ARÁN

ROMM
Revista de Osteoporosis
y Metabolismo Mineral

Original

Modulación osteogénica mediante estimulación eléctrica: estudio *in vitro* en osteoblastos humanos

Elena Fernández-Díaz[1], Jesús Bocio[1,2], Daniel Martín[3,6], M.ª Ángeles Vázquez[4,5], Pedro Chacón[7,8], Miguel Colmenero[5], Miguel Ángel Rico[5], Alberto Yufera[3,6], M.ª José Montoya-García[4,5], Mercè Giner[1,5]

[1]Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica. Universidad de Sevilla. Sevilla. [2]FISEVI. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. [3]Instituto de Microelectrónica de Sevilla – Universidad de Sevilla (IMSE-US). Sevilla. [4]Departamento de Medicina. Universidad de Sevilla. Sevilla. [5]UGC de Medicina Interna. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. [6]Departamento de Tecnología Electrónica. Universidad de Sevilla. Sevilla. [7]Departamento de Ciencias de la Salud y Biomédicas. Universidad Loyola Andalucía. Dos Hermanas, Sevilla. [8]Laboratorio de Inmunología y Alergia-FISEVI. UGC de Alergología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla

Resumen

Introducción: la estimulación eléctrica (EE) se ha consolidado como una herramienta prometedora en medicina regenerativa por su capacidad de modular procesos celulares clave. En el tejido óseo, la EE puede favorecer proliferación, diferenciación y síntesis de matriz extracelular.

Hipótesis y objetivo: la aplicación de corriente alterna a baja frecuencia modula "de manera dependiente del voltaje" la proliferación, maduración y morfología de hOB procedentes de biopsias humanas. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la EE alterna sobre la proliferación, actividad osteogénica (ALP y OCN) y características morfológicas de hOB en cultivo.

Material y métodos: a partir de biopsias tibiales de cuatro pacientes se obtuvieron cultivos primarios de hOB. Tras su expansión, se sometieron a EE (0, 500 o 750 mV) durante 10 días, 3 h/día. Se evaluó proliferación mediante recuento nuclear, actividad de ALP, síntesis de osteocalcina (OCN) por inmunofluorescencia y morfología celular tras transfección con pmCherry. El análisis estadístico incluyó análisis de normalidad seguido de *t* Student y ANOVA para variables paramétricas y Kruskall-Wallis ANOVA en rangos, para variables no paramétricas.

Resultados: la proliferación aumentó significativamente a 500 mV, mientras que 750 mV mostró valores similares al control. La actividad ALP aumentó progresivamente en ambos voltajes, alcanzando valores máximos a día 10. La expresión de OCN fue significativamente superior a 500 mV. Morfológicamente, 500 mV incrementó el área celular sin cambios relevantes en número o longitud de pseudofilopodios.

Conclusión: la EE alterna a 10 Hz y 500 mV favorece la proliferación y la maduración osteoblástica. Los resultados indican que 500 mV constituye la condición más adecuada para promover una respuesta osteogénica equilibrada en hOB.

Palabras clave:
Osteoblastos primarios humanos.
Electroestimulación.
Corriente alterna.
Ingeniería tisular.

Recibido: 05/02/2026 • Aceptado: 07/04/2026

Financiación: estudio financiado por el programa PAIDI 2018: Proyectos I+D+i de la Junta de Andalucía (Consejería de Economía y Conocimiento), P18-FR-2308.

Consideraciones éticas: el estudio se aprobó por el CEIm Provincial de Sevilla (SICEIA-2024-001743).

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Fernández-Díaz E, Bocio J, Martín D, Vázquez MÁ, Chacón P, Colmenero M, Rico MÁ, Yufera A, Montoya-García MJ, Giner M. Modulación osteogénica mediante estimulación eléctrica: estudio *in vitro* en osteoblastos humanos. Rev Osteoporos Metab Miner 2026;18(3):101-109

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00118

Correspondencia:
Jesús Bocio. Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica.
Universidad de Sevilla.
Avda. de Sánchez Pizjuán, s/n. 41009 Sevilla
e-mail: jbocio@us.es

©Copyright 2026 SEIOMM y ©Arán Ediciones S.L. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-SA (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa es un campo interdisciplinario que tiene como objetivo reparar o sustituir tejidos y órganos comprometidos para restablecer sus funciones fisiológicas. Dentro de este campo, la estimulación eléctrica (EE) ha surgido como una modalidad terapéutica significativa, reconocida por su capacidad para modular diferentes procesos biológicos tanto a nivel celular como tisular (1,2).

La generación de un tejido funcional mediante ingeniería tisular y la aplicación de estimulación eléctrica, tiene un gran impacto en diversas áreas de la medicina regenerativa, así como la corrección de defectos óseos mediante la producción de osteoblastos (OB) funcionales (3). Las células osteoblásticas, ampliamente reconocidas por su función en la formación de tejido óseo, provienen de células madre mesenquimales (MSC) presentes en el estroma de la médula ósea (4).

A lo largo del proceso de diferenciación osteoblástica, estas células van a ir expresando distintos genes, marcadores que indican el estadio de maduración de los osteoblastos. Al inicio, existe una etapa de proliferación en la que los pre-OB expresan entre otros genes, *RUNX2*. Posteriormente, la transición de pre-OB a OB maduros se caracteriza por expresión de genes como osterix (*OSX)* y osteocalcina (*OCN)*, y un aumento en la actividad fosfatasa alcalina (ALP) para una posterior síntesis de proteínas de la matriz ósea, como es la OCN (5). El proceso de síntesis de matriz ósea extracelular por parte de los OB ya maduros, se lleva a cabo mediante la deposición de la matriz inorgánica y posterior mineralización, donde ALP y OCN desempeñan un papel fundamental (6). ALP es una enzima producida por los OB que participa en la mineralización ósea al proporcionar el fosfato inorgánico necesario para la formación de hidroxiapatita, principal componente mineral del hueso (7). Por otra parte, la OCN, se considera un marcador específico de la formación ósea debido a su síntesis exclusiva por los OB, además, su concentración en sangre refleja la actividad osteoblástica (8).

En la actualidad, existen diversas condiciones asociadas a la patología ósea que requieren soluciones en la práctica clínica. Entre ellas, se incluyen defectos significativos en el tejido óseo, fracturas traumáticas con mala consolidación, resecciones de tumores, desbridamientos de tejidos necróticos tanto sépticos como asépticos. Asimismo, el incremento en los reemplazos protésicos, debido a enfermedades óseas degenerativas o metabólicas, es cada vez más común, especialmente en personas mayores en las que presentan menor capacidad osteorregenerativa, sin garantizar de este modo, una adecuada biomecánica futura (3).

Se ha evidenciado que la aplicación de corrientes eléctricas en el hueso produce un efecto eléctrico capaz de estimular la osteogénesis (3). Actualmente, las investigaciones se orientan en el desarrollo de sistemas conductores para la EE localizada, la aplicación de la EE en células madre, la utilización de diferentes biomateriales, la optimización de los parámetros de EE (frecuencia, amplitud, duración) para diferentes aplicaciones y el estudio de sus mecanismos de acción a nivel celular y molecular (9). En su conjunto, la EE muestra un gran potencial para avanzar en la regeneración ósea, particularmente en casos desafiantes como grandes defectos óseos y la integración de prótesis, debido a su capacidad para mejorar la proliferación celular, la diferenciación y la remodelación de tejidos, particularmente, del tejido óseo (10).

Diversos experimentos han demostrado que la EE tiene un efecto positivo en procesos clave para la regeneración ósea como la vascularización, condrogénesis, adhesión celular o la modulación de la inflamación (11). A nivel celular, se considera que los valores en el rango de decenas o centenas de milivoltios (mV), son los adecuados para inducir excitación, y óptimos para activar las proteínas sensibles al campo eléctrico, principalmente canales y receptores de membrana.

El objetivo general de este trabajo es estudiar el papel de la estimulación eléctrica como modulador de la diferenciación y maduración de células osteoblásticas obtenidas a partir de biopsias óseas humanas procedentes de artrodesis de rodilla.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio experimental *in vitro* de osteoblastos humanos primarios (hOB) procedentes de biopsias ósea, sometiéndolos a electroestimulación mediante corriente alterna (Fig. 1A).

SUJETOS DE ESTUDIO

Los hOB se obtuvieron a partir de explantes de mesetas tibiales. Dichos explantes se adquirieron durante intervenciones artoplásticas de 4 pacientes que acudieron a la UGC de Traumatología del Hospital Universitario Virgen Macarena (HUVM), Sevilla. El estudio se aprobó por el CEI Provincial de Sevilla (SICEIA-2024-001743).

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados y firmaron el consentimiento informado. No hubo pacientes excluidos durante el procedimiento.

Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo con los criterios de exclusión e inclusión definidos en el estudio. Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes

mayores de 50 años, que hayan ingresado para la implantación de una prótesis articular de rodilla por cuestiones mecánicas y hayan firmado el consentimiento informado. Se excluyeron aquellos que presentaron tratamientos crónicos con corticoides orales durante un período mayor a 6 meses y con una dosis ≥ 7,5 mg/día de prednisona o corticoide equivalente. También se excluyeron los que habían recibido en los últimos 5 años tratamiento para la osteoporosis, presentaban antecedentes de inmovilización prolongada durante un período mayor a 6 meses o sufrían enfermedades hepáticas, renales, endocrinas o hematológicas con influencia sobre el metabolismo óseo o enfermedad tumoral.

CULTIVO CELULAR

A partir de biopsias óseas de cuatro pacientes, se obtuvieron cuatro cultivos celulares de explantes mediante disgregación mecánica del hueso trabecular, constituyendo cuatro réplicas biológicas independientes para cada condición experimental.

Tras lavarlos con PBS, fueron cultivados para obtener osteoblastos humanos en medio DMEM (Medio Esencial Mínimo - PanBiotec, Alemania) suplementado con 15 % suero bovino fetal inactivado, 2 mM GlutaMAX i, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina (Gibco, USA) y 2,5 µg/mL anfotericina-B (Cytiva, USA). A los 4 días de cultivo se cambió este medio de crecimiento por medio osteogénico, el cual incluyó: 50 µg/mL de β-glicerofosfato (Merck, Alemania), 10 mM de ácido ascórbico (StemCell Technologies, Canadá) y 10 nM de dexametasona (Sigma-Aldrich, Madrid). Se mantuvieron en el incubador a una atmósfera humificada al 95 % y 5 % de CO_2. Cuando las células alcanzaron un 80-85 % de confluencia, se efectuó un pase celular para aumentar el número de células y someterlas a las diferentes condiciones de electroestimulación.

SISTEMA DE ELECTROESTIMULACIÓN

La electroestimulación de los cuatro cultivos de hOB, se realizó mediante un sistema que genera campos eléctricos a la vez que los adapta y aplica a las células. Para poder realizar estas funciones, el sistema posee 3 componentes principales: monitorización, electroestimulación y funciones de control como el suministro de energía. Todos los componentes están acoplados a una placa del circuito e interactúan a través de una conexión inalámbrica bidireccional, que permite conocer y modificar los parámetros de funcionamiento en cualquier momento del transcurso experimental (10).

El sistema de electroestimulación utilizado albergó 4 placas de electrodos 8W10E+ (Applied Biophysics, Troy, NY, USA) de 8 pocillos de 1 cm^2 cada uno, con 20 electrodos de oro de un diámetro de 250 µm (10). La frecuencia aplicada fue de 10 Hz. El sistema de electroestimulación fue diseñado en el Instituto de Microelectrónica de la Universidad de Sevilla (grupo TIC-178) (Fig. 1B).

En este estudio, se aplicó corriente alterna con una frecuencia de 10 Hz, a un voltaje de 500 mV/mm o 750 mV/mm durante 10 días, 3 h diarias, además de una condición control (0 mV). Se definió este rango de voltaje y frecuencia debido a experimentos anteriores de nuestro grupo de investigación aun no publicados.

El sistema de electroestimulación empleado permite trabajar en condiciones compatibles con cultivos celu-

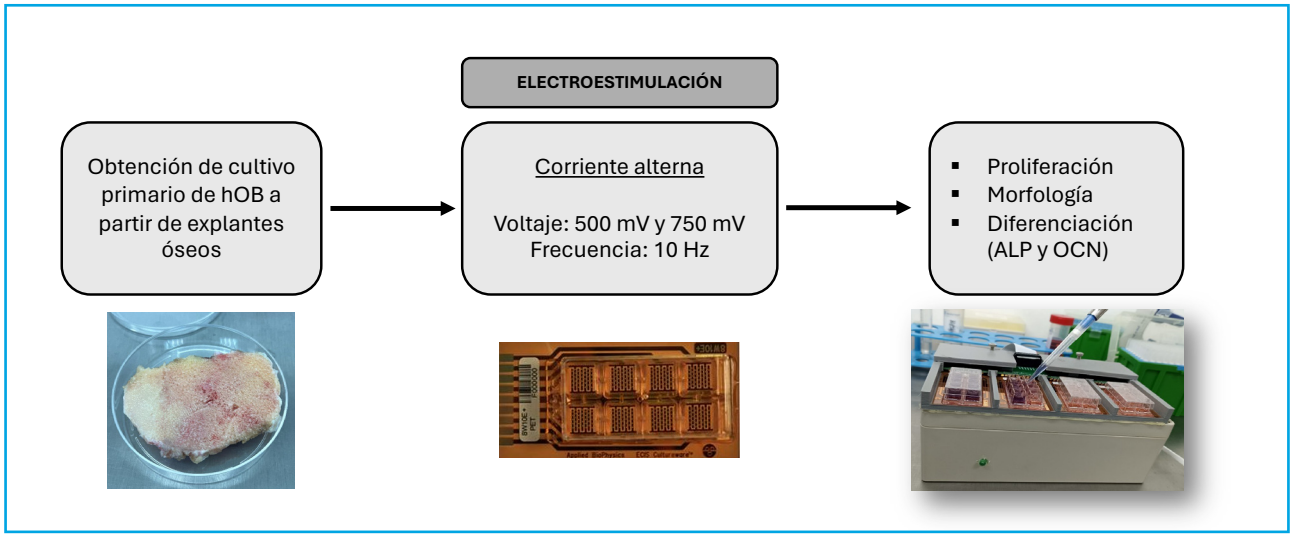

Figura 1. Esquema general del proceso realizado, creado con Bio-Render.

lares estándar, manteniendo las placas de cultivo en incubador (37 °C, 5 % CO_2 y humedad controlada). El sistema está diseñado para mantener la esterilidad durante la estimulación.

ENSAYO DE ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA

Durante la estimulación, se recogió el sobrenadante (SN) los días 4, 7 y 10, y se congelaron a -80 ºC para su posterior análisis.

La actividad ALP se determinó con el *kit* comercial Alkaline Phosphatase Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK), y se midió mediante un ensayo colorimétrico basado en la conversión de p-nitrofenilfosfato (pNPP) a *p*-nitrofenol.

Se determinó la absorbancia utilizando el lector de placas Infinity 200 Pro y los resultados obtenidos se analizaron y representaron mediante GraphPad Prism.

DETERMINACIÓN DE OSTEOCALCINA

Para estudiar la maduración de los hOB, se determinó la presencia de OCN mediante inmunofluorescencia (IF).

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %. El anticuerpo primario utilizado fue anti-humano-OCN (R&D Systems, USA) y el secundario Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Spain).

Las células fueron visualizadas utilizando microscopio de fluorescencia (Hamamatsu ORCA-03G) y se midió la fluorescencia mediante el *software* ImageJ (Softonic, España).

TRANSFECCIÓN CELULAR E INMUNOFLUORESCENCIA

Los hBO deben cultivarse a una densidad alta para asegurar la supervivencia. La expansión de las células dificulta el análisis individual morfológico. Para evitar este problema, realizamos la transfección de los hOB, tras los 10 días de cultivo, con vectores de expresión de proteínas exógenas fluorescentes. La baja eficiencia de la transfección nos permitió analizar células individuales al microscopio electrónico.

La transfección se llevó a cabo mediante lipofección con el vector pmCherry-N1 (Clontech Laboratories, Takara BioCompany, Canadá) usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies, USA) en medio OptiMEM (invitrogen).

Posteriormente, para evaluar la proliferación, morfología y diferenciación celular se llevó a cabo una IF de los hOB después de 10 días de electroestimulación. Las células fueron fijadas con 4 % de parafolmaldehido, impermeabilizadas con 0,5 % Tritón-PBS e inmediatamente bloqueadas con 1 % de albúmina de suero bovino en PBT (0,1 % Tritón en PBS). Se incubó con el anticuerpo primario conejo anti-mCherry 1:500 (Conejo, ab167453, Abcam) para el estudio morfológico. Tras lavado con PBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario correspondientes en solución de bloqueo durante 1 hora a dilución 1:500 Cy3 AffiniPure Donkey (H+L) (Conejo, AB_2340612, Jackson ImunoResearch). Para finalizar, las placas se lavaron con PBS y se incubaron con DAPI 1:500 para el estudio de proliferación. Se procedió al montaje y visualización en el microscopio de fluorescencia (Olympus BX50, PA, USA).

También se realizó una inmunofluorescencia de todas las células, como estudio independiente utilizando antiosteocalcina humana 1:500 (ratón, MAB1419, R&D Systems) como marcador de diferenciación celular. Se siguió el mismo protocolo llevado a cabo en la IF de las células transfectadas, utilizando el anticuerpo secundario a dilución 1:500: anti-mouse Alexa Fluor 488 (Cabra, A11001, Invitrogen) y DAPI a 1:500.

ANÁLISIS DE ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN, MORFOLOGÍA Y DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA

El análisis morfológico de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia y se capturaron 10 imágenes por pocillo usando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50) equipado con una cámara digital (Hamamatsu ORCA-03G).

Para el estudio de proliferación, se contaron núcleos de 40 campos aleatorios por condición mediante la herramienta Cell Counter del programa ImageJ. Para el análisis morfológico, se contabilizó el área, número de pseudofilopodios, así como su longitud máxima y media de las células pmCherry$^+$ mediante el *software* ImageJ. Para cada imagen, se realizó la calibración específica en escala píxel-µm (1 µm = 12 pixeles).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado y cada condición por duplicado.

Para llevar a cabo el análisis de datos se utilizó el *software* estadístico SPSS 23.0 (IBM, España). Se rea-

lizó un primer análisis de normalidad, mediante el test de Shapiro-Wilk. Se compararon las medias para datos independientes siguiendo *t*-student o el test *one-way* ANOVA, según se comparasen 2 o más condiciones experimentales, respectivamente. Para el estudio de actividad ALP, se llevó a cabo un análisis *t*-Student de datos pareados, ya que se obtuvieron resultados a lo largo del tiempo (4,7 y 10 días). Los datos referentes a la señal ICC OCN mostraron distribución normal. Sin embargo, el estudio de proliferación y morfológico (área, número de pseudofilopodios, longitud media y máxima) no mostró normalidad. Para las variables normales, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante *t*-Student, para comparar dos grupos independientes y posterior realización de *post-hoc* Tukey. Por otro lado, las variables no paramétricas fueron analizadas mediante un estudio Kruskall-Wallis.

Los datos de edad de los pacientes se representan como media ± desviación típica, los datos de los análisis experimentales se muestran como media ± error estándar de la media (SEM). En todos los casos se consideró una $p < 0,05$ como nivel de significación estadística.

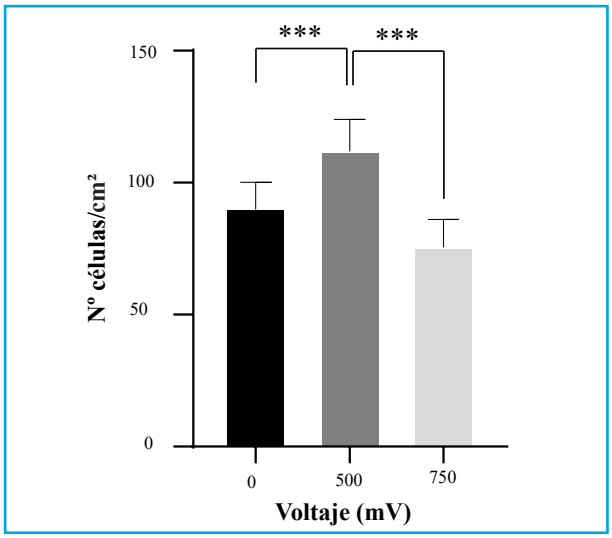

Figura 2. Efecto de la estimulación con corriente alterna sobre la proliferación en cultivos primarios hOB tras 10 días de cultivo. Se evaluaron las respuestas celulares a la frecuencia de 10 Hz bajo diferentes voltajes: 500 mV y 750 mV. Los valores se expresan como porcentaje de viabilidad en relación con el control sin estimulación (0 Hz). Diferencias estadísticas: ***$p < 0,001$.

RESULTADOS

Obtuvimos cuatro cultivos primarios de hOB de 4 pacientes que fueron sometidos a artrodesis. La edad media de los pacientes fue de 55 ± 2, fueron 2 mujeres y 2 varones, y en los 4 casos se alcanzó la confluencia celular óptima a los 22 ± 2 días. Los datos se organizan en función de los diferentes parámetros funcionales y morfológicos evaluados, permitiendo observar cómo varía la respuesta celular en relación con el voltaje aplicado.

PROLIFERACIÓN

Analizamos la proliferación de hOB en función del voltaje de electroestimulación aplicado (0, 500 o 750 mV) a una frecuencia de 10 Hz durante 10 días. La variable analizada corresponde a la densidad celular (células/cm²).

En la condición control, sin estímulo eléctrico, se registra una densidad celular media de 90,26 ± 7,70 células/cm². En aquellas células estimuladas a 500 mV, observamos un aumento significativo en la proliferación celular ($p < 0,001$) alcanzando una densidad de 112,25 ± 11,03 células/cm² mientras que en la condición de 750 mV, la proliferación fue similar a la condición control (75,90 ± 7,82 células/cm²) (Fig. 2).

MADURACIÓN OSTEOBLÁSTICA

La maduración celular se analizó cuantificando los valores de la actividad de ALP a 4, 7 y 10 días de cultivo en el sobrenadante celular. Los valores se muestran en la figura 3.

Tanto en la condición de 500 mV como a 750 mV, observamos una progresión en aumento de la actividad de ALP a lo largo de los días de cultivo, en ambos casos, obtuvimos una actividad máxima a los 10 días.

En el día 7 se observaron aumentos significativos de la actividad ALP respecto a la condición control frente a 750 mV con unos valores de 0,72 U/mL ± 0,02 vs 0,76 U/mL ± 0,01. A los 10 días de cultivo, los niveles de ALP a 500 mV y 750 mV aumentaron significativamente respecto a las células control no estimuladas, con valores de 0,74 U/mL ± 0,006 a 500 mV ($p < 0,01$), 0,82 U/mL ± 0,02 a 750 mV ($p < 0,001$) frente a control 0,70 U/mL ± 0,01.

Con respecto a la síntesis de OCN, la figura 4 muestra la señal IF de OCN en hOB expuestas a los voltajes del estudio. La variable registrada corresponde a la intensidad de la señal IF medida en unidades arbitrarias.

Se muestra cómo la señal de OCN es significativamente superior ($p > 0,001$) a 500 mV respecto a la condición control. A 750 mV, observamos una tendencia en aumento sin llegar a alcanzar la significación.

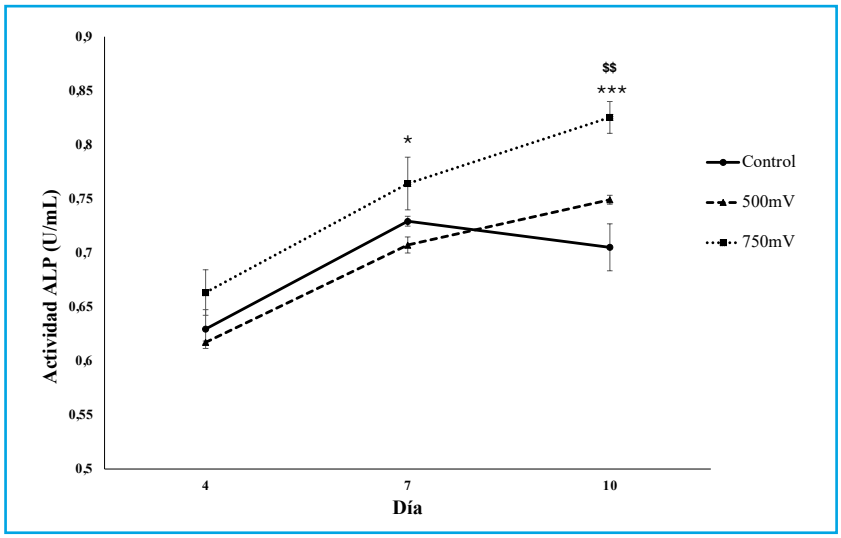

Figura 3. Estudio de actividad de ALP en hOB durante la electroestimulación medida en los días 4, 7 y 10 por corriente alterna a 10 Hz aplicando voltajes de 500 mV y 750 mV. Los datos se expresan en U/mL y se realiza una comparación estadística con el control osteogénico no estimulado (0 Hz) del día del estudio. *$p < 0,05$; ***$p < 0,001$.

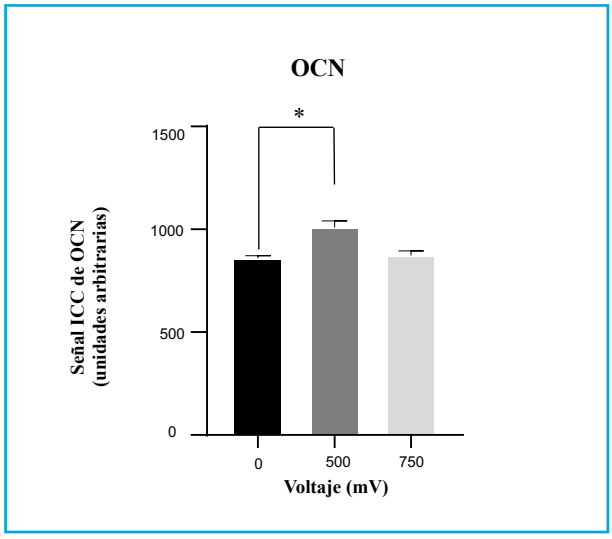

Figura 4. Estudio de la señal IF de OCN de hOB tras la electroestimulación por corriente alterna a 10 Hz aplicando voltajes de 500 mV y 750 mV durante 10 días; (*$p < 0,05$).

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Nos planteamos estudiar la morfología celular de los hOB para demostrar si la electroestimulación inducia cambios de forma, tamaño, número de prolongaciones citoplasmáticas (pseudofilopodios) o la extensión de las mismas. Dado que observar la morfología en un cultivo es complejo, se transfectaron las células, con una tasa de 10 % de transfección, con el objetivo de observar cél2ulas aisladas y poder cuantificar y evaluar todos los parámetros (Fig. 5).

Respecto al estudio del área celular media de los hOBs (μm^2), el cultivo control presentó un área media de 167,03 μm^2 ± 12,56. La estimulación a 500 mV produjo un aumento notable del área, alcanzando 181,78 μm^2 ± 17,50. A 750 mV el área media fue de 200 μm^2 ± 15,89, siendo superior al valor observado en el grupo control, pero sin alcanzar diferencia significativa.

En cuanto al recuento total de pseudofilopodios por hOB, tanto en las células estimuladas como en el cultivo control, no se observaron diferencias significativas ya que tanto en los OB estimulados a 500 mV, a 750 mV como la condición control presentaron 6,32 ± 0,25 pseudofilopodios por célula.

Los valores alcanzados en la longitud máxima de los pseudofilopodios fueron similares en todos los cultivos de hOB, llegando a valores próximos a cerca de 14,55 µm ± 1,40 en cada condición. Respecto a la longitud media de los mismos, no mostró diferencias significativas entre el grupo control y las células estimuladas a 500 mV, ya que ambos alcanzaron una media de 7,1 µm ± 0,40. En cambio, la estimulación eléctrica a 750 mV resultó en una disminución no significativa, situándose en valores de 5,19 µm ± 0,63.

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que los cultivos de hOB estimulados a 500 mV presentan un aumento de la proliferación. Estos resultados están en consonancia con los de otros autores los cuales también observan un aumento tanto en la actividad metabólica como en la proliferación celular bajo estimulación eléctrica. Esto sugiere que la estimulación eléctrica potencia el crecimiento celular bajo condiciones específicas, observado que los campos eléctricos acoplados de forma capacitiva incrementaron significativamente la proliferación

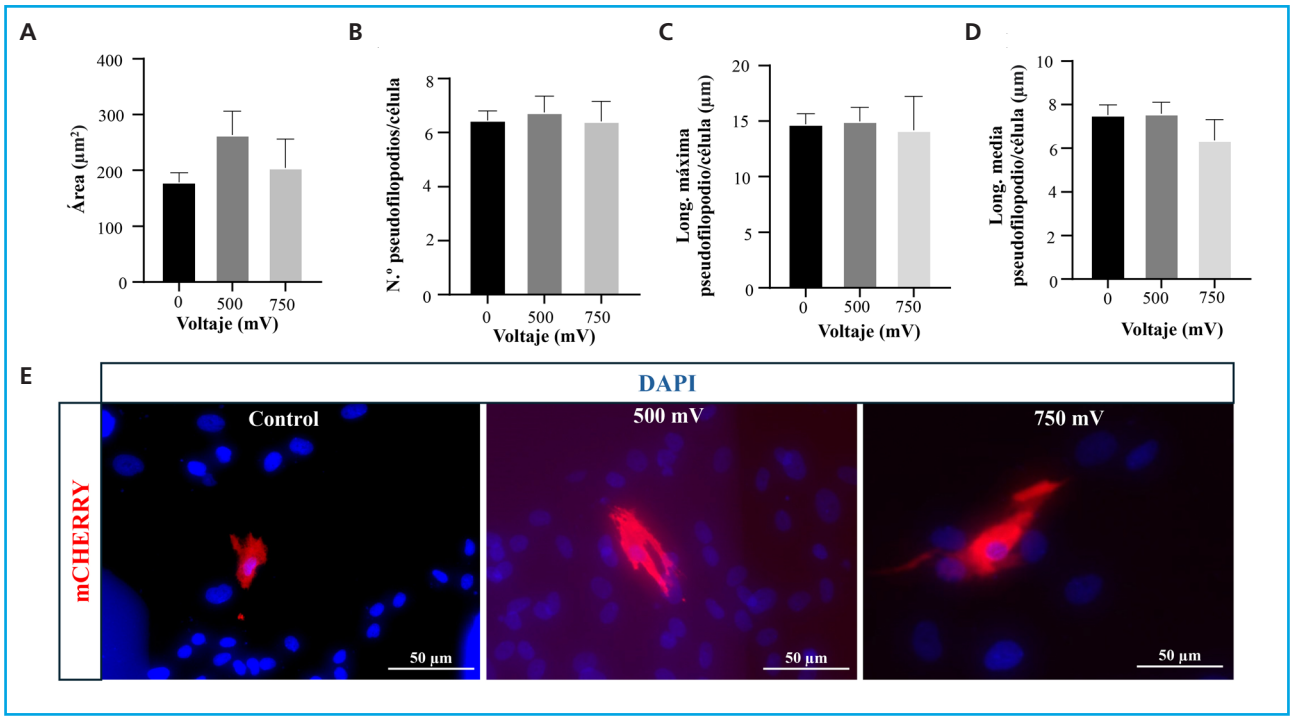

Figura 5. Estudio morfológico en hOB tras la electroestimulación por corriente alterna a 10 Hz aplicando voltajes de 500 mV y 750 mV. A. Área (µm²). B. Número de pseudofilopodios/célula. C. Longitud máxima de los pseudofilopodios/célula. D. Longitud media de pseudofilopodios/célula. E. Inmunofluorescencia de hOB tras electroestimulación a 10 Hz a los voltajes de 500 mV y 750 mV respecto a la situación control (0 mV). Células transfectadas con el plásmido mCherry (rojo); núcleos celulares con DAPI (azul).

de células osteoblásticas respaldando el hecho de que la estimulación eléctrica puede favorecer la expansión celular en fases tempranas del proceso osteogénico (12,13). En otros estudios realizados, se ha descrito que la estimulación eléctrica produce un aumento en la actividad metabólica de los hOB y de la expresión de marcadores implicados en la remodelación ósea (14). Sin embargo, en diversos estudios no se han observado diferencias significativas en la regeneración ósea tras aplicar estimulación eléctrica alterna a 0,2 V y 1,4 V, lo que sugiere que es una respuesta dependiente de las condiciones de estimulación eléctrica (15). Este aumento de proliferación podría deberse a que la corriente continua puede alterar el potencial de membrana celular, activando canales iónicos dependientes de voltaje, especialmente canales de calcio. El aumento en la entrada de Ca^{2}* puede activar cascadas de señalización intracelular que promueven la proliferación mediante la activación de proteínas quinasas A y C (PKA y PKC). Por otro lado, se ha descrito que el aumento de vinculina induce una mejor adhesión celular, lo que puede activar señalización mediada por integrinas y promover la proliferación a través de señales mecanotransductoras (14-16).

La maduración celular la valoramos cuantificando la actividad de ALP y OCN, como biomarcadores claves en el proceso de formación ósea ya que son enzimas producidas por los osteoblastos que participan en la mineralización ósea.

En base a los datos obtenidos, se observó un aumento progresivo entre días 4-10 en ambos cultivos estimulados, siendo más evidente en las células estimuladas a 750 mV. ALP es un marcador de maduración temprana osteoblástica y de preparación de la matriz para mineralización, este patrón temporal es coherente con la transición de pre-OB a OB maduros, donde la actividad de ALP precede a la expresión de proteínas de matriz (como OCN) y a la deposición de hidroxiapatita. Por otro lado, la mayor expresión de OCN se mostró en los cultivos de hOB estimulados a 500 mV.

Varios autores han descrito que la expresión de ALP y/o OCN aumentó de forma notable tras la aplicación de campos electromagnéticos junto con un campo eléctrico alterno tradicional tanto en células madre humanas derivadas de hueso alveolar como en cultivos de células MC3T3 (17-19). De manera similar se mostró que la combinación de electroestimulación con hidrogel de hidroxiapatita incrementa la expresión de marcadores osteogénicos y promueve la diferenciación de hOB, favoreciendo su maduración y mineralización (20).

Los cambios morfológicos observados en los osteoblastos tras ser sometidos a diferentes voltajes reflejan va-

riaciones relevantes en su comportamiento biológico. A partir de los resultados del estudio se observa un incremento del área celular en las células estimuladas a 500 mV, posiblemente relacionado con un aumento en la producción de matriz extracelular (15). Con respecto al número de pseudofilopodios observados, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de OB estimulados. Aunque estos resultados no son concluyentes, estudios previos han demostrado que la estimulación eléctrica puede modular la organización del tejido e incrementar su actividad celular, lo que está relacionado de forma indirecta con la formación de pseudofilopodios. Concretamente, estudios en neuronas han evidenciado que la estimulación eléctrica modula parámetros estructurales como la longitud y orientación celular (10), lo que sugiere que este fenómeno podría manifestarse en OB, dado que la formación de pseudofilopodios están relacionados con procesos de migración y regeneración ósea. Asimismo, en estudios previos se ha descrito que la estimulación eléctrica induce cambios morfológicos generales en hOB, como alteraciones en la forma celular y reorganización del citoesqueleto, lo que refuerza la idea de que la morfología de los osteoblastos responde a estímulos eléctricos (21).

Basándose en trabajos previos, se plantea la hipótesis de que la estimulación con corriente continua posiblemente aumenta la concentración de calcio extracelular y promueve la señalización celular, así como la expresión de diferentes proteínas de adhesión celular y otros marcadores de la matriz extracelular (como vinculina, fosfatasa alcalina, osteocalcina, etc.), lo que acelera el crecimiento y la maduración progresiva de los osteoblastos.

A partir de los estudios previos, se propone que la estimulación con corriente continua podría elevar los niveles de calcio en el espacio extracelular y activar diversas rutas de señalización celular (16). Este estímulo favorecería también la producción de proteínas implicadas en la adhesión celular y en la matriz extracelular, la fosfatasa alcalina y la osteocalcina, contribuyendo así a acelerar tanto la proliferación como la maduración progresiva de los osteoblastos (22).

La fortaleza del estudio es el uso de hOB primarios como modelo de investigación, evitando los cambios genéticos que presentan las líneas celulares convencionales, por otro lado, el sistema de estimulación está totalmente controlado y regulado por análisis integrados. En modelos de fractura ósea, la estimulación eléctrica ha demostrado mejorar la calidad ósea, evidenciándose en un aumento de la densidad mineral y resistencia mecánica del hueso fracturado, lo que apoya la aplicabilidad de estimulación eléctrica en estudios de regeneración ósea (23). Las limitaciones principales son: por un lado, el pequeño tamaño muestral y el hecho que sean 2 varones y 2 mujeres que no nos permitió hacer estudios separados por sexo y, por otro lado, la duración limitada del estudio (10 días) que viene determinada por la dificultad de mantener los cultivos hOB y la ausencia de análisis de mineralización tardía.

Los resultados muestran tres conclusiones: a) mejoría de la proliferación y expansión del área celular a 500 mV (pero reducción de densidad a 750 mV); b) aumento de la actividad de ALP con el tiempo, particularmente significativo al día 10 en ambos voltajes frente al control; y c) incremento significativo de la señal de osteocalcina (OCN) a 500 mV, sin cambios relevantes en número ni longitud máxima de pseudofilopodios respecto a control.

Se concluye que la estimulación alterna a 10 Hz y 500 mV mejora proliferación, expande el área celular y potencia la maduración (OCN) osteoblástica, siendo la condición óptima y recomendable para estudios posteriores en modelos de animales y humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chen C, Bai X, Ding Y, Lee IS. Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering. Biomater Res 2019;23:25. DOI: 10.1186/s40824-019-0176-8
2. Zhang X, Wang T, Zhang Z, Liu H, Li L, Wang A, et al. Electrical stimulation system based on electroactive biomaterials for bone tissue engineering. Mater Today 2023;68:177-203.
3. Wang Y, Li Z, Chen X, Tan Y, Wang F, Du Y, et al. Electroactive differential growth and delayed instability in accelerated healing tissues. J Mech Phys Solids 2024;193:105861. DOI: 10.1016/j.jmps.2024.105867
4. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J Cell Biochem 2006;99(5):1233-9. DOI: 10.3390/ijms20071694
5. Buo AM, Tomlinson RE, Eidelman ER, Chason M, Stains JP. Connexin43 and Runx2 interact to affect cortical bone geometry, skeletal development, and osteoblast and osteoclast function. J Bone Miner Res 2017;32(8):1727-38. DOI: 10.1002/jbmr.3152
6. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. Biomed Res Int 2015;2015:421746. DOI: 10.1155/2015/421746
7. Rubert M, de la Piedra C. La osteocalcina: de marcador de formación ósea a hormona; y el hueso, un órgano endocrino. Rev Osteoporos Metab Miner 2020;12(4):146-51. DOI: 10.4321/S1889-836X2020000400007
8. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. Osteoporos Int 2011;22(2):391-420. DOI: 10.1007/s00198-010-1501-1
9. Aleem IS, Aleem I, Evaniew N, Busse JW, Yaszemski M, Agarwal A, et al. Efficacy of electrical stimulators for bone healing: a meta-analysis of randomized sham-controlled trials. Sci Rep 2016;6:31724. DOI: 10.1038/srep31724

10. Martín D, Gil A, Sanchis A, Martínez-Ramos C, Pradas MM, Vallés-Lluch A, et al. DC electrical stimulation enhances proliferation and differentiation on N2a and MC3T3 cell lines. J Biol Eng 2022;16:27. DOI: 10.1186/s13036-022-00306-8
11. Leppik L, Oliveira KMC, Bhavsar MB, Barker JH. Electrical stimulation in bone tissue engineering treatments. Eur J Trauma Emerg Surg 2020;46(2):231-44. DOI: 10.1007/s00068-020-01324-1
12. Mata D, Boix-Lemonche G, Marchat D, Llorens E, Ginebra MP, Canal C, et al. Smart electroconductive bioactive ceramics to promote in situ electrostimulation of bone. J Mater Chem B 2015;3(9):1831-45. DOI: 10.1039/c4tb01628a
13. Hartig M, Joos U, Wiesmann HP. Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. Eur Biophys J 2000;29(7):499-506. DOI: 10.1007/s002490000100
14. Stephan S, Zimmermann J, Klinder A, Sahm F, van Rienen U, Kämmerer PW, et al. Establishment and evaluation of an in vitro system for biophysical stimulation of human osteoblasts. Cells 2020;9(9):1995. DOI: 10.3390/cells9091995
15. Sahm F, Zimmermann J, Klinder A, Stephan M, van Rienen U, Kämmerer PW, et al. Alternating electric fields modify the function of human osteoblasts growing on and in the surroundings of titanium electrodes. Int J Mol Sci 2020;21(18):6944. DOI: 10.3390/ijms21186944
16. Bodhak S, Bose S, Kinsel WC, Bandyopadhyay A. Investigation of In Vitro Bone Cell Adhesion and Proliferation on Ti Using Direct Current Stimulation. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2012;32(8):2163-8. DOI: 10.1016/j.msec.2012.05.032
17. Hiemer B, Ziebart J, Jonitz-Heincke A, Grunert PC, Su Y, Hansmann D, et al. Magnetically induced electrostimulation of human osteoblasts results in increased cell viability and osteogenic differentiation. Int J Mol Med 2016;38:57-64. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2590
18. Lim K, Hexiu J, Kim J, Seonwoo H, Cho WJ, Choung PH, et al. Effects of electromagnetic fields on osteogenesis of human alveolar bone-derived mesenchymal stem cells. Biomed Res Int 2013;2013:296019. DOI: 10.1155/2013/296019
19. Liu J, Zhang Y, Wang H, Li X, Chen Z, Liu Y, et al. The effects and mechanisms of electromagnetic fields on bone remodeling: from clinical to laboratory. J Orthop Translat 2025;52:14-26. DOI: 10.1016/j.jot.2025.03.003
20. Gao J, Li Y, Wang X, Zhang L, Chen Y, Liu H, et al. Electrical stimulation combined with hydroxyapatite hydrogel for bone regeneration. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2025;113(11):e35687. DOI: 10.1002/jbm.b.35687
21. Engel N, Dau M, Engel V, Franz D, Klemmstein F, Thanisch C, et al. Combining electrostimulation with impedance sensing to promote and track osteogenesis within a titanium implant. Biomedicines 2023;11(3):697. DOI: 10.3390/biomedicines11030697
22. Mahadeo CO, Shahin-Shamsabadi A, Khodamoradi M, Fahnestock M, Selvaganapathy PR. The Effects of Electrical Stimulation on a 3D Osteoblast Cell Model. Cells 2025;14:396. DOI: 10.3390/cells14060396
23. Yao G, Kang L, Li C, Chen S, Wang Q, Yang J, et al. A self-powered implantable and bioresorbable electrostimulation device for biofeedback bone fracture healing. Proc Natl Acad Sci U S A 2021;118(28):e2100772118. DOI: 10.1073/pnas.2100772118