magnéticos de baja frecuencia [1].

El estar expuestos a los diferentes campos magnéticos no es algo que se pueda evitar, debido a que nos encontramos inmersos en él, comenzando con el campo magnético terrestre, con una magnitud en la superficie de la tierra de 0.25-0.65 G [2].

Por otro lado, también se ha reportado que el campo magnético actúa sobre las estructuras biológicas, como la regeneración celular en heridas [3], formación de hueso [4] o desarrollando algún tipo de cáncer como leucemia [5], [6].

No obstante que se han reportado estudios epidemiológicos, existen evidencias de los efectos de los campos magnéticos mediante la experimentación con campos magnéticos en los seres vivos [7], en la mayoría de los casos reportados, la generación del campo magnético se efectuó a frecuencias fijas variando solamente la magnitud. Se requiere por lo tanto plantear nuevas técnicas y/o métodos científicos para experimentar a nivel celular y estar en la posibilidad de determinar específicamente esos efectos.

Para este fin, se necesita desarrollar una metodología que permita llevar a cabo estudios específicos, con el objetivo de generar información a nivel microestructura de células o tejidos debido a la falta de técnicas o metodologías, así como una infraestructura para mantener el sano crecimiento celular y su viabilidad.

1.2. Planteamiento del problema

No se ha reportado una infraestructura que permita la experimentación en epitelios con campos magnéticos bajo condiciones controladas para el mantenimiento de las células en cultivo, con el objetivo de asegurar que los efectos medidos no se vean alterados por variables externas al tratamiento.

Por la complejidad de las estructuras biológicas, la medición de los efectos por la aplicación de campos magnéticos a tejidos celulares se debe hacer con variables estrictamente relacionadas con el experimento y controlar aquellas como la temperatura, humedad, %CO₂ y exposición a la luz. Además, cuando se trata de sistemas biológicos es necesario evaluar los resultados con diversos indicadores, los cuales proporcionan una visión general de los efectos relacionados con el tratamiento aplicado.

1.2.1. Hipótesis

Existen reportes de efectos de la aplicación de campos magnéticos en tejido u organismos biológicos, sin embargo, es importante conocer las afectaciones a nivel celular que puedan presentarse mediante generadores de campo magnético, que permitan la exposición de diferentes densidades de flujo magnético y frecuencia, así como mantener un ambiente controlado para el sano crecimiento celular.

Se espera observar que campos magnéticos de baja frecuencia alteren las condiciones y/o propiedades de las células epiteliales, tales como: la impedancia eléctrica transepitelial, la velocidad de regeneración de la monocapa y la expresión de las proteínas de la unión estrecha cuando se sigue una metodología que establece un ambiente controlado de crecimiento celular.

1.2.2. Objetivos

1.2.2.1. Objetivo general

Generar la metodología e infraestructura necesarias para la experimentación con campos magnéticos pulsantes variables en frecuencia y densidad de flujo magnético en epitelios.

1.2.2.2. Objetivos específicos

Diseñar y desarrollar un dispositivo para generar campos magnéticos pulsantes variables en frecuencia y densidad de flujo magnético aplicados a monocapas

celulares, para operar dentro de una cámara capaz de mantenerse en un entorno estéril y bajo ambientes controlados de % CO₂, temperatura y humedad.

Diseñar y desarrollar un sistema para la medición de impedancia eléctrica de monocapas celulares sembradas en filtros permeables de 6.5 mm de diámetro y que a su vez sea apto para ser alojado en un espacio dentro del generador de campo magnético.

Desarrollar una metodología de experimentación con la aplicación de campos magnéticos en células epiteliales incluyendo las diferentes técnicas de evaluación de la integridad de las monocapas celulares.

1.3. Estructura de la tesis

El presente trabajo se divide en 5 capítulos. En el primero se da una introducción de la importancia de los campos magnéticos en la vida cotidiana, así como sus posibles efectos en los organismos vivos. Se plantea la necesidad de desarrollar un sistema para realizar pruebas de laboratorio y determinar si existe una relación de los efectos del campo magnético en monocapas celulares (MDCK). Se mencionan los objetivos generales y específicos.

En el capítulo 2 se describe el estado del arte, se presentan algunos reportes de afectaciones e impacto por la aplicación del campo magnético en materia viva. Se muestran algunos sistemas desarrollados para aplicar campos magnéticos en biología y algunas técnicas para evaluar la integridad en las monocapas celulares.

El capítulo 3 presenta la metodología propuesta, en ésta se describen de forma detallada las partes de los sistemas desarrollados, así como los prototipos tanto del generador de campo magnético como el sistema de medición de impedancia eléctrica transepitelial. También este capítulo muestra los procedimientos de experimentación para evaluar los efectos de la aplicación del campo magnético en cultivos celulares.

En el capítulo 4 se describen las diferentes pruebas de caracterización y simulación del sistema generador de campo magnético y los procedimientos de validación de ambos sistemas desarrollados; el generador de campo magnético y el medidor de impedancia eléctrica transepitelial. En este capítulo también se presentan los resultados de la experimentación con los cultivos celulares.

En el capítulo 5 se exponen las discusiones referentes a los resultados obtenidos de la validación de los sistemas desarrollados. Además, se discute sobre los resultados de la experimentación de cada uno de los parámetros observables.

El capítulo 6 presenta conclusiones del trabajo desarrollado.

En el capítulo 7 se proponen los trabajos a futuro y las perspectivas.

Por último, el apartado de anexos describe de manera detallada los procedimientos de simulación, desarrollos matemáticos, códigos de los programas desarrollados en las diferentes plataformas de programación. También se muestran los planos de las piezas de cada uno de los sistemas desarrollados, así como los diagramas y circuitos electrónicos. Finalmente, se expone la metodología de experimentación donde se detallan los procedimientos de cada una de las técnicas utilizadas.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

2.1. Exposiciones a campo magnético y electromagnético de extrema baja frecuencia en la vida cotidiana

Los campos electromagnéticos están presentes en todos los lugares y todo el tiempo, un ejemplo de esto, por supuesto es la luz. Los campos eléctricos y magnéticos forman parte del espectro electromagnético, el cual abarca desde los campos magnéticos estáticos (0 Hz) hasta los rayos gamma, con frecuencia de 300 ExaHertz (EHz) ($1\text{EHz} = 1 \times 10^{18}$ Hz). Se ha reportado cómo las radiaciones electromagnéticas interactúan con las estructuras biológicas y la frecuencia de las ondas determina que se presenten efectos ionizantes y no-ionizantes [8]. En el caso de las radiaciones ionizantes, las cuales poseen energía suficiente para romper algunos enlaces moleculares, son conocidas por causar quemaduras cutáneas o algunos tipos de cánceres, entre otros efectos adversos [9]. Estas radiaciones se presentan en las frecuencias más altas del espectro electromagnético, en tanto que las no-ionizantes se encuentran en las frecuencias intermedias y bajas.

Es por eso que la Organización Mundial De La Salud (OMS) busca establecer los límites de exposición a campos electromagnéticos (CEM) en lugares de trabajo y casas habitación [10]. Asimismo, la Comisión Internacional para la Protección de la Radiación No-Ionizante (ICNIRP, por sus siglas en inglés), la cual es un organismo no gubernamental que se encarga de evaluar las investigaciones y establecer los límites de exposición de CEM, recomienda periodos cortos de exposición a campos magnéticos de extrema baja frecuencia (ELF-MF). . Fuera de las consideraciones y recomendaciones hechas por este organismo para evitar la sobre-exposición a estas radiaciones, no se tiene evidencia clara de las alteraciones debidas a las exposiciones de ELF-MF en seres vivos [11].

En este capítulo se presenta una breve recopilación de estudios relacionados con los efectos de la aplicación de campos magnéticos de baja frecuencia.

2.1.1. Impacto de los campos magnéticos en el ámbito social

Durante el desarrollo de los sistemas de suministro de energía eléctrica, se establecieron 2 estándares de frecuencia para la generación de corriente alterna

(CA) que siguen vigentes hasta el día de hoy, 50 Hz y 60 Hz. Ambos estándares se sitúan en el rango de las ondas denominadas de extrema baja frecuencia.

El estar expuestos a radiaciones de campos magnéticos no es algo que se pueda evitar. Tanto el vivir o trabajar cerca de las líneas de transmisión de energía como el uso de motores eléctricos, dispositivos electrodomésticos y por supuesto el campo magnético terrestre, hacen que cada día se tenga una exposición a los campos magnéticos de baja frecuencia.

2.1.2. Efectos negativos de la exposición de campos magnéticos en estudios epidemiológicos

Se ha hablado mucho acerca de los efectos de la exposición a campos magnéticos, debido a una alta incidencia de ciertos tipos de cáncer en personas que viven o trabajan cerca de ambientes expuestos. Los estudios epidemiológicos más conocidos son los casos de leucemia relacionados con los campos magnéticos de las líneas de transmisión (Feychting, 1997) [12].

Savitz y Loomis, en 1995, encontraron que las exposiciones a campo magnético se vincularon con leucemia y con cáncer en el cerebro. Estos autores recopilaron información de trabajadores de las principales compañías eléctricas en los Estados Unidos de Norteamérica, entre 1950 y 1986, observándose que el total de muertes a causa de cáncer aumentó ligeramente con la exposición a campos magnéticos [5]. Desde hace varias décadas se ha tenido la creencia de que existe una relación entre la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia y el cáncer. Sin embargo, diversos autores realizaron estudios sin llegar a una conclusión que demostrara dicha relación [6], [13].

En el año 2002, la Agencia Internacional para Investigación del Cáncer (IARC) clasificó en el “grupo 2B” a los campos magnéticos de baja frecuencia como “posiblemente cancerígenos para los humanos” [14]. Se basaron en un análisis combinado de diferentes estudios y reportaron un pequeño aumento en el riesgo de leucemia en niños después de una exposición a los campos magnéticos de extrema baja frecuencia [15]. Por otra parte, Michael Carlberg *et al.*, basado en su estudio del 2017, concluyeron que no existe una asociación de la exposición de campo magnético y el riesgo de cáncer del tipo meningioma [16].

2.2. Efectos biológicos de la exposición a campos magnéticos de extrema baja frecuencia

2.2.1. Estudios *in vivo*

En ciencia, *in vivo* se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo, la cual puede realizarse tanto en humanos como en animales.

J. I. Jacobson *et al.*, reportaron resultados de un tratamiento del dolor en personas con osteoartritis basado en la aplicación de campos magnéticos. Se seleccionaron 176 pacientes separados aleatoriamente en 2 grupos, los expuestos a los campos magnéticos y los de efecto placebo. Después de 2 semanas de exposición, se observó una disminución del dolor en el 48% de los expuestos contra el 8% de los pacientes con placebo. Los autores concluyeron que los campos magnéticos pueden ser seguros y parcialmente útiles en personas con dolor crónico de rodilla asociado a la osteoartritis [17].

En otro estudio (H. De Paz, 2001), se determinó el efecto del campo magnético de baja frecuencia sobre el proceso de cicatrización de la piel. Se emplearon 30 ratones Balb-C distribuidos en 6 grupos. Los 2 primeros grupos para conocer las posibles modificaciones de la piel con la aplicación o no de campos magnéticos. Los 4 restantes permitieron determinar las particularidades macroscópicas y microscópicas de la piel de los animales, luego de realizarse heridas cutáneas y aplicarse el campo magnético con la bobina de Helmholtz. La frecuencia utilizada fue de 60 Hz y una intensidad de 100 G (10 mT). Los autores concluyeron que el campo magnético de baja frecuencia no produce modificaciones significativas sobre la piel de los animales de experimentación empleados. Esto coincide con otros resultados en humanos, en el sentido de que este agente magnético, aplicado a baja frecuencia e intensidad y por corto tiempo, no induce efectos nocivos en las ratas [18]–[21].

En otros estudios, el efecto de campos magnéticos en la germinación de semillas de arroz y tomate mostraron que los campos magnéticos estacionarios, con intensidades de 50 G y 100 G, estimularon la germinación de esas semillas, al igual que el crecimiento de plántulas de tomate entre 8%-18% [22].

2.2.2. Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* pueden proveer información para entender lo que sucede en un organismo completo. Su principal objetivo es observar el comportamiento de la materia viva fuera de su entorno bajo las condiciones necesarias para estudiar las células fuera del tejido. Los principales factores por considerar son: temperatura, humedad, concentraciones de CO₂, entre otros, ya que de ellos depende la viabilidad y el crecimiento celular de la muestra bajo estudio. [23], [18].

En un estudio realizado por Fanelli *et al.*, 1999, células U937 y CEM, provenientes de seres humanos, fueron expuestas a magnitudes de campo magnético estático de 6 – 60 Gauss. Se observó un incremento en la supervivencia de las células mediante la inhibición de la apoptosis a través de la afluencia de los iones de Calcio (Ca²⁺). La apoptosis se indujo de tal manera que se pudiera observar el efecto antiapoptótico provocado por los campos magnéticos [25].

En otro estudio realizado por Jung *et al.*, se reportó cómo las células nerviosas, provenientes de sujetos con enfermedades neurodegenerativas, mostraron un incremento en la diferenciación neuronal al exponerse a ELF-EMF. Las características del campo magnético y tiempos de exposición fueron 10 G de amplitud a 50 Hz durante 5 días consecutivos [26].

En estudios hechos por Focke *et al.*, en cultivos primarios de fibroblastos humanos, encontraron un incremento significativo en la fragmentación del ADN. La alteración en el ADN la detectaron por electroforesis en gel para una sola célula (Comet assay) después de exponer fibroblastos a una densidad de campo magnético intermitente de 10 G @ 50 Hz durante 15 h [27].

Para los estudios *in vitro* se ha reportado el uso de generadores de campo magnético cuya característica principal es el proporcionar un campo magnético uniforme en la región de trabajo. Sin embargo, la mayoría de los generadores utilizan la frecuencia de la línea eléctrica para generar el campo magnético sinusoidal, restringiendo los estudios sólo a esa frecuencia.

2.3. Métodos y procedimientos de generación de campo magnético para experimentación e investigación

Comúnmente, para generar campos magnéticos con fines de experimentación *in vitro* se suelen utilizar 2 tipos de fuentes: los campos magnéticos estáticos y los campos magnéticos variantes en el tiempo. Los parámetros que se toman en cuenta para la experimentación *in vitro*, al igual que la frecuencia y densidad de flujo magnético, son la uniformidad del campo y el tiempo de exposición. Los casos descritos en la sección 2.2, muestran que variaciones en los valores de estos parámetros, aplicados a tejidos biológicos, tienen efectos diferentes.

2.3.1. Campo magnético estático y variable en el tiempo

Los campos magnéticos estáticos son campos constantes en los cuales ni la magnitud del campo magnético ni su dirección cambian a través del tiempo. Es decir, la magnitud del campo se comporta como una señal con frecuencia de 0 Hz.

Los seres humanos nos encontramos expuestos a campos magnéticos estáticos que van desde 0.5 G (campos magnéticos de la tierra) hasta casi 10^5 G (resonancia magnética). La fuente más común de los campos magnéticos estáticos son los imanes permanentes ya sea natural (magnetita) o hecho de aleaciones de materiales ferromagnéticos [2], [28].

Otra fuente de generación de campo magnético es mediante la circulación de corriente eléctrica a través de un conductor. Al circular una corriente constante se puede obtener un campo magnético estático. A diferencia de los imanes, los sistemas de generación de campo magnético, basados en bobinas, generan un campo magnético variable en el tiempo, con cambio continuo o pulsado.

2.3.2. Campo magnético basado en bobinas

Para experimentos *in vitro* resulta de fundamental importancia generar campos magnéticos uniformes, para garantizar en todo momento las mismas condiciones de exposición en un volumen de trabajo definido [29].

Se han estudiado configuraciones de bobinas en paralelo o en serie que permiten delimitar una región de trabajo espacial o volumen, donde la densidad de campo magnético se mantiene constante y uniforme [30], [31].

A continuación, se mencionan las principales configuraciones de bobinas y sus características.

2.3.2.1. Sistemas de bobinas cuadradas

En estos sistemas de bobinas, la principal característica es que son utilizados para volúmenes de trabajo muy amplios, son relativamente fáciles de elaborar y al igual que los arreglos de bobinas circulares, el campo magnético se determina mediante modelos matemáticos bien establecidos.

En la Fig. 2.1 se observa el arreglo de bobinas cuadradas de Rubens [32], el número de vueltas es proporcional a los números indicados en la figura y el campo magnético en la región uniforme está dado por (1):

$$B = \frac{1.878 \times 10^{-6} Ni}{d} \quad (1)$$

Donde i es igual a la corriente (A) que circula por las bobinas, N es el número de vueltas y d es la longitud de los lados de la bobina cuadrada en metros, todo multiplicado por la constante 1.878×10^{-6} [32].

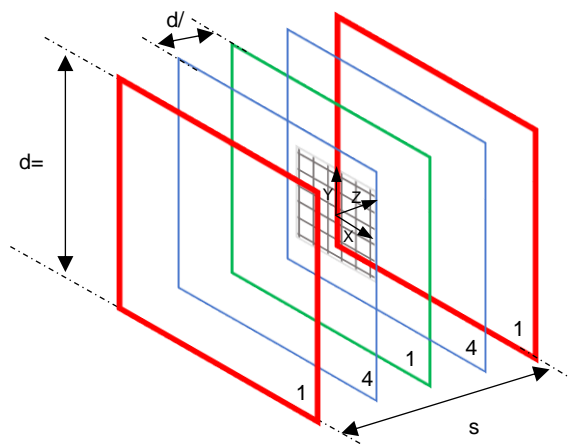


Fig. 2.1. Sistema de 5 bobinas tipo Rubens [32].

En los sistemas de 4 bobinas cuadradas propuestos por Merritt [33], a diferencia del propuesto por Rubens, la separación entre las bobinas sigue la relación $a/b=0.128106$ y $b/d=0.505492$, donde a y b son distancias del centro a las bobinas y $d=1/4$ del perímetro (Fig. 2.2). En este caso, el campo magnético uniforme está dado por (2).

$$B = \frac{1.795 \times 10^{-6} Ni}{d} \quad (2)$$

Cabe señalar que la corriente de las bobinas interiores (azules) y exteriores (rojas) son diferentes de tal forma que pretende conservar la relación de: $Ni \text{ bobinas interiores} / Ni \text{ bobinas exteriores} = 0.423514$ [33].

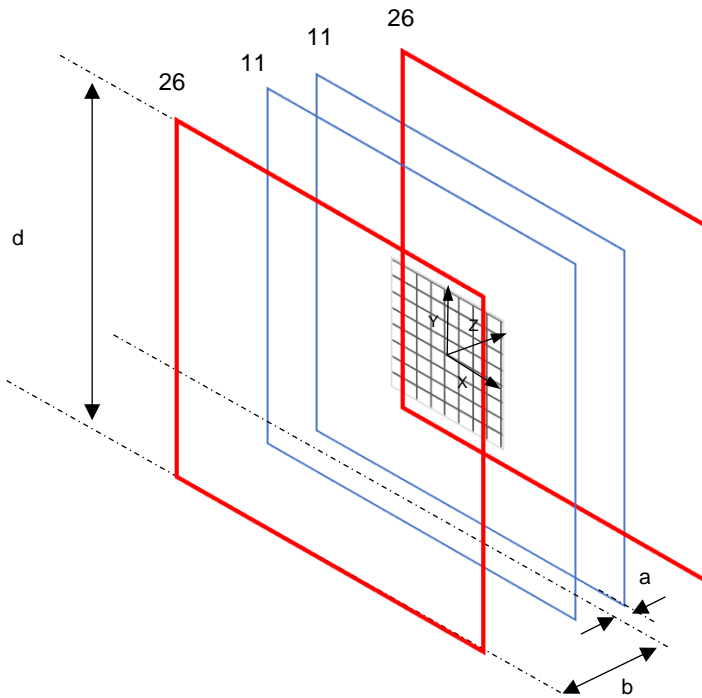


Fig. 2.2. Sistema de 4 bobinas tipo Merritt [33].

Similar al sistema Merritt de 4 bobinas, se encuentra el arreglo Alldred & Scollar de 4 bobinas. La diferencia de este arreglo respecto al de Merritt, es que no se conservan las relaciones de los perímetros de las bobinas interiores y exteriores. En Fig. 2.3 se observa la configuración de este arreglo de bobinas.

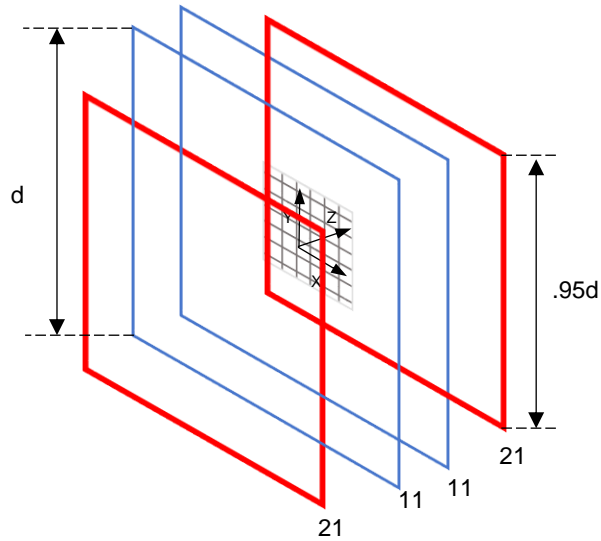


Fig. 2.3. Sistema de 4 bobinas tipo Allred & Scollar [34].

Otra configuración de bobinas cuadradas es la formada por 3 bobinas, también propuesta por Merritt (Fig. 2.4). De forma similar a las configuraciones anteriormente mencionadas, en este arreglo, la separación de las bobinas (s) respeta la relación $s/d=0.821116$. El campo magnético para la zona de trabajo en este sistema está dado por (3).

$$B = \frac{1.749 \times 10^{-6} Ni}{d} \quad (3)$$

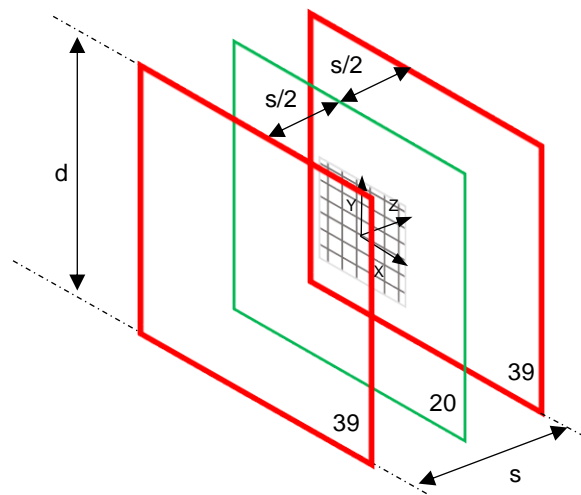


Fig. 2.4. Sistema de 3 bobinas tipo Merritt [33].

2.3.2.2. Sistemas de bobinas circulares

Los sistemas de bobinas circulares al igual que los de bobina cuadrada sirven para generar un campo magnético uniforme en una región determinada (volumen de trabajo). En los sistemas circulares dicha región es más reducida. Sin embargo, estos sistemas suelen ser mayormente utilizados por su simplicidad en las configuraciones de las bobinas y por su sencillez en cuanto a su elaboración.

Entre los sistemas de bobinas circulares tenemos el propuesto por Lee-Whiting [35], el cual consta de 4 bobinas. En este arreglo, la relación entre el número de vueltas de las bobinas interiores y exteriores es de 4:9 como se muestra en Fig. 2.5.

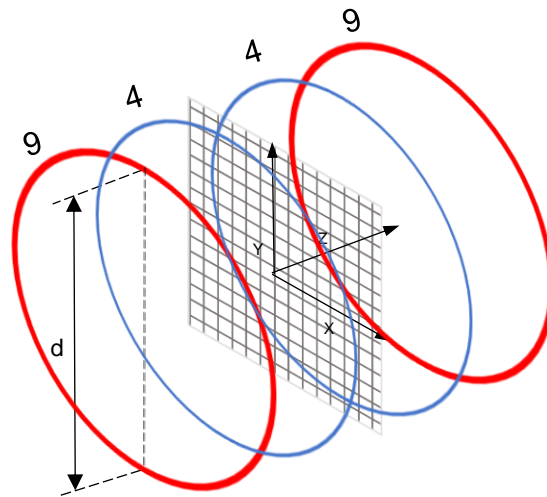


Fig. 2.5. Configuración de bobinas Lee-Whiting [35].

Sistema de bobinas Helmholtz

Este sistema es el más usado en aplicaciones en el ámbito médico biológico, esencialmente por la simplicidad en su diseño y construcción, aunado a la uniformidad de campo en la región de trabajo. Esta configuración consta de 2 bobinas conectadas en serie y con igual número de vueltas, lo cual garantiza la misma corriente circulante en ambas [36].

En Fig. 2.6 se muestra la geometría del arreglo de bobinas Helmholtz, donde r corresponde al radio de las bobinas, así como la separación entre ellas.

Mediante los parámetros geométricos (N es el número de vueltas) y la magnitud de corriente eléctrica circulante (i), se determina el campo magnético en la región de trabajo empleando (4).

$$B = \frac{8.9917 \times 10^{-7} Ni}{r} \quad (4)$$

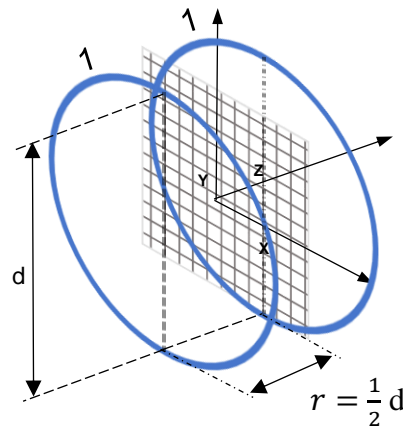


Fig. 2.6. Geometría del arreglo de bobinas Helmholtz [36].

En la TABLA 2.1. se presenta un resumen de los sistemas de bobinas descritos anteriormente y sus principales características.

TABLA 2.1. COMPARATIVA DE LOS ARREGLOS DE BOBINAS [31].

Arreglo de bobinas	Forma de las bobinas	Número de bobinas	Relación de diámetro o lado de las bobinas	Relación de corriente-vueltas	Campo central ($\mu T/A$)
Rubens	Cuadradas	5	d, d, d, d, d	19/4/10/4/19	35.69/d
Merritt et al.	Cuadradas	4	d, d, d, d	26/11/11/26	46.65/d
Aldred & Scollar	Cuadradas	4	.95d, d, d, .95d	12/11/11/21	40.29/d
Merritt et al.	Cuadradas	3	d, d, d	39/20/39	68.21/d
Lee-Whiting	Circulares	4	d, d, d, d	9/4/4/9	17.96/d
Helmholtz	Circulares	2	d, d	1/1	1.798/d

Se destaca que el arreglo de bobinas Helmholtz es el más simple de elaborar por la cantidad de bobinas que tiene, aunado a que las bobinas son idénticas en número de vueltas y en tamaño.

En Fig. 2.7 se muestran esquemáticamente los cálculos numéricos del campo magnético en la región de trabajo, en donde se busca que la intensidad se conserve uniforme. Los cálculos fueron realizados en un área de $2 \times 2 \text{ m}^2$, en corte central. Las variaciones de la uniformidad del campo se muestran en porcentaje. Las áreas oscuras muestran la región de campo magnético con variaciones en la uniformidad menores al 0.02% [31].

No obstante que tenemos arreglos en donde el campo magnético se conserva uniforme en un mayor volumen de trabajo, el costo beneficio que nos ofrece el arreglo de bobinas Helmholtz resulta más apropiado para los requerimientos de simplicidad y espacio físico.

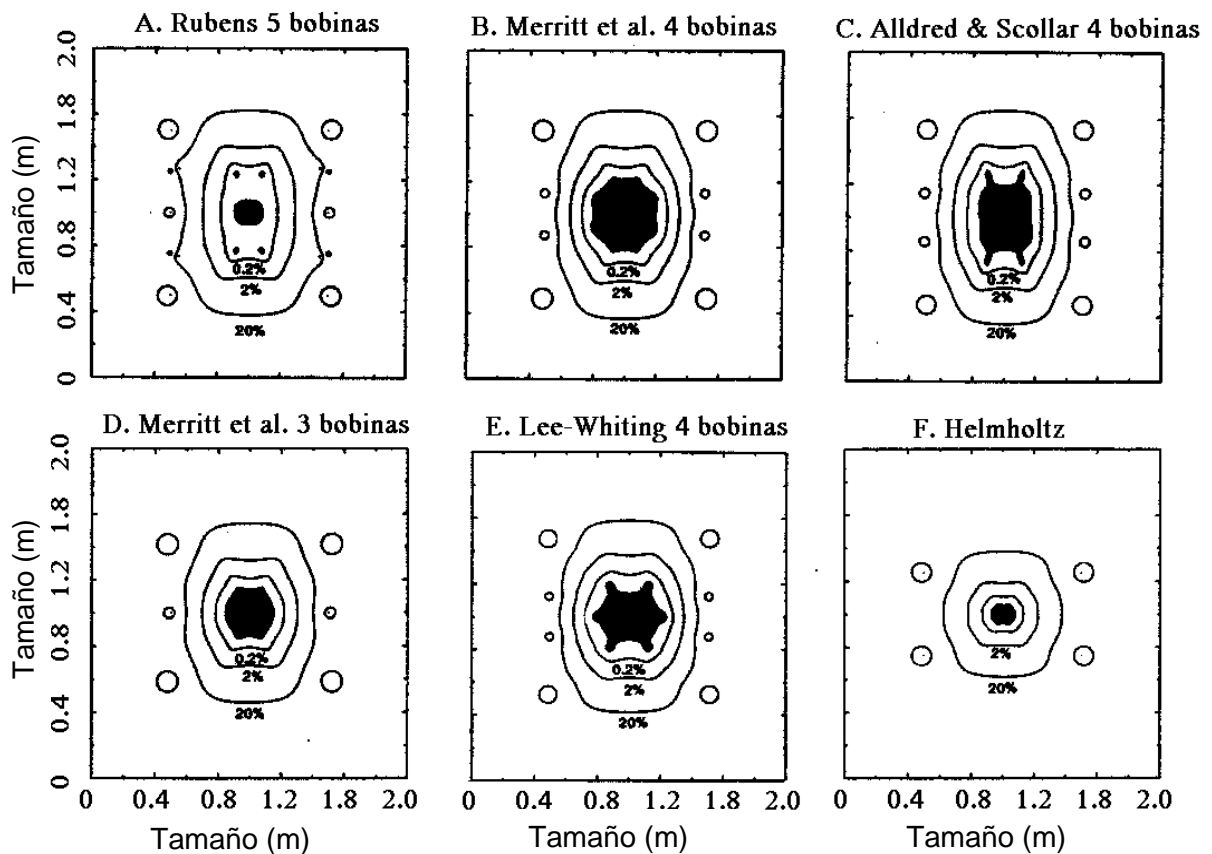


Fig. 2.7. Uniformidades del campo magnético en la región de trabajo los diferentes arreglos de bobinas (zona oscura) [31].

2.4. Fisiología epitelial

El mayor reto de las investigaciones con materia viva es aplicar los conocimientos para mejorar la calidad de vida humana. Es bien sabido que, antes de someter a seres humanos a experimentos de cualquier índole, generalmente se tienen que realizar experimentaciones sobre modelos celulares. Los tejidos epiteliales son utilizados como modelo de estudio para las radiaciones magnéticas *in vitro*.

Los tejidos epiteliales se encuentran distribuidos en los organismos vivos, representando en su conjunto más del 60 % de todas las células del cuerpo humano. Son tejidos avasculares siendo las células nutridas por el tejido conectivo subyacente.

Cabe destacar que los tejidos epiteliales son el origen de diversos cánceres y que éstos se han relacionado con la exposición de las células de estos tejidos a estímulos químicos o físicos, como la exposición a campos magnéticos.

Se constituyen por células muy cercanas y unidas entre sí, llevando a cabo diferentes roles especializados, en donde cada una de las funciones es lograda de acuerdo con la organización estructural de las células epiteliales. El epitelio básicamente está formado por 3 partes: células, uniones estrechas y una membrana basal la cual sirve de soporte estructural para las células epiteliales. La estructura del epitelio se muestra en Fig. 2.8.

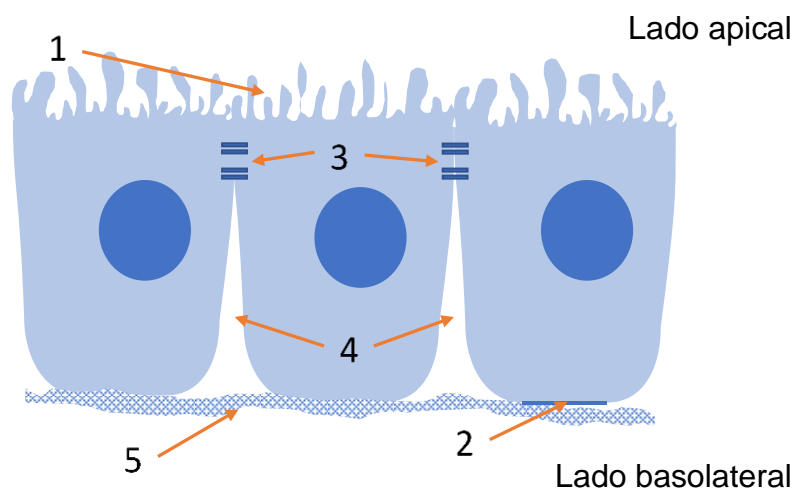


Fig. 2.8. Monocapa celular epitelial: (1) membrana apical, (2) membrana basolateral, (3) unión estrecha, (4) espacio intercelular, (5) membrana basal [37].

La principal función del epitelio es mantener una barrera (membrana epitelial) que funciona con una permeabilidad selectiva, es decir, regulan el intercambio de

materiales entre los lados de la barrera celular de acuerdo con las necesidades del organismo.

Para generar la membrana epitelial es necesario que las células se acomoden en forma de una lámina continua y orientadas de manera que una cara es el lado basal y la otra el lado apical de la membrana. La unión de las células se realiza mediante uniones intercelulares llamadas uniones estrechas (TJ) situadas muy cerca de la cara apical [38].

Existe una membrana que sirve como soporte físico, además de servir como separación de otros tejidos, llamada membrana basal, la cual está compuesta por una red de colágeno y filamentos proteicos [39].

Los epitelios requieren una correcta polarización apical–basal de las células para el buen funcionamiento de los organismos (homeostasis). Los mecanismos de la polarización de las células no solo son responsables de la diversificación de las formas de las células sino también de la regulación y diferenciación de éstas. Un mal funcionamiento de la polarización, así como una excesiva reproducción celular pueden llegar a ser un indicador de cáncer. Por ello se dice que la mayoría de los cánceres humanos son derivados de los tejidos epiteliales. [40]–[42].

El transporte a través del epitelio puede realizarse utilizando los espacios intersticiales del mismo, la denominada vía paracelular; o bien atravesando la célula epitelial mediante el cruce de dos membranas celulares y el citoplasma, la llamada vía transcelular [43] (Fig. 2.9).

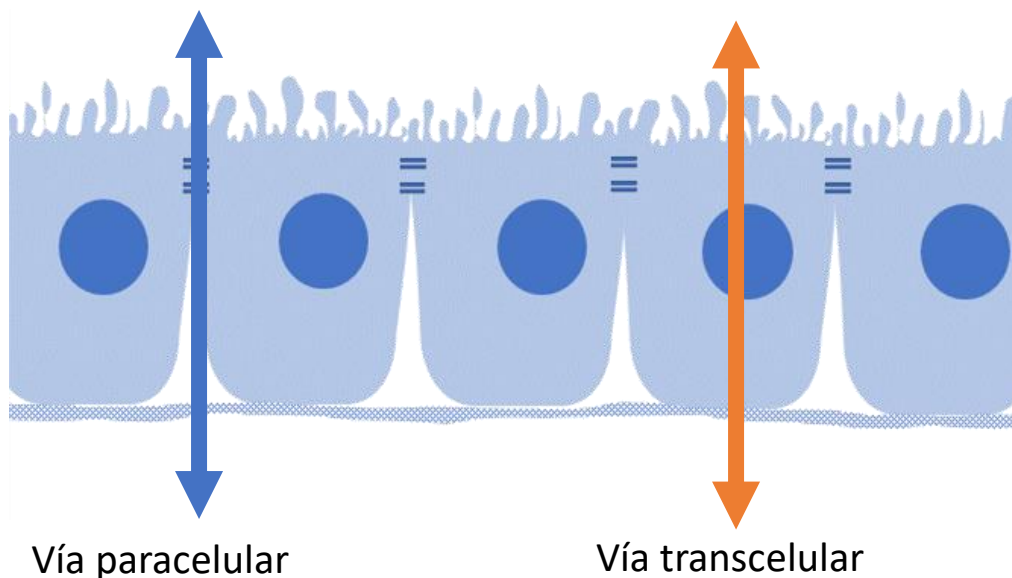


Fig. 2.9. Transporte a través del epitelio [43].

2.4.1. Cultivos celulares (modelos de epitelio)

En la sección 2.2.1 se mencionaron algunos de los estudios que se han realizado para conocer el efecto del campo magnético sobre el tejido vivo. Este proyecto está enfocado en los estudios *in vitro*. En consecuencia, se requiere tener un panorama general de cultivos celulares.

Los cultivos celulares se dividen en 2 tipos: los primarios y las líneas celulares. Los primarios son las células tomadas directamente de un organismo o un tejido y se deben separar de los órganos para sembrarlos en condiciones adecuadas que permitan su uso experimental. Por otro lado, las líneas celulares son células que modificaron su estructura genética para inmortalizarse de manera que al reproducirse se garantiza que conservan las mismas características que las células madres; para ello se requieren realizar pasajes celulares. El pasaje celular, también denominado pase de las células, es un procedimiento importante para mantener los cultivos celulares por más tiempo y así evitar la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular. El pasaje se logra transfiriendo un pequeño número de células a otro espacio en donde las células se puedan dividir hasta llegar a confluencia .

Una de las líneas celulares de mayor estudio es la Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), desarrollada por S. H. Madin and N. B. Darby en 1958, la cual contiene células con una morfología epitelial, situadas en la nefrona en un riñón de perro cocker spaniel [44].

Las células MDCK comúnmente son usadas para generar un modelo del epitelio para estudiar la regulación del crecimiento celular y los mecanismos de transporte del epitelio [45]–[47].

2.5. Condiciones normales de crecimiento y mantenimiento celular.

Las células se cultivan y mantienen en condiciones apropiadas de temperatura y mezcla de gases (habitualmente, 37°C, 5% CO₂ y 95% aire) en una incubadora [23], [24]. Además de la temperatura y la mezcla de gases, el factor más comúnmente variado en los sistemas de cultivo es el medio de crecimiento para cultivo celular.

Los medios de cultivo por lo general derivan de algunos tipos de sueros como el suero fetal bovino. En ocasiones, al medio se le agrega algún antibiótico para hacerlo resistente a contaminaciones [48]. Es de vital importancia realizar un cambio del medio de cultivo cada que se requiera ya que las células se alimentan directamente del medio y en él desechan lo que no necesitan.

Un ambiente controlado es muy importante para los estudios *in vitro*, además de simular las condiciones normales de crecimiento tal como se encuentran dentro de un organismo. Los experimentos requieren ser repetibles y al controlar los parámetros ambientales se asegura evitar que un cambio en ellos pueda inducir información adicional a las cuantificaciones que queremos observar. Es por ello que los experimentos debieran realizarse dentro de cámaras de ambiente controlado o incubadoras.

2.6. Técnicas de medición para modelos de barrera celular *in vitro*.

Debido a que el epitelio juega un papel muy importante en los procesos de transporte y flujo tanto de moléculas como de iones, es claro que se requiere de una comprensión de la estructura epitelial.

Existen métodos para los estudios de la estructura epitelial, como los análisis morfométricos y los video análisis [49]–[51]. Sin embargo, estos métodos no permiten un monitoreo de las características estructurales, como las áreas y las conductancias de la membrana.

Diversas técnicas eléctricas han sido usadas para estudiar las propiedades del transporte epitelial, incluidos métodos de medición transepitelial en corriente directa (DC) y el análisis de la impedancia eléctrica [37]. A continuación, se exponen los principales métodos de medición eléctrica transepitelial para una aproximación a la estructura del epitelio.

2.6.1. Resistencia eléctrica Transepitelial

La medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) es una técnica cuantitativa ampliamente aceptada para medir la integridad de la dinámica de la unión estrecha en modelos de cultivo celular de monocapas endoteliales y epiteliales.

El cultivo de las células epiteliales en insertos o filtros de soporte porosos emula las condiciones *in vivo*, permitiendo el suministro de nutrientes desde el compartimiento basolateral y así promueve la diferenciación celular similar a la del tejido nativo [52].

Las células MDCK tienen de 3-5 μm de altura cuando se siembran en soportes sólidos, mientras que en filtros porosos logran de 10 -15 μm de altura. Esto se debe a que las células sembradas en base sólida no tienen la capacidad de adquirir los nutrientes del lado basolateral (Fig. 2.10a) a diferencia de las que son sembradas en filtros porosos (Fig. 2.10b), donde las células obtienen los nutrientes de la superficie basolateral siendo polarizadas en una monocapa con forma de columna [52]. El desarrollo de las células en estos filtros también permite la llegada de nutrientes desde el lado apical.

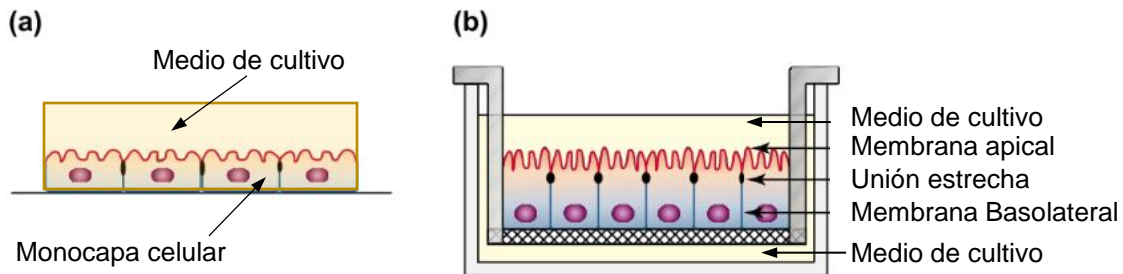


Fig. 2.10. a) Células cultivadas en soportes sólidos como vidrio o plástico. b) Células cultivadas en filtros porosos [52].

El epitelio se puede caracterizar eléctricamente como un arreglo de resistencias y capacitores en paralelo a lo largo de toda la monocapa celular. Sin embargo, por practicidad y porque se desconoce el número total de células, se toma por unidad de área. Claude [53], propuso un modelo eléctrico de la monocapa celular (Fig. 2.11) con elementos resistivos y capacitivos.

La Fig. 2.11 muestra el diagrama de circuito equivalente de una monocapa celular. Las resistencias R_j y R_i , corresponden a la vía paracelular y representan la resistencia de las uniones estrechas y la resistencia del espacio intersticial respectivamente. Cada una de las membranas (apical y basolateral) se representan con una resistencia y una capacitancia en paralelo ($R_a/C_a + R_b/C_b$) y corresponden a la vía paracelular [54]. Se consideran capacitancias en las membranas por su habilidad de almacenar cargas iónicas.

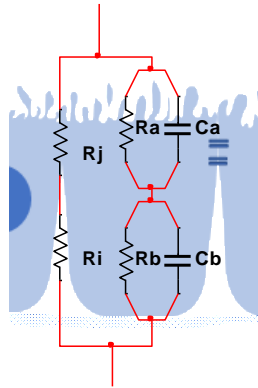


Fig. 2.11. Diagrama del circuito eléctrico equivalente de una monocapa celular [54].

El circuito equivalente se puede reducir ya que R_i es prácticamente 0Ω , entonces se considera corto circuito y se elimina del modelo. R_a y R_b poseen valores muy elevados de resistencia (arriba de $2 \text{ G}\Omega$) por lo que se eliminan del circuito [55], [56], dejando a C_a y C_b formar una sola capacitancia C_{cel} . (Fig. 2.12).

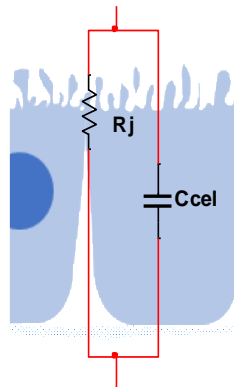


Fig. 2.12. Diagrama del circuito eléctrico reducido de la monocapa celular.

La resistencia R_j es también llamada resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Los valores TEER son fuertes indicadores de la integridad de las barreras celulares, y el efecto de fármacos o productos químicos puede ser valorado por medio de los cambios inducidos por éstos en la TEER [57]–[59]. También existen reportes donde se utilizan los valores de TEER para evaluar la permeabilidad del epitelio debido al tratamiento con bacterias probióticas en el intestino [60]. Se ha reportado el uso de epitelios como las líneas celulares MDCK -C7 para detectar células de metástasis de tumor mediante la medición de la TEER [61], [62].

La TEER se calcula mediante la relación voltaje/corriente utilizando la ley de Ohm. Sin embargo, las corrientes en DC pueden dañar tanto las células como los

electrodos [63], es por eso que en los instrumentos comerciales la TEER se calcula al inducir una corriente cuadrada de baja frecuencia ($\pm 20 \mu\text{A}$ @ 12.5 Hz) a través de la monocapa mediante un par de electrodos (E_1 y E_2) y efectuar la medición del voltaje de la monocapa. Debido a la característica de los capacitores al funcionar como circuito abierto en bajas frecuencias, se puede decir que la impedancia medida corresponde únicamente a la TEER. Cabe destacar que en la medición de la TEER van incluidas las resistencias del medio y del filtro, es por eso que se requiere medir un blanco y restárselo a la medición obtenida por los dispositivos comerciales. Este blanco es el valor de la resistencia medido en el filtro, en ausencia de las células.

La Fig. 2.13a muestra los electrodos tipo *chopstick* los cuales se introducen al medio de modo que un electrodo (E_1) quede sumergido en el medio que se encuentra en contacto con el lado basolateral de la membrana y el otro electrodo (E_2) quede del lado apical. Por otro lado, la Fig. 2.13b muestra la condición de un electrodo en base (E_1) y otro en la parte superior (E_2) (Arreglo Endohm).

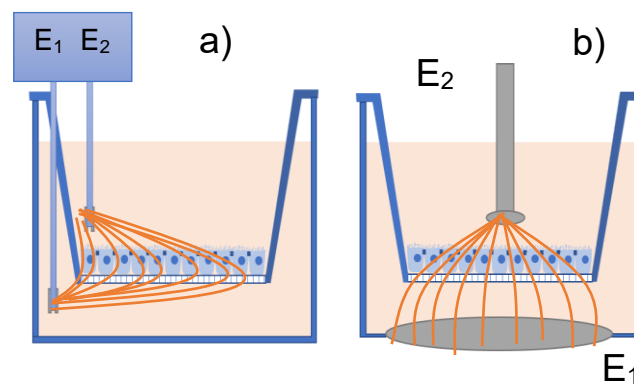


Fig. 2.13. Tipos de montaje para las mediciones de TEER, a) Medición mediante electrodos tipo *chopstick*, b) Medición mediante electrodo base y superior (Arreglo Endohm).

Esta última configuración proporciona lecturas más precisas debido a que no existe manera de cometer error en la colocación de los electrodos, a diferencia de los electrodos *chopstick* que cualquier inclinación en ellos puede provocar lecturas erróneas, como se muestra en la Fig. 2.14. Un estudio reportó que se encontraron diferencias significativas en los valores pico de TEER utilizando los 2 tipos de electrodos (*chopstick* vs Endohm) [64], siendo menos frecuentes los errores de medición con los electrodos tipo Endohm.

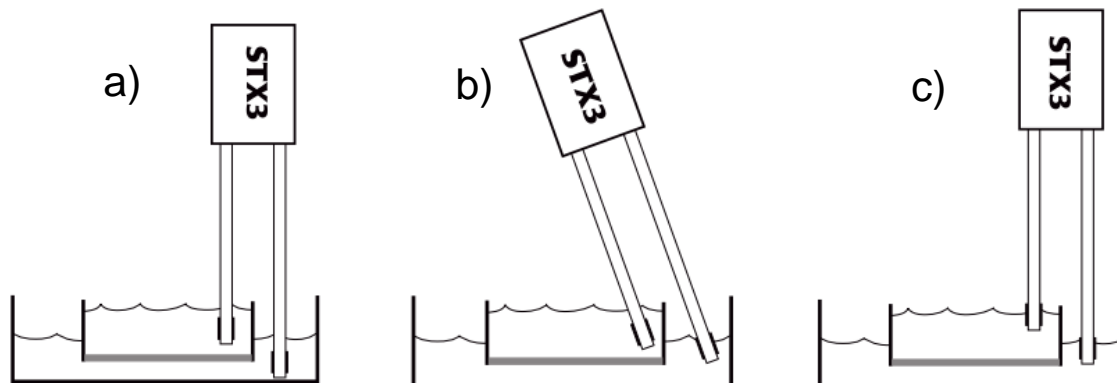


Fig. 2.14. a) Forma correcta de colocar los electrodos, b) Error de colocación por ángulo , c) Error de colocación por profundidad [65].

Los instrumentos medidores de TEER se denominan Voltóhmetros. Los dos equipos principales comercialmente son EVOM (World Precision Instruments, USA) y los Millicell® ERS (Merck, Alemania) mostrados en la Fig. 2.15.



Fig. 2.15. Medidores comerciales de TEER.

Las variaciones en los valores de TEER pueden deberse a cambios de temperatura [66], a la composición y cantidad del medio y al número de pasaje de las células [63].

La TEER puede ser muy baja ($6 \Omega \cdot \text{cm}^2$) en algunos tejidos, como el intestino delgado, vesícula biliar, y túbulo proximal del riñón que transportan grandes cantidades de agua y solutos [67]. En otros tejidos, como la piel de rana, la vejiga, la mucosa del estómago, son mucho más restrictivas al paso de agua y otras moléculas por la vía paracelular ($12,000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ en la vejiga urinaria [53]).

Se dice que un epitelio puede ser “tight” o “leaky” (cerrado o abierto) dependiendo de su TEER. Mediciones superiores a los $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ se considera un epitelio cerrado [68], [69], mientras que en un epitelio abierto, la TEER se encuentra en el orden de los $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ [70].

Mientras exista un mayor número de células en un área, el espacio entre las células se reduce y la corriente que puede circular por esos espacios es menor y la TEER aumenta. En las células MDCK la TEER alcanza un valor máximo a los 2 días (Fig. 2.16) de sembrado para posteriormente estabilizarse en un valor de menos de $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Esto se debe a que el epitelio contiene células en diferentes estados del ciclo celular. Cuando las células son sembradas, tienen que generar uniones de nuevo, lo que hace que entren en un proceso de sincronización y al transcurrir los días pierden la sincronización, manteniendo un equilibrio en la TEER [71].

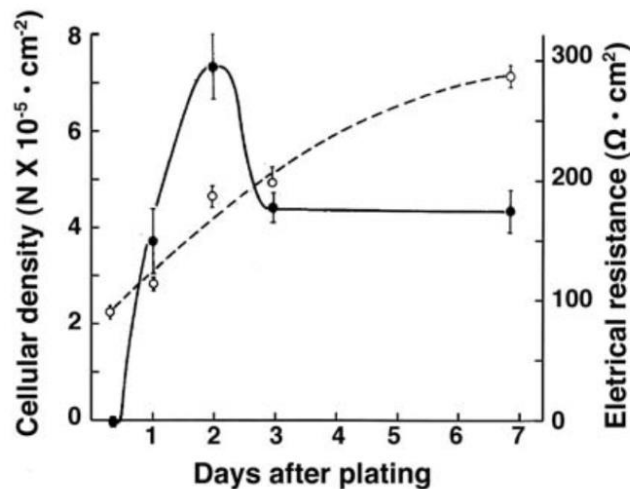


Fig. 2.16. Densidad celular (-○-) y TEER (-●-) de células MDCK en función del día de siembra [71].

2.6.2. Impedancia eléctrica Transepitelial

De igual manera que la TEER, la impedancia eléctrica transepitelial (TEEI, por sus siglas en inglés) es la oposición al flujo de corriente a través de la monocapa

celular en los filtros permeables. A diferencia de la TEER cuya medición se realiza en una sola frecuencia baja, la TEEI se obtiene al variar la frecuencia.

Basados en el modelo eléctrico de la Fig. 2.12, mediante la medición de la TEEI, no solamente podemos obtener la TEER sino también la capacitancia de la célula C_{cl} . Por lo que a partir de esta sección, cada vez que se mencione TEEI se asume que se refiere a los dos los parámetros: TEER y C_{cl} .

Para la medición de la Impedancia eléctrica se requiere añadir al modelo eléctrico la impedancia de los electrodos y del medio de cultivo, quedando como se muestra en la Fig. 2.17.

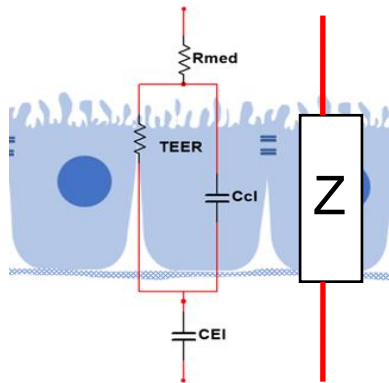


Fig. 2.17. Modelo eléctrico de la monocapa celular incluyendo capacitancia del electrodo y resistencia del medio de cultivo [54], donde Z = impedancia eléctrica equivalente total de la monocapa celular.

La respuesta en frecuencia de la magnitud de la TEEI se debe a la característica que tienen las células de actuar como capacitores, así como las propiedades dieléctricas de la interfaz electrodo-electrolito que también tiene un comportamiento capacitivo.

La manera más sencilla de obtener los valores de los elementos del modelo eléctrico de la monocapa es midiendo la impedancia a frecuencias diferentes y realizando una estimación de los parámetros con la magnitud de impedancia leída en ese espectro.

La curva característica de la magnitud de la impedancia a través de la frecuencia en una monocapa celular se muestra en la Fig. 2.18. La figura muestra la manera en que cada componente individual afecta de manera significativa a la forma de la gráfica del comportamiento de la impedancia eléctrica.

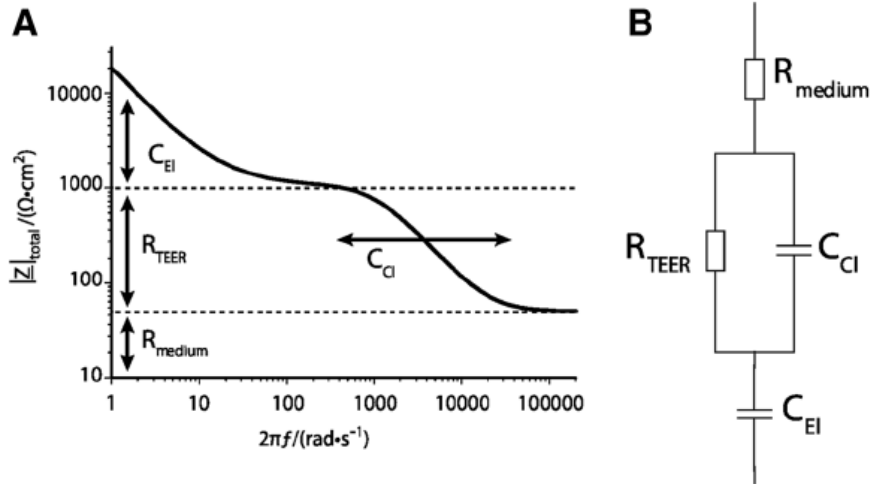


Fig. 2.18. (A) Espectro de la impedancia eléctrica de una monocapa a diferentes frecuencias. (B) Diagrama del circuito equivalente de una monocapa [54], donde se observa que cada uno de los componentes del modelo eléctrico actúa directamente sobre el espectro de la impedancia eléctrica.

Existen en el mercado diferentes sistemas de medición de la TEEI. Uno de los principales y más comunes sistemas comerciales es el CellZscope® (nanoAnalytics, Alemania). El sistema cuenta con un arreglo multipozo para colocar los filtros permeables, un electrodo común en la base y múltiples electrodos superiores (uno por cada uno de los filtros permeables). El sistema combina *hardware* con *software*, por lo que se conecta a la computadora para hacer la adquisición de los datos de manera continua. Los datos arrojados por el sistema son: la resistencia eléctrica transepitelial, la capacitancia celular así como la resistencia del medio de cultivo. La Fig. 2.19 muestra el arreglo multipozo del medidor comercial CellZscope®.



Fig. 2.19. Arreglo multipozo del instrumento CellZscope Nano analytics [72].

2.7. Ensayo de la técnica de “cierre de herida” para la evaluación de la migración celular.

La migración celular se define como el movimiento de células de un lugar a otro [73], [74]. Es un proceso por el cual los organismos se mantienen y se desarrollan, desempeña un papel importante en la quimiotaxis (movimiento de las células en respuesta a un estímulo químico), y en el proceso de regeneración de tejido y el cáncer [75].

El ensayo de cierre de herida (*scratch wound assay*) es un método bien desarrollado, de bajo costo y sencillo de ejecutarse para observar el comportamiento de las células en relación con la migración celular *in vitro*. Este método consiste en realizar una herida en la monocapa confluyente celular con una punta de una pipeta y observar el movimiento de las células a través de un microscopio, a manera que cubran la superficie dañada [76], [77]. La Fig. 2.20 muestra la manera en la que se realiza la herida en la monocapa celular.

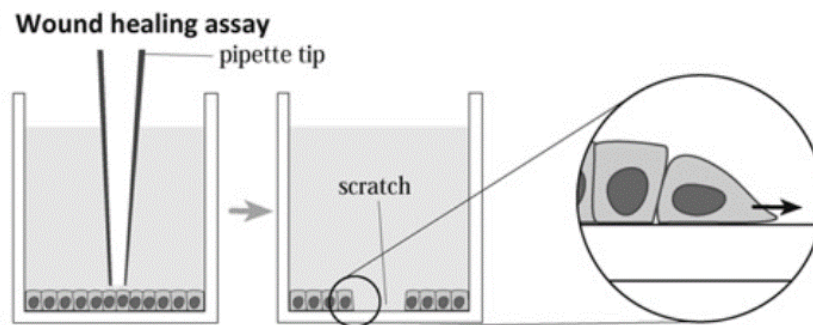


Fig. 2.20. Migración celular con el método de ensayo de cierre de herida [78].

2.8. Técnica de Inmunofluorescencia

La expresión de las proteínas de una célula depende de los estímulos que reciban. Es por eso que se requiere un método para observar la presencia de proteínas específicas.

Una forma de detectar dichas proteínas es mediante la inmunofluorescencia, la cual es una técnica para la detección de estructuras subcelulares. Para ello se emplean anticuerpos para detectar y localizar proteínas específicas en células y/o tejidos.

Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de reconocer específicamente y unirse con alta afinidad a otras moléculas (antígenos), estos a su vez se unen a fluorocromos capaces de ser detectados visualmente por microscopios de fluorescencia (microscopio confocal) [79].

La técnica de inmunofluorescencia se logra siguiendo los pasos mostrados en la Fig. 2.21.

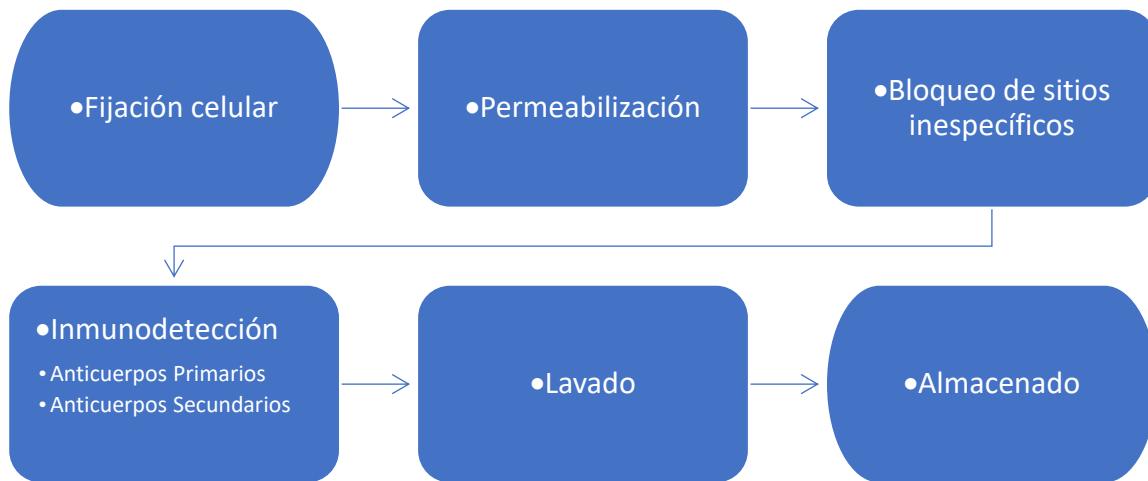


Fig. 2.21. Procedimiento de la técnica de inmunofluorescencia.

- Mediante la fijación celular se mantiene la estructura biológica en la condición que existe *in vivo* (generalmente se utilizan fijadores con aldehídos, metanol o acetona) .
- Para la permeabilización se utilizan detergentes no iónicos (ejemplo Tritón) produciendo poros en las membranas celulares que permiten el ingreso de los anticuerpos a la célula.
- El bloqueo impide interacciones inespecíficas de los anticuerpos con el material biológico bajo análisis y así reduce la marcación inespecífica. Generalmente se utilizan soluciones protéicas concentradas como la albúmina sérica bovina (BSA).

- Los anticuerpos para inmunofluorescencia están divididos en 2 categorías: anticuerpos primarios y secundarios. Estos dos grupos se clasifican según si se unen a antígenos o proteínas directamente o se dirigen a otro anticuerpo (primario) y éste, a su vez, está ligado a un antígeno o proteína [80]. La Fig. 2.22 ejemplifica la diferencia de los anticuerpos.

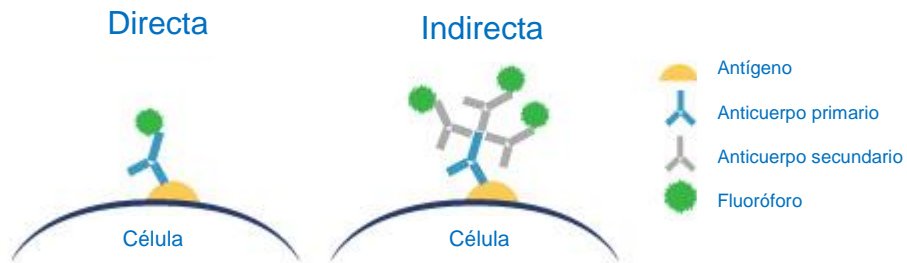


Fig. 2.22. Diferencia entre inmunofluorescencia directa e indirecta [81].

Mediante la técnica de inmunofluorescencia aplicada a proteínas presentes en los núcleos celulares se puede determinar la forma y el tamaño de los núcleos celulares, al definirse los núcleos en las imágenes de la muestra observada.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

En este capítulo se describe el desarrollo de la instrumentación necesaria para el control ambiental del medio de cultivo de los tejidos biológicos utilizados para la medición *in situ* de la impedancia eléctrica y la resistencia transepitelial, así como el desarrollo del generador de campo magnético de extrema baja frecuencia, ajustable en intensidad y frecuencia. Por otro lado, se presenta la metodología definida para la experimentación con campos magnéticos de extrema baja frecuencia en cultivos celulares, la cual incluye pruebas de medición de impedancia eléctrica, medición del porcentaje de confluencia a través del ensayo de cierre de herida y análisis de imagen del cultivo celular mediante microscopía confocal.

3.1. Desarrollo de la instrumentación

Generalmente, al desarrollar instrumentación se requieren de una serie de lineamientos y características como la exactitud, precisión, error, resolución, entre otros, deberán tomarse en cuenta para garantizar una experimentación repetible y confiable. En esta sección se definen los requerimientos para la construcción y desarrollo del dispositivo generador de campo magnético, del medidor de impedancia eléctrica transepitelial, así como de las metodologías para los experimentos biológicos descritos en esta tesis.

3.1.1. Generador de campo magnético

El objetivo central de este trabajo es el estudio del comportamiento de las monocapas celulares ante un estímulo magnético de baja frecuencia. Para ello se requiere tener una fuente de generación de campos magnéticos la cual se adapte a los objetivos de los experimentos. Esto es, generar un campo magnético de extrema baja frecuencia, con la capacidad de variar dicha frecuencia y a su vez de modificar la amplitud de la densidad de flujo magnético.

La Fig. 3.1 muestra el esquema general del sistema generador del campo magnético diseñado y todos sus componentes.

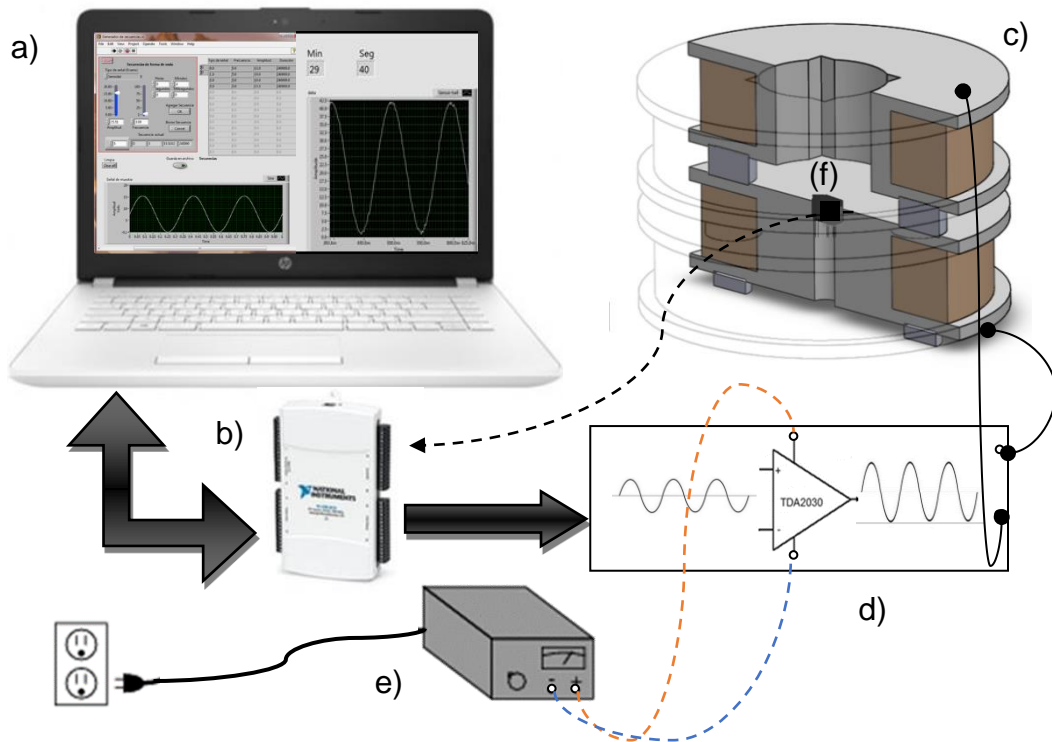


Fig. 3.1. Diagrama general del generador de campo magnético: a) Interfaz gráfica, b) Tarjeta NI-USB 6218® (National Instruments, USA), c) Arreglo de bobinas Helmholtz, d) Etapa de potencia y control del campo magnético generado por las bobinas, e) fuente de alimentación, f) Sensor de efecto Hall.

A continuación, se describen de manera detallada cada uno de los componentes que componen el sistema generador de campo magnético, así como las consideraciones para llevar a cabo el prototipo final del generador.

3.1.1.1. Diseño de las Bobinas Helmholtz

La generación del campo magnético se efectúa mediante un arreglo de bobinas tipo Helmholtz. Se eligió esta configuración por su sencillez, eficiencia y tamaño pequeño, esto debido a que el generador estará alojado en una incubadora de cultivos celulares, cuyo volumen es relativamente reducido, 0.184 metros cúbicos (TC 230, Thermo Scientific Forma, Thermo Fisher Scientific, USA).

El arreglo consta de un par de bobinas de igual tamaño, colocadas en un mismo eje y separadas por una distancia igual a su radio (ver Fig. 3.2).

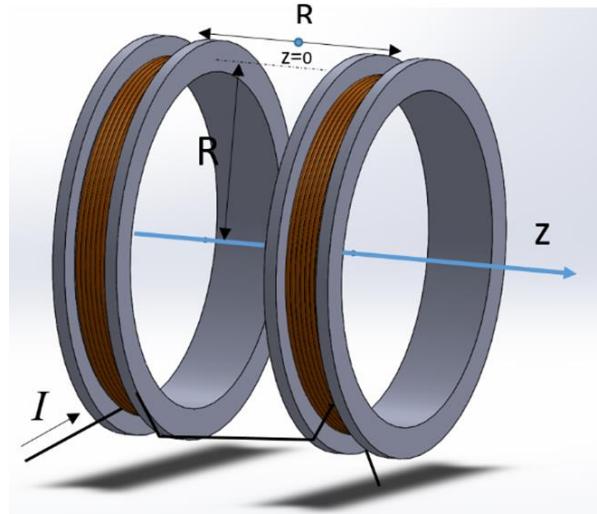


Fig. 3.2. Esquema general de un arreglo de bobinas Helmholtz.

La intensidad de campo magnético en este arreglo de bobinas Helmholtz es directamente proporcional a la corriente circulante (I) y al número de vueltas (N) de cada una de ellas, e inversamente proporcional a la separación de las bobinas igual al radio (R). De acuerdo con la ley de Biot-Savart se puede calcular la intensidad del campo magnético (B) en cualquier punto de la zona central, dependiendo de la corriente en las bobinas y que está dada por (5) [30].

$$B(z) = \frac{1}{2} \mu_0 N I R^2 \left\{ \left[R^2 + \left(z + \frac{R}{2} \right)^2 \right]^{-\frac{3}{2}} + \left[R^2 + \left(z - \frac{R}{2} \right)^2 \right]^{-\frac{3}{2}} \right\} \quad (5)$$

Donde:

z es la distancia desde el centro de las bobinas a un punto donde el campo magnético uniforme debe ser observado.

μ_0 = Constante de permeabilidad magnética en el vacío ($4\pi \times 10^{-7}$ Tm/A).

La distribución del campo magnético se considera uniforme en un volumen en torno al centro de las bobinas ($z=0$) que cubre la zona de trabajo.

De esta forma (5) se reduce a (6).

$$B(0) = \frac{16}{5\sqrt{5}} \frac{1}{2} \frac{\mu_0 NI}{R} = 1.43 \frac{\mu_0 NI}{D} \quad (6)$$

Se observan en (6) de manera resumida los parámetros que definen a un generador de campo magnético basado en la configuración Helmholtz.

La configuración vertical para el arreglo de bobinas Helmholtz se propuso siguiendo la geometría recomendada en la literatura [82], [83]. De esta manera se pretende aplicar el flujo magnético del lado apical de la membrana hacia el basolateral de los cultivos celulares.

Con el objetivo de proporcionar la información necesaria para visualizar, simular y posteriormente maquinar el prototipo, el diseño del arreglo Helmholtz se realizó en el paquete de computadora CAD de acceso libre, Fig. 3.3.

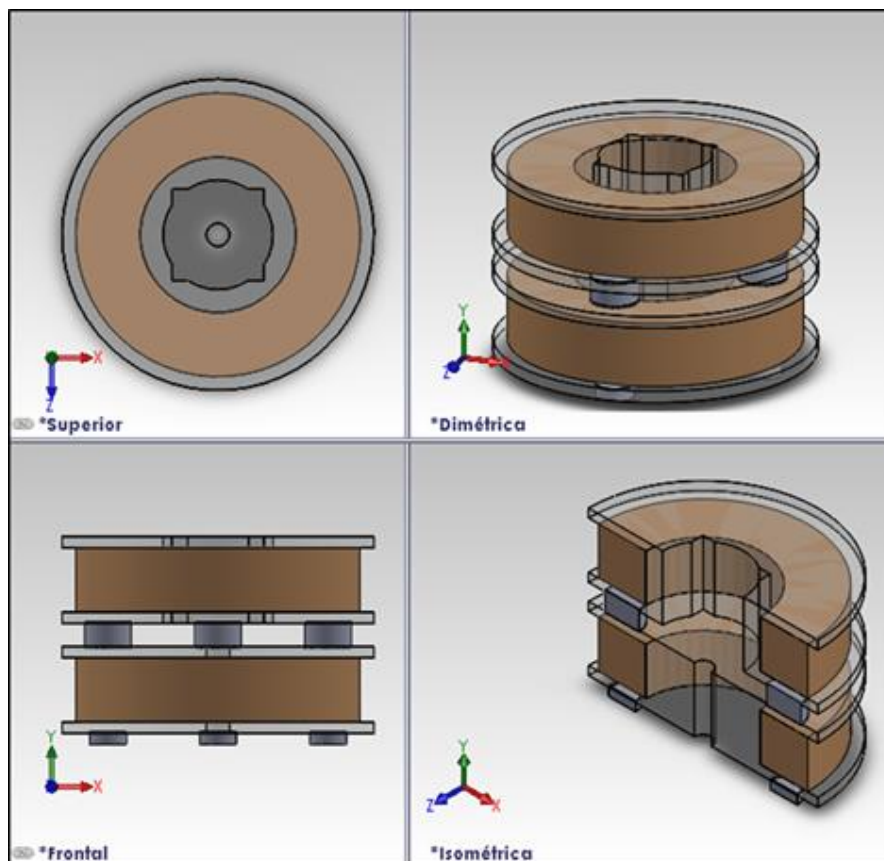


Fig. 3.3. Vistas generadas en el software CAD para la visualización, construcción y ensamble del arreglo de bobinas Helmholtz.

3.1.1.2. Criterios de diseño del generador de campo magnético

Definición del volumen de trabajo

El protocolo experimental definido contempla un arreglo de cuatro muestras de cultivos celulares para observar los efectos de la radiación de campo magnético (Anexo 7.3). Por esta razón, se diseñaron las bobinas de acuerdo con el tamaño de una cámara multipozos descrita en la sección 3.1.2.1, que mide 50 mm x 50 mm x 19 mm.

Las características y dimensiones físicas de la cámara definieron el volumen de trabajo de la configuración Helmholtz considerando que el centro de cada pozo tiene la misma distancia al centro de las bobinas para aplicar radiación similar en todos los pozos. Además, el arreglo de bobinas deberá de tener dimensiones reducidas que permitan alojarlo dentro de una incubadora.

Materiales

Los estudios *in vitro* con campos magnéticos de baja frecuencia se realizan usando cajas Petri circulares de plástico, las cuales permiten que los campos penetren a través de ellas debido a que sus materiales son paramagnéticos. Por ello se consideraron los materiales de la estructura de soporte de las bobinas de metacrilato, comúnmente conocido como acrílico, ya que su permeabilidad magnética es muy cercana a 1. Así mismo, su facilidad para el maquinado y de esterilización, hacen al acrílico un material adecuado para la estructura de las bobinas Helmholtz.

Para la construcción de las bobinas se utilizó alambre magneto de cobre AWG #17 (Área de sección transversal= 1.04 mm²) el cual brinda una resistencia a la corriente de 16.614 (Ω /km). Esto, en conjunto con la cantidad de alambre por el número de vueltas, hace que, el calor generado sea menor que en alambres de calibre más delgado. Este calibre #17 fue determinado mediante pruebas de intensidad de campo y calentamiento, la primera para asegurar la aplicación de un campo magnético estable y la segunda para evitar efectos térmicos, tanto en la operación del generador de campo como en el estado de los cultivos celulares. Esta característica es muy importante para los cultivos celulares, ya que éstos requieren una temperatura constante.

3.1.1.3. Simulación y modelado en COMSOL Multiphysics®

La simulación por computadora es una herramienta muy útil cuando se requiere comprender, aproximar y optimizar algún diseño o prototipo. Para ello es necesario introducir parámetros a la computadora y mediante un procesamiento computacional resolver modelos matemáticos complejos.

En este proyecto se utilizó un software computacional basado en análisis de elemento finito llamado COMSOL Multiphysics® (COMSOL, Inc., USA) para simular y modelar diferentes condiciones de campo magnético en el volumen de trabajo, en el cual se colocarían los insertos de los cultivos celulares. De esta manera se pretende evitar incertidumbre en el diseño y operación del modelo físico del generador de campo magnético. Esta simulación permitió experimentar con las características físicas y eléctricas del generador de campo magnético a fin de obtener uniformidad de campo en el volumen de trabajo requerido por las condiciones del protocolo experimental (Anexo 7.3).

El programa computacional COMSOL Multiphysics® tiene 2 maneras de trabajar la simulación de un modelo, ya sea generando la geometría directamente en 3D, las bobinas dentro del apartado de geometría o importando el modelo de algún programa CAD.

Los pasos que se siguieron para la simulación en COMSOL Multiphysics® se describen en el Diagrama A1.1 (anexo 1).

El arreglo de bobinas del generador de campo magnético tiene como objetivo suministrar la densidad de flujo necesaria para exponer a las células alojadas en 4 filtros permeables en una región de campo uniforme situada en el centro del generador.

Los modelos de los filtros que contendrán a las células se importaron y colocaron en el centro del modelo de las bobinas, dentro del espacio de trabajo de COMSOL Multiphysics®, para simular la posición del campo magnético y garantizar que a todos los filtros les sea aplicada la misma densidad de flujo magnético.

Dos aspectos importantes que se consideraron durante la simulación fueron: la determinación de las condiciones de frontera mediante la subdivisión del modelo de interés denominada mallado y la elección de los materiales, acordes al entorno real que se pretende. Así mismo es importante delimitar el espacio a simular mediante una frontera, ya sea esfera o cubo de aire, debido a que el análisis de elemento finito así lo requiere. Se utilizaron los materiales de cobre y acrílico con las permeabilidades magnéticas establecidas en COMSOL.

Campo magnético dentro del volumen de trabajo

Con la intención de obtener una mejor resolución en los parámetros de la simulación en la región de trabajo que contiene los filtros, se asignó un mallado extra fino, en tanto que, en las zonas aledañas se optó por asignar un mallado grueso; esto evitó un alto costo computacional ya que la información en estas regiones no es relevante (ver Fig. 3.4).

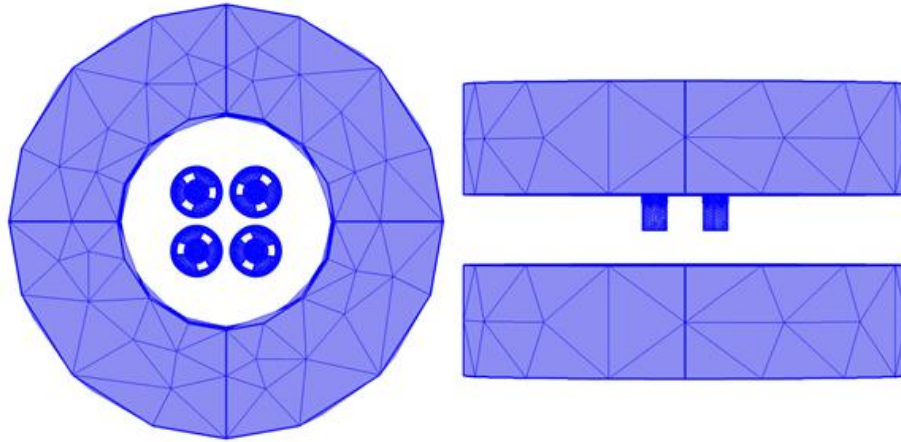


Fig. 3.4. Mallado de la simulación en COMSOL.

En relación con la uniformidad del campo magnético, se simularon diferentes configuraciones de dimensiones y número de vueltas de las bobinas.

Los parámetros modificados fueron: el radio de las bobinas, la separación entre ellas y el número de vueltas del alambre de cobre (Fig. 3.5)

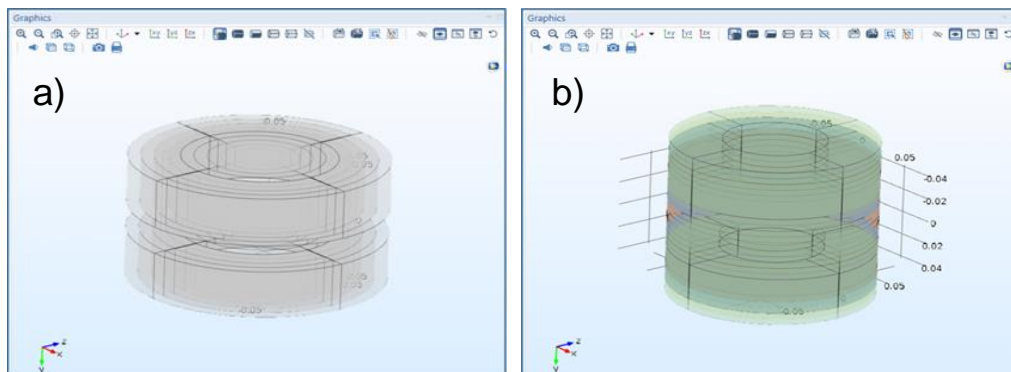


Fig. 3.5. Configuraciones del arreglo de bobinas a) Variación del radio de las bobinas, b) variación de la separación de las bobinas.

Campo magnético en la zona cercana al volumen de trabajo

Se realizó una prueba para determinar la atenuación de la densidad de flujo con la distancia, la cual consistió en tomar puntos en el espacio fuera de la zona del volumen de trabajo y obtener los valores de la densidad de flujo magnético arrojados por la simulación. Esto para observar la presencia de la intensidad del campo magnético en la ubicación del cultivo control.

3.1.1.4. Construcción del prototipo del generador de campo magnético

Para la elaboración del prototipo del arreglo Helmholtz se utilizó acrílico en los soportes de las bobinas. A estos se les realizó un refuerzo mediante cuatro postes de acrílico cada 90°.

Las 2 bobinas son del mismo tamaño, con la diferencia de que la bobina superior cuenta con un espacio que permite la libre colocación de la cámara donde estarán los cultivos celulares. El embobinado se recubrió con un barniz especial que brinda protección contra la humedad del ambiente.

Mediante 4 soportes circulares de acrílico se logró la separación de las bobinas de acuerdo con la distancia obtenida mediante la simulación.

Finalmente, las características geométricas del diseño se resumen en la TABLA 3.1. y en la Fig. 3.6 se muestra el prototipo físico generado.

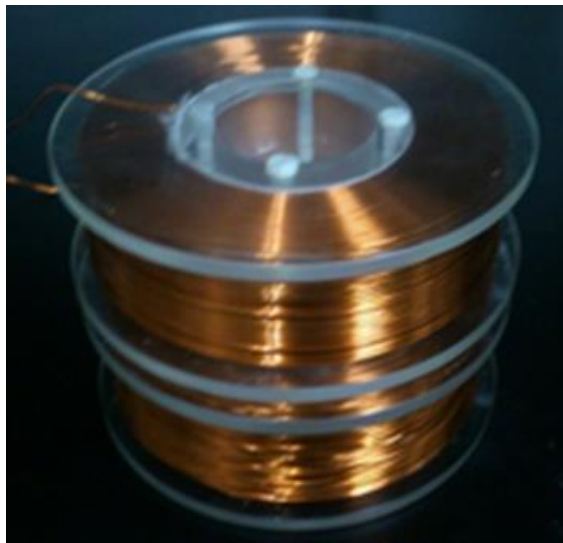


Fig. 3.6. Fotografía del prototipo físico del arreglo de bobinas Helmholtz

TABLA 3.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL ARREGLO DE BOBINAS.

Parámetros	Unidad
Radio de las bobinas	60 mm
Separación entre las bobinas	32 mm
Número de vueltas	900
Calibre del alambre	17
Sección transversal	40mm x 40 mm

Las descripciones de las piezas de acrílico que sirven de soporte para las bobinas del generador de campo magnético, así como las dimensiones de éstas se encuentran en el anexo 6.

3.1.1.5. Circuito de excitación y de control de las bobinas

El campo magnético se genera con señales sinusoidales proporcionadas por una de las salidas analógicas de una tarjeta digital NI-USB 6218® (National Instruments, USA). El arreglo de bobinas no puede conectarse directamente a la salida de la tarjeta, debido a que ésta no tiene la capacidad para proporcionarle la corriente necesaria.

Por esta razón, se utilizó el circuito integrado amplificador de potencia TDA2030 configurado en clase AB (ST Microelectronics, USA). El circuito de excitación cuenta con protección contra el retorno de corriente que podría generarse debido al comportamiento intrínseco de las bobinas (Fig. 3.7). Además, cuenta con un potenciómetro de ajuste, el cual sirve para regular un *offset* de voltaje para garantizar una señal positiva.

Por otro lado, se optó por colocar un disipador y un ventilador en el circuito integrado para mantener la temperatura lo más baja posible y evitar daños en el circuito.

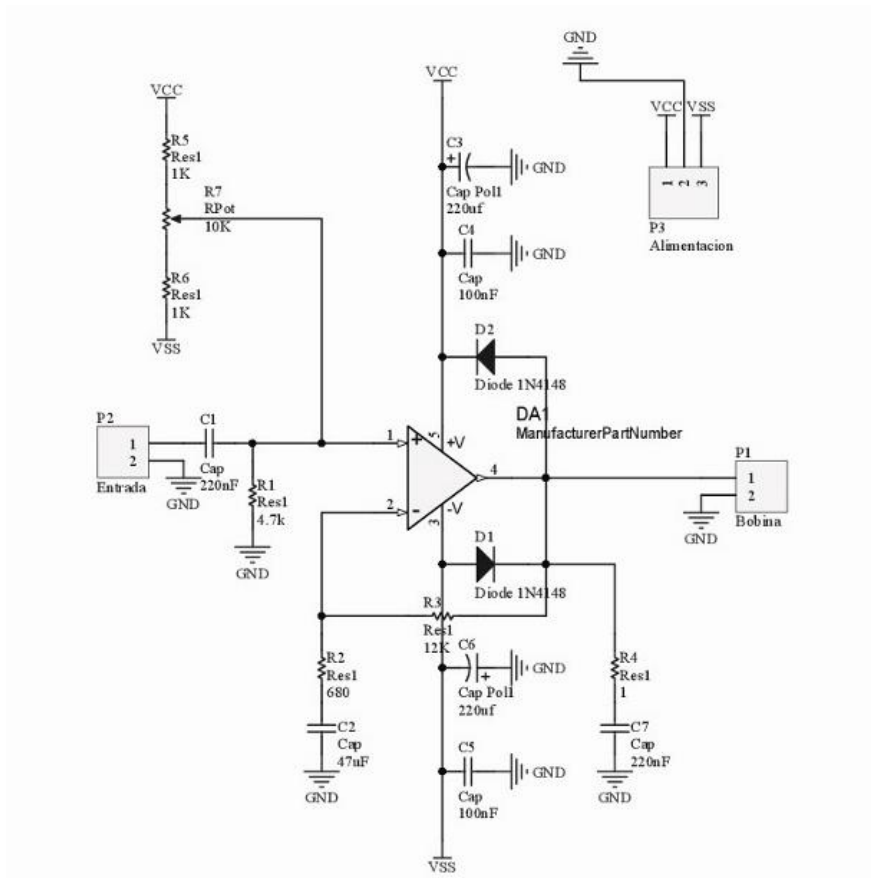


Fig. 3.7. Esquema del circuito de excitación de las bobinas Helmholtz.

Circuito de control

La retroalimentación del campo magnético se obtiene al colocar un sensor lineal de efecto Hall de matrícula UGN3503 (Allegro MicroSystems, USA), dentro de la región de trabajo. La señal del sensor central se adquiere con la tarjeta de NI-USB 6218® para después utilizarse en el sistema de control. Para este propósito se desarrolló un programa (Anexo 3) con una tabla con valores que relacionan el voltaje de salida al circuito de excitación con la magnitud del campo magnético deseado y que es registrado en el sensor central. Para efectuar el control, se evalúa continuamente el error entre la condición del campo magnético deseado y la información del sensor central.

3.1.1.6. Evaluación del generador de campo magnético

Se evaluaron la distribución del campo magnético y la temperatura generados por el modelo físico desarrollado. Para lo primero se emplearon 5 sensores de radiación de flujo magnético con matrícula UGN3503 (Allegro MicroSystems, USA) y un sensor LM35 (Texas Instruments, EUA) para monitorear la temperatura. La información de los sensores fue digitalizada mediante la tarjeta de adquisición de datos NI-USB 6218® (National Instruments, EUA), de 16 bits a 250 kS/s.

Caracterización de los sensores de campo magnético

Para efectuar este procedimiento, los sensores fueron colocados en el volumen de trabajo, de forma paralela a la sonda de un medidor Gauss/Tesla Meter 5180 (FW BELL, EUA) empleada como referencia, garantizando con esto las mismas condiciones para la radiación magnética. Este sensor de referencia mide campo magnético en un rango de 0.1 G a 30 kG, con un ancho de banda de 0 – 20 kHz y una exactitud de 1.1%. Para este procedimiento, se registró la información de 3 barridos de intensidad de campo magnético en el intervalo 1.5 a 40 G.

Se aplicó un modelo de ajuste de regresión lineal a los datos obtenidos de las mediciones de cada uno de los sensores, los resultados se muestran en la TABLA 3.2. Adicionalmente, se presentan las correlaciones de la referencia y cada sensor. No se encontraron diferencias significativas en los coeficientes de determinación (R^2), arrojando pequeñas diferencias en el orden de 1×10^{-4} , lo cual sugiere linealidad y repetibilidad en la respuesta de los sensores caracterizados.

TABLA 3.2. MODELO DE AJUSTE DE LOS DATOS DE LOS SENSORES.

Y= aX+b	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3	Sensor 4	Sensor Central
a	525	582.7	579.9	531.3	767.5
b	-1247	-1403	-1416	-1279	-1874
R ²	0.9998	0.9999	0.9999	0.9998	0.9998
*Corr	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999

*Corr: correlación del sensor de referencia con cada sensor.

Evaluación del generador de campo magnético en el volumen de trabajo

El protocolo de experimentación contempla la medición de los efectos de campo magnético a una frecuencia de 60 Hz, sin embargo, se realizaron pruebas con campos magnéticos con corriente pulsada y corriente directa para contemplar una ventana de frecuencias en el intervalo de la extrema baja frecuencia.

Pruebas con corriente continua

La uniformidad del campo magnético fue verificada utilizando 4 sensores de densidad de flujo magnético colocados de acuerdo con la posición de los 4 filtros permeables para los cultivos celulares. El arreglo se muestra en la Fig. 3.8. La información obtenida fue validada con la referencia comercial Gauss/Tesla Meter 5180 (FW BELL, EUA), etiquetada en la Fig. 3.8 como “ref.”

Se llevaron a cabo 10 series de mediciones del campo magnético para 20 intensidades, desde 1.5 hasta 40 G, intervalo en el que se pretenden llevar a cabo los experimentos de estimulación celular. Se determinó tanto la media como la desviación estándar de las 10 series de mediciones efectuadas para los 4 sensores de efecto Hall. Finalmente, se determinó el coeficiente de variación (CV), relación entre la desviación estándar de la media de los 4 sensores y el promedio de éstos, para cada intensidad de campo magnético, (7). Un bajo valor de CV indica una distribución uniforme del campo magnético en el volumen de trabajo.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desviación Estandar}}{\text{Promedio}} * 100 \quad (7)$$

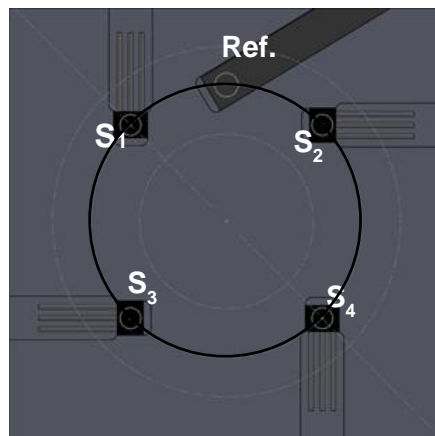


Fig. 3.8. Distribución de sensores en la región de trabajo para el registro simultáneo del campo magnético. S1-S4: Sensores de efecto hall, Ref.: Sensor del Gauss/Tesla Meter.

Pruebas con campos magnéticos pulsados

Con el objetivo de observar el comportamiento del campo magnético en relación con los cambios de frecuencia y temperatura, efectuamos pruebas con corriente pulsada en dos condiciones; la primera a temperatura ambiente de 24.6°C y la segunda de 36.7 °C, dentro de la incubadora comercial TC 230 (Thermo Fisher Scientific, USA). Cabe mencionar que comúnmente los cultivos celulares deben conservarse a una temperatura de 36.5°C±0.5°C [84]–[86]. Se generó un campo magnético con forma de onda sinusoidal con una amplitud de 25 G en una frecuencia inicial de 0.5Hz en temperatura ambiente de 24.6°C. Se realizaron registros durante 3 min a las frecuencias de 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 y 60 Hz, en las dos condiciones de temperatura mencionadas.

3.1.1.7. Interfaz gráfica

Se desarrolló una interfaz gráfica en el lenguaje de programación visual gráfico plataforma LabVIEW® (National Instruments, USA), en conjunto con el arreglo de bobinas Helmholtz para configurar la operación del generador de campo magnético.

La señal de excitación de las bobinas es generada por la tarjeta de adquisición y mediante una interfaz gráfica desarrollada en la plataforma visual LabVIEW® se configuran los valores de amplitud y frecuencia.

El panel principal del programa que se muestra en la Fig. 3.9, permite al usuario introducir las secuencias de excitación de las bobinas y las almacena en un archivo. En el panel se encuentran los controles de frecuencia, amplitud, tiempos de exposición y tipos de onda, para así generar una señal personalizada de cada experimento. También, se ofrece una vista previa de la señal de salida.

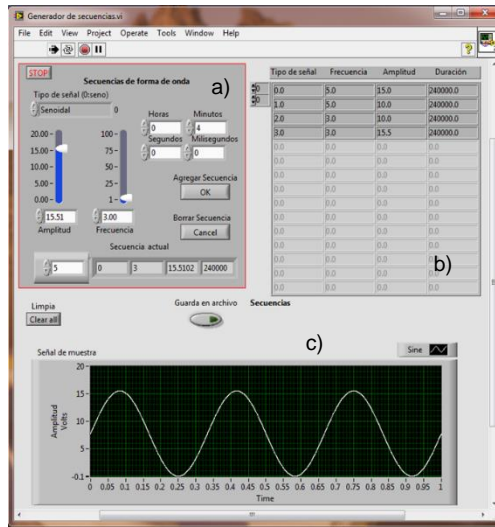


Fig. 3.9. Panel frontal de la interfaz de usuario. a) Caja de diálogo de introducción de parámetros de la señal de excitación, b) Historial de parámetros guardado en un archivo de texto, c) vista previa de la señal de excitación.

Además del programa de configuración para las señales de excitación, se desarrolló otro programa en LabVIEW® (Fig. 3.10), el cual lee los archivos de secuencias guardados y los utiliza para generar las secuencias que son enviadas a la tarjeta de adquisición y amplificadas para excitar al arreglo Helmholtz.

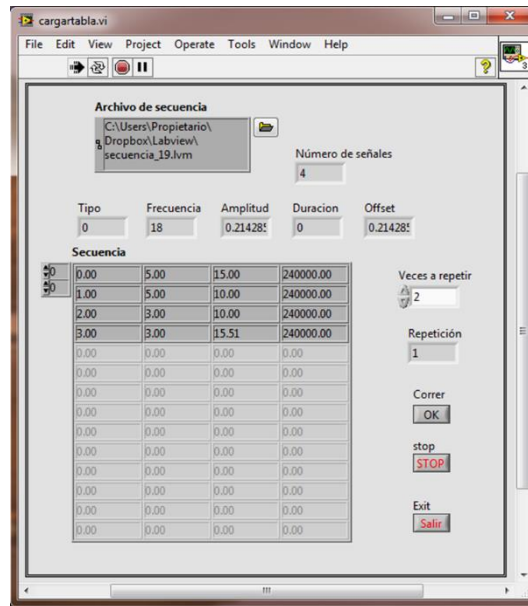


Fig. 3.10. Panel frontal del programa en LabVIEW® para reproducir las secuencias almacenadas y enviarlas al circuito de excitación de las bobinas.

El panel frontal de la Fig. 3.11 nos permite observar la señal de campo magnético y una cuenta regresiva que marca el tiempo restante de exposición al campo magnético.

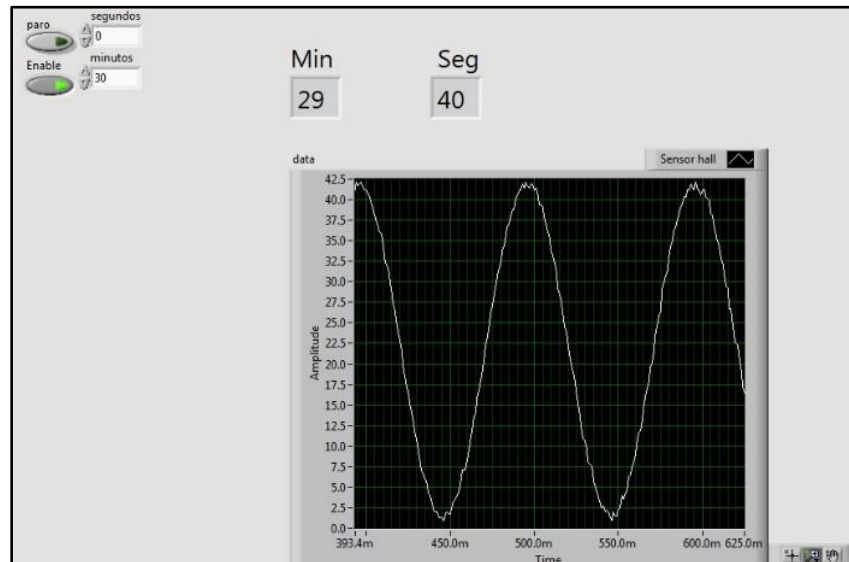


Fig. 3.11. Panel frontal del programa de visualización del campo magnético con el sensor central.

3.1.2. Sistema de medición de impedancia eléctrica transepitelial

La medición de la TEEI permite evaluar la integridad de una monocapa celular en términos de la vía paracelular (uniones estrechas) y la vía transcelular como parte de la caracterización de la membrana. Para obtener la TEEI fue necesario desarrollar un sistema de medición *in situ* de la impedancia eléctrica de cultivos celulares de tipo MDCK. En la Fig. 3.12 se observa el esquema del sistema desarrollado.

A continuación, se describe de manera detallada cada uno de los componentes que integran el sistema de medición de impedancia eléctrica, así como las consideraciones que se tomaron para llevar a cabo el instrumento de medición.

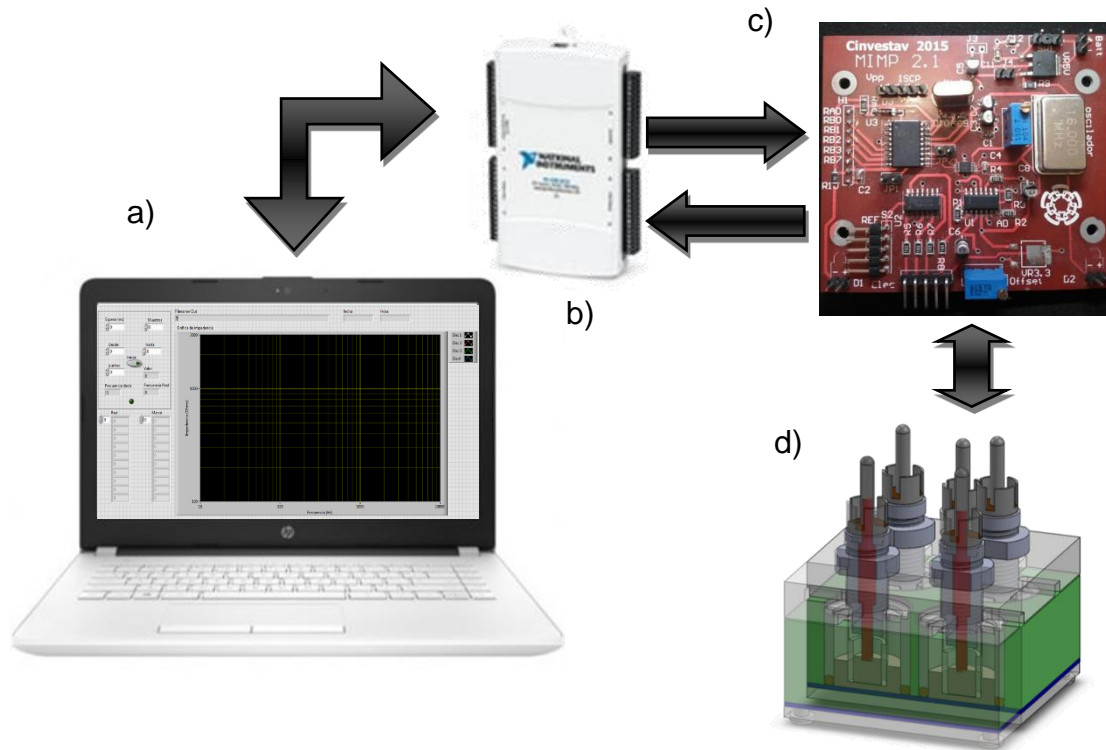


Fig. 3.12. Diagrama general del sistema de medición de impedancia eléctrica: a) Interfaz gráfica, b) Tarjeta NI-USB 6218®, c) Tarjeta para la Medición de impedancia eléctrica (MIMP 2.1), d) Cámara Multipozos para la Medición de Impedancia eléctrica.

3.1.2.1. Cámara Multipozos para la Medición de Impedancia eléctrica transepitelial

La Impedancia eléctrica se mide en la monocapa celular sembrada en filtros porosos permeables que permiten no solo el paso de los nutrientes hacia las células, sino que también el flujo de corriente eléctrica desde la zona apical de la membrana a la zona basolateral.

Los filtros permeables requieren de un pozo en donde se coloca el medio de cultivo. La parte superior del pozo da sostén al filtro y garantiza una separación de éste de la base del pozo.

Se diseñó una cámara multipozos para la medición de impedancia eléctrica transepitelial (CAMMIE) con 4 pozos la cual permite medir simultáneamente la impedancia eléctrica de cuatro monocapas de cultivos celulares (Fig. 3.13).

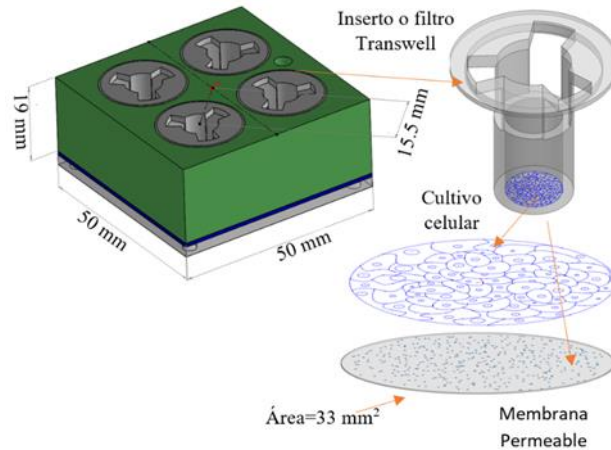


Fig. 3.13. Cámara Multipozos para la Medición de Impedancia eléctrica (Cammie).

Se determinó diseñar el arreglo de cuatro pozos para trabajar los experimentos por cuadruplicado, de manera que mediante estadística se calculen los valores promedio y desviaciones estándar. Esto brinda una mayor confianza al momento de realizar la experimentación.

Se optó por el arreglo propuesto por Wegener *et al.* 2004 [87] para la medición de la impedancia eléctrica, el cual consta de una cámara con un electrodo común en la base de los pozos y electrodos individuales en la parte superior (ver Fig. 2.13, sección 2.6.1).

La caja principal, que sirve de soporte para los filtros permeables, se encuentra en contacto con el medio de cultivo por lo que debe ser un material que no interactúe con el medio de cultivo y no modifique las propiedades de éste. A su vez, el material, debe ser aislante eléctrico y soportar altas temperaturas para su esterilización. Con estos criterios se seleccionó el politetrafluoroetileno (PTFE), conocido por el nombre comercial "Teflón".

En la base de la Cammie se colocó una placa de acero inoxidable como electrodo de referencia común a los 4 pozos. Este electrodo se soldó a un cilindro del mismo material para hacer contacto eléctrico con el conector. Por otro lado, para evitar fugas del medio de cultivo entre la placa del electrodo de la base con la caja de teflón se optó por colocar juntas tóricas de silicón, denominadas comúnmente O-Rings, para evitar contaminar el medio de cultivo.

Los electrodos de cada filtro son cilíndricos y de acero inoxidable, van sumergidos en el medio de cultivo y se encuentran sujetos mediante una camisa de acrílico roscada, que permite ajustar la altura del electrodo respecto del medio de cultivo y así garantizar que el contacto entre electrodo-medio de cultivo sea el mismo en todos los casos (área

de superficie = 39.5 mm²). Por otro lado, la camisa roscada va colocada en la tapa de acrílico que contiene orificios que permiten fijar la posición en XY de los electrodos; este diseño mecánico permite repetibilidad en las mediciones. La tapa de acrílico protege de contaminación directa con el exterior, sin embargo, permite el intercambio de CO₂ entre el ambiente y el medio.

En la Fig. 3.14 se observa la composición de la CAMMIE en 2 cortes. Con esta representación se aprecian las conexiones de las piezas mencionadas. Las dimensiones de cada una de las piezas se pueden ver en el anexo 6.

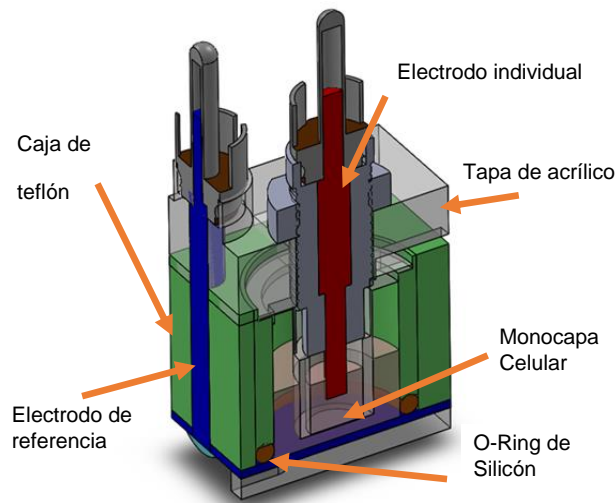


Fig. 3.14. Estructura de CAMMIE con cortes en 2 planos.

3.1.2.2. Materiales biocompatibles

Debido a que las células se encuentran en el medio de cultivo, resulta indispensable cuidar su bienestar para favorecer una adecuada proliferación celular. En una versión del CAMMIE previa se decidió colocar juntas tóricas de nitrilo por accesibilidad en el mercado. Desafortunadamente, el nitrilo, al ser soluble en el medio, produjo toxicidad a las células provocando despegarse del sustrato y su muerte a los 3 días. El proceso de evaluación de la viabilidad de las células permitió determinar la Dosis Letal 50% (LD50) del nitrilo; este procedimiento consistió en suministrar a células medio de cultivo con diferentes concentraciones de nitrilo y observar la respuesta de viabilidad de las células (ver anexo 8).

3.1.2.3. Diseño del sistema para la medición de impedancia eléctrica en monocapas celulares.

Para determinar la impedancia eléctrica de la monocapa celular se deben incluir los efectos eléctricos. Se hace circular una corriente eléctrica a través de la monocapa, se mide la diferencia de potencial producida y, mediante la ley de Ohm (8) se calcula el valor de la impedancia eléctrica.

$$Z = \frac{v}{i} \quad (8)$$

Desarrollo de la instrumentación electrónica del sistema de medición de impedancia eléctrica

Se utilizó el circuito integrado de montaje superficial AD9833 (Analog Devices USA) para generar las señales de excitación definidas en el programa de la interfaz de usuario. El generador se controla mediante el dispositivo PIC16F84a (Microchip Technology Inc. USA) a través del puerto de comunicación I²C. La tarjeta de adquisición de datos NI USB 6208B (National Instruments, USA.) se interconecta con el microcontrolador para realizar el barrido de las frecuencias y a su vez registrar los voltajes de los electrodos. El voltaje aplicado en la monocapa celular por el generador de señales eléctricas fue de 45 mV RMS y la corriente se limita mediante una resistencia R.

La Fig. 3.15 muestra el diagrama de flujo que explica el funcionamiento del medidor de impedancia eléctrica. Los programas desarrollados en LabVIEW®, en C y en MATLAB® para la operación del medidor, se muestran en el Anexo 3-5.

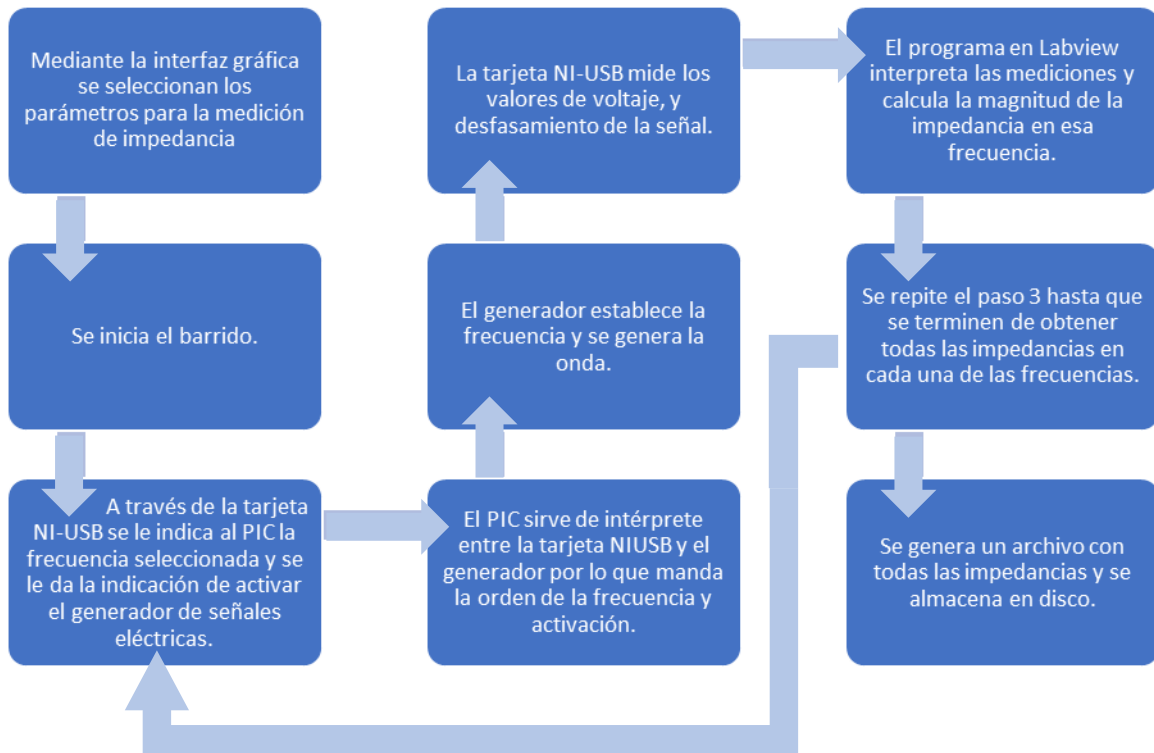


Fig. 3.15. Diagrama de flujo del medidor de impedancia eléctrica.

La tarjeta electrónica del medidor de impedancia eléctrica tiene una conexión digital con la tarjeta NI USB la cual sirve para hacer la comunicación con el PIC. A su vez la tarjeta electrónica se conecta por las conexiones analógicas en donde se mide la diferencia de potencial de las monocapas celulares. Se realizaron 2 diseños preliminares (Fig. 3.16); el primer circuito no contenía el PIC de control del generador de función, sino que el PIC se encontraba externo a la placa principal. Ya en la segunda versión se incorporó el PIC y se incluyeron reguladores de voltaje.

En el diseño final (Fig. 3.17), se incorporaron circuitos de montaje superficial, lo que ayudó a que la placa del circuito impreso (PCB) de la tarjeta electrónica fuera más pequeña. Se utilizó una batería de 9V y mediante reguladores de voltaje se energizaron las diferentes etapas de la tarjeta electrónica.

Además del generador y del PIC, la tarjeta electrónica contiene amplificadores operacionales que sirven como *buffer* y quitan los niveles de DC del generador de señales.

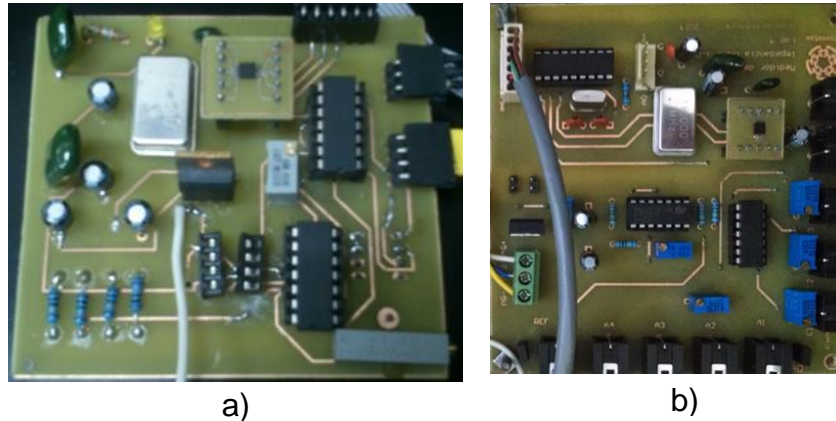


Fig. 3.16. Circuito preliminares para la medición de impedancia; a) versión 1.0, b) versión 2.0.

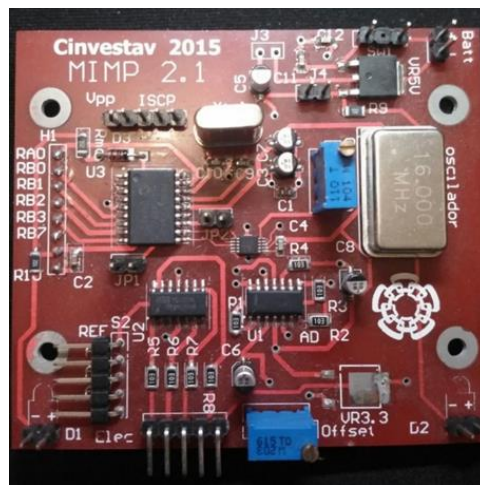


Fig. 3.17. Tarjeta electrónica final para la medición de impedancia eléctrica, versión 2.1.

La corriente que proporciona el circuito generador de señales a las monocapas celulares se limita mediante una resistencia de $1\text{ k}\Omega$ y se calculó el voltaje rms necesario de 225 mV , para que la corriente no excediera los $300\text{ }\mu\text{A}$ [87]. El diagrama final se presenta en el anexo 9.

3.1.2.4. Interfaz de usuario

La interfaz gráfica se programó utilizando LabVIEW®, la cual es una plataforma y entorno de desarrollo para diseñar sistemas, con un lenguaje de programación visual gráfico. Esta plataforma tiene la capacidad de utilizar subprogramas que permiten probar módulo por módulo.

Se desarrollaron diferentes programas y subprogramas y su jerarquía se muestra en la Fig. 3.18.

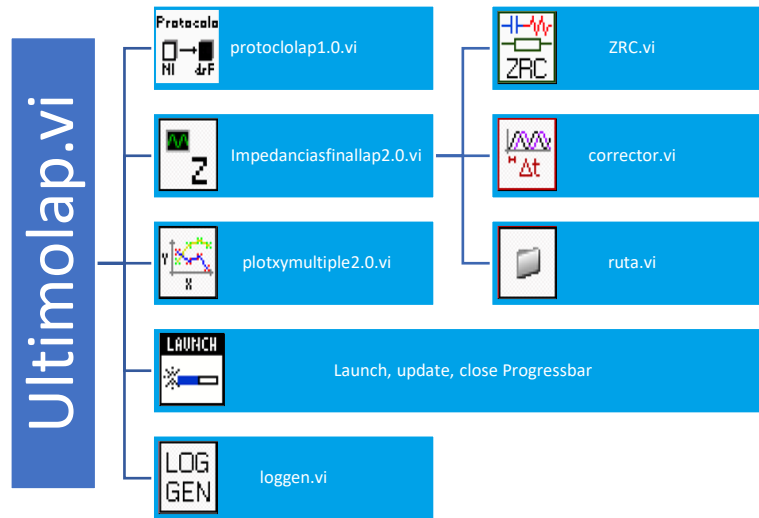


Fig. 3.18. Jerarquía de programas en la interfaz gráfica de LabVIEW®.

El programa principal se divide en 4 programas secundarios: el primero es el que se encarga de la conexión de la tarjeta NI-USB con el PIC. El segundo programa es el encargado de realizar la medición de los voltajes y cálculo de la impedancia eléctrica en determinadas frecuencias, utilizando un subprograma con el modelo eléctrico; otro que corrige los retardos del multiplexor de la tarjeta NI-USB y un último que almacena la información en una ruta específica. Los programas restantes sirven para desplegar en pantalla los resultados y para generar la tabla con las frecuencias de barrido, haciendo una división de frecuencias en la escala logarítmica.

La Fig. 3.19 muestra el panel frontal del programa principal de adquisición y presentación de valores de impedancia eléctrica en donde en la caja de diálogo de la izquierda se introducen los parámetros a considerar para la medición. Del mismo lado, pero en la parte de abajo se tiene un botón de prueba para determinar si los electrodos se encuentran haciendo contacto con el medio, en cualquiera de los 4 pozos y se indica mediante una luz verde. En la zona central se observa la gráfica de la impedancia eléctrica que será desplegada al final del barrido. El anexo 3 incluye los programas y subprogramas necesarios del desarrollo de la interfaz gráfica

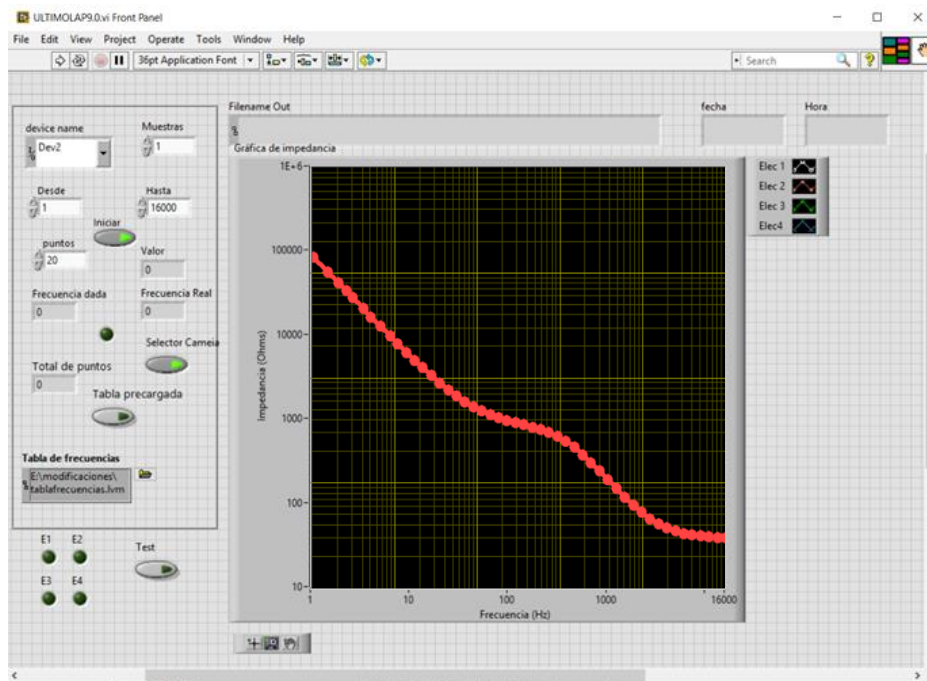


Fig. 3.19. Panel frontal de la interfaz desarrollada en LabVIEW® para la adquisición y presentación de valores de la impedancia eléctrica en las monocapas celulares.

3.1.2.5. Desarrollo matemático del modelo eléctrico de la monocapa

La finalidad de efectuar la medición de la TEEI es obtener los parámetros individuales de la monocapa celular que nos dan información de la integridad física y funcionalidad del cultivo celular después de haber sido sometido a exposición de campo magnético. Los parámetros se calculan mediante aproximación y es por ello que se requiere realizar un barrido en frecuencia.

Se utilizó la propuesta de algunos autores de utilizar la constante de fase (CPE) para describir las características de la impedancia eléctrica de la interfaz electrodo-electrolito. [88]–[90].

La Fig. 3.20 muestra el modelo eléctrico reducido. Suponiendo que las resistencias de ambos medios y las capacitancias de los electrodos se suman.

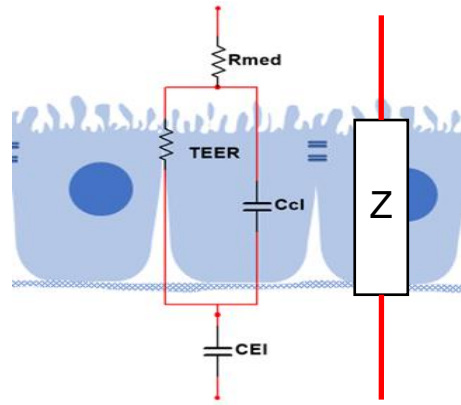


Fig. 3.20. Modelo básico de la monocapa celular. R_{med} =Resistencia del medio; TEER= Resistencia de las uniones estrechas; C_{cl} = Capacitancia celular; C_{el} =Capacitancia de la interfaz electrodo-electrolito Z = impedancia eléctrica total.

Teniendo en consideración estos elementos, la impedancia eléctrica total Z (9) está dada por el paralelo de las impedancias eléctricas de TEER y C_{cl} junto con las impedancias eléctricas en serie de R_{med} y C_{el} .

$$Z_{Total} = R_{med} + (Z_{TEER} \parallel Z_{C_{cl}}) + Z_{C_{el}} \quad (9)$$

Las impedancias eléctricas individuales de cada uno de los componentes del modelo se muestran en la TABLA 3.3.

TABLA 3.3 PARÁMETROS, ABREVIATURAS, UNIDADES Y ECUACIONES PARA CÁLCULO DEL CIRCUITO EQUIVALENTE DE LA IMPEDANCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL.

Parámetro	Componente	Impedancia eléctrica Z	Unidad
Resistencia del medio	R_{med}	$Z_{R_{med}} = R_{med}$	(Ω)
Resistencia Eléctrica transepitelial	$TEER$	$Z_{TEER} = TEER$	($\Omega * cm^2$)
Capacitancia de membrana celular	C_{cl}	$Z_{C_{cl}} = \frac{1}{j(2\pi f) C_{cl}}$	($\mu F / cm^2$)
Elemento de constante de fase (CPE)	C_{el} $A_{CPE}, (0 \leq n_{CPE} \leq 1)^*$	$Z_{C_{el}} = \frac{1}{j(2\pi f)^{n_{CPE}} A_{CPE}}$	($\mu F * S^{(n_{CPE}-1)} / cm^2$)

* Cuando $n_{CPE} = 1$, CPE es puramente capacitiva y cuando $n_{CPE} = 0$, CPE es resistiva [91], [92]

La impedancia eléctrica de los electrodos ($Z_{C_{el}}$), posee una constante de fase (CPE) que representa un capacitor no ideal y una impedancia eléctrica empírica. Fue originalmente usado para describir la impedancia eléctrica de interfaz de los electrodos de un metal inmerso en soluciones electrolíticas. Asimismo, la base física del comportamiento del CPE no está completamente comprendida a detalle, se cree que está asociado con la superficie rugosa y una absorción de iones específica a las interfaces [91], y se relaciona con la ausencia de homogeneidad en el material del electrodo [93]. La impedancia eléctrica $Z_{C_{el}}$ se representa de la siguiente manera:

$$Z_{C_{el}} = \frac{\cos\left(\frac{\pi}{2}n_{CPE}\right)}{A_{CPE} * (2\pi * f)^{n_{CPE}}} + \frac{\sin\left(\frac{\pi}{2}n_{CPE}\right)}{A_{CPE} * (2\pi * f)^{n_{CPE}}}j \quad (10)$$

Y las impedancias eléctricas en paralelo de la TEER y la C_{Cl} están dadas por

$$(Z_{TEER} \parallel Z_{C_{Cl}}) = \frac{TEER}{1 + (2\pi * f * TEER * C_{Cl})^2} + \frac{2\pi * f * TEER^2 * C_{Cl}}{1 + (2\pi * f * TEER * C_{Cl})^2}j \quad (11)$$

La impedancia eléctrica del medio, al ser considerada puramente resistiva, no posee una parte imaginaria, por lo que su impedancia eléctrica queda de la siguiente forma:

$$Z_{R_{med}} = R_{med} + 0j \quad (12)$$

Sustituyendo (10), (11) y (12) en (9) podemos calcular el módulo de la impedancia eléctrica en función de la frecuencia y de los parámetros del modelo eléctrico:

$$|Z|(f) = \sqrt{\left(\frac{\cos\left(\frac{\pi}{2}n_{CPE}\right)}{A_{CPE} * (2\pi * f)^{n_{CPE}}} + \frac{TEER}{1 + (2\pi * f * TEER * C_{Cl})^2} + R_{med}\right)^2 + \left(\frac{\sin\left(\frac{\pi}{2}n_{CPE}\right)}{A_{CPE} * (2\pi * f)^{n_{CPE}}} + \frac{2\pi * f * TEER^2 * C_{Cl}}{1 + (2\pi * f * TEER * C_{Cl})^2}\right)^2} \quad (13)$$

En la literatura se encuentra la representación gráfica de la medición de la magnitud de la impedancia eléctrica en monocapas celulares (Fig. 3.21) [87], [91], [94]–[96]

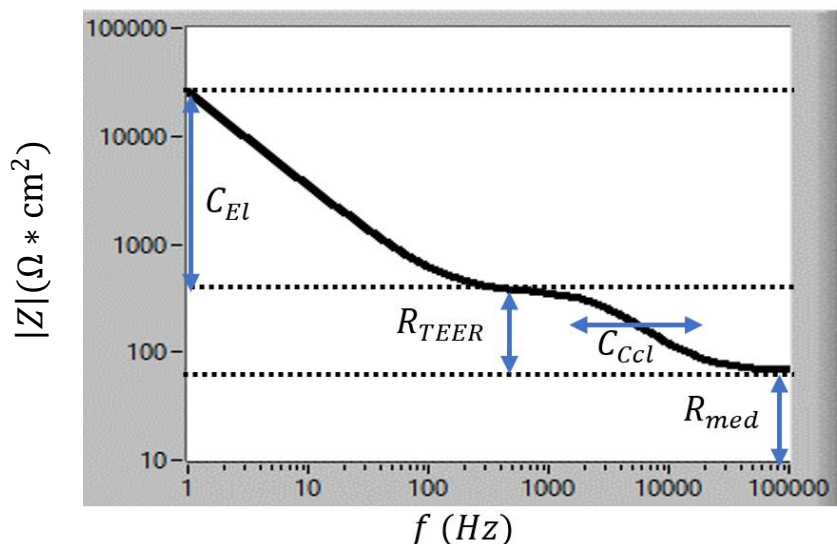


Fig. 3.21. Comportamiento de la impedancia eléctrica de la monocapa celular en función de la frecuencia.

3.1.2.6. Aproximación de los parámetros en MATLAB®

Los datos de magnitud de la impedancia eléctrica medidos a diferentes frecuencias son almacenados en archivos generados por el programa hecho en LabVIEW® (sección 3.1.2.4) y procesados con un programa desarrollado en MATLAB®. Empleando la ecuación que describe el modelo eléctrico de la impedancia eléctrica (9) y mediante un ajuste por mínimos cuadrados, se aproximan los parámetros del modelo eléctrico de la monocapa celular (Fig. 3.20). Finalmente, los resultados se almacenan y se despliegan en pantalla. El código de procesamiento y cálculos de parámetros eléctricos del programa desarrollado en MATLAB® se muestra en el anexo 4.

3.1.2.7. Validación del sistema desarrollado mediante el sistema comercial CellZscope®

En esta etapa de validación se compararon los valores de la impedancia eléctrica de la monocapa celular y sus parámetros ($TEER$, C_{cl} , R_{med}) del sistema desarrollado con los medidos con el sistema comercial CellZscope® (nanoAnalytics Münster, Germany).

Validación del algoritmo desarrollado con MATLAB® para la estimación de parámetros del modelo eléctrico de la monocapa celular a partir de los resultados obtenidos de magnitud de impedancia.

Se sembraron células MDCK en insertos permeables como se muestra en el protocolo de sembrado. (Anexo 7.1).

Se dejó crecer la monocapa celular durante 7 días hasta llegar a confluencia, realizando los respectivos cambios de medio cada tercer día.

Se colocaron los insertos permeables con las células en el sistema de medición CellZscope® y se registraron las impedancias eléctricas de los respectivos filtros permeables con la monocapa celular confluyente.

Se tomaron 10 registros de impedancia eléctrica mediante el sistema CellZscope®, modificando la frecuencia y obteniendo el valor de la magnitud de la impedancia eléctrica a cada una de las 46 frecuencias diferentes, comenzando con 1Hz y finalizando en 100kHz.

Una vez realizados los registros, el sistema calcula automáticamente los valores de TEER, Capacitancia de la monocapa celular C_{cl} , y la resistencia del medio de cultivo para cada uno de los 10 registros.

En esta primera etapa de validación se registraron los valores crudos de las lecturas de impedancia eléctrica del sistema CellZscope® y mediante un algoritmo diseñado en MATLAB® se calcularon, mediante aproximación no lineal, los valores de TEER, Capacitancia y resistencia, con la finalidad de comparar los algoritmos de aproximación lineal entre el sistema comercial y el algoritmo del sistema desarrollado en MATLAB®. La Fig. 3.22 ejemplifica la infraestructura empleada para comparar el software desarrollado contra el software comercial.

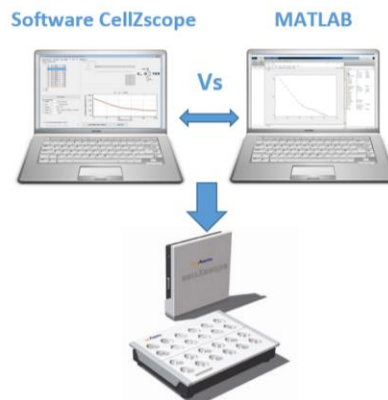


Fig. 3.22. Esquema comparativo entre algoritmos de aproximación de parámetros eléctricos de la monocapa.

Comparación del sistema integral desarrollado contra el sistema comercial CellZscope®.

Una vez realizada la prueba de software se realizó otra prueba comparativa de ambos sistemas con la finalidad de medir simultáneamente la impedancia eléctrica con los 2 equipos y poder compararlos de manera cuantitativa. Para ello se montó la infraestructura para conmutar entre ambos sistemas la cámara con los electrodos junto con los cultivos celulares para así evaluar los sistemas de medición de impedancia eléctrica como la aproximación de parámetros. La Fig. 3.23 muestra la configuración de los sistemas a comparar.

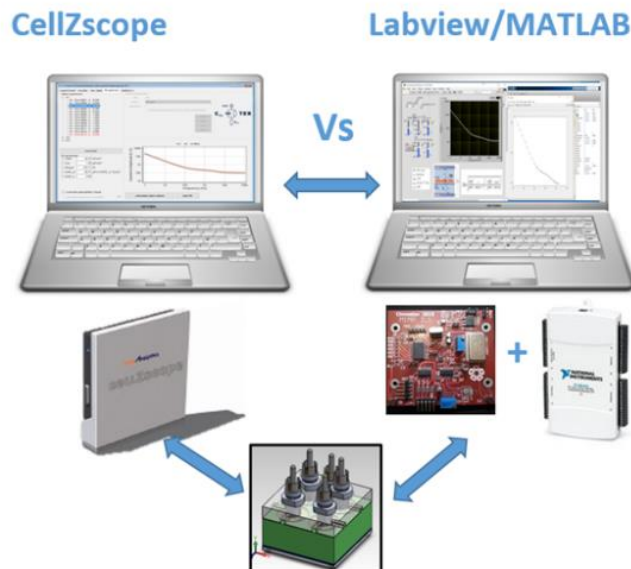


Fig. 3.23. Esquema comparativo del sistema comercial y el sistema desarrollado.

La prueba consistió en sembrar células MDCK en insertos permeables y llevarlas a confluencia como se describe en el experimento anterior, solo que esta vez se compararán los 2 sistemas completos y no solamente los algoritmos de aproximación que tienen cada uno de los sistemas por separado, con el objetivo de validar el equipo desarrollado respecto al sistema comercial.

Una vez que las células llegaron a confluencia, se registraron las impedancias eléctricas cada 10 min, empezando con el sistema comercial y 2 min después con el sistema desarrollado.

3.1.2.8. Determinación de la TEER y de la Capacitancia durante el crecimiento de la monocapa.

Como primera instancia se midió la impedancia eléctrica transepitelial en la monocapa celular mediante pruebas preliminares para observar el comportamiento de la monocapa celular a través del tiempo.

El experimento consiste en obtener mediciones de impedancia eléctrica de la monocapa celular cada 15 min desde que se siembran las células en los filtros permeables, para observar el comportamiento de la monocapa celular durante varias horas.

3.2. Experimentación para evaluar los efectos del campo magnético aplicado en cultivos celulares

El objetivo principal de este trabajo es evaluar los efectos de la aplicación del campo magnético en monocapas celulares. Para ello se consideraron diferentes parámetros que pueden dar información acerca de dichos efectos, tales como la medición de la impedancia eléctrica transepitelial, el porcentaje de regeneración de la monocapa celular al realizársele una herida, así como la utilización de la técnica de inmunofluorescencia para observar las proteínas de la unión estrecha y los núcleos. En esta sección se describe la metodología de cada uno de los diferentes métodos utilizados para evaluar los efectos del campo magnético en las monocapas celulares.

3.2.1. Experimentos de medición de Impedancia

3.2.1.1. Determinación de la TEEI al aplicar estímulo magnético.

El protocolo de experimentación estableció una señal sinusoidal pulsada de 10 y 50G @60 Hz para estimular a las monocapas celulares confluentes durante 60 min cada 4 h (Anexo 7.3).

Se tomó un grupo de control, al cual no se les aplicó estímulo, y un grupo de tratamiento. Ambos grupos se encontraban en las mismas condiciones ambientales, es decir, condiciones normales de crecimiento y provenientes de una misma población celular.

Las mediciones de impedancia eléctrica se realizaron previamente y posterior al tiempo de exposición de 60 min de duración. La Fig. 3.24 muestra un esquema del protocolo y la toma de muestras.

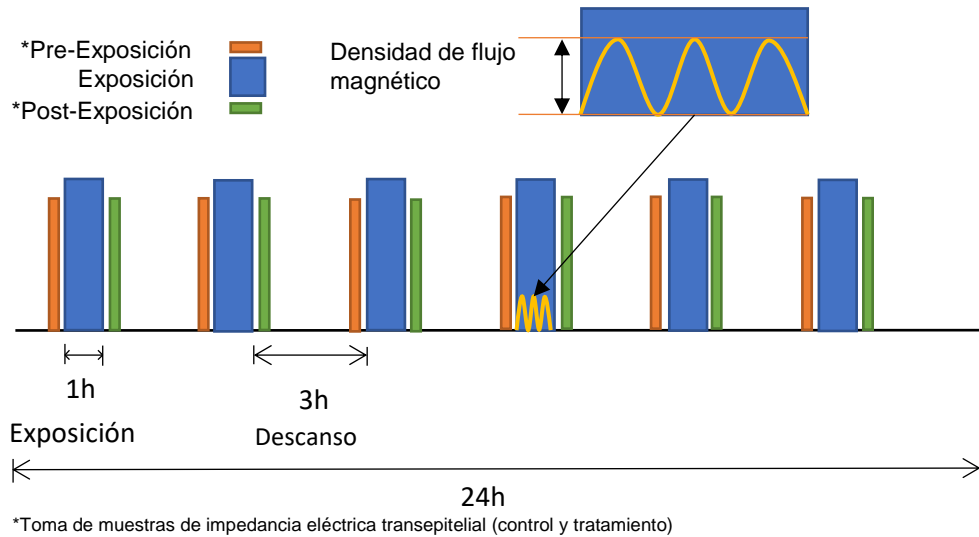


Fig. 3.24. Representación gráfica del protocolo experimental con campos magnéticos y toma de muestras de impedancia eléctrica transepitelial.

Las células se sembraron con una densidad media (25,000 por pozo), una semana antes de aplicarles el campo magnético para que el estímulo magnético se proporcionara cuando la monocapa celular estuviera confluyente y poder comparar las impedancias eléctricas.

3.2.2. Regeneración de la monocapa celular mediante el ensayo de cierre de herida

Una forma de analizar la migración celular *in vitro* (la manera que las células se reproducen y se mueven) es utilizando el ensayo de cierre de herida (Scratch-wound assay) [77], [97], [98], el cual consiste en sembrar células en cajas Petri y realizar una herida para observar la velocidad de cierre de esa herida.

Empleando el protocolo de experimentación definido para observar la regeneración de la monocapa ante los estímulos magnéticos (anexo 7.5), se obtuvieron imágenes en microscopio cada 120 min para comparar ambas poblaciones celulares (anexo 7.5).

Mediante un programa desarrollado en MATLAB® se obtuvieron los porcentajes de confluencia. El script se observa en el anexo 4.

3.2.3. Inmunofluorescencia

Para el experimento de inmunofluorescencia se utilizaron los mismos grupos celulares de control y tratamiento. El protocolo del experimento se muestra en los anexos 7.6 y 7.7.

La Fig. 3.25 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra el procedimiento de exposición al campo magnético y la toma de muestras a las 24h, 48h y 72 h, así como los periodos de descanso y tratamiento.

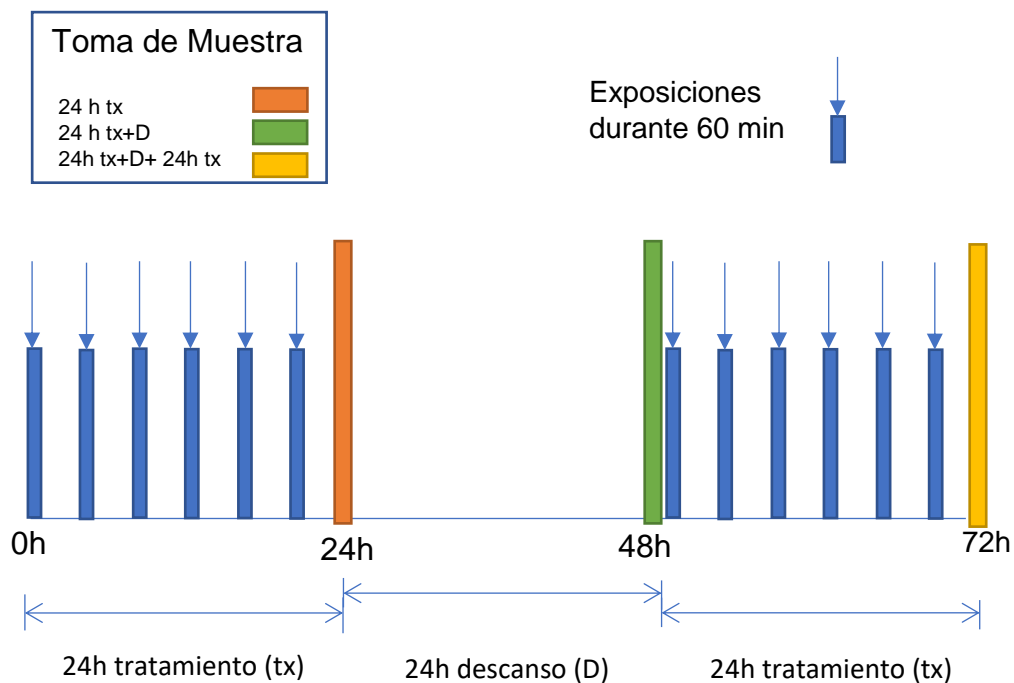


Fig. 3.25. Representación gráfica de la temporalidad de ejecución de los experimentos con campos magnéticos y toma de muestra para la inmunofluorescencia.

Las uniones estrechas poseen proteínas especializadas (claudinas, ocludinas, etc.) las cuales pueden observarse mediante la microscopía confocal o inmunofluorescencia. Dicha técnica consiste en la utilización de anticuerpos junto con fluorocromos o marcadores que, al hacerles incidir un haz de luz a cierta longitud de onda, se observan en un microscopio confocal.

Se ha reportado una relación en la expresión de Claudina-1 (CLDN1) con la TEER [99], es por ello que en este procedimiento se optó por observar la expresión de las proteínas de la unión estrecha para darle mayor soporte a la investigación. De igual manera se propuso observar la proteína llamada Zonula occludens-1 (ZO-1), la cual se encuentra presente de igual manera en las uniones estrechas.

Las imágenes se tomaron con cortes a diferente altura de la monocapa celular para observar las proteínas en distintos planos. El mismo procedimiento de microscopía confocal se efectuó para observar los núcleos de las células debido al marcaje de adenina y timina presentes en los núcleos celulares.

3.2.3.1 Evaluación del número de núcleos

Una vez obtenidas las imágenes se comparó la cantidad de células por área de la imagen. Para ello se utilizaron los núcleos y se contaron mediante un programa desarrollado en MATLAB®. El script desarrollado se presenta en el anexo 4

3.2.3.2 Evaluación de forma y área de los núcleos

Del mismo modo que se contaron los núcleos, se desarrolló un programa que evalúa la forma de los núcleos por su circularidad. Dicho programa arroja valores entre 0 y 1, siendo 1 el núcleo totalmente circular. El script desarrollado se muestra en el anexo 4.

3.2.3.3 Evaluación en la intensidad de CLDN1 y ZO-1 (uniones intercelulares)

Tanto las proteínas de CLDN1 como ZO-1 se marcan con dos anticuerpos, por lo que se realizaron en 2 pruebas diferentes.

Una vez obtenidas las imágenes, se planteó efectuar una comparación, mediante el uso del histograma en la imagen, de la cantidad de proteína presente en las uniones estrechas puesto que las proteínas se encuentran en proporción a la cantidad de fluorescencia en la imagen.

CAPÍTULO 4. PRUEBAS Y RESULTADOS

La sección de resultados, al igual que la de metodología, se divide en 2 partes: la primera se refiere a la instrumentación desarrollada (generador de campo magnético y medidor de impedancia eléctrica) y la segunda a las pruebas realizadas en células al aplicarles un estímulo magnético.

A continuación, se muestran los resultados de cada una de las etapas en el mismo orden que se presentan en el capítulo 3.

4.1. Pruebas y resultados de la instrumentación desarrollada.

4.1.1. Pruebas del generador de campo magnético.

Las pruebas realizadas al generador de campo magnético sirvieron para evaluar las características de magnitud, frecuencia y uniformidad del campo magnético en la zona de trabajo.

4.1.1.1 Simulación del generador de campo magnético.

La simulación del funcionamiento del generador de campo magnético se realizó para condiciones dentro y fuera del volumen de trabajo para observar la uniformidad del campo magnético en la zona de tratamiento y la densidad del campo magnético remanente en la región donde se colocan las muestras control.

Campo magnético dentro del volumen de trabajo.

Los datos arrojados por la simulación muestran que el arreglo de bobinas Helmholtz proporciona un flujo de campo magnético uniforme en la zona central de las bobinas. En la Fig. 4.1 se observa la distribución de la densidad del campo magnético en el arreglo Helmholtz, mediante la escala de colores y flechas que indican los vectores de la densidad de flujo. Se aprecia que en la zona central los vectores poseen una dirección perpendicular a las bobinas y conservan la misma proporción en tamaño.

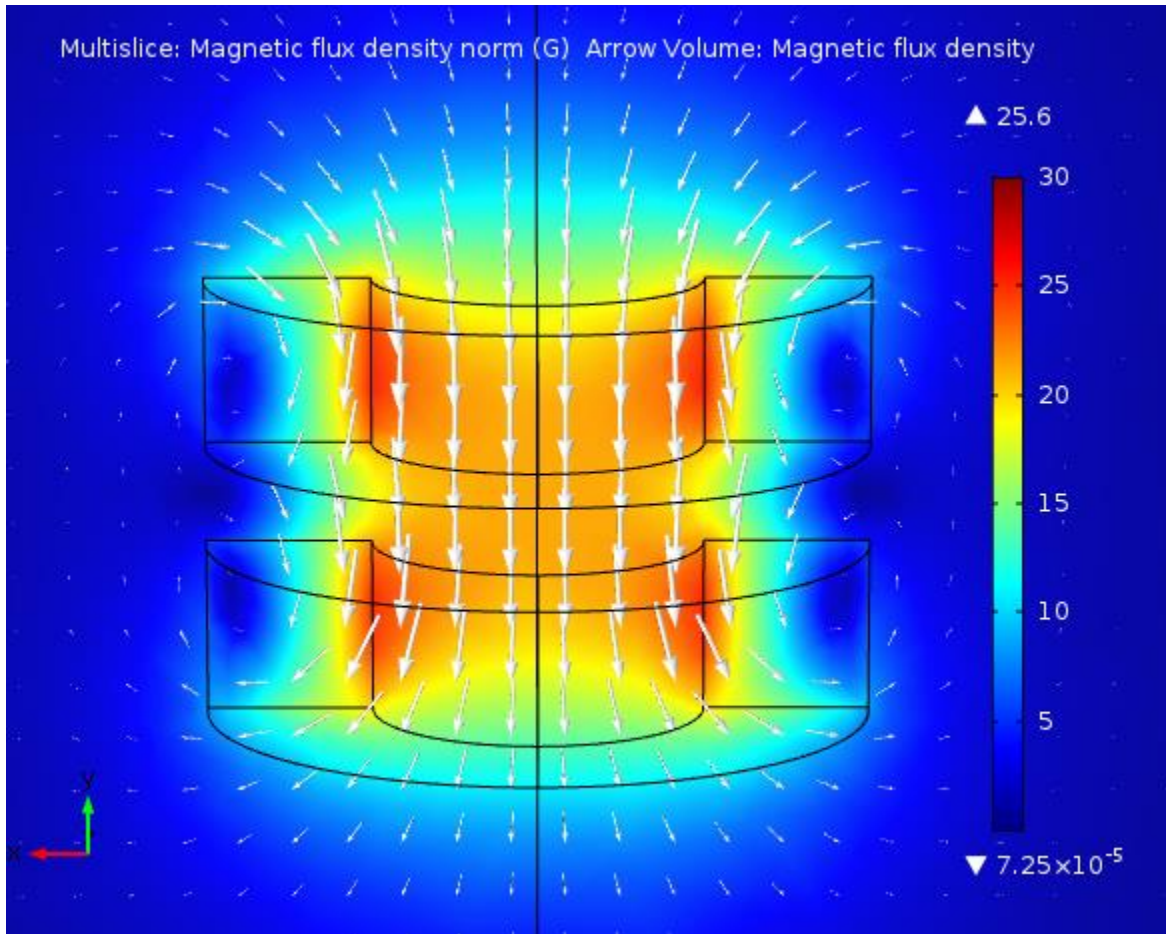


Fig. 4.1. Resultados de la simulación del campo magnético en el arreglo de bobinas Helmholtz

Mediante la simulación se logró observar la región plana con la intensidad del campo magnético igual en cada uno de los puntos del volumen de trabajo, donde se colocan los filtros permeables. La Fig. 4.2 muestra la región de trabajo, la cual no excede de un cilindro de 20 mm de diámetro y 16 mm de altura.

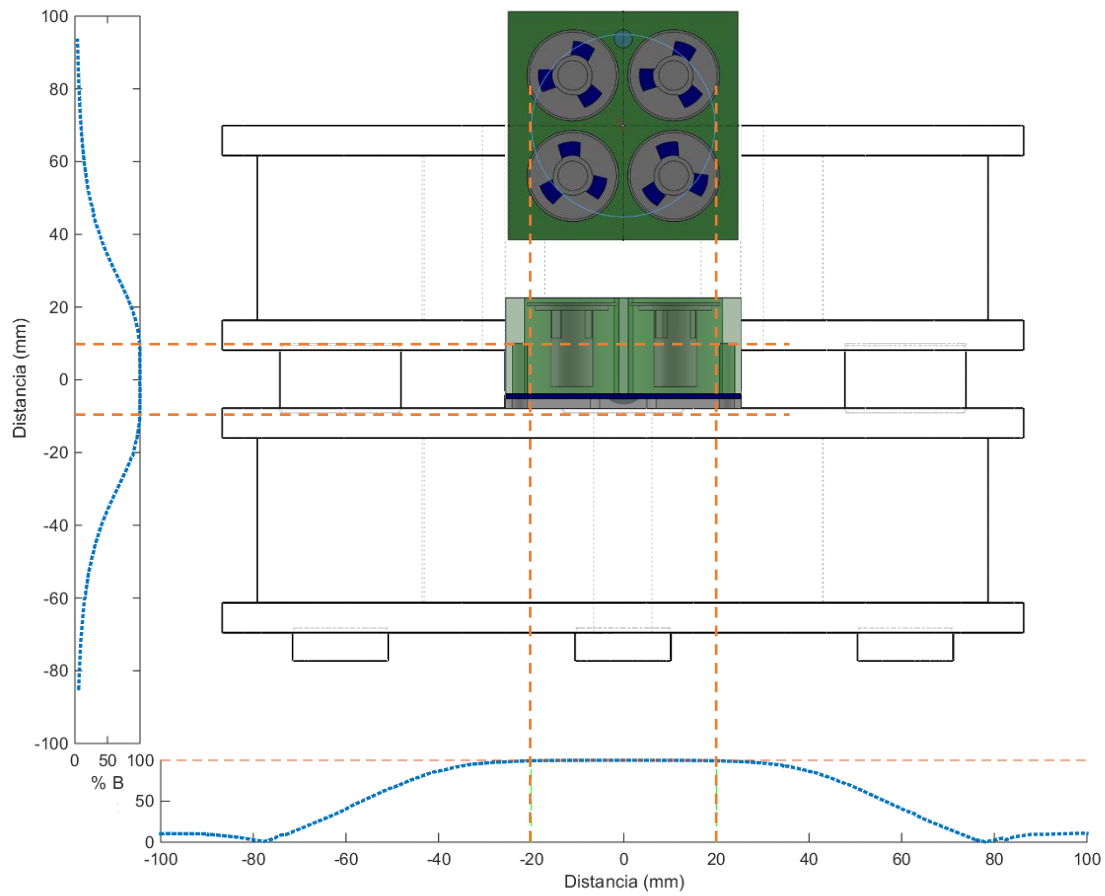


Fig. 4.2. Distribución del campo magnético (trazo de puntos azules) y su correspondencia con el volumen de trabajo y las zonas de los filtros permeables.

La densidad de flujo magnético en el volumen de trabajo se observa gráficamente en la Fig. 4.3, en donde se aprecia un color uniforme en los pozos.

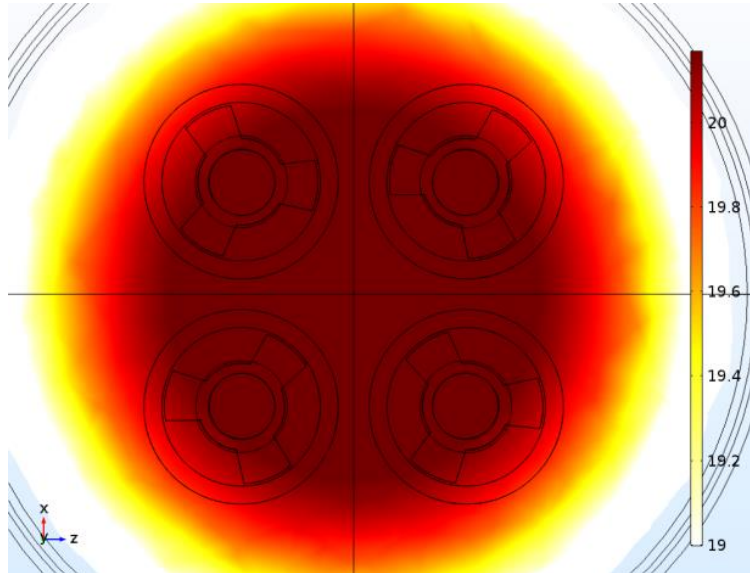


Fig. 4.3. Distribución uniforme de la densidad de flujo magnético (G) (zona roja) en la región correspondiente a los filtros con los cultivos celulares.

Para corroborar de manera cuantitativa la uniformidad de la distribución del campo en la región de interés, se calcularon los siguientes parámetros: media, desviación estándar, máximo y mínimo de la intensidad del campo magnético en cada pozo; los resultados se muestran en la TABLA 4.1.

TABLA 4.1. DENSIDAD DE FLUJO MAGNÉTICO EN LA REGIÓN DE INTERÉS.

Parámetro	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4
Media (G)	20.217	20.223	20.210	20.234
STD	0.049	0.053	0.053	0.041
Máximo (G)	20.312	20.307	20.301	20.316
Mínimo (G)	20.105	20.080	20.068	20.110

Se efectuaron diferentes configuraciones de distancias de separación de las bobinas y de los diámetros de cada una, así como del número de vueltas del alambre de cobre.

Los resultados de las pruebas realizadas mediante la simulación para el número de vueltas se pueden ver en la Fig. 4.4, en donde efectivamente se comprueba que la densidad de flujo magnético es directamente proporcional al número de vueltas de las bobinas en el arreglo tipo Helmholtz.

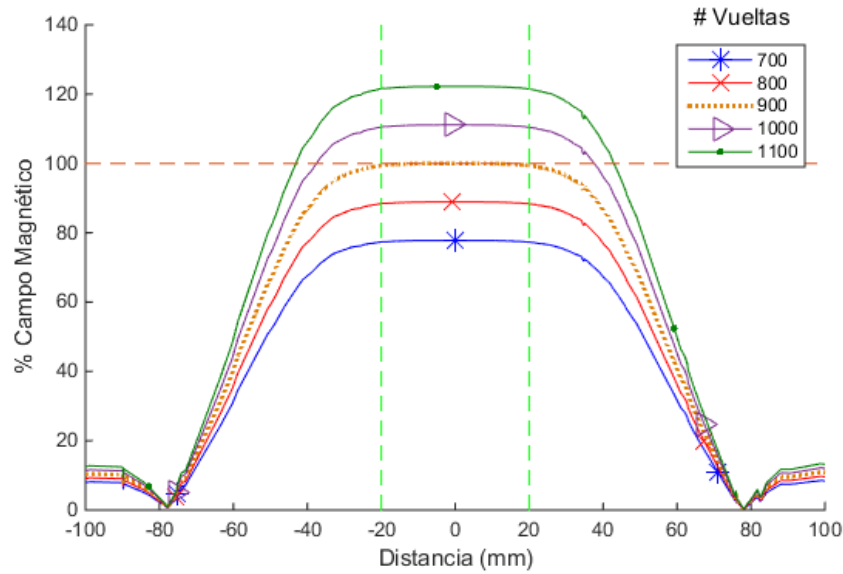


Fig. 4.4. Curvas de densidad de flujo magnético en proporción al número de vueltas.

En la Fig. 4.5 se observan las curvas de la densidad de flujo magnético simuladas al modificar los radios de las bobinas. Se observa que mientras menor sea el radio, la magnitud del campo magnético es menor y se pierde la región uniforme propuesta de 40mm (marcada en la imagen de -20 a 20 mm). Sin embargo, al aumentar de más el radio, la región que requiere ser uniforme tiende a hacer un valle y cae un poco en la región central.

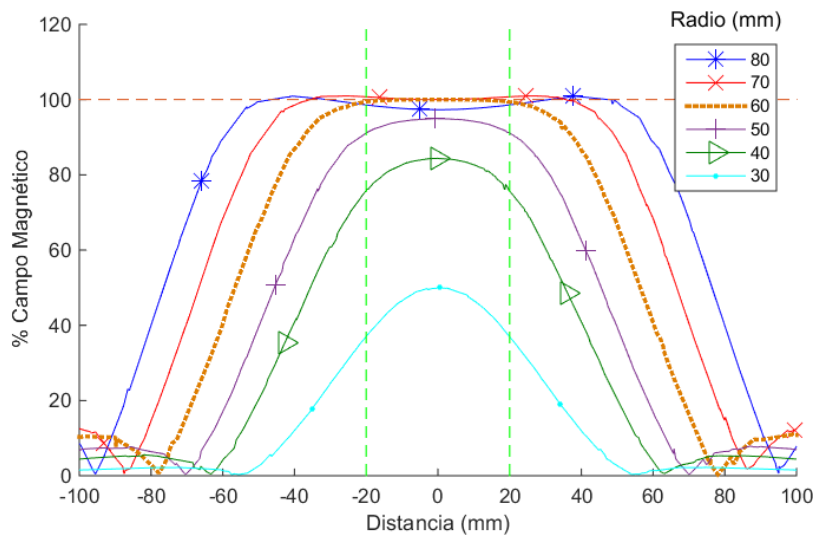


Fig. 4.5. Curvas de densidad de flujo magnético variando el radio de las bobinas.

De la misma forma, al variar la distancia de la separación de las bobinas (Fig. 4.6), se observa cómo la región central cambia de valle a cresta. Sin embargo, se observa que con la separación a utilizar de 32 mm se puede lograr la región plana.

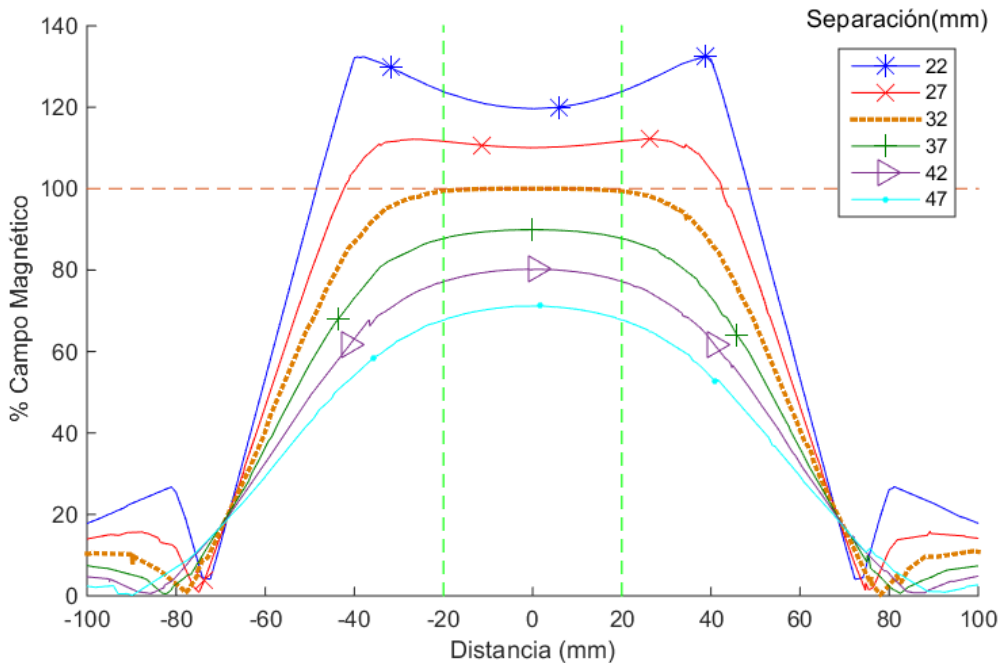


Fig. 4.6. Curvas de densidad de flujo magnético variando la distancia de separación de las bobinas.

Campo magnético en la zona cercana al volumen de trabajo.

Con el objetivo de observar la densidad de flujo magnético fuera y cercana a la zona del volumen de trabajo, se tomaron diferentes puntos de la simulación a distancias de aproximadamente 35 cm a 85 cm. Mediante la herramienta de aproximación de la curva en Matlab se obtuvo (14):

$$f(x) = 31.61e^{-15.42x} + 0.73287e^{-0.04569x} \quad (14)$$

La Fig. 4.7 muestra los datos obtenidos de la simulación y la curva descrita por (14). La aproximación de la curva obtuvo un coeficiente de determinación $R^2=0.9891$ y un valor de la Raíz del Error Cuadrático Medio $RMSE=0.004295$.

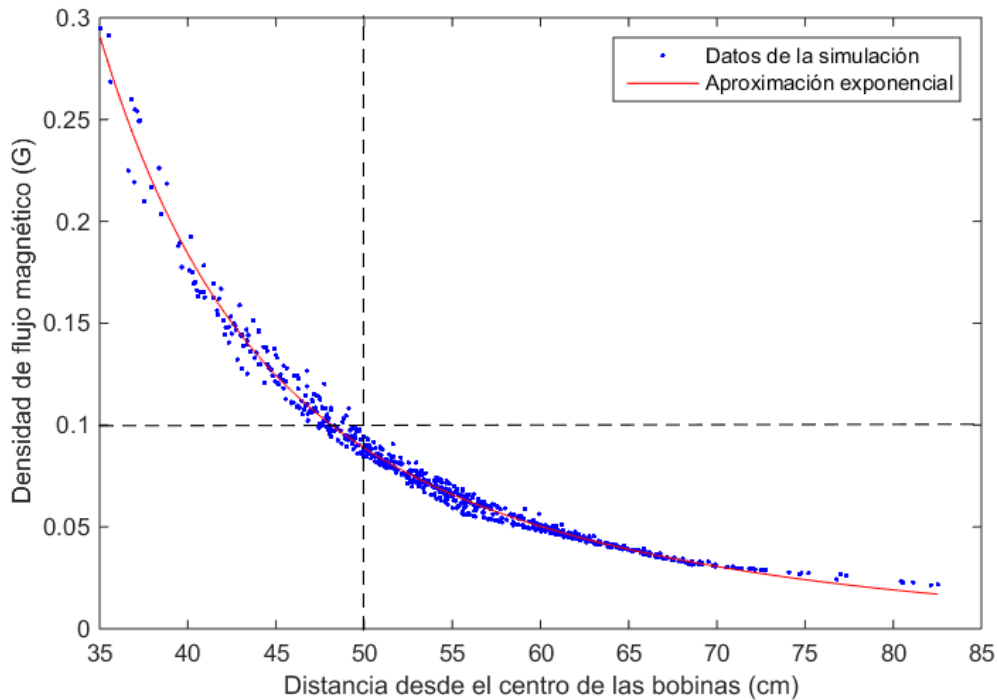


Fig. 4.7. Datos obtenidos de la simulación para distancias fuera del volumen de trabajo.

4.1.1.2 Pruebas con corriente continua.

Como prueba inicial se propuso medir la densidad de flujo magnético desde el centro de las bobinas, utilizando el instrumento Gauss/Tesla Meter 5180 y manteniendo fija la densidad del campo. Los resultados de la prueba se observan en la Fig. 4.8, en donde se aprecia la región plana del volumen de trabajo en la zona central.

Los datos de las medidas de campo magnético utilizando los criterios definidos para las pruebas, aplicando corriente continua, se muestran en la TABLA 4.2. El coeficiente de variación determinó el grado de dispersión de la magnitud del campo magnético para el volumen de trabajo, el cual fue menos del 1% en todos los casos, considerando los promedios de los cuatro sensores. Esto sugiere una uniformidad del campo magnético y un buen desempeño de la configuración Helmholtz.

TABLA 4.2. RESPUESTA DE LOS SENSORES DE EFECTO HALL DE LAS 10 SERIES DE MEDICIONES Y LOS RESULTADOS DE LA DISPERSIÓN DE LOS SENSORES, MEDIA (SD).

*G	Sensor 1		Sensor 2		Sensor 3		Sensor 4		Medias de los sensores		●CV (%)
1.50	1.565	(0.0548)	1.585	(0.0476)	1.5685	(0.0718)	1.5476	(0.0623)	1.568	(0.0155)	0.99
3.20	3.37	(0.08)	3.38	(0.09)	3.37	(0.09)	3.34	(0.08)	3.37	(0.02)	0.52
5.40	5.44	(0.08)	5.47	(0.09)	5.46	(0.09)	5.43	(0.06)	5.45	(0.02)	0.37
7.60	7.57	(0.06)	7.58	(0.06)	7.59	(0.07)	7.57	(0.07)	7.58	(0.01)	0.18
9.70	9.81	(0.07)	9.85	(0.08)	9.85	(0.08)	9.82	(0.08)	9.83	(0.02)	0.20
11.90	12.08	(0.10)	12.12	(0.11)	12.11	(0.09)	12.10	(0.09)	12.10	(0.02)	0.14
14.30	14.37	(0.09)	14.43	(0.10)	14.44	(0.09)	14.40	(0.08)	14.41	(0.03)	0.22
16.70	16.67	(0.11)	16.73	(0.10)	16.74	(0.10)	16.69	(0.09)	16.71	(0.03)	0.20
19.00	19.01	(0.09)	19.08	(0.09)	19.04	(0.09)	19.03	(0.07)	19.04	(0.03)	0.17
21.10	21.36	(0.09)	21.42	(0.09)	21.37	(0.11)	21.39	(0.08)	21.39	(0.03)	0.12
23.30	23.72	(0.17)	23.81	(0.17)	23.74	(0.19)	23.75	(0.15)	23.75	(0.04)	0.16
25.70	26.05	(0.12)	26.11	(0.12)	26.06	(0.13)	26.07	(0.10)	26.07	(0.03)	0.10
28.30	28.39	(0.12)	28.46	(0.12)	28.38	(0.09)	28.40	(0.10)	28.41	(0.03)	0.12
30.50	30.76	(0.11)	30.79	(0.12)	30.74	(0.12)	30.75	(0.11)	30.76	(0.02)	0.07
32.80	33.08	(0.06)	33.12	(0.07)	33.09	(0.08)	33.06	(0.06)	33.09	(0.03)	0.08
35.20	35.41	(0.11)	35.45	(0.12)	35.43	(0.13)	35.35	(0.12)	35.41	(0.04)	0.12
37.50	37.78	(0.11)	37.75	(0.10)	37.80	(0.12)	37.72	(0.11)	37.76	(0.04)	0.10
40.00	40.11	(0.10)	40.08	(0.10)	40.12	(0.10)	40.03	(0.09)	40.09	(0.04)	0.10

*Densidad de flujo magnético (Gauss)

●CV, Coeficiente de variación

Se realizó una prueba para observar el campo magnético en la región central de las bobinas. Dicha prueba consistió en inducir un campo magnético de 25 G y medirlo desde el centro hacia la zona exterior de las bobinas. Las mediciones se efectuaron cada 1 mm utilizando el Gauss/Tesla Meter 5180 y se realizaron 4 mediciones (cada 90°).

Los resultados de las mediciones se observan en la Fig. 4.8, en donde se aprecia la región plana, la cual se encuentra justo en el centro de las bobinas.

Con estos mismos datos se calculó la media y desviación estándar de las medidas tomadas desde el centro hasta los 20 mm (Volumen de trabajo), dando como resultado $m= 24.9594$, y $STD= 0.1627$.

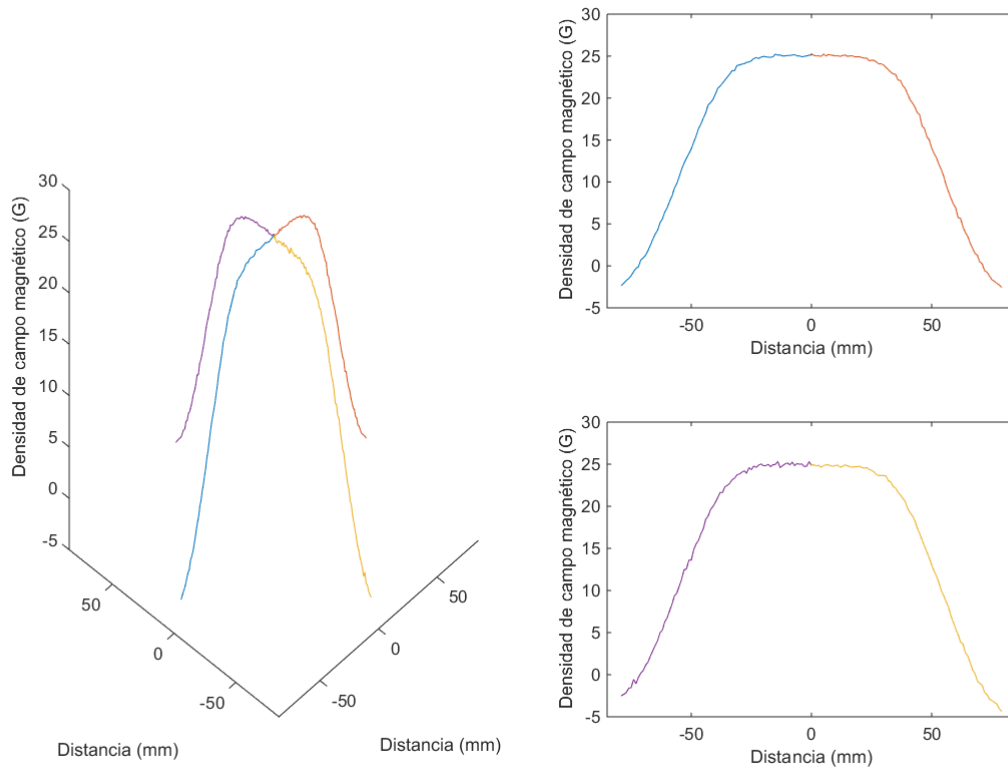


Fig. 4.8. Densidad de flujo magnético medido desde el centro de las bobinas.

4.1.1.3 Pruebas con corriente pulsante.

Las pruebas con corriente pulsante se realizaron a diferentes frecuencias en dos condiciones de temperatura: en medio ambiente y dentro de la incubadora.

En cuanto a temperatura ambiente (24.6°C), en la Fig. 4.9a se observa cómo la densidad de flujo magnético a frecuencias bajas ($f < 5\text{Hz}$) se conserva prácticamente en 25 G, mientras que en la Fig. 4.9b se aprecia la atenuación del campo conforme la frecuencia se incrementa.

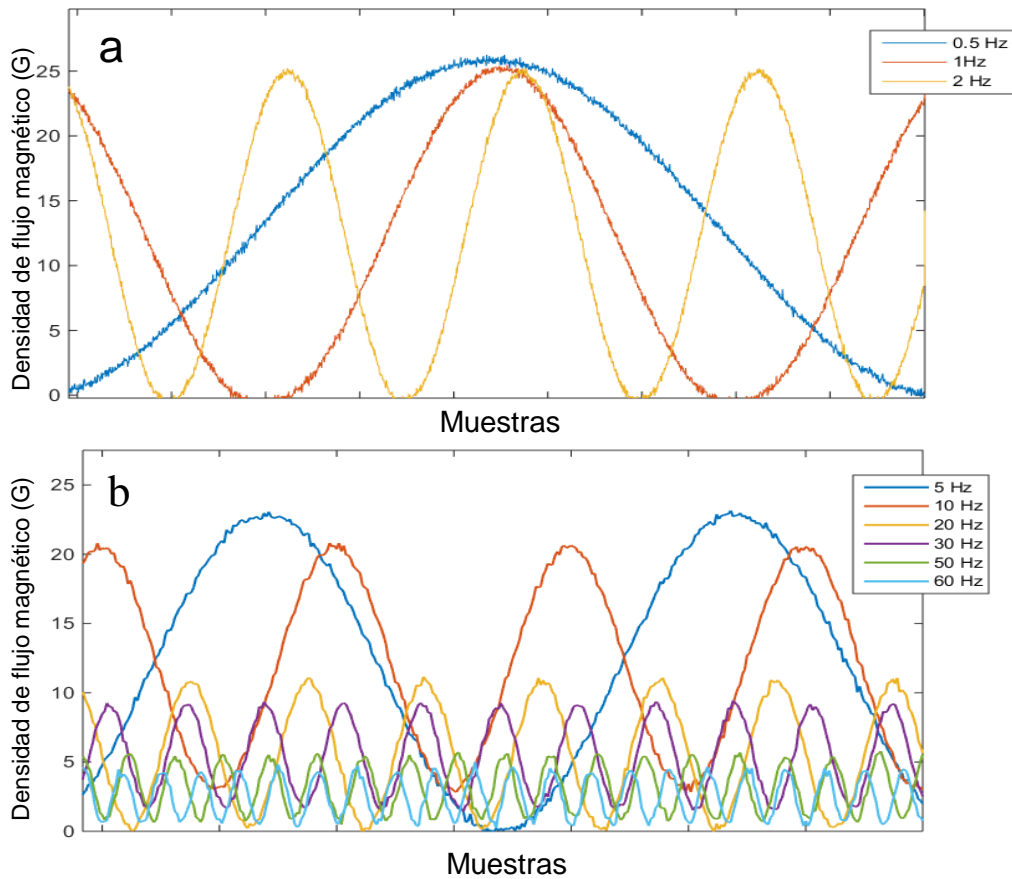


Fig. 4.9. Señales de densidad de flujo magnético a temperatura ambiente superpuestas a diferentes frecuencias, a) $f < 5$ Hz, b) $60 \geq f \geq 5$ Hz.

Resultados de la afectación de la temperatura al campo magnético.

La Fig. 4.10 muestra la comparación de las lecturas de densidad de flujo magnético en las condiciones de temperatura de 24.6 y 36.7°C. Se observa que hubo una atenuación de la intensidad del campo magnético al cambiar las condiciones de temperatura, es decir, al colocar el generador de campo magnético dentro de la incubadora a 36.7°C. No obstante, se conserva la tendencia de atenuación al aumentar la frecuencia en ambas condiciones de temperatura.

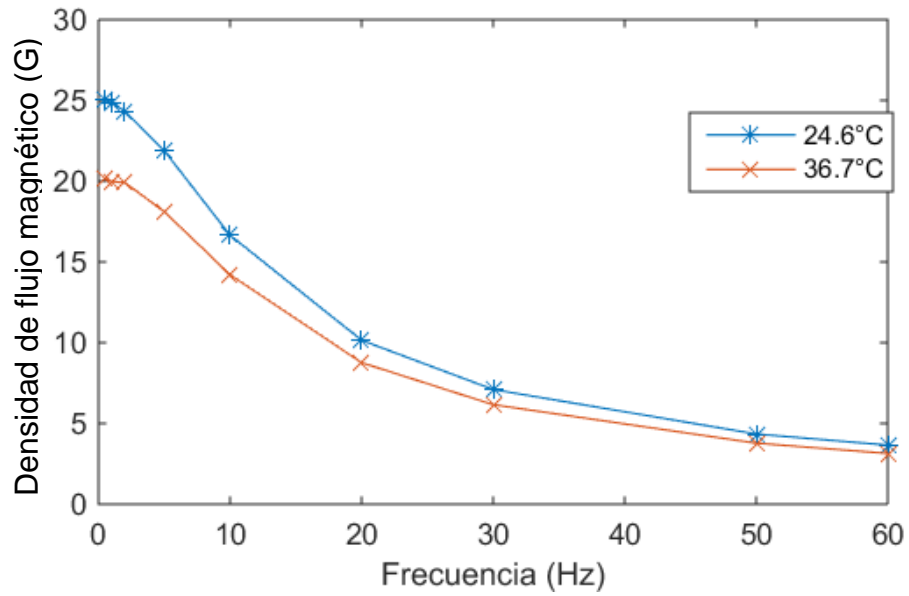


Fig. 4.10. Respuesta del generador de campo magnético considerando la frecuencia y temperatura.

Para observar modificaciones en la operación del generador del campo magnético, en la Fig. 4.11 se muestran los cambios de temperatura dentro de la incubadora, en exposiciones de campo magnético durante 60 min con corriente pulsante en las frecuencias de 1 y 10Hz. Se observó un incremento de temperatura menor a 0.4°C a lo largo del experimento para ambas frecuencias.

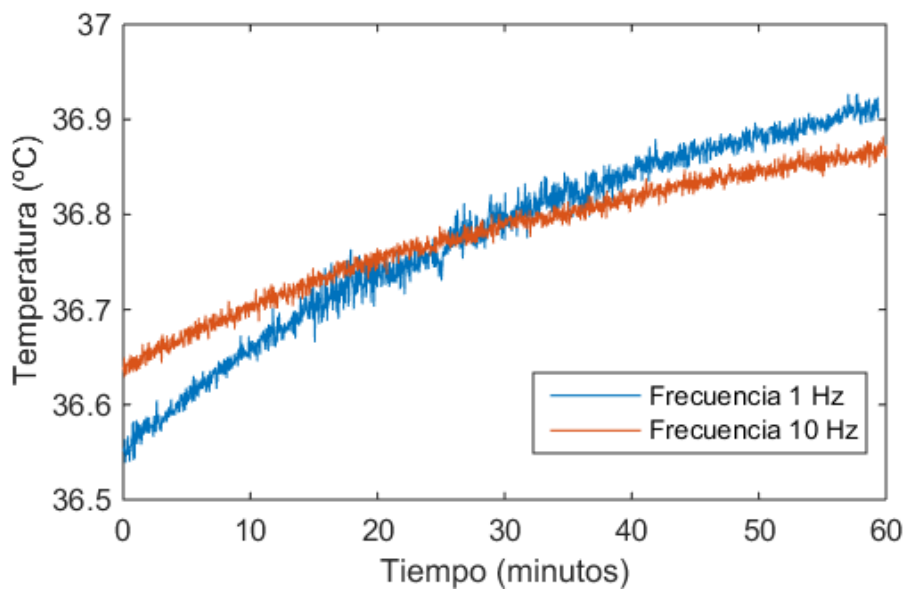


Fig. 4.11. Medición de la temperatura durante 1 hora a 1 y 10 Hz.

En relación con los registros de densidad de flujo magnético durante las pruebas de 60 min, en la TABLA 4.3 se muestra la media y la desviación estándar de los datos obtenidos. Se observa una mínima desviación estándar menor al 1%, lo que sugiere que la densidad de flujo se conserva a lo largo del experimento.

TABLA 4.3. CAMPO MAGNÉTICO DURANTE UNA HORA DE EXPOSICIÓN.

Frecuencia	Media (G)	STD
1 Hz	20.21	0.13
10 Hz	20.05	0.05

4.1.2. Pruebas y resultados para el sistema de medición de impedancia eléctrica en monocapas celulares.

4.1.2.1 Validación del sistema desarrollado con el sistema comercial CellZscope®.

Comparación de los algoritmos de estimación de parámetros del modelo eléctrico de la monocapa celular a partir de los resultados obtenidos de la magnitud de impedancia eléctrica.

Los resultados de la prueba de validación del algoritmo desarrollado con Matlab y el algoritmo del sistema comercial se muestran en las Fig. 4.12 - Fig. 4.14. Se utilizaron los mismos valores de la magnitud de la impedancia eléctrica transepitelial para ambos algoritmos y se aproximaron los valores de TEER, Capacitancia C_{cl} , y resistencia del medio (R_{med}). Se obtuvieron 10 mediciones por cada pozo y se compararon los resultados. Se realizaron estas pruebas con la finalidad de comparar los algoritmos como una fase del desarrollo del sistema de medición de impedancia eléctrica.

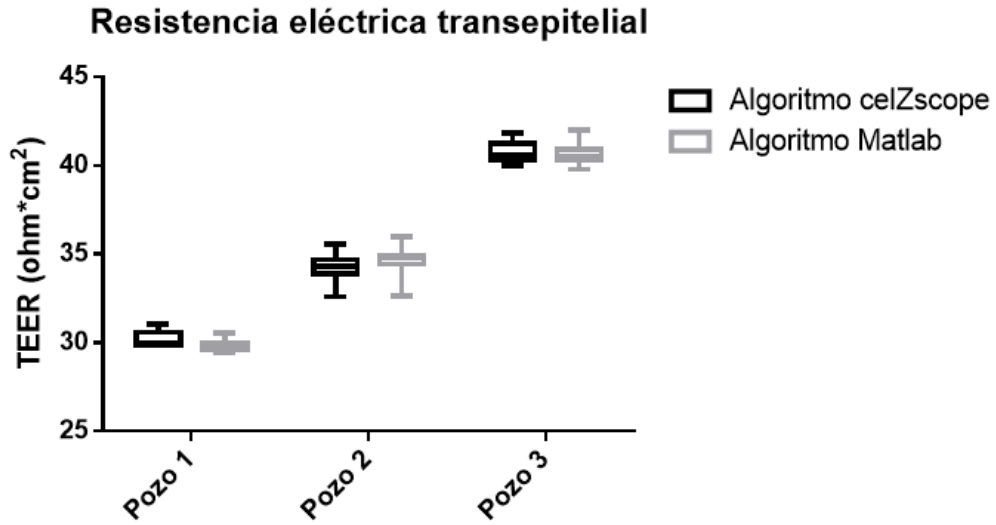


Fig. 4.12. Comparativa de TEER del algoritmo desarrollado en Matlab con el algoritmo interno del sistema comercial CellZscope®.

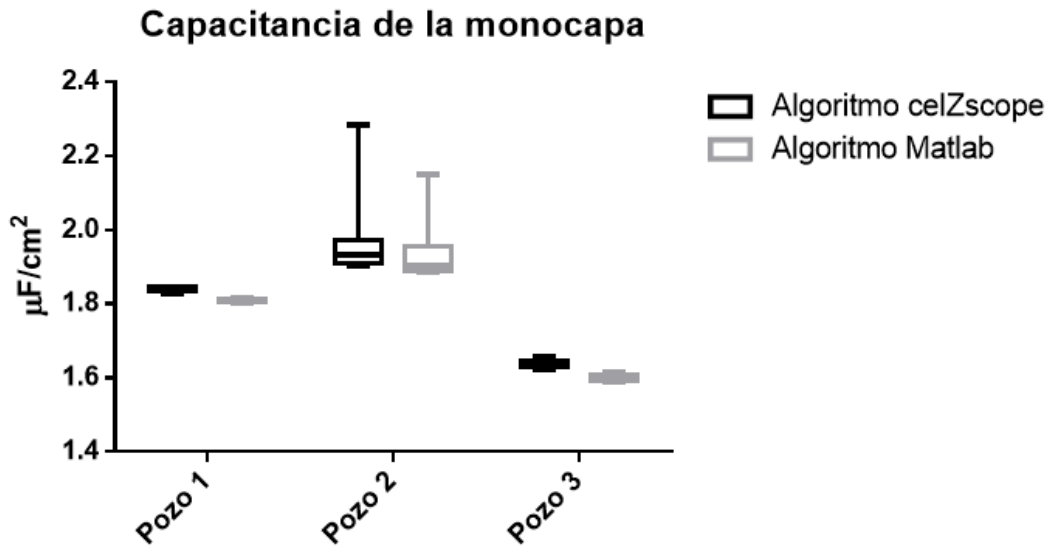


Fig. 4.13. Comparativa de la capacitancia de la monocapa celular del algoritmo desarrollado en Matlab con el algoritmo interno del sistema comercial CellZscope®.

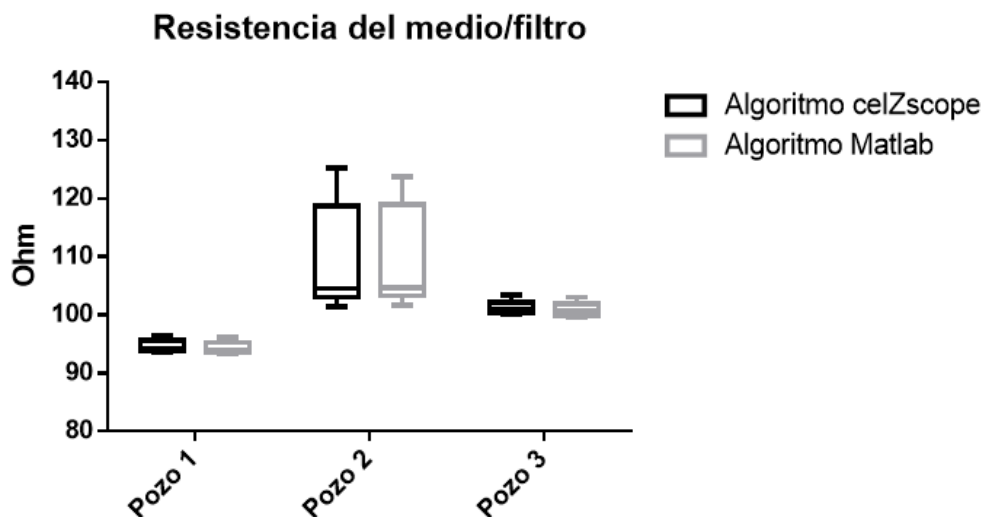


Fig. 4.14. Comparativa de la resistencia del medio/filtro del algoritmo desarrollado en Matlab con el algoritmo interno del sistema comercial CellZscope®.

Además de las gráficas comparativas, se realizó la prueba de *Wilcoxon Matched-Pairs Signed Rank* mediante el software GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA) para encontrar los valores p y determinar si los datos arrojados por ambos algoritmos son significativamente parecidos (TABLA 4.4).

TABLA 4.4. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE WILCOXON MATCHED-PAIRS SIGNED RANK PARA LAS COMPARACIONES DE LOS ALGORITMOS

Parámetros	TEER(Ω^*cm^2)	C_{cl} ($\mu F/cm^2$)	Rmed (Ω)
P	> 0.9999	0.2500	0.5000
Diferencia Mediana	-0.06955	-3.192e-008	-0.2476
¿Diferencias mayores al %5? (P < 0.05)	No	No	No

Comparación del sistema desarrollado con el sistema comercial CellZscope®.

Una vez que se validó el algoritmo desarrollado en Matlab, fue necesario validar el sistema completo, es decir, comparar el sistema desarrollado con el equipo comercial CellZscope®. Para ello se montó la infraestructura para conmutar únicamente la cámara con los electrodos junto con los cultivos celulares y así evaluar los sistemas de medición de impedancia eléctrica como la aproximación de parámetros. Se realizaron 10 mediciones de 3 pozos diferentes (cada 2 min) y se compararon los 2 sistemas.

Los resultados de las comparaciones para TEER, C_{cl} y R_{med} se pueden apreciar en las Fig. 4.15-Fig. 4.17.

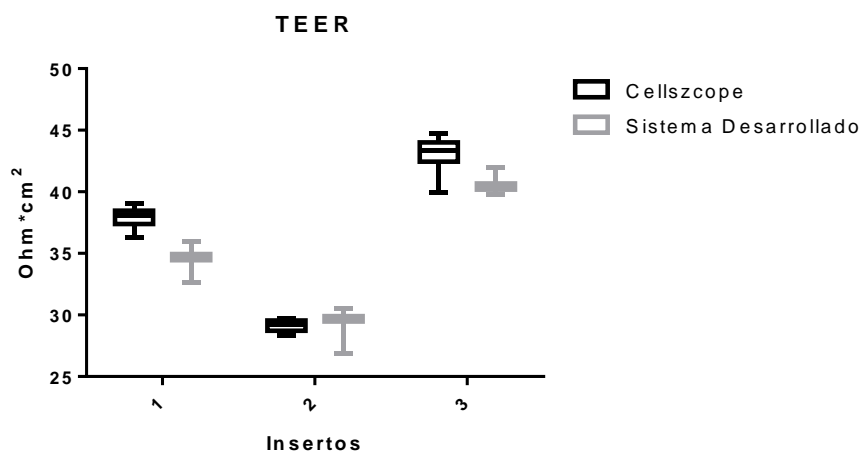


Fig. 4.15. Comparativa de TEER del sistema comercial CellZscope® y el sistema desarrollado.

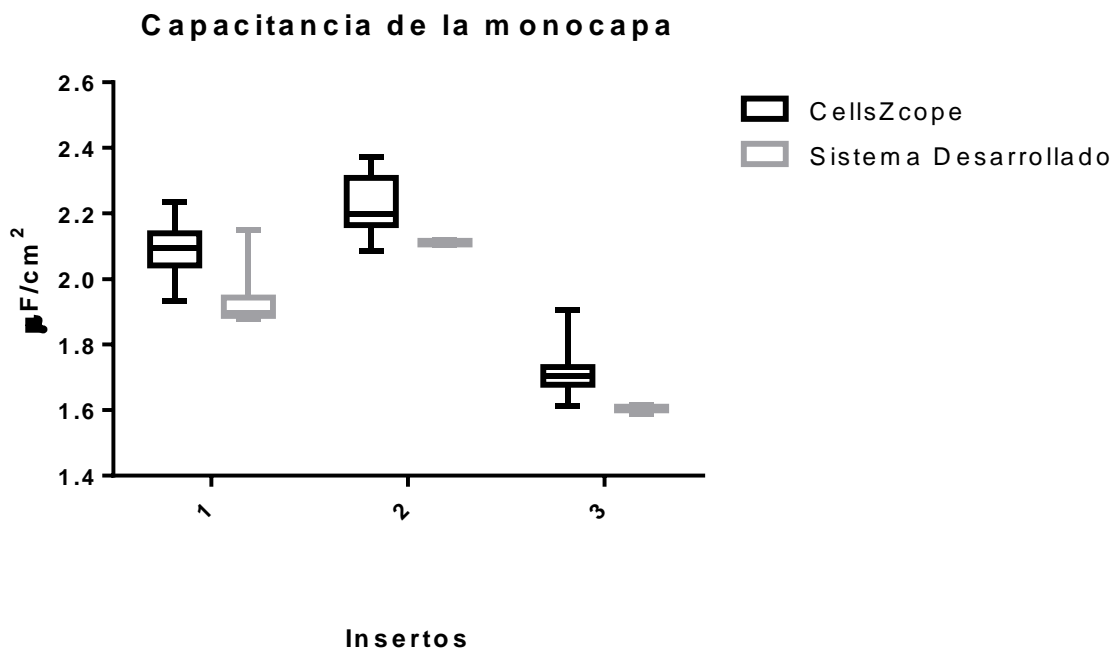


Fig. 4.16. Comparativa de la capacitancia de la monocapa celular C_{cl} del sistema comercial CellZscope® y el sistema desarrollado.

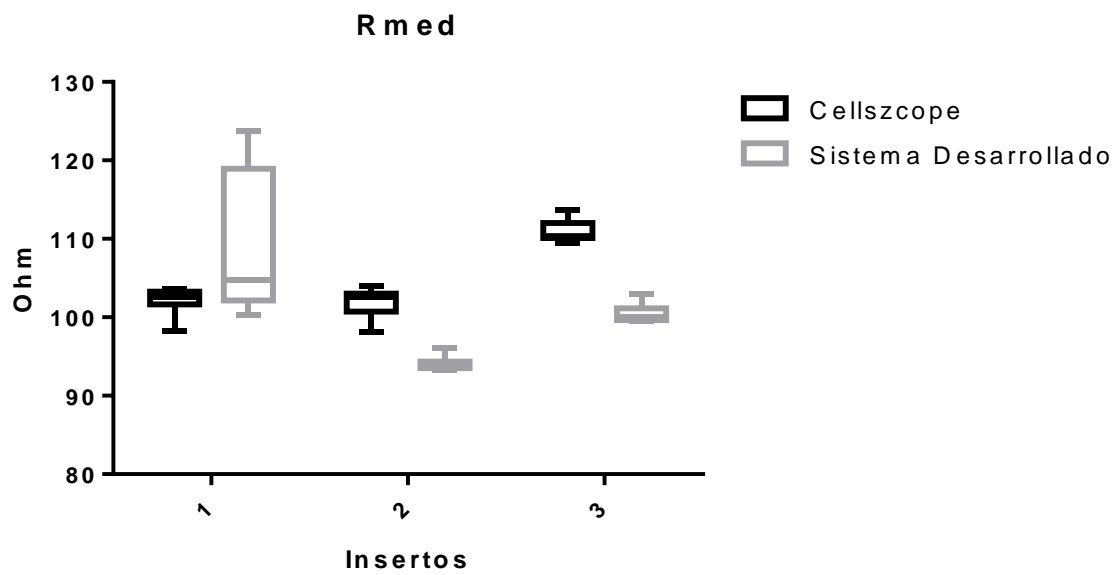


Fig. 4.17. Comparativa de la resistencia del medio del sistema comercial CellZscope® y el sistema desarrollado.

Los resultados cuantitativos de comparación entre el sistema desarrollado y el sistema comercial se muestran en la TABLA 4.5, en donde se realiza una comparación utilizando la prueba de Mann Withney. No se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos con los dos instrumentos.

TABLA 4.5. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE MANN WHITNEY DE LAS COMPARACIONES DEL SISTEMA COMERCIAL CON EL DESARROLLADO

Parámetros	TEER(Ω^*cm^2)	C_{cl} ($\mu F/cm^2$)	Rmed (Ω)
P	0.9	0.7	0.4
¿Diferencia significativa? (P < 0.05)	No	No	No
Mann-Whitney U	4	3	2
<i>Diferencia entre las medianas</i>			
Mediana CellZscope®	37.95	2.088	102.2
Mediana CAMEIA	34.64	1.932	100.5
Diferencia: Actual	-3.314	-0.1562	-1.664

4.1.2.2 Pruebas de tiempo de confluencia mediante el uso de la TEER obtenida por el medidor de impedancia eléctrica.

Se realizó un seguimiento de la impedancia eléctrica de las monocapas celulares cada 15 min, desde el momento en que se siembran hasta justo después del cambio de medio de cultivo, para observar su comportamiento a través del tiempo. La impedancia se registró automáticamente bajo las condiciones normales de crecimiento (dentro de un ambiente controlado de CO₂, humedad y temperatura) utilizando el sistema de medición de impedancia desarrollado. Las células se sembraron conforme al procedimiento mostrado en el anexo 7.1; los resultados del experimento se muestran en la Fig. 4.18.

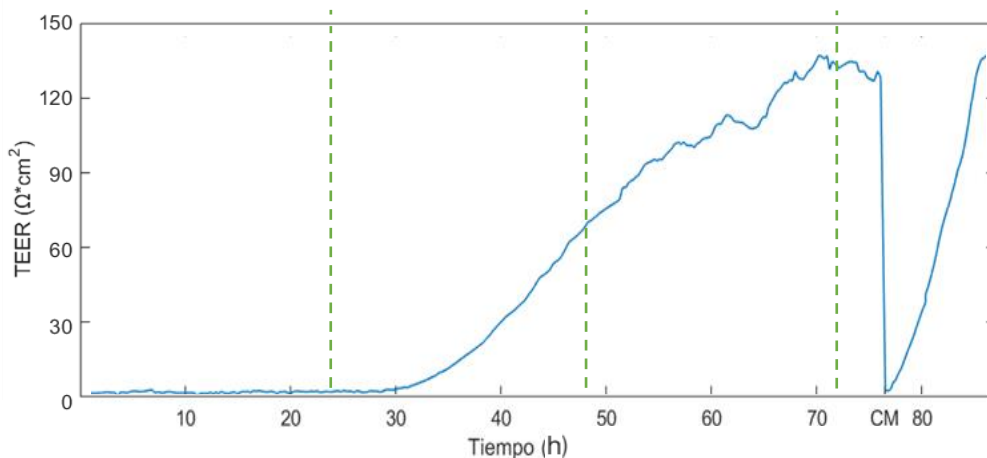


Fig. 4.18. Seguimiento de la TEER en las monocapas celulares a partir del momento de sembrado, *CM es cambio de medio.

Los resultados de la prueba de monitoreo de impedancia eléctrica indican un aumento en la TEER conforme se da un crecimiento en la monocapa celular, siendo un comportamiento normal reportado en la literatura [46], [100], [101]. Al momento de hacer el cambio de medio, se observa que la TEER cae drásticamente y se recupera en un lapso de cerca de 10 h, lo que indica que el cambio de medio afecta significativamente a la impedancia eléctrica de la monocapa celular.

De la misma forma se realizó otro seguimiento de la TEER a través del tiempo a partir del primer cambio de medio. En esta ocasión se presentaron problemas tanto de CO₂ como de medición de impedancia debido a situaciones externas. El resultado se presenta en la Fig. 4.19, en donde se aprecia un comportamiento anormal en la TEER de la monocapa debido a estos fallos.

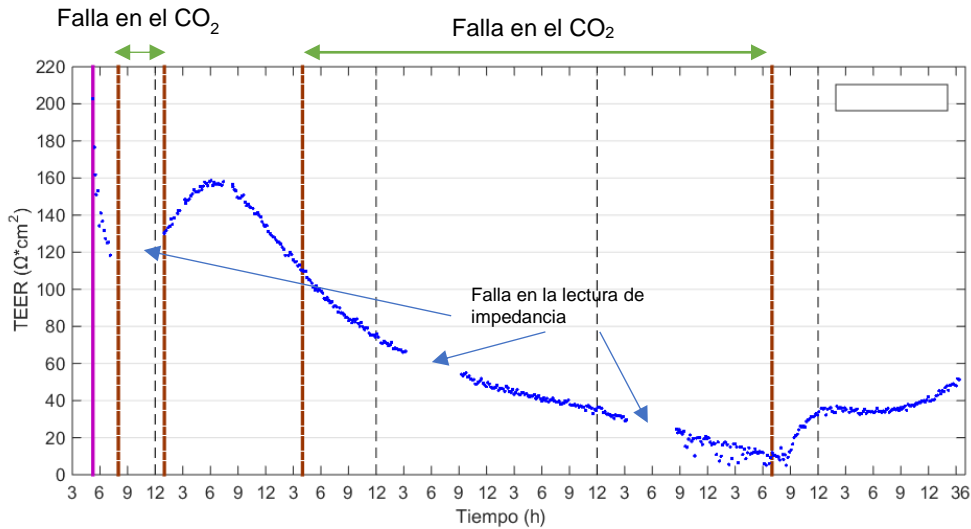


Fig. 4.19. Monitoreo de la TEER con modificaciones en el CO₂.

4.2. Pruebas y resultados para evaluar efectos de la aplicación del campo magnético en cultivos celulares.

Aquí se expondrán las pruebas y los resultados de los diferentes parámetros que se utilizaron para evaluar la aplicación del campo magnético en las monocapas celulares.

4.2.1. Medición de Impedancia eléctrica

Como primer parámetro se planteó medir la impedancia eléctrica y obtener la TEEI de las monocapas celulares al aplicarse una radiación magnética. Se realizaron pruebas en donde se tuvieron 2 poblaciones de cultivos celulares: controles y tratados.

4.2.1.1 Medición de impedancia eléctrica transepitelial en cultivos celulares expuestos a campo magnético de 10 G @ 60 Hz.

Las monocapas celulares se llevaron a confluencia y a partir de ahí se consideran estables y se les aplicó campo magnético de 10 G con una frecuencia de 60 Hz durante 60 min cada 4 h.

Se realizaron mediciones de impedancia eléctrica transepitelial antes y después del tratamiento para comparar posibles diferencias de TEER y de capacitancia C_{cl} , como resultado de la aplicación del campo magnético a las monocapas celulares. Los resultados del experimento se muestran en la TABLA 4.6 y Fig. 4.20.

TABLA 4.6. DATOS COMPARATIVOS DE TEER Y C_{cl} DE TRATAMIENTO CON CAMPO MAGNÉTICO 10 G @ 60 HZ, cada renglón corresponde a una exposición.

#Exp	Control - TEER (C_{cl})*		Diferencia (%)	Tratamiento- TEER (C_{cl})*		Diferencia (%)
	Pre	Post		Pre	Post	
1	129.71 (4.01)	134.12 (4.09)	3.41 (1.88)	159.82 (3.19)	160.12 (3.32)	0.19 (4.13)
2	128.36 (4.27)	130.69 (4.11)	1.82 (-3.83)	155.41 (3.30)	154.36 (3.38)	-0.68 (2.37)
3	128.01 (3.94)	135.28 (3.71)	5.68 (-6.02)	155.20 (3.32)	156.20 (3.32)	0.65 (-0.11)
4	139.29 (3.51)	141.29 (3.12)	1.43 (-11.08)	155.11 (3.31)	157.12 (3.15)	1.29 (-4.88)
5	147.48 (3.22)	140.43 (3.33)	-4.77 (3.58)	155.54 (3.16)	156.01 (3.10)	0.30 (-2.16)
6	146.66 (3.10)	139.58 (3.39)	-4.83 (9.31)	153.92 (3.18)	151.99 (3.23)	-1.26 (1.52)
7	139.17 (3.48)	143.26 (3.32)	2.94 (-4.64)	151.70 (3.24)	152.09 (3.23)	0.26 (-0.29)
Media	136.95 (3.65)	137.81 (3.58)	0.81 (-1.54)	155.24 (3.24)	155.41 (3.25)	0.11 (0.08)
STD	8.38 (0.43)	4.52 (0.39)	4.07 (6.85)	2.43 (0.07)	2.88 (0.10)	0.84 (2.99)

* Valores de TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) y Valores de C_{cl} ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)

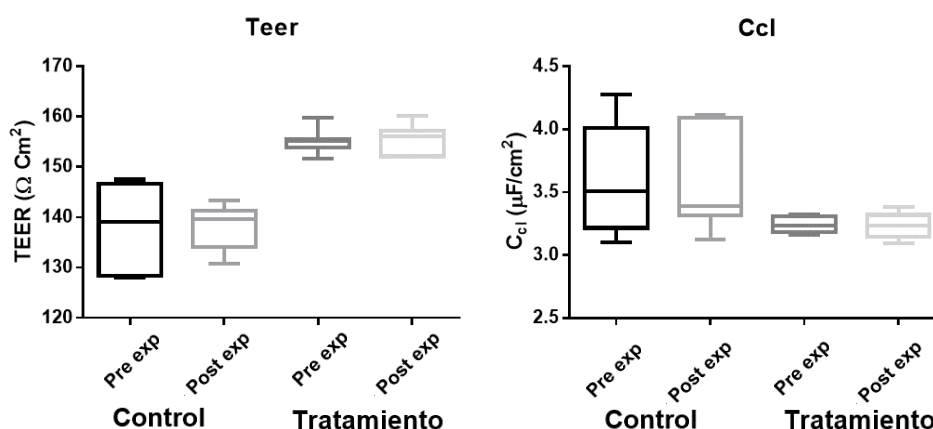


Fig. 4.20. Comparativa de parámetros de impedancia eléctrica previa y posterior al tratamiento de campo magnético con magnitud de 10 G @ 60 Hz.

Con los datos de la TABLA 4.6 se realizó un análisis de t-Student pareado para observar diferencias antes y después de la exposición. Los resultados obtenidos arrojaron valores $p = 0.7046$ en las células control y $p=0.7410$ en las tratadas, los cuales no representan diferencia estadísticamente significativa.

4.2.1.2 Medición de impedancia eléctrica transepitelial en cultivos celulares expuestos a campo magnético de 50 G @ 60 Hz.

Se decidió aumentar la densidad de flujo magnético de 10 G a 50 G manteniendo la frecuencia y repetir la experimentación. Para ello se llevaron las monocapas a confluencia y se les aplicó el tratamiento siguiendo el protocolo de experimentación de 60 min de exposición cada 4 h.

Las mediciones de la impedancia eléctrica se realizaron antes y después del tratamiento para comparar valores y evaluar la significancia de las diferencias por la aplicación de estímulos magnéticos.

Los datos que se introdujeron al programa *GraphPad Prism* fueron las medias de los valores de TEER y C_{cl} previos y posteriores al tiempo de tratamiento, tanto para las células control como para las tratadas. Utilizando los datos de la TABLA 4.7. se realizó un análisis de t-Student pareado asumiendo que los datos tienen una distribución normal, dando como resultado valores $p = 0.266$ en las células control y $p=0.6382$ en las tratadas, los cuales no representan una diferencia estadísticamente significativa.

TABLA 4.7. DATOS COMPARATIVOS DE TEER Y C_{cl} DE TRATAMIENTO CON CAMPO MAGNÉTICO 50 G @ 60 HZ, cada renglón corresponde a una exposición.

#Exp	Control - TEER (C_{cl})*		Diferencia		Tratamiento- TEER (C_{cl})*		Diferencia	
	Pre	Post	(%)		Pre	Post	(%)	
1	176.28 (1.63)	177.52 (1.61)	-0.70	(0.81)	179.57 (1.43)	177.27 (1.40)	1.27	(2.54)
2	179.99 (1.60)	185.04 (1.56)	-2.80	(2.37)	178.57 (1.40)	180.23 (1.38)	-0.92	(1.17)
3	178.38 (1.50)	178.14 (1.47)	0.13	(1.85)	183.97 (1.37)	184.30 (1.36)	-0.18	(0.55)
4	183.00 (1.39)	181.99 (1.41)	0.54	(-1.17)	183.46 (1.32)	183.81 (1.32)	-0.19	(-0.02)
5	188.20 (1.32)	189.86 (1.30)	-0.88	(1.67)	187.57 (1.30)	189.84 (1.27)	-1.21	(2.14)
6	193.35 (1.26)	192.03 (1.27)	0.68	(-0.50)	188.44 (1.30)	188.26 (1.28)	0.098	(1.21)
Media	186.20 (1.45)	184.10 (1.44)	-0.51	(0.84)	183.60 (1.35)	183.95 (1.34)	-0.19	(1.27)
STD	6.47 (0.15)	6.00 (0.14)	1.29	(1.41)	4.02 (0.06)	4.73 (0.05)	0.87	(0.96)

* Valores de TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) y Valores de C_{cl} ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)

La Fig. 4.21 muestra una comparativa de los parámetros de TEEI antes y después del tratamiento.

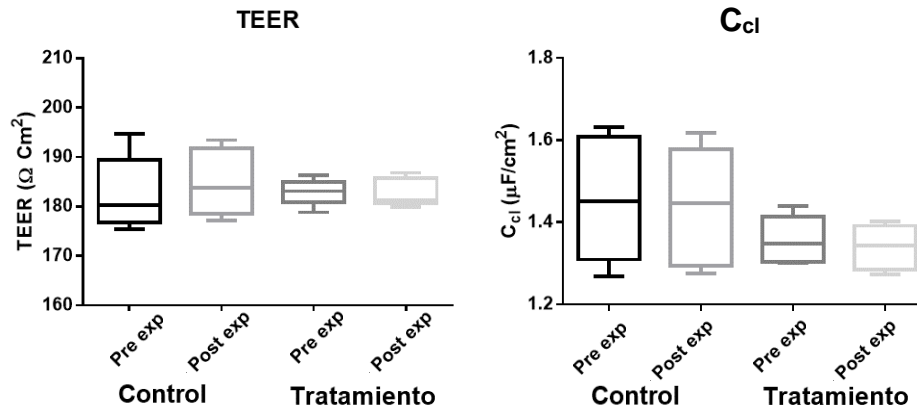


Fig. 4.21. Comparativa de parámetros de impedancia previa y posterior al tratamiento de campo magnético con magnitud de 50 G @ 60 Hz.

4.2.2. Cierre de herida

El ensayo de cierre de herida se utilizó para medir el porcentaje de cierre de la monocapa celular al realizársele una lesión en donde se desprenden células de la caja Petri. Se repitió el experimento 8 veces en las células control y 10 veces las tratadas. El procedimiento del experimento de cierre de herida se muestra en anexo 7.5.

El porcentaje de confluencia de las células se obtuvo utilizando las imágenes binarizadas, contando el número de píxeles blancos (áreas A y B de la Fig. 4.22) y mediante (15).

$$\% \text{ confluencia} = \frac{(A - B) * 100\%}{A} \quad (15)$$

En la ecuación (15), A y B son las cantidades de píxeles blancos de la abertura de la herida, inicial (t_0) y después de un tiempo x (t_x) respectivamente (Fig. 4.22).

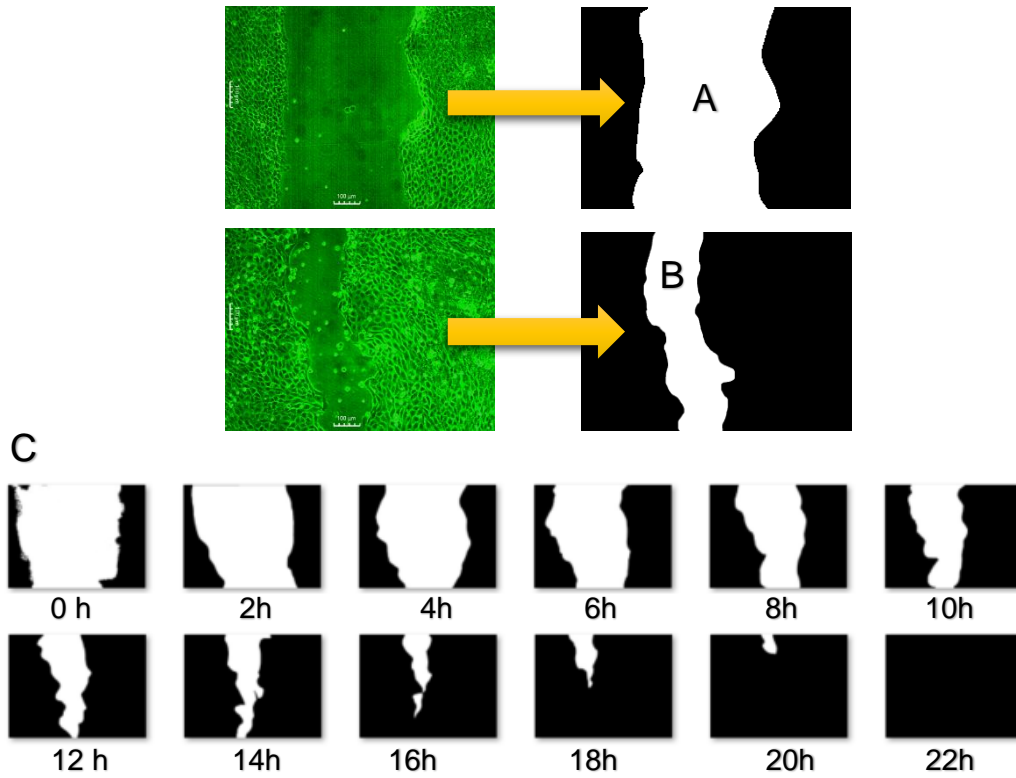


Fig. 4.22. Heridas captadas con microscopio, A, B) imágenes binarizadas para calcular el porcentaje de superficie cubierta por células, C) secuencia de evolución del cierre de la herida a lo largo del tiempo.

La Fig. 4.23 muestra las comparativas del porcentaje de confluencia de las células control y las tratadas.

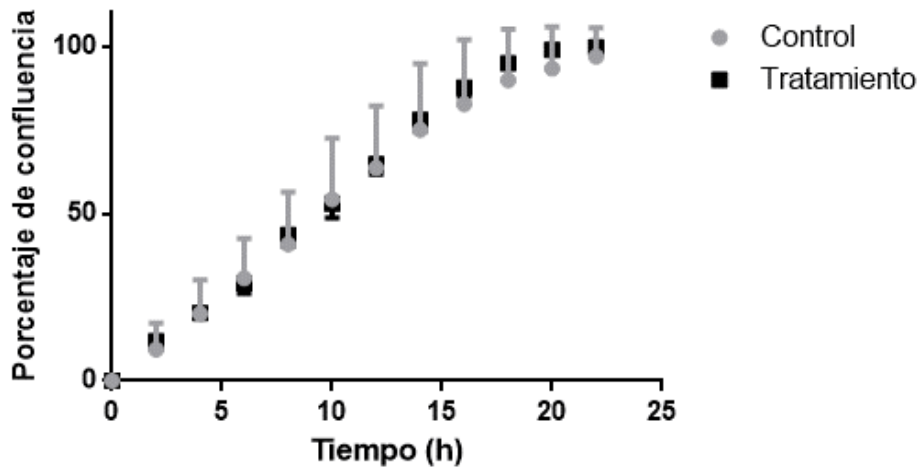


Fig. 4.23. Porcentaje de confluencia de la herida a través del tiempo.

Mediante una conversión de píxeles y distancia (mm) se puede calcular el área de la herida y la velocidad de cierre de herida. La Fig. 4.24 muestra la evolución del área de la herida a través del tiempo.

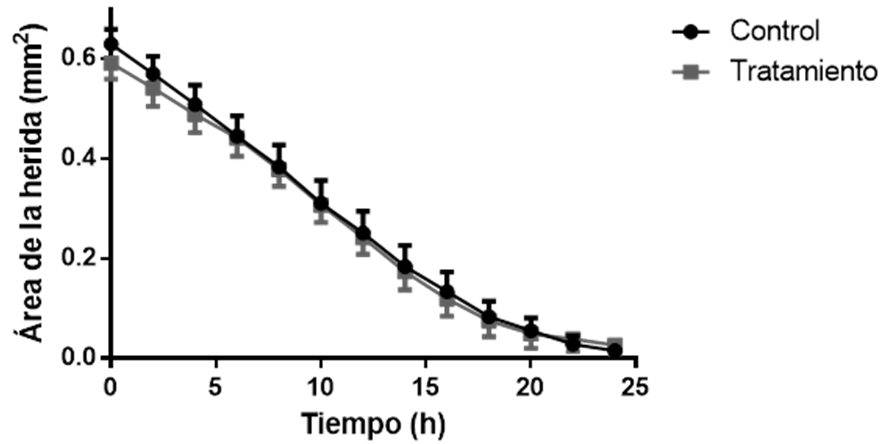


Fig. 4.24. Evolución del área de superficie de la herida.

La Fig. 4.25 muestra la tendencia de la velocidad de confluencia. En la imagen se aprecia una mayor velocidad de cierre de la herida en las primeras horas del experimento.

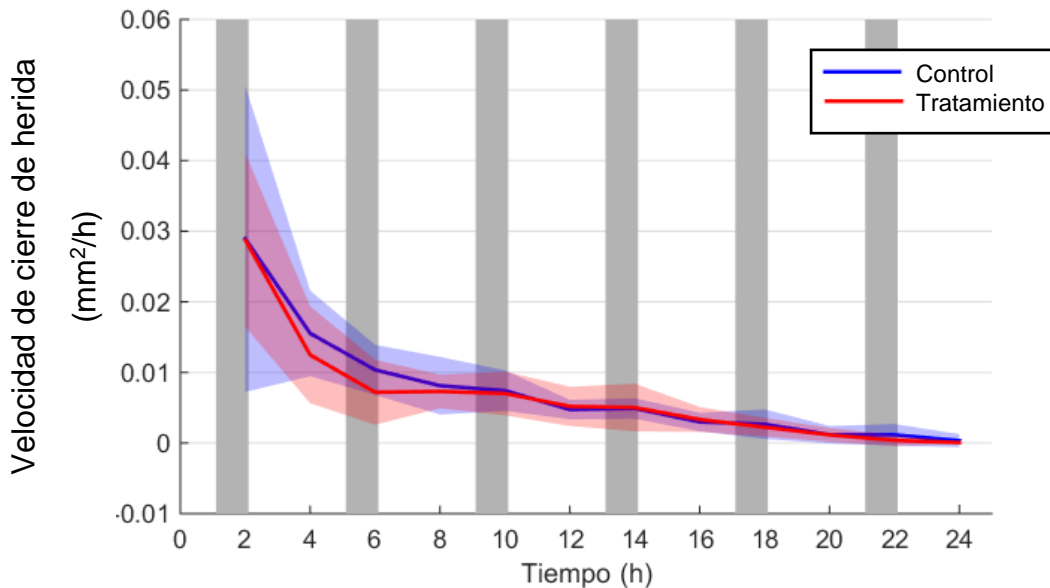


Fig. 4.25. Velocidad de cierre de la herida.

4.2.3. Inmunofluorescencia

Mediante la técnica de inmunofluorescencia se hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para determinar la presencia de las proteínas CLDN1 y ZO-1 (*goat anti-rabbit*) y para observar los núcleos celulares se utilizó DAPI como marcador fluorescente, el cual permite identificar la presencia de células en el cultivo.

Inicialmente las imágenes del confocal se obtienen en cortes ópticos transversales de las monocapas celulares (Fig. 4.26a). Después se toma la proyección máxima sumando las intensidades de pixeles de cada una de las imágenes de los cortes ópticos (Fig. 4.26b). Por último, se analizan por fluorescencia (núcleos y uniones estrechas) (Fig. 4.26c, Fig. 4.26d).

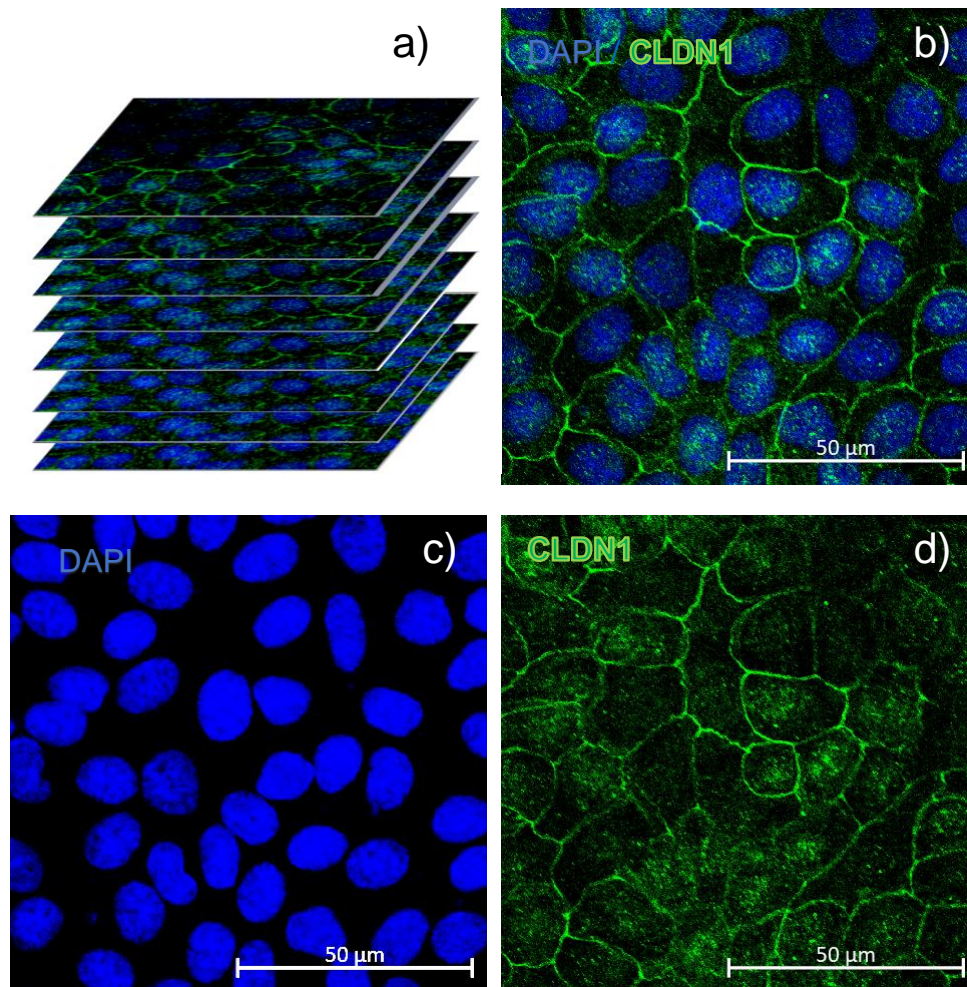


Fig. 4.26. Inmunofluorescencia a) Cortes transversales, b) proyección máxima, C) Núcleos celulares, d) Proteína de la unión estrecha.

4.2.3.1 Evaluación de los núcleos celulares

Para obtener una estimación de cuantas células se encuentran en el cultivo, se requiere contar el número de ellas por unidad de área. Se sabe que existe una coincidencia entre el número de núcleos celulares y el número de células, asumiendo que existe un núcleo por célula. Por ello, se pueden contar los núcleos por imagen, mediante Matlab, considerando sus propiedades de tamaño y forma. El programa desarrollado en MATLAB para análisis de los núcleos celulares se encuentra en el anexo 4.

En la Fig. 4.27a se observan los núcleos marcados con DAPI binarizados para analizarlos mediante Matlab. La Fig. 4.27b muestra los núcleos catalogados por tamaño de área. En la Fig. 4.27c y Fig. 4.27d se muestran los histogramas de forma (circularidad) y áreas de los núcleos respectivamente.

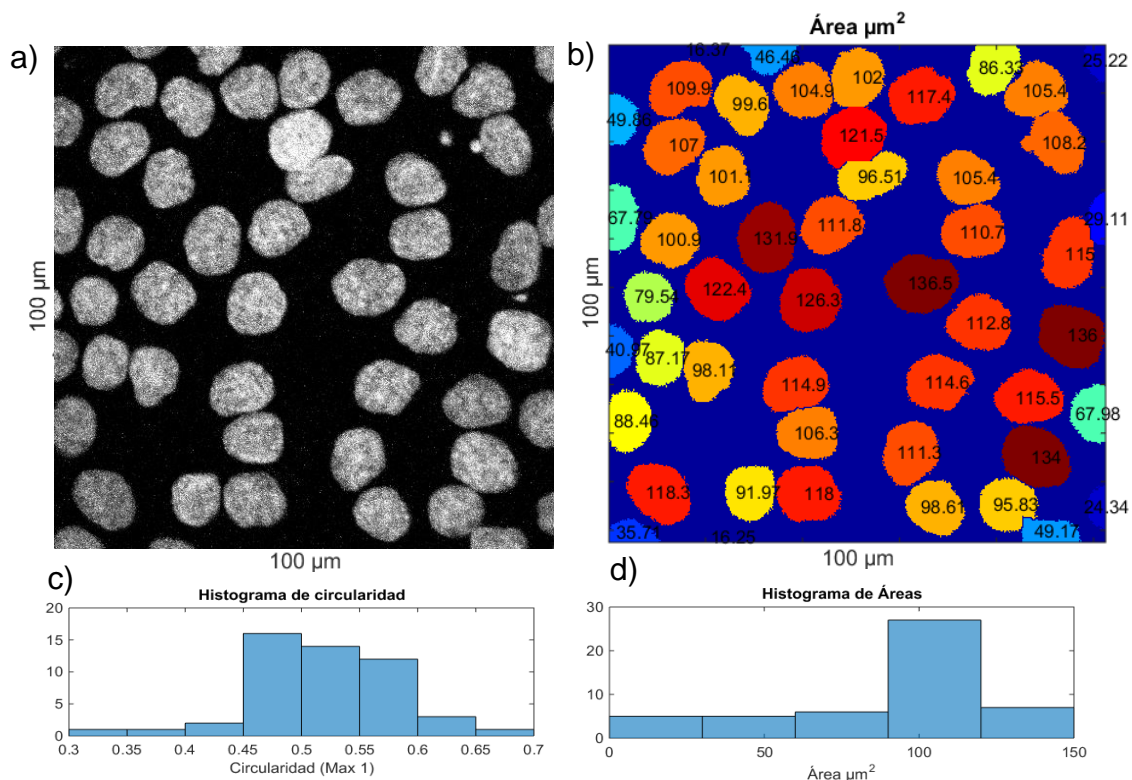


Fig. 4.27. a) Binarización de los núcleos celulares, b) Área de cada uno de los núcleos celulares, c) Histograma de circularidad de los núcleos celulares, d) Histograma del área de los núcleos celulares.

Se realizaron las respectivas comparaciones en cantidades celulares en cada una de las etapas del experimento y la densidad celular se muestra en la Fig. 4.28.

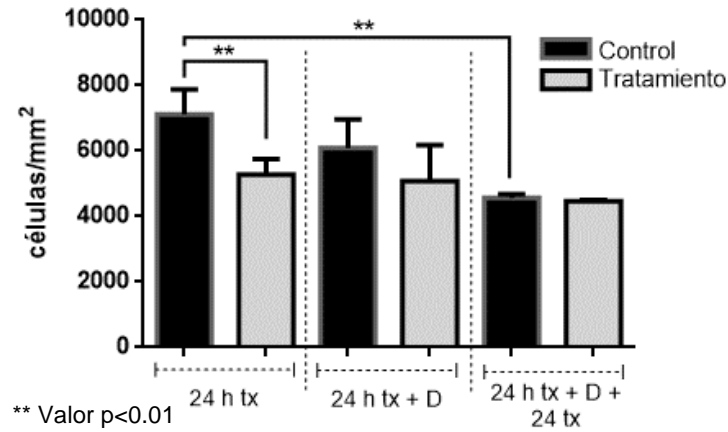


Fig. 4.28. Gráfica comparativa de densidad de células en cada etapa del experimento.

De igual forma la Fig. 4.29 exhibe los resultados de área y forma de los núcleos celulares.

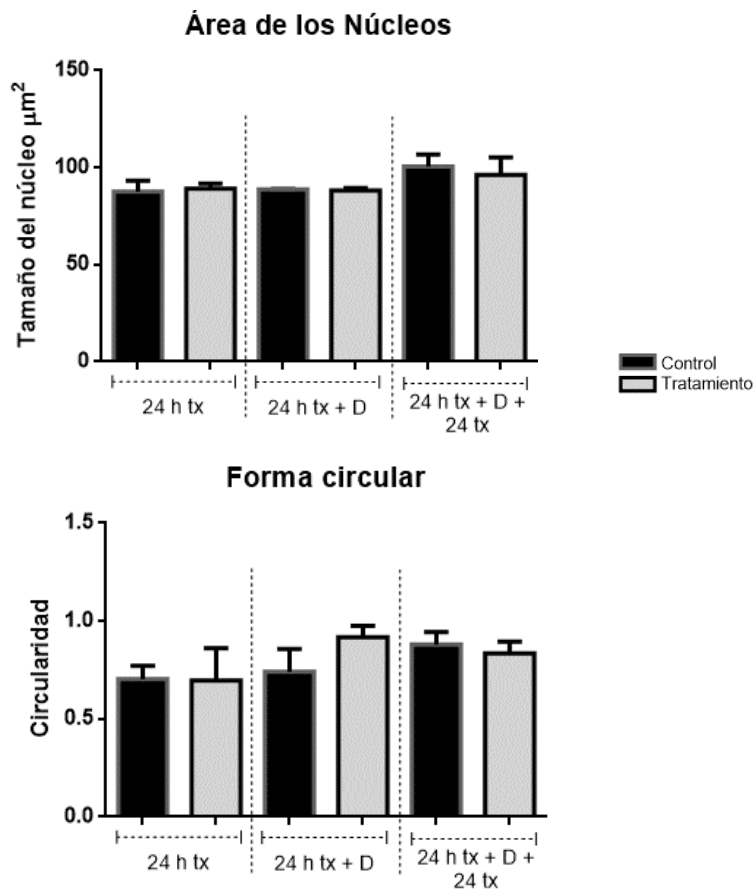


Fig. 4.29. Gráfica comparativa de Área y forma circular de los núcleos celulares.

4.2.3.2 Evaluación en la intensidad de fluorescencias de CLDN1 y ZO-1

La cantidad de proteínas es directamente proporcional con la fluorescencia, por lo que, al obtener las imágenes de inmunofluorescencia en las mismas condiciones, las cantidades de píxeles marcados con el color correspondiente al anticuerpo nos genera una estimación de la presencia de la proteína marcada. La manera en que se compararon los niveles de proteína de la unión estrecha en control y tratamiento fue utilizando el histograma de colores.

Los resultados de la comparativa en el primer experimento donde se relaciona el color verde con los niveles de CLDN1 se aprecian en la Fig. 4.30.

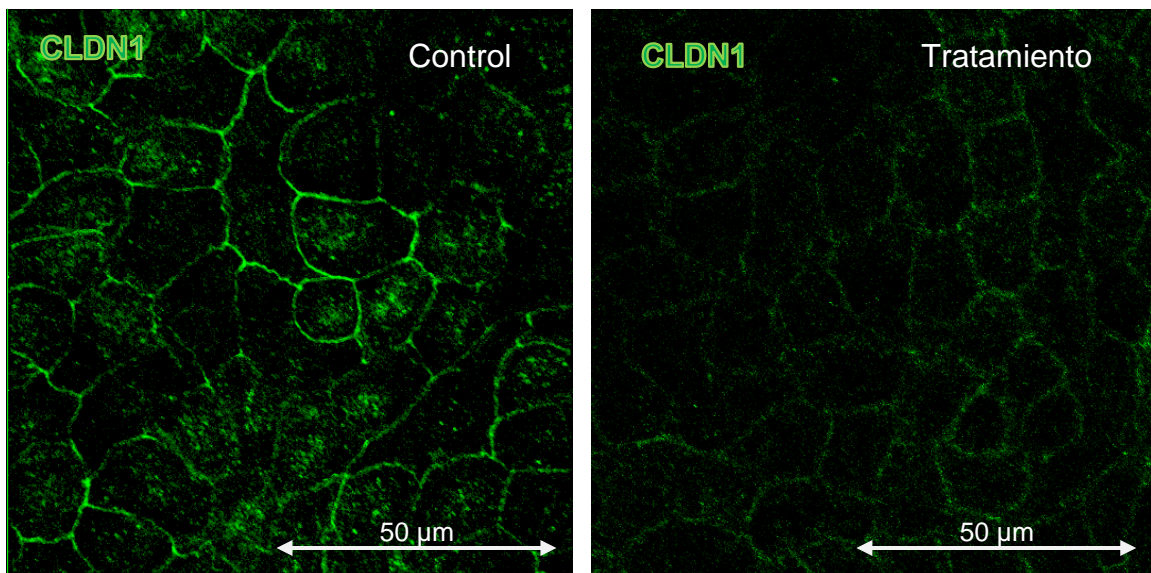


Fig. 4.30. Comparativa de las proyecciones máximas del fluorocromo asociado con la presencia de CLDN1 50G @60Hz.

La Fig. 4.31 muestra la diferencia en el promedio de la intensidad de los píxeles que representan la presencia de CLDN1, utilizando el histograma proporcionado por el software de visualización de las imágenes del microscopio confocal.

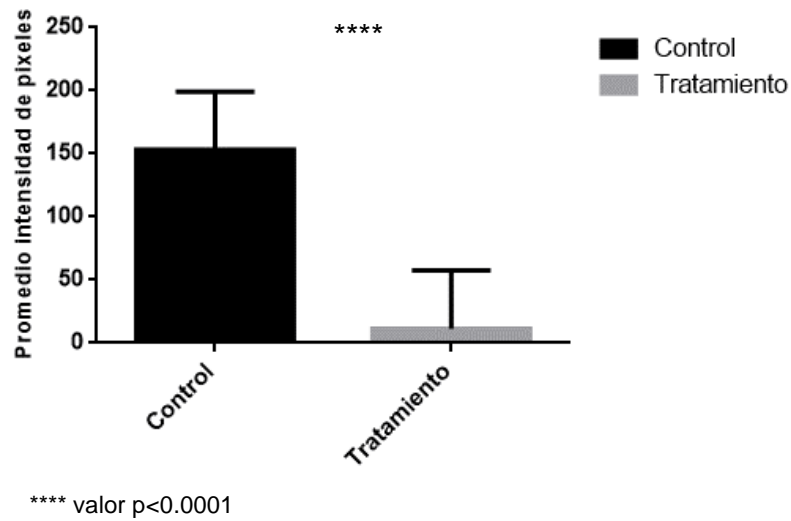


Fig. 4.31. Comparativa del promedio de intensidad de pixeles relacionados con la presencia de CLDN1 50G @60Hz.

De manera similar se analizaron las imágenes de inmunofluorescencia de la proteína de la unión estrecha ZO-1 al aplicar tratamiento con campo magnético con amplitud de 50 G @ 60 Hz. Se realizó el experimento de acuerdo con lo establecido en la Fig. 3.25.

Las imágenes de las inmunofluorescencias se aprecian en la Fig. 4.32– Fig. 4.34

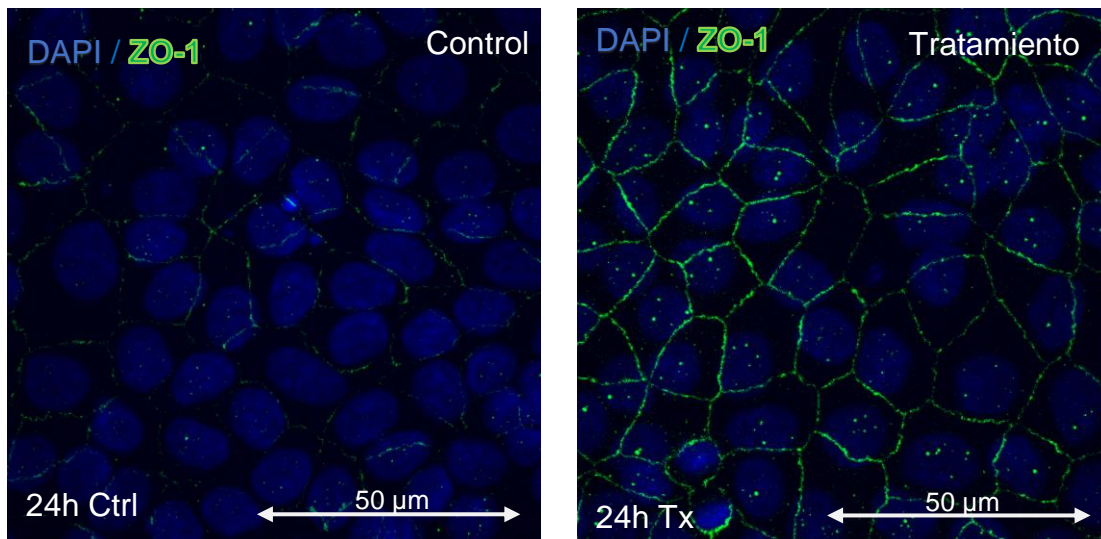


Fig. 4.32. Inmunofluorescencia de control y tratamiento en las primeras 24 h de exposición a campo magnético 50G @60Hz.

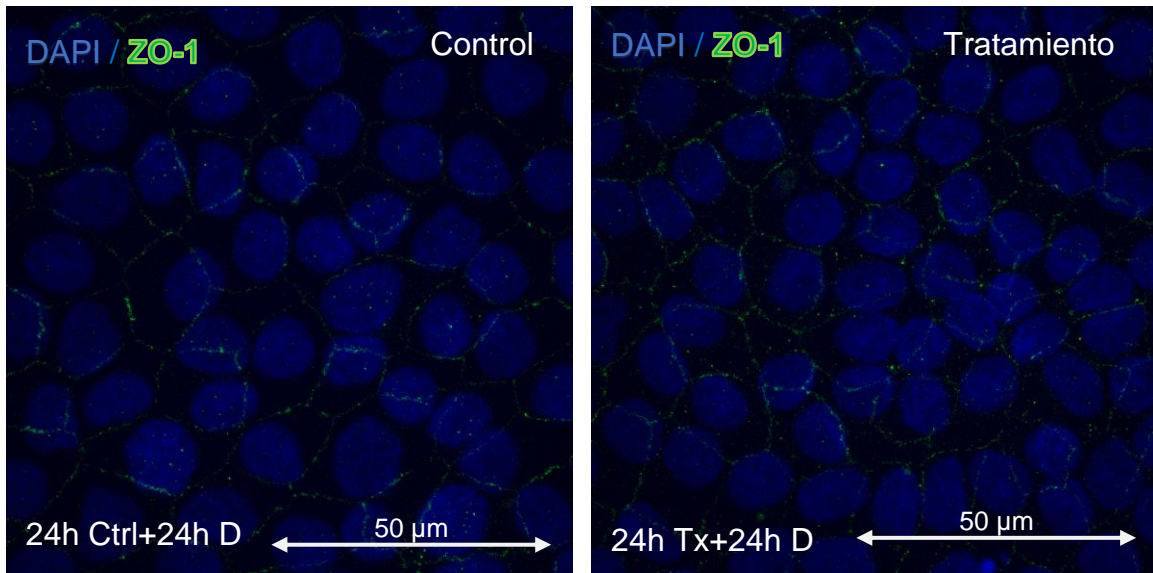


Fig. 4.33. Inmunofluorescencia de control y tratamiento a las 48 h de exposición a campo magnético (24 h de exposición + 24 h de descanso) 50G @60Hz.

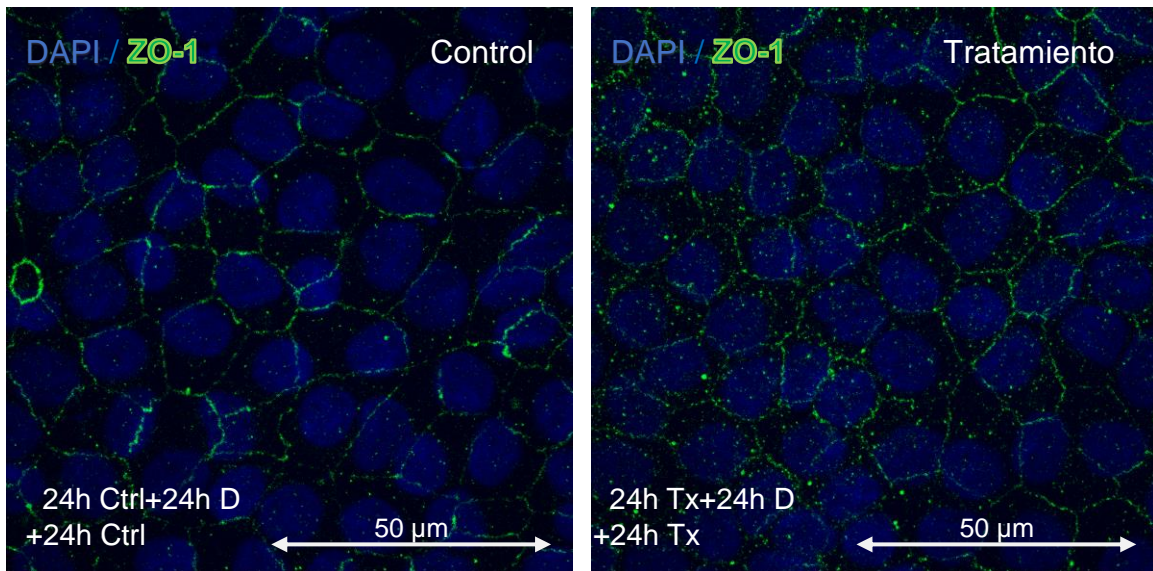


Fig. 4.34. Inmunofluorescencia de control y tratamiento a las 72 h de exposición a campo magnético (24 h de exposición + 24 h de descanso + 24 h de tratamiento) 50G @60Hz.

Se obtuvieron resultados utilizando el histograma de la inmunofluorescencia para ZO-1 y se muestran en la Fig. 4.35.

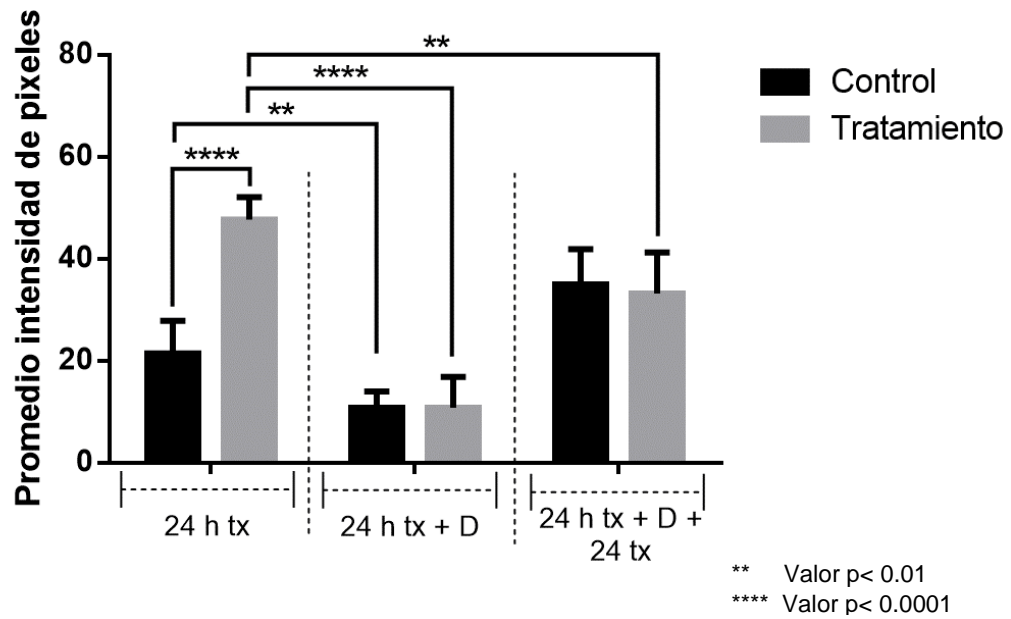


Fig. 4.35. Gráfica comparativa del promedio de intensidad de pixeles relacionados con la presencia de ZO-1 50G @60 Hz.

CAPÍTULO 5. DISCUSIONES

5.1. Ambiente controlado

En el trabajo experimental con cultivos celulares resulta de fundamental importancia cuidar que los protocolos existentes para su desarrollo y manejo sean estrictamente atendidos. Se conoce que las células son sensibles a la luz, temperatura, pH, humedad y elementos nutricionales, entre otros factores. Se conoce también que la experimentación incorpora estructuras control que sirven de referencia para el análisis estadístico de los resultados, considerando que al estar en condiciones similares el control y el tratamiento, los efectos por la variabilidad en ellas puedan ser los mismos. En este trabajo se desarrolló una infraestructura, en donde se lograron fijar los parámetros de humedad, temperatura y %CO₂, estrictamente utilizados en los experimentos con cultivos celulares. El sistema desarrollado funcionó satisfactoriamente en este proyecto y permitirá dar continuidad o ampliar la experimentación *in situ*, ya que forma parte de la infraestructura del área biológica del Cinvestav.

5.2. Generador de campo magnético

Se diseñó, simuló y construyó un generador de campo magnético variable en densidad de flujo magnético y frecuencia. Mediante las pruebas de simulación y mediciones directas con el prototipo físico, se observó que el generador es capaz de proporcionar campo magnético uniforme en un volumen de trabajo determinado para albergar 4 filtros permeables con células en su interior. El generador resultó adecuado para realizar la experimentación con campos magnéticos, debido a su tamaño, materiales de elaboración y condiciones para efectuar asepsia mediante radiación UV para la esterilización de la superficie del generador y así evitar contaminación dentro de la incubadora.

Mediante las pruebas de larga duración se logró observar durante 60 min un aumento de 0.4°C en la zona de trabajo. Este cambio de la temperatura se encuentra dentro de los rangos permisibles y seguros para los cultivos celulares, además de comprobar la estabilidad del generador de campo magnético, como se reporta en la sección 4.1.1.3.

5.3. Medidor de impedancia eléctrica transepitelial

Se diseñó y construyó un sistema para la medición de impedancia eléctrica transepitelial. Las cámaras para la medición de impedancia eléctrica se elaboraron con materiales biocompatibles y apropiados para su esterilización.

Se comparó el sistema de medición de impedancia eléctrica desarrollado para validación con el sistema comercial CellZscope utilizado como referencia. Los resultados no mostraron diferencias significativas, lo cual sugiere una equivalencia entre los dos dispositivos. Además, se observó similitud en los resultados arrojados por el algoritmo de aproximación de parámetros del modelo eléctrico de la monocapa celular y los datos obtenidos con el algoritmo de sistema comercial.

Se dio seguimiento de la TEER a lo largo del tiempo de maduración de la monocapa para observar su grado de confluencia, confirmando la información de la literatura. Mediante este seguimiento se observó una disminución significativa de la TEER tras realizarse el cambio de medio, recuperándose en aproximadamente 10 h. Es importante destacar que cualquier variación en el ambiente puede llegar a afectar significativamente las mediciones de impedancia eléctrica, es por ello que mantener un ambiente controlado es fundamental en los experimentos.

5.4. Técnicas propuestas para la evaluación de la integridad de la monocapa celular ante la exposición a los campos magnéticos pulsados

5.4.1. Impedancia eléctrica transepitelial

Se planteó como parámetro inicial la impedancia eléctrica transepitelial de las monocapas celulares, la cual incluye obtención de la TEER y C_{cl} por su relación directa con la integridad de la monocapa celular. El no haber obtenido información significativa sobre los efectos en los valores de la impedancia eléctrica transepitelial por la aplicación de campos magnéticos pulsados de 10 y 50G @60Hz en monocapas celulares confluentes, no significa que no exista efecto en las células bajo estas condiciones.

5.4.2. Cierre de la herida

Se decidió utilizar la técnica del ensayo de cierre de herida debido a los reportes que sugieren regeneración de tejido óseo ante la exposición de campos magnéticos [102], [103]. Mediante la observación de la migración celular (velocidad de cierre de la herida) y la confluencia (porcentaje de cierre de herida) de la monocapa celular no se observaron diferencias significativas entre las células control y las expuestas a campos magnético con densidad de flujo de 50 G @ 60 Hz. Los resultados obtenidos de la evolución del área de la herida a través del tiempo se comportan de manera similar a la reportada por Zahm et al. en 1997, utilizando células epiteliales del sistema respiratorio humano y realizando una herida circular de área cercana a los 30 mm² [104].

Se realizó la herida de las monocapas celulares manualmente usando una punta de pipeta por su relación costo-beneficio. A pesar que se han reportado otras técnicas más automatizadas y precisas de realizar las heridas [105], los resultados obtenidos fueron similares a los de la literatura.

5.4.2.1 Inhibición por contacto.

Las células normales en cultivo muestran un fenómeno conocido como inhibición por contacto. Este consiste en que al ser sembradas en condiciones adecuadas las células crecen y proliferan hasta llenar el espacio del cual disponen, es decir, la superficie de la caja de Petri.

En la serie experimental se midió la capacidad de la monocapa para alcanzar a cubrir la superficie de la caja, en la cual se levantaron las células al practicar la herida. Se encontró que la capacidad para cubrir esa superficie fue similar en los cultivos controles y en los expuestos a campos magnéticos.

Se observó además que una vez cubierta la superficie carente de células, éstas dejaron de crecer. Este fenómeno también está relacionado con la inhibición por contacto y es un resultado importante de esta tesis. La inhibición por contacto se pierde en células tumorales y se ha sugerido que la exposición a campos magnéticos puede inducir crecimientos celulares tumorales.

Los resultados aquí mostrados sugieren que la exposición a campos magnéticos, bajo condiciones controladas, no indujo crecimientos anormales de las monocapas, ni pérdida de la inhibición por contacto.

5.4.3. Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia permite obtener resultados cualitativos y cuantitativos mostrados en imágenes de las proteínas deseadas. Se decidió obtener imágenes de las proteínas de la unión estrecha (CLDN1 y ZO-1), así como de los núcleos, para observar de manera objetiva la estructura celular al estar bajo tratamiento de campo magnético con densidad de flujo de 50 G @ 60 Hz en periodos de exposición de 60 min cada 4 h.

Se observaron diferencias significativas en la fluorescencia correspondiente a las proteínas de las uniones estrechas durante las primeras 24 h. Para el caso de C 1, la expresión de esta proteína resultó en un decremento mayor al 90% mientras que en la expresión de ZO-1 se tuvo un incremento mayor al 120%. Sin embargo, a las 48 h (24 h de descanso) y 72 h no se observan diferencias significativas en la expresión de ZO-1 en células control y tratamiento.

Por otro lado, se utilizaron las imágenes de inmunofluorescencia con el marcador fluorescente relacionado a los núcleos celulares de manera que se observaran los efectos de la presencia del campo magnético en los 3 parámetros propuestos (Densidad de células, área y forma). El parámetro de densidad celular se obtuvo mediante el conteo automático celular utilizando los núcleos celulares, asumiendo que cada célula posee un solo núcleo. Los resultados de este análisis arrojaron disminución significativa en la población tratada las primeras 24 horas, haciéndose menor la diferencia con el tiempo hasta llegar a la similitud entre tratamiento y control. En cuanto a los otros 2 parámetros, tanto el área como la forma de los núcleos no presentaron diferencia estadísticamente significativa en las células control y tratadas.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones y aportaciones de este proyecto inciden principalmente en 2 áreas del conocimiento; las contribuciones en el área tecnológica-bioelectrónica y en el ámbito biológico.

En cuanto al área tecnológica-bioelectrónica se desarrollaron 2 dispositivos, los cuales formarán parte de la infraestructura requerida para la realización de estudios específicos en células y tejidos expuestos o estimulados a campos magnéticos, así como la infraestructura para mantener un ambiente controlado que permita el sano crecimiento celular. Con este resultado se da cumplimiento a los objetivos planteados.

El primer dispositivo desarrollado, el generador de campo magnético, permite la ejecución de experimentos in situ con la seguridad de contar con un campo uniforme en la zona de trabajo, además de hacer posible la experimentación in situ con la aplicación de campo magnético variable en intensidad y frecuencia en un ambiente controlado.

El segundo dispositivo desarrollado para este trabajo, el medidor de impedancia eléctrica para tejidos epiteliales permite la experimentación con cultivos celulares proporcionando mediciones similares a los equipos comerciales con la ventaja de ser más barato, de fácil montaje y con software escalable.

Por sus características técnicas, la infraestructura desarrollada sirvió para cubrir el objetivo general de este proyecto de manera confiable y representa una plataforma real y útil para futuras investigaciones en el área médico-biológica.

La segunda área del conocimiento en la que este desarrollo tecnológico permitió avances considerables fue en el ámbito biológico. Durante el desarrollo del proyecto y gracias a las condiciones controladas para la medición de cambios en los parámetros biológicos de cultivos de células epiteliales, tales como: la impedancia eléctrica transepitelial, la migración celular, se logró observar alteraciones mínimas en dichas mediciones debidas a artefactos experimentales.

En cuanto a la evaluación de la presencia de las proteínas de la unión estrecha mediante inmunofluorescencia, así como la densidad celular, tamaño y forma de los núcleos celulares, se observaron diferencias significativas en la fluorescencia correspondiente a las proteínas presentes en los canales de las uniones estrechas durante las primeras veinticuatro horas; no así en la evaluación de cantidad de núcleos, forma y área. Este hallazgo indica una posible alteración en los

procesos que se desarrollan en las uniones estrechas, bajo las condiciones de estimulación del campo magnético establecidas en el protocolo.

Los resultados obtenidos sugieren una ampliación del número de opciones en los valores de los parámetros del campo magnético. En el caso de los resultados de transporte en las uniones estrechas, plantean una continuidad y ampliación de los experimentos para obtener más información en esta línea.

Una característica relevante del proyecto es que logró alcanzar la etapa de prototipo funcional. Esto significa que se logró hacer una integración entre los aspectos de bioingeniería y los aspectos biológicos. Dadas las limitaciones de tiempo para el desarrollo de los proyectos de tesis doctorales, es importante destacar que en este proyecto se lograron ambas metas, la de bioingeniería con el desarrollo del prototipo y la de estudios biológicos utilizando el prototipo desarrollado, dejando las bases para futuros estudios en la línea de investigación.

CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones de los estudios presentados en esta tesis doctoral, las perspectivas y trabajos futuros se orientan en varias direcciones.

En un primer plano estaría, la realización de experimentos utilizando el generador de campo magnético desarrollado, para estimular mediante frecuencias y densidades de flujo magnético diferentes a las utilizadas en el presente trabajo, evaluando los mismos parámetros que fueron contemplados en el protocolo experimental de esta tesis.

Sugerimos realizar tratamientos de larga duración, para lo cual se requiere diseñar un sistema de enfriamiento de las bobinas con el fin de evitar incrementos de temperatura que pueda afectar al comportamiento normal de las células.

Por otro lado, consideramos que sería interesante realizar experimentos con otro tipo de líneas celulares. En concreto, se podría estudiar el comportamiento de las células diabéticas o cancerosas para observar su comportamiento ante la radiación magnética.

De acuerdo con lo observado y la experiencia adquirida en este trabajo, se podría experimentar con las células en un estado de madurez bajo, esto, con la idea de observar si se genera una inhibición por contacto o las células siguen creciendo una vez confluyente la monocapa celular.

En cuanto al medidor de impedancia eléctrica transepitelial sugerimos mejorar su autonomía, almacenamiento y procesamiento de los datos en tiempo real. Para ello se necesitaría utilizar componentes electrónicos de uso específico para lograr un sistema embebido sin la necesidad de una computadora.

Finalmente, consideramos que sería de interés la realización de estudios utilizando algún otro parámetro medible o técnica de evaluación celular ante la experimentación con campos magnéticos, tales como la observación del ADN, expresión de otras proteínas o mediante el ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT.

REFERENCIAS

- [1] U. M. Forssen, G. Mezei, G. Nise, and M. Feychting, "Occupational magnetic field exposure among women in Stockholm County, Sweden," *Occup Env. Med*, vol. 61, no. 7, pp. 594–602, 2004.
- [2] W. Hall Campbell, *Earth magnetism: a guided tour through magnetic fields*. 2001.
- [3] V. Ottani, V. De Pasquale, P. Govoni, M. Franchi, A. Ruggeri, and P. Zaniol, "Effects of pulsed extremely-low-frequency magnetic fields on skin wounds in the rat," *Bioelectromagnetics*, vol. 9, no. 1, pp. 53–62, 1988.
- [4] H. Kotani, H. Kawaguchi, T. Shimoaka, M. Iwasaka, S. Ueno, H. Ozawa, and K. Hoshi, "Strong Static Magnetic Field Stimulates Bone Formation to a Definite Orientation In Vitro and In Vivo," vol. 17, no. 10, pp. 1814–1821, 2002.
- [5] D. A. Savitz and D. P. Loomis, "Magnetic Field Exposure in Relation to Leukemia and Brain Cancer Mortality among Electric Utility Workers," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 141, no. 2, pp. 123–134, Jan. 1995.
- [6] D. A. Savitz, E. M. John, and R. C. Kleckner, *Magnetic field exposure from electric appliances and childhood cancer*, vol. 131. 1990.
- [7] M. Feychting, "Health effects of static magnetic fields - A review of the epidemiological evidence," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 87, no. 2–3 SPEC. ISS., pp. 241–246, 2005.
- [8] S. Guide, "Radiological Protection for Medical Exposure to Ionizing Radiation," *Health Phys.*, vol. 90, no. 6, p. 597, 2006.
- [9] UNSCEAR, *UNSCEAR 2006 Report volume I. Effects of ionizing radiation*, vol. I. 2006.
- [10] "OMS | Normas y directrices," *WHO*, 2016.
- [11] International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, "Guidelines for limiting exposure to time-varying electric and magnetic fields (1 Hz to 100 kHz).," *Health Phys.*, vol. 99, no. 6, pp. 818–36, 2009.
- [12] M. Feychting, U. Forssen, and B. Floderus, "Occupational and residential

magnetic field exposure and leukemia and central nervous system tumors,” *Epidemiology*, vol. 8, no. 4, pp. 384–389, 1997.

[13] D. A. Savitz, W. Ha, F. Barnes, E. M. John, and J. G. Tvrdik, *Case-Control Study of Childhood Cancer and Exposure to 60-Hz Magnetic Fields*, vol. 128. 1988.

[14] International Agency for Research on Cancer, *International Agency for Research on Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans*, vol. 96. 2002.

[15] L. Kheifets, A. Ahlbom, C. M. Crespi, G. Draper, J. Hagihara, R. M. Lowenthal, G. Mezei, S. Oksuzyan, J. Schüz, J. Swanson, A. Tittarelli, M. Vinceti, and V. Wunsch Filho, “Pooled analysis of recent studies on magnetic fields and childhood leukaemia,” *Br. J. Cancer*, vol. 103, no. 7, pp. 1128–1135, 2010.

[16] M. Carlberg, *Case-Control Study on Occupational Exposure to Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields and the Association with Meningioma*, vol. 2018, no. February. 2018.

[17] J. I. Jacobson, R. Gorman, W. S. Yamanashi, B. B. Saxena, and L. Clayton, “Low-amplitude, extremely low frequency magnetic fields for they treatment of osteoarthritic knees: A double-blind clinical study.,” *Altern. Ther. Heal. Med.*, vol. 7, no. 5, 2001.

[18] A. H. De Paz, M. G. Deben, and A. Q. Ceballos, “Acción del campo magnético de baja frecuencia en la cicatrización de la piel,” *Rev. Cuba. Investig. Biomed.*, vol. 20, no. 3, pp. 178–183, 2001.

[19] P. V Torres-Duran, A. Ferreira-Hermosillo, M. a Juarez-Oropeza, D. Elias-Viñas, and L. Verdugo-Diaz, “Effects of whole body exposure to extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) on serum and liver lipid levels, in the rat.,” *Lipids Health Dis.*, vol. 6, p. 31, 2007.

[20] M. Vázquez-García, D. Elías-Viñas, G. Reyes-Guerrero, A. Domínguez-González, L. Verdugo-Díaz, and R. Guevara-Guzmán, “Exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields improves social recognition in male rats,” *Physiol. Behav.*, vol. 82, no. 4, pp. 685–690, 2004.

[21] H. Lai and N. P. Singh, “Magnetic field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 112, no. 6, pp. 687–694, 2004.

- [22] C. Torres, J. E. Díaz, and P. A. Cabal, "Efecto de campos magnéticos en la germinación de semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.)," *Agron. Colomb.*, vol. 26, no. 2, pp. 177–185, 2008.
- [23] Invitrogen, "Cell Culture Basics Handbook," *ThermoFisher Sci. Inc.*, pp. 1–61, 2010.
- [24] J. M. Walker, *Epithelial Cell Culture Protocols*. 2002.
- [25] C. Fanelli, S. Coppola, R. Barone, C. Colussi, G. Gualandi, P. Volpe, and L. Ghibelli, "Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx," *FASEB J.*, vol. 13, no. 1, pp. 95–102, 1999.
- [26] I. S. Jung, H. J. Kim, R. Noh, S. C. Kim, and C. W. Kim, "Effects of extremely low frequency magnetic fieldson NGF induced neuronal differentiation of PC12 cells," *Bioelectromagnetics*, vol. 35, no. 7, pp. 459–469, 2014.
- [27] F. Focke, D. Schuermann, N. Kuster, and P. Schär, "DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure.," *Mutat. Res.*, vol. 683, no. November 2015, pp. 74–83, 2010.
- [28] R. J. Parker and R. J. Studders, *Permanent magnets and their application*. Wiley, 1962.
- [29] R. K. Adair, "Constraints on biological effects of weak extremely-low-frequency electromagnetic fields," *Phys. Rev. A*, vol. 43, no. 2, pp. 1039–1048, 1991.
- [30] D. Cvetkovic and I. Cosic, "Modelling and design of extremely low frequency uniform magnetic field exposure apparatus for in vivo bioelectromagnetic studies," *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. - Proc.*, no. 7, pp. 1675–1678, 2007.
- [31] J. L. Kirschvink, "Uniform Magnetic-Fields and Double-Wrapped Coil Systems - Improved Techniques for the Design of Bioelectromagnetic Experiments," *Bioelectromagnetics*, vol. 13, no. 5. pp. 401–411, 1992.
- [32] S. M. Rubens, "Cube-Surface Coil for Producing a Uniform Magnetic Field," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 16, no. 9, pp. 243–245, Sep. 1945.
- [33] R. Merritt, C. Purcell, and G. Stroink, "Uniform magnetic field produced by three, four, and five square coils," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 54, no. 7, pp. 879–882, 1983.
- [34] I. Scollar, "Square cross section coils for the production of d o r m magnetic

fields,” vol. i, 1967.

[35] G. E. Lee-Whiting, “UNIFORM MAGNETIC FIELDS,” Canada, 1957.

[36] R. Deseze, A. Lahitte, J. M. Moreau, and B. Veyret, “Generation of Extremely-Low-Frequency Magnetic-Fields with Standard Available Commercial Equipment - Implications for Experimental Bioelectromagnetics Work,” *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 35, no. 1–2, pp. 127–131, 1994.

[37] N. k. Wills, L. Reuss, and S. A. Lewis, *Epithelial Transport: A Guide to Methods and Experimental Analysis*, 1st editio. London: Chapman & Hall, 1996.

[38] G. Pocock, C. D. Richards, and D. A. Richards, *Human Physiology*. Oxford University Press, 2018.

[39] B. R. Silverthorn, D. U., Ober, W. C., Garrison, C. W., Silverthorn, A. C., & Johnson, “Fisiología humana: Un enfoque integrado,” *Fisiología humana: Un enfoque integrado (4a. ed.)*. pp. 558–609, 2008.

[40] C. Royer and X. Lu, “Epithelial cell polarity: A major gatekeeper against cancer,” *Cell Death Differ.*, vol. 18, no. 9, pp. 1470–1477, 2011.

[41] T. A. Tervonen, J. I. Partanen, S. T. Saarikoski, M. Myllynen, E. Marques, K. Paasonen, A. Moilanen, G. Wohlfahrt, P. E. Kovanen, and J. Klefstrom, *Faulty epithelial polarity genes and cancer*, vol. 111. Elsevier Inc., 2011.

[42] M. Lee and V. Vasioukhin, “Cell polarity and cancer - cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor,” *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. 8, pp. 1141–1150, 2008.

[43] D. W. Powell, “Barrier function of epithelia,” *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, vol. 241, no. 4, pp. G275–G288, 1981.

[44] M. Davidson, “Molecular Expressions Microscopy Primer: Specialized Microscopy Techniques - Fluorescence Digital Image Gallery - Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells (MDCK),” 1995. [Online]. Available: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/mdck/mdckcells.html>. [Accessed: 17-Feb-2017].

[45] J. D. Irvine, L. Takahashi, K. Lockhart, J. Cheong, J. W. Tolan, H. E. Selick, J. R. Grove, and J. R. U. G. Rove, “MDCK (Madin – Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 88, no. 1, pp. 28–

33, 1999.

[46] M. J. Cho, D. P. Thompson, C. T. Cramer, T. J. Vidmar, and J. F. Scieszka, "The Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Epithelial Cell Monolayer as a Model Cellular Transport Barrier," *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 6, no. 1. pp. 71–77, 1989.

[47] M. Cereijido, E. Robbins, W. Dolan, C. Rotunno, and D. Sabatini, "Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support," *J. Cell Biol.*, vol. 77, no. 3, 1978.

[48] © 2006 Selborne Biological Services, "Selborne Biological Services - LipiMAX® purified lipoprotein solution from bovine serum," 2006. [Online]. Available: <http://www.selbornebiological.com/products/lipimax.htm>. [Accessed: 21-Dec-2014].

[49] S. A. Ernst, S. R. Hootman, J. H. Schreiber, and C. V. Riddle, "Freeze-fracture and morphometric analysis of occluding junctions in rectal glands of elasmobranch fish," *J. Membr. Biol.*, vol. 58, no. 2, pp. 101–114, 1981.

[50] S. Hashimoto, T. Yamamura, and M. Shimono, "Morphometric analysis of the intercellular space and desmosomes of rat junctional epithelium," *J. Periodontal Res.*, vol. 21, no. 5, pp. 510–520, 1986.

[51] S. Séguier, G. Godeau, and N. Brousse, "Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues," *Arch. Oral Biol.*, vol. 45, no. 6, pp. 441–52, 2000.

[52] M. M. P. Zegers, L. E. O'Brien, W. Yu, A. Datta, and K. E. Mostov, "Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro," *Trends Cell Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 169–76, Apr. 2003.

[53] P. Claude, "Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens," *J. Membr. Biol.*, vol. 39, no. 2–3, pp. 219–232, 1978.

[54] K. Benson, S. Cramer, and H.-J. Galla, "Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond," *Fluids Barriers CNS*, vol. 10, no. 1, p. 5, 2013.

[55] E. Stefani and M. Cereijido, "Electrical properties of cultured epithelioid cells (MDCK)," *J Membr Biol*, vol. 73, no. 2, pp. 177–184, 1983.

- [56] J. J. Bolivar, M. Cereijido, M. M. Goutx, and J. C. Bertrand, "Voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channel in cultured epithelial cells (MDCK)," *J. Membr. Biol.*, vol. 97, no. 1, pp. 43–51, 1987.
- [57] A. Narai, S. Arai, and M. Shimizu, "Rapid decrease in transepithelial electrical resistance of human intestinal Caco-2 cell monolayers by cytotoxic membrane perturbants," *Toxicol. Vitr.*, vol. 11, no. 4, pp. 347–354, 1997.
- [58] G. Velarde, S. Ait-Aissa, C. Gillet, F. Rogerieux, C. Lambre, E. Vindimian, and J. M. Porcher, "Use of transepithelial electrical resistance in the study of pentachlorophenol toxicity," *Toxicol. Vitr.*, vol. 13, no. 4–5, pp. 723–727, 1999.
- [59] V. L. M. Madgula, B. Avula, N. Reddy V.L, I. A. Khan, and S. I. Khan, "Transport of decursin and decursinol angelate across Caco-2 and MDR-MDCK cell monolayers: In vitro models for intestinal and blood-brain barrier permeability," *Planta Med.*, vol. 73, no. 4, pp. 330–335, 2007.
- [60] T. D. Klingberg, M. H. Pedersen, A. Cencic, and B. B. Budde, "Application of Measurements of Transepithelial Electrical Resistance of Intestinal Epithelial Cell Monolayers To Evaluate Probiotic Activity Application of Measurements of Transepithelial Electrical Resistance of Intestinal Epithelial Cell Monolayers To E," *Aem*, vol. 71, no. 11, pp. 11–14, Nov. 2005.
- [61] J. Zak, S. W. Schneider, I. Eue, T. Ludwig, and H. Oberleithner, "High-resistance MDCK-C7 monolayers used for measuring invasive potency of tumour cells," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 440, no. 1, pp. 179–183, 2000.
- [62] T. Ludwig, R. Ossig, S. Graessel, M. Wilhelmi, H. Oberleithner, and S. W. Schneider, "The electrical resistance breakdown assay determines the role of proteinases in tumor cell invasion.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 283, no. 2, pp. F319–F327, 2002.
- [63] L. Shuler and J. J. Hickman, *TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems*, vol. 20, no. 2. 2016.
- [64] R. A. Sheller, M. E. Cuevas, and M. C. Todd, "Comparison of transepithelial resistance measurement techniques: Chopsticks vs. Endohm," *Biol. Proced. Online*, vol. 19, no. 1, pp. 1–5, 2017.
- [65] World Precision Instruments/WPI, "STX3 Instruction Manual," no. 13. Florida

U.S.A, pp. 3–4, 2009.

[66] L. F. Blume, M. Denker, F. Gieseler, and T. Kunze, “Temperature corrected transepithelial electrical resistance (TEER) measurement to quantify rapid changes in paracellular permeability,” *Pharmazie*, vol. 65, no. 1, pp. 19–24, 2010.

[67] E. L. Boulpaep and J. F. Seely, “Electrophysiology of proximal and distal tubules in the autoperfused dog kidney,” *Am. J. Physiol. Content*, vol. 221, no. 4, pp. 1084–1096, 1971.

[68] J. C. W. C. W. Richardson, V. Scalera, and N. L. L. Simmons, “Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.*, vol. 673, pp. 26–36, Jan. 1981.

[69] N. L. Simmons, “Stimulation of Cl⁻ secretion by exogenous ATP in cultured MDCK epithelial monolayers,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 646, no. 2, pp. 231–242, Aug. 1981.

[70] D. Louvard, “Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 77, no. 7, pp. 4132–4136, 1980.

[71] M. Cereijido, L. González-Mariscal, and L. Borboa, “Occluding junctions and paracellular pathways studied in monolayers of MDCK cells.,” *J. Exp. Biol.*, vol. 106, pp. 205–215, 1983.

[72] Biometrology, “system | cellZscope®.” [Online]. Available: <http://www.biometrology.com/system.html>. [Accessed: 09-Mar-2018].

[73] P. Friedl and E. B. Bröcker, “The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 57, no. 1, pp. 41–64, 2000.

[74] P. Friedl and K. Wolf, “Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 362–374, 2003.

[75] D. Wedlich, *Cell Migration in Development and Disease*. 2004.

[76] J. M. Walker, *Cell Migration*, vol. 769. Totowa, NJ: Humana Press, 2011.

[77] C. Liang, A. Y. Park, and J. Guan, “In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 2, pp. 329–333, Feb. 2007.

[78] N. Kramer, A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschläger,

and H. Dolznig, "In vitro cell migration and invasion assays," *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, vol. 752, no. 1, pp. 10–24, 2013.

[79] C. Burtis and D. Bruns, *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 6th editio. 2008.

[80] P. Held, "Sample Preparation for Fluorescence Microscopy: An Introduction Concepts," 2015.

[81] Abcam, "Direct vs indirect immunofluorescence | Abcam." [Online]. Available: [http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence?utm_source=Eloqua&utm_medium=Email&utm_campaign=IHC%7CContent%7C42736%7CN%2FA%7CN%2FA%7CEng%7CNewsletter&utm_content=Segement test, email 1, NE%7C](http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence?utm_source=Eloqua&utm_medium=Email&utm_campaign=IHC%7CContent%7C42736%7CN%2FA%7CN%2FA%7CEng%7CNewsletter&utm_content=Segement%20test,%20email%201,%20NE%7C). [Accessed: 07-Mar-2018].

[82] M. Misakian and W. T. Kaune, "Optimal experimental design for in vitro studies with ELF magnetic fields.," *Bioelectromagnetics*, vol. 11, no. 3, pp. 251–5, 1990.

[83] M. Frazier and M. Misakian, "Examination of Experimental Designs for In Vitro Studies Using ELF Magnetic Fields," in *BPNL/NIST Workshop on Exposure Parameters for In Vitro Studies with ELF Magnetic and Electric Fields*, 1990.

[84] L. M. Martínez Méndez, "Desarrollo y construcción de un sistema de medición y control de los parámetros de una cámara de incubación para el crecimiento de monocapas celulares in vitro," CINVESTAV I.P.N., 2016.

[85] W. Jakoby and I. Pastan, *Cell culture*. Elsevier, 1979.

[86] H. Lodish and T. Parts, *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, 2008.

[87] J. Wegener, D. Abrams, W. Willenbrink, H.-J. Galla, and A. Janshoff, "Automated multi-well device to measure TER under physiological conditions," *Biotechniques*, vol. 4, no. 4, pp. 590–596, 2004.

[88] J. Wegener, M. Sieber, and H. J. Galla, "Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 32, no. 3, pp. 151–170, 1996.

[89] G. Kottra and E. Frömter, "Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy," *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 402, no. 4, pp. 409–420, Dec. 1984.

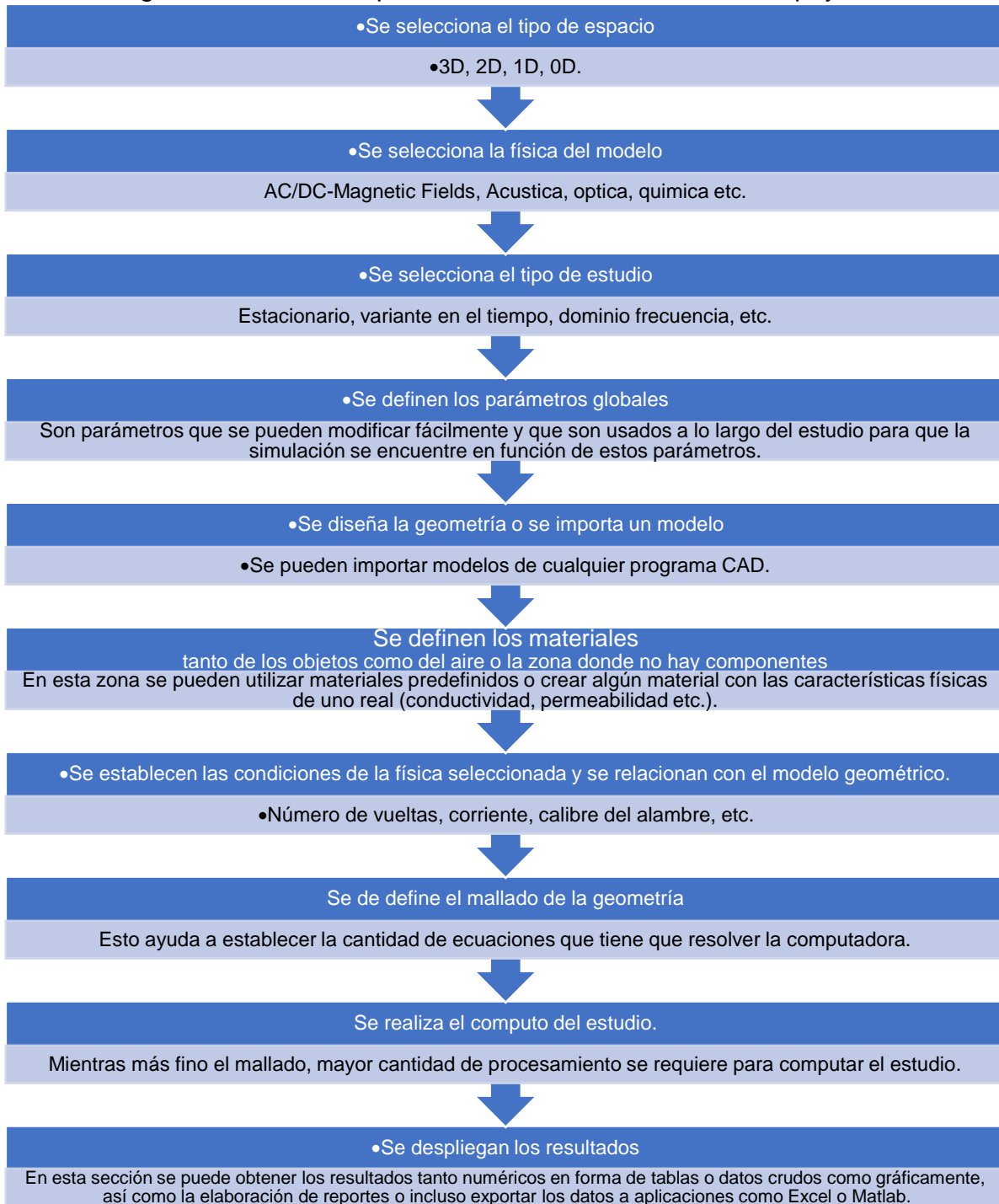
- [90] J. Z. Bao, C. C. Davis, and R. E. Schmukler, "Impedance spectroscopy of human erythrocytes: system calibration and nonlinear modeling.," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 4, pp. 364–78, 1993.
- [91] J. Wegener, "Impedance Analysis of Cell Junctions," in *Nanotechnology. Volume 6: Nanoprobes*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
- [92] T. Sun, E. J. Swindle, J. E. Collins, J. A. Holloway, D. E. Davies, and H. Morgan, "On-chip epithelial barrier function assays using electrical impedance spectroscopy," *Lab Chip*, vol. 10, no. 12, p. 1611, 2010.
- [93] E. Barsoukov and J. R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy*. 2005.
- [94] C.-M. Lo, C. R. Keese, and I. Giaever, "Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing.," *Biophys. J.*, vol. 69, no. 6, pp. 2800–2807, 1995.
- [95] A. Janshoff, J. Wegener, M. Sieber, and H.-J. Galla, "Double-mode impedance analysis of epithelial cell monolayers cultured on shear wave resonators.," *Eur. Biophys. J.*, vol. 25, no. 2, pp. 93–103, 1996.
- [96] S. Arndt, J. Seebach, K. Psathaki, H.-J. Galla, and J. Wegener, "Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 6, pp. 583–594, 2004.
- [97] J. C. Yarrow, Z. E. Perlman, N. J. Westwood, and T. J. Mitchison, "A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods," *BMC Biotechnol.*, vol. 4, pp. 1–9, 2004.
- [98] K. I. Hulkower and R. L. Herber, "Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery," *Pharmaceutics*, vol. 3, no. 1, pp. 107–124, 2011.
- [99] T. Inai, J. Kobayashi, and Y. Shibata, "Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 78, no. 12, pp. 849–855, 1999.
- [100] D. Bennet, "Drug and bioactive molecule screening based on a bioelectrical impedance cell culture platform," pp. 5789–5809, 2014.
- [101] C. R. Keese, J. Wegener, S. R. Walker, and I. Giaever, "Electrical wound-healing assay for cells in vitro," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 6, pp. 1554–1559, 2004.

- [102] M. Nakagawa, *Biological Effects of Electric and Magnetic Fields.*, vol. 2. 1997.
- [103] S. Zannella, "Biological effects of magnetic fields," *CISE SpA, Segrate (Milan), Italy Abstr.*, 1997.
- [104] J. M. Zahm, H. Kaplan, a L. Hérard, F. Doriot, D. Pierrot, P. Somelette, and E. Puchelle, "Cell Migration and Proliferation During The In Vitro Wound Repair of The Respiratory Epithelium," *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol. 37, no. 1, pp. 33–43, 1997.
- [105] R. Riahi, Y. Yang, D. D. Zhang, and P. K. Wong, "Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration," *J. Lab. Autom.*, vol. 17, no. 1, pp. 59–65, 2012.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimientos y diagramas de flujo

Diagrama A1.1. Pasos para la simulación en Comsol Multiphysics®



Anexo 2. Desarrollos matemáticos

Desarrollo de la superficie de contacto de los electrodos

El electrodo superior tiene forma cilíndrica por lo que la superficie de contacto entre el medio y el electrodo está dada en función del radio del cilindro (r) y la altura (h) (Fig. A. 1).

$$A_c = \pi * 2r * h + \pi * r^2 \quad (16)$$

$$A_c = \pi r(2h + r) \quad (17)$$

Conocemos el valor del $r = 1.25 \text{ mm}$ pero desconocemos el valor de h que es la altura del medio en contacto con el electrodo. Para ello se requiere saber la altura total del volumen del medio h_m . La fig A2.1 muestra un esquema de la colocación del electrodo.

Se conoce el volumen del medio exterior al filtro $Vm_E = 1.5 \mu\text{l} = 1500 \text{ mm}^3$ y el volumen del medio interior al filtro $Vm_I = .15 \mu\text{l} = 150 \text{ mm}^3$. Se sabe que los líquidos tienden al equilibrio por la igualdad de presiones, entonces, sumamos ambos volúmenes para un volumen total de $Vm_T = 1650 \text{ mm}^3$.

Las distancias conocidas se presentan en la TABLA A. 1.

TABLA A. 1. MEDIDAS DE LA COLOCACIÓN DEL ELECTRODO EN EL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA

Medida	Abreviación	Cantidad
Diámetro del electrodo de la base	D_E	15.5 mm
Diámetro exterior del filtro	D_{EF}	9 mm
Diámetro interior del filtro	D_{IF}	6.48 mm
Altura de la base al filtro	h_{bf}	1.4 mm
Altura de la base al electrodo	h_E	5.9 mm

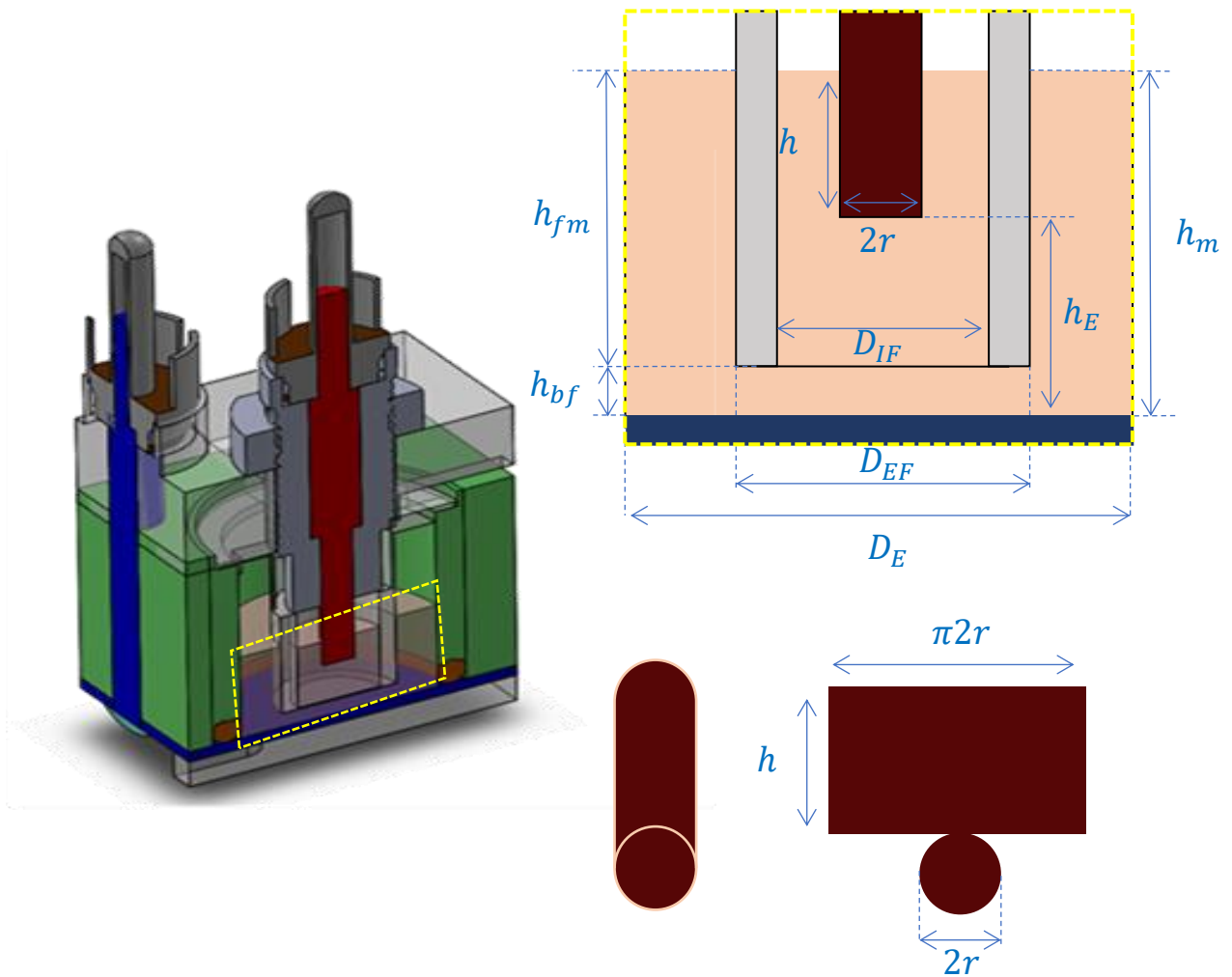


Fig. A. 1. Dimensiones de la superficie de contacto del electrodo medio.

La mejor forma de resolver este problema es separando los volúmenes por sección. Haciéndolo de esta manera se calculó que la altura total de volumen del medio $h_m = 10.3 \text{ mm}$ por lo que la altura del electrodo en contacto con el medio $h = 4.4 \text{ mm}$. La superficie en contacto del medio y electrodo por lo tanto es $A_c = 39.46 \text{ mm}^2$

Anexo 3. Programas de LabVIEW

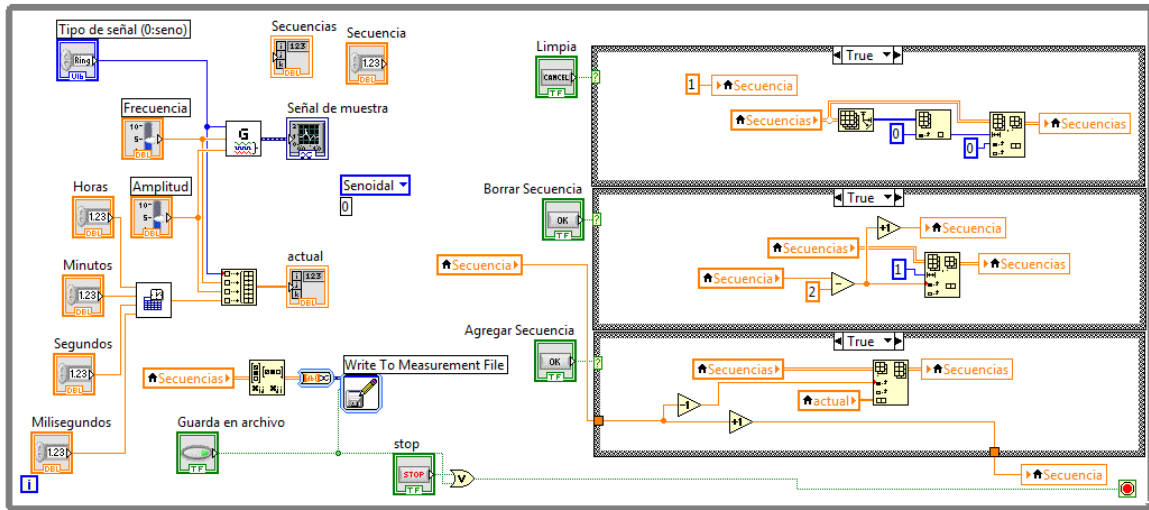


Fig. A. 2. Panel del programa en LabVIEW para almacenar las secuencias de generación de campo en las bobinas Helmholtz.

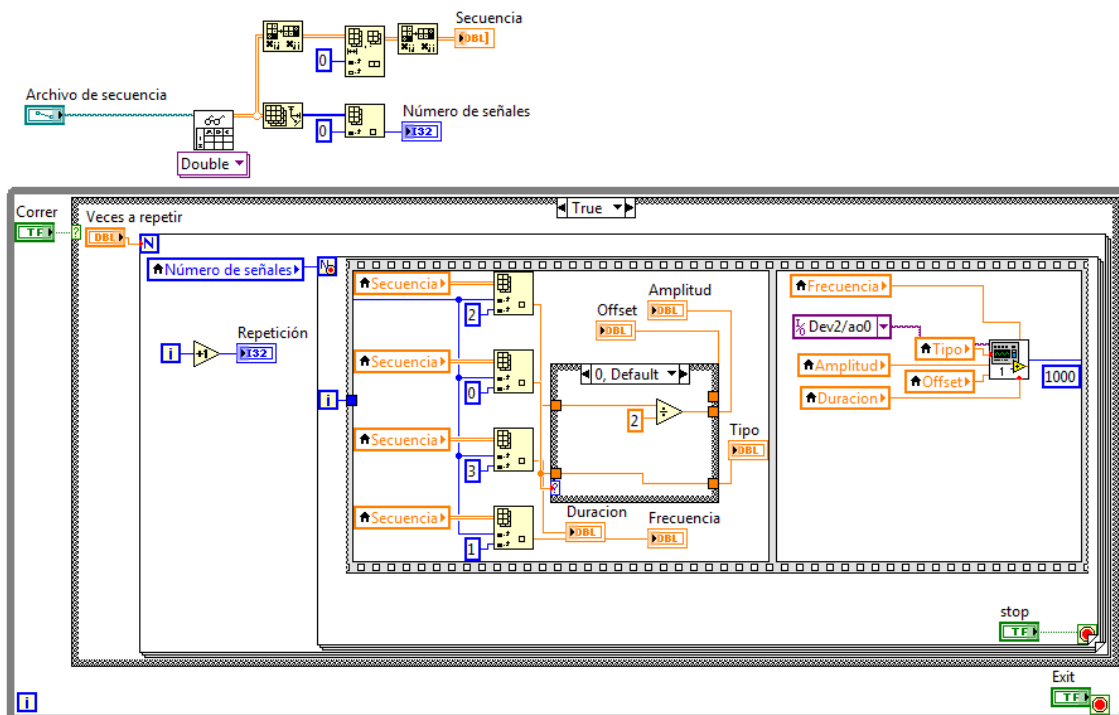


Fig. A. 3. Panel del programa en LabVIEW para reproducir las secuencias almacenadas y enviarlas al circuito de potencia de las bobinas.

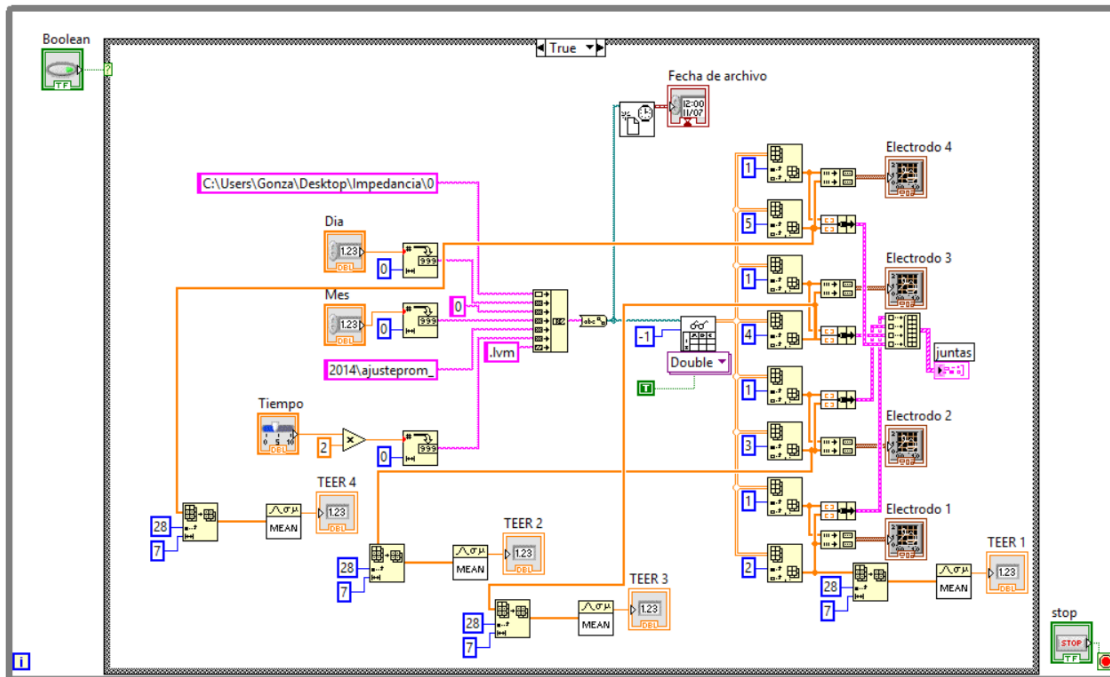


Fig. A. 4. Panel del programa para cargar las gráficas de TEER.

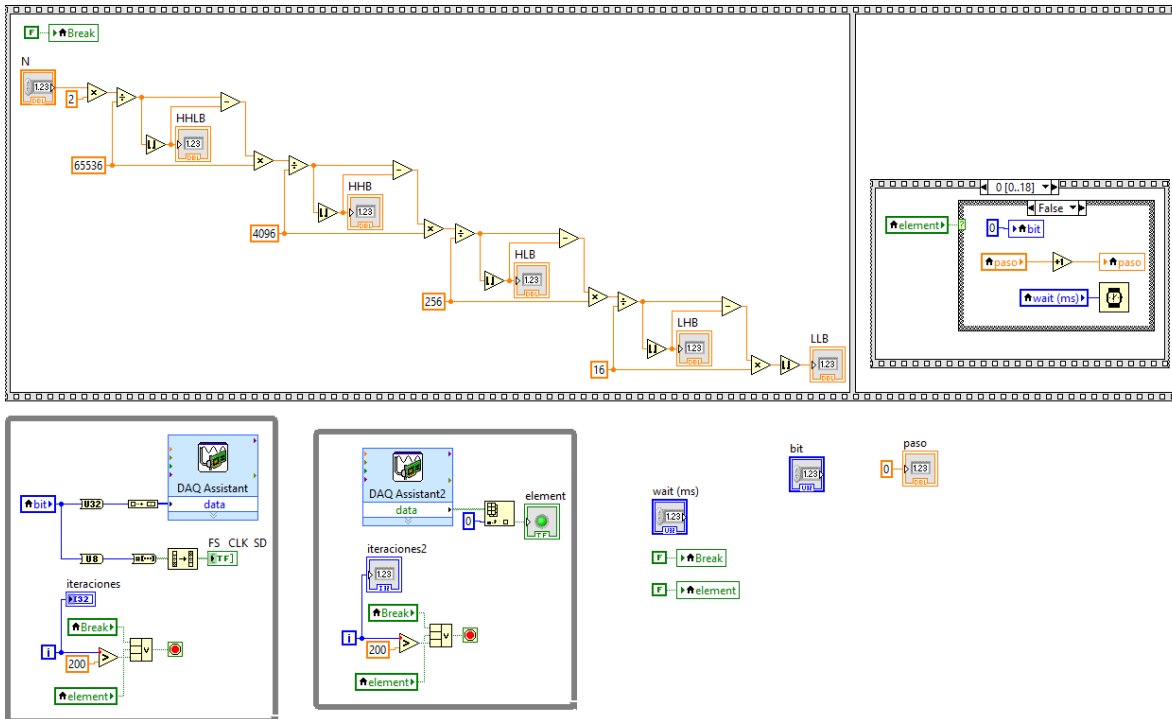


Fig. A. 5. Programa de comunicación entre el PIC y la tarjeta NI-USB(Protocololap.vi).

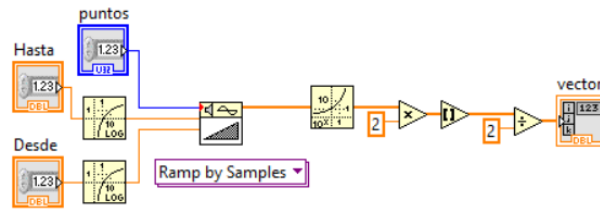


Fig. A. 6. Programa para determinar los puntos en escala logarítmica(Loggen.vi).

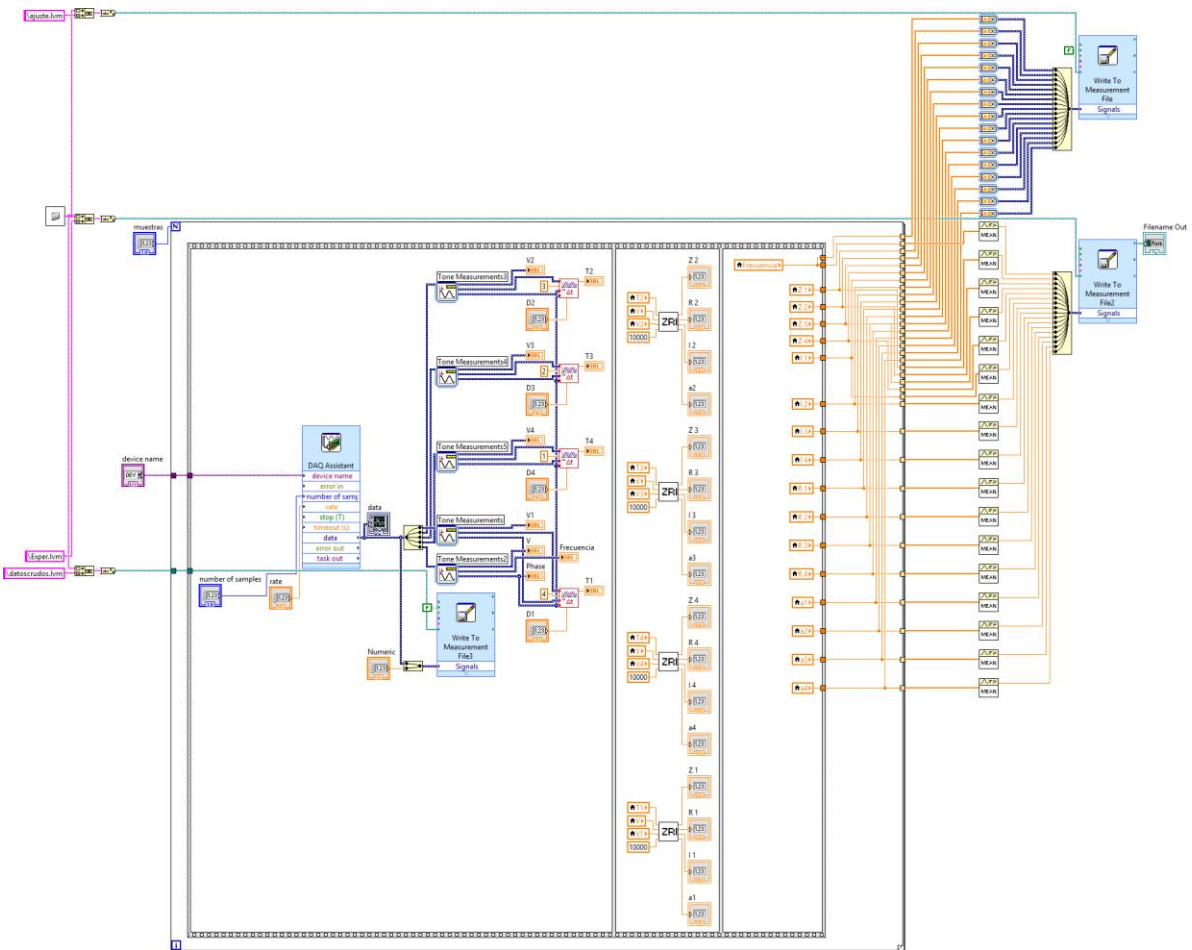


Fig. A. 7. Programa que mide y determina los valores de impedancia (Impedanciasfinalap.vi).

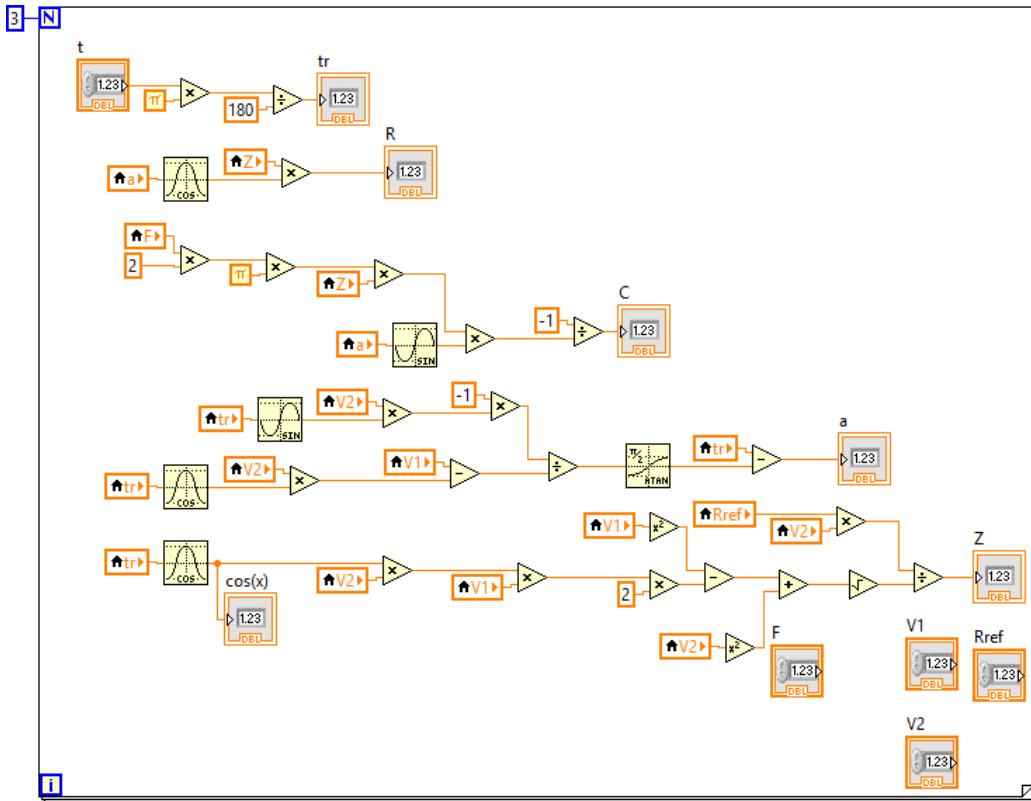


Fig. A. 8. Programa que determina los componentes de las impedancias (ZRC.vi).

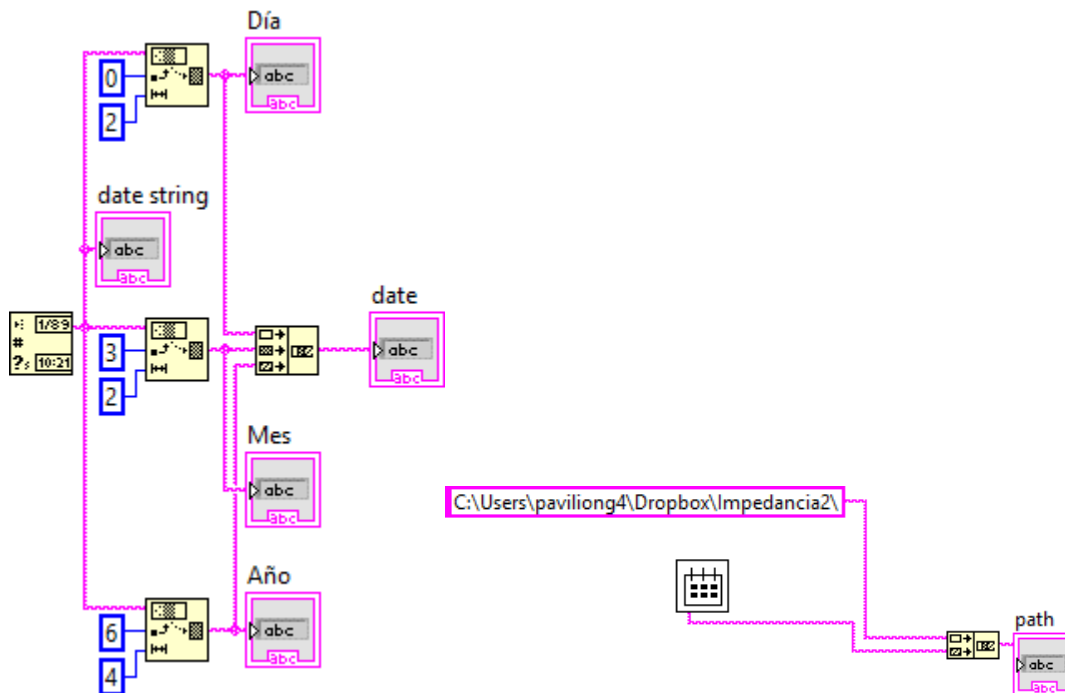


Fig. A. 9. Programa para generar automáticamente una ruta de guardado (Ruta.vi).

Anexo 4. Programas y funciones en Matlab.

% Programa para obtener todos los archivos almacenados de TEEI y los grafica

```

DateString = '13-11-2016';
formatIn = 'dd-mm-yyyy';
DateNumber = datenum(DateString,formatIn);
duracion=9;
control1=[];
control2=[];
control3=[];
control4=[];

exper1=[];
exper2=[];
exper3=[];
exper4=[];

addpath(genpath('C:\Users\Toshiba\Dropbox\
Impedancia eléctrica\experimento 13-22 nov
2016'));
for d=0:duracion

formatOut = 'ddmmyyyy';
str =
datestr(DateNumber+d,formatOut,'local')
s =
strcat('C:\Users\Toshiba\Dropbox\Impedanci
a eléctrica\experimento 13-22 nov
2016\',str)
cd(s)

control1=[control1;ajustprom(1,d,0,9)];
hold off
control2=[control2;ajustprom(2,d,0,9)];
hold off
control3=[control3;ajustprom(3,d,0,9)];
hold off
control4=[control4;ajustprom(4,d,0,9)];
hold off

% exper1=[exper1;ajustprom(1,d,1,4)];
% exper2=[exper2;ajustprom(2,d,1,4)];
% exper3=[exper3;ajustprom(3,d,1,4)];
% exper4=[exper4;ajustprom(4,d,1,4)];

end

% hold off
%
inicio=min([control1(1),control2(1),contro
l4(1),exper1(1),exper2(1),exper3(1)]);
inicio=0;
plot(control1(:,1)-inicio,control1(:,2))
hold on
plot(control2(:,1)-inicio,control2(:,2))
plot(control4(:,1)-inicio,control4(:,2))
plot(control3(:,1)-inicio,control3(:,2))
% plot(exper1(:,1)-inicio,exper1(:,2))
%
% plot(exper2(:,1)-inicio,exper2(:,2))
% plot(exper3(:,1)-inicio,exper3(:,2))
ultimoctr=char(archctrl(length(archctrl)))

```

```

ultimoexp=char(archexp(length(archexp)))

indexctrl = find(strcmp(archctrl,
ultimoctr));
indexexp = find(strcmp(archexp,
ultimoexp));

[archctrl,tam]=archivo('Ctrl',1);
[archexp,tam]=archivo('Exper',1);

anexoctrl1=anexo(1,d,0,indexctrl+1);
anexoctrl2=anexo(2,d,0,indexctrl+1);
anexoctrl4=anexo(4,d,0,indexctrl+1);

anexoexp1=anexo(1,d,1,indexexp+1);
anexoexp2=anexo(2,d,1,indexexp+1);
anexoexp3=anexo(3,d,1,indexexp+1);

control1=[control1;anexoctrl1];
clear anexoctrl1
control2=[control2;anexoctrl2];
clear anexoctrl2
% control3=[control3;anexoctrl3];
% clear anexoctrl3
control4=[control4;anexoctrl4];
clear anexoctrl4

exper1=[exper1;anexoexp1];
clear anexoexp1
exper2=[exper2;anexoexp2];
clear anexoexp2
exper3=[exper3;anexoexp3];
clear anexoexp3
% exper4=[exper4;anexoexp4];
% clear anexoexp4

close all

plot(control1(:,1),control1(:,2))
hold on
plot(control2(:,1),control2(:,2))
plot(control4(:,1),control4(:,2))
plot(exper1(:,1),exper1(:,2))

plot(exper2(:,1),exper2(:,2))
plot(exper3(:,1),exper3(:,2))

%% Promediar

hold on
[x1,teer1]=promedios3(control1,control2,co
ntrol3);

plot(x1,teer1(:,1))
min(x1)
xldif=diff(x1);
plot(x1(2:end),xldif*2+30)
%%
hold on
[x2,teer2]=promedios3(exper1,exper2,exper3
);
plot(x2,teer2(:,1))
min(x2)

```

```
x2dif=diff(x2);
```

% Función para aproximar los datos a la curva de la impedancia eléctrica

```
function [datos2] = ajustprom(e,dia,coe,D)
clc
[archivos,tam]=archivo('ajustprom',1);
for xx=1:tam
A=importdata(char(archivos(xx)));
[fm,r]=size(A);
if coe==0
nm=20;
else
nm=fm/2;
A=A(21:end,:);
end
[dd,mm,aa,h,m,s,tts]=fechayhora(char(archivos(xx)));
tiempo(xx,:)= [dd,mm,aa,h,m,s,tts];
archi=[];
for y=1:4
if y==e
ecuacion='sqrt(((cos(pi/2*e))/(d*(2*pi*x)^e))+(b/(1+(2*pi*x*b*c)^2))+a)^2+(((sin(pi/2*e))/(d*(2*pi*x)^e))+((2*pi*x*b^2*c)/(1+(2*pi*x*b*c)^2)))^2)';
comienzo=[A(nm,y+2), 10, .0001,0.000022,.92];
bajo=[A(nm,y+2)*.99, 0, 0.0000001,0.000001,.9];
alto=[A(nm,y+2)*1.01,5000, 0.000018,0.0001,.95];
f = fit(A(D:nm,2),A(D:nm,y+2),ecuacion, 'StartPoint', comienzo,'Algorithm','Trust-Region','Lower', bajo,'Upper',alto);
loglog(A(1:nm,2),A(1:nm,y+2))
hold on
for w=1:nm
x=A(w,2);
%Ecuación a aproximar
z(w)=sqrt(((cos(pi/2*f.e))/(f.d*(2*pi*x)^f.e))+(f.b/(1+(2*pi*x*f.b*f.c)^2))+f.a)^2+(((sin(pi/2*f.e))/(f.d*(2*pi*x)^f.e))+((2*pi*x*f.b^2*f.c)/(1+(2*pi*x*f.b*f.c)^2)))^2);
end
x=A(1:nm,2);
scatter(x,z)
teer(xx,y)=f.b*.33;
capa(xx,y)=f.c/.33;
cpe2(xx,y)=f.e;
cpe1(xx,y)=f.d/.33;
rmed(xx,y)=f.a;
else
end
end
end
for u=1:tam

t(u)=tiempo(u,4)+tiempo(u,5)/60+tiempo(u,6)/360+tiempo(u,7)/360000;
end
teer=teer';
teer(all(teer==0,2),:)=[];
teer=teer';

capa=capa';
capa(all(capa==0,2),:)=[];
capa=capa';
```

```
cpe1=cpe1';
cpe1(all(cpe1==0,2),:)=[];
cpe1=cpe1';

cpe2=cpe2';
cpe2(all(cpe2==0,2),:)=[];
cpe2=cpe2';

rmed=rmed';
rmed(all(rmed==0,2),:)=[];
rmed=rmed';
hold off
t=t';
t=t+24*dia;
datos=[t,teer,capa,rmed,cpe1,cpe2];
indice=rmed<500;
datos2=datos;
datos2(:,1)=indice.*datos2(:,1);
datos2(~all(datos2,2),:)=[];
end
```

% Función que regresa los nombres de los archivos en una lista que contengan la palabra

```
function [ archivos,tam ] =
archivo(nom,init)
%regresa los nombres de los archivos en
una lista que contengan la palabra
% en un inicio determinado
fold=dir;
num=size(fold);
arch=num(1,1);
fil=cell(arch,1);
Xx = [fold(:).datenum].';
[Xx,Xx] = sort(Xx);
S = {fold(Xx).name}';
for x=1:arch
nombre=char(S(x));
try
if sum(nombre(init:init+length(nom)-1)==nom)==length(nom)
fil{x}=nombre;
end
end
end
archivos=fil(~cellfun('isempty',fil));
[tam,no]=size(archivos);
clear no
endç
```

% Función para contar los núcleos dada una imagen de proyección máxima en confocal.

```
function [nCel,Areas,Roundness] =
celulas(proymaxT,AoC)
bw = im2bw(proymaxT, 0.1);
%imshow(bw)
D = -bwdist(~bw);
%imshow(D,[])
Ld = watershed(D);
```

```

%imshow(label2rgb(Ld))
bw2 = bw;
bw2(Ld == 0) = 0;
%imshow(bw2)
mask = imextendedmin(D,2);
%imshowpair(bw,mask,'blend')
D2 = imimposemin(D,mask);
Ld2 = watershed(D2);
bw3 = bw;
bw3(Ld2 == 0) = 0;
%imshow(bw3)
BW2 = bwareaopen(bw3, 500);
L = watershed(BW2);
%imshow(label2rgb(Ld2))
%imshow(BW2)
CC = bwconncomp(BW2);
L = labelmatrix(CC);
RGB = label2rgb(L);
image(RGB)
s =
regionprops(BW2,{'centroid','Area','Perimeter','PixelList'});
centroids = cat(1, s.Centroid);
Pixe=cat(1, s.PixelList);
Areas = cat(1, s.Area);
Perimeters= cat(1, s.Perimeter);
Roundness=(4*pi*Areas)./Perimeters.^2;
nCel=length(Areas);
hold on
microA=Areas*10000/262144;

if AoC==1
text(centroids(:,1),centroids(:,2),
num2str(microA,5))
title('Area  $\mu\text{m}^2$ ')
else
text(centroids(:,1),centroids(:,2),
num2str(Roundness,5))
title('Circularidad (Circulo completo=1)')
end
end
end

```

% Programa que regresa porcentaje de área cubierta para el ensayo de cierre de herida

```

clear
ext='.bmp';
fold=dir;
num=size(fold);
arch=num(1,1);
fil=cell(arch,1);
Xx = [fold(:).datenum].';
[Xx,Xx] = sort(Xx);
S = {fold(Xx).name}';
for x=1:arch
nombre=char(S(x));
try
if sum(nombre(length(nombre)-
3:length(nombre))==ext)==4
fil{x}=nombre;
end
end
end
archivos=fil(~cellfun('isempty',fil));
[tam,no]=size(archivos);
clear no

```

```

tiempo=[];
for x=1:tam
actual=char(archivos(x));

tiempo(x)=str2num(actual(find(actual==' ',
1)+1:find(actual=='.',1)-1));
end
[time,I] = sort(tiempo,'ascend')
ao=archivos(I);
archivos=ao;
tiempo=time;
%%trabaja con las imagenes
for j=1:tam
imagen=imread(char(archivos(j)));
% imshow(imagen)
bw = im2bw(imagen, .5);
% imshow(bw)
areacubierta(j)=sum(sum(bw));
% pause(1)
end
porcent=((areacubierta(1))-
areacubierta)*100/max(areacubierta));
% bar(tiempo,porcent)
A=[tiempo',porcent,areacubierta',786432-
areacubierta'];
B={'Tiempo','Porcentaje de
confluencia','area en blanco','area en
negro'}
C=[B;num2cell(A)]
filename = actual(1:find(actual==' ',1)-
1);
sheet = 1;
xlRange = 'A1';
xlswrite(filename,C,sheet,xlRange)

```

%Programa que calcula los promedios de los parámetros en 3 pozos

```

function [jx,vpt] = promedios3(aa,bb,cc)
aa=aa';
bb=bb';
cc=cc';
z=max([max(aa(1,:)),max(bb(1,:)),max(cc(1,
:))]);
aa=[aa,ones(6,1)*(z+1)];
bb=[bb,ones(6,1)*(z+1)];
cc=[cc,ones(6,1)*(z+1)];
j=[]; %vector con el tiempo
x=1;
xa=1;
xb=1;
xc=1;
tf=0
vpt=[]; %vector promedio teer
while tf==0
vpt(1,x)=0;
vpt(2,x)=0;
vpt(3,x)=0;
vpt(4,x)=0;
vpt(5,x)=0;

sumatoria=0;
j(x)=min([aa(1,xa),bb(1,xb),cc(1,xc)]);

```

```

if j(x) == z+1;
    tf=1;
end

if j(x) == aa(1, xa)

    vpt(1,x) = vpt(1,x) + aa(2, xa);
    vpt(2,x) = vpt(2,x) + aa(3, xa);
    vpt(3,x) = vpt(3,x) + aa(4, xa);
    vpt(4,x) = vpt(4,x) + aa(5, xa);
    vpt(5,x) = vpt(5,x) + aa(6, xa);
    sumatoria = sumatoria + 1;
    xa = xa + 1;
end
if j(x) == bb(1, xb)

    vpt(1,x) = vpt(1,x) + bb(2, xb);
    vpt(2,x) = vpt(2,x) + bb(3, xb);
    vpt(3,x) = vpt(3,x) + bb(4, xb);
    vpt(4,x) = vpt(4,x) + bb(5, xb);
    vpt(5,x) = vpt(5,x) + bb(6, xb);

    sumatoria = sumatoria + 1;
    xb = xb + 1;

end
if j(x) == cc(1, xc)
    vpt(1,x) = vpt(1,x) + cc(2, xc);
    vpt(2,x) = vpt(2,x) + cc(3, xc);
    vpt(3,x) = vpt(3,x) + cc(4, xc);
    vpt(4,x) = vpt(4,x) + cc(5, xc);
    vpt(5,x) = vpt(5,x) + cc(6, xc);

    sumatoria = sumatoria + 1;

    xc = xc + 1;
end

vpt(1,x) = vpt(1,x) / sumatoria;
vpt(2,x) = vpt(2,x) / sumatoria;
vpt(3,x) = vpt(3,x) / sumatoria;
vpt(4,x) = vpt(4,x) / sumatoria;
vpt(5,x) = vpt(5,x) / sumatoria;

x = x + 1;
end

jx = j(1:end-1)';
vpt = vpt(:, 1:end-1)';
end

%Programa para obtener los datos de
las gráficas importados de Consol

clc
clear
close all
A = subdir('*.txt');
r = size(A)
r(1,1)
orden = [2, 3, 1, 4, 5];
for x = 1:length(orden)
    if orden(x) == 1
        s = load(A(orden(x)).name)
        hold on

        plot(s(:,3)*1000, s(:,4) ./ 86.11*100, ':', 'LineWidth', 2)
    else
        s = load(A(orden(x)).name)
        hold on
        plot(s(:,3)*1000, s(:,4) ./ 86.11*100)
    end
end

lgd = legend('700', '800', '900', '1000', '1100');
hTitle = legendTitle(lgd, '# Vueltas', 'FontWeight', 'normal');
h = hline(100, '--');
xlabel('Distancia (mm)')
ylabel('% Campo Magnético')
vline([-20 20], {'--g', '--g'})
xlim([-100 100])

%% Radio
clc
clear
close all
A = subdir('*.txt');
r = size(A)

r(1,1)
orden = [17, 16, 1, 15, 14, 13];

for x = 1:length(orden)

    if orden(x) == 1
        s = load(A(orden(x)).name)
        hold on

        plot(s(:,3)*1000, s(:,4) ./ 86.11*100, ':', 'LineWidth', 2)
    else
        s = load(A(orden(x)).name)
        hold on
        plot(s(:,3)*1000, s(:,4) ./ 86.11*100)
    end
end

lgd = legend('80', '70', '60', '50', '40', '30');
hTitle = legendTitle(lgd, 'Radio (mm)', 'FontWeight', 'normal');
h = hline(100, '--');
xlabel('Distancia (mm)')
ylabel('% Campo Magnético')
vline([-20 20], {'--g', '--g'})
xlim([-100 100])

%%
%Distancia
clc
clear
close all
A = subdir('*.txt');
r = size(A)

r(1,1)
orden = [18, 19, 1, 20, 21, 22];

for x = 1:length(orden)

```

```

if orden(x)==1
    s=load(A(orden(x)).name)
    hold on

plot(s(:,3)*1000,s(:,4)./86.11*100,':','Linewidth',2)
else
    s=load(A(orden(x)).name)
    hold on
    plot(s(:,3)*1000,s(:,4)./86.11*100)
end
end

lgd=legend('22','27','32','37','42','47');
hTitle = legendTitle (lgd,
'Separación(mm)', 'FontWeight', 'normal'
);
h = hline(100,'--')
xlabel('Distancia (mm)')
ylabel('% Campo Magnético')
vline([-20 20],{'--g','--g'})
xlim([-100 100])

```

%Programa para cargar los archivos guardados de los 4 sensores de efecto hall

```

clear
filename='tesla_5.lvm';
m=importdata(filename);
tam=size(m);
n=tam(1)/54;
bazal=zeros(n,4);
bgt=zeros(n,1);
%f=ax+b
a=[576.7,523.49,530.96,584.63];
for f=1:n
    bas=m(54*f-54+1:54*f-54+12,4);
    bazal(f,1)=mean(bas);
    bas=m(54*f-54+1:54*f-54+12,5);
    bazal(f,2)=mean(bas);
    bas=m(54*f-54+1:54*f-54+12,6);
    bazal(f,3)=mean(bas);
    bas=m(54*f-54+1:54*f-54+12,7);
    bazal(f,4)=mean(bas);
    bas=m(54*f-54+1:54*f-54+12,3);
    bgt(f)=mean(bas);
end
r=bazal;
rbaz=r;
for f=1:4
    r(:,f)=a(f)*bazal(:,f);
    rbaz(:,f)=r(:,f)-bgt(f);
end
y=zeros(36,n);
y1=zeros(36,n);
y2=zeros(36,n);
y3=zeros(36,n);
y4=zeros(36,n);
for f=1:n
    y(:,f)=m(54*f-54+19:54*f,3);
    x1=m(54*f-54+19:54*f,4);
    y1(:,f)=x1*a(1)-rbaz(f,1);
    x2=m(54*f-54+19:54*f,5);
    y2(:,f)=x2*a(2)-rbaz(f,2);
    x3=m(54*f-54+19:54*f,6);
    y3(:,f)=x3*a(3)-rbaz(f,3);
    x4=m(54*f-54+19:54*f,7);
    y4(:,f)=x4*a(4)-rbaz(f,4);

```

end

%Función que regresa el día, mes y año en números

```

function [dd,mm,aa,h,m,s,tts] =
fechayhora(archivo)

% 12:00 am
% ejemplo: [dd,mm,aa,h,m,s,tts] =
fechayhora('ajuste.lvm')

file = dir(archivo);
a=file.date;
h=str2num(a(14:15));
m=str2num(a(17:18));
s=str2num(a(20:21));
dd=str2num(a(1:2));
aa=str2num(a(9:12));
tts=h*3600+m*60+s;
mes={'ene','feb','mar','abr','may','jun','jul','ago','sep','oct','nov','dec'};
in=strcmpi(mes, a(4:6));
mi=linspace(1,12,12);
mm=sum(in.*mi);

```

end

%Script para las gráficas de densidad de campo magnético

```

x=0:79;
y=0:79;
z=0:79;

x0=x*0;
y0=y*0;

subplot(2,2,[1,3])
plot3(-x,y0,yy80/90*25.3);
hold on
plot3(x,y0,yy82/90*25.3);
plot3(x0,-y,yy83/90*25.3);
plot3(x0,y,yy82/90*25.3);
axis([-85,85,-85,85,-5,30])
xlabel('Distancia (mm)')
ylabel('Distancia (mm)')

zlabel('Densidad de campo magnético (G)')

subplot(2,2,2)
plot(-x,yy80/90*25.3);
hold on
plot(x,yy82/90*25.3);
axis([-85,85,-5,30])
xlabel('Distancia (mm)')
ylabel('Densidad de campo magnético (G)')

subplot(2,2,4)
plot(-x,yy83/90*25.3,'color',[0.4940 0.1840 0.5560]);
hold on
plot(x,yy84/90*25.3,'color',[0.9290 0.6940 0.1250]);
axis([-85,85,-5,30])
xlabel('Distancia (mm)')
ylabel('Densidad de campo magnético (G)')

```

```

%Script para obtener valores de
una gráfica
%cargar la imagen con el nombre
de imrgb.png
disp('Colocate en el origen y da
click');
figure(1)
A = imread('imrgb.png');
image(A)
[x0,y0] = ginput(1);
disp('Da clic en el maximo de x
respecto al origen y luego el
maximo de y respecto al origen');
[xm,ym] = ginput(2);
xmax = input('maximo x: ');
ymax = input('maximo y: ');
N = input('Puntos de la grafica
(numero): ');
[x,y] = ginput(N);
xo=(x0+xm(2))/2; %origen
promedio en x
yo=(y0+ym(1))/2; %origen
promedio de y
xmaxima=xm(1);
ymaxima=ym(2);
resx=(xmaxima-xo)/xmax;
resy=(yo-ymaxima)/ymax;
xc=x-xo;
yc=yo-y;
xx=xc/resx;
yy=yc/resy;
figure(2)
plot(xx,yy)

```

Anexo 5. Programa del PIC16f84a

Programa de pic

```

#define osc 16000000
#define Ad9833res
268435456
intmuestra;
shortuno;
void datospi(int bytes){
short d;
//Inicial
PORTB.F4=1;
PORTB.F5=0;
PORTB.F6=0;
//comenzamos
PORTB.F4=1;
PORTB.F5=1;
PORTB.F6=0;
//delay_nop(t11);
PORTB.F4=0;
for (d=0;d<15;d++){
PORTB.F6=(bytes>>(15-
d));
//delay_nop(t9);
PORTB.F5=0;
//delay_nop(t6);
delay_us(6);
PORTB.F5=1;
//delay_nop(t9);
}
PORTB.F6=bytes;
PORTB.F5=0;
delay_us(5);
PORTB.F4=1;
PORTB.F6=0;
}
void frecuencia(short tipo,
floatfq){
//0-seno y 2- triangular
104- cuadrada
longfreq;
intalta;
intbaja;
//Fout=Fmclk/2^28*FREQR
EG
//Fmclk= Frecuencia del
oscilador
//freq=fq*16.77;
freq=fq*8.385;
baja=freq&0x3FFF;
alta=(freq>>14);
datospi(0x2100+tipo);
//triangulo o seno
//modifique los valores
de 1000 a 10
delay_us(10);
datospi(0x4000+baja);
delay_us(10);
datospi(0x4000+alta);
delay_us(10);
datospi(0x8000);
delay_us(10);
datospi(0x8000);
delay_us(10);
datospi(0xC000);
delay_us(10);
datospi(0xE000);
delay_us(10);
datospi(0x200+tipo);
delay_us(10);
}
void muestralos(int x){
int x1;
x1=(x&0xF000)/4096;
PORTA=x1;
delay_ms(1000);
x1=(x&0x0F00)/256;
PORTA=x1;
delay_ms(1000);
x1=(x&0x00F0)/16;
PORTA=x1;
delay_ms(1000);
x1=(x&0x000F);
PORTA=x1;
delay_ms(1000);
}
intcnidsp(){
short HHB;
short HLB;
short LHB;
short LLB;
int Bit14;
while(PORTB.F7==0){}
while(PORTB.F7==1){}
HHB=PORTB&0x0F;
uno=HHB;
while(PORTB.F7==0){}
while(PORTB.F7==1){}
HLB=PORTB&0xF;
uno=HLB;
while(PORTB.F7==0){}
while(PORTB.F7==1){}
LHB=PORTB&0xF;
uno=LLB;
Bit14=HHB*4096+HLB*256
+LHB*16+LLB;
muestra=Bit14;
return Bit14;}
void main() {
intnum;
TRISA = 0; // set
direction to be output
TRISB = 0b10001111; //
set direction to be input
PORTA=0;
delay_ms(2000);
frecuencia(0,0);
while(1){
PORTA=0;
num=cnidsp();
PORTA=1;
frecuencia(0, num);
delay_ms(20);
}}

```

Anexo 6. Piezas detalladas de los sistemas desarrollados

Piezas del medidor de impedancia eléctrica (medidas en mm)

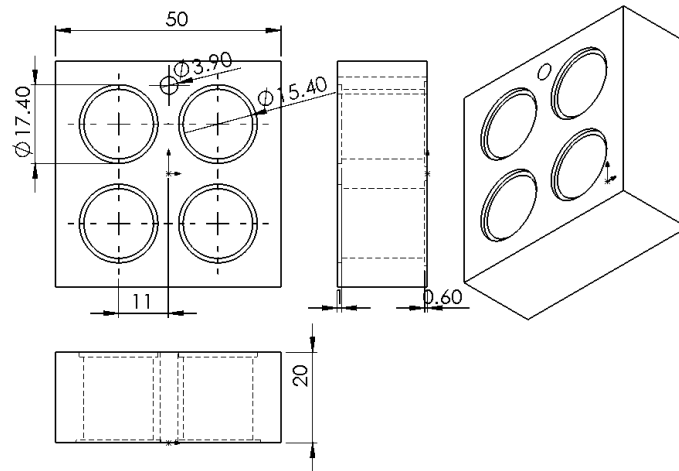


Fig. A. 10. Dimensiones del cuadro de teflón.

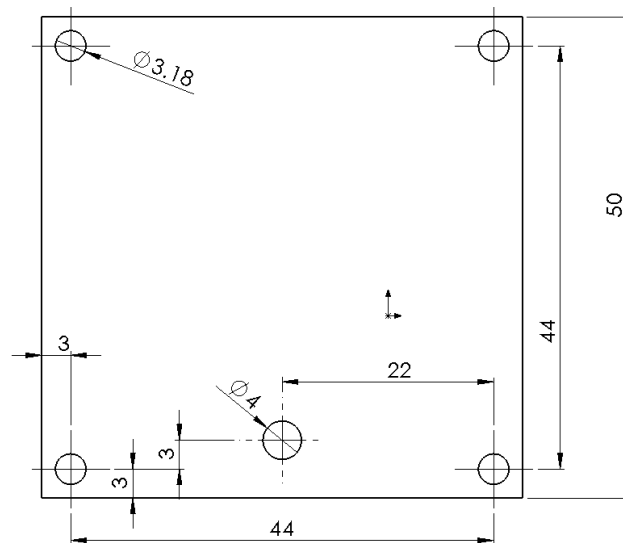


Fig. A. 11. Dimensiones de la placa de acero inoxidable (electrodo de referencia).

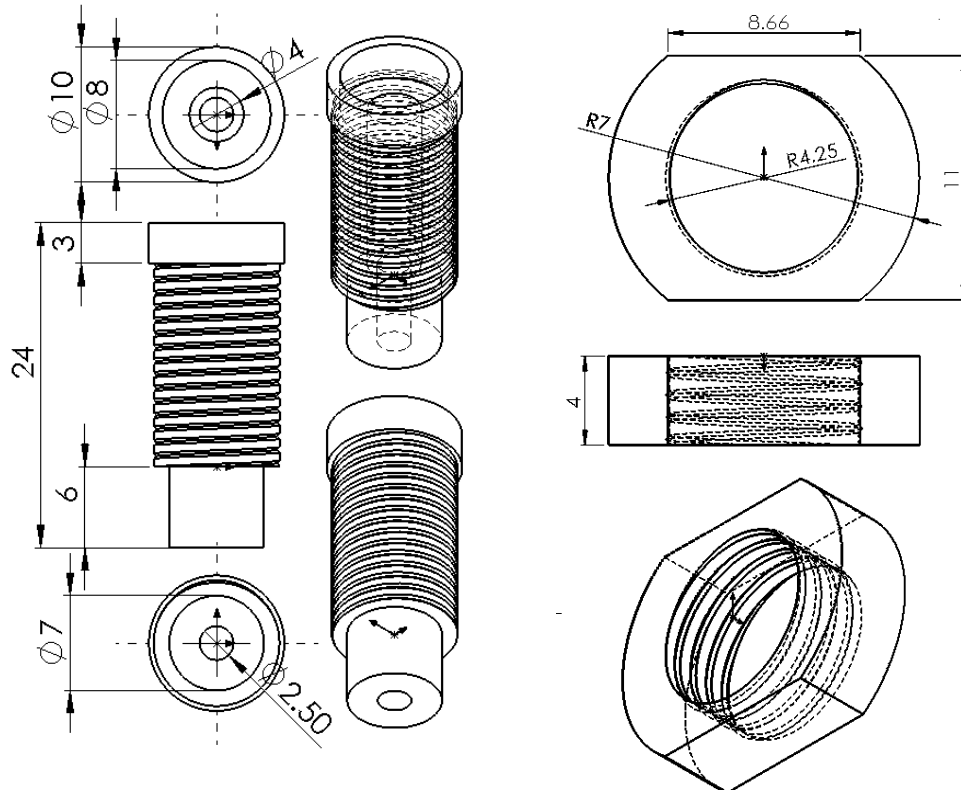


Fig. A. 12. Dimensiones del tornillo y tuerca de acrílico porta electrodo superior.

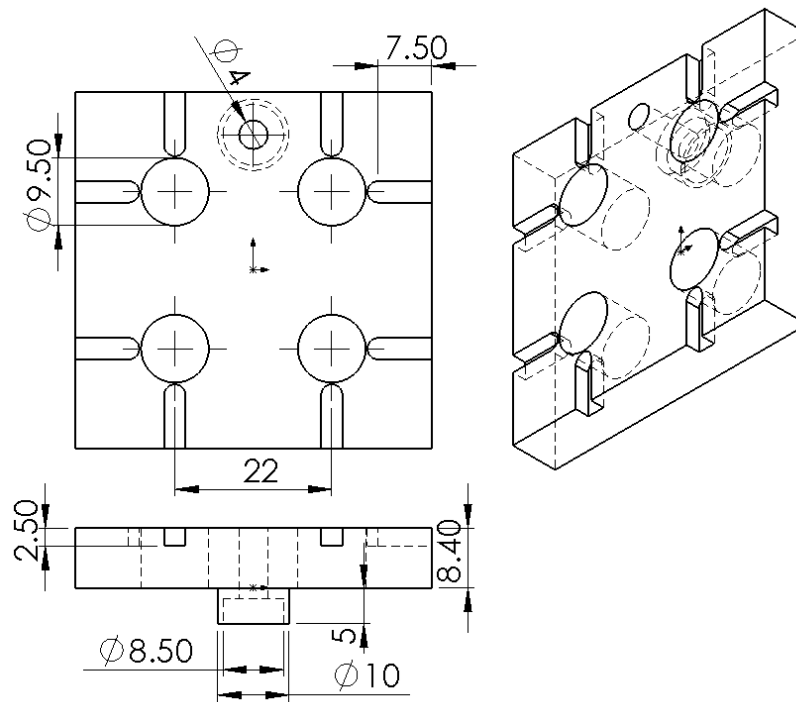


Fig. A. 13. Dimensiones de la tapa de acrílico.

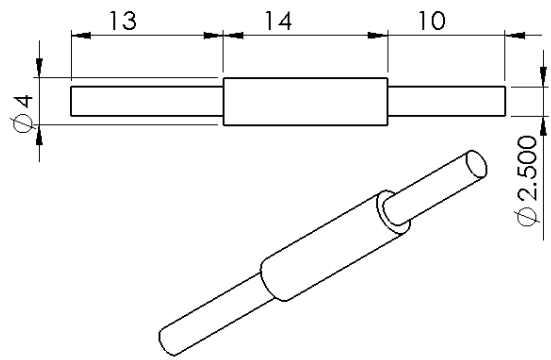


Fig. A. 14. Dimensiones del electrodo de acero inoxidable.

Piezas del generador de campo magnético

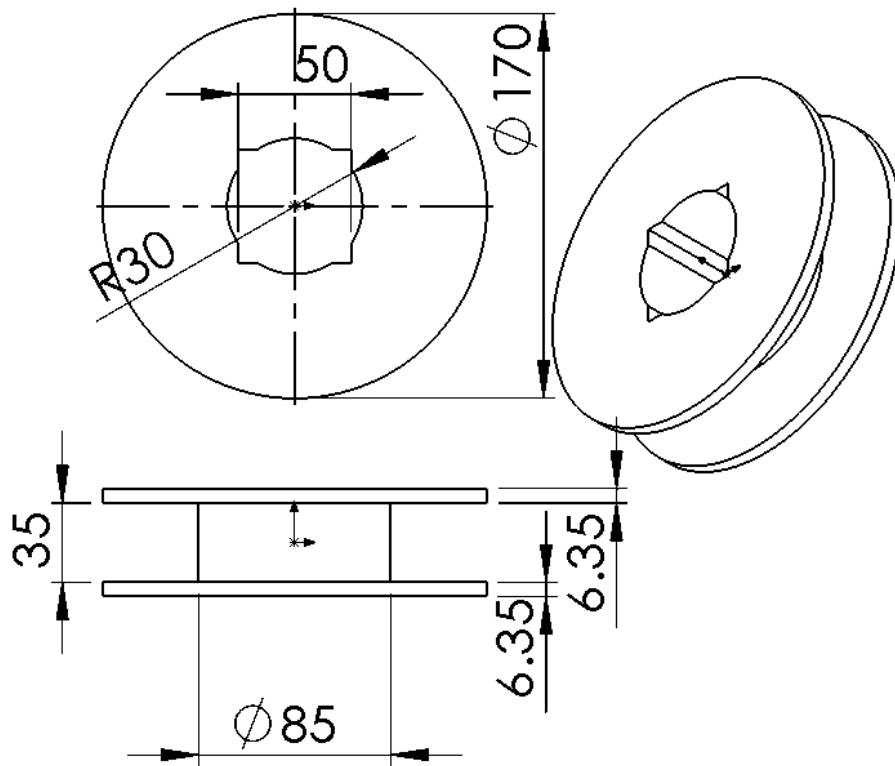


Fig. A. 15. Dimensiones del carrete superior de las bobinas Helmholtz.

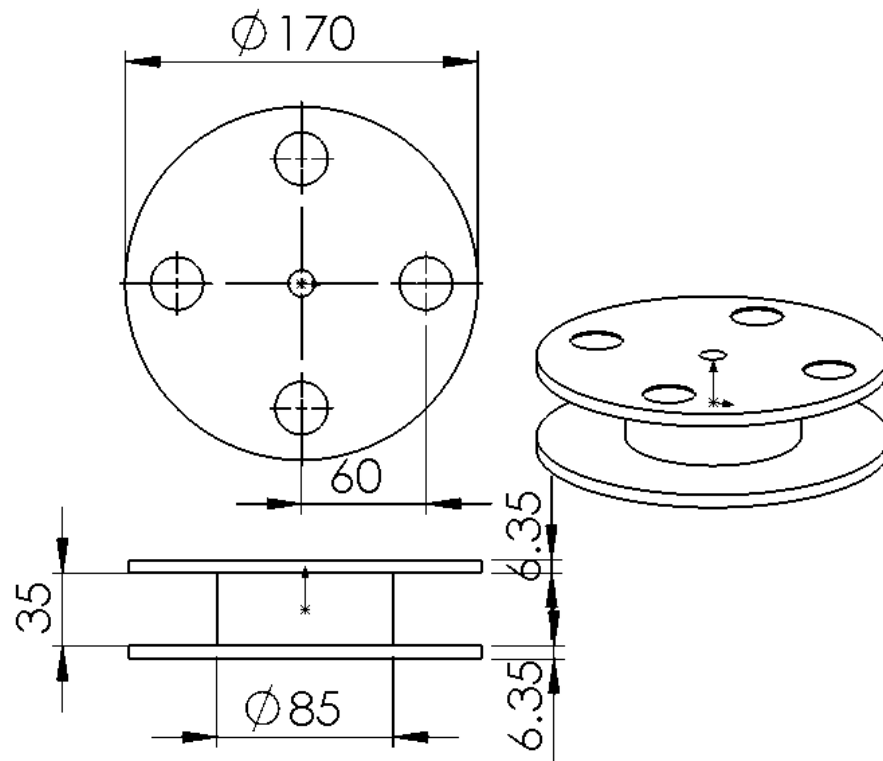


Fig. A. 16. Dimensiones carrete inferior de acrílico de las bobinas Helmholtz.

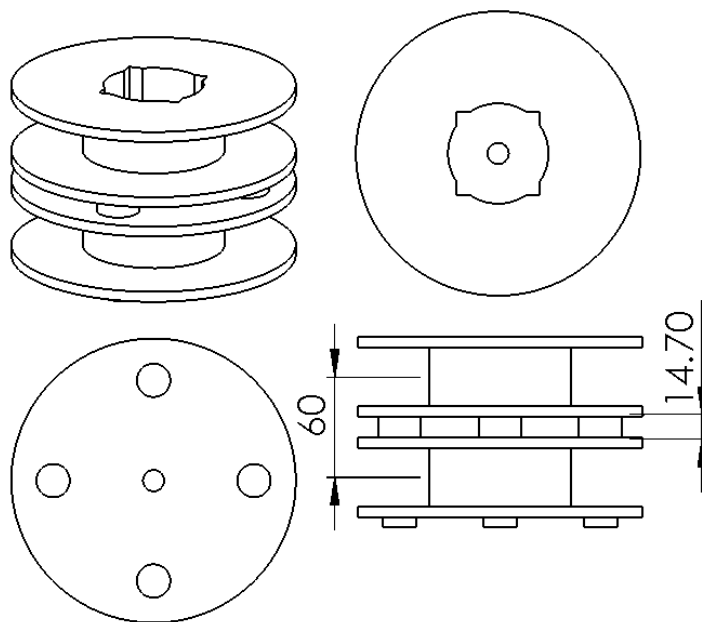


Fig. A. 17. Posicionamiento de los carretes de las bobinas Helmholtz.

Anexo 7. Metodología de experimentos biológicos

A 7.1 Sembrado de células MDCK en filtros permeables

1. Se tienen las células ya crecidas en cajas de Petri como se muestra en la siguiente imagen:

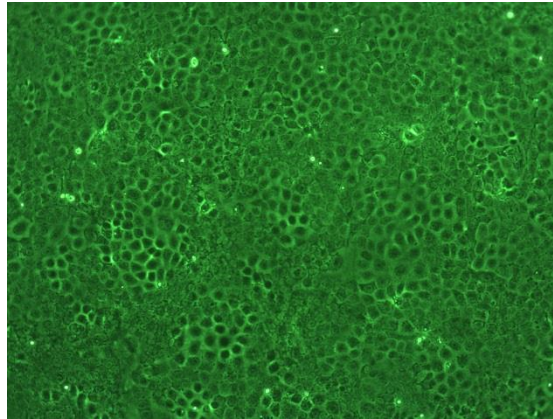


Fig. A. 18. Monocapa celular confluyente en la caja Petri.

2. Se lavan las células 3 veces con una solución salina amortiguada (PBS) y se dejan reposar un tiempo (5-10 min). Debido a que las uniones estrechas son dependientes de calcio, éste se les retira para facilitar su desprendimiento sin dañarlas.

En la siguiente imagen se pueden apreciar zonas más brillantes donde la monocapa celular se está separando.

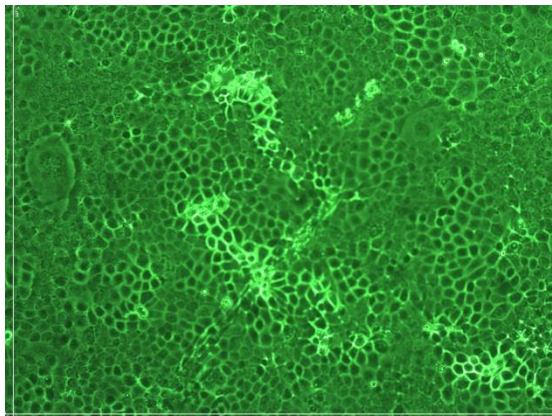


Fig. A. 19. Monocapa celular separándose por la acción del PBS.

3. Se le coloca tripsina (0.125%), que es una enzima que rompe los enlaces y permite que las células se terminen de desprender.

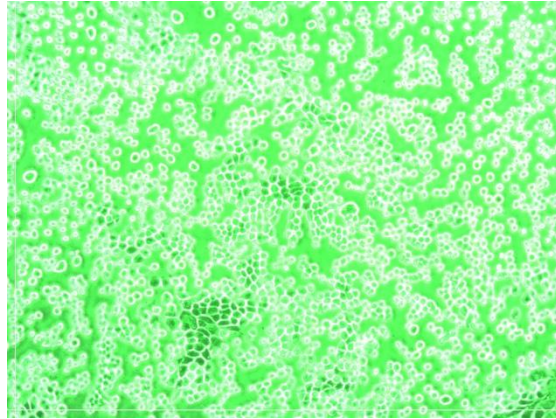


Fig. A. 20. Células separadas y desprendidas del fondo de la caja Petri.

4. Una vez que se separan las células, se colocan en un tubo de centrifuga para separarlas del medio y poder contarse.
5. Se colocan en la centrifuga por alrededor de 5 min a 1000 rpm.
6. Utilizando una cámara de Neubauer, en donde se colocan 10 μ l de una solución con células 10 μ l en 90 μ l de azul de tripano (0.4%) (para identificar las células muertas) y se cuentan las células dentro de un campo marcado por lo que nos da el número de células en 1 milímetro cúbico de solución.

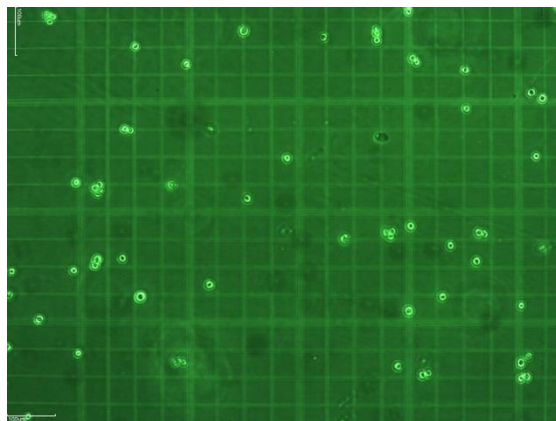


Fig. A. 21. Ejemplo de las células colocadas en la cámara de Neubauer.

En este caso se contaron 311 células vivas y 2 muertas en 5 áreas de la cámara de Neubauer

$$\frac{311}{5} = 62.2$$

Por lo que nos da como resultado: 62.2×10^5 cells/ml

Como se requieren sembrar 25,000 células en cada pozo se necesitan $4.02 \mu\text{l}$ de la suspensión.

- Una vez obtenida la suspensión con células se procede a sembrarlas en filtros Transwell® (Corning 3496) con una membrana de teflón (PTFE) de $3 \mu\text{m}$ de espesor y 6.5 mm de diámetro.

Los filtros previamente se dejan en medio de cultivo un día antes para que se humedezcan y se puedan utilizar para sembrar las células.

- Se coloca medio (DMEM con SFB 10% y antibiótico), $150 \mu\text{l}$ en la parte interior del pozo junto con los $4.02 \mu\text{l}$ de células y $1500 \mu\text{l}$ de medio solo en la parte exterior.

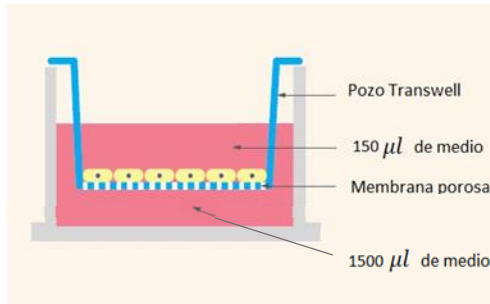


Fig. A. 22. Filtros Transwell® (Corning 3496) y la colocación del medio de cultivo.

En la siguiente imagen a la derecha se observan los diferentes tamaños de las células aproximadamente de $5 \mu\text{m}$ de diámetro hasta los $10 \mu\text{m}$ las más grandes.

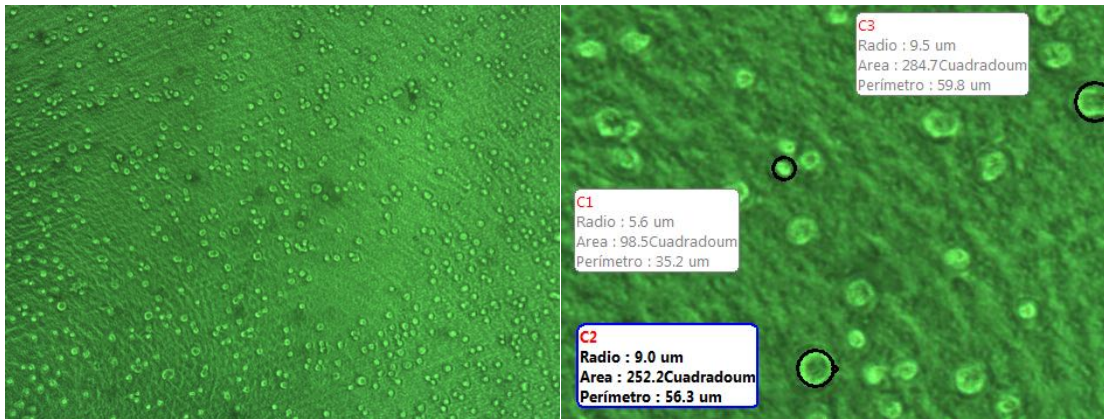


Fig. A. 23. Células sembradas en los filtros.

9. Se procede a almacenar los filtros en la incubadora.
10. Cada tercer día se realiza un cambio de medio, retirando el medio y colocándole nuevo, previamente calentado a 37°C en baño maría.

A 7.2 Procedimiento para el experimento comparativo con el dispositivo Millicell ERS-2 y el medidor de impedancia eléctrica.

1. Los filtros se observan en el microscopio y se colocan en la campana para medir la TEER con el dispositivo Millicell ERS-2.
2. Se colocan los electrodos de manera vertical.
3. Se presiona el botón de activación del dispositivo Millicell ERS-2.
4. Se leen los valores de TEER 3 veces.
5. Se trasladan los filtros a la cámara diseñada para medir la impedancia eléctrica, donde se mide la TEER con el dispositivo Millicell igual que el paso 4.
6. Se coloca la tapa con los electrodos y se enciende el medidor de impedancia eléctrica.
7. Se mide la impedancia eléctrica con el sistema desarrollado.
8. Las lecturas se obtienen en una computadora.
9. Los filtros se regresan de nuevo a la caja multipozos para hacer cambio de medio y se guardan en la incubadora. Todo este procedimiento se realiza en condiciones de esterilidad.

A 7.3 Procedimiento experimental con campo magnético y medición de impedancia.

1. Se siembran las células en los filtros permeables como en el anexo A 7.1
2. Las cámaras de medición de impedancia eléctrica se colocan con las células en la incubadora.
3. La impedancia eléctrica se registra cada 30 min.
4. Se deja crecer la monocapa celular hasta que llegue a confluencia (1 semana), después, se coloca la cámara con los insertos dentro de las bobinas y se aplica el campo magnético.
 - a. Las células son tratadas durante una hora con campos magnéticos con intensidad de 50 G a 60 Hz
 - b. Cada 4 h se repite el procedimiento
5. Se registra la impedancia eléctrica antes y después de cada exposición, tanto la de las células tratadas como las células control y se almacenan los valores registrados electrónicamente.

A 7.4 Procedimiento de los experimentos para evaluar la toxicidad de nitrilo en células MDCK

1. Las células MDCK se siembran por triplicado, 250 000 por pozo en cajas de 24 pozos. Dejar llegar a confluencia por 7 días.
2. Se hacen extractos acuosos de anillos de nitrilo 0.6 g en 8 ml de medio de cultivo.
 - a. Los extractos se obtienen al pesar diferentes cantidades del anillo de nitrilo que se pone en viales de vidrio con medio de cultivo.
 - b. Se mantienen por 24 h en agitación, en un baño a 37°C y se filtrarán con un filtro Millex gs para esterilizar la solución.
3. Se hacen diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000 de este extracto en medio de cultivo.
4. Al día 7, los cultivos de células MDCK confluentes se lavan con PBS y se aplica el tratamiento a las células en cultivo por 1 h, 2 h, 3 h, 6 h y 12 h.

5. Pasado ese tiempo, se recupera el sobrenadante y se levantan las células que aun queden adheridas para contarlas por el método de azul de tripano.

A 7.5 Procedimiento para el experimento del ensayo de cierre de herida.

1. Las células se siembran en caja Petri de 25 mm de diámetro. Cuando están confluentes, se les hace la herida con una punta amarilla de pipeta como en la siguiente figura:

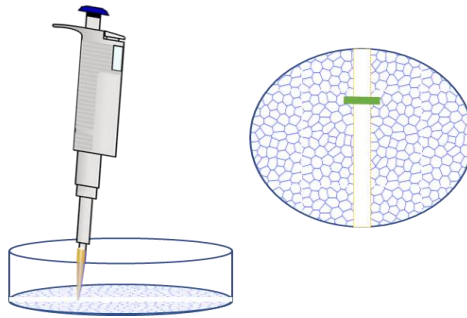


Fig. A. 24. Lesión de la monocapa celular.

2. Con un marcador permanente de colores se coloca un punto en la herida el cual sirve como guía para tomar las imágenes en el mismo lugar y poder comparar el cierre de la herida.
3. Bajo el microscopio de luz se toma una imagen con la cámara Moticam 2000 y su software Motic images, (Motic (Xiamen) Electric Group Co., Ltd, China).
4. Después se colocan las cajas de cultivo con las células en la zona central del generador de campo magnético y se les aplica el tratamiento con campos magnéticos con intensidad de 50 G @ 60 Hz por 60 min. El procedimiento se repite cada 4 h.
5. Las imágenes son tomadas cada 2 h y el tratamiento se efectúa cada 4 h.
6. Cuando se cierra la herida en todos los casos, se concluye el experimento.

A 7.6 Procedimiento previo a la técnica de inmunofluorescencia

1. Se siembran las células en cubreobjetos de 16mm dentro de las cajas de 24 pozos.
2. Se sigue el procedimiento de mantenimiento de las células hasta que lleguen a confluencia (cambio de medio cada tercer día).
3. Se levantan los cubreobjetos y se colocan en cajas Petri de 40 mm de diámetro (cuatro cubreobjetos por caja Petri), de modo que permita la colocación de las cajas Petri en un rack dentro del volumen de trabajo del arreglo de bobinas Helmholtz.

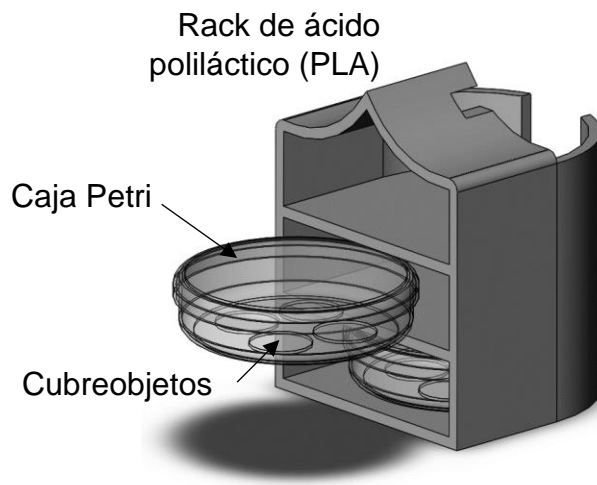


Fig. A. 25. Colocación de los cubreobjetos dentro del rack de PLA.

4. Se aplica el tratamiento de campo magnético.
5. Se realiza la técnica de inmunofluorescencia

A 7.7 Procedimiento para la técnica de inmunofluorescencia.

1. Hacer 2 lavados rápidos a las células con PBS filtrado.
2. Fijar la monocapa con metanol absoluto por 15 min en frío.
3. Retirar el metanol y esperar a que se seque.
4. Sellar la caja con parafilm y guardar hasta colocar los anticuerpos.
5. Lavar 3 veces de 5 min cada una con PBS 1x en agitación suave.
6. Permeabilizar las células confluentes con tritón por 15 min.
7. Hacer 2 lavados rápidos y 3 de 5 min con PBS.
8. Bloquear los sitios inespecíficos con 30 μ l de Albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5% a 4°C durante 30 min.
9. Poner 30 μ l del primer anticuerpo diluido en BSA a la concentración marcada por el proveedor.
10. Incubar toda la noche a 4°C en una cámara húmeda.
11. Poner el segundo anticuerpo fluoresceína durante 60 min a temperatura ambiente cubriendo la preparación con papel aluminio para evitar luz directa.
12. Lavar 3 veces con PBS durante 5 min cada uno en agitación suave.
13. Lavar 2 veces con agua des ionizada y filtrada durante 5 min cada uno
14. Montar la preparación en un portaobjetos
15. Guardar a 4°C protegido de la luz hasta realizar la microscopia confocal.

A 7.8 Procedimiento para la esterilización de los sistemas desarrollados.

Procedimiento de esterilización de las cámaras de medición de impedancia eléctrica

- Se lavan y se sumergen las cámaras dentro de una solución jabonosa durante 24 h.
- Se trasladan y sumergen en una solución de agua e hipoclorito de sodio durante 24 h.
- Se trasladan y sumergen en una solución de agua y ácido clorhídrico durante 24 h.
- Se enjuagan con agua desionizada.
- Se trasladan a un escurridor hasta que se sequen por completo.
- Se sumergen en una solución de etanol al 70% durante 2h.

Se dejan escurrir dentro de la campana de flujo laminar encendida.

Procedimiento de esterilización del generador de campos magnéticos.

- Se limpia la superficie de las bobinas con toallas de papel y etanol al 70%.
- Se colocan las bobinas dentro de una cámara de esterilización mediante radiación ultravioleta durante 24h.
- Se trasladan las bobinas a la campana de flujo laminar y se deja orear con la campana encendida durante 24 h.

Anexo 8. Experimento de la toxicidad del nitrilo

Se sembraron células MDCK por duplicado en cajas cuadradas de 8 divisiones en una concentración de 25,000 Células/ml.

Se dejaron hasta llegar a confluencia, cambiándoles el medio de rutina cada tercer día.

Una vez llevadas a confluencia se les aplicó tratamiento de la siguiente forma:

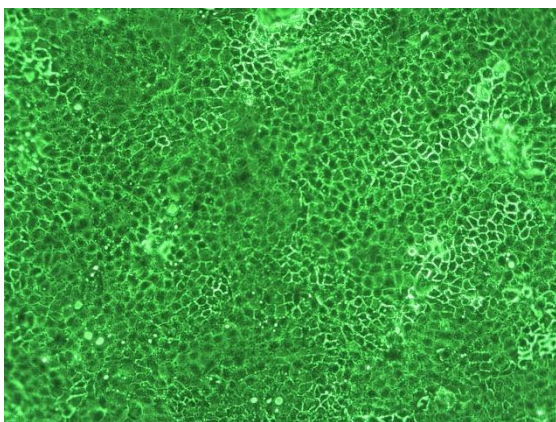
TABLA A. 2. CONCENTRACIONES DE LA SOLUCIÓN DE NITRILO PARA EL TRATAMIENTO CELULAR

Control	Diluciones* Concentración Nitrilo (Tratamiento)			
Control 1	1:1000 Extracto 1	1:100 Extracto 1	1:10 Extracto 1	
Control 2	1:1000 Extracto 2	1:100 Extracto 2	1:10 Extracto 2	

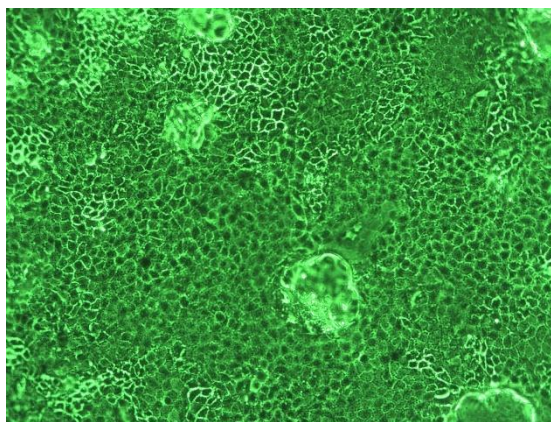
*Las diluciones del nitrilo se obtuvieron de un extracto de anillos de nitrilo sumergidos en medio con agitación constante durante 24 h.

Las células se mantuvieron en la incubadora y con el tratamiento 24 h.

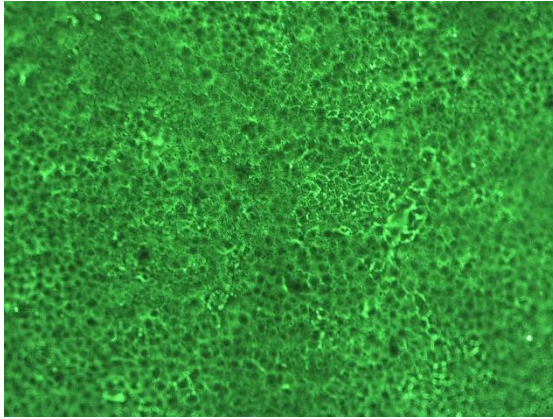
Se observaron las cajas con las células mediante microscopio y se registraron mediante una capturadora de imágenes, y el resultado de las imágenes fueron las siguientes:



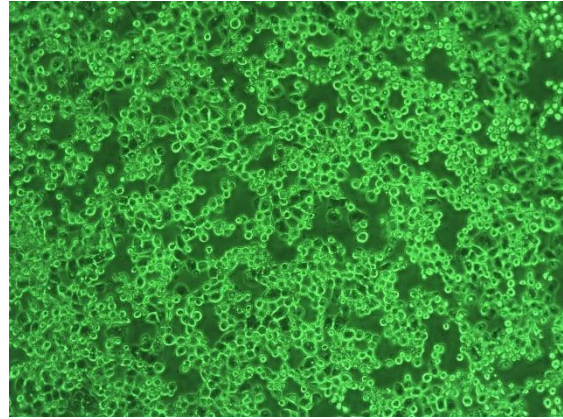
Control



Concentración 1:1000



Concentración 1:100



Concentración 1:10

Fig. A. 26. Fotografías de las células con cada una de las concentraciones.

A simple vista podemos observar como en la concentración mayor de tóxico las células se desprendieron de la base mientras que en las otras concentraciones parece integra la monocapa.

Para obtener el número de células que se despegaron de la base, se optó por extraer el sobrenadante de cada una de las cajas, centrifugarlo y contar las células en la cámara de Neubauer.

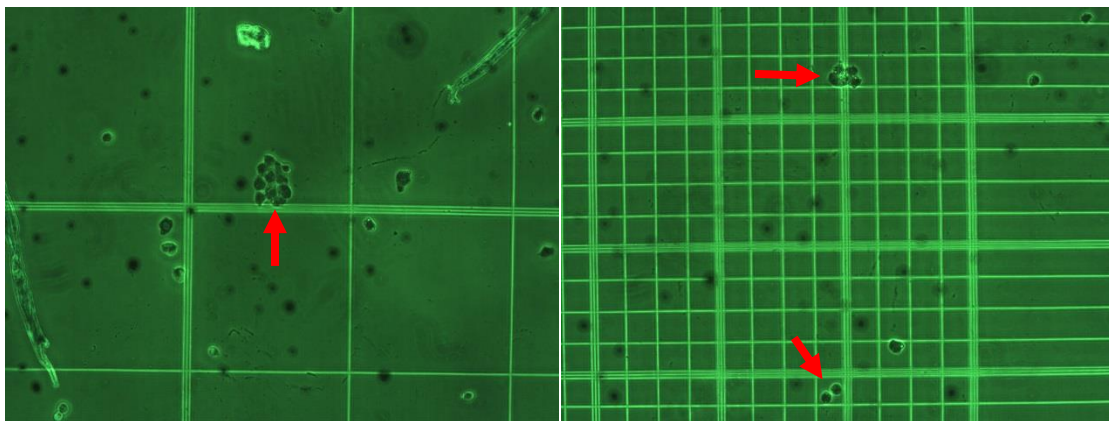


Fig. A. 27. Imágenes de la Cámara de Neubauer.

En las imágenes se pueden observar las células muertas teñidas de azul por el azul de tripano aún unidas entre sí.

Los resultados del conteo de células en el sobrenadante se muestran en la Fig. A. 28.

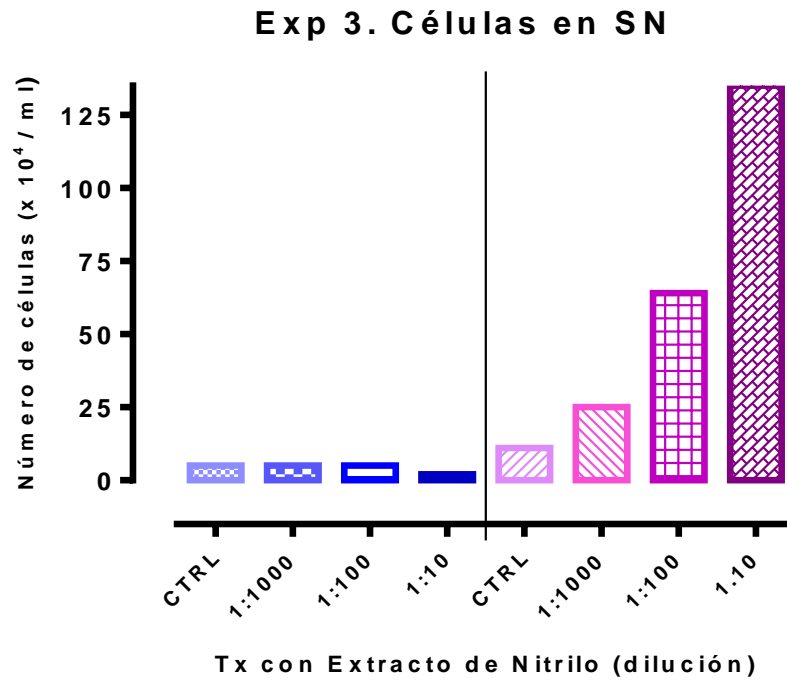
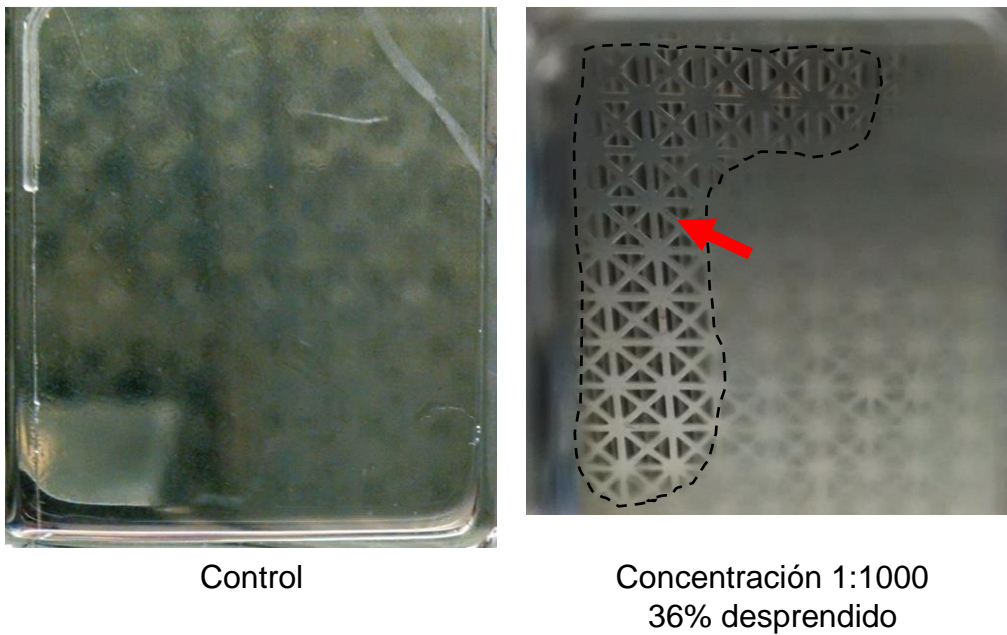


Fig. A. 28. Número de células en sobrenadante.

Al retirar el sobrenadante se observó a simple vista como una parte de la monocapa se desprendió como se puede observar en la Fig. A. 29.



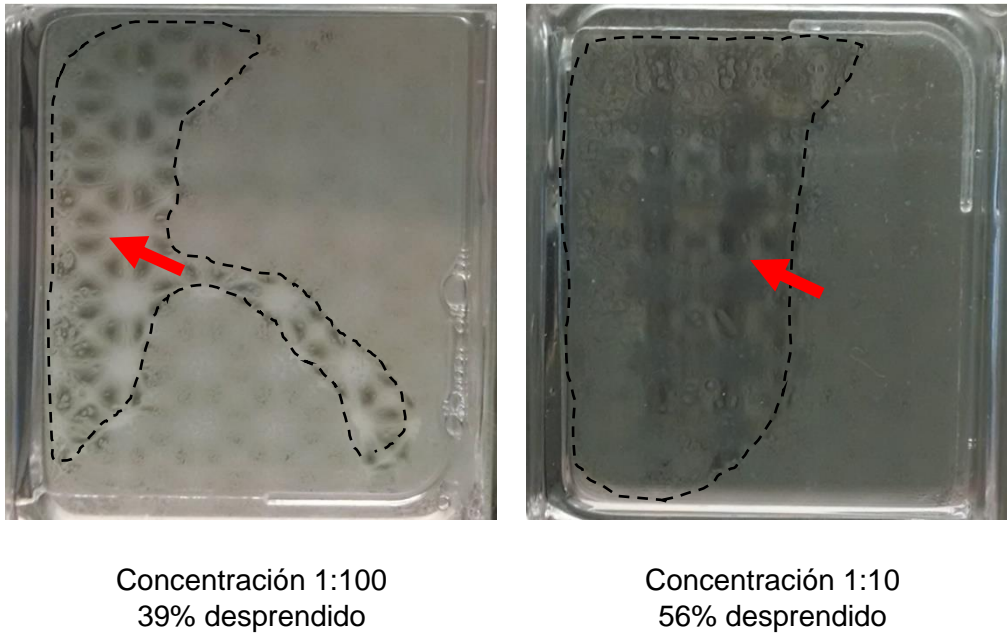


Fig. A. 29. Imágenes del desprendimiento de la monocapa.

Se realizó el procedimiento para levantar las células permanecieron pegadas a la base mediante el uso de tripsina y centrifugado para después contarlas con la cámara de Neubauer y los resultados se observan en la Fig. A. 30. Número de células levantadas con Tripsina.

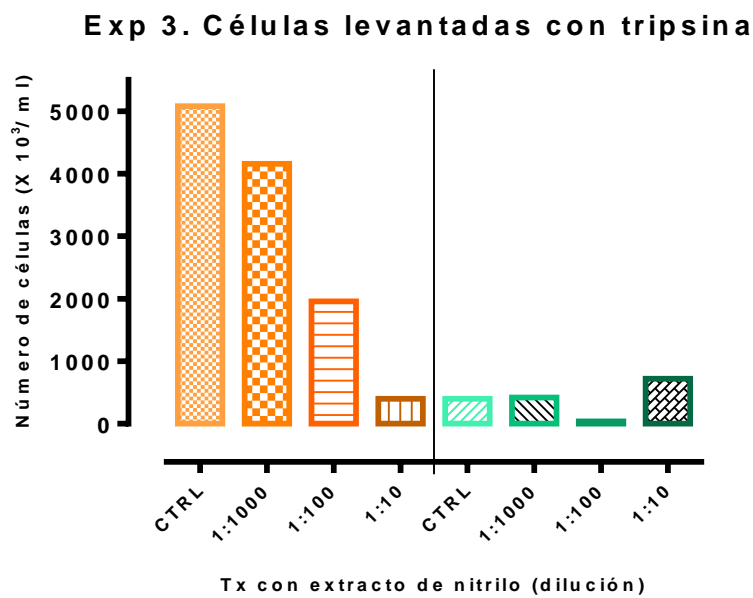


Fig. A. 30. Número de células levantadas con Tripsina.

Conclusiones del experimento de la toxicidad del nitrilo.

Al comparar las Fig. A. 28 y Fig. A. 30 podemos observar la relación entre ellas de la siguiente manera:

La primera parte de Fig. A. 28. muestra un bajo contenido de células en el sobrenadante esto quiere decir que permanecieron pegadas y se pudieron contar al momento de levantarse con la tripsina.

La Fig. A. 30 muestra un alto contenido de células en el sobrenadante y por consiguiente un bajo contenido en las células levantadas con tripsina.

En conclusión, existe una relación entre las células expuestas a tratamiento con extracto de nitrilo y el número de viabilidad de dichas células la cual es inversamente proporcional a la concentración de nitrilo en el medio de cultivo.

Anexo 9. Diagramas y circuitos electricos

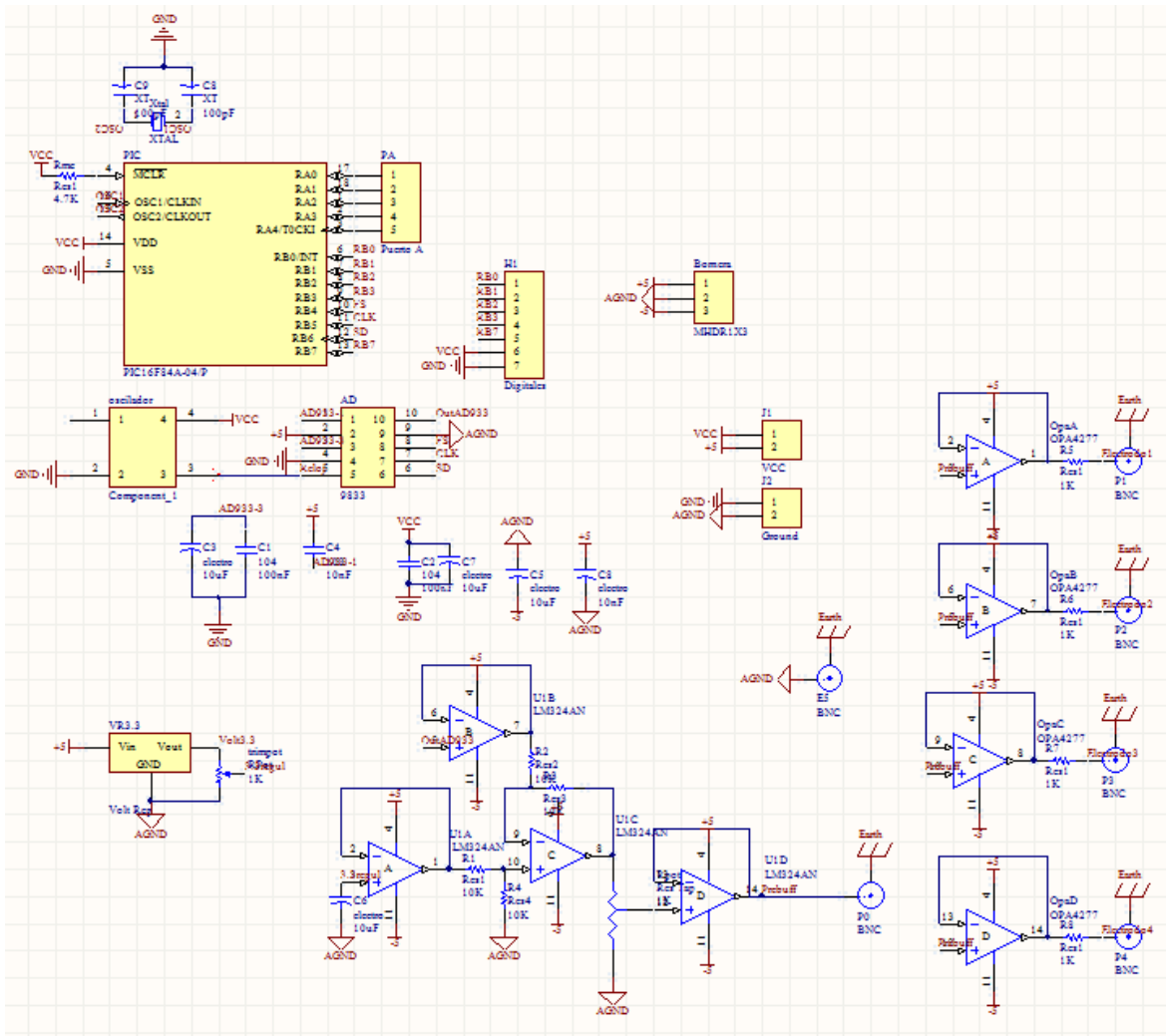


Fig. A. 31. Diagrama esquemático de la tarjeta control del medidor de impedancia eléctrica.

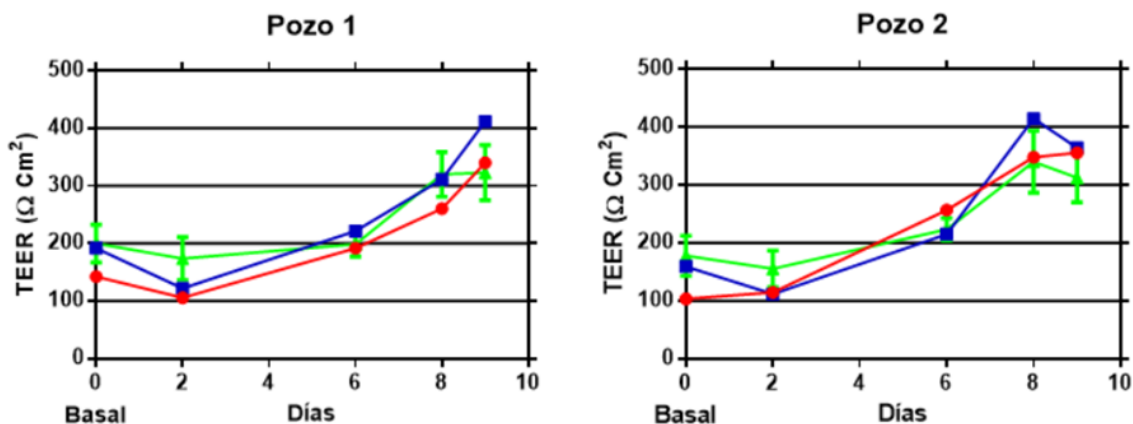
Anexo 10. Comparación del sistema desarrollado contra el medidor comercial de TEER Millicell ERS-2

Siempre que se desarrolla un sistema, se requiere verificar que cumpla con las especificaciones u objetivos para los cuales fue desarrollado, ya sea en el apartado de software o en el hardware. En nuestro caso, proponemos realizar pruebas de validación con monocapas celulares.

La primera prueba de validación consistió en comparar el sistema de medición de impedancia eléctrica con el medidor de TEER Millicell ERS-2 (Merck KGaA, Alemania) en diferentes condiciones: a) Mediciones de TEER en los filtros permeables con las células con el medidor comercial dentro de una caja multipozos, b) Mediciones de TEER en los filtros permeables con las células con el medidor comercial dentro la cámara desarrollada y c) Cálculo de la TEER a través de la medición de impedancia eléctrica con el sistema dentro de la cámara desarrollada. En el anexo 7.2 se describe el procedimiento efectuado. Se aseguró que el procedimiento fuera el mismo todos los días, por lo que se describe un solo procedimiento y se presentan los resultados.

Mediciones de TEER en diferentes circunstancias

Los resultados de la prueba de validación de la medición de TEER utilizando el medidor comercial Millicell ERS-2 y el sistema medidor de impedancia eléctrica desarrollado, se observan en la Fig. A. 32. En las imágenes se observa como la TEER aumenta al transcurrir los días lo cual indica que las células se encuentran creciendo para formar la monocapa celular.



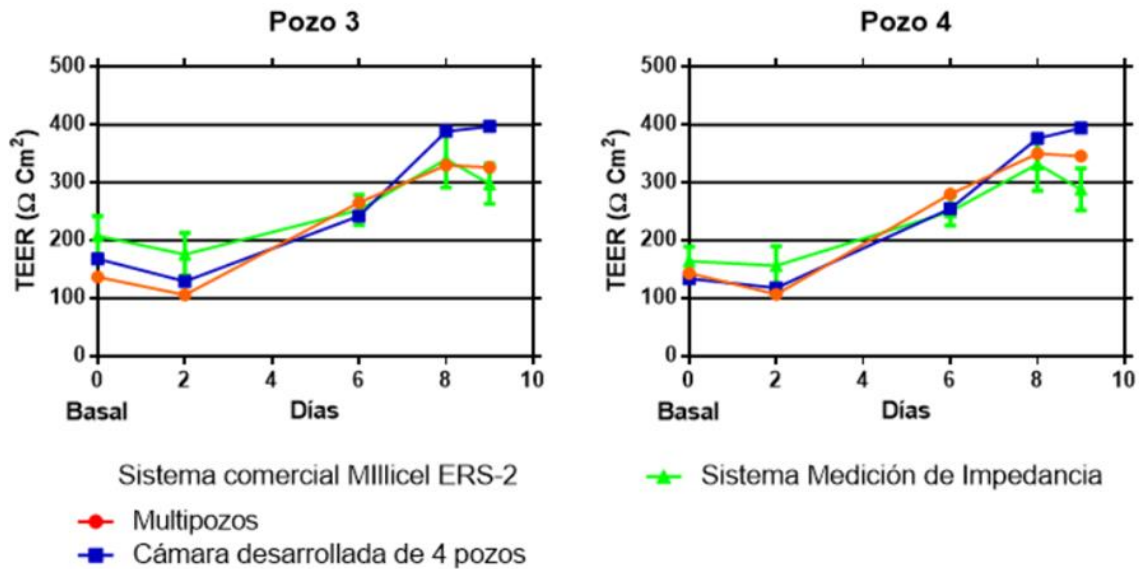


Fig. A. 32. Comparativa de las mediciones de TEER con el sistema comercial Millicell ERS-2 en 2 condiciones y el Sistema de medición de impedancia eléctrica desarrollado. Se observan las mediciones realizadas en un periodo de 9 días.

Seguimiento de la monocapa celular mediante imágenes de microscopio.

Simultáneamente, se tomaron imágenes de la monocapa celular en diferentes días. Esto, para llevar una relación entre el crecimiento de las células y la resistencia TEER.

Las imágenes obtenidas mediante el microscopio (Fig. A. 33) muestran la evolución de la monocapa celular a través del tiempo. Cabe señalar que las fotografías se encuentran en alta resolución, pero para efectos de este reporte se redujeron de tamaño.

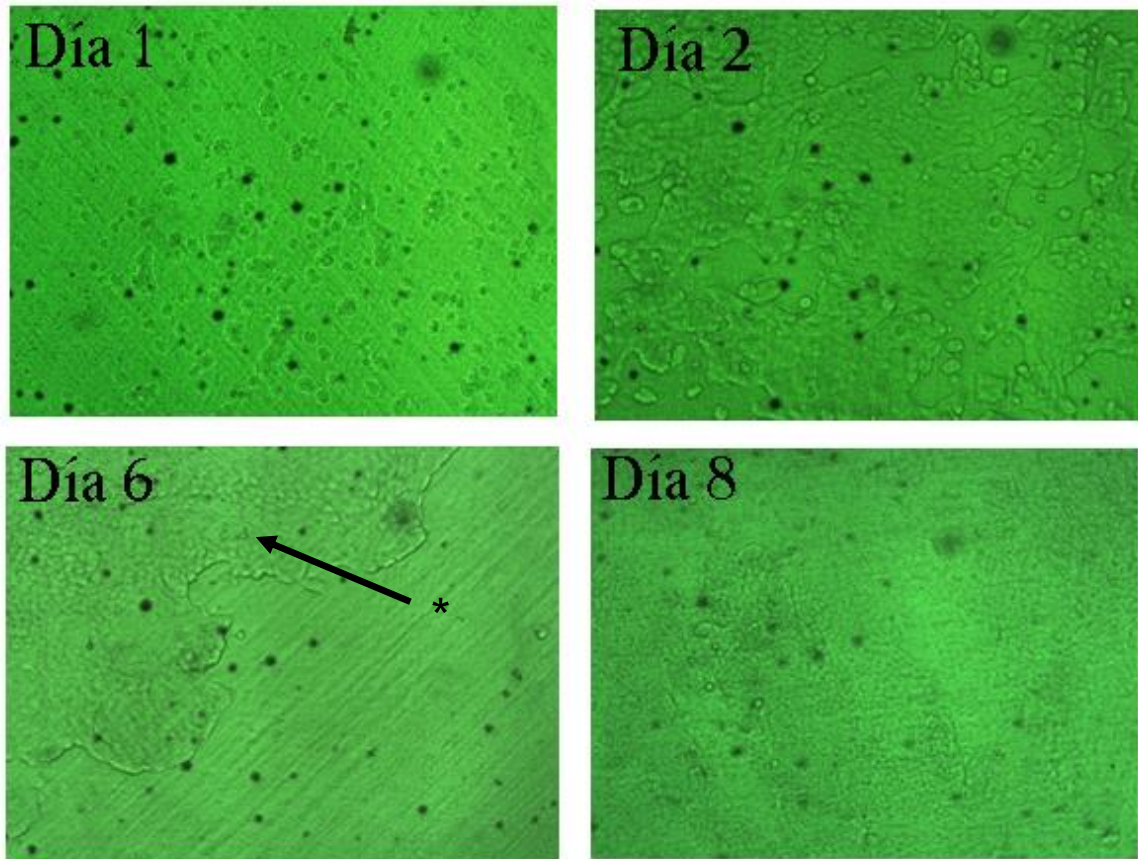


Fig. A. 33. Evolución de la monocapa celular los días de cambio de medio a partir del momento de sembrado. * Indica la posición de la monocapa celular parcialmente confluyente.

Las imágenes muestran un aumento en la división celular respecto al paso del tiempo. Se observa el comportamiento normal de la monocapa para recubrir toda la zona del filtro permeable. En el caso del día 6, la imagen se tomó en una orilla del filtro para que se observara que la monocapa celular aún no estaba confluyente.

Seguimiento de la impedancia eléctrica transepitelial

En la Fig. A. 34 se muestran las imágenes de la magnitud de las impedancias eléctricas. Se aprecia en escala logarítmica las diferentes formas de onda a través del tiempo. También muestra como a partir de la imagen del sexto día la meseta se aprecia más por el efecto en la TEER.

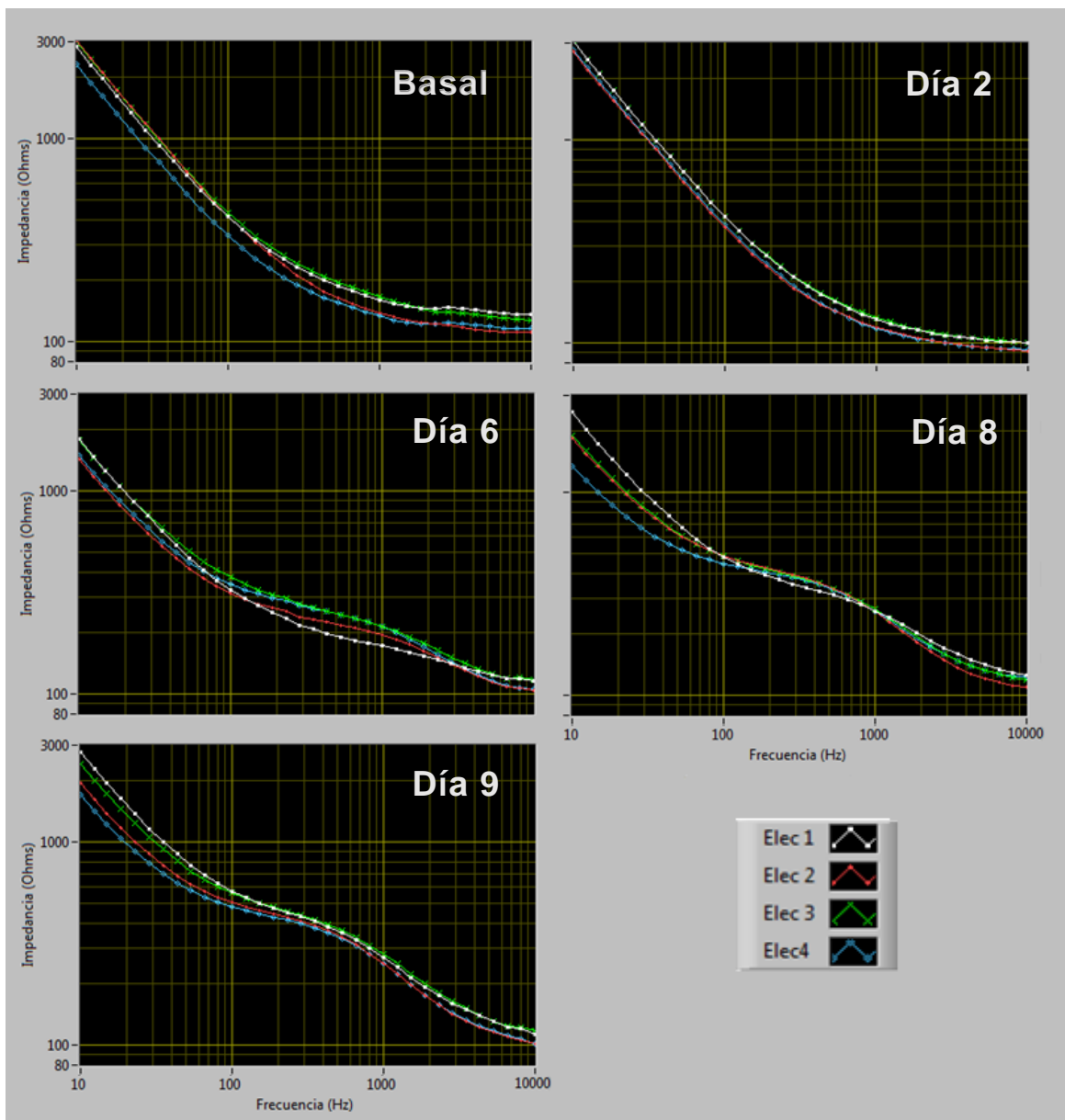


Fig. A. 34. Gráficas de la magnitud de la impedancia eléctrica transepitelial a través de los días desde el sembrado.

Development of a Magnetic-field Stimulation System for Cell Cultures *in situ*: Simulation by Finite Element Analysis

G. Domínguez¹, S. Arias², José L. Reyes³, and Pablo Rogeli^{1*}

¹The Electrical Engineering Department, Center for Research and Advanced Studies, Ave. IPN 2508 Zacatenco 07360, Mexico City, Mexico

²Electronics Department, Autonomous Metropolitan University, Ave. San Pablo Xalpa 180, Azcapotzalco, C.P. 02200 Mexico City, Mexico

³Physiology, Biophysics and Neuroscience Department, Center for Research and Advanced Studies, Ave. IPN 2508 Zacatenco 07360, Mexico City, Mexico

(Received 9 March 2017, Received in final form 11 May 2017, Accepted 7 June 2017)

The effects of exposure to an extremely low-frequency magnetic field (25 Hz 20G) on animal cells have been studied. In some reports, stimulation was performed for fixed frequency and variations in magnitude; however, animal-cell experiments have established that both parameters play an important role. The present work undertook the modeling, simulation, and development of a uniform-magnetic-field generation system with variable frequency and stimulation intensity (0-60 Hz, 1-25G) for experimentation with cell cultures *in situ*. The results showed a coefficient of variation less than 1 % of the magnetic-field dispersion at the working volume, which is consistent with the corresponding simulation results demonstrating a uniform magnetic field. On the other hand, long-term tests during the characterization process indicated that increments of only 0.4°C in the working volume temperature will not be an interfering factor when experiments are carried out in *in situ* cell cultures.

Keywords : magnetic field, extremely low frequency, helmholtz coils, hall effect, pulsed magnetic field.

1. Introduction

Studies on the effects of exposure of animal cells to non-ionizing radiation of extremely low-frequency magnetic field (ELFMF), i.e. fields whose energy is not sufficient to break the molecular bonds, have been performed [1]. Some of these effects are the rise in tissue temperature produced by energy absorption [2], modifications in Deoxyribonucleic Acid (DNA), alterations in the processes of cell proliferation, and apoptosis inhibition [3-5]. Collagen-synthesis improvement due to the application of magnetic fields to animal tissue also has been reported [6, 7]. The present studies were performed using a variable magnetic-field magnitude and a fixed frequency. A number of experiments applying static magnetic fields already have been reported. For example, Fanelli *et al.* demonstrated increased cell survival by magnet-induced

inhibition of apoptosis [8]. Introducing an alternative means of extremely-low-frequency magnetic-field (ELFMF) generation with permanent magnets in rotation using stepper motors, Y. Ren *et al.* generated a maximum-15 Hz rotating magnetic field. They found that the application of their procedure can affect blood pressure in the cerebral cortex [9]. As for magnetic-field exposure effects as functions of the variation of both frequency and magnitude in cell-culture stimulation [6, 7], however, there have been few reports. This line of investigation, therefore, needs to be further explored.

Factors such as temperature, humidity, concentrations of O₂ and CO₂, nutrients and light, among others, are fundamental to the care, maintenance, and development of cell cultures [10, 11]. Adequate control of those factors, therefore, must be guaranteed in order to avoid any change that leads to error in the interpretation of their effects due to the application of magnetic fields.

Our working hypothesis is that experimentation with cell cultures exposed to ELFMF variable in frequency and amplitude [6, 7] must be *in situ* and within a con-

©The Korean Magnetism Society. All rights reserved.

*Corresponding author: Tel: +52-55-5747-3800

Fax: +52-55-5747-3887, e-mail: pablo.rogeli@cinvestav.mx

trolled environment so as to guarantee that the effects observed were due only to the stimulus of the magnetic field. In this sense, it is important to develop a system for generation of magnetic fields variable in magnitude and frequency that yet preserves normal cell-culture conditions.

This paper presents the modeling, simulation, and development of a system for generation of uniform magnetic fields variable in magnitude and frequency for compatibility with *in situ* cell cultures within an incubator environment.

2. Materials and Methods

2.1. Magnetic-field generator: Simulation and design criteria.

To guarantee a uniform magnetic field in a working volume, it is necessary to establish some configurations or arrangements of coils such as the square coil systems (Merritt, Alldred & Scollar, and Rubens) and circular coil systems like those of Lee-Whiting and Helmholtz [12, 13]. Moreover, these systems should be able to work with both direct and alternate current since magnetic-field stimulation is needed for *in situ* cell cultures.

The Helmholtz configuration was chosen to generate a uniform magnetic field due to its simplicity, efficiency, and small size because this generator will be housed in an incubator whose volume is relatively small, 0.184 cubic meters (TC 230, Thermo Scientific Forma, Thermo Fisher Scientific, USA). This configuration consists of a pair of coils of equal size placed on the same axis and separated by a distance equal to its radius.

The magnitude of the magnetic field of this Helmholtz coil arrangement is directly proportional to the circulating current I and the number of turns N of each of them, and inversely proportional to the separation of the coils; in this case, the same as radius R . According to Biot-Savart's law, the magnetic field B can be calculated based on the current in the coils, as given by Eq. (1) [14].

$$B(z) = \frac{1}{2} \mu_0 N I R^2 \left\{ \left[R^2 + \left(z + \frac{R}{2} \right)^2 \right]^{-\frac{3}{2}} + \left[R^2 + \left(z - \frac{R}{2} \right)^2 \right]^{-\frac{3}{2}} \right\} \quad (1)$$

Where:

z is the distance from the center of the coils to a point where a uniform field should be observed.

μ_0 is the permeability (Tm/A).

The magnetic field distribution is considered to be uniform at the center of the coils, i.e., $z = 0$.

Thus Eq. (1) is reduced to Eq. (2)

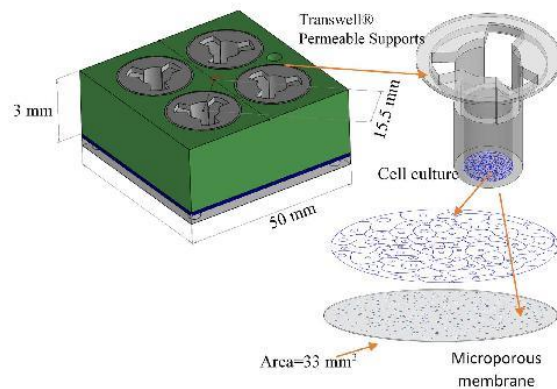


Fig. 1. (Color online) Chamber designed and built specifically for the placement of cell cultures.

$$B(0) = \frac{16}{5\sqrt{5}} \frac{\mu_0 N I}{R} = 1.43 \frac{\mu_0 N I}{D} \quad (2)$$

Eq. (2) shows a relatively simple way to define the parameters of a magnetic field generator based on Helmholtz configuration.

2.2. Design parameters of the magnetic field generator

2.2.1. Definition of working volume

Because the experimental protocol to be implemented contemplates an arrangement of four experimental samples of cell cultures to observe the effects of the magnetic field radiation, a chamber with four independent wells for the placement of these cultures was designed and built, see Fig. 1. To define the working volume of the Helmholtz configuration, the characteristics and physical dimensions of the chamber were considered. It is in these wells where the permeable inserts, which would contain the culture cells, would be placed.

2.2.2. Simulation and Modeling

A computer software based on finite element analysis called COMSOL Multiphysics® was used to simulate and model different excitation conditions of magnetic radiation at the border of cell cultures seeded in the permeable inserts to avoid uncertainty in the design and operation of the physical model of the magnetic-field generator. This simulation allowed to experiment with the physical and electrical characteristics of the field generator to obtain the uniformity of the working volume required for the conditions of the experimental protocol.

The data obtained from COMSOL Multiphysics® allowed us to implement, with a good approximation, the physical design of the generator as well as to define the

best placement of the chamber which contains the experimental cell cultures.

2.2.3. Considerations for the design of the magnetic field generator for the simulation

The design of the magnetic field generator took into consideration the results of several simulated tests, the working volume required due to the physical characteristics of the chamber for the cell cultures, and that cell cultures were going to be exposed to the radiation of a magnetic field variable in frequency. The Helmholtz coil array model was designed with a CAD program in a 3D environment compatible with COMSOL Multiphysics®.

The generated three-dimensional model was exported to COMSOL Multiphysics®, using the “AC-DC, Magnetic fields, stationary study” module, to observe the magnetic field conditions in the working volume.

Two important aspects considered during the simulation were the determination of the boundary conditions, achieved by the subdivision of the model of interest, called mesh; and the choice of materials according to the environment in which the system was going to work.

An extra fine meshing was assigned to the working region to provide a better resolution of the simulation parameters of the chamber which contained the filters, while a thick mesh was chosen for the surrounding areas to avoid a high computational cost since the information in these regions was not relevant.

2.3. Physical prototype

The parameters considered in the model to design and build the physical coils prototype were 900 turns of copper wire AWG 17, 60 mm radius, and 32.7 mm of the separation between them.

Acrylic was chosen to build the support for the coils because it does not have ferromagnetic characteristics that could interact directly with the magnetic field, it has an

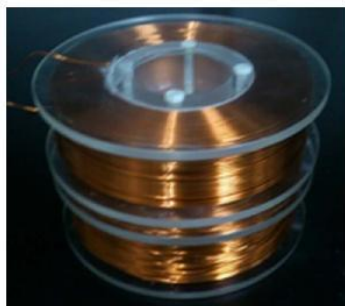


Fig. 2. (Color online) The physical arrangement of Helmholtz coils, acrylic structure.

adequate mechanical resistance, and it is light and easy to clean. Figure 2 shows the physical prototype of Helmholtz coils.

Probable increments of temperature were considered for the design of the coils because of two reasons: first, experiments with cell cultures may involve prolonged times, and second, the inherent changes in the wire current and impedance as consequence of the increment of both the frequency and the magnitude of the magnetic field during the tests. Since the impedance of the coils was modified, it was necessary to compensate with voltage increments to sustain the current that defined the magnetic field, as shown in Eq. (2). For cell culture research protocols, these temperature increments should not go beyond to what cells can tolerate without suffering stress, which is 0.5° above 37°C.

2.3.1. Instrumentation

In order to evaluate the physical model developed, five Hall effect sensors UGN3503 (Allegro MicroSystems, USA) were used to measure the magnetic field distribution. Also, an LM35 sensor (Texas Instruments, USA) was used to measure the temperature. The information from the sensors was digitalized using a NI-USB 6218® data acquisition card (National Instruments, USA), of 16 bits to 250 kS/s. The acquisition and processing of data, the configuration and excitation of the coils, and the storage and visualization of the information were made using a graphic interface developed in the visual platform LabVIEW®.

2.4. Characterization of magnetic field sensors

The five Hall effect sensors were characterized to observe the performance of the magnetic field generator on the working volume. Each sensor was placed parallel to a reference sensor, Gauss/Tesla Meter 5180 (FW BELL, USA), at the center of the Helmholtz coil array, thereby ensuring the same magnetic-field radiation conditions. This reference sensor measures the magnetic field in a range of 0.1 G to 30 kG with a bandwidth of 0-20 kHz

Table 1. Mathematical model for adjustment of the sensors data.

Y= aX+b	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3	Sensor 4	Central Sensor
a	525	582.7	579.9	531.3	767.5
b	-1247	-1403	-1416	-1279	-1874
R ²	0.9998	0.9999	0.9999	0.9998	0.9998
*Corr	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999

*Corr correlation of reference and each sensor

and an accuracy of 1.1 %. For this procedure, the information of three magnetic field magnitude scans was recorded in the range 1.5 to 40 G.

A model of linear regression adjustment was applied to the data obtained from the measurements of each of the Hall effect sensors compared with the reference sensor; the results are shown in Table 1. Additionally in this table, the correlations of the reference and each sensor are presented. The results showed that the responses of all sensors are lineal and they have a good correlation with the reference sensor.

2.5. Evaluation of the physical system

Experiments with direct and pulsed current were carried out for this evaluation because the protocol of experimentation intended to be implemented with cell cultures requires frequencies from 0 to 60 Hz. The graphical interface developed in LabVIEW® was used in conjunction with the Helmholtz configuration to generate the desired magnetic field.

2.5.1. Tests with direct current

The uniformity of the magnetic field was verified using an array of four Hall effect sensors according to the distribution shown in Fig. 3 and the position of the wells for the cell cultures. The information obtained was validated by the commercial reference FwBell, labeled as Ref.

Ten series of measurements of the magnetic field were carried out for twenty intensities, from 1.5 to 40 G. Both the mean and the standard deviation of the ten series of measurements made for the 4 Hall effect sensors were determined.

The coefficient of variation (CV) was computed to offer the measure of statistical dispersion between all Hall effect sensors. The CV is the ratio of the standard deviation

and the mean of the magnetic field given by the four sensors corresponding to each well, eq. (3), this parameter was determined for the twenty intensities of each magnetic field magnitude. A low CV value indicates a uniform distribution of the magnetic field in the working volume.

$$cv(\%) = \frac{STD}{Mean} \times 100 \quad (3)$$

2.5.2. Tests with pulsed magnetic fields

In order to observe the behavior of the magnetic field related to the frequency and temperature changes, tests with the pulsed magnetic field in two conditions were performed; the first was at room temperature (24.6°C) and the second was inside the commercial incubator TC 230 (36.7°C). It should be mentioned that the cell cultures within an incubator should commonly be kept at a temperature of 36.5°C ± 0.5°C [10, 11]. For these tests, a Hall effect sensor was used in the central region of the coils. A magnetic field with sinusoidal waveform and amplitude of 25 G was generated at an initial frequency of 0.5 Hz at room temperature of 24.6°C. The frequencies of 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 and 60 Hz were recorded for three minutes at both 36.7°C and room temperature.

It has been reported that temperatures above 37°C can stress the cells [15]; thus, considering that the Joule effect is not absent in generators that depend essentially on the flow of electric current, it is important to observe the temperature conditions present in long duration tests. Therefore, the temperature inside the incubator was recorded for 60 minutes at frequencies 1 and 10 Hz, at a field magnetic magnitude compensated to its initial value, 25G at room temperature. Before the tests, 10 minutes were waited to allow the initial temperature inside the incubator to stabilize at 36.5°C for both experiments.

Simultaneously, the magnetic field was measured to verify that its magnitude was the same during the experiment.

3. Results

3.1. Simulation

The results of the simulation can be observed both graphically in Fig. 4, and numerically in Table 2.

The flat response of the graph in Fig. 4 allows observing the uniformity of the magnitude of the magnetic field in the region where the filters with cell cultures are intended to be placed.

To corroborate, quantitatively, the uniformity of the field distribution in the region of interest, the mean, standard

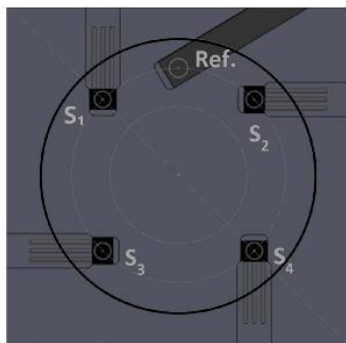


Fig. 3. (Color online) Sensor distribution in the working region for the simultaneous recording of the magnetic field. S1-S4: Hall effect Sensors, Ref.: Gauss Sensor/Tesla Meter.

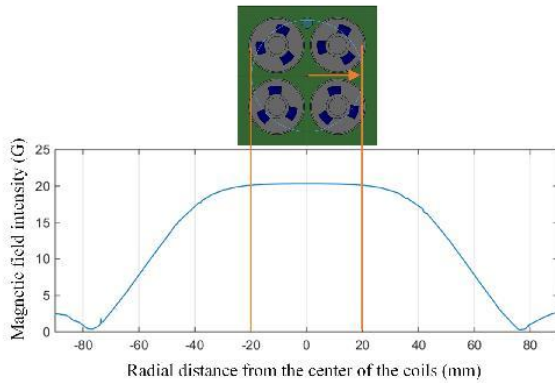


Fig. 4. (Color online) The flat response of the magnetic field generator can be seen in the region delimited by orange lines.

Table 2. Magnetic field values in the region of interest.

Parameter	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Mean (G)	20.217	20.223	20.210	20.234
SD	0.049	0.053	0.053	0.041
Maximum (G)	20.312	20.307	20.301	20.316
Minimum (G)	20.105	20.080	20.068	20.110

deviation, maximum, and minimum magnetic field magnitude parameters in each well were calculated. The results are shown in Table 2.

3.2. Direct current

The data of the magnetic field measurements made with the criteria defined for the direct current tests are shown in Table 3(a) and Table 3(b). The coefficient of variation determined the degree of dispersion of the magnetic field magnitude for the working volume, which was less than 1% in all cases. This suggested a uniformity of the magnetic field and a good performance of the Helmholtz configuration when working with direct current.

3.3. Pulse current

The tests with pulsed current were performed at different frequencies, with two temperature conditions, in the environment, and inside the incubator.

Figure 5(a) shows that at ambient temperature, the magnetic field magnitude at low frequencies was conserved practically at 25 G, whereas Fig. 5(b) shows the attenuation of the field as the frequency increased.

Figure 5(c) shows the comparison of the magnetic field magnitude readings under the two proposed temperature conditions. It is observed that there was an attenuation of the magnitude of the magnetic field with the change of temperature, i.e. by placing the magnetic field generator

Table 3. (a) Response of Hall effect sensors of the 10 series of measurements, Mean (SD).

*G	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3	Sensor 4
1.50	1.57 (0.05)	1.59 (0.05)	1.57 (0.07)	1.55 (0.06)
3.20	3.37 (0.08)	3.38 (0.09)	3.37 (0.09)	3.34 (0.08)
5.40	5.44 (0.08)	5.47 (0.09)	5.46 (0.09)	5.43 (0.06)
7.60	7.57 (0.06)	7.58 (0.06)	7.59 (0.07)	7.57 (0.07)
9.70	9.81 (0.07)	9.85 (0.08)	9.85 (0.08)	9.82 (0.08)
11.90	12.08 (0.10)	12.12 (0.11)	12.11 (0.09)	12.10 (0.09)
14.30	14.37 (0.09)	14.43 (0.10)	14.44 (0.09)	14.40 (0.08)
16.70	16.67 (0.11)	16.73 (0.10)	16.74 (0.10)	16.69 (0.09)
19.00	19.01 (0.09)	19.08 (0.09)	19.04 (0.09)	19.03 (0.07)
21.10	21.36 (0.09)	21.42 (0.09)	21.37 (0.11)	21.39 (0.08)
23.30	23.72 (0.17)	23.81 (0.17)	23.74 (0.19)	23.75 (0.15)
25.70	26.05 (0.12)	26.11 (0.12)	26.06 (0.13)	26.07 (0.10)
28.30	28.39 (0.12)	28.46 (0.12)	28.38 (0.09)	28.40 (0.10)
30.50	30.76 (0.11)	30.79 (0.12)	30.74 (0.12)	30.75 (0.11)
32.80	33.08 (0.06)	33.12 (0.07)	33.09 (0.08)	33.06 (0.06)
35.20	35.41 (0.11)	35.45 (0.12)	35.43 (0.13)	35.35 (0.12)
37.50	37.78 (0.11)	37.75 (0.10)	37.80 (0.12)	37.72 (0.11)
40.00	40.11 (0.10)	40.08 (0.10)	40.12 (0.10)	40.03 (0.09)

*Magnitude of Magnetic Field (G)

(b) Results of the sensors dispersion

Mean	(SD)	CV (%)
1.57	(0.02)	0.99
3.37	(0.02)	0.52
5.45	(0.02)	0.37
7.58	(0.01)	0.18
9.83	(0.02)	0.20
12.10	(0.02)	0.14
14.41	(0.03)	0.22
16.71	(0.03)	0.20
19.04	(0.03)	0.17
21.39	(0.03)	0.12
23.75	(0.04)	0.16
26.07	(0.03)	0.10
28.41	(0.03)	0.12
30.76	(0.02)	0.07
33.09	(0.03)	0.08
35.41	(0.04)	0.12
37.76	(0.04)	0.10
40.09	(0.04)	0.10

*CV, Coefficient of Variation

inside the incubator at 36.7°C. Also, the attenuation tendency was maintained by increasing the frequency in both temperature conditions.

Figure 6 shows the temperature changes within the incubator during magnetic field exposures for 60 minutes with the pulsed magnetic field at two frequencies, 1 and 10 Hz. A temperature increase about 0.4°C was observed

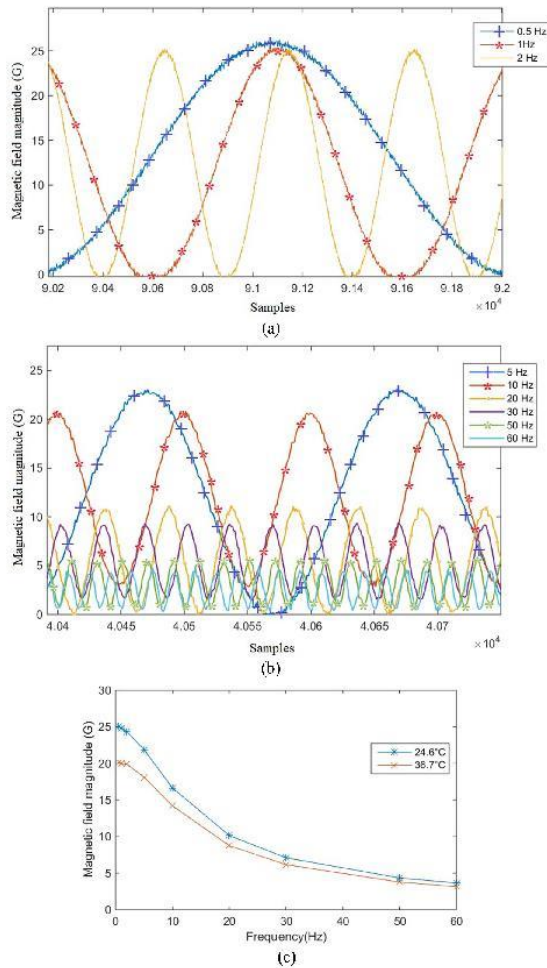


Fig. 5. (Color online) Magnetic field magnitude at different frequencies, (a) $f < 5$ Hz, (b) $60 \geq f \geq 5$ Hz, (c) response of the magnetic field generator through the frequency and temperature.

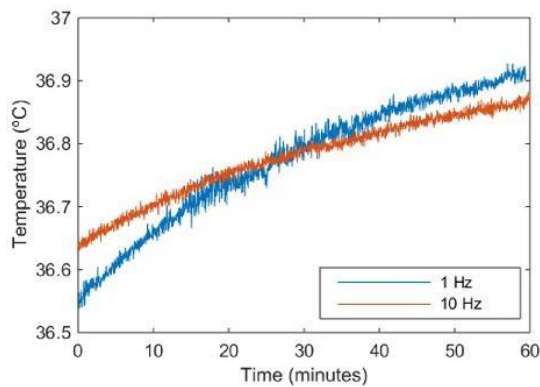


Fig. 6. (Color online) Temperature measurement for 1 hour at 1 and 10 Hz.

throughout the experiment for both frequencies.

In relation to the magnetic field magnitude records during the 60-minute tests, the mean and standard deviation at 1 Hz were 20.21 ± 0.13 G meanwhile at 10 Hz were 20.05 ± 0.05 G. Data showed a minimum standard deviation, which suggested that the magnitude of the field was conserved throughout the experiment.

4. Discussion

The simulation and modeling allowed for a good approximation to the developed physical model since it offered a relatively simple way to establish the design parameters of the coil system specifically, the dimensions of the coils and wire gauge to meet the requirements for the desired working volume. The simulation showed the distribution of the magnetic-field magnitude inside and outside of the region of interest. Moreover, because of the uniformity of the magnetic field in the working volume, it was not necessary to carry out point-to-point measurements throughout the area.

The results of the physical prototype with direct current agreed with those obtained by the simulation: that is, there was no variation in the magnitude recordings made with the four sensors in the area of interest. The coefficient of variation was less than 1% over the entire frequency range wherein work with cell cultures typically is carried out.

As expected, there were attenuations in the magnitude of the magnetic field initially established for the tests, as shown in Fig. 5. It should be emphasized that temperature was a critical factor, because when the room temperature was changed from 24.6°C to 36.5°C inside the incubator, the magnetic field underwent an attenuation; this is shown in Fig. 6. This is why the developed system was designed to compensate for such attenuations by adjusting the voltage and current parameters that define the desired magnetic-field magnitude. The compensation at 10 Hz and 1 Hz in the 60-minute tests showed that, despite the frequency, the field magnitude remained constant.

It should be noted that the tests inside the incubator were performed under temperature conditions similar to those reported for optimal cell development [10, 11]. The data of the working volume temperature for the long-term tests showed only increments of 0.4°C. These increments are according to cell growth and survival under usual culture conditions.

It is noteworthy that the equipment developed in this manuscript has a total volume suitable to be introduced in commercial incubators to keep the standard cell culture conditions to guarantee that magnetic field variable in

frequency and magnitude will be the only stimulation factor when experiments are carried out with *in situ* cell cultures.

5. Conclusions

The simulation in COMSOL Multiphysics® allowed for the physical-model design and development according to the parameters specified for studies with cell cultures inside an incubator. Both the physical size, and the working volume (i.e., the region wherein crops will be exposed to the same magnetic field magnitude) were considered. This uniformity of field in the physical model was confirmed by the coefficient of variation obtained from the data on the arrangement of the four Hall effect sensors, which was less than 1 %.

In this work the inherent performance of the coils was observed in relation to the working frequency and temperature; as expected, there were attenuations in the magnetic field magnitude as the frequency and temperature increased.

Considering that during tests with cell cultures the same magnetic field magnitude must be guaranteed independently of the working frequency, a control and compensation procedure was implemented through the developed graphical interface. In long-term tests, it was demonstrated that the magnitude of field was maintained for one hour and that the changes in temperature did not interfere with cellular activity. These results served to demonstrate that the magnetic field was the only stimulating factor.

Acknowledgments

The authors thank the National Council of Science and Technology (CONACyT, Mexico) for the scholarship granted to Gonzalo Eduardo Domínguez Dyck. The authors

also acknowledge the valuable support given by Engineer Eladio Cardiel Pérez and Pharmaceutical Chemistry Specialist Elsa Sánchez Montes de Oca for the technical assistance provided in this project.

References

- [1] S. Zannella, Proceedings of CAS CERN Accelerator School. Anacapri, Italy (1997).
- [2] W. R. Adey, Proc IEEE. **68**, 1 (1980).
- [3] L. Potenza, L. Cucchiari, E. Piatti, U. Angelini, and M. Dachà, Bioelectromagnetics **25**, 5 (2004).
- [4] B. Tenuzzo, A. Chionna, E. Panzarini, R. Lanubile, P. Tarantino, B. Di Jeso, M. Dwikat, and L. Dini, Bioelectromagnetics **27**, 7 (2006).
- [5] L. Dini and L. Abbro. Micron **36**, 3 (2005).
- [6] S. Ahmadian, R. Z. Saeed, and B. Bahram, Iran. Biomed. J. **10**, 1 (2006).
- [7] E. Lindström, P. Lindström, A. Berglund, E. Lundgren, and K. Hansson, Bioelectromagnetics **16**, 1 (1995).
- [8] C. Fanelli, S. Coppola, R. Barone, C. Colussi, G. Gualandi, P. Volpe, and L. Ghibelli, FASEB J. **13**, 1 (1999).
- [9] Y. Ren, J. Zhang, X. Wang, L. Xie, and B. Liu, Metallurgical and Mining Industry **7** (2015).
- [10] J. Darnell, H. Lodish, and D. Baltimore, Molecular cell biology, 2nd ed. Scientific American Books, New York (1990) pp. 235-240.
- [11] W. B. Jakoby, and I. H. Pastan, Cell culture, Elsevier (1979) pp. 554-556.
- [12] S. Magdaleno, J. C. Olivares, E. Campero, R. Escarela, and E. Blanco, Proceedings of the COMSOL Conference **13** (2010).
- [13] J. Kirschvink, Bioelectromagnetics **13**, 5 (1992).
- [14] D. Cvetkovic and I. Cosic, IEEE EMBS (2007) pp. 1675-1678.
- [15] K. Dokladny, W. Wharton, R. Lobb, T. Y. Ma, and P. L. Moseley, Cell Stress Chaperones **11**, 3 (2006).

Development of a system for measuring and controlling environmental parameters in an chamber for *in vitro* cell cultures experimentation

G.E. Domínguez, L.M. Martínez, E. Cardiel, P.R. Hernández

Departamento de Ingeniería Eléctrica, Sección de Bioelectrónica, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

Email: gdominguez@cinvestav.mx, ecardiel@cinvestav.mx, pablo.rogeli@cinvestav.mx

Abstract — Cell cultures are essential in research. They need to be under appropriate conditions of temperature, humidity, and carbon dioxide to promote their growth. A system for monitoring and controlling the CO₂ concentration, as well as for measuring and recording both temperature and humidity parameters inside of a conditioned chamber for experimentation with magnetic fields and recording the Transepithelial Electrical Impedance of cells, has been developed in this work. This system was designed to support the development of healthy growth of monolayer cultures and their survival. The system was based on the device K-33 BLG for CO₂ concentration measurements and the sensor DHT22 for monitoring temperature and relative humidity. A graphical interface was developed for the control and monitoring of CO₂, the exhibition of temperature and relative humidity values, the definition of set points parameter, and for alerting when thresholds are exceeded. The system is autonomous and can be adapted to several types of incubators. The validation was performed using three commercial incubators as a reference, and according to the performance results, this system can be used in experimental procedures.

Keywords — Cell Cultures, Standard Conditions for Cell-Cultures, CO₂ measurements.

I. INTRODUCTION

The areas of the medical-biological sciences that require studies with cell cultures are, among others: cellular physiology, toxicology and virology, tissue engineering, biological tissue production, cytogenetics and transgenics. These cell cultures must have aseptic conditions, free from any contamination, mainly microbial and fungal, and of course appropriate environmental conditions of [CO₂], temperature, and humidity. Additionally, energy levels of luminous, electrical, and magnetic radiation must be maintained low, because they could disturb the cell developing and proliferation, particularly when cultures are submitted to experimentation [1].

The environmental suitable for a cell culture is characterized by three fundamental parameters: a) Temperature, b) Carbon Dioxide (CO₂), and c) Humidity [2]. In the next lines, we will explain each one. The temperature at which mammal cells grow and proliferate is 37°C±0.5°C [3], CO₂ should be supply at a portion of 5% to

the gas mixture inside the incubator for maintaining a neutral pH in the culture medium [4], and finally, the relative humidity should be at 95% to avoid the dehydration of the medium.

Working with cell cultures requires rigorous laboratory protocols and very specific equipment to promote proper development. In most cases, culture is required to be removed from the incubator and the experiments are not run *in situ*. This procedure involves factors that can significantly modify the experiment and the results. In this sense, this development maintains the environmental conditions unchanged during the experimentation.

This work presents the development of a controlled environment system to assure the conditions of growth of cellular monolayers, confluence (maturation) and survival, in addition to maintain the standard cell culture conditions [2,3] during experimental procedures related with magnetic fields exposition and recording the Transepithelial Electrical Impedance of cells, inside the chamber.

II. METHODOLOGY

The measurement system was based on the Data Logging Sensor, K-33 BLG, type (CO₂Meter, USA), for CO₂ concentration measurements and the sensor DHT22 for monitoring temperature and relative humidity. A graphical interface was developed for the control and monitoring of CO₂, the exhibition of temperature and relative humidity values in a TFT Touch display, the definition of set points parameter, and for alerting when thresholds are exceeded. Some protocols were designed in this work for assessing and characterizing the devices, processing software and the complete system. The validation was performed using three commercial incubators as a reference.

A. [CO₂]measurement

The system will measure carbon dioxide in a chamber for cell cultures, also record temperature and humidity. Additionally, the control of the gas injection will be executed and alert indicators will be exhibited when any parameter falls outside the specified ranges. A water trap CM-0112 (CO₂meter, USA) and a CO₂ extractor complete the K-33 module [5]. The former serves to protect the

electronics of water excess and the latter to pump 500ml/min with 380-400 millibar of pressure.

B. Communication

Because data display, acquisition, and $[CO_2]$ control must be efficiently synchronized and due to K-33 BLG module and the TFT Touch display use the I2C and UART communication protocols, it was decided to implement a master-slave configuration with two microcontrollers, as shown in Fig. 1. The Master action was performed with an Arduino Mega 2560 card (Arduino, Italy) based on the Atmega 1280 microcontroller; the slave function with an Arduino Uno (Arduino, Italy), supported with the ATmega 328 P microcontroller [6].

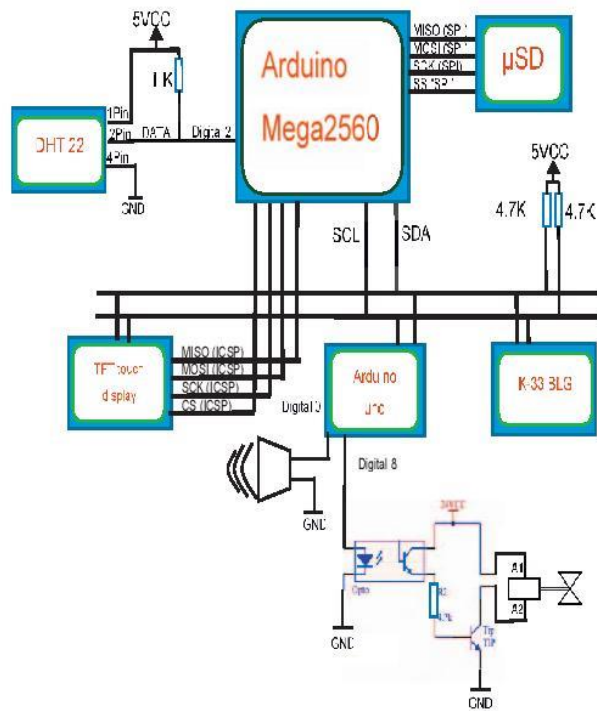


Figure 1. Electric diagram of the system.

C. Data storage

The storage is performed in a μ SD memory with a capacity of 2GB in a format *.TXT files. This device uses the communication protocol SPI, implemented in an Arduino mega device, general coordinator of the system [7].

The files *.TXT can be written and read using the Micro Card Adapter (Catalex, USA) [8].

D. $[CO_2]$ injection control

To control the $[CO_2]$, a solenoid valve (MSZD-3) (Festo, Germany) was operated by a proportional control implemented with PWM.

E. Temperature and RH% sensor (DHT 22)

This sensor has its digital output calibrated, the calibration coefficients are stored in an OTP memory and recoverable in its operation. Relative humidity strongly depends on temperature, that is why we use temperature compensation technology to ensure accurate measurement of RH [9]. It is noteworthy that the fact that DHT (temperature and humidity sensors) has digital output sensor makes it immune to interference from magnetic fields.

F. Validation

In order to validate the behavior of the CO_2 sensor of the developed system, a testing protocol for comparing measurements with a reference was established. The protocol consisted in establishing a set point of $[CO_2]$ at 1% using the Thermo Scientific incubator, 8000 WJ series (Thermo Fisher Scientific, USA), once the incubator was stabilized, the changes in $[CO_2]$ were recorded by the developed system. The set point was modified in increments of 0.5% until reaching 6% of $[CO_2]$. This procedure was performed for 3 consecutive days.

Additionally, a protocol for measurement of temperature, humidity, and carbon dioxide, as well as for control of $[CO_2]$ was developed. This protocol is described as follows: 1) Execute the experiment with both, the developed system and the reference incubator at the same time (Fig. 2), on three consecutive days. 2) Keep the incubator overnight at an internal temperature of $37^\circ C$ with an inner glass tray containing 1 liter of distilled water. 3) Before the measurement, open the incubator for 2 minutes to release possible concentrations of carbon dioxide. 4) Close the chamber with no record for 2 minutes. 5) Turn on the developed system and record a baseline of the three parameters for 2 minutes. 6) Set up the system for a concentration of 5% carbon dioxide. 7) Open the valve of the CO_2 container. 8) Record the CO_2 stabilization for 20 minutes. 9) Open the incubator for 2 minutes. 10) Close the door and record readings for three consecutive hours.

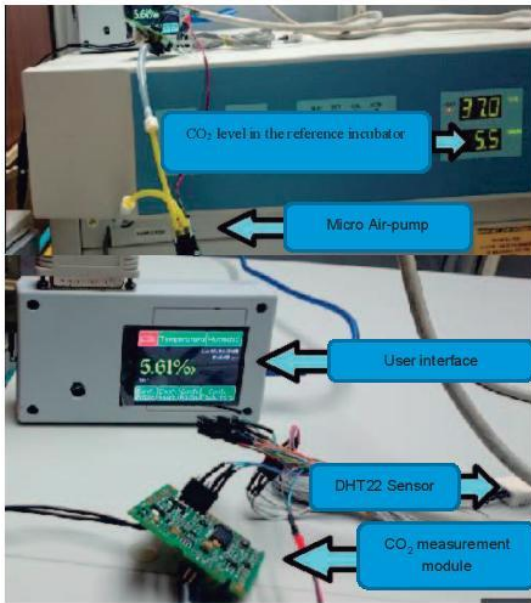


Figure 2. The developed system and the reference incubator.

III. RESULTS

A. Temperature

The measurement of the temperature of the developed system is shown in Fig. 3; it corresponds to 140 minutes after the door was closed for the last time. It can also be observed a stabilization time of about 30 minutes to reach the target temperature.

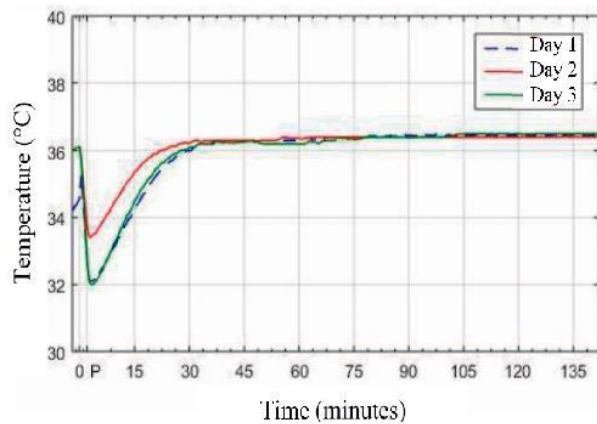


Figure 3. Temperature measurements of consecutive three days from the developed system in the chamber.

B. Humidity

The relative humidity records are shown in Fig. 4. It can be seen that this parameter reaches the target level of 95% in an average of two hours.

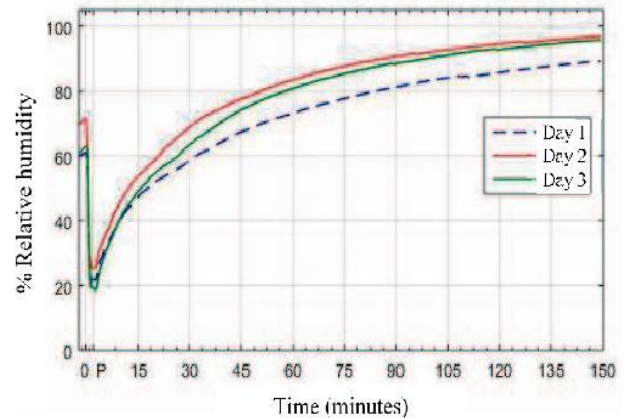


Figure 4. Humidity measurements of consecutive three days from the developed system in the chamber.

C. [CO₂] injection control

The recovery time of the CO₂ concentration level (5%) of the developed system, from the moment the door was closed (P in Fig 5), was 5 minutes; this time is 10 minutes in most of the commercial incubators. Once the level of carbon dioxide has been reached, this value does not fall below 5% but exceeds 0.5%, which is permitted in the operating standards of the incubators.

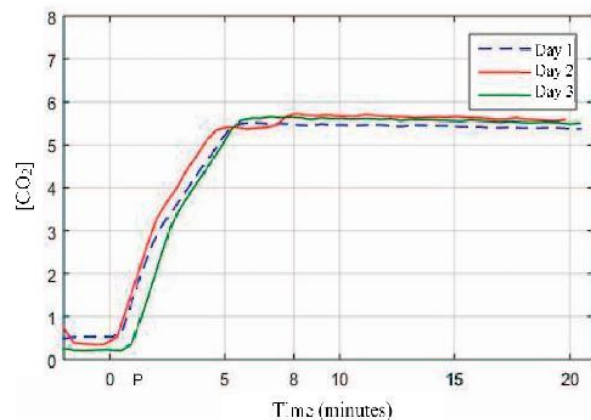


Figure 5. [CO₂] measurements of consecutive three days from the developed system in the chamber.

The results of the CO₂ sensor measurements from the developed system with respect to the commercial reference are shown in Table I. To validate the performance of this device, the Pearson correlation coefficient was determined, giving a value of 0.9997. This value allowed the use of the system in the experimental phase with cell cultures *in situ*.

TABLE I
CO₂ CONCENTRATION MEASUREMENTS BETWEEN THE DEVELOPED SYSTEM AND THE THERMO SCIENTIFIC INCUBATOR (REFERENCE)

Thermo Scientific incubator	[CO ₂]		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	1.19	1.17	1.06
1.5	1.78	1.64	1.66
2	2.22	2.1	2.14
2.5	2.71	2.57	2.59
3	3.2	3.06	3.12
3.5	3.71	3.5	3.54
4	4.13	3.99	4
4.5	4.66	4.45	4.47
5	5.12	4.81	4.95
5.5	5.59	5.4	5.3
6	6.04	5.72	5.76

IV. CONCLUSION

A system has been developed for the measurement of temperature, humidity, and CO₂ concentration, as well as the control of CO₂ inside an incubation chamber for the growth of cell monolayers *in vitro*. This system complies with the specifications of this type of equipment to maintain the standard cell culture conditions.

In contrast to commercial incubators, the developed system generates files of the measurements of environmental parameters in the chamber through a graphical interface for monitoring the experiments.

The system developed, in conjunction with the controlled environment chamber, is currently being used in experiments with cell cultures subjected to the radiation of magnetic fields *in situ* to determine their effects through the measurement of transepithelial electrical impedance.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Conacyt for the support provided to Gonzalo Domínguez and Luis Manuel Martínez for the completion of their postgraduate studies at Cinvestav.

REFERENCES

- [1] F. C. Orejana and P. E. Gil-Loyzaga, "Estructura general de un laboratorio de cultivos celulares. Equipamiento esencial para las técnicas de cultivos celulares," *Cultiv. Células Anim. Y Humanas, Apl. en Med. Regen.*, p. 35.
- [2] Invitrogen, "Cell Culture Basics Handbook," ThermoFisher Sci. Inc., pp. 1–61, 2010.
- [3] "ATCC® Animal Cell Culture Guide: Tips and techniques for continuous cell lines," 2015.
- [4] M. E. Castaño and J. C. Zapata, "Cultivos celulares.," Fondo Editor. Biogénesis, pp. 49–64, 2016. [5] G. B. Gentili, V. Tesi, M. Linari, and M. Marsili, "A versatile microwave plethysmograph for the monitoring of physiological parameters (Periodical style)," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 49, no. 10, pp. 1204–1210, Oct. 2002.
- [5] CO₂meter, "K33-BLG/ELG Sensor module for environment logging Data Sheet and Manual," 2015. [Online]. Available: <http://www.airtest.com/support/datasheet/K33-BLG.pdf>. [Accessed: 22-Feb-2016].
- [6] arduino.cc, "Master Reader/Slave Sender." [Online]. Available: <https://www.arduino.cc/en/Tutorial/MasterReader>. [Accessed: 24-Aug-2015].
- [7] T. Leal-Del Río, G. Juárez-Gracia, and L. Noé Oliva-Moreno, "Implementation of the communication protocols SPI and I2C using a FPGA by the HDL-Verilog language."
- [8] W. Greiman, "SD Library, sdfatlib," 2012. [Online]. Available: <https://github.com/jbeynon/sdfatlib>. [Accessed: 01-Jan-2015].
- [9] T. Liu, "Digital relative humidity & temperature sensor AM2302/DHT22." [Online]. Available: <https://cdn-shop.adafruit.com/datasheets/Digital+humidity+and+temperature+sensor+AM2302.pdf>. [Accessed: 22-Feb-2017].