

Comunicación

El tratamiento con campos electromagnéticos pulsados de alta intensidad y baja frecuencia estimula la regeneración de las aletas en adultos Pez cebra: un informe preliminar

Marta Carnovali¹, Noemí Stefanetti^{1,2}, Alejandro Galluzzo^{1,2}, Pietro Romeo¹, Massimo Mariotti^{1,2} y Valerio Sansone^{1,2,*}

¹ Instituto Ortopédico IRCCS Galeazzi, 20161 Milán, Italia; marta.carnovali@grupposandonato.it (MC); noemi.stefanetti@gmail.com (NS); alessandro.galluzzo@unimi.it (AG); romeo.p@libero.it (PR); massimo.mariotti@unimi.it (MM)

² Departamento de Ciencias Biomédicas, Quirúrgicas y Dentales, Universidad de Milán, 20161 Milán, Italia

* Correspondencia: valerio.sansone@unimi.it

Aplicación destacada: Los resultados resaltaron el papel de los campos electromagnéticos de baja intensidad en la regeneración de las espinas de pescado. Un modelo in vivo tan simple puede usarse para dilucidar la capacidad de respuesta del tejido esquelético a fuerzas físicas específicas útiles para diseñar nuevos enfoques terapéuticos en enfermedades óseas humanas.

Abstracto: Se sabe que los campos electromagnéticos de baja intensidad (LI-PEMF) inducen un estímulo trófico en el tejido óseo y, por lo tanto, se han utilizado en gran medida para el tratamiento de varios trastornos musculoesqueléticos. Los PEMF de alta intensidad (HI) añaden características interesantes a la bioestimulación, como la electroporación, un fenómeno caracterizado por un aumento transitorio de la permeabilización celular a las moléculas, y el diamagnetismo, un efecto repulsivo del agua basado en las propiedades diamagnéticas del agua y los gradientes de iones transmembrana. A pesar de la rápida evolución de la tecnología, los mecanismos biológicos subyacentes aún no se conocen bien. Para evaluar la eficacia de esta estimulación particular, se utilizaron HI LF-PEMF para estimular los rayos de la aleta caudal del pez cebra adulto. En realidad, la regeneración de las aletas del pez cebra es un modelo simple, bien comprendido y ampliamente adoptado para estudiar la regeneración ósea. Luego se llevó a cabo un experimento de amputación controlada. La matriz ósea regenerada de los rayos de las aletas se tiñó con cal y luego se analizó bajo microscopía de fluorescencia. Tanto la longitud como el área de los rayos de las aletas regeneradas tratados con HI LF-PEMF resultaron significativamente mayores en comparación con los no tratados.

Palabras clave: pez cebra; aleta; regeneración ósea; campo electromagnético



Cita: Carnovali, M.; Stefanetti, N.; Galluzzo, A.; Romeo, P.; mariotti, METRO.; Sansone, V. El tratamiento con campos electromagnéticos pulsados de alta intensidad y baja frecuencia estimula la regeneración de las aletas en el pez cebra adulto: informe preliminar. *Aplica. Esquiar* **2022**, *12*, 7768. <https://doi.org/10.3390/aplicación12157768>

Editora académica: Giuliana Muzio

Recibido: 27 de junio de 2022

Aceptado: 1 de agosto de 2022

Publicado: 2 de agosto de 2022

Notas del editor: MDPI se mantiene neutral con respecto a reclamos jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.



Derechos de autor: © 2022 por los autores. Licenciario MDPI, Basilea, Suiza. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introducción

En los últimos cincuenta años, se han estudiado campos magnéticos seleccionados de baja frecuencia y variables en el tiempo como herramientas terapéuticas para varias enfermedades musculoesqueléticas, como pseudoartrosis óseas, artrodesis fallida, osteonecrosis y tendinitis refractaria crónica. Los campos electromagnéticos pulsados (PEMF), dentro del amplio espectro electromagnético, dieron como resultado una explotación clínicamente efectiva de las propiedades piezoeléctricas del hueso [1], modulando los procesos de transducción de señales de membrana [2], y promover la diferenciación [3] y proliferación de células osteoblásticas [4]. Estos efectos positivos se han utilizado en gran medida con fines terapéuticos cuando se solicita estimulación osteogénica para la reparación del tejido óseo [5,6]. Aunque se ha realizado un número notable de estudios sobre PEMF de baja intensidad (LI) y baja frecuencia (LF), se sabe muy poco sobre los efectos de los PEMF de baja intensidad (HI) en tejidos musculoesqueléticos vitales. Los HI LF-PEMF, con una intensidad en el rango de 0,3 a 16,4 Tesla (T), se han estudiado por su capacidad para inducir la electroporación (es decir, la capacidad de aumentar el transporte molecular transmembrana) [7–11] y, con niveles adecuados de energía, un agua

efecto repulsivo y diamagnético molecular [12]. Este efecto repulsivo (repulsión diamagnética o diamagnetismo) se refiere a la propiedad magnética de algunos materiales que, sometidos a un campo magnético de alta intensidad, reciben el efecto de empuje como ya se experimenta en el campo de la biología mediante la levitación magnética. [13]. A nivel de la matriz extracelular (MEC), el diamagnetismo mueve agua y otras sustancias diamagnéticas como proteínas e iones. [12]. Esto también ocurre a nivel celular en términos de movimiento de iones y activación de proteínas transmembrana, mientras que la variabilidad del MF y del gradiente del campo magnético influyen en los eventos fundamentales de encendido/apagado de los canales iónicos mediante el estrés magnetomecánico de la membrana. [14,15] principalmente para Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Al^{3+} , magnesio e iones u otras actividades celulares. Por lo tanto, consideramos interesante conocer los efectos de HI LF-PEMF sobre la regeneración ósea. En este sentido, elegimos un modelo experimental basado en el pez cebra (*danio rerio*). Este pez tiene varias características atractivas para la investigación (entre otras, mecanismos de desarrollo y reparación ósea muy similares a los de los vertebrados) [16]. Por tanto, el pez cebra parece ser un buen objetivo para estudios experimentales sobre los efectos de la estimulación física sobre el tejido óseo, especialmente, utilizando como modelo la regeneración de la aleta caudal. [17]. A pesar de estas características interesantes, se sabe muy poco sobre los resultados de los PEMF en el pez cebra. El único informe científico que se puede encontrar en la literatura médica es sobre el efecto estimulante sobre la pigmentación del embrión de pez cebra in vivo [18]. El propósito de este estudio experimental es evaluar los efectos de HI LF-PEMF en la regeneración del pez cebra adulto de la aleta caudal.

2. Materiales y métodos

2.1. Generador PEMF

Como generador de PEMF, utilizamos un sistema de aceleración diamagnética capaz de generar en el origen un LF-PEMF de alta intensidad de 2 T (Figura 1).



Figuras 1. Generador PEMF.

El comportamiento con la distancia del campo magnético como amplitud máxima a mayor distancia se ha medido con un sensor Hall aplicando la siguiente ecuación derivada de la ley de Biot-Savart para un tipo determinado de solenoide:

$$B = \frac{\mu_0 y_0}{2} \left[\frac{(e/2) - z}{(z - e/2)^2 + R^2} + \frac{(e/2) + z}{(z + e/2)^2 + R^2} \right]$$

(*n* es el número de vueltas, *I* es la corriente máxima y *e/2, z, R* son los parámetros geométricos de la bobina).

El gradiente del campo magnético es <400 T/s, la duración del pulso único es de 5 ms, el período de 1000 ms y 2,9 mT de MF en el objetivo. Los peces tratados fueron expuestos a 6 Hz de frecuencia PEMF. Al utilizar una portadora de 1000 ms, se obtiene un pico principal más bajo en el dominio de la frecuencia que es de 1 Hz, el segundo pico más alto, que no resulta de un armónico múltiple de 1 Hz, está a 200 Hz con una duración de pulso de 5 ms. Se capturaron imágenes de aletas regeneradas de peces no tratados y tratados con HI LF-PEMF desde el día 1 al 10 después de la amputación y se analizaron cinco días después de la amputación. Se describirá la tendencia de regeneración durante diez días.

2.2. Animales y tratamientos

Las cepas de pez cebra AB se mantuvieron en un sistema de mesa ZEBTEC © (Tecniplast, Buguggiate, Italia) en condiciones estándar [19]. Durante el tratamiento los peces se han mantenido a 28 °C en medio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl 0,33 mM₂, MgSO 0,33 mM₄). Los peces se incubaron con Alizarin Red S al 0,005 % (ARS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) para resaltar la matriz mineralizada del hueso. Al final del procedimiento de tinción, los peces se anestesiaron con una solución de medio de metanosulfonato de triclaína E3 de 0,168 mg/ml [19] y sometido a amputación en la bifurcación de la aleta. En un experimento preliminar (datos no mostrados), probamos diferentes protocolos de tratamiento para identificar el más efectivo en términos de estimulación regenerativa. El tiempo de tratamiento se ha definido mediante un algoritmo que considera las propiedades morfogénicas de los peces, traduciendo el diámetro, las dimensiones del tanque de tratamiento y el número de peces tratados simultáneamente. El tiempo ideal de tratamiento resultó en 64 min/2 veces al día. También comprobamos que el tratamiento con HI LF-PEMF no altera la temperatura del agua. En cada experimento tratamos 14 peces cebra. Siete peces cebra fueron tratados con HI LF-PEMF siguiendo el protocolo citado anteriormente, mientras que siete peces actuaron como controles no tratados. Utilizamos la configuración preestablecida del dispositivo específica para hueso y cartílago con intensidad en el nivel 5 (máximo) y frecuencia de repetición del pulso de 5 Hz/s. Todo el experimento se repitió tres veces utilizando un total de 42 peces. Después de cinco días de tratamiento, los peces se incubaron durante la noche con calceína al 0,005% (Bis[N,Nbis(carboximetil)aminometil]fluoresceína, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) para evidenciar la matriz ósea regenerada de los rayos de las aletas. Los peces fueron anestesiados en metanosulfonato de triclaína al 0,01% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y las aletas se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus SZX-ZB7, Tokio, Japón) equipado con una cámara Discovery CH30 (TiEsseLab, Milán), Italia. Los parámetros elegidos para evaluar el efecto de la estimulación fueron la longitud de los tres radios más largos de la aleta y el área de tejido óseo regenerado. Las muestras se analizaron con el software de código abierto ImageJ.

2.3. Declaración de ética

Esta experimentación se ha realizado en el Laboratorio del Pez Cebra (IRCCS R. Galeazzi, Fundación GSD, Milán, Italia) de acuerdo con las directrices italianas y europeas sobre prácticas de investigación (Directiva UE 2010/63/UE) y con la autorización de ASL Varese Con Prot. N° 2019/014/DVVS/0078143, Italia.

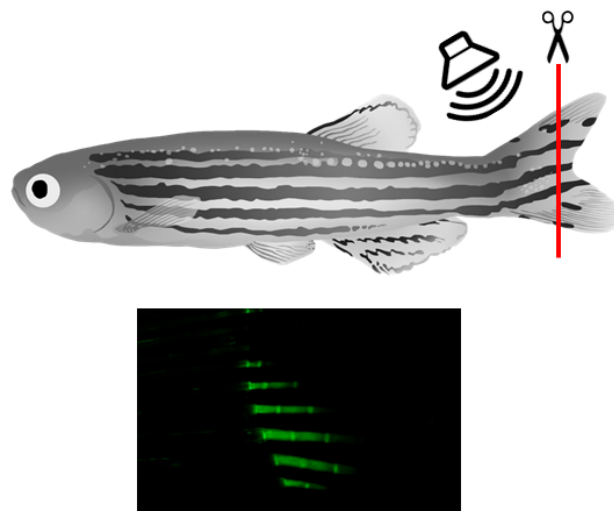
2.4. Estadística

Se decidió analizar el efecto de la adherencia a la intervención, realizando un *t*-análisis de prueba con datos recopilados cinco días después de la amputación. El *t*-La prueba está precedida por el análisis de D'Agostino-Pearson para verificar la distribución de los datos. Importancia estadística

estaba decidido *apag*-los valores se establecen en *pag*<0,05 *;*pag*<0,01 **;*pag*<0,001***. Los datos de la prueba han sido analizados por el sistema no apareado de Student. *t*-análisis de pruebas. Asumimos una condición de homocedasticidad entre las variables recolectadas, considerando también que los dos grupos tienen el mismo tamaño de muestra y, excepto el tratamiento de estudio, siempre se mantuvieron en las mismas condiciones básicas. Utilizamos una varianza común estimada de los dos grupos (*s*₂agrupados) para el *t*-prueba con *n*₁+*n*₂-2 grados de libertad.

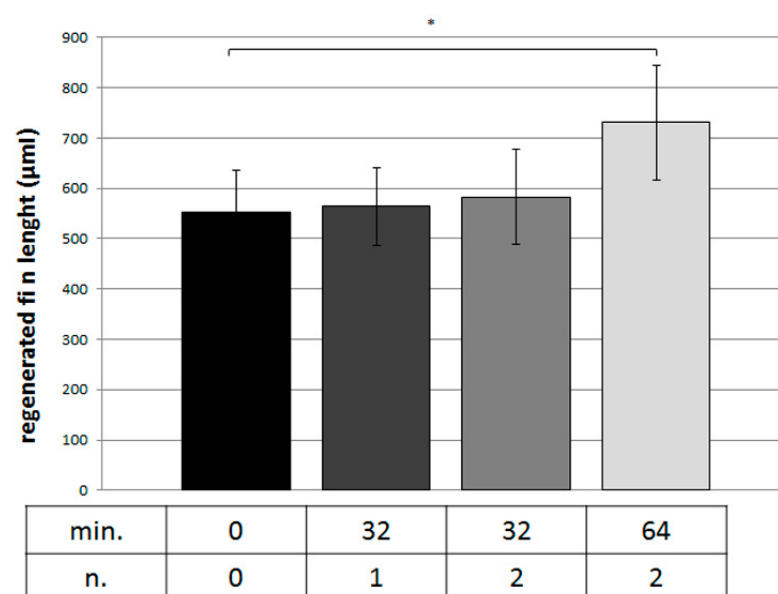
3.Resultados

La regeneración de la aleta caudal del pez cebra adulto se ha utilizado como modelo de lectura para analizar el efecto de la estimulación biofísica en la regeneración ósea mediante tinción viva con cal (Figura2).



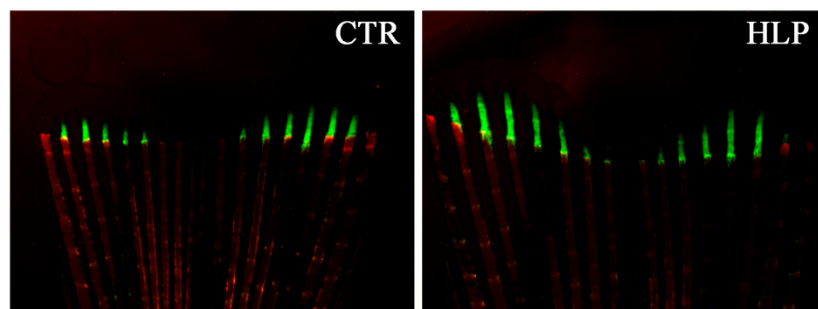
Figuras 2.Amputación de aletas y tinción de doble vida como modelo de lectura para estudiar los efectos de las estimulaciones biofísicas de la regeneración ósea in vivo.

Se han evaluado diferentes tratamientos HI LF-PEMF cinco días después de la amputación en términos de duración o número de sesiones, dando como resultado un protocolo efectivo de 64 min dos veces al día (Figura 3).



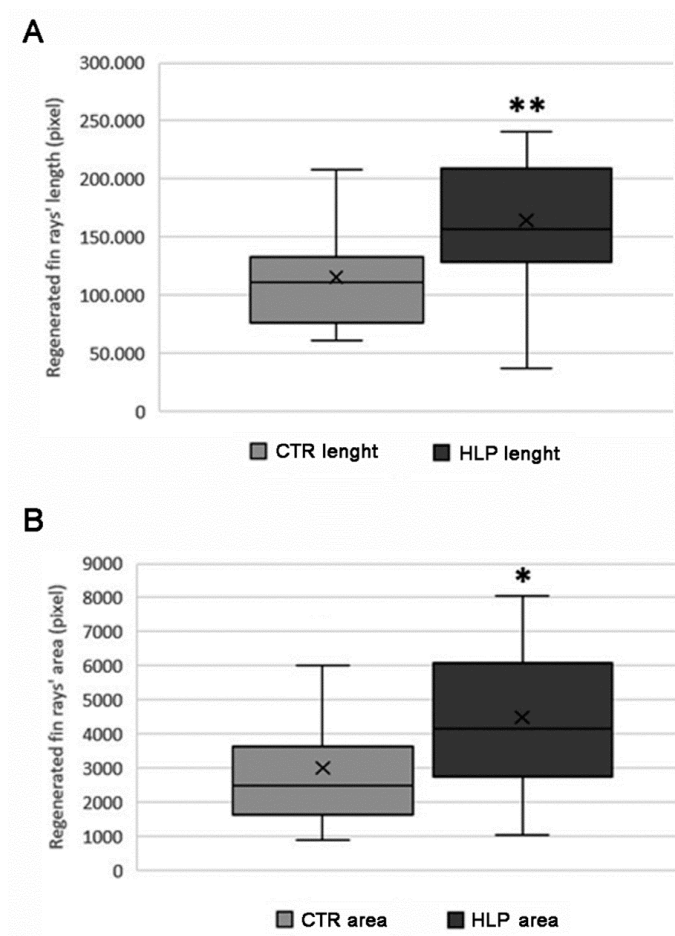
Figuras 3.Mediciones de longitud de rayos de aleta regenerados en diferentes tratamientos con HI LF-PEMF. Los parámetros se expresaron como minutos de tratamiento (min.) y número de sesiones diarias (n.) (0 vs. 64, * *pag*<0,05).

Se capturaron imágenes de aletas regeneradas de peces no tratados y tratados con HI LF-PEMF (Figura4) y los parámetros morfométricos se analizaron mediante software de imágenes.



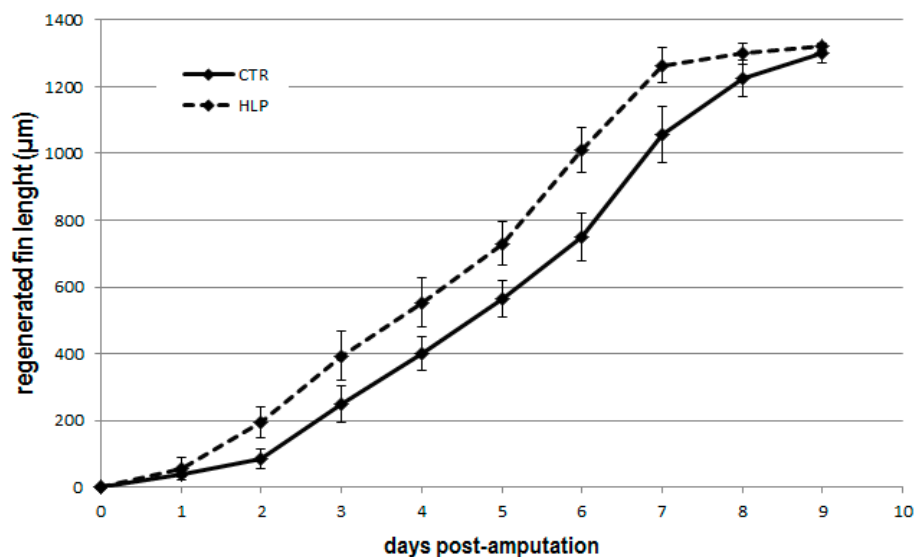
Figuras 4. Doble tinción con calceína-alizarina de los rayos de las aletas: matriz ósea regenerada en aletas de pez cebra adultas no tratadas (CTR) y tratadas con HI LFPEMF (HLP) (la tinción roja resalta el tejido óseo antiguo y la tinción verde resalta el nuevo tejido óseo regenerado).

La longitud de los radios de las aletas regenerados bajo condiciones HI LF-PEMF cinco días después de la amputación, medida en la parte superior de la aleta, mostró un aumento dimensional estadísticamente significativo en comparación con el grupo de control ($p < 0,01$, cifras5A). De manera similar, el área de los rayos de aleta regenerados de los peces tratados con PEMF resultó más amplia en comparación con los controles ($p < 0,05$, cifras5B).



Figuras 5. Mediciones en pez cebra adulto no tratado (CTR, siete peces) y tratado con HI LF-PEMF (HLP, siete peces) de **(A)** longitud de los radios de aleta regenerados (HLP vs. CTR, $**p < 0,01$) y **(B)** área de radios de aleta regenerados (HLP vs. CTR, $*p < 0,05$).

Toda la curva de crecimiento, calculada hasta el final del proceso de regeneración (10 días), indicó un efecto estimulador de los HI LF-PEMF respecto de los controles no tratados (Figura6). De hecho, el pico de regeneración se alcanza antes y más rápido en el grupo tratado en comparación con el grupo de control (8 días frente a 10 días).



Figuras 6. Mediciones diarias de la longitud de las aletas regeneradas en peces cebra adultos no tratados (CTR, 7 peces) y tratados con HI LF-PEMF (HLP, 7 peces).

4. Discusión

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio experimental sobre el resultado de la estimulación HI LF-PEMF en el tejido óseo. Por el contrario, los efectos de la estimulación con PEMF de baja intensidad sobre el hueso han sido ampliamente estudiados, aunque los mecanismos de acción de este procedimiento aún siguen siendo parcialmente desconocidos y la cuantificación de los efectos sobre el hueso es difícil de evaluar. No obstante, los resultados positivos de los PEMF sobre la actividad y diferenciación de los osteoblastos se han demostrado in vivo en modelos animales y en estudios clínicos en humanos [6]. Debido a esto, en los últimos años se han lanzado al mercado muchos dispositivos LF-PEMF para uso clínico. Sin embargo, los protocolos clínicos para el uso de estos dispositivos en el tratamiento de diferentes afecciones óseas todavía se basan más en experiencias anecdóticas que en datos experimentales sólidos. Los estudios preclínicos en modelos animales simples, como en este caso, podrían contribuir a detectar e identificar protocolos más eficaces para aplicar en el entorno clínico humano. Nuestros resultados mostraron un efecto anabólico positivo y significativo en la regeneración de las aletas del pez cebra. El efecto es mínimo para el área pero más evidente en la longitud de la aleta regenerada. La aplicación de un fuerte campo magnético debería aumentar el movimiento de líquidos intra y extracelulares, facilitando el transporte transmembrana de moléculas e iones, las interacciones enzima-sustratos y el metabolismo celular en su conjunto. Se espera que estas acciones promuevan efectos tróficos y beneficiosos en los tejidos. Según la literatura, la modulación de las vías de señalización Wnt/ β -catenina, ALP, osterix, osteocalcina y BMP puede desempeñar un papel crucial en la estimulación física de la regeneración ósea en el pez cebra hasta que [20] y en otros modelos animales [5,6]. Además, se ha informado que la transducción de señales a través de los receptores de adenosina A2A y A3 estimula la síntesis de componentes de la MEC [21]. Dado que estas moléculas y vías están bien conservadas en el pez cebra, planteamos la hipótesis de que la regeneración de las aletas mediada por PEMF podría estimularse mediante los mismos mecanismos. La razón para analizar sólo los tres radios de aleta regenerados más largos se debe al intento de reducir la variabilidad anatómica entre peces. Aunque se trata de un informe preliminar, podemos observar resultados positivos derivados del efecto diamagnético, aunque también se pueden hacer especulaciones interesantes desde el punto de vista técnico. Si hacemos una comparación con otros estudios experimentales en células, nuestra experiencia muestra que los valores del campo magnético de 2,9 mT

al objetivo, con un tiempo de exposición de 64 min/2 veces cada día, han permitido alcanzar un efecto biológico significativo en comparación con otras condiciones que requirieron 9 h de estimulación a 1,5 mT [22] o un tiempo de exposición de 24 h a 1,8–3 mT de valores de campo magnético [23]. La principal limitación de este estudio reside en el tamaño relativamente pequeño de la muestra. Nuestro propósito es ampliarlo durante nuevos estudios futuros realizados en una población de peces más grande.

5. Conclusiones

Se demostró que el tratamiento con HI LF-PEMF aumenta el potencial de recrecimiento regenerativo de la aleta caudal del pez cebra adulto, sin efectos nocivos. Los resultados identifican al pez cebra como un modelo in vivo útil para estudiar nuevos protocolos terapéuticos para la salud ósea con potencial aplicación humana. Se requieren más estudios con un mayor número de muestras y posiblemente agregando la medición de marcadores de expresión genética y metabolismo óseo para confirmar nuestros datos. Además, nuestros resultados pueden allanar el camino para estudios comparativos sobre los efectos de los PEMF de alta intensidad versus los de baja intensidad en el tejido óseo vital.

Contribuciones del autor: VS, MM contribuyó a las ideas, MC, NS contribuyó al análisis de datos, la generación de datos y la preparación del manuscrito. VS contribuyó a la revisión del manuscrito, la supervisión del proyecto y la financiación. PR y AG contribuyeron al análisis de datos y la revisión del manuscrito. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Fondos: Este trabajo fue apoyado y financiado por el Ministerio de Salud italiano: “Ricerca Corrente” y la Fundación Gruppo San Donato (subvención SOYFISH). El APC fue financiado por el Instituto Ortopédico Galeazzi del IRCCS.

Declaración de la Junta de Revisión Institucional: No aplicable.

Declaración de consentimiento informado: No aplicable.

Declaración de disponibilidad de datos: No aplicable.

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Bassett, CA Aspectos fundamentales y prácticos de los usos terapéuticos de los campos electromagnéticos pulsados (PEMF). *Crítico. Rev. Biomed. Ing.* **1989**, *17*, 451–529.
2. Luben, R. Efectos de los campos electromagnéticos de baja energía (pulsados y CC) en los procesos de transducción de señales de membrana en sistemas biológicos. *Médico de Salud. Soc.* **1991**, *61*, 15–28. [\[Referencia cruzada\]](#)
3. Ehnert, S.; Van Griensven, M.; Unger, M.; Scheffler, H.; Falldorf, K.; Fentz, AK; Seeliger, C.; Schröter, S.; Nussler, AK; balmayor, El cocultivo de ER con osteoblastos humanos y la exposición a campos electromagnéticos pulsados de frecuencia extremadamente baja mejoran la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo humano. *Int. J. Mol. Esquiar.* **2018**, *19*, 994. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Chang, WH; Chen, L.; Sol, J.; Lin, F. Efecto de la estimulación del campo electromagnético de ráfaga de pulso sobre las actividades de las células de osteoblastos. *Bioelectromagnética* **2004**, *25*, 457–465. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Ehnert, S.; Schröter, S.; Aspera-Werz, RH; Eisler, W.; Falldorf, K.; Ronniger, M.; Nussler, A. K. Conocimientos traslacionales sobre campos electromagnéticos pulsados de frecuencia extremadamente baja (ELF-PEMF) para la regeneración ósea después de traumatismos y cirugía ortopédica. *J. Clin. Medicina.* **2019**, *8*, 2028. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Yuan, J.; Xin, F.; Jiang, W. Vías de señalización subyacentes y aplicaciones terapéuticas de campos electromagnéticos pulsados en la reparación ósea. *Fisiol celular. Bioquímica.* **2018**, *46*, 1581–1594. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Novitsky, V.; Grainys, A.; Kučinskaitė-Kodze, I.; Žvirbliene, A.; Novickij, J. Magnetopermeabilización de membrana celular viable utilizando un campo magnético de alto impulso. *Traducción IEEE. Magn.* **2015**, *51*, 5000505. [\[Referencia cruzada\]](#)
8. Kranjc, S.; Kranjc, M.; Scancar, J.; Jelenc, J.; Sersa, G.; Miklavcic, D. Electroquimioterapia mediante tratamiento con campo electromagnético pulsado (PEMF) en ratones con melanoma B16F10 in vivo. *Radiol. Oncol.* **2016**, *50*, 39–48. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Miklavcic, D.; Novitsky, V.; Kranjc, M.; Polajzer, T.; Meglic, SH; Napotnik, TB; Romih, R.; Lisjak, D. Electroporación sin contacto inducida por campos electromagnéticos pulsados de alta intensidad mediante nanoelectrodos distribuidos. *Bioelectroquímica* **2020**, *132*, 107440. [\[Referencia cruzada\]](#)
10. Novitsky, V.; Dermol, J.; Grainys, A.; Kranjc, M.; Miklavcic, D. Permeabilización de membranas de células de mamíferos mediante ráfagas de pulsos de alto campo magnético. *PeerJ* **2017**, *4*, e3267. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Towhidi, L.; Firoozabadi, SMP; Mozdarani, H.; Miklavcic, D. Lucifer Captación de amarillo por células CHO expuestas a pulsos magnéticos y eléctricos. *Radiol. Oncol.* **2012**, *46*, 119–125. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)

12. Premios, E.; Benussi, A.; La Gatta, A.; Visconti, S.; Costa, A.; Gilberti, N.; Cantoni, V.; Padovani, A.; Borroni, B.; Magoni, M. Modulación de la plasticidad cortical similar a una potenciación a largo plazo en el cerebro sano con campos electromagnéticos pulsados de baja frecuencia. *BMC Neurociencias*.**2018**, *19*, 34. [[Referencia cruzada](#)] [[PubMed](#)]
13. Hammer, BE; Kidder, LS; Williams, PC; Xu, W. W. Levitación magnética de células de osteoblastos MC3T3 como simulación terrestre de microgravedad. *Ciencia de microgravedad*.**2009**, *21*, 311–318. [[Referencia cruzada](#)]
14. Zhadin, MN Acción combinada de campos magnéticos estáticos y alternos sobre el movimiento de iones en una macromolécula: aspectos teóricos. *Bioelectromagnética***1998**, *19*, 279–292. [[Referencia cruzada](#)]
15. Zablotskii, V.; Poliakova, T.; Lunov, O.; Dejneka, A. Cómo un campo magnético de alto gradiente podría afectar la vida celular. *Representante de ciencia*.**2017**, *6*, 37407. [[Referencia cruzada](#)] [[PubMed](#)]
16. Renn, J.; Winkler, C.; Scharlt, M.; Fischer, R.; Goerlich, R. Zebrafish y medaka como modelos para la investigación ósea, incluidas las implicaciones relacionadas con cuestiones relacionadas con el espacio. *Protoplasma***2006**, *229*, 209–214. [[Referencia cruzada](#)] [[PubMed](#)]
17. Uemoto, T.; Abe, G.; Tamura, K. El nuevo crecimiento de la regeneración de la aleta caudal del pez cebra está determinado por la longitud amputada. *Representante de ciencia*. **2020**, *10*, 649. [[Referencia cruzada](#)]
18. Kim, YM; Lim, HM; Ro, HS; Ki, GE; Seo, YK Los campos electromagnéticos pulsados aumentan la pigmentación a través de la vía p-ERK/p-p38 en el pez cebra (*danio rerio*). *Int. J. Mol. Esquiar*.**2018**, *19*, 3211. [[Referencia cruzada](#)]
19. Westerfield, M. *El libro del pez cebra: una guía para el uso del pez cebra en el laboratorio (Danio rerio)*, 5ª ed.; Prensa de la Universidad de Oregon: Eugene, Oregón, EE. UU., 2007.
20. Molagoda, IMN; Karunaratne, WAHM; Choi, YH; Park, EK; Jeon, YJ; Lee, BJ; Kang, CH; Kim, GY El extracto de ostra fermentada promueve la diferenciación de osteoblastos activando la vía de señalización Wnt/ β -catenina, lo que conduce a la formación de hueso. *Biomoléculas***2019**, *9*, 711. [[Referencia cruzada](#)]
21. Cadossi, R.; Massari, L.; Racine-Ávila, J.; Aaron, R. K. Estimulación por campo electromagnético pulsado de la curación ósea y la preservación de las articulaciones: mecanismos celulares de respuesta esquelética. *J. Am. Acad. Ortopédico. Cirugía. Globo. Res.***2020**, *4*, e1900155. [[Referencia cruzada](#)]
22. Lin, HY; Lin, YJ Efectos in vitro de los campos electromagnéticos de baja frecuencia sobre la proliferación y maduración de osteoblastos en un entorno inflamatorio. *Bioelectromagnética***2011**, *32*, 552–560. [[Referencia cruzada](#)] [[PubMed](#)]
23. Chang, CH; Loo, ST; Liu, HL; Colmillo, HW; Lin, HY ¿Puede el campo electromagnético de baja frecuencia ayudar a la ingeniería del tejido del cartílago? *J. Biomed. Madre. Res. A2010*, *92*, 843–851. [[Referencia cruzada](#)] [[PubMed](#)]