

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA TOXICIDAD
POR 2 – HIDROXIETIL METACRILATO (HEMA)
EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS**

TESIS DOCTORAL

Doctorando: Gonzalo López González.-

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Histología

Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS - 115

**“Evaluación Biológica de la toxicidad por 2 – Hidroxietil Metacrilato
(HEMA) en Fibroblastos Gingivales Humanos”**

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III con los Proyectos titulados “Estudio de los efectos citotóxicos de los sistemas adhesivos dentales en operatoria dental e ingeniería tisular odontológica” – PI: 031052 y “Fabricación de Sustitutos de mucosa oral humana por Ingeniería Tisular. Evaluación de la viabilidad celular y tisular” – PI: 041306.

Granada, a 22 de noviembre de 2006.

Fdo: Gonzalo López.-

D. Antonio CAMPOS MUÑOZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y de Odontología de la Universidad de Granada, España;

Dña. M^a Carmen SÁNCHEZ QUEVEDO, Profesora Titular del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y de Odontología de la Universidad de Granada, España;

D. Miguel ALAMINOS MINGORANCE, Investigador Contratado, adscrito al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y de Odontología de la Universidad de Granada, España;

CERTIFICAN:

Que D. Gonzalo López González, Licenciado en Medicina y Cirugía ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral “Evaluación Biológica de la toxicidad por 2 – Hidroxietil Metacrilato (HEMA) en Fibroblastos Gingivales Humanos”, y que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Prof. D. A. Campos Muñoz

Prof. Dña. M^a C. Sánchez Quevedo

Prof. D. M. Alaminos Mingorance

Granada, a 22 de noviembre de 2006

Agradecimientos

La presente Tesis Doctoral representa la consecución de una meta, en pos de la cual comencé no ya desde que tuviera la inmensa suerte de que mis directores de tesis empezaran a tutelarme, sino desde el momento que decidí estudiar Medicina. En todo este tiempo, y ya se han cumplido doce años, he recibido la ayuda y la inspiración de muchas personas a las que quisiera dirigir estas líneas de agradecimiento, confiando en no olvidar a nadie y pidiendo indulgencia, si así fuera el caso, para mi torpe memoria.

Quisiera agradecer al profesorado del Departamento de Histología su excelente labor docente, tanto teórica como práctica, y en especial al Dr. Vicente Crespo, por su apoyo durante los cursos de doctorado.

A mis directores de Tesis: al Dr. Miguel Alaminos, por su ayuda inconmensurable, a la Dra. M^a Carmen Sánchez, por sus consejos e infinita paciencia y al Dr. Antonio Campos, una de las personas que sin duda más ha influido en mi vida, tanto académica como no académica. No tengo palabras para agradecer la extraordinaria oportunidad que me han brindado, no habiendo sido posible la elaboración de esta Tesis sin su guía.

A todos los amigos de mis padres, que tanto han cuidado de mí, especialmente desde el desgraciado fallecimiento de mi Padre.

Al Dr. Ismael Ángel Rodríguez, que además de ser un modelo para mí en múltiples sentidos me ha enseñado el significado de la palabra Hermano, hasta el punto de considerarme uno más de su familia, a cuyos miembros (padres, hermano, tíos, primos), quisiera también agradecer su cariño.

A todos mis amigos, a los que tengo más lejos (Antonio, Juan Pedro, Eduardo, Helena, Olga, Clara...), como los que tengo más cerca (Salva, M^a del Mar, Juanma...), y como no, a Agustín, con quien tantas cosas he compartido. Sin la amistad y el apoyo de todos ellos difícilmente sería la persona que soy hoy día.

A Sonia, por haberme aguantado y ayudado tanto y tan bien durante todos estos meses.

Y por último, a las dos personas a las que les debo todo. A mi Padre, Pepe, del que no transcurre un día sin recordarlo. Después de todo lo que pasamos juntos, de los buenos tiempos (quién se acuerda de los malos), de las risas, el cariño, los nervios y las esperanzas, quiero pensar que, donde esté, se sentirá más que contento con el logro que supone esta Tesis. Y a mi Madre, Carmen, quien más me quiere, que me lo ha dado todo siempre y sin reparo, y que es sin duda mi mejor amiga.

A mi Padre.-

1. Introducción.....	Pag. 1
1.1. Biomateriales.....	Pag. 2
1.2. Biomateriales en Medicina y Odontología.....	Pag. 8
1.3. Citotoxicidad de los biomateriales.....	Pag.15
1.4. Objetivos.....	Pag. 20
2. Material y Métodos.....	Pag. 22
2.1. Obtención de muestras de mucosa oral humana	Pag. 23
2.2. Obtención de cultivos primarios de fibroblastos.....	Pag. 25
2.3. Subcultivo de fibroblastos procedentes de cultivos primarios de mucosa oral	Pag. 26
2.4. Estudio de citotoxicidad mediante cuantificación del nivel de Celularidad en cultivo.....	Pag. 29
2.5. Estudio de citotoxicidad mediante cuantificación del nivel de la liberación de LDH.....	Pag. 30
2.5.1. Preparación disoluciones de HEMA.....	Pag. 31
2.5.2. Tratamiento de fibroblastos con las soluciones de HEMA.....	Pag. 31
2.5.3. Cuantificación LDH libre.....	Pag. 31
2.6. Estudio de la citotoxicidad mediante la liberación de ADN.....	Pag. 33
2.6.1. Método de cuantificación de ADN libre en el medio de cultivo.....	Pag. 33
2.6.2. Método de amplificación de los genes mediante PCR.....	Pag. 34
2.7. Estudio de la citotoxicidad mediante microanálisis por Energía dispersiva de rayos X	Pag. 36
2.7.1. Adhesión de las células al soporte.....	Pag. 36
2.7.2. Eliminación del medio extracelular.....	Pag. 37

2.7.3. Criofijación y desecación de las muestras.....	Pag. 37
2.7.4. Montaje y recubrimiento de las muestras.....	Pag. 40
2.7.5. Instrumentación, parámetros analíticos y condiciones de observación.....	Pag. 40
2.7.6. Observación de las muestras.....	Pag. 40
2.7.7. Método de cuantificación para microanálisis por energía dispersiva de rayos X con microscopía electrónica de barrido.....	Pag. 41
2.8. Estudio Estadístico.....	Pag. 47
3. Resultados.....	Pag. 48
3.1. Resultados del estudio de la citotoxicidad del HEMA mediante determinación del nivel de celularidad.....	Pag. 49
3.2. Resultados del estudio de la citotoxicidad del HEMA mediante la liberación de LDH.....	Pag. 56
3.3. Resultados del estudio de la citotoxicidad del HEMA mediante la liberación de ADN.....	Pag. 63
3.4. Resultados del estudio de la citotoxicidad del HEMA mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X	Pag. 69
3.5. Resultados estadísticos.....	Pag. 110
3.5.1. Nivel de celularidad.....	Pag. 110
3.5.2. Liberación de LDH.....	Pag. 113
3.5.3. Liberación de ADN.....	Pag. 116
3.5.4. Microanálisis.....	Pag. 119
4. Discusión.....	Pag. 120
5. Conclusiones.....	Pag. 133
6. Bibliografía.....	Pag. 136

1. INTRODUCCIÓN

En la introducción de la presente Tesis Doctoral consideramos en primer lugar el concepto de los Biomateriales en el contexto de las Ciencias de la Salud y especialmente de la Ingeniería Tisular. En segundo lugar consideramos los tipos de Biomateriales y la citotoxicidad de los mismos. Finalmente, a partir de dichas consideraciones, formularemos los objetivos generales y específicos que constituyen la base del trabajo experimental que se desarrolla en nuestro estudio.

1.1 BIOMATERIALES

El uso de los biomateriales es profuso en el momento actual, como lo demuestra el hecho de que más de cincuenta millones de personas viven con algún tipo de prótesis en cuya composición intervienen (Arcos et al, 2002). El aumento de la esperanza de vida, además de otros factores sociológicos, entre los que se encuentran la cada vez mayor demanda de seguridad y fiabilidad médica, y el propio desarrollo de ésta y de las técnicas quirúrgicas, han hecho que el requerimiento de los biomateriales se haya incrementado y potenciado de forma espectacular su desarrollo. Debe tenerse en cuenta que en un principio los biomateriales surgieron, esencialmente, como productos industriales seleccionados bajo el criterio de cumplir de forma básica ciertos requisitos de aceptabilidad biológica. Sin embargo, en la actualidad, la mayoría de estos materiales son diseñados, sintetizados y procesados con el único fin de tener una aplicación médica. A tal efecto son materiales *implantables* intracorporalmente en un paciente con el objeto no sólo de sanar, sino también de proporcionar una actividad fisiológica que proporcione al sujeto que lo porta una vida lo más normal posible (Vallet y Rámila, 2000). Estas consideraciones hacen que entre las características que de ellos se esperan esté la *Biocompatibilidad*, entendida como la premisa elemental de

que no se produzcan reacciones adversas en el contacto *tejido – material*, precepto extensible a las partículas que se liberan en cualquier implante como consecuencia de su desgaste y de los productos de degradación que se pudieran originar (Arcos et al, 2002), sin olvidar que la *tolerancia* a un producto y su *toxicidad* dependerán de la concentración a la que se encuentre presente. Así mismo, habrán de poseer la *Durabilidad* adecuada al destino y objetivo del biomaterial. De esta forma, y según la necesidad de que su permanencia en el organismo sea mayor o menor, se definirán dispositivos *provisionales* o *definitivos*, con las consiguientes variaciones en su composición. Por último, otra de las características requeridas será la *Resistencia*, tanto al desgaste por factores químicos (*corrosión*) como físicos (*tensiones, factores cinéticos y resistencias*) (Willian, 1987).

Todo lo anterior explica por qué las investigaciones en el campo de los biomateriales constituyen un ejemplo claro de actividad interdisciplinaria que no puede ser encuadrada de forma única dentro de los límites de las materias universitarias tradicionales. De esta forma, mientras la *Ciencia* de los biomateriales estudia los parámetros que definen las interacciones entre estos con un sistema biológico, la *Ingeniería* de biomateriales incluye la investigación y desarrollo de materiales con control de calidad, tanto en lo que se refiere a su estructura como a su tamaño, tomando como referencia para esto la escala de nanómetros, lo que está dando lugar en el momento presente al desarrollo de la *nanotecnología*. Esta naturaleza multidisciplinaria hace que tanto la *Ciencia* como la *Ingeniería* de los biomateriales compartan áreas temáticas pertenecientes a variados sectores del conocimiento, como es el caso de las ciencias básicas, las especialidades médicas y la ingeniería (Hebling et al, 1998).

Entre las ciencias básicas involucradas destacan la *Biología Celular y Molecular* y la *Histología*, además de los estudios sobre materiales y superficies. Tanto en *Medicina* como en *Biomedicina*, se hace un profuso uso de los biomateriales en los campos de la cirugía en sus diferentes modalidades (Traumatología, Oftalmología, Maxilofacial, etc.), así como en *Odontología*, lo que justifica su participación en este desarrollo. Por último, en el campo de la *Ingeniería*, destacan los estudios centrados en las características de los materiales en sí: su composición, mecánica y química. Puede por tanto afirmarse que tanto en la *Ciencia* como en la *Ingeniería* de los biomateriales, más que en ninguno de los otros campos de la tecnología contemporánea, se reúnen investigadores con diferente formación académica, por lo que es necesario mantener una comunicación clara y fluida (Rosato et al, 1998).

En *Medicina*, los biomateriales tienen un alto valor añadido. Su desarrollo y uso se ha hecho profuso en sus diferentes campos, destacando el de la *Ingeniería Tisular*. Se define ésta como un área en expansión que, asentada en los conocimientos básicos de la *Histología*, tiene por objeto construir tejidos nuevos, funcionalmente activos, a partir de células procedentes de cultivos desarrollados previamente y de biomateriales de distinta naturaleza que sirven como soporte o andamiaje (Langer y Vacanti, 1995). La *Ingeniería Tisular* se asienta en los conocimientos histológicos y recibe asimismo aportaciones de otras disciplinas fundamentales (fig. 1) que ayudan al logro final del objetivo propuesto: la construcción de un nuevo tejido vivo y funcional capaz de sustituir con eficacia terapéutica al tejido original dañado (Campos, 2004)

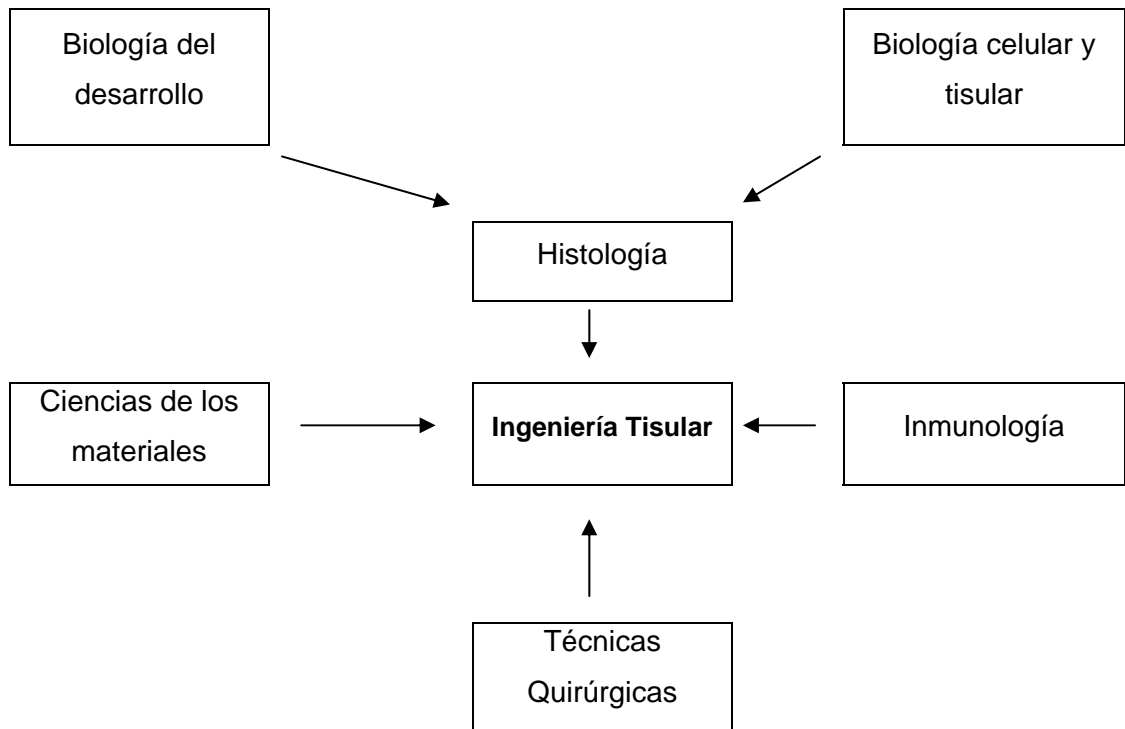


Fig. 1: Aportaciones a la Ingeniería Tisular

En la actualidad se han desarrollado tres mecanismos fundamentales para la creación de un nuevo tejido. En primer lugar, el diseño y posterior crecimiento de los tejidos fuera del cuerpo para más tarde implantarlos a fin de reparar o sustituir los tejidos dañados. Ejemplo de este mecanismo es la creación de piel artificial para su utilización en las quemaduras.

En segundo lugar se ha inducido la creación de un nuevo tejido utilizando el implante de dispositivos con determinados tipos de células o libres de éstas y el uso de los adecuados factores de crecimiento y estímulo del sustrato biológico en el que se asienta el biomaterial que generalmente configura el dispositivo. Prueba de esta modalidad es la regeneración tisular guiada para estimular la regeneración ósea.

Por último, un tercer mecanismo para desarrollar nuevo tejidos consiste en dispositivos internos o externos diseñados mediante el asilamiento de células del organismo y situarlas sobre o dentro de matrices estructurales y ubicar el sistema de nuevo en el organismo o bien hacerlo funcionar desde afuera. Para ello, ha tenido que evolucionar la idea que sobre la matriz extracelular se tenía, que la consideraba como un mero soporte. Hoy sabemos que es un sistema dinámico integrado por diversas moléculas y que su organización varía con los diferentes tejidos. Este conocimiento es uno de los pilares de la ingeniería de tejidos para la elaboración de este tercer tipo de dispositivo, a fin de crear un sustrato ideal para el injerto en el que se produzca el correcto desarrollo y diferenciación celular. La utilización de implantes biocompatibles compuestos por moléculas poliméricas sembradas con células autólogas es una de las estrategias a considerar. El posterior agregado de factores de crecimiento y diferenciación celular incrementará potencialmente la calidad del tejido a reemplazar, aparte de la necesidad de proveer de un adecuado medio ambiente para el desarrollo celular y tisular, hecho crucial que mantendrá la función celular y el correcto desarrollo del tejido neoformado (Campos, 2004). Las características básicas que estos

polímeros deben tener son una alta porosidad, gran superficie de contacto celular, estructura constante, forma tridimensional y biocompatibilidad. Su función será la de dirigir el crecimiento celular, bien sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas en él.

1.2 BIOMATERIALES EN MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Entre los distintos grupos de biomateriales que se utilizan en Medicina y Odontología encontramos los denominados *Cerámicos*. Si bien en principio su principal ventaja parecía ser la baja reactividad química, es decir, su carácter inerte y por tanto su biocompatibilidad, se ha demostrado que no todas las biocerámicas son inocuas, dándose la circunstancia de que gran parte de los utilizados en cirugía reconstructiva presentan bioactividad (Wilson et al, 1991). Estos productos se introdujeron en la década de los setenta, cuando comenzaron a detectarse fracasos en los que hasta ese momento se utilizaban, como el acero, aleaciones de cobalto y el polimetil metacrilato (Langer y Vacanti, 1995). En el momento actual, entre las más desarrolladas de las cerámicas se encuentran los *biovidrios*, empleadas principalmente en la reparación de huesos, debido a su eficiente capacidad de integración con el tejido vivo. Así mismo, se avanza en la investigación de los cementos quirúrgicos, provistos de actividad biológica, lo que ha dado pie a una mejora de la fijación y estabilización del implante a largo plazo, ya que la acción de dichos rellenos promueve la diferenciación celular e induce la formación de depósitos de hidroxiapatita proveniente del medio biológico en la zona de contacto entre el cemento y el hueso, lo que posibilita el crecimiento de tejido nuevo (Brittberg et al, 1994).

Otro grupo de Biomateriales son los denominados *Metálicos*. El principal límite para su utilización es la tolerancia por el organismo, por lo que es determinante la cantidad de producto que pueden llegar a aportar a los tejidos vivos. Así mismo, es también imprescindible que tengan una buena resistencia a la corrosión. En el momento actual se investiga en la mejora de las propiedades mecánicas de las aleaciones usadas de forma habitual, así como en lograr que sus superficies tengan texturas adecuadas que

provoquen la respuesta biológica deseada. Bajo esta premisa, se han desarrollado microelectrodos en dispositivos neurológicos que resisten la corrosión, especialmente el fenómeno de *tensión – corrosión* (*stress corrosion cracking*) inducida por el medio biológico. También se está prestando una especial atención a las propiedades súper elásticas de diferentes aleaciones, como la de níquel y titanio, así como al fenómeno de memoria de forma. Este conocimiento se ha aplicado para la creación de dispositivos tubulares expansibles (*stents*), usados en medicina con el propósito de mantener abiertos conductos tales como arterias, venas, uretra y tráquea, evitando así su colapso. El término *superelástico* describe la capacidad de algunas aleaciones metálicas de sufrir grandes deformaciones y retornar a la forma original una vez que la fuerza que la genera desaparece. Por ejemplo, un acero inoxidable común sufre deformaciones elásticas de un 0,5%, mientras que las aleaciones utilizadas en los *stents*, alcanzan deformaciones de hasta un 11% (Duckeyne y Hasting, 1984).

Por último encontramos el grupo de los *Biomateriales Poliméricos*. La gran variedad de fórmulas y la versatilidad de diseño (fibras, tejidos, películas, bloques) de estos materiales los han convertido en los componentes utilizados de forma más frecuente en la fabricación de dispositivos biomédicos. Clásicamente se han clasificado en *naturales* y *sintéticos*, si bien funcionalmente se diferencian en *bioestables*, de carácter permanente y particularmente útiles para sustituir de forma parcial o total tejidos u órganos lesionados o destruidos, y *biodegradables*, es decir, de carácter temporal, y por tanto con una funcionalidad limitada, ceñida al tiempo en el que el problema subsista. Así mismo, se desarrollan materiales híbridos formados por la combinación de productos de naturaleza sintética y natural (Ratner et al, 1996).

A pesar de todo lo dicho, se impone la necesidad de continuar investigando en la mejora de estos productos, especialmente en lo referente a los ensayos de

biocompatibilidad. Es importante desarrollar métodos más rápidos y menos costosos que los actuales y que puedan aplicarse sobre sistemas celulares, esto es, *in vitro*, de forma que se evalúe la interacción de nuevos materiales con el medio biológico. Estos desarrollos reducirían el gran número de ensayos en animales y en humanos "in vivo" que actualmente se llevan a cabo para obtener tal información. Además, podrían predecir con un alto grado de certidumbre el rendimiento biológico del material sometido a estudio (Lanza et al, 2000). Asimismo, se sigue en la búsqueda de materiales de referencia para la estandarización de los estudios de la relación del biomaterial con la sangre y los tejidos, y la definición de los procesos de esterilización adecuados a las distintas formulaciones y diseños existentes (Gardner y Peel, 1991).

Dentro de las múltiples aplicaciones de los polímeros cabe mencionar la de formar parte de *biosensores*. Se trata de dispositivos capaces de reconocer señales químicas, con una superficie modificada de moléculas que pueden interaccionar de forma específica con el medio biológico. Las adaptaciones de las superficies constituyen una línea de investigación importante en diferentes campos, como el de la medicina cardiovascular. En este caso, el objetivo es incrementar la compatibilidad con la sangre de los materiales en contacto con ella, disminuyendo el daño a los componentes sanguíneos (Zilla et al, 1994). Las superficies modificadas también tienen importancia en neurología, en particular en la búsqueda de recubrimientos poliméricos para *microelectrodos* que permitan una adhesión selectiva de estos al tejido nervioso asegurando un buen contacto que facilite la efectiva transmisión de señales eléctricas.

Otras aplicaciones son los *dispositivos* para la liberación de drogas, que permiten la administración de un fármaco de manera localizada y controlada en el lugar donde debe ejercer su acción. En este sentido, se han creado dispositivos que incorporan

una droga en una matriz bioabsorbible, lo que hace que la liberación y consiguiente disponibilidad de la sustancia esté determinada por la velocidad con que se degrada el polímero que la contiene (Park et al, 1988).

Así mismo, como se comentó más arriba, en el ámbito de la *Ingeniería Tisular* se ha extendido el uso de estos polímeros como soporte para el implante de células vivas. En el campo de los órganos artificiales, destacan las investigaciones orientadas a retener células hepáticas o pancreáticas dentro de soportes formados por polímeros. Esto permite por un lado la función normal de las células y por otro, la protección de ellas contra el ataque del sistema inmune (Berglund, Nerem y Sambanis, 2004). El uso de materiales como soporte de células también tiene un claro ejemplo en cardiología, donde se busca obtener prótesis vasculares en cuya superficie interna se puedan fijar las células endoteliales, lo que no se ha logrado aún con las actuales prótesis comerciales de *Dacrón*® o *Teflón*®. Recuérdese que, en condiciones fisiológicas, las células endoteliales son las que tapizan la superficie interna de los vasos sanguíneos y del corazón, y constituyen por lo tanto el material biológico que está en contacto directo con la sangre (Bujan, 1996) (Jensen et al, 1994).

El área de la ortopedia es otra de las más estudiadas, de forma particular en la fijación de fracturas, con ventajas patentes frente a los implantes metálicos. Esto es debido a que las características bioabsorbibles de los biomateriales evita el trauma de una segunda operación para extraer el dispositivo metálico, una vez que se ha soldado la fractura (Vacanti et al, 1991).

Los polímeros también se usan para paliar una complicación común en las intervenciones quirúrgicas: la aparición de adherencias entre diferentes tejidos u órganos vecinos. Ello puede ocasionar trastornos más graves que el que causó la

operación. Es común luego de una intervención quirúrgica sencilla, como por ejemplo la extirpación de un quiste de ovario, que el tejido manipulado se adhiera a los tejidos de órganos circundantes. Estas adherencias pueden, por ejemplo, impedir la libertad de movimiento del intestino delgado y dar lugar a obstrucciones intestinales. Para prevenir la aparición de las adherencias postoperatorias, se están desarrollando delgadas películas (*films*) de polímeros, en la mayoría de los casos bioabsorbibles, las cuales al evitar el contacto entre diferentes tejidos durante la fase postoperatoria, impiden la generación de adherencias (Hunt, 1996).

Con independencia de los biomateriales y las aplicaciones en Medicina hasta ahora comentadas, en Odontología, los más frecuentemente utilizados son los *adhesivos dentales*. El uso de las sustancias adhesivas se ha convertido en uno de los fundamentos primordiales en la odontología contemporánea. La evolución de dichos productos ha sido el fruto de investigaciones que han llevado a eficaces fórmulas y productos activos sobre substratos tanto dentarios como no dentarios. Esto, en conjunto con las innovaciones de las técnicas odontológicas, ha hecho que los sistemas de adhesión sean mucho más eficientes y fiables para efectuar tratamientos que conlleven la unión mecánica al esmalte y dentina (Amussen, 1985). En general, se definen los *sistemas de adhesión* como aquella sustancia capaz de conseguir una unión íntima óptima entre el tejido dentario y el material restaurador, de tal forma que se conforme un solo cuerpo fruto de la cohesión de los substratos dentarios, metálicos, poliméricos y/o cerámicos, y que conduzca a la práctica de una odontología depurada, conservadora y de la más alta calidad. La investigación en tales productos ha estado dirigida principalmente hacia la consecución de la máxima biocompatibilidad.

Es obvio que en los diferentes sistemas adhesivos disponibles en el mercado mundial, las sustancias o componentes empleados pueden variar significativamente, dando

lugar a claras diferencias entre unos y otros. Dentro de las distintas casas comerciales, a menudo, se establecen rígidos parámetros de referencia que llevan a diferencias e innovaciones en la composición de estos sistemas adhesivos, a fin de conseguir la máxima afinidad con el material restaurador del propio laboratorio.

Los sistemas adhesivos suelen tener entre sus componentes de forma habitual: 1) un *Vehículo*, que actúa como medio de transporte de los diferentes elementos que conforman el compuesto, 2) *Grupos químicos para la polimerización*, indispensables para la reacción química de conversión del biomaterial, 3) *Grupo de moléculas poliméricas adhesivas*, 4) *Carga Inorgánica*, que le confiere resistencia tensional además de un efecto anticariogénico mediante la liberación de minúsculas cantidades de iones de flúor, y por último 5) *Moléculas bifuncionales*, las cuales poseen un extremo altamente hidrofílico, capaz de humectar la dentina y en especial la malla colágena de la misma, mientras que el otro extremo es de tipo hidrofóbico, apto para la unión con el adhesivo o material de restauración respectivo. Estas moléculas bifuncionales, promotoras de adhesión, se pueden basar químicamente en tres grupos: el *BPDM* (bifenil-dimetacrilato), el *4META* (4metacril-oxi-etil-trimelitato-anhídrido) o bien en el que constituye objeto de esta tesis, el *HEMA* (2 hidroxietil-metacrilato) (Nakabayashi, 1984).

El HEMA es en efecto un polímero, componente básico de los sistemas adhesivos actuales, presente en la mayor parte de ellos. Su uso generalizado en odontología es debido a su bajo peso molecular (130), que dota a los productos de los que forma parte de una alta capacidad de *Difusión intertubular*, entendida ésta como la capacidad de un material a propagarse por el túbulo dentinario, siendo ésta proporcional a la longitud del túbulo, a su diámetro y al peso molecular de las sustancias (Espinosa y Espinosa, 1999).

Las aplicaciones del HEMA no se ciñen sólo a las odontológicas. Actualmente se usa en la fabricación de lentes intraoculares (Lee et al, 1996), (Peris et al, 1999), aplicables tras cirugía de cataratas con facoemulsificación, rindiendo unas prestaciones que igualan o mejoran a las lentes compuestas por poly hidroximetilmetacrilato (PMMA), en términos de biocompatibilidad, producción de bajo trauma intraocular y en su capacidad para ser plegadas. Esto se debe a las características hidrofílicas del HEMA, junto a su bajo peso molecular (Nahra et al, 1998). Asimismo su uso se está introduciendo progresivamente en la Ingeniería Tisular (Berglund et al, 2004) (Campos, 2006).

Se ha demostrado que los diferentes compuestos de los materiales adhesivos poliméricos pueden llegar a ser tóxicos (el monómero libre aplicado en la dentina profunda causa importantes reacciones inflamatorias pulpares) y provocar incluso reacciones de anafilaxia (al parecer por las diquetonas) (Cerdá y Bartra, 2003). En el caso del HEMA, se ha demostrado que es tóxico en pulpa al no poder ser fagocitado por los macrófagos, dando lugar a inflamación crónica y reabsorción intensa sin sensibilidad (Schuster et al, 2000). En caso de presentarse, lo hace años después de acaecer las reabsorciones internas, con importante desorganización celular que llega incluso a la necrosis pulpar (Eliades et al, 1990).

En general, son escasas las investigaciones desarrolladas en el área de la Biología Pulpar y en la literatura odontológica, que den noticia de datos significativos en referencia a la compatibilidad biológica de los distintos materiales que se utilizan en la práctica clínica. En relación con el HEMA, algunos autores han demostrado sus efectos citotóxicos utilizando metodologías muy diversas que en general resultan muy difícil de comparar a la hora de establecer indicadores significativos sobre los efectos de dicho compuesto (Campos et al, 2006) (Rodríguez, 2005) (Schiraldi et al, 2004) (Spagnuolo et al, 2004b) (Stanislawski et al 2003).

1.3 CITOTOXICIDAD DE LOS BIOMATERIALES

La capacidad de los diferentes tóxicos para ocasionar el daño celular, es decir, la citotoxicidad, va a depender de las propiedades físicas y químicas de estos, si bien su vía común final va a consistir en incidir sobre un sistema enzimático, dando lugar a una inhibición que será reversible o irreversible. Por otro lado, tal acción estará localizada de forma selectiva sobre sitios específicos de la célula. Tal es el caso de las lesiones sobre la membrana, en las que generalmente se ve alterada la estructura lipoproteica y con ello la permeabilidad de ésta, lo que conlleva la salida de nutrientes o de iones. Otro nivel de actuación es el endocelular, donde a su vez los bloqueos pueden ocasionarse por diversos mecanismos (ciclo de Krebs, síntesis de ácidos grasos, etc.). Por último, la lesión de estas sustancias puede tener también como objetivo a veces las organelas celulares, tales como las mitocondrias (responsables de los mecanismos de oxidación), el sistema microsómico, con los ribosomas (síntesis de proteínas) y el sistema retículo – endoplásmico (inducción enzimática y biodegradación) y las lesiones del núcleo (replicación del DNA y síntesis de proteínas nucleares) (Gisbert, 1998).

La forma de valorar la citotoxicidad puede llevarse a cabo en diferentes fases. Por una parte encontramos las *Pruebas iniciales*, que más abajo desarrollaremos. Incluyen éstas modelos para la citotoxicidad in vitro, en la que los materiales han de ponerse en contacto directo con células cultivadas en laboratorio. A través de esta metodología se evalúa la morfología celular, las alteraciones en la síntesis de proteínas, la respiración mitocondrial (*MTT assay*), así como distintas actividades metabólicas y enzimáticas, por lo que son pruebas que se pueden estandarizar fácilmente.

Además, este tipo de investigaciones evalúan la sensibilidad celular frente a los diferentes biomateriales y reducen por tanto la probabilidad de posteriores fracasos de biocompatibilidad en pruebas in vivo, las cuales resultan ser más caras y demandar un tiempo más prolongado.

Otro tipo serían las llamadas *Pruebas secundarias*. Consisten en evaluar las reacciones inflamatorias y/o inmunes provocadas por biomateriales, usando para ello animales de experimentación. Dentro de éstas destacan las de *implantación*, consistentes en poner el material en contacto con un tejido semejante al que va a aplicarse en la terapéutica clínica.

Por último, encontramos las *Pruebas de aplicación clínica*. Se trataría de evaluar los efectos de los biomateriales odontológicos sobre el tejido específico objeto de la aplicación terapéutica. Para ello se utilizan preferentemente primates y seres humanos. Los resultados de las pruebas realizadas sobre animales no son directamente extrapolables a humanos. En definitiva, todo el desarrollo de estas pruebas de biocompatibilidad permiten evaluar con la máxima efectividad las propiedades de los materiales dentales con la única finalidad de evitar riesgos para la salud del paciente.

Como indicábamos más arriba, los métodos para evaluar la citotoxicidad o lesión celular inducida en modelos experimentales in vitro son múltiples y variados, y están basados esencialmente en criterios morfológicos, bioquímicos y metabólicos.

Los métodos basados en la perturbación de la permeabilidad de la membrana son los más numerosos y utilizados, pudiendo distinguir dentro de estos fundamentalmente dos variantes:

- Métodos basados en el empleo de colorantes.
- Métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas, fundamentalmente enzimas, en el medio extracelular.

El principio básico de los primeros consiste en la utilización de un colorante, que en función de sus características, penetra y colorea las células vivas o muertas. La proporción relativa de las células coloreadas o no, refleja el número exacto de las células vivas o muertas, y en consecuencia, la viabilidad del conjunto de la población celular. El conteo de las diferentes poblaciones celulares puede ser efectuado por métodos microscópicos, citometría de flujo, espectrofotometría y por espectrofluometría automatizada (Slater, 2001).

Por otra parte, el segundo tipo de métodos, basados en la medición de la liberación de moléculas intracelulares, están fundamentados en las alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bajo la acción de los tóxicos. Dichos métodos comprenden dos ensayos, uno enzimático y otro radiactivo. El enzimático está basado en la medición del enzima citosólico *lactato deshidrogenasa* (LDH), enzima que es liberada en el medio extracelular tras graves alteraciones de la membrana plasmática. El método radioactivo se basa en la medida de la liberación del Cr^{51} , isótopo radiactivo que se une de manera no covalente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. Las células muertas liberan el Cr^{51} , en el medio extracelular, el cual puede ser cuantificado por un contador gamma.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos – x (EPXMA) es una técnica que utilizando un haz de electrones permite estudiar la composición química de la muestra de forma simultánea a su observación microscópica (Carini et al, 1995; 1997; 2000). A este respecto, existe un amplio número de técnicas analíticas para estimar el contenido de los elementos inorgánicos en los especímenes biológicos como la espectrografía por absorción atómica y la fotometría de llama. Estas técnicas, aparte de requerir un número elevado de células, tan sólo consideran uno o dos cationes simultáneamente. Asimismo, el empleo de métodos electrofisiológicos o fluorimétricos mediante el uso de indicadores fluorescentes específicos para iones (Fura – 2, Fluo – 3, SBFI) a fin de evaluar las actividades de los diferentes iones, no proporciona información sobre la localización subcelular debido a su baja resolución microscópica. El microanálisis por energía dispersiva de Rayos X permite sin embargo el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones ($Z \leq 11$) presentes en el espécimen irradiado por el haz de electrones y requiere tan solo un número de células pequeño.

La determinación analítica en la microscopía electrónica analítica se lleva a cabo cuando un haz de electrones acelerados incide sobre la superficie de una muestra y se produce, entre otros fenómenos, la ionización de los átomos de la misma, esto es, la pérdida de los electrones de los orbitales internos. Cuando un átomo se encuentra en un estado ionizado, otro electrón de una capa más externa salta inmediatamente a la capa deficitaria, rellenando el hueco producido. Este salto implica una liberación de energía que se manifiesta en forma de radiación electromagnética (rayos X), que es dependiente del número atómico del elemento. Los rayos X generados se pueden clasificar en dos categorías: característicos y continuos. Los rayos X característicos son generados como resultado de la colisión entre los electrones del haz primario con los electrones de los orbitales que se encuentran alrededor del núcleo. Por el contrario, los rayos X continuos o radiación continua son producidos como consecuencia de la desaceleración que sufren los electrones del haz primario al

interaccionar con el núcleo atómico. La energía de los rayos X característicos depende el número atómico del elemento y puede ser utilizada para identificar un elemento químico presente en la muestra.

El análisis de los rayos X emitidos por la muestra va a permitir conocer la composición de la misma. Dicho análisis consiste en medir la energía de los fotones producidos, previa transformación de su energía electromagnética en señal eléctrica utilizando un espectrómetro de dispersión de energía. Posteriormente, los impulsos eléctricos son clasificados utilizando un analizador multicanal acoplado a dicho sistema, originando un espectro a partir del cual es posible derivar la composición química del espécimen visualizado en el microscopio electrónico. El espectro es un histograma de frecuencia que muestra el número de rayos X detectados para cada rango de energía y está constituido por una serie de picos, designados indistintamente como líneas, de intensidad variable – rayos X característicos -, los cuales están superpuestos a un fondo continuo de menor intensidad (rayos X continuos, radiación de fondo o radiación blanca) (Goldstein et al, 1992) (Roomans y von Euler, 1996). El estudio de muestras biológicas con Microscopía Electrónica Analítica permite asimismo la cuantificación de los elementos objeto de estudio, lo cual exige el desarrollo de protocolos específicos (Campos et al, 1992) (Campos et al, 1994) (Crespo et al, 1993) (Fernández – Segura et al, 1999a) (Fernández – Segura et al, 1999b) (López – Escámez et al, 1992) (López – Escámez et al, 1993) (López – Escámez y Campos, 1994) (Warley et al, 1994) (Warley, 1997).

1.4 OBJETIVOS

Los sistemas adhesivos dentales y concretamente el HEMA, de muy amplia utilización en odontología y de uso más reciente en Ingeniería Tisular, exige establecer patrones de citotoxicidad que permitan su aplicación biocompatible en terapéutica. El estudio comparado utilizando distintas metodologías de los efectos citotóxicos del HEMA en modelos desarrollados in vitro debe facilitar, no sólo el establecimiento de indicadores específicos (*Gold Standard*), sino además la comprensión de los mecanismos biopatológicos que constituyen el sustrato de dichos procesos.

Los objetivos a desarrollar en la presente tesis doctoral, de acuerdo con lo anteriormente indicado, son los siguientes:

- *Objetivo General:*

Analizar la toxicidad del HEMA, utilizando criterios clásicos: morfológicos y bioquímicos y criterios microanalíticos, y evaluar, a partir de ellos, el mecanismo de muerte celular inducida por dicho compuesto.

- *Objetivos Específicos:*

1. Establecer un modelo experimental in vitro de citotoxicidad inducida por el HEMA mediante la utilización de Fibroblastos Gingivales Humanos.
2. Evaluar la actividad citotóxica del HEMA mediante cuantificación del nivel de celularidad.
3. Evaluar la actividad citotóxica del HEMA mediante cuantificación enzimática del LDH libre.

4. Evaluar la actividad citotóxica del HEMA mediante la cuantificación de ADN libre.

5. Evaluar la actividad citotóxica del HEMA mediante Microscopía Electrónica Analítica Cuantitativa por energía dispersiva de rayos X.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE MUCOSA ORAL HUMANA

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, se ha contado con un total de 30 muestras de mucosa oral normal de espesor total (epitelio y corion) obtenidas de 30 pacientes sometidos a diferentes procedimientos de Cirugía Oral ambulatoria bajo anestesia local. Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron tratados en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y todos los procedimientos quirúrgicos asociados se llevaron a cabo en los quirófanos con que dicho servicio cuenta en el Hospital. En todos los casos, se contó con el consentimiento informado del paciente una vez que éste había sido pertinentemente informado del procedimiento. En el momento de la obtención, ninguno de los pacientes seleccionados presentaba enfermedad sistémica grave, proceso neoplásico asociado o enfermedad infectocontagiosa. En ningún caso se extirpó más tejido del necesario para el tratamiento de la patología quirúrgica que presentaba el paciente.

Una vez obtenida la muestra, los tejidos extraídos fueron introducidos inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich Ref. D5796, Saint- Quentin-Fallavier, Francia) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomina) y antimicóticos (1.25 µg/ml de anfotericina B) (Sigma-Aldrich Ref. A5955) para evitar una eventual contaminación de la muestra. La composición del medio de cultivo DMEM se muestra en la Tabla 1.

COMPONENTE	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Medio de cultivo Ham F12
SALES INORGÁNICAS		
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.265	0.0441
CuSO ₄ •5H ₂ O	—	0.000025
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0.0001	—
FeSO ₄ •7H ₂ O	—	0.000834
KCl	0.4	0.224
MgCl•6H ₂ O	—	0.123
MgSO ₄	0.09767	—
Na ₂ HPO ₄	—	0.14204
NaCl	6.4	7.599
NaH ₂ PO ₄	0.109	—
NaHCO ₃	3.7	1.176
ZnSO ₄ •7H ₂ O	—	0.000863
AMINOÁCIDOS		
Glicina	0.03	0.00751
L-Alanina	—	0.009
L-Arginina•HCl	0.084	0.211
L-Asparagina•H ₂ O	—	0.01501
L- Ácido Aspártico	—	0.0133
L-Cisteína•2HCl	0.0626	0.035
L- Ácido Glutámico	—	0.0147
L-Glutamina	0.584	0.146
L-Histidina•HCl•H ₂ O	0.042	0.02096
L-Isoleucina	0.105	0.00394
L-Leucina	0.105	0.0131
L-Lisina•HCl	0.146	0.0365
L-Metionina	0.03	0.00448
L-Fenilalanina	0.066	0.00496
L-Prolina	—	0.0345
L-Serina	0.042	0.0105
L-Treonina	0.095	0.0119
L-Triptófano	0.016	0.00204
L-Tirosina•2Na•2H ₂ O	0.10379	0.00778
L-Valina	0.094	0.0117
VITAMINAS		
Colina	0.004	—
D- Ácido Pantoténico •½Ca	0.004	0.00048
Ácido Fólico	0.004	0.00132
Hipoxantina	—	0.00408
Ácido Linoleico	—	0.000084
mio-Inositol	0.0072	0.018
Ácido nicotínico	0.004	0.000037
Piridoxina•HCl	0.004	0.000062
Riboflavina	0.0004	0.000038
Tiamina•HCl	0.004	0.00034
Ácido Tióctico	—	0.00021
Timidina	—	0.00073
Vitamina B-12	—	0.00136
OTROS		
D-Glucosa	4.5	1.802
Fenol rojo•Na	0.0159	0.0013
Ácido pirúvico	—	0.11
Putrescina•HCl	—	0.000161

Tabla 1

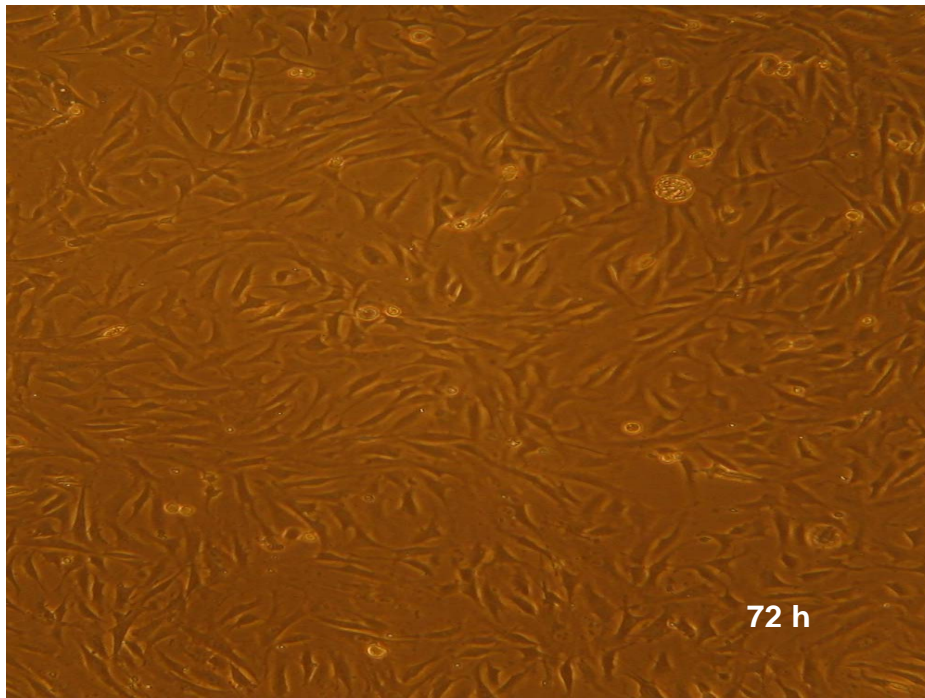
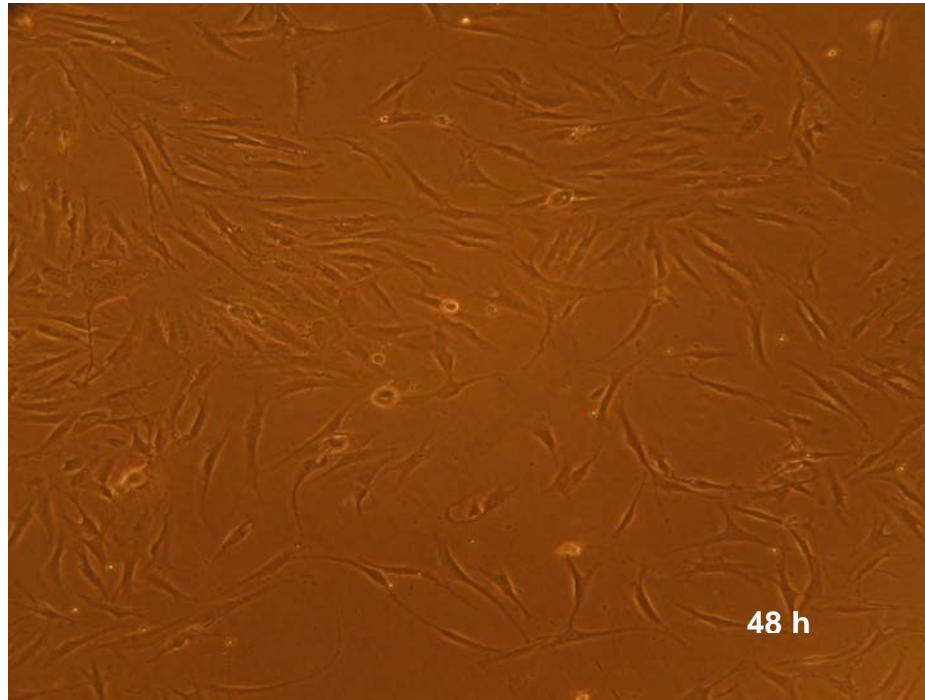
2.2 OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras fueron lavadas dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomycin y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1.25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras. Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular del corion de la mucosa oral y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras fueron incubadas a 37°C en una solución estéril de colagenasa tipo I de *Clostridium hystoliticum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 10-12 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno del corion y liberar los fibroblastos estromales. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a retirar el epitelio no digerido de la mucosa oral. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contenía las células estromales disgregadas del corion, recogiendo el pellet celular correspondiente a los fibroblastos en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie. Como medio de cultivo, se utilizó DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) suplementado con antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0.25 µg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665) al 10%. En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

2.3 SUBCULTIVO DE FIBROBLASTOS PROCEDENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE MUCOSA ORAL

Una vez alcanzada la confluencia celular, los distintos cultivos celulares de fibroblastos (fig. 2) se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1 ml de una solución de tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo. Una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 1 ml de medio de cultivo DMEM. La presencia de abundantes proteínas séricas en el medio de cultivo DMEM es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El *pellet* celular se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de medio DMEM y parte de las células se cultivaron en:

- a) Frascos de cultivo de 15, 25 ó 75 cm² de superficie, para su utilización en subcultivos posteriores.
- b) Placas Microplate de 96 pocillos, para el estudio de LDH, cuantificación de ADN mediante espectrofotometría y estudios de la densidad celular
- c) Rejillas de oro, para su estudio mediante técnicas de microscopía electrónica analítica cuantitativa



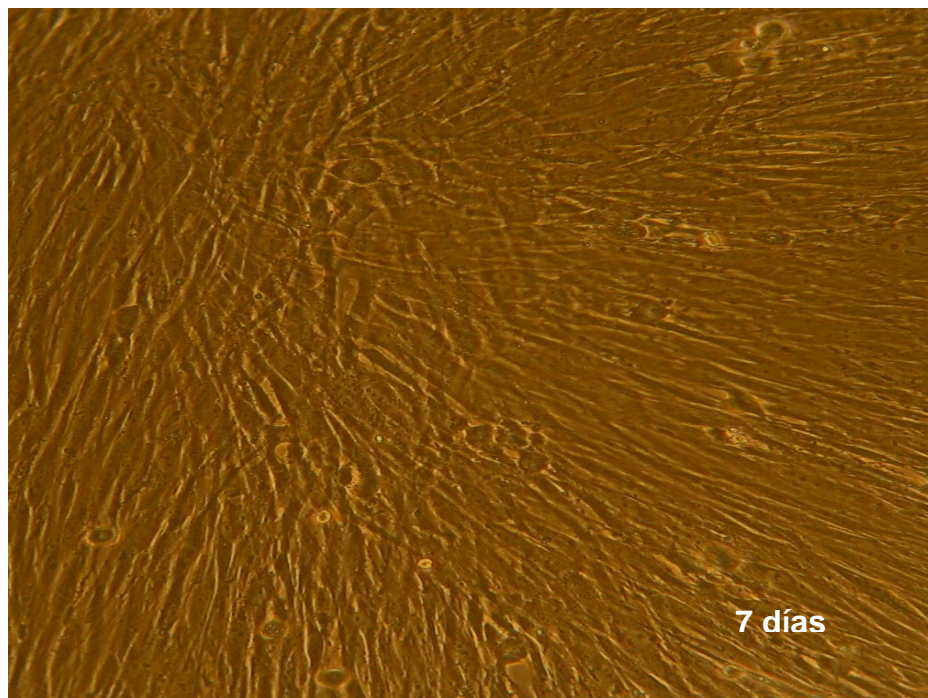
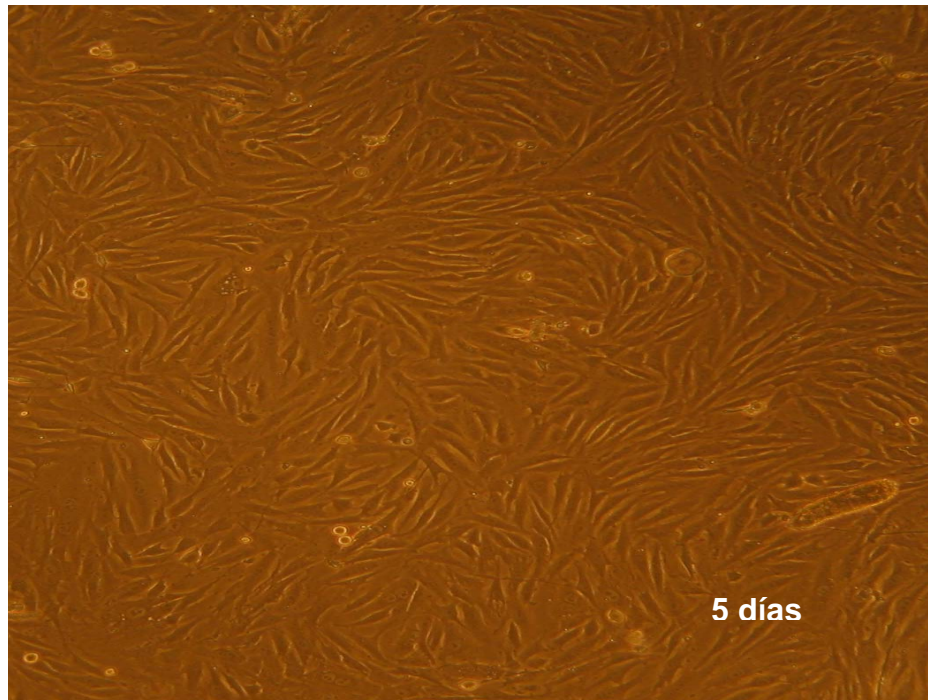


Fig 2. Cultivo de Fibroblastos Gingivales Humanos a las 48 horas, 72 horas, 5 días y 7 días.

2.4 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL DE CELULARIDAD EN CULTIVO

Para evaluar el nivel de celularidad en cultivo tras la administración de las concentraciones de HEMA previamente indicadas, las placas de cultivo celular sobre las que se cultivaron las células se lavaron con PBS y se fijaron en formol al 4% durante 30'. A continuación, las células fijadas se lavaron con agua destilada y se tiñeron durante 10' con hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich ref. MHS16, Steinheim, Alemania), lavándose abundantemente con agua para eliminar los restos de colorante y dejándose secar al aire.

La cuantificación de la celularidad se realizó mediante colorimetría utilizando un lector de placas ELX-800 de Bio-Tek, realizándose para cada cultivo primario cuatro determinaciones.

2.5 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE LDH

Para realizar dicho estudio se utilizan 3 cultivos primarios de fibroblastos correspondientes a 3 sujetos diferentes (F_1 , F_2 y F_3), en placas de microplate de 96 pocillos. El medio de cultivo utilizado fue medio DMEM con 10% FBS sin antibióticos. El número de células cultivadas, en cada pocillo fue de 10000 / 200 μ l de medio. Las células, a continuación fueron incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono durante 24 horas. Transcurridos este tiempo y tras la extracción del medio de cultivo, las células fueron lavadas dos veces con medio DMEN (suplementado con glutamina) sin rojo fenol y en ausencia de antibióticos.

2.5.1 PREPARACION DE LAS DISOLUCIONES DEL HEMA

El sistema adhesivo utilizado 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA) fue suministrado por Sigma-Aldrich Química (Madrid, España).

Se procedió a la realización de una solución stock de HEMA en dimetilsulfoxido (DMSO) en una relación 1:10. La molaridad de dicha disolución es de 0.82M. A continuación se preparan, a partir de la disolución anterior, soluciones de concentraciones 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM en 1 ml de medio DMEM respectivamente.

2.5.2 TRATAMIENTO DE FIBROBLASTOS CON LAS SOLUCIONES DEL HEMA

200 µl de disolución de HEMA a 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM fueron añadidos respectivamente a los pocillos durante un periodo de tiempo de 1, 6, 12, 24 y 48 horas. El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones y periodo de tiempo anteriormente indicado. Transcurrido dichos tiempos pipeteamos 200 µl de cada pocillo para cada una de las concentraciones empleadas, en total 600 µl de sobrenadante para cada concentración y tiempo.

2.5.3 CUANTIFICACIÓN DE LDH LIBRE

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediante la liberación de enzima LDH, en todos los casos anteriormente mencionados, utilizamos Kit de la casa Roche Cat. No. 1 644 793, para ello tomamos 100µl de sobrenadante para cada una de las concentraciones tiempos empleados y le añadimos 100µl de la solución Kit. La liberación de la enzima LDH se realizó en un aparato lector de placas ELX – 800 de Biotek

Como controles realizamos mediciones de liberación de LDH del medio de cultivo DMEM, de fibroblastos cultivados exclusivamente con medio de cultivo DMEM (CM) y de fibroblastos con solución de TironX-100 (2% en medio de cultivo DEMEM) (CT)

La formula empleada para determinar el porcentaje de citotoxicidad fue la siguiente:

$$(\%) = \frac{\text{Valor. Exp} - \text{CM}}{\text{CT} - \text{CM}}$$

2.6 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE LA LIBERACIÓN ADN

La identificación de fragmentos de ADN libre en el medio de cultivo celular se llevó a cabo mediante dos técnicas: una técnica cuantitativa (cuantificación de ADN en el sobrenadante mediante espectrofotometría) y una técnica cualitativa (amplificación de genes específicos mediante PCR).

2.6.1 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN LIBRE EN EL MEDIO DE CULTIVO

Para la determinación cuantitativa de ADN libre en el medio en el cual se incubaron las células durante distintos tiempos y con diferentes concentraciones de HEMA, se tomaron alícuotas de 10 µl de volumen para cada una de las muestras a cuantificar. A continuación, estas alícuotas de medio de cultivo se diluyeron en agua bidestilada y autoclavada hasta un volumen final de 100 µl en cubetas especiales para espectrofotometría (Bio-Rad, ref. 170-2510, Hércules, California, EEUU), cuantificándose la concentración de ADN mediante un espectrofotómetro SmartSpec Plus de la casa comercial Bio-Rad (ref. 170-2525). Las condiciones en las que se cuantificó el ADN en el medio de cultivo fueron las siguientes:

- Longitud de onda para la detección de ADN: 260 nm
- Longitud de onda para la detección de proteínas asociadas al ADN: 260 nm
- Factor de conversión: 1 = 50 µg/ml
- Factor de dilución: 10 ×

2.6.2 MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS MEDIANTE PCR

En algunos casos, se tomó una alícuota de 3 μ l del medio de cultivo en el que se incubaron las células, utilizándose ésta como molde para la reacción de PCR. El gen amplificado fue GAPDH, considerado un gen de expresión constitutiva en todo tipo de células (*housekeeping gene*). Para ello, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

GAPDH-S: 5'-GGGTTTATGGAGGTCCTCTT-3'

GAPDH-AS: 5'- GCACAAGCTTTGTACATGGTA-3'

Para llevar a cabo la reacción de PCR, se utilizó una ADN-polimerasa Taq EcoStart de la casa comercial Ecogen (ref. ECOSTART5, Barcelona, España), mezclándose los siguientes componentes en un tubo Eppendorf de 200 μ l de capacidad para PCR:

- Agua bidestilada autoclavada: 11.8 μ l
- Tampón específico: 13.75 μ l
- Oligonucleótidos dNTPs (2 mM): 2.5 μ l
- Oligonucleótido GAPDH-S (10 μ M): 2.5 μ l
- Oligonucleótido GAPDH-AS (10 μ M): 2.5 μ l
- Medio de cultivo con ADN a amplificar: 3 μ l
- Taq polimerasa EcoStart: 0.2 μ l

Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de PCR fueron las siguientes:

- 1 ciclo de desnaturalización del ADN de 5' a 95°C.
- 40 ciclos de amplificación del ADN consistentes cada uno de ellos en los siguientes subciclos:
 1. Desnaturalización a 95°C durante 1'.
 2. Anillamiento de los oligonucleótidos a 55°C durante 1'.
 3. Polimerización a 72°C durante 1.5'.
- 1 ciclo de polimerización a 72°C durante 7'.

Una vez concluida la reacción de PCR, los fragmentos de ADN amplificados se separaron, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% (p/v) bajo luz ultravioleta utilizando un sistema Gel-Doc de la casa comercial Bio-Rad.

2.7 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

Con el objeto de analizar la viabilidad celular de los fibroblastos tratados con soluciones de HEMA 5 y 10mM, durante un periodo de 6 horas respectivamente, y de fibroblastos mantenidos exclusivamente en medio de cultivo DMEM utilizamos las técnicas de Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X (EPXMA). Se realizó el estudio en 55 Células control y en 110 células tratadas. De ellas, 55 células lo fueron con solución de HEMA 5 mM y las otras 55 con solución de HEMA 10 mM.

2.7.1 ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS AL SOPORTE

Las células mantenidas en *falcon* con medio de cultivo DMEM se tripsinizaron y se cultivaron sobre rejillas de oro (Ref.G100 – G3) especiales para microscopía electrónica.

Con el objeto de eliminar restos de materia orgánica que pudiese haberse depositado sobre las mismas, las rejillas fueron lavadas con cloroformo, aclaradas con etanol absoluto y nuevamente lavadas en solución de ácido acético 2%, dejándose secar a continuación al aire. Para permitir el crecimiento de las células sobre las rejillas de oro, se aplicó una fina capa de Píoloformo (fig. 3) sobre las rejillas.

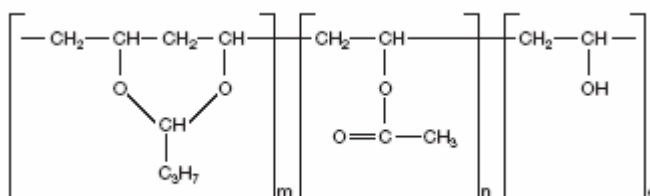


Figura 3. Estructura química del *polivinil butiral* (pioloformo).

2.7.2 ELIMINACIÓN DEL MEDIO EXTRACELULAR

Con el objetivo de eliminar la contribución del medio extracelular al espectro de rayos X en los análisis de los fibroblastos, se procedió al lavado de las rejillas conteniendo las células de acuerdo con los criterios establecidos previamente por diferentes autores (Abraham et al, 1985) (Borgman et al, 1994) (Fernández-Segura et al, 1997a) (Lechne, 1989) (von Euler et al, 1993) (Warley, 1994) (Wroblewski et al, 1983) (Wroblewski y Roomans, 1984) (Zierold y Schäfer, 1988), eligiendo como solución lavadora el agua destilada. Las muestras fueron lavadas mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4°C, durante 5 segundos. La solución lavadora se mantiene en movimiento constante por agitación magnética.

2.7.3 CRIOFIJACIÓN Y CRIODESECACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras lavadas se criofijaron mediante inmersión rápida de las mismas en nitrógeno líquido. Previamente se eliminó el exceso de agua con un papel de filtro. Las rejillas con las células criofijadas se introdujeron en un portamuestras de aluminio preenfriado a -196°C mediante inmersión en nitrógeno líquido.

Las células criofijadas y en el interior del portamuestras fueron transferidas de forma inmediata a un sistema de criodesecación de alto vacío Emitech K775 (Emitech, Watford, UK) con el objetivo de extraer el agua de las células por sublimación (fig. 4). Las muestras fueron criodesecadas durante un total de 17 horas a una presión de vacío de 10⁻⁵ mbar siguiendo el perfil de temperaturas mostrado en la Tabla 2, y desarrollado de acuerdo con los criterios establecidos por Warley y Skepper (2000).

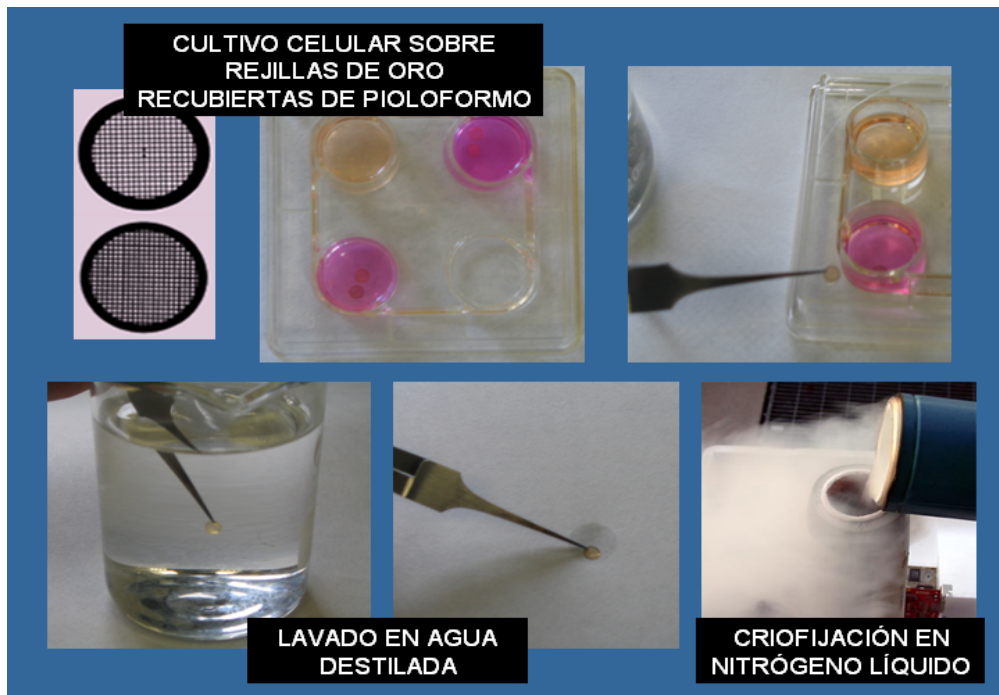


Figura 4. Preparación de células humanas mantenidas en cultivo para análisis mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X. Las células cultivadas sobre rejillas de oro cubiertas de pioformo son lavadas en agua destilada, criofijadas por inmersión en nitrógeno líquido, desecadas en frío y recubiertas con carbón.

Tabla 2. Programa de intervalos de tiempo y temperaturas utilizadas para la criodesecación de las muestras en un sistema de alto vacío

Segmento	Temperatura inicial	Temperatura final	Tiempo
1	-100°C	-100°C	1 hora
2	-100°C	-70°C	1 hora
3	-70°C	-70°C	1 hora
4	-70°C	-50°C	1 hora
5	-50°C	-50°C	1 hora
6	-50°C	+25°C	12 horas

2.7.4 MONTAJE Y RECUBRIMIENTO DE LAS MUESTRAS

Tras la criodesecación de las células, se recubren las muestras con una superficie conductora de electricidad, que facilite el barrido del haz de electrones durante, su observación microscópica y detección analítica. Para ello, las rejillas criodesecadas y montadas sobre el portamuestras de aluminio fueron recubiertas con una capa de carbón mediante un evaporador (Emitech, Watford, UK) utilizando hilo de grafito.

2.7.5 INSTRUMENTACIÓN, PARÁMETROS ANALÍTICOS Y CONDICIONES DE OBSERVACIÓN

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral hemos utilizado un microscopio electrónico de barrido Phillips XL 30 (Phillips, Eindhoven, Holanda), y un detector de energía dispersiva de rayos X con una ventana ultrafina CDU (EDAX, Eindhoven, Holanda). La configuración geométrica de este equipamiento posibilita la detección simultánea de electrones secundarios y rayos X.

2.7.6 OBSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la visualización de las muestras mediante electrones secundarios en el microscopio electrónico de barrido Phillips XL30, los parámetros fijados fueron los siguientes:

Voltaje del microscopio 10 KV
Angulación de superficie.....0°
Distancia de trabajo 10mm

Para la detección microanalítica, las condiciones instrumentales fueron las siguientes:

Voltaje del microscopio.....	10 KV
Aumentos.....	10000
Angulación de superficie (tilt)	0°
Cuentas por segundo (CPS) registradas por el detector.....	500
Tiempo de adquisición	200 s
Tamaño del haz de electrones (spot size)	6
Distancia de trabajo	10
Área de análisis	puntiforme y estático

2.7.7 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN PARA MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para determinar cuantitativamente el contenido elemental de las células, se utilizó el método de la razón pico fondo -método P/B- con referencia a patrones de calibración de matriz orgánica (Boekestein *et al.*, 1980 y 1984; Roomans, 1988; Statham y Pawley, 1978). La concentración de cada elemento se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_{\text{spc}} = C_{\text{std}} \frac{(P/B)_{\text{spc}} \cdot Z^2/A_{\text{spc}}}{(P/B)_{\text{std}} \cdot Z^2/A_{\text{std}}}$$

Donde:

- C_{spc} es la concentración del elemento a cuantificar,
- P corresponde a las cuentas netas de la señal característica del elemento,
- B es la radiación continua medida debajo del pico, es decir, tomada entre los mismos niveles de energía de la señal característica,
- Z^2/A es el valor medio del número atómico al cuadrado por el peso atómico, correspondiente un valor específico para el dextrano y las células (Warley, 1977).

La preparación de los patrones se realizó de acuerdo con las pautas establecidas en nuestro laboratorio (Crespo et al, 1993) (López-Escámez y Campos, 1994) utilizando sales de NaHPO_4 , MgCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y K_2SO_4 disueltas en una matriz orgánica. Para ello, se prepararon soluciones de cada sal a diferentes concentraciones en dextrano al 20% (300 kD). Los patrones se montaron sobre membranas microporosas de las unidades Millicell[®] y se criofijaron mediante inmersión en nitrógeno líquido. En esta fase del proceso, así como en la posterior criodesecación, montaje y recubrimiento, se siguió el mismo procedimiento que se expuso para la preparación de células humanas para microanálisis. Los patrones se analizaron en el microscopio electrónico de barrido y se microanalizaron inmediatamente después de su preparación para evitar su contaminación o modificación química, adquiriéndose entre 15 y 20 espectros para cada concentración de patrón, utilizando las mismas condiciones de análisis que se utilizaron para las células cultivadas sobre rejillas de oro.

El análisis de los patrones de dextrano al 20% conteniendo concentraciones conocidas de sales de Na, Cl, Mg, P, S, K y Ca, nos permitió realizar la calibración de las concentraciones de los citados elementos frente a la señal P/B. La concentración de

cada elemento en el estándar es directamente proporcional a la razón P/B de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$C_{ts} = K \times (P_{std}/B_{std})$$

Donde:

- C_{ts} es la concentración del elemento en el patrón, la cual es conocida,
- (P_{std}/B_{std}) es la razón P/B, donde el fondo se ha medido entre el mismo rango de energía de la señal característica obtenida del análisis de los estándar,
- K es la constante de calibración característica para cada elemento y configuración instrumental utilizada.

La relación entre P_{std}/B_{std} frente a la concentración de cada elemento se estudió mediante regresión lineal simple (fig. 5).

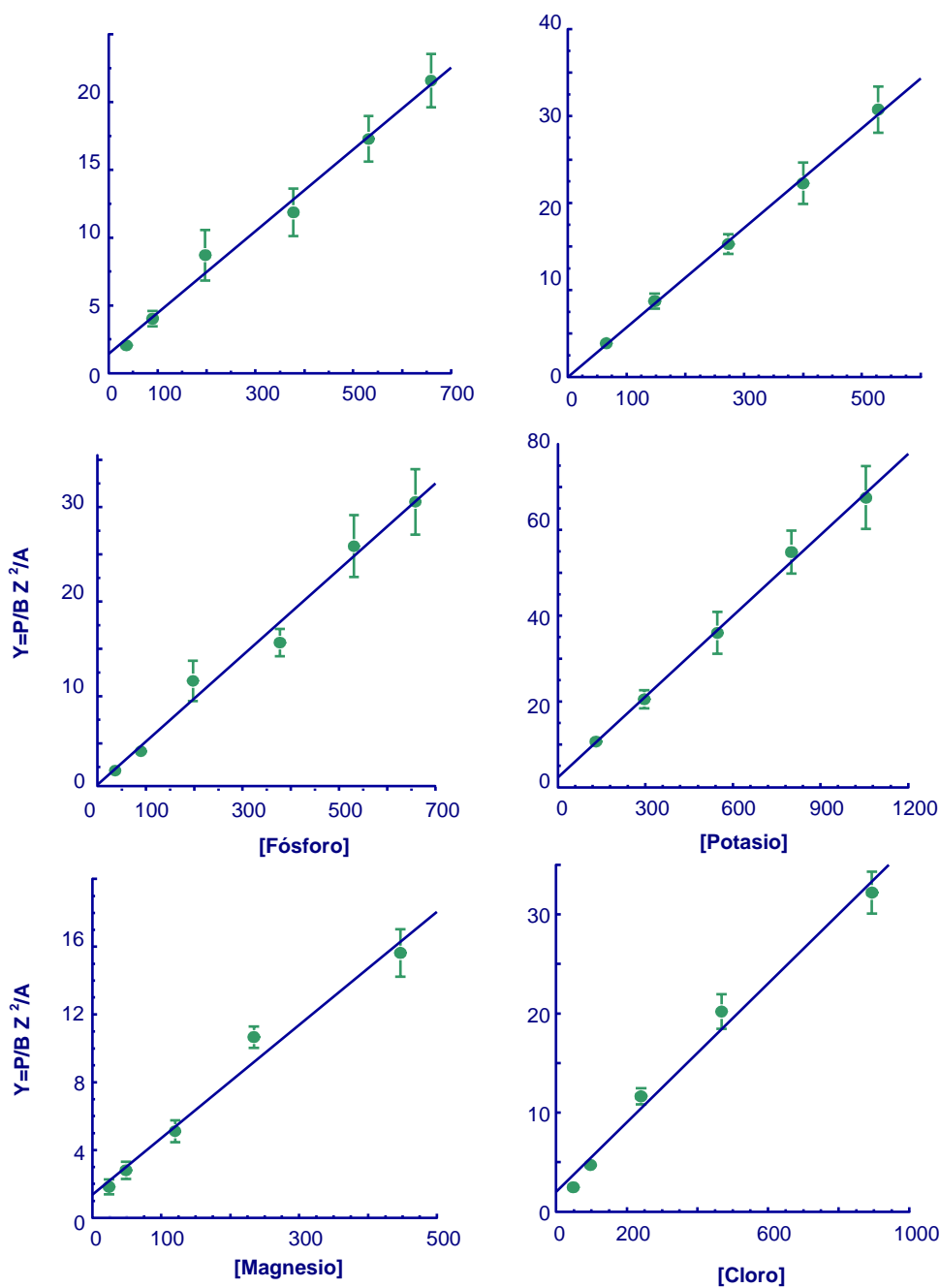


Fig. 5. Representación de la razón $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$ como una función de C_{std} para los patrones de P, Mg, K y Cl 10 kV. Cada valor representa la media \pm SD de 15- 20 análisis. Los patrones de calibración fueron preparados de forma idéntica a las células U937. Las soluciones en dextrano al 20% con las diferentes concentraciones de las sales inorgánicas empleadas fueron depositadas sobre filtros de policarbonato (tamaño de poro de 0'4 μ m) aislados de sus soportes de polistireno, criofijadas en nitrógeno líquido, criodesecadas y analizadas en un microscopio Philips XL30 utilizando idénticas condiciones instrumentales y analíticas a las indicadas en los apartados 2..4.6, del capítulo de Material y Métodos.

Puesto que la constante de calibración K depende de la diferencia en el Z^2/A (factor G) entre el estándar y la célula, empleamos la siguiente ecuación para valorar la influencia de dicho factor en el ajuste de la curva:

$$Y = P_{\text{std}}/B_{\text{std}} \cdot (Z^2/A)_{\text{std}}$$

Donde Z^2/A es el promedio del valor de Z^2/A para todos los elementos presentes en el volumen analizado de estándar:

$$Z^2/A = \Sigma(f_i \cdot Z_i^2/A_i)$$

Donde:

- Z_i es el número atómico del elemento i ,
- A_i es el peso atómico de dicho elemento,
- f_i es la fracción de masa del elemento i expresada como masa elemental/masa total (Hall y Gupta, 1986).

En la Tabla 3 se muestran las ecuaciones de regresión obtenidas para todos los elementos cuando $Y = P_{\text{std}}/B_{\text{std}} \cdot Z^2/A$ se calibró frente a C_{std} para los elementos Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca analizados a 10 kV.

Tabla 3. Ecuaciones de regresión obtenidas cuando $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$ se calibró frente a C_{std} analizados a 10 kV.

Elemento		
Na	$Y = 3,75 + 0,032x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$
Mg	$Y = 1,07 + 0,052x$	$(r = 0,98 \text{ P} < 0,001)$
P	$Y = 0,64 + 0,042x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$
S	$Y = 1,38 + 0,052x$	$(r = 0,97 \text{ P} < 0,001)$
Cl	$Y = 1,42 + 0,036x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$
K	$Y = 3,32 + 0,054x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$
Ca	$Y = 0,60 + 0,063x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$

2.8 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para la comparación de los niveles de toxicidad entre tiempos experimentales consecutivos (1 hora – 6 horas / 6 horas – 12 horas / 12 horas – 24 horas / 24 – 48 horas) se aplicó el test no paramétrico U de Mann – Whitney. Esta prueba se utilizó asimismo para realizar el estudio estadístico de los datos procedentes del estudio microanalítico.

Para la identificación de las diferencias significativas entre varios grupos experimentales (concentraciones de HEMA: 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM) se utilizó el test no paramétrico de Kruskal – Wallis.

En todos los casos se seleccionó un valor de significación $p < 0.01$ para los tests de doble cola.

3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras la aplicación de la metodología descrita en el capítulo anterior se expresan a continuación siguiendo idéntico orden al expresado en dicho capítulo.

3.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL HEMA MEDIANTE DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE CELULARIDAD

En las tablas 4 a 8 se expresan los resultados de citotoxicidad celular inducida por el HEMA basado en el estudio del nivel de celularidad para los distintos tiempos (1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas) y concentraciones de HEMA, representándose en las Gráficas 1 a 5 tales valores.

HE t=1h									
Concentración		CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	DC1	0,080	0,251	0,261	0,128	0,100	0,108	0,170	0,117
	DC2	0,058	0,239	0,265	0,189	0,126	0,094	0,156	0,117
	DC3	0,068	0,225	0,332	0,253	0,171	0,176	0,173	0,073
	DC4	0,091	0,255	0,289	0,242	0,144	0,183	0,148	0,130
F ₂	DC5	0,169	0,644	0,464	0,438	0,259	0,198	0,224	0,167
	DC6	0,192	0,552	0,516	0,401	0,280	0,171	0,227	0,133
	DC7	0,280	0,681	0,435	0,413	0,243	0,192	0,265	0,151
	DC8	0,092	0,807	0,515	0,356	0,249	0,243	0,292	0,181
F ₃	DC9	0,081	0,222	0,178	0,097	0,109	0,081	0,176	0,098
	DC10	0,042	0,134	0,153	0,099	0,107	0,118	0,111	0,101
	DC11	0,040	0,126	0,138	0,107	0,113	0,112	0,108	0,101
	DC12	0,037	0,188	0,117	0,113	0,105	0,103	0,130	0,090
MEDIA		0,103	0,360	0,305	0,236	0,167	0,148	0,182	0,122
ERROR ESTÁNDAR		0,022	0,070	0,039	0,038	0,021	0,015	0,016	0,010

Tabla 4

HE t= 6h									
Concentración		CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	DC1	0,078	0,145	0,168	0,147	0,157	0,110	0,138	0,081
	DC2	0,057	0,181	0,155	0,137	0,085	0,061	0,073	0,058
	DC3	0,085	0,210	0,174	0,187	0,166	0,099	0,097	0,064
	DC4	0,082	0,338	0,222	0,250	0,217	0,115	0,082	0,087
F ₂	DC5	0,106	0,700	0,507	0,318	0,226	0,171	0,139	0,144
	DC6	0,108	0,805	0,413	0,288	0,189	0,202	0,143	0,137
	DC7	0,126	0,806	0,682	0,403	0,281	0,177	0,146	0,160
	DC8	0,135	0,798	0,640	0,419	0,315	0,197	0,163	0,107
F ₃	DC9	0,069	0,138	0,088	0,084	0,080	0,066	0,080	0,054
	DC10	0,063	0,113	0,120	0,084	0,062	0,045	0,066	0,044
	DC11	0,059	0,122	0,121	0,087	0,066	0,082	0,086	0,036
	DC12	0,042	0,125	0,105	0,061	0,073	0,076	0,058	0,084
MEDIA		0,084	0,373	0,283	0,205	0,160	0,117	0,106	0,088
ERROR ESTÁNDAR		0,008	0,088	0,063	0,037	0,025	0,016	0,011	0,012

Tabla 5

HE t= 12h									
Concentración		CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	DC1	0,109	0,231	0,376	0,254	0,087	0,074	0,119	0,067
	DC2	0,046	0,423	0,302	0,260	0,071	0,097	0,095	0,077
	DC3	0,058	0,392	0,405	0,317	0,090	0,117	0,091	0,092
	DC4	0,081	0,308	0,386	0,310	0,088	0,130	0,078	0,080
F ₂	DC5	0,081	0,571	0,359	0,185	0,196	0,093	0,153	0,081
	DC6	0,099	0,623	0,467	0,211	0,190	0,097	0,096	0,123
	DC7	0,078	0,619	0,453	0,202	0,215	0,109	0,104	0,090
	DC8	0,067	0,523	0,475	0,274	0,169	0,117	0,125	0,129
F ₃	DC9	0,042	0,106	0,082	0,064	0,080	0,052	0,058	0,052
	DC10	0,056	0,159	0,139	0,101	0,084	0,076	0,069	0,063
	DC11	0,052	0,178	0,169	0,119	0,075	0,084	0,073	0,062
	DC12	0,054	0,169	0,156	0,122	0,091	0,086	0,075	0,051
MEDIA		0,069	0,359	0,314	0,202	0,120	0,094	0,095	0,081
ERROR ESTÁNDAR		0,006	0,055	0,041	0,024	0,016	0,006	0,008	0,007

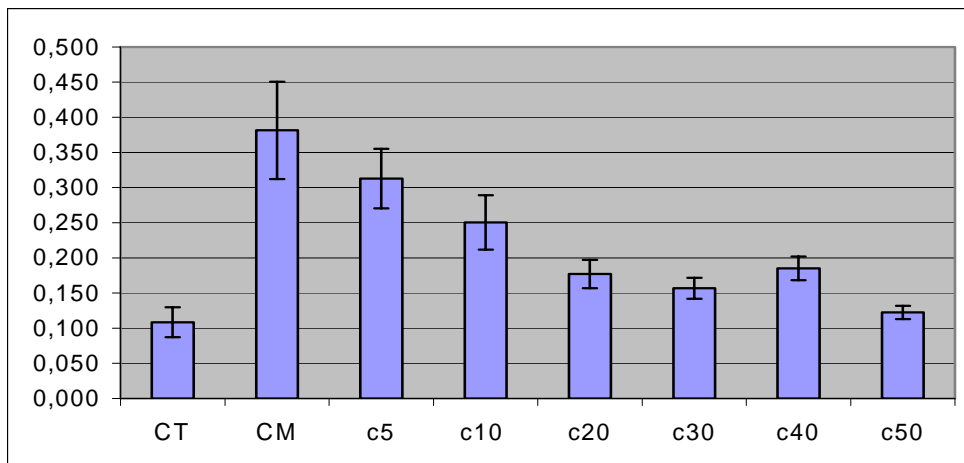
Tabla 6

HE t= 24h									
Concentración		CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	DC1	0,113	0,170	0,135	0,133	0,075	0,078	0,053	0,146
	DC2	0,082	0,131	0,143	0,104	0,570	0,057	0,082	0,134
	DC3	0,090	0,196	0,159	0,116	0,082	0,090	0,091	0,092
	DC4	0,105	0,243	0,197	0,126	0,085	0,088	0,092	0,068
F ₂	DC5	0,195	0,972	0,665	0,314	0,087	0,153	0,138	0,116
	DC6	0,134	1,052	0,735	0,282	0,092	0,106	0,173	0,089
	DC7	0,098	0,935	0,679	0,341	0,180	0,090	0,160	0,101
	DC8	0,256	0,996	0,729	0,359	0,146	0,083	0,138	0,087
F ₃	DC9	0,090	0,094	0,058	0,059	0,041	0,046	0,055	0,058
	DC10	0,209	0,144	0,122	0,088	0,057	0,046	0,046	0,050
	DC11	0,218	0,151	0,125	0,102	0,061	0,095	0,054	0,058
	DC12	0,202	0,147	0,114	0,114	0,058	0,052	0,066	0,061
MEDIA		0,149	0,436	0,322	0,178	0,128	0,082	0,096	0,088
ERROR ESTÁNDAR		0,018	0,119	0,082	0,032	0,042	0,009	0,013	0,009

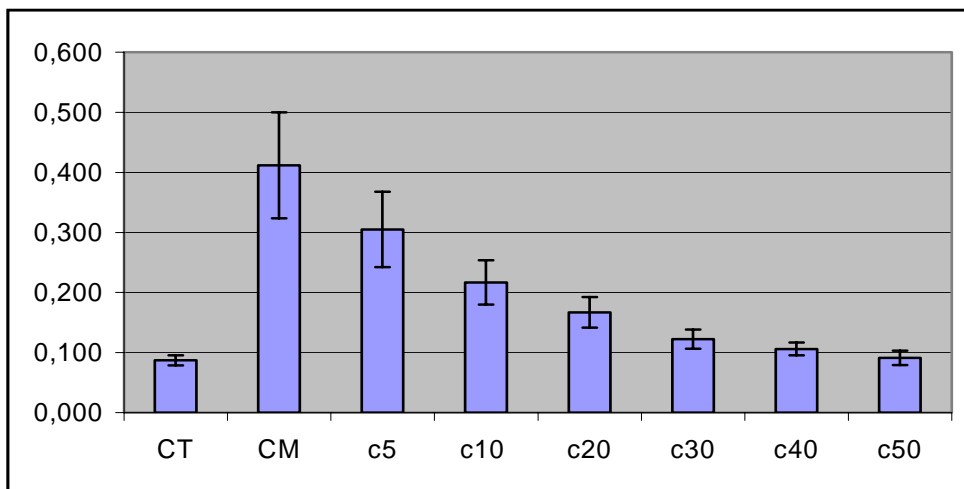
Tabla 7

HE t=48h									
Concentración		CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	DC1	0,152	0,306	0,074	0,098	0,072	0,066	0,071	0,114
	DC2	0,146	0,212	0,183	0,054	0,063	0,056	0,084	0,089
	DC3	0,147	0,248	0,184	0,063	0,075	0,074	0,072	0,066
	DC4	0,143	0,354	0,067	0,068	0,065	0,068	0,059	0,075
F ₂	DC5	0,228	0,692	0,673	0,272	0,116	0,066	0,177	0,156
	DC6	0,134	0,916	0,749	0,318	0,108	0,088	0,091	0,098
	DC7	0,154	0,944	0,690	0,281	0,100	0,136	0,086	0,084
	DC8	0,248	0,774	0,441	0,263	0,124	0,123	0,086	0,052
F ₃	DC9	0,071	0,133	0,077	0,060	0,054	0,067	0,045	0,072
	DC10	0,069	0,201	0,099	0,093	0,060	0,064	0,053	0,065
	DC11	0,085	0,290	0,092	0,077	0,059	0,070	0,067	0,074
	DC12	0,128	0,231	0,108	0,104	0,085	0,065	0,071	0,070
MEDIA		0,142	0,442	0,286	0,146	0,082	0,079	0,080	0,085
ERROR ESTÁNDAR		0,016	0,086	0,078	0,030	0,007	0,007	0,010	0,008

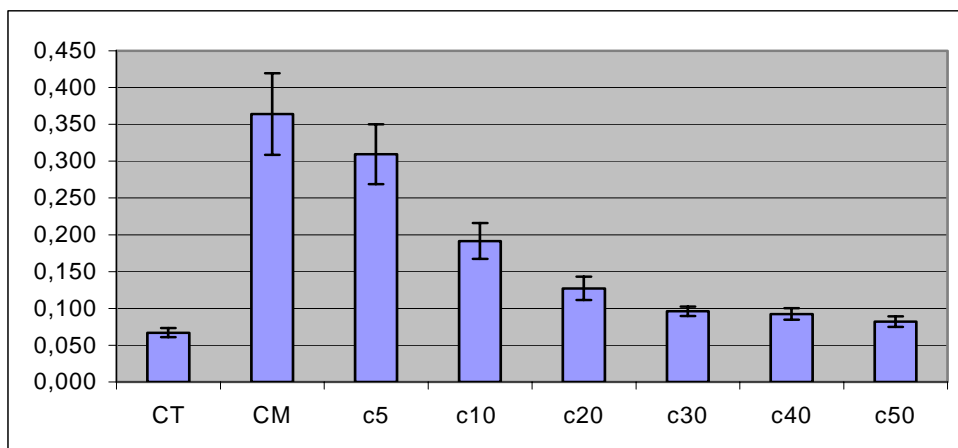
Tabla 8



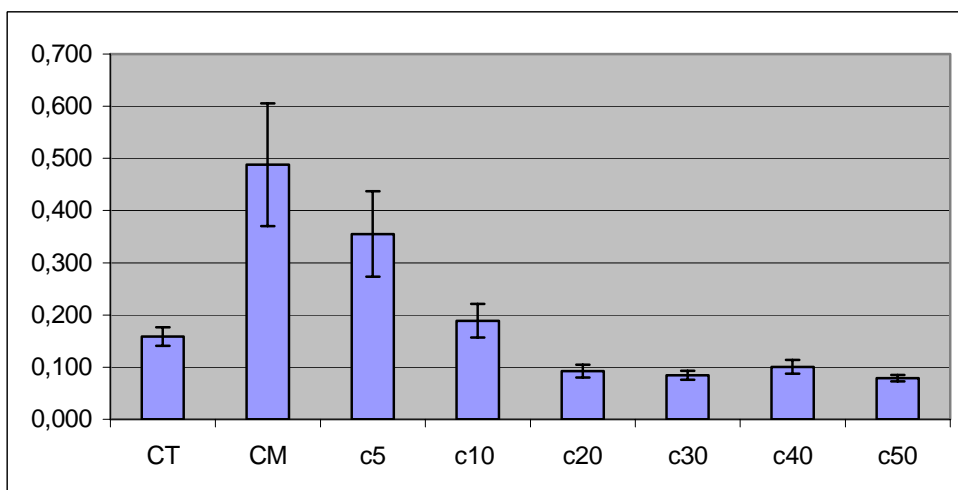
Gráfica 1: 1 hora



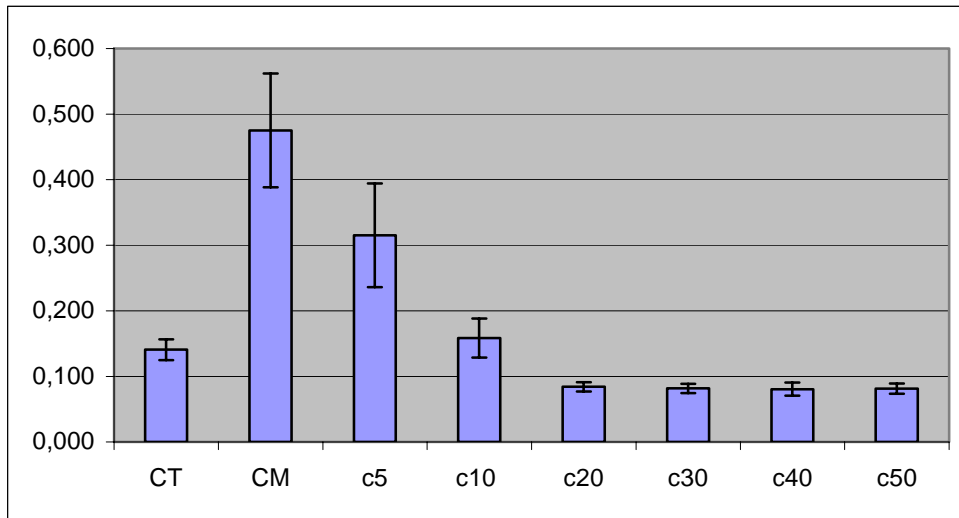
Gráfica 2: 6 horas



Gráfica 3: 12 horas



Gráfica 4: 24 horas



Gráfica 5: 48 horas

3.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL HEMA MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE LDH

En las tablas 9 a 13 se expresan las concentraciones de la liberación de LDH y los porcentajes de citotoxicidad en función del tiempo (1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas) y de la concentración de HEMA, y en las Gráficas 6 a 10 la representación de dichos valores. Los estudios se realizaron por triplicado en cada uno de los tres cultivos primarios de fibroblastos (F₁, F₂ y F₃)

LDH t = 1h										
Concentración		M	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	LDH 1	0,081	1,974	0,287	0,312	0,406	0,368	0,345	0,568	0,368
	LDH 2	0,079	2,176	0,275	0,318	0,410	0,354	0,353	0,537	0,388
	LDH 3	0,078	1,284	0,292	0,320	0,409	0,363	0,354	0,546	0,390
F ₂	LDH 4	0,071	2,815	0,285	0,371	0,724	0,696	0,709	0,787	0,262
	LDH 5	0,083	2,795	0,277	0,373	0,720	0,677	0,703	0,789	0,244
	LDH 6	0,073	2,737	0,280	0,379	0,733	0,691	0,718	0,802	0,245
F ₃	LDH 7	0,069	2,728	0,162	0,208	0,328	0,499	0,427	0,357	0,323
	LDH 8	0,074	2,697	0,164	0,207	0,325	0,501	0,426	0,426	0,323
	LDH 9	0,075	2,676	0,160	0,208	0,326	0,506	0,443	0,443	0,325
MEDIA		0,076	2,431	0,242	0,300	0,487	0,517	0,498	0,584	0,319
Porcentaje		0,000	1,000	0,000	0,026	0,112	0,126	0,117	0,156	0,035

Tabla 9

LDH t= 6h										
Concentración		M	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	LDH 1	0,075	1,748	0,159	0,372	0,376	0,481	0,676	1,848	1,904
	LDH 2	0,073	1,828	0,158	0,370	0,391	0,498	0,667	1,880	1,933
	LDH 3	0,074	1,886	0,154	0,376	0,358	0,488	0,676	1,857	1,916
F ₂	LDH 4	0,076	2,539	0,546	0,678	0,537	1,114	1,437	1,263	1,650
	LDH 5	0,077	2,451	0,547	0,660	0,516	1,119	1,393	1,241	1,616
	LDH 6	0,077	2,479	0,550	0,650	0,512	1,060	1,445	1,268	1,660
F ₃	LDH 7	0,067	2,025	0,132	0,251	0,170	0,480	0,791	2,461	1,904
	LDH 8	0,067	1,791	0,131	0,248	0,164	0,460	0,776	2,416	1,911
	LDH 9	0,067	1,645	0,132	0,242	0,169	0,483	0,789	2,471	1,992
MEDIA		0,073	2,044	0,279	0,427	0,355	0,687	0,961	1,856	1,832
Porcentaje		0,000	1,000	0,000	0,084	0,043	0,231	0,387	0,894	0,880

Tabla 10

LDH t=12h										
Concentración		M	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	LDH 1	0,074	1,446	0,258	0,242	0,219	0,412	1,564	1,654	1,414
	LDH 2	0,072	1,343	0,258	0,240	0,214	0,411	1,582	1,631	1,379
	LDH 3	0,081	1,367	0,257	0,245	0,217	0,389	1,606	1,799	1,427
F ₂	LDH 4	0,079	2,397	0,265	0,545	0,681	1,233	2,024	1,777	1,969
	LDH 5	0,080	2,322	0,256	0,519	0,663	1,179	2,038	1,752	1,984
	LDH 6	0,077	2,545	0,256	0,524	0,669	1,194	2,051	1,800	2,030
F ₃	LDH 7	0,065	2,167	0,187	0,173	0,171	1,753	2,529	2,355	1,798
	LDH 8	0,066	2,138	0,184	0,171	0,168	1,703	2,478	2,350	1,800
	LDH 9	0,065	2,137	0,185	1,172	0,172	1,754	2,529	2,414	1,849
MEDIA		0,073	1,985	0,234	0,426	0,353	1,114	2,045	1,948	1,739
Porcentaje		0,000	1,000	0,000	0,109	0,068	0,503	1,034	0,979	0,860

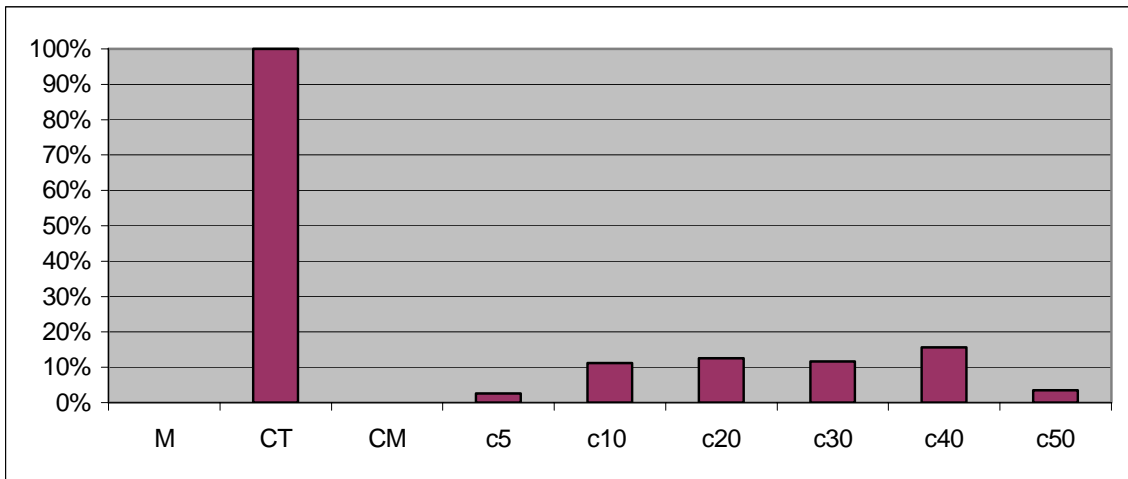
Tabla 11

LDH t=24 h										
Concentración		M	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	LDH 1	0,078	2,947	0,759	0,667	0,598	2,208	2,471	2,365	2,313
	LDH 2	0,079	2,836	0,747	0,661	0,577	2,161	2,408	2,441	2,299
	LDH 3	0,078	2,775	0,711	0,667	0,640	2,190	2,446	2,432	2,370
F ₂	LDH 4	0,078	2,451	0,672	0,618	0,783	1,507	2,070	1,436	2,084
	LDH 5	0,077	2,413	0,657	0,614	0,777	1,506	2,019	1,429	2,092
	LDH 6	0,076	2,422	0,672	0,606	0,782	1,482	2,114	1,439	2,134
F ₃	LDH 7	0,072	2,043	0,253	0,268	0,255	2,399	2,426	2,446	2,536
	LDH 8	0,074	2,016	0,250	0,270	0,250	2,328	2,447	2,414	2,466
	LDH 9	0,073	1,954	0,254	0,275	0,260	2,462	2,548	2,546	2,559
MEDIA		0,076	2,429	0,553	0,516	0,547	2,027	2,328	2,105	2,317
Porcentaje		0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,786	0,946	0,828	0,941

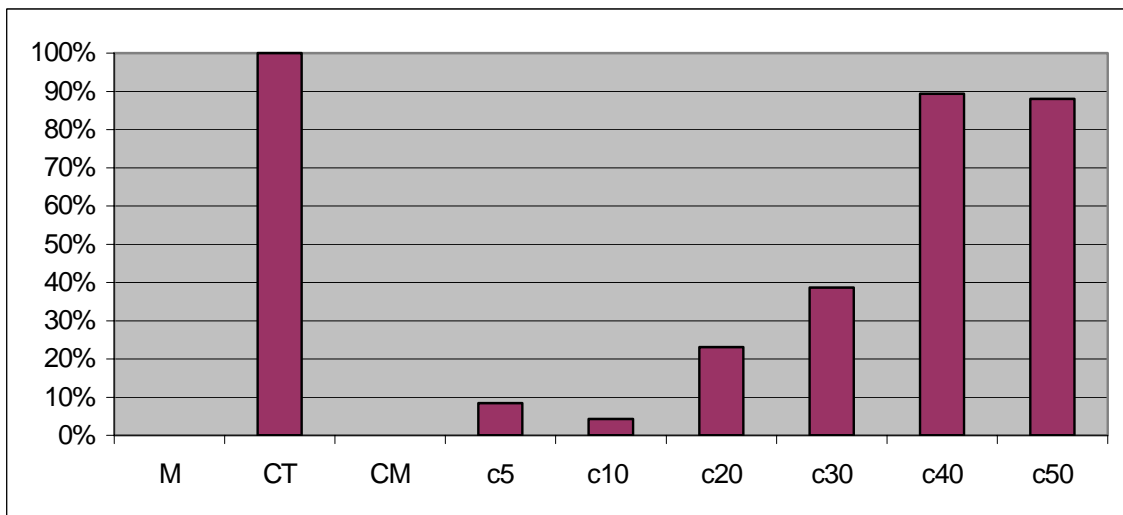
Tabla 12

LDH t=48h										
Concentración		M	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁	LDH 1	0,094	2,515	0,648	0,725	0,680	1,981	1,886	1,490	1,473
	LDH 2	0,097	2,671	0,647	0,702	0,669	2,012	1,874	1,490	1,481
	LDH 3	0,093	2,555	0,633	0,730	0,678	2,008	1,925	1,515	1,527
F ₂	LDH 4	0,072	2,451	0,628	1,003	1,272	1,538	1,406	0,910	1,166
	LDH 5	0,071	2,413	0,630	0,999	1,280	1,526	1,409	0,901	1,183
	LDH 6	0,070	2,422	0,630	0,998	1,261	1,512	1,437	0,923	1,212
F ₃	LDH 7	0,069	2,509	0,646	2,149	1,010	2,825	2,189	2,063	1,690
	LDH 8	0,070	2,755	0,638	2,295	1,058	2,830	2,202	2,014	1,572
	LDH 9	0,073	2,685	0,667	2,346	1,052	2,808	2,271	2,112	1,690
MEDIA		0,079	2,553	0,641	1,327	0,996	2,116	1,844	1,491	1,444
Porcentaje		0,000	1,000	0,000	0,359	0,186	0,771	0,629	0,445	0,420

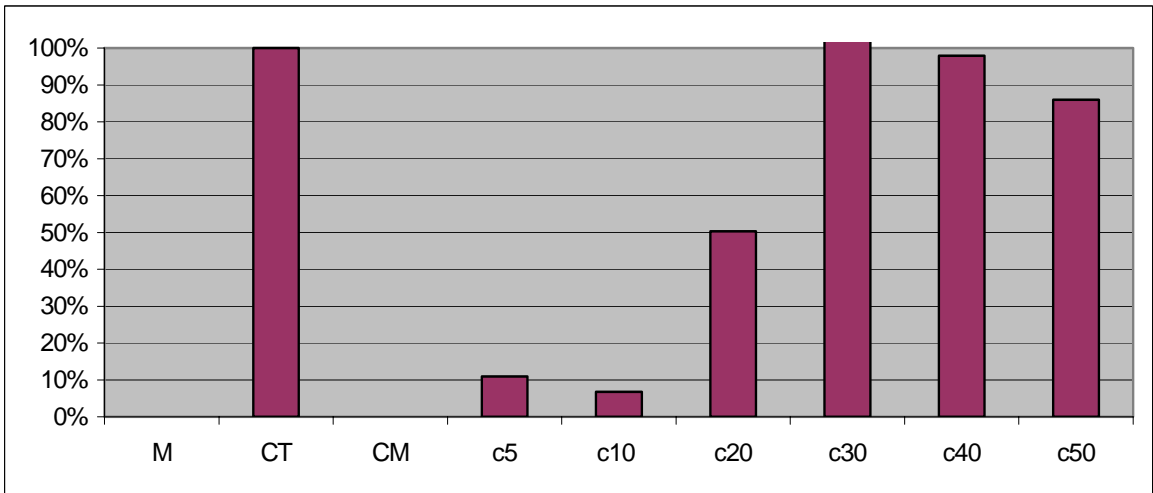
Tabla 13



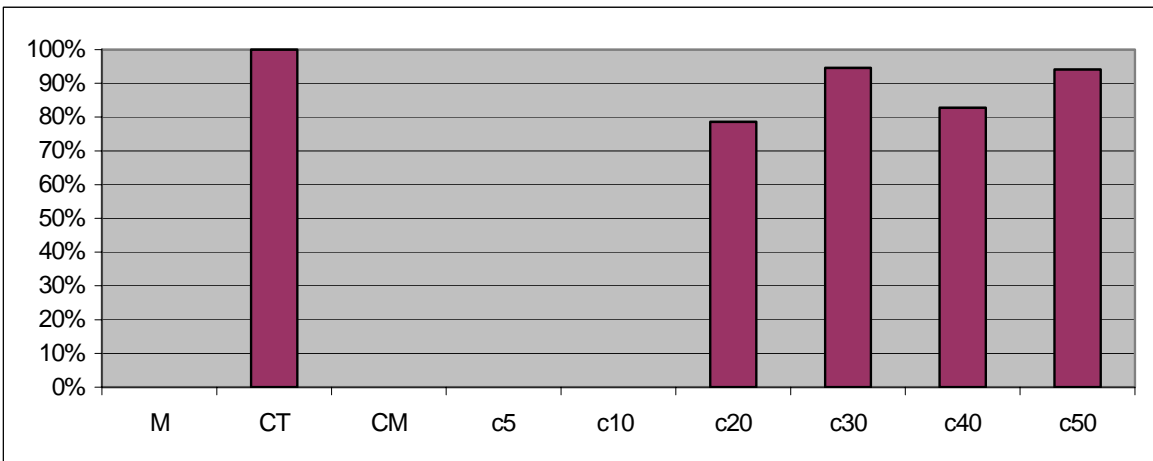
Gráfica 6: 1 hora



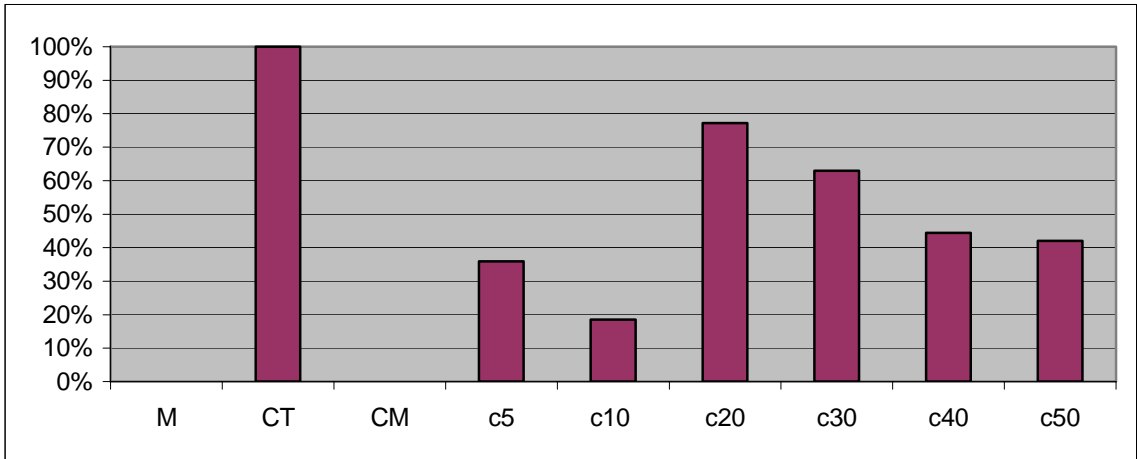
Gráfica 7: 6 horas



Gráfica 8: 12 horas



Gráfica 9: 24 horas



Gráfica 10: 48 horas

3.3 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL HEMA MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE ADN

Los resultados correspondientes a la liberación de ADN se expresan en las tablas 14 a 18, así como los porcentajes de citotoxicidad en función del tiempo (1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas) y de la concentración de HEMA, representándose en las Gráficas 11 a 15 tales valores.

ADN t = 1h								
Concentración	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁ ADN	140,923	74,253	69,352	72,521	93,440	81,774	121,545	198,100
F ₂ ADN	246,087	70,131	75,334	85,210	110,064	134,543	171,943	167,444
F ₃ ADN	225,628	77,412	87,184	97,670	117,126	136,923	155,518	184,168
Media	204,213	73,932	77,290	85,134	106,877	117,747	149,669	183,237
Error Est	32,191	2,108	5,240	7,260	7,021	17,999	14,840	8,862

Tabla 14

ADN t = 6h								
Concentración	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁ ADN	186,172	56,419	71,351	82,229	110,774	148,548	218,878	157,767
F ₂ ADN	182,937	66,032	75,341	88,046	98,357	124,107	179,122	165,399
F ₃ ADN	163,326	79,111	71,855	81,023	92,022	118,781	140,288	151,699
Media	177,478	67,187	72,849	83,766	100,384	130,478	179,429	158,289
Error Est	7,138	6,576	1,255	2,168	5,507	9,164	22,688	3,963

Tabla 15

ADN t = 12h								
Concentración	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁ ADN	279,486	89,748	73,866	94,407	131,621	122,960	151,431	160,971
F ₂ ADN	110,924	51,973	58,860	92,749	100,166	131,031	153,909	164,199
F ₃ ADN	184,769	67,373	77,432	86,467	81,345	139,377	154,270	168,776
Media	191,726	69,698	70,053	91,208	104,377	131,123	153,203	164,648
Error Est	48,784	10,967	5,690	2,418	14,665	4,739	0,893	2,264

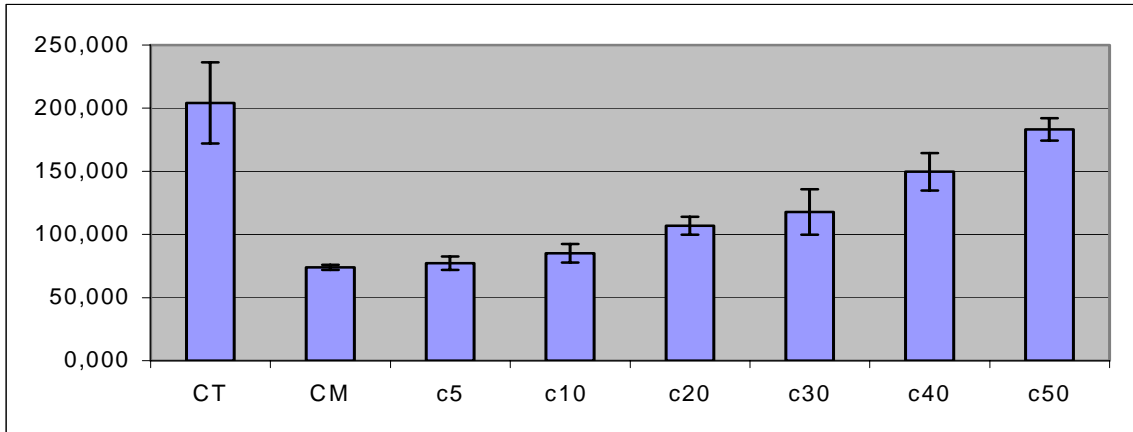
Tabla 16

ADN t = 24h								
Concentración	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁ ADN	277,938	58,838	92,550	96,282	128,126	144,718	147,131	171,960
F ₂ ADN	214,884	79,362	86,143	101,790	125,304	151,510	168,150	181,255
F ₃ ADN	138,967	65,745	77,534	84,104	110,023	138,417	150,266	173,620
Media	210,596	67,982	85,409	94,059	121,151	144,881	155,182	175,612
Error Est	40,175	6,029	4,350	5,225	5,623	3,781	6,546	2,862

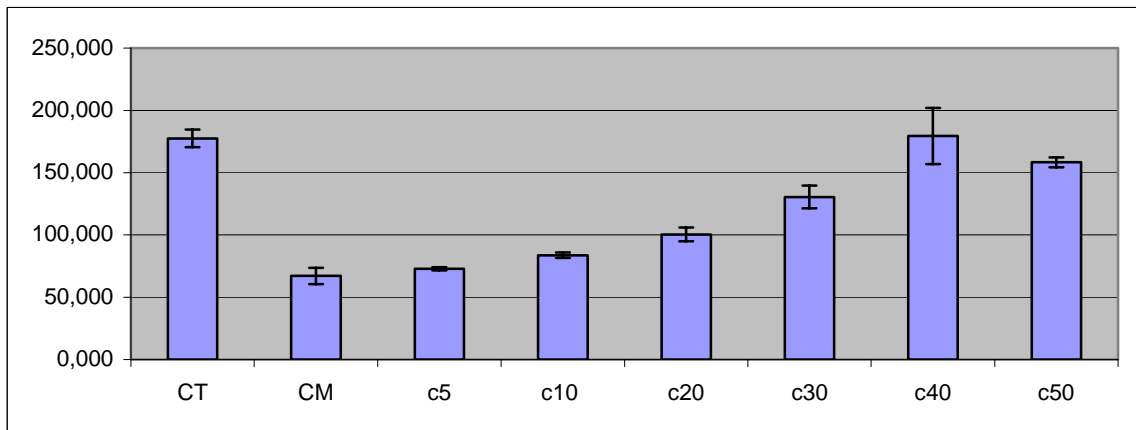
Tabla 17

ADN t = 48h								
Concentración	CT	CM	c5	c10	c20	c30	c40	c50
F ₁ ADN	229,349	82,338	82,254	104,717	120,665	143,311	153,635	172,480
F ₂ ADN	248,836	70,563	82,353	79,401	115,467	143,889	154,940	177,837
F ₃ ADN	165,348	80,338	92,523	94,689	125,943	145,618	168,561	182,516
Media	214,511	77,746	85,710	92,936	120,692	144,273	159,045	177,611
Error Est	25,217	3,638	3,407	7,360	3,024	0,693	4,773	2,899

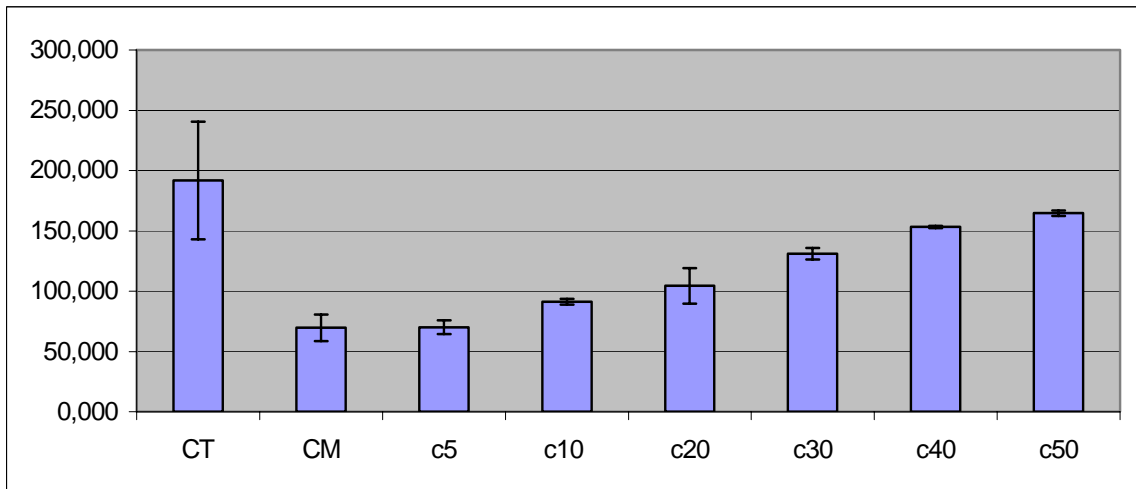
Tabla 18



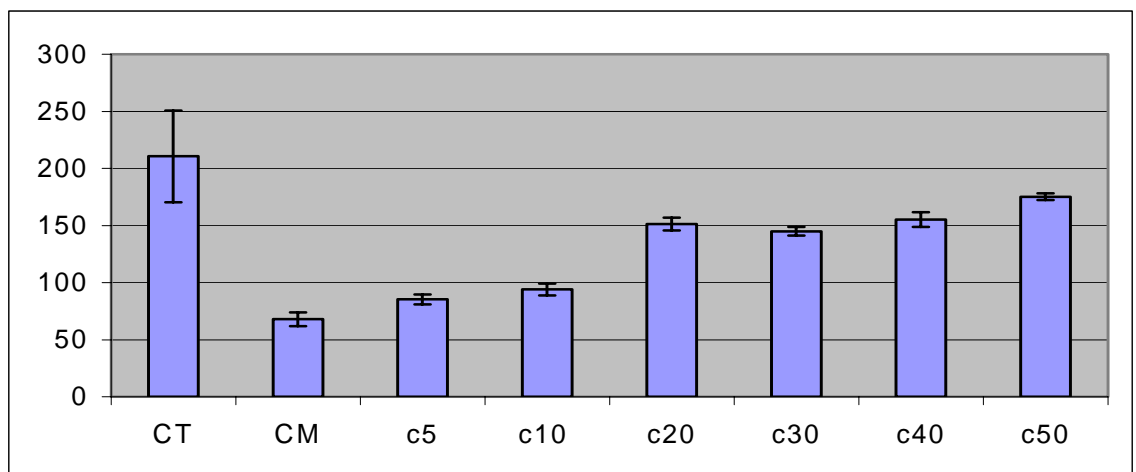
Gráfica 11: 1 hora



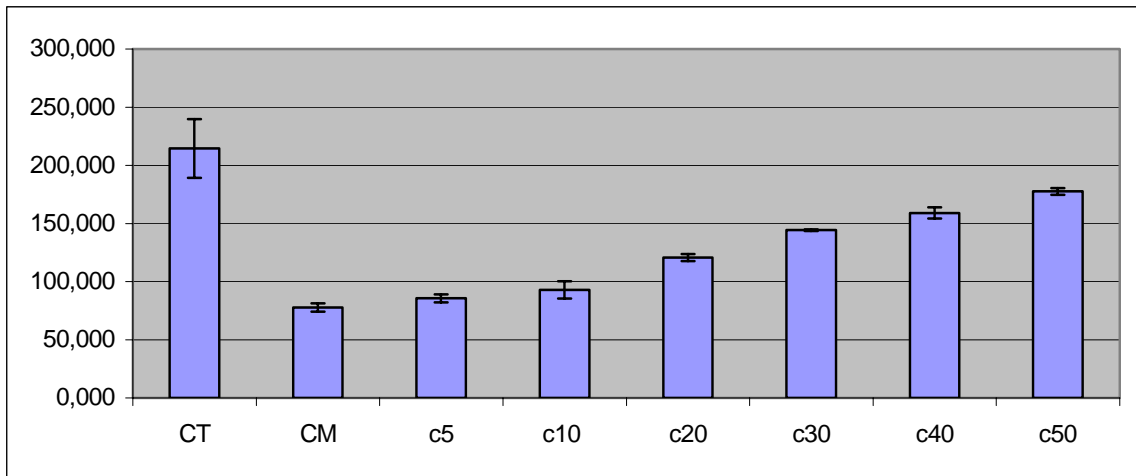
Gráfica 12: 6 horas



Gráfica 13: 12 horas



Gráfica 14: 24 horas



Gráfica 15: 48 horas

3.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL HEMA MEDIANTE MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

En las tablas 19 a la 29 se expresan los análisis cualitativos de las 55 células control.

En las tablas 30 a la 40 aparecen los análisis cualitativos de las células expuestas a concentraciones de HEMA 5 mM, mientras que en las tablas 41 a la 51 se muestra el análisis cualitativo de las células expuestas a concentraciones de HEMA 10 mM.

De la tabla 52 a la 61 se muestran resultados cuantitativos del análisis microanalítico de los grupos de células control (tablas 52 y 53) y expuestas a concentraciones de HEMA 5 mM (tablas 55 y 56) y 10mM (tablas 58 y 59), así como las medias y desviaciones estándar de dichos resultados (tablas 54, 67 y 60). En la tabla 61 aparece la comparativa de las medias de los resultados de dichos grupos, mientras que en la gráfica 16 aparece la representación de tal comparación.

El índice K/Na es en los controles 9,01 y en las células incubadas con HEMA con 5 mM y 10 mM 6,06 y 1,39, respectivamente.

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 1	Na	1,07	3,83	0,28
	Mg	1,12	3,89	0,29
	P	7,88	2,69	2,92
	S	1,42	2,24	0,63
	Cl	2,40	1,65	1,45
	K	6,51	1,03	6,33
	Ca	0,22	0,71	0,31
Célula 2	Na	2,33	2,93	0,80
	Mg	1,43	2,69	0,53
	P	9,06	2,29	3,95
	S	1,93	1,82	1,07
	Cl	3,70	1,37	2,70
	K	6,55	1,09	6,04
	Ca	0,43	0,89	0,48
Célula 3	Na	1,23	2,24	0,55
	Mg	0,64	2,59	0,25
	P	9,38	2,09	4,50
	S	1,52	1,68	0,90
	Cl	2,49	1,29	1,92
	K	8,20	1,14	7,19
	Ca	0,18	0,96	0,19
Célula 4	Na	0,74	2,03	0,36
	Mg	0,63	2,03	0,31
	P	6,15	1,50	4,11
	S	1,45	1,33	1,09
	Cl	1,63	1,14	1,43
	K	5,47	0,78	7,01
	Ca	0,00	0,78	0,00
Célula 5	Na	0,35	3,05	0,35
	Mg	0,84	3,19	0,26
	P	11,97	2,25	5,32
	S	1,60	1,76	0,90
	Cl	3,10	1,35	2,30
	K	10,06	0,90	11,17
	Ca	0,47	0,81	0,58

Tabla 19

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 6	Na	1,06	1,86	0,57
	Mg	0,96	1,60	0,60
	P	6,44	1,53	4,20
	S	1,03	1,15	0,90
	Cl	1,71	0,75	2,26
	K	5,00	0,54	9,26
	Ca	0,12	0,41	0,28
Célula 7	Na	0,65	1,72	0,38
	Mg	0,60	1,83	0,33
	P	6,59	1,44	4,57
	S	1,10	0,99	1,11
	Cl	1,88	0,66	2,85
	K	4,74	0,60	7,89
	Ca	0,17	0,49	0,36
Célula 8	Na	0,94	2,22	0,42
	Mg	0,77	2,13	0,36
	P	7,79	1,85	4,22
	S	1,12	1,39	0,80
	Cl	2,27	0,95	2,38
	K	6,62	0,57	11,50
	Ca	0,36	0,48	0,75
Célula 9	Na	1,00	1,55	0,65
	Mg	0,96	1,68	0,57
	P	7,85	1,54	5,10
	S	1,31	1,12	1,16
	Cl	1,98	0,89	2,22
	K	6,32	0,73	8,66
	Ca	0,22	0,60	0,37
Célula 10	Na	1,01	2,40	0,42
	Mg	0,81	2,62	0,31
	P	9,42	1,90	4,96
	S	0,76	1,43	0,53
	Cl	2,51	1,10	2,28
	K	8,47	0,84	10,08
	Ca	0,34	0,65	0,52

Tabla 20

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 11	Na	0,88	3,48	0,25
	Mg	0,95	3,33	0,29
	P	9,98	2,41	4,13
	S	1,80	1,81	1,00
	Cl	3,28	1,33	2,46
	K	9,45	0,96	9,84
	Ca	0,14	1,02	0,14
Célula 12	Na	1,09	3,07	0,35
	Mg	1,13	2,83	0,40
	P	11,24	2,15	5,23
	S	2,16	1,62	1,33
	Cl	2,80	1,24	2,26
	K	8,93	1,14	7,83
	Ca	0,20	1,02	0,20
Célula 13	Na	1,93	3,22	0,60
	Mg	0,86	3,05	0,28
	P	10,48	2,29	4,59
	S	1,70	1,71	0,99
	Cl	3,47	1,28	2,70
	K	8,36	1,02	8,20
	Ca	0,00	1,02	0,00
Célula 14	Na	1,82	2,16	0,84
	Mg	0,85	2,42	0,35
	P	8,17	1,99	4,12
	S	1,69	1,56	1,08
	Cl	2,23	1,23	1,81
	K	6,36	0,96	6,63
	Ca	0,00	0,96	0,00
Célula 15	Na	1,92	3,28	0,59
	Mg	1,31	3,33	0,39
	P	10,81	2,60	4,16
	S	1,50	1,87	0,80
	Cl	3,13	1,38	2,28
	K	8,90	1,12	7,91
	Ca	0,32	0,88	0,37

Tabla 21

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 16	Na	0,99	2,57	0,39
	Mg	0,75	2,57	0,29
	P	10,14	2,35	4,31
	S	1,52	1,75	0,87
	Cl	2,45	1,32	1,86
	K	7,74	0,87	8,90
	Ca	0,08	0,84	0,09
Célula 17	Na	2,56	1,87	1,37
	Mg	1,03	2,15	0,48
	P	8,11	1,97	4,12
	S	1,63	1,58	1,03
	Cl	2,47	1,32	1,87
	K	7,14	0,90	7,89
	Ca	0,23	0,79	0,29
Célula 18	Na	0,64	2,17	0,30
	Mg	0,59	2,06	0,29
	P	5,97	1,63	3,67
	S	1,23	1,25	0,99
	Cl	1,69	0,95	1,78
	K	5,39	0,67	8,04
	Ca	0,22	0,56	0,39
Célula 19	Na	1,28	3,13	0,41
	Mg	1,15	2,86	0,40
	P	9,76	2,23	4,38
	S	2,11	1,13	1,22
	Cl	3,04	1,24	2,46
	K	7,84	1,02	7,69
	Ca	0,35	0,96	0,37
Célula 20	Na	0,37	2,62	0,14
	Mg	0,51	2,35	0,22
	P	8,57	1,89	4,53
	S	1,42	1,32	1,08
	Cl	1,82	0,98	1,85
	K	6,52	0,83	7,86
	Ca	0,31	0,63	0,49

Tabla 22

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 21	Na	1,01	1,32	0,77
	Mg	0,81	1,61	0,51
	P	6,69	1,38	4,87
	S	1,26	1,04	1,21
	Cl	2,07	0,75	2,75
	K	5,47	0,59	9,28
	Ca	0,00	0,66	0,00
Célula 22	Na	0,75	2,36	0,32
	Mg	0,89	2,06	0,43
	P	7,71	1,71	4,51
	S	1,42	1,37	1,04
	Cl	1,90	1,07	1,78
	K	6,26	0,72	8,69
	Ca	0,20	0,66	0,31
Célula 23	Na	0,92	2,19	0,42
	Mg	0,30	2,31	0,13
	P	8,86	1,61	5,51
	S	1,52	1,18	1,29
	Cl	2,22	0,95	2,32
	K	7,26	0,78	9,31
	Ca	0,28	0,66	0,42
Célula 24	Na	2,38	3,12	0,76
	Mg	1,24	2,84	0,44
	P	8,66	2,52	3,44
	S	1,37	1,81	0,76
	Cl	3,32	1,36	2,44
	K	7,39	0,90	8,21
	Ca	0,46	0,90	0,51
Célula 25	Na	1,32	2,00	0,66
	Mg	0,74	2,07	0,36
	P	9,90	2,31	4,29
	S	1,43	1,67	0,85
	Cl	2,00	1,13	1,76
	K	7,09	0,96	7,38
	Ca	0,00	1,02	0,00

Tabla 23

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 26	Na	1,39	1,75	0,79
	Mg	1,08	1,72	0,63
	P	8,27	1,32	6,29
	S	2,12	1,18	1,80
	Cl	2,45	1,02	2,40
	K	6,76	0,78	8,66
	Ca	0,26	0,68	0,39
Célula 27	Na	2,96	2,76	1,07
	Mg	2,78	2,80	0,99
	P	17,64	2,45	7,20
	S	3,35	2,36	1,42
	Cl	3,76	2,21	1,70
	K	11,99	1,97	6,10
	Ca	0,00	1,75	0,00
Célula 28	Na	2,86	4,68	0,61
	Mg	1,47	4,72	0,31
	P	18,53	4,11	4,51
	S	3,72	3,12	1,19
	Cl	5,01	2,32	2,16
	K	14,72	1,91	7,68
	Ca	0,43	1,57	0,27
Célula 29	Na	1,99	3,85	0,52
	Mg	1,22	3,66	0,33
	P	13,18	3,03	4,35
	S	2,79	2,30	1,21
	Cl	3,73	1,74	2,15
	K	11,97	1,44	8,31
	Ca	0,00	1,44	0,00
Célula 30	Na	3,10	6,20	0,50
	Mg	1,78	6,29	0,28
	P	22,59	5,06	4,47
	S	5,32	3,82	1,39
	Cl	6,16	2,94	2,10
	K	16,34	2,14	7,62
	Ca	0,23	2,04	0,11

Tabla 24

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 31	Na	1,11	3,67	0,30
	Mg	1,09	3,46	0,31
	P	12,88	3,34	3,86
	S	3,34	2,41	1,38
	Cl	4,12	1,63	2,52
	K	11,02	1,40	7,87
	Ca	0,27	1,16	0,23
Célula 32	Na	1,37	4,82	0,28
	Mg	1,18	4,91	0,24
	P	19,07	4,30	4,43
	S	2,80	3,45	0,81
	Cl	4,95	2,42	2,04
	K	15,05	1,87	8,07
	Ca	0,36	1,47	0,24
Célula 33	Na	1,90	4,26	0,45
	Mg	1,52	3,93	0,39
	P	17,00	3,78	4,50
	S	3,53	2,80	1,26
	Cl	4,69	1,93	2,43
	K	13,80	1,57	8,79
	Ca	0,41	1,36	0,31
Célula 34	Na	2,39	5,13	0,47
	Mg	2,01	5,03	0,40
	P	18,68	4,16	4,48
	S	3,66	2,98	1,23
	Cl	5,43	2,08	2,61
	K	13,93	1,92	7,25
	Ca	0,27	1,92	0,14
Célula 35	Na	2,26	4,68	0,48
	Mg	1,49	4,95	0,30
	P	14,98	3,69	4,06
	S	3,52	2,91	1,21
	Cl	4,58	2,18	2,10
	K	12,57	1,93	6,50
	Ca	0,54	1,54	0,35

Tabla 25

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 36	Na	2,27	2,54	0,89
	Mg	1,66	2,97	0,56
	P	10,19	2,97	3,43
	S	2,70	2,14	1,26
	Cl	3,73	1,54	2,41
	K	9,60	1,20	8,00
	Ca	0,49	1,20	0,40
Célula 37	Na	2,97	6,34	0,56
	Mg	2,28	5,42	0,42
	P	21,44	4,70	4,57
	S	3,81	3,44	1,11
	Cl	5,95	2,52	2,36
	K	16,13	2,06	7,85
	Ca	0,57	1,89	0,30
Célula 38	Na	1,71	3,42	0,50
	Mg	1,45	3,02	0,48
	P	11,61	2,80	4,15
	S	2,22	2,08	1,07
	Cl	4,49	1,44	3,11
	K	11,19	1,17	9,56
	Ca	0,41	0,88	0,47
Célula 39	Na	3,06	5,59	0,55
	Mg	1,73	6,04	0,29
	P	20,28	4,59	4,42
	S	3,76	3,59	1,05
	Cl	6,84	2,79	2,61
	K	18,02	2,16	8,34
	Ca	0,53	2,06	0,26
Célula 40	Na	1,36	3,60	0,38
	Mg	1,39	3,60	0,39
	P	12,82	2,97	4,32
	S	2,93	2,18	1,34
	Cl	3,87	1,71	2,27
	K	11,23	1,26	8,91
	Ca	0,31	1,32	0,23

Tabla 26

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 41	Na	3,99	4,84	0,82
	Mg	1,81	5,18	0,35
	P	17,03	3,97	4,29
	S	5,07	3,13	1,62
	Cl	4,45	2,49	2,41
	K	11,19	1,95	5,74
	Ca	0,95	1,95	0,61
Célula 42	Na	1,21	3,07	0,39
	Mg	0,93	2,73	0,34
	P	10,01	1,96	4,57
	S	1,96	1,51	1,29
	Cl	2,65	1,21	2,19
	K	7,55	1,02	7,40
	Ca	0,23	0,96	0,24
Célula 43	Na	2,07	3,05	0,68
	Mg	0,92	3,28	0,28
	P	12,28	2,85	4,31
	S	2,09	2,11	0,99
	Cl	3,38	1,41	2,39
	K	10,00	1,25	8,04
	Ca	0,00	1,37	0,00
Célula 44	Na	2,23	5,05	0,44
	Mg	1,64	4,64	0,35
	P	16,25	3,92	4,14
	S	4,01	2,94	1,36
	Cl	4,80	2,20	2,18
	K	13,74	1,80	7,61
	Ca	78,00	1,36	0,58
Célula 45	Na	1,96	5,58	0,35
	Mg	1,12	5,58	0,20
	P	17,69	4,00	4,42
	S	5,41	3,09	1,75
	Cl	5,11	2,36	2,17
	K	11,95	1,80	6,64
	Ca	0,00	1,80	0,00

Tabla 27

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 46	Na	4,32	6,07	0,71
	Mg	3,24	6,45	0,50
	P	23,84	5,55	4,30
	S	4,39	4,36	1,01
	Cl	6,45	3,24	1,99
	K	17,47	2,25	7,76
	Ca	0,73	2,09	0,35
Célula 47	Na	2,02	3,33	0,61
	Mg	1,08	3,38	0,32
	P	14,66	3,24	4,52
	S	3,34	2,38	1,40
	Cl	3,87	1,70	2,28
	K	11,88	1,20	9,90
	Ca	0,43	1,20	0,36
Célula 48	Na	2,10	2,87	0,73
	Mg	1,49	2,99	0,50
	P	13,15	2,80	4,70
	S	2,77	2,19	1,26
	Cl	2,95	1,72	1,72
	K	10,03	1,26	7,93
	Ca	0,47	1,08	0,43
Célula 49	Na	2,09	3,87	0,54
	Mg	1,10	3,81	0,29
	P	12,32	3,20	3,85
	S	3,91	2,36	1,66
	Cl	4,63	1,76	2,63
	K	10,52	1,50	7,04
	Ca	0,60	1,36	0,44
Célula 50	Na	2,51	6,86	0,37
	Mg	1,97	6,93	0,28
	P	24,43	5,78	4,23
	S	5,98	4,38	1,37
	Cl	6,56	3,39	1,93
	K	19,28	2,38	8,12
	Ca	0,89	2,19	0,41

Tabla 28

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 51	Na	2,43	6,28	0,39
	Mg	2,15	6,36	0,34
	P	22,76	5,19	4,39
	S	5,97	4,12	1,45
	Cl	7,11	3,20	2,22
	K	18,66	2,45	7,60
	Ca	0,70	2,27	0,31
Célula 52	Na	2,90	5,50	0,53
	Mg	1,54	5,86	0,26
	P	20,12	5,43	3,71
	S	4,19	3,95	1,06
	Cl	6,30	2,72	2,32
	K	16,00	2,19	7,31
	Ca	0,41	2,00	0,20
Célula 53	Na	3,21	5,28	0,61
	Mg	2,54	5,82	0,44
	P	19,65	4,60	4,27
	S	5,11	3,47	1,47
	Cl	5,99	2,58	2,32
	K	16,78	1,97	8,52
	Ca	0,40	2,06	0,19
Célula 54	Na	3,15	5,07	0,62
	Mg	1,89	5,34	0,35
	P	20,55	4,72	4,36
	S	4,58	3,62	1,27
	Cl	5,80	2,74	2,11
	K	16,05	2,16	7,43
	Ca	0,27	2,10	0,13
Célula 55	Na	2,12	3,98	0,53
	Mg	1,54	4,10	0,38
	P	12,58	3,40	3,70
	S	4,00	2,75	1,45
	Cl	4,74	2,01	2,36
	K	11,40	1,77	6,44
	Ca	0,82	1,90	0,43

Tabla 29

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 56	Na	1,43	2,74	0,52
	Mg	2,00	2,67	0,23
	P	8,73	1,90	4,58
	S	2,09	1,48	1,41
	Cl	1,93	1,09	1,77
	K	6,78	0,84	8,07
	Ca	0,08	0,84	0,10
Célula 57	Na	2,36	6,10	0,39
	Mg	1,91	5,37	0,36
	P	18,07	3,97	4,55
	S	2,74	2,90	0,94
	Cl	4,59	2,26	2,04
	K	12,61	1,76	7,14
	Ca	0,63	1,52	0,41
Célula 58	Na	2,18	3,93	0,55
	Mg	1,99	4,02	0,49
	P	16,08	3,74	4,30
	S	1,67	2,81	0,60
	Cl	3,69	2,03	1,82
	K	11,13	1,55	7,16
	Ca	0,45	1,34	0,34
Célula 59	Na	2,29	4,62	0,50
	Mg	2,47	4,84	0,51
	P	17,83	3,48	5,12
	S	1,91	2,65	0,72
	Cl	4,22	2,16	1,95
	K	12,90	1,60	7,89
	Ca	0,51	1,43	0,36
Célula 60	Na	0,67	1,37	0,49
	Mg	0,64	1,75	0,36
	P	8,03	1,76	4,55
	S	1,21	1,36	0,89
	Cl	1,97	1,01	1,94
	K	5,41	1,00	5,41
	Ca	0,16	0,75	0,21

Tabla 30

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 61	Na	1,85	1,77	1,04
	Mg	1,38	2,22	0,62
	P	8,79	2,11	4,17
	S	1,30	1,48	0,88
	Cl	2,69	1,04	2,58
	K	5,92	1,11	5,33
	Ca	0,00	1,02	0,00
Célula 62	Na	1,74	2,81	0,62
	Mg	1,53	2,56	0,60
	P	9,67	2,27	4,27
	S	1,20	1,61	0,75
	Cl	2,33	1,15	2,02
	K	6,68	0,89	7,51
	Ca	0,22	0,84	0,27
Célula 63	Na	1,50	2,30	0,66
	Mg	0,92	2,66	0,34
	P	7,26	2,12	3,41
	S	1,01	1,48	0,69
	Cl	2,06	1,04	1,97
	K	5,07	0,90	5,63
	Ca	0,12	0,84	0,14
Célula 64	Na	1,09	1,75	0,62
	Mg	0,35	1,67	0,21
	P	4,51	1,23	3,67
	S	0,93	1,00	0,93
	Cl	0,82	0,71	1,16
	K	1,93	0,66	2,92
	Ca	0,09	0,58	0,16
Célula 65	Na	2,67	2,14	1,25
	Mg	1,07	2,24	0,48
	P	7,09	1,65	4,28
	S	1,38	1,25	1,11
	Cl	0,88	0,92	0,96
	K	2,39	0,72	3,32
	Ca	0,22	0,72	0,31

Tabla 31

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 66	Na	2,39	2,37	1,01
	Mg	0,89	2,30	0,39
	P	5,86	1,63	3,59
	S	0,98	1,26	0,77
	Cl	1,32	0,95	1,38
	K	4,09	0,66	6,20
	Ca	0,12	0,60	0,19
Célula 67	Na	2,72	2,32	0,82
	Mg	0,81	2,97	0,27
	P	8,57	2,36	3,64
	S	1,54	1,80	0,86
	Cl	4,88	1,27	3,84
	K	8,71	0,90	9,68
	Ca	0,13	0,96	0,14
Célula 68	Na	2,20	1,93	1,14
	Mg	1,15	1,93	0,59
	P	8,02	1,78	4,50
	S	1,22	1,27	0,96
	Cl	2,20	0,99	2,22
	K	6,06	0,77	1,87
	Ca	0,11	0,60	0,18
Célula 69	Na	1,53	2,71	0,56
	Mg	1,24	2,57	0,48
	P	8,52	2,18	3,91
	S	1,24	1,78	0,69
	Cl	2,12	1,40	1,51
	K	6,01	1,02	5,89
	Ca	0,14	0,90	0,16
Célula 70	Na	1,33	3,06	0,43
	Mg	0,72	3,06	0,24
	P	7,93	2,48	3,19
	S	1,62	1,70	0,95
	Cl	2,12	1,15	1,85
	K	5,03	0,92	5,50
	Ca	0,17	0,78	0,22

Tabla 32

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 71	Na	1,18	2,16	0,55
	Mg	0,18	2,16	0,55
	P	8,54	1,86	4,59
	S	0,91	1,43	0,63
	Cl	2,14	1,10	1,95
	K	6,08	0,77	7,85
	Ca	0,22	0,78	0,28
Célula 72	Na	1,19	2,22	0,53
	Mg	0,95	2,33	0,41
	P	7,26	1,71	4,24
	S	1,13	1,25	0,93
	Cl	1,16	0,81	1,39
	K	2,91	0,80	3,64
	Ca	0,33	0,52	0,63
Célula 73	Na	0,52	2,87	0,18
	Mg	0,74	2,57	0,29
	P	7,46	1,99	3,75
	S	0,56	1,46	0,39
	Cl	0,79	0,89	0,88
	K	2,57	0,92	2,79
	Ca	0,00	0,84	0,00
Célula 74	Na	1,02	2,43	0,42
	Mg	0,88	2,38	0,37
	P	8,17	1,90	4,30
	S	1,12	1,47	0,77
	Cl	2,56	1,21	2,12
	K	6,57	0,77	8,48
	Ca	0,41	0,56	0,72
Célula 75	Na	1,35	2,52	0,53
	Mg	0,91	2,57	0,35
	P	8,38	2,03	4,13
	S	1,11	1,51	0,73
	Cl	2,20	1,03	2,13
	K	5,72	0,78	7,34
	Ca	0,18	0,84	0,21

Tabla 33

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 76	Na	11,23	3,21	3,49
	Mg	0,41	2,82	0,15
	P	7,89	1,78	4,43
	S	0,76	1,41	0,54
	Cl	3,90	1,21	3,22
	K	0,62	0,78	0,79
	Ca	0,00	0,78	0,00
Célula 77	Na	3,44	4,01	0,86
	Mg	1,66	4,01	0,41
	P	11,70	2,67	4,37
	S	2,62	2,09	1,25
	Cl	3,09	1,64	1,88
	K	6,96	1,38	5,05
	Ca	0,31	1,26	0,25
Célula 78	Na	2,65	5,78	0,46
	Mg	1,63	5,42	0,30
	P	15,12	3,81	3,97
	S	2,33	2,72	0,85
	Cl	2,19	2,04	1,08
	K	3,98	1,74	2,29
	Ca	0,42	1,84	0,23
Célula 79	Na	5,13	4,86	1,06
	Mg	1,76	4,86	0,36
	P	20,20	4,41	4,59
	S	1,20	3,14	0,38
	Cl	3,98	2,37	1,68
	K	11,30	1,79	6,29
	Ca	0,56	1,45	0,39
Célula 80	Na	3,05	3,76	0,81
	Mg	0,58	3,95	0,15
	P	9,73	3,09	3,15
	S	1,27	2,34	0,54
	Cl	2,36	1,66	1,42
	K	3,42	1,50	2,28
	Ca	0,91	1,61	0,57

Tabla 34

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 81	Na	2,86	3,29	0,87
	Mg	1,56	3,66	0,43
	P	10,32	3,22	3,20
	S	2,38	2,63	0,90
	Cl	2,12	2,02	1,05
	K	4,05	1,77	2,43
	Ca	0,27	1,68	0,16
Célula 82	Na	1,91	3,55	0,54
	Mg	1,58	3,65	0,43
	P	11,53	2,97	3,88
	S	1,37	2,36	0,58
	Cl	1,44	1,61	0,89
	K	4,22	1,13	3,71
	Ca	0,32	0,96	0,34
Célula 83	Na	0,52	2,68	0,19
	Mg	0,14	2,37	0,06
	P	6,48	1,55	4,17
	S	1,37	1,30	1,05
	Cl	1,36	1,02	1,33
	K	4,41	0,60	1,34
	Ca	0,40	0,48	0,83
Célula 84	Na	1,40	4,73	0,30
	Mg	1,93	4,89	0,30
	P	19,33	4,64	4,16
	S	1,37	3,37	0,41
	Cl	3,97	2,26	1,76
	K	12,57	2,07	6,07
	Ca	0,11	1,82	0,06
Célula 85	Na	1,20	2,44	0,49
	Mg	1,08	2,56	0,42
	P	8,80	2,32	3,79
	S	2,16	1,80	1,20
	Cl	2,54	1,32	1,92
	K	7,70	1,14	6,75
	Ca	0,34	0,96	0,35

Tabla 35

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 86	Na	3,55	4,74	0,75
	Mg	1,92	4,62	0,42
	P	15,65	3,59	4,36
	S	2,18	2,53	0,86
	Cl	5,19	2,02	2,58
	K	11,58	1,77	6,54
	Ca	0,67	1,47	0,45
Célula 87	Na	2,12	3,71	0,57
	Mg	1,28	4,28	0,30
	P	14,19	3,47	4,08
	S	2,90	2,78	1,05
	Cl	3,69	2,14	1,72
	K	10,99	1,68	6,54
	Ca	0,23	1,62	0,14
Célula 88	Na	1,94	4,80	0,40
	Mg	1,34	4,64	0,29
	P	17,11	3,83	4,47
	S	2,83	2,89	0,98
	Cl	4,39	2,06	2,14
	K	12,69	1,50	8,46
	Ca	0,41	1,44	0,28
Célula 89	Na	2,38	4,49	0,53
	Mg	2,33	4,70	0,50
	P	17,26	3,80	4,54
	S	2,91	3,08	0,95
	Cl	4,41	2,28	1,93
	K	13,24	1,75	7,47
	Ca	0,51	1,63	0,31
Célula 90	Na	2,05	5,51	0,37
	Mg	1,62	5,67	0,29
	P	19,59	4,18	4,69
	S	3,47	3,25	1,07
	Cl	4,28	2,46	1,74
	K	12,88	2,07	6,22
	Ca	0,41	1,71	0,24

Tabla 36

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 91	Na	1,12	4,17	0,27
	Mg	1,49	3,83	0,39
	P	14,63	3,31	4,42
	S	2,16	2,55	0,85
	Cl	3,93	1,88	2,10
	K	12,15	1,40	8,68
	Ca	0,84	1,13	0,74
Célula 92	Na	4,20	12,99	0,32
	Mg	2,93	13,49	0,22
	P	28,25	8,96	3,15
	S	4,99	6,84	0,73
	Cl	9,47	5,32	1,78
	K	22,27	3,98	5,59
	Ca	0,91	3,57	0,25
Célula 93	Na	4,51	17,12	0,26
	Mg	3,93	16,78	0,23
	P	34,49	11,44	3,02
	S	4,13	8,49	0,49
	Cl	8,91	6,24	1,43
	K	23,66	4,68	5,05
	Ca	0,99	3,76	0,26
Célula 94	Na	4,65	13,27	0,35
	Mg	3,48	13,79	325,00
	P	34,98	9,60	3,64
	S	4,13	7,55	0,55
	Cl	8,90	5,70	1,56
	K	23,79	3,97	5,98
	Ca	0,86	3,23	0,26
Célula 95	Na	2,06	1,78	1,16
	Mg	0,95	1,96	0,49
	P	6,11	1,38	4,42
	S	1,42	1,10	1,29
	Cl	3,02	0,94	3,23
	K	5,14	0,75	6,89
	Ca	0,16	0,78	0,20

Tabla 37

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 96	Na	4,76	11,86	0,40
	Mg	4,35	11,69	0,37
	P	35,36	9,06	3,91
	S	1,88	6,74	0,28
	Cl	5,62	4,80	1,17
	K	25,08	4,07	6,16
	Ca	0,21	3,14	0,07
Célula 97	Na	13,00	15,66	0,83
	Mg	5,67	15,61	0,36
	P	40,94	12,02	3,41
	S	1,78	8,62	0,21
	Cl	11,40	6,30	1,81
	K	30,27	4,41	6,86
	Ca	1,40	3,69	0,38
Célula 98	Na	2,39	11,10	0,22
	Mg	5,13	10,26	0,50
	P	28,40	8,12	3,49
	S	2,60	5,82	0,45
	Cl	4,91	4,09	1,20
	K	18,19	3,20	5,68
	Ca	0,50	2,93	0,17
Célula 99	Na	2,77	9,40	0,29
	Mg	2,95	9,02	0,33
	P	26,22	6,99	3,75
	S	2,72	5,08	0,54
	Cl	4,09	3,64	1,12
	K	14,91	2,97	5,02
	Ca	0,47	2,58	0,18
Célula 100	Na	2,28	7,70	0,30
	Mg	2,34	8,20	0,29
	P	28,40	6,61	4,30
	S	2,60	5,14	0,51
	Cl	3,38	3,67	0,92
	K	12,36	3,06	4,04
	Ca	0,49	2,39	0,20

Tabla 38

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 101	Na	2,08	8,64	0,24
	Mg	1,99	8,62	0,23
	P	24,64	6,18	3,99
	S	3,12	4,82	0,65
	Cl	5,01	3,50	1,43
	K	13,50	2,64	5,10
	Ca	0,36	2,48	0,15
Célula 102	Na	2,95	7,29	0,40
	Mg	2,60	7,20	0,36
	P	22,97	5,66	4,06
	S	3,28	4,09	0,80
	Cl	2,95	2,87	1,03
	K	10,12	2,40	4,21
	Ca	0,38	2,31	0,17
Célula 103	Na	2,80	7,83	0,36
	Mg	2,72	7,63	0,36
	P	23,72	5,63	4,21
	S	4,09	4,64	0,88
	Cl	5,76	3,44	1,68
	K	16,42	2,42	6,77
	Ca	0,55	2,10	0,26
Célula 104	Na	1,63	7,72	0,21
	Mg	2,57	7,47	0,34
	P	23,26	5,64	4,12
	S	4,07	4,18	0,97
	Cl	5,02	3,10	1,62
	K	15,20	2,34	6,51
	Ca	0,71	1,92	0,37
Célula 105	Na	1,33	2,96	0,45
	Mg	1,34	2,78	0,48
	P	10,69	2,42	4,41
	S	1,47	1,75	0,84
	Cl	2,63	1,12	2,35
	K	6,78	1,08	6,28
	Ca	0,28	0,85	0,30

Tabla 39

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 106	Na	2,69	7,91	0,34
	Mg	2,54	7,63	0,33
	P	23,12	6,02	3,85
	S	3,21	4,47	0,72
	Cl	4,69	3,19	1,47
	K	14,06	2,52	5,58
	Ca	0,40	2,58	0,15
Célula 107	Na	3,81	5,93	0,64
	Mg	2,00	6,17	0,32
	P	14,80	4,55	3,25
	S	2,98	3,43	0,87
	Cl	4,97	2,57	1,93
	K	11,28	2,08	5,44
	Ca	0,44	2,04	0,21
Célula 108	Na	2,09	8,23	0,25
	Mg	1,52	7,97	0,19
	P	19,73	5,55	3,55
	S	3,59	4,49	0,80
	Cl	5,18	3,23	1,61
	K	14,29	2,55	5,60
	Ca	0,35	2,23	0,16
Célula 109	Na	0,82	2,66	0,31
	Mg	1,15	2,49	0,46
	P	9,42	2,00	4,71
	S	1,75	1,31	1,33
	Cl	2,59	0,88	2,94
	K	6,87	0,87	7,90
	Ca	0,23	0,77	0,31
Célula 110	Na	0,71	2,40	0,30
	Mg	0,95	2,34	0,41
	P	8,95	1,94	4,61
	S	1,51	1,47	1,03
	Cl	2,65	1,15	2,31
	K	7,54	1,02	7,39
	Ca	0,11	0,86	0,13

Tabla 40

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 111	Na	0,49	0,62	0,79
	Mg	0,31	0,86	0,35
	P	0,87	1,78	0,48
	S	2,16	2,12	1,02
	Cl	5,00	2,01	2,49
	K	7,03	1,56	4,51
	Ca	0,71	1,44	0,49
Célula 112	Na	2,72	5,78	0,47
	Mg	2,08	5,90	0,35
	P	20,29	4,59	4,43
	S	1,97	3,70	0,53
	Cl	4,09	2,86	1,43
	K	15,74	1,88	8,39
	Ca	0,51	2,07	0,25
Célula 113	Na	0,65	1,19	0,55
	Mg	0,08	0,98	0,08
	P	0,28	0,60	0,46
	S	0,99	0,52	1,89
	Cl	0,91	0,39	2,33
	K	0,77	0,42	1,83
	Ca	0,10	0,30	0,33
Célula 114	Na	1,83	2,45	0,75
	Mg	0,83	2,60	0,32
	P	1,44	1,79	0,80
	S	2,71	1,47	1,84
	Cl	0,81	1,25	0,65
	K	0,00	1,44	0,00
	Ca	1,27	2,12	0,60
Célula 115	Na	0,45	0,54	0,83
	Mg	0,06	0,54	0,11
	P	0,10	0,38	0,27
	S	0,17	0,29	0,58
	Cl	0,04	0,22	0,18
	K	0,00	0,20	0,00
	Ca	0,22	0,24	0,94

Tabla 41

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 116	Na	0,69	0,38	1,83
	Mg	0,14	0,46	0,30
	P	0,34	0,28	1,21
	S	0,31	0,17	1,85
	Cl	0,32	0,17	1,94
	K	0,00	0,24	0,00
	Ca	0,04	0,24	0,17
Célula 117	Na	0,19	1,14	0,17
	Mg	0,00	0,93	0,00
	P	0,16	0,47	0,33
	S	0,23	0,39	0,59
	Cl	0,12	0,33	0,35
	K	0,09	0,30	0,30
	Ca	0,20	0,30	0,68
Célula 118	Na	0,00	1,05	0,00
	Mg	0,00	0,92	0,00
	P	0,00	0,56	0,00
	S	0,22	0,41	0,54
	Cl	0,05	0,28	0,20
	K	0,00	0,36	0,00
	Ca	0,00	0,30	0,00
Célula 119	Na	1,16	4,45	0,26
	Mg	0,79	4,41	0,18
	P	10,56	3,17	3,33
	S	1,08	2,42	0,45
	Cl	0,71	1,68	0,42
	K	0,00	1,84	0,00
	Ca	1,74	2,41	0,72
Célula 120	Na	2,33	4,72	0,49
	Mg	0,00	3,66	0,00
	P	0,69	2,70	0,25
	S	1,73	2,86	0,60
	Cl	3,36	2,39	1,40
	K	0,81	2,09	0,39
	Ca	1,23	1,92	0,64

Tabla 42

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 121	Na	7,93	5,85	1,36
	Mg	0,50	5,43	0,09
	P	1,00	2,88	0,35
	S	6,66	2,78	2,40
	Cl	6,26	2,35	2,66
	K	6,55	1,74	3,77
	Ca	1,11	1,74	0,64
Célula 122	Na	1,65	2,16	0,76
	Mg	0,83	2,10	0,40
	P	6,44	1,72	3,76
	S	0,92	1,13	0,81
	Cl	0,57	0,77	0,75
	K	0,57	0,72	0,80
	Ca	0,34	0,78	0,44
Célula 123	Na	0,26	0,78	0,34
	Mg	0,22	0,90	0,24
	P	0,39	0,80	0,49
	S	0,37	0,69	0,53
	Cl	0,23	0,54	0,43
	K	0,18	0,49	0,37
	Ca	0,32	0,63	0,50
Célula 124	Na	4,58	5,33	0,86
	Mg	1,86	5,59	0,33
	P	15,03	4,01	3,75
	S	4,59	2,89	1,59
	Cl	1,50	2,23	0,67
	K	3,18	1,97	1,61
	Ca	0,51	1,59	0,32
Célula 125	Na	8,62	5,99	1,44
	Mg	2,19	6,51	0,34
	P	21,56	5,01	4,30
	S	6,33	3,80	1,67
	Cl	3,34	2,79	1,20
	K	8,44	1,99	4,24
	Ca	0,00	2,04	0,00

Tabla 43

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 126	Na	1,46	4,22	0,35
	Mg	2,24	3,77	0,60
	P	15,69	3,62	4,34
	S	2,14	2,60	0,82
	Cl	3,26	1,77	1,84
	K	12,15	1,38	8,80
	Ca	0,55	1,24	0,44
Célula 127	Na	1,97	6,38	0,31
	Mg	1,87	6,21	0,30
	P	20,89	4,59	4,55
	S	3,27	3,44	0,95
	Cl	3,93	2,62	1,50
	K	14,31	2,24	6,37
	Ca	0,00	2,00	0,00
Célula 128	Na	4,72	5,94	0,79
	Mg	2,61	5,89	0,44
	P	25,34	4,71	5,38
	S	2,09	3,30	0,63
	Cl	3,56	2,45	1,45
	K	13,17	2,06	6,41
	Ca	0,31	1,70	0,19
Célula 129	Na	2,91	3,42	0,85
	Mg	0,61	3,12	0,19
	P	5,20	2,17	2,39
	S	2,07	1,67	1,24
	Cl	1,78	1,43	1,25
	K	3,43	1,08	3,18
	Ca	0,17	1,02	0,17
Célula 130	Na	13,56	8,09	1,68
	Mg	1,61	6,90	0,23
	P	1,60	4,26	0,38
	S	9,29	3,97	2,34
	Cl	10,11	3,45	2,93
	K	8,02	2,87	2,80
	Ca	2,88	3,36	0,86

Tabla 44

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 131	Na	1,42	4,17	0,34
	Mg	0,83	4,03	0,21
	P	9,66	2,81	3,45
	S	0,94	2,03	0,47
	Cl	0,70	1,49	0,47
	K	0,23	1,43	0,16
	Ca	1,48	1,79	0,82
Célula 132	Na	1,26	6,34	0,20
	Mg	2,21	5,77	0,38
	P	19,22	4,41	4,36
	S	3,64	3,35	1,09
	Cl	3,39	2,36	1,44
	K	11,48	2,02	5,68
	Ca	0,12	1,73	0,07
Célula 133	Na	0,53	5,28	0,10
	Mg	0,86	5,36	0,16
	P	1,42	2,97	0,48
	S	5,96	2,74	2,18
	Cl	0,65	2,18	0,30
	K	0,00	2,19	0,00
	Ca	1,12	2,48	0,45
Célula 134	Na	1,49	4,14	0,36
	Mg	1,64	4,09	0,40
	P	14,48	3,55	4,08
	S	3,38	2,52	1,34
	Cl	2,41	1,87	1,29
	K	10,39	1,44	7,22
	Ca	0,43	1,44	0,30
Célula 135	Na	2,05	2,52	0,81
	Mg	1,08	2,42	0,44
	P	7,53	1,83	4,13
	S	1,30	1,41	0,92
	Cl	0,65	1,10	0,58
	K	1,53	0,73	2,10
	Ca	0,31	0,78	0,40

Tabla 45

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 136	Na	2,10	5,39	0,39
	Mg	2,32	5,22	0,44
	P	15,79	4,13	3,82
	S	2,22	2,94	0,75
	Cl	3,93	2,20	1,79
	K	13,26	1,56	8,50
	Ca	0,41	1,50	0,27
Célula 137	Na	12,66	5,55	2,28
	Mg	2,30	5,12	0,45
	P	18,27	3,76	4,86
	S	1,19	2,71	0,44
	Cl	1,88	1,85	1,02
	K	1,33	1,50	0,88
	Ca	0,94	1,38	0,68
Célula 138	Na	1,57	3,81	0,41
	Mg	0,80	3,42	0,23
	P	7,89	2,72	2,90
	S	1,07	1,95	0,55
	Cl	1,39	1,43	0,97
	K	0,23	1,44	0,16
	Ca	1,38	1,44	0,95
Célula 139	Na	2,42	1,89	1,28
	Mg	1,07	1,89	0,57
	P	7,71	1,58	4,88
	S	0,88	1,05	0,84
	Cl	0,82	0,68	1,22
	K	1,61	0,78	2,06
	Ca	0,22	0,78	0,28
Célula 140	Na	0,83	0,95	0,87
	Mg	0,16	1,08	0,14
	P	2,07	0,62	3,30
	S	0,63	0,54	1,19
	Cl	0,26	0,42	0,62
	K	0,41	0,36	1,15
	Ca	0,17	0,42	0,40

Tabla 46

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 141	Na	7,14	4,53	1,58
	Mg	1,17	4,06	0,29
	P	10,61	2,99	3,54
	S	2,27	2,44	0,93
	Cl	1,39	1,78	0,78
	K	0,41	1,51	0,27
	Ca	0,22	1,37	0,16
Célula 142	Na	1,64	2,34	0,70
	Mg	0,38	2,38	0,16
	P	5,70	2,20	2,59
	S	1,39	1,65	0,84
	Cl	0,68	1,21	0,56
	K	1,17	0,78	1,51
	Ca	0,32	0,68	0,48
Célula 143	Na	0,34	1,07	0,32
	Mg	0,22	1,17	0,19
	P	3,95	0,89	4,42
	S	0,77	0,56	1,37
	Cl	0,22	0,41	0,54
	K	0,00	0,61	0,00
	Ca	0,17	0,79	0,21
Célula 144	Na	34,20	8,53	4,01
	Mg	0,49	6,51	0,07
	P	12,38	3,94	3,14
	S	1,08	3,18	0,34
	Cl	14,90	2,80	5,32
	K	1,29	1,47	0,88
	Ca	0,25	1,21	0,21
Célula 145	Na	3,13	3,30	0,95
	Mg	0,88	3,42	0,26
	P	9,05	2,38	3,79
	S	1,30	1,74	0,75
	Cl	0,81	1,23	0,65
	K	0,27	1,14	0,24
	Ca	0,65	1,39	0,47

Tabla 47

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 146	Na	23,08	8,37	2,76
	Mg	0,75	6,86	0,11
	P	10,86	4,38	2,48
	S	1,96	3,56	0,55
	Cl	9,77	2,97	3,29
	K	0,85	1,77	0,48
	Ca	0,39	1,29	0,30
Célula 147	Na	16,36	6,24	2,62
	Mg	0,79	5,43	0,15
	P	11,39	3,40	3,35
	S	1,71	2,39	0,71
	Cl	6,45	1,82	3,55
	K	0,90	1,51	0,60
	Ca	0,22	1,47	0,15
Célula 148	Na	3,49	3,28	1,06
	Mg	0,88	3,23	0,27
	P	9,89	2,43	4,06
	S	0,64	1,75	0,37
	Cl	1,26	1,16	1,09
	K	0,15	1,20	0,12
	Ca	0,95	1,14	0,83
Célula 149	Na	8,12	7,68	1,06
	Mg	0,78	7,03	0,11
	P	14,65	5,22	2,80
	S	2,00	3,85	0,52
	Cl	2,01	2,78	0,72
	K	0,78	2,52	0,31
	Ca	1,13	2,81	0,40
Célula 150	Na	4,76	7,80	0,61
	Mg	0,87	7,03	0,12
	P	18,11	5,03	3,60
	S	1,80	3,58	0,50
	Cl	1,68	2,53	0,67
	K	0,89	2,51	0,36
	Ca	1,42	2,93	0,49

Tabla 48

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 151	Na	1,07	5,46	0,20
	Mg	0,41	5,45	0,08
	P	1,27	2,97	0,43
	S	1,30	2,37	0,55
	Cl	0,76	1,92	0,40
	K	0,46	1,47	0,31
	Ca	0,44	1,57	0,28
Célula 152	Na	4,41	4,37	1,01
	Mg	0,47	3,70	0,13
	P	9,27	2,65	3,50
	S	1,00	2,00	0,50
	Cl	1,02	1,38	0,74
	K	2,29	1,04	2,19
	Ca	0,11	1,13	0,10
Célula 153	Na	4,51	6,45	0,70
	Mg	1,00	5,61	0,18
	P	17,01	4,38	3,89
	S	1,14	2,99	0,38
	Cl	1,24	2,00	0,62
	K	2,40	1,80	1,33
	Ca	0,78	1,91	0,41
Célula 154	Na	3,31	4,06	0,81
	Mg	1,22	4,45	0,27
	P	13,65	4,22	3,23
	S	1,45	3,03	0,48
	Cl	1,46	2,07	0,71
	K	2,64	1,68	1,57
	Ca	0,48	1,74	0,28
Célula 155	Na	5,25	4,01	1,31
	Mg	1,60	4,03	0,40
	P	12,84	4,02	3,19
	S	1,48	2,85	0,52
	Cl	1,05	1,80	0,58
	K	2,70	1,44	1,80
	Ca	0,19	1,44	0,13

Tabla 49

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 156	Na	4,78	12,09	0,40
	Mg	3,58	11,98	0,30
	P	31,49	8,88	3,55
	S	3,29	6,61	0,50
	Cl	7,51	5,07	1,48
	K	22,07	3,67	6,01
	Ca	0,88	3,03	0,29
Célula 157	Na	2,78	8,50	0,33
	Mg	2,91	9,17	0,32
	P	29,66	6,89	4,30
	S	3,76	5,05	0,75
	Cl	3,89	3,62	1,08
	K	13,14	2,96	4,44
	Ca	0,50	2,79	0,18
Célula 158	Na	1,98	4,19	0,47
	Mg	0,94	3,80	0,25
	P	0,58	2,30	0,25
	S	2,37	1,93	1,22
	Cl	0,36	1,52	0,24
	K	0,00	1,74	0,00
	Ca	2,31	2,51	0,92
Célula 159	Na	1,03	2,02	0,51
	Mg	1,02	1,92	0,53
	P	4,89	1,11	4,40
	S	0,59	0,86	0,69
	Cl	0,26	0,62	0,42
	K	0,00	0,66	0,00
	Ca	0,67	1,03	0,64
Célula 160	Na	1,15	11,70	0,10
	Mg	4,73	6,66	0,71
	P	0,54	1,99	0,27
	S	1,66	1,64	1,02
	Cl	2,23	1,43	1,56
	K	0,82	1,42	0,58
	Ca	1,25	1,71	0,74

Tabla 50

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 161	Na	0,82	2,47	0,33
	Mg	0,65	2,47	0,26
	P	1,37	1,46	0,94
	S	1,76	1,37	1,28
	Cl	0,46	1,12	0,41
	K	0,00	2,43	0,00
	Ca	4,79	4,55	1,05
Célula 162	Na	20,37	6,64	3,07
	Mg	0,65	6,28	0,10
	P	1,33	4,55	0,29
	S	3,66	4,34	0,84
	Cl	16,36	3,96	4,13
	K	19,61	3,54	5,54
	Ca	4,00	4,59	0,87
Célula 163	Na	3,02	4,07	0,74
	Mg	0,15	3,87	0,04
	P	1,10	1,93	0,57
	S	1,77	1,55	1,14
	Cl	2,05	1,36	1,51
	K	1,14	1,25	0,92
	Ca	0,81	1,48	0,55
Célula 164	Na	0,82	3,42	0,24
	Mg	0,84	3,38	0,25
	P	13,27	2,95	4,50
	S	0,94	1,99	0,47
	Cl	0,44	1,19	0,37
	K	0,00	1,20	0,00
	Ca	0,94	1,26	0,75
Célula 165	Na	0,50	1,34	0,37
	Mg	0,76	1,56	0,49
	P	5,09	1,42	3,57
	S	0,62	0,95	0,65
	Cl	0,09	0,61	0,16
	K	0,00	0,72	0,00
	Ca	0,44	0,90	0,48

Tabla 51

Controles

N ° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 1	23,74	15,34	202,05	34,30	115,70	324,55	15,11
Célula 2	67,82	28,03	273,32	58,26	215,44	309,68	23,39
Célula 3	46,62	13,22	311,38	49,01	153,20	368,64	9,26
Célula 4	30,52	16,39	284,39	59,35	114,10	359,41	0,00
Célula 5	29,67	13,75	368,12	49,01	183,52	572,70	28,26
Célula 6	48,32	31,73	290,62	49,01	180,33	474,77	13,64
Célula 7	32,21	17,45	316,22	60,44	227,41	404,53	17,54
Célula 8	35,60	19,04	292,00	43,56	189,91	589,62	36,55
Célula 9	55,10	30,14	352,89	63,16	177,14	444,01	18,03
Célula 10	35,60	16,39	343,21	28,86	181,93	516,81	25,34
Célula 11	21,19	15,34	285,78	54,45	196,29	504,51	6,82
Célula 12	29,67	21,15	361,89	72,42	180,33	401,45	9,75
Célula 13	50,86	14,81	317,61	53,91	215,44	420,42	0,00
Célula 14	71,21	18,51	285,08	58,81	144,43	339,93	0,00
Célula 15	50,01	20,62	287,85	43,56	181,93	405,55	18,03
Célula 16	33,06	15,34	298,23	47,37	148,41	456,31	4,39
Célula 17	116,14	25,38	285,08	56,08	149,21	404,53	14,13
Célula 18	25,43	15,34	253,95	53,91	142,03	412,22	19,01
Célula 19	34,76	21,15	303,07	66,43	196,29	394,27	18,03
Célula 20	11,87	11,63	313,45	58,81	147,62	402,99	23,88
Célula 21	65,27	26,97	336,98	65,88	219,43	475,79	0,00
Célula 22	27,13	22,74	312,07	56,63	142,03	445,54	15,11
Célula 23	35,60	6,87	381,26	70,24	185,12	477,33	20,47
Célula 24	64,43	23,27	238,03	41,38	194,69	420,93	24,85
Célula 25	55,95	19,04	296,85	46,28	140,44	378,38	0,00
Célula 26	66,97	33,32	435,24	98,01	191,50	444,01	19,01
Célula 27	90,70	52,35	498,20	77,32	135,65	312,75	0,00
Célula 28	51,71	16,39	312,07	64,80	172,35	393,76	13,16
Célula 29	44,08	17,45	301,00	65,88	171,55	426,06	0,00
Célula 30	42,39	14,81	309,30	75,69	167,57	390,69	5,36

Tabla 52

N ° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 31	25,43	16,39	267,09	75,14	201,08	403,50	11,21
Célula 32	23,74	12,69	306,53	44,10	162,78	413,76	11,70
Célula 33	38,15	20,62	311,38	68,61	193,90	450,67	15,11
Célula 34	39,84	21,15	309,99	66,97	208,26	371,71	6,82
Célula 35	40,69	15,86	280,93	65,88	167,57	333,26	17,06
Célula 36	76,12	29,61	237,34	68,61	192,30	410,17	19,49
Célula 37	47,47	22,21	316,22	60,44	188,31	402,48	14,62
Célula 38	42,39	25,38	287,16	58,26	248,16	490,15	22,90
Célula 39	46,62	15,34	305,84	57,17	195,49	427,60	12,67
Célula 40	32,21	20,62	298,92	72,96	181,13	456,82	11,21
Célula 41	69,51	18,51	296,85	88,21	142,83	294,30	29,73
Célula 42	33,06	17,98	354,28	70,24	174,75	379,41	11,70
Célula 43	57,64	14,81	298,23	53,91	190,71	412,22	0,00
Célula 44	37,30	18,51	286,47	74,05	173,95	390,17	28,26
Célula 45	29,67	10,58	305,84	95,29	252,94	340,44	0,00
Célula 46	60,19	26,44	297,54	54,99	158,79	397,86	17,06
Célula 47	51,71	16,92	312,76	76,23	181,93	507,58	17,54
Célula 48	61,88	26,44	325,22	68,61	137,24	406,58	20,95
Célula 49	45,78	15,34	266,40	90,39	209,86	360,95	21,44
Célula 50	31,37	14,81	292,69	74,60	154,00	416,32	19,98
Célula 51	33,06	17,98	303,77	78,95	177,14	389,66	15,11
Célula 52	44,93	13,75	256,71	57,72	185,12	374,79	9,75
Célula 53	51,71	23,27	295,46	80,04	185,12	436,83	9,26
Célula 54	52,56	18,51	301,69	69,15	168,36	380,94	6,34
Célula 55	44,93	20,09	256,02	78,95	188,31	330,19	20,95

Tabla 53

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Media	45,67	19,78	305,79	63,13	177,84	411,83	14,00
Error Est.	2,49	0,95	6,11	1,94	3,90	8,11	1,20

Tabla 54

5mM

N ° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 56	44,08	12,16	316,91	76,77	141,23	413,76	4,87
Célula 57	33,06	19,04	314,84	51,18	162,78	366,07	19,98
Célula 58	46,62	25,91	297,54	32,67	145,22	367,10	16,57
Célula 59	42,39	26,97	354,28	39,20	155,60	404,53	17,54
Célula 60	41,54	19,04	314,84	48,46	154,80	277,38	10,23
Célula 61	88,16	32,79	288,54	47,92	205,87	273,27	0,00
Célula 62	52,56	31,73	295,46	40,84	161,18	385,05	13,16
Célula 63	55,95	17,98	235,95	37,57	157,19	288,66	6,82
Célula 64	52,56	11,11	253,95	50,64	92,56	149,71	7,80
Célula 65	105,96	25,38	296,15	60,44	76,60	170,22	15,11
Célula 66	85,62	20,62	248,41	41,93	110,11	317,88	9,26
Célula 67	69,51	14,28	251,87	46,83	306,41	496,30	6,82
Célula 68	96,64	31,20	311,38	52,27	177,14	403,50	8,77
Célula 69	47,47	25,38	270,55	37,57	120,49	301,99	7,80
Célula 70	36,45	12,69	220,73	51,73	147,62	281,99	10,72
Célula 71	46,62	29,08	317,61	34,30	155,60	402,48	13,64
Célula 72	44,93	21,68	293,39	50,64	110,91	186,63	30,70
Célula 73	15,26	15,34	259,48	21,24	70,22	143,05	0,00
Célula 74	35,60	19,57	297,54	41,93	169,16	434,78	35,09
Célula 75	44,08	18,51	285,78	39,75	169,96	376,33	10,23
Célula 76	295,85	7,93	306,53	29,40	256,93	40,50	0,00
Célula 77	72,90	21,68	302,38	68,06	150,01	258,92	12,18
Célula 78	38,99	15,86	274,70	46,28	86,18	117,41	11,21
Célula 79	89,86	19,04	317,61	20,69	134,05	322,49	19,01
Célula 80	68,66	7,93	217,96	29,40	113,31	116,90	27,78
Célula 81	73,75	22,74	221,42	484,61	83,78	124,59	7,80
Célula 82	45,78	22,74	268,48	31,58	71,02	190,22	16,57
Célula 83	16,11	3,17	288,54	57,17	106,12	376,33	40,45
Célula 84	25,43	21,15	287,85	22,32	140,44	311,21	2,92
Célula 85	41,54	22,21	262,25	65,34	153,20	346,08	17,06

Tabla 55

N° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 86	63,58	22,21	301,69	46,83	205,87	335,31	21,93
Célula 87	48,32	15,86	282,32	57,17	137,24	335,31	6,82
Célula 88	33,91	15,34	309,30	53,36	170,76	433,75	13,64
Célula 89	44,93	26,44	314,15	51,73	154,00	388,12	15,11
Célula 90	31,37	15,34	324,52	58,26	138,84	318,91	11,70
Célula 91	22,89	20,62	305,84	46,28	167,57	445,03	36,06
Célula 92	27,13	11,63	217,96	39,75	142,03	286,60	12,18
Célula 93	22,04	12,16	208,97	26,68	114,10	258,92	12,67
Célula 94	29,67	13,22	251,87	29,95	124,48	306,60	12,67
Célula 95	33,91	19,57	270,55	15,25	93,36	315,83	3,41
Célula 96	70,36	19,04	235,95	16,88	144,43	351,72	18,52
Célula 97	18,65	26,44	241,49	24,50	95,75	291,22	8,28
Célula 98	24,58	17,45	259,48	29,40	89,37	257,38	8,77
Célula 99	25,43	15,34	297,54	27,77	73,41	207,13	9,75
Célula 100	20,35	12,16	276,09	35,39	114,10	261,48	7,31
Célula 101	33,91	19,04	280,93	43,56	82,19	215,85	8,28
Célula 102	30,52	19,04	291,31	47,92	134,05	347,10	12,67
Célula 103	17,80	17,98	285,08	52,82	129,26	333,77	18,03
Célula 104	28,82	17,45	266,40	39,20	117,30	286,09	7,31
Célula 105	54,25	16,92	224,88	47,37	154,00	278,91	10,23
Célula 106	21,19	10,05	245,64	43,56	128,47	287,12	7,80
Célula 107	98,33	25,91	305,84	70,24	257,73	353,26	9,75
Célula 108	38,15	25,38	305,15	45,74	187,51	321,98	14,62
Célula 109	26,28	24,33	325,91	72,42	234,59	405,04	14,62
Célula 110	25,43	21,15	318,99	56,08	184,32	378,89	6,34

Tabla 56

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Media	49,92	19,18	280,38	51,58	142,92	302,67	12,88
Error Est	5,50	0,84	4,52	8,24	6,54	12,81	1,14

Tabla 57

10 mM

N° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 111	66,97	18,51	33,21	55,54	198,68	231,23	23,88
Célula 112	39,84	18,51	306,53	28,86	114,10	430,16	12,18
Célula 113	46,62	4,23	31,83	102,91	185,92	96,90	16,08
Célula 114	63,58	16,92	55,36	100,19	51,87	0,00	29,24
Célula 115	70,36	5,82	18,68	31,58	14,36	0,00	45,81
Célula 116	155,13	15,86	83,73	100,73	154,80	0,00	8,28
Célula 117	14,41	0,00	22,83	32,13	27,93	15,38	33,14
Célula 118	0,00	0,00	0,00	29,40	15,96	0,00	0,00
Célula 119	22,04	9,52	230,42	24,50	33,51	0,00	35,09
Célula 120	41,54	0,00	17,30	32,67	111,71	20,00	31,19
Célula 121	115,29	4,76	24,22	130,68	212,25	193,29	31,19
Célula 122	64,43	21,15	260,17	44,10	59,84	41,02	21,44
Célula 123	28,82	12,69	33,91	28,86	34,31	18,97	24,37
Célula 124	72,90	17,45	259,48	86,58	53,46	82,55	15,59
Célula 125	122,07	17,98	297,54	90,93	95,75	217,39	0,00
Célula 126	29,67	31,73	300,31	44,65	146,82	451,18	21,44
Célula 127	26,28	15,86	314,84	51,73	119,69	326,60	0,00
Célula 128	66,97	23,27	372,27	34,30	115,70	328,65	9,26
Célula 129	72,06	10,05	165,38	67,52	99,74	163,04	8,28
Célula 130	142,42	12,16	26,29	127,41	233,79	143,56	41,91
Célula 131	28,82	11,11	238,72	25,59	37,50	8,20	39,96
Célula 132	16,95	20,09	301,69	59,35	114,90	291,22	3,41
Célula 133	8,48	8,46	33,21	118,70	23,94	0,00	21,93
Célula 134	30,52	21,15	282,32	72,96	102,93	370,18	14,62
Célula 135	68,66	23,27	285,78	50,09	46,28	107,67	19,49
Célula 136	33,06	23,27	264,32	40,84	142,83	435,80	13,16
Célula 137	193,28	23,80	336,29	23,96	81,39	45,12	33,14
Célula 138	34,76	12,16	200,67	29,95	77,40	8,20	46,29
Célula 139	108,51	30,14	337,67	45,74	97,35	105,62	13,64
Célula 140	73,75	7,40	228,34	64,80	49,47	58,96	19,49

Tabla 58

N° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 141	133,94	15,34	244,95	50,64	62,24	13,84	7,80
Célula 142	59,34	8,46	179,22	45,74	44,68	77,42	23,39
Célula 143	27,13	10,05	305,84	74,60	43,09	0,00	10,23
Célula 144	339,93	3,70	217,27	18,51	424,50	45,12	10,23
Célula 145	80,53	13,75	262,25	40,84	51,87	12,31	22,90
Célula 146	233,97	5,82	171,60	29,95	262,52	24,61	14,62
Célula 147	222,10	7,93	231,80	38,66	283,27	30,76	7,31
Célula 148	89,86	14,28	280,93	20,15	86,97	6,15	40,45
Célula 149	89,86	5,82	193,75	28,31	57,45	15,89	19,49
Célula 150	51,71	6,35	249,10	27,23	53,46	18,46	23,88
Célula 151	16,95	4,23	29,75	29,95	31,92	15,89	13,64
Célula 152	85,62	6,87	242,18	27,23	59,05	112,28	4,87
Célula 153	59,34	9,52	269,17	20,69	49,47	68,19	19,98
Célula 154	68,66	14,28	223,50	26,14	56,65	80,50	13,64
Célula 155	111,05	21,15	220,73	28,31	46,28	95,88	6,34
Célula 156	33,91	15,86	245,64	27,23	118,09	308,14	14,13
Célula 157	27,97	16,92	297,54	40,84	86,18	227,64	8,77
Célula 158	39,84	13,22	17,30	66,43	19,15	0,00	44,83
Célula 159	43,23	28,03	304,46	37,57	33,51	0,00	31,19
Célula 160	8,48	37,55	18,68	55,54	124,48	29,74	36,06
Célula 161	27,97	13,75	65,04	69,70	32,72	0,00	51,17
Célula 162	260,25	5,29	20,07	45,74	329,55	284,04	42,40
Célula 163	62,73	2,12	39,44	62,07	120,49	47,17	26,80
Célula 164	20,35	13,22	311,38	25,59	29,52	0,00	36,55
Célula 165	31,37	25,91	247,03	35,39	12,77	0,00	23,39

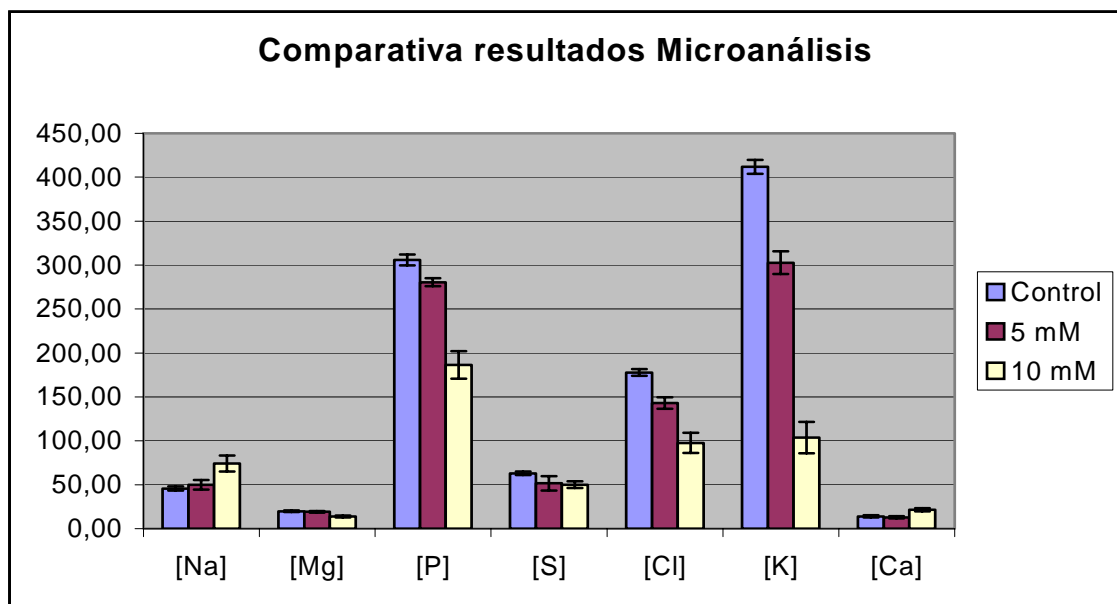
Tabla 59

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Media	74,26	13,76	186,40	50,00	97,71	103,73	21,59
Error Est.	9,15	1,14	15,69	3,83	11,33	17,70	1,79

Tabla 60

		[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Control	Media	45,67	19,78	305,79	63,13	177,84	411,83	14,00
	Error Est.	2,49	0,95	6,11	1,94	3,90	8,11	1,20
5 mM	Media	49,92	19,18	280,38	51,58	142,92	302,67	12,88
	Error Est.	5,50	0,84	4,52	8,24	6,54	12,81	1,14
10 mM	Media	74,26	13,76	186,40	50,00	97,71	103,73	21,59
	Error Est.	9,15	1,14	15,69	3,83	11,33	17,70	1,79

Tabla 61



Gráfica 16

3.5 RESULTADOS ESTADÍSTICOS

3.5.1 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL HEMA MEDIANTE DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE CELULARIDAD

- a) En relación con la determinación del nivel de Celularidad, el estudio comparado y sucesivo de los distintos tiempos y concentraciones se especifica en las tablas de la 62 a la 65.

1 hora Vs 6 horas								
	HE cT	HE cM	HE c5	HE c10	HE c20	HE c30	HE c40	HE c50
U de Mann - Whitney	70,500	61,000	57,000	59,000	62,000	47,500	17,000	36,000
W de Wilcoxon	148,500	139,000	135,000	137,000	140,000	125,500	95,000	114,000
Z	-0,087	-0,635	-0,866	-0,751	-0,577	-1,415	-3,175	-2,079
Sig. Asintót. (bilateral)	0,931	0,525	0,386	0,453	0,564	0,157	0,001	0,038
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,932	0,551	0,410	0,478	0,590	0,160	0,100	0,390

Tabla 62

6 hora Vs 12 horas								
	HE cT	HE cM	HE c5	HE c10	HE c20	HE c30	HE c40	HE c50
U de Mann - Whitney	46,000	67,000	62,000	69,000	63,500	62,500	61,000	66,500
W de Wilcoxon	124,000	145,000	140,000	147,000	141,500	140,500	139,000	144,500
Z	-1,502	-0,289	-0,577	-0,173	-0,491	-0,549	-0,635	-0,318
Sig. Asintót. (bilateral)	0,133	0,773	0,564	0,862	0,624	0,583	0,525	0,751
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,143	0,799	0,590	0,887	0,630	0,590	0,551	0,755

Tabla 63

12 hora Vs 24 horas								
	HE cT	HE cM	HE c5	HE c10	HE c20	HE c30	HE c40	HE c50
U de Mann - Whitney	9,000	64,000	61,000	62,000	50,000	48,500	63,500	63,500
W de Wilcoxon	87,000	142,000	139,000	140,000	128,000	126,500	141,500	141,500
Z	-3,639	-0,462	-0,635	-0,577	-1,271	-1,358	-0,491	-0,491
Sig. Asintót. (bilateral)	0,000	0,644	0,525	0,564	0,204	0,174	0,623	0,623
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,000	0,671	0,551	0,590	0,219	0,178	0,630	0,630

Tabla 64

24 horas Vs 48 horas								
	HE cT	HE cM	HE c5	HE c10	HE c20	HE c30	HE c40	HE c50
U de Mann - Whitney	70,500	56,000	59,000	45,500	66,000	63,500	62,000	69,500
W de Wilcoxon	148,500	134,000	137,000	123,500	144,000	141,500	140,000	147,500
Z	-0,087	-0,924	-0,751	-1,530	-0,347	-0,491	-0,578	-0,144
Sig. Asintót. (bilateral)	0,931	0,356	0,453	0,126	0,729	0,623	0,563	0,855
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,932	0,378	0,478	0,128	0,755	0,630	0,590	0,887

Tabla 65

b) El resultado de la comparación de las concentraciones de HEMA en relación con los niveles de celularidad se expresa en las tablas 66 y 67.

Concentración		N	Rango promedio
Celularidad	1	15	102,20
	2	15	14,07
	3	15	22,13
	4	15	36,73
	5	15	53,00
	6	15	68,13
	7	15	88,27
	8	15	99,47
Total		120	

Tabla 66

	Celularidad
Chi - cuadrado	159,312
gl	7
Sig. Asintót.	0,000

Tabla 67

3.5.2 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL HEMA MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE LDH

- a) En relación con la determinación de LDH, el estudio comparado y sucesivo de los distintos tiempos y concentraciones se especifica en las tablas 68 a 71.

1 hora Vs 6 horas								
	LDH cT	LDH cM	LDH c5	LDH c10	LDH c20	LDH c30	LDH c40	LDH c50
U de Mann - Whitney	16,000	27,000	24,000	27,000	36,000	9,000	0,000	0,000
W de Wilcoxon	61,000	72,000	69,000	72,000	81,000	54,000	45,000	45,000
Z	-2,163	-1,193	-1,458	-1,192	-0,397	-2,783	-3,576	-3,580
Sig. Asintót. (bilateral)	0,031	0,233	0,145	0,233	0,691	0,005	0,000	0,000
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,310	0,258	0,161	0,258	0,730	0,004	0,000	0,000

Tabla 68

6 hora Vs 12 horas								
	LDH cT	LDH cM	LDH c5	LDH c10	LDH c20	LDH c30	LDH c40	LDH c50
U de Mann - Whitney	39,000	27,000	28,500	38,000	27,000	0,000	36,000	34,000
W de Wilcoxon	84,000	72,000	73,500	83,000	72,000	45,000	81,000	79,000
Z	0,132	-1,194	-1,060	-0,221	-1,192	-3,580	-0,397	-0,574
Sig. Asintót. (bilateral)	0,895	0,233	0,289	0,825	0,233	0,000	0,691	0,566
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,931	0,258	0,297	0,863	0,258	0,000	0,730	0,605

Tabla 69

12 hora Vs 24 horas								
	LDH cT	LDH cM	LDH c5	LDH c10	LDH c20	LDH c30	LDH c40	LDH c50
U de Mann - Whitney	21,000	18,000	18,000	18,000	9,000	27,000	28,500	0,000
W de Wilcoxon	66,000	63,000	63,000	63,000	54,000	72,000	73,500	45,000
Z	-1,722	-1,990	-1,988	-1,987	-2,782	-1,193	-1,060	-3,576
Sig. Asintót. (bilateral)	0,085	0,047	0,047	0,047	0,005	0,233	0,289	0,000
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,094	0,050	0,050	0,050	0,004	0,050	0,050	0,050

Tabla 70

24 horas Vs 48 horas								
	LDH cT	LDH cM	LDH c5	LDH c10	LDH c20	LDH c30	LDH c40	LDH c50
U de Mann - Whitney	31,500	28,000	0,000	9,000	36,000	9,000	18,000	0,000
W de Wilcoxon	76,500	73,000	45,000	54,000	81,000	54,000	63,000	45,000
Z	-0,796	-1,105	-3,578	-2,782	-0,397	-2,782	-1,988	-3,578
Sig. Asintót. (bilateral)	0,426	0,269	0,000	0,005	0,691	0,005	0,047	0,000
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,436	0,297	0,000	0,004	0,730	0,004	0,050	0,000

Tabla 71

b) El resultado de la comparación de las concentraciones de HEMA en relación con la liberación de LDH se expresa en las tablas 72 y 73.

Concentración	N	Rango promedio
LDH 1	45	303,61
2	45	70,57
3	45	103,66
4	45	102,54
5	45	193,42
6	45	224,60
7	45	230,60
8	45	215,00
Total	360	

Tabla 72

	LDH
Chi - cuadrado	187,131
gl	7,000
Sig. Asintót.	0,000

Tabla 73

3.5.3 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL HEMA MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE ADN

a) En relación con la determinación de ADN, el estudio comparado y sucesivo de los distintos tiempos y concentraciones se especifica en las tablas de la 74 a la 77.

1 hora Vs 6 horas								
	ADN cT	ADN cM	ADN c5	ADN c10	ADN c20	ADN c30	ADN c40	ADN c50
U de Mann - Whitney	3,000	3,000	4,000	4,000	3,000	4,000	2,000	0,000
W de Wilcoxon	9,000	9,000	10,000	10,000	9,000	10,000	8,000	6,000
Z	-0,655	-0,655	-0,218	-0,218	-0,655	-0,218	-1,091	-1,964
Sig. Asintót. (bilateral)	0,513	0,513	0,827	0,827	0,513	0,827	0,275	0,500
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	0,700	0,700	0,100	0,100	0,700	0,100	0,400	0,100

Tabla 74

6 hora Vs 12 horas								
	ADN cT	ADN cM	ADN c5	ADN c10	ADN c20	ADN c30	ADN c40	ADN c50
U de Mann - Whitney	4,000	4,000	4,000	1,000	4,000	4,000	3,000	2,000
W de Wilcoxon	10,000	10,000	10,000	7,000	10,000	10,000	9,000	8,000
Z	-0,218	-0,218	-0,218	-1,528	-0,218	-0,218	-0,655	-1,091
Sig. Asintót. (bilateral)	0,827	0,827	0,827	0,127	0,827	0,827	0,513	0,275
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	1,000	1,000	1,000	0,200	1,000	1,000	0,700	0,400

Tabla 75

12 hora Vs 24 horas								
	ADN cT	ADN cM	ADN c5	ADN c10	ADN c20	ADN c30	ADN c40	ADN c50
U de Mann - Whitney	4,000	4,000	0,000	3,000	3,000	1,000	3,000	0,000
W de Wilcoxon	10,000	10,000	6,000	9,000	9,000	7,000	9,000	6,000
Z	-0,218	-0,218	-1,964	-0,655	-0,655	-1,528	-0,655	-1,964
Sig. Asintót. (bilateral)	0,827	0,827	0,500	0,513	0,513	0,127	0,513	0,050
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	1,000	1,000	0,100	0,700	0,700	0,200	0,700	0,100

Tabla 76

24 horas Vs 48 horas								
	ADN cT	ADN cM	ADN c5	ADN c10	ADN c20	ADN c30	ADN c40	ADN c50
U de Mann - Whitney	4,000	1,000	4,000	4,000	4,000	4,000	2,000	3,000
W de Wilcoxon	10,000	7,000	10,000	10,000	10,000	10,000	8,000	9,000
Z	-0,218	-1,528	-0,218	-0,218	-0,218	-0,218	-1,091	-0,655
Sig. Asintót. (bilateral)	0,827	0,127	0,827	0,827	0,827	0,827	0,275	0,513
Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	1,000	0,200	1,000	1,000	1,000	1,000	0,400	0,700

Tabla 77

b) El resultado de la comparación de las concentraciones de HEMA en relación con la liberación de ADN se expresa en las tablas 78 y 79.

Concentración	N	Rango promedio
ADN 1	15	102,20
2	15	14,07
3	15	22,13
4	15	36,73
5	15	53,00
6	15	68,13
7	15	88,27
8	15	99,47
Total	120	

Tabla 78

	ADN
Chi - cuadrado	187,131
gl	7,000
Sig. Asintót.	0,000

Tabla 79

3.5.4 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL HEMA MEDIANTE MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

En relación con la determinación de los elementos químicos obtenidos por Energía dispersiva de rayos X, el estudio comparado y sucesivo en relación con los diferentes tiempos y concentraciones queda reflejado en las tablas de la 80 a la 82.

Control Vs 5 mM							
	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
U de Mann - Whitney	1425,500	1480,000	1040,500	535,000	680,000	468,500	1285,000
W de Wilcoxon	2965,500	3020,000	2580,500	2075,000	2220,000	2220,000	2825,000
Z	-0,520	-0,194	-2,822	-5,844	-4,977	-4,977	-1,361
Sig. Asintót. (bilateral)	0,603	0,846	0,005	0,000	0,000	0,000	0,173

Tabla 80

Control Vs 10 mM							
	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
U de Mann - Whitney	1229,000	850,000	512,000	819,500	444,500	142,000	1036,500
W de Wilcoxon	2769,000	2390,000	2052,000	2359,500	1984,500	1682,000	2576,500
Z	-1,695	-3,963	-5,981	-4,143	-6,385	-8,198	-2,848
Sig. Asintót. (bilateral)	0,090	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004

Tabla 81

5 mM Vs 10 mM							
	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
U de Mann - Whitney	1219,000	881,500	764,500	1476,000	716,500	398,500	889,500
W de Wilcoxon	2759,000	2421,500	2304,500	3016,000	2256,500	1938,500	2429,500
Z	-1,755	-3,774	-4,472	-0,218	-4,759	-6,664	-3,726
Sig. Asintót. (bilateral)	0,079	0,000	0,000	0,827	0,000	0,000	0,000

Tabla 82

4. DISCUSIÓN

La utilización de los Adhesivos Dentales y especialmente el HEMA está muy generalizada en la práctica odontológica (Bouillaguet et al, 1996) (Ratanasathien et al, 1995) (Bouillaguet et al, 2000) (Caughman et al, 2000) (Erickson, 1992). Recientemente distintos autores han postulado la utilización del HEMA como biomaterial en Ingeniería Tisular y más concretamente en relación con la elaboración de córneas artificiales (Campos, 2006) (Lee et al, 1996) (Wichterle y Lim, 1960). El hidrogel de 2 – Hidroxietil Metacrilato, es en efecto un material que parece ser muy biocompatible con los tejidos y, de ahí, su potencial aplicación a la Ingeniería Tisular.

Sin embargo las experiencias existentes en Odontología y los estudios experimentales realizados con HEMA ponen de relieve que dicho producto genera efectos citotóxicos de distinta naturaleza (Bouillaguet et al, 2000) (Campos, 2006) (Souza et al, 1999).

Al objeto de evaluar dicha acción citotóxica y conocer el mecanismo de acción de los adhesivos dentales y concretamente el mecanismo de toxicidad del HEMA sobre las células del tejido pulpar se han ido desarrollando distintos modelos in vitro que han venido a sustituir, siguiendo las recomendaciones de la Unión Europea, a los primitivos modelos de investigación citotóxica sustentados en la experimentación animal. A este respecto, Freshney (1994) ha establecido además con suma claridad las ventajas y los inconvenientes, con balance a favor de las primeras, del uso de los modelos in vitro para llevar a cabo la evaluación de los ensayos de toxicidad celular. En este sentido, como ha indicado Rodríguez (2005), las células que habitualmente se utilizan en cultivos para los ensayos “in vitro” son de origen embrionario o adulto y se emplean en cultivos primarios recién obtenidos o tras su transformación en líneas celulares continuas. Las células embrionarias y las de origen tumoral se adaptan con más facilidad al desarrollo en cultivo que las células derivadas de tejidos adultos normales.

En general, las células pueden ser mantenidas en forma de suspensión en un medio nutritivo adecuado, o adheridas a un soporte sólido formando una monocapa celular más o menos confluyente. Se denominan líneas celulares primarias a las obtenidas mediante subcultivos procedentes de un cultivo primario. En este caso, son células normales, inicialmente diferenciadas, pero que sufren un proceso de senescencia en cultivo que altera sus características morfológicas y que limita su vida.

En el caso de las líneas continuas, las células se hacen inmortales mediante un proceso de transformación que puede ocurrir de forma espontánea o ser inducido experimentalmente por virus, agentes químicos carcinogénicos o por radiaciones y su uso constituye el modelo experimental más utilizado para evaluar la citotoxicidad a xenobióticos (Zucco, 1992). Las líneas celulares que se han utilizado en estudios experimentales de citotoxicidad de sistemas adhesivos dentales han sido de distinta naturaleza y origen, destacando entre ellos los fibroblastos de ratón 3T3 (Ratanasathien et al, 1995) y L929 (Kaga et al, 2001), las células odontoblastoides MDPC-23 (Costa et al, 1999), los monocitos-macrófagos humano THP-1 (Bouillaguet et al, 2000), las células neuronales (Kraemer et al, 1999) las células pulmonares A549 y L2 (Kehe et al, 2001), las células epiteliales de ratón (RK13) (Schuster et al, 2000), las células de pulpa humana (Spagnuolo et al, 2004a) y los fibroblastos humanos (Spagnuolo et al 2004b) .

En la presente Tesis Doctoral y con el objeto de evaluar la citotoxicidad del HEMA hemos utilizado como modelo experimental los fibroblastos gingivales humanos extraídos mediante biopsia. A diferencia de otros ensayos de citotoxicidad sobre células en suspensión como las células U 937 (Blottiere et al, 1995) (Cimpan et al, 2000) (Rodríguez, 2006), utilizadas en nuestro grupo de investigación, el presente trabajo ha sido realizado sobre células fibroblásticas adherentes en cultivo, modelo que como ha demostrado Issa (2004) permite realizar determinaciones morfológicas y

bioquímicas con un importante grado de fiabilidad. Por otra parte, otras dos razones justifican el uso de los fibroblastos gingivales humanos. Por un lado la singularidad de dichas células, caracterizadas por su alta sensibilidad en la respuesta a fármacos y otras sustancias (Ferraris y Campos, 2002) (Geurtsen et al, 1998) (Lekic et al, 1977) (Ratanasathien et al, 1995) y, por otro lado, por la posibilidad de comparar los ensayos bioquímicos de citotoxicidad efectuados en dicho modelo (Issa et al, 2004) con los datos microanalíticos que resultan de aplicar la metodología microscópica microanalítica cuantitativa desarrollada en nuestro grupo de investigación (Arrebola et al, 2005; 2006) (Fernández et al, 1997b;1999a; 1999b).

En nuestra Tesis Doctoral, al objeto de evaluar la citotoxicidad del HEMA en fibroblastos gingivales humanos hemos desarrollado un protocolo que consiste en determinar cuatro tipos de indicadores. En primer lugar el nivel de celularidad en el cultivo tras la aplicación de distintas concentraciones de HEMA en distintos períodos de tiempo con el objeto de visualizar, utilizando una coloración nuclear como la Hematoxilina, que permite identificar la morfología de los núcleos celulares, el porcentaje de células que permanece en el cultivo. Dicho ensayo evaluado mediante colorimetría nos ha permitido comprobar que existe un nivel de mortalidad celular, esto es, de reducción en el número de células identificables morfológicamente en el cultivo, que se corresponde significativamente con el previo aumento de las concentraciones de HEMA administradas en el ensayo y que como hemos relatado en el capítulo de Material y Métodos van desde 5 hasta 50 mM.

Cuando evaluamos los efectos de una determinada concentración de HEMA sobre el nivel de celularidad a lo largo del tiempo los resultados no son estadísticamente significativos, lo que parece indicar que la citotoxicidad del HEMA, en lo que a cuantificación de la celularidad se refiere, es independiente del tiempo transcurrido desde su exposición.

El segundo indicador utilizado para evaluar la citotoxicidad el HEMA en fibroblastos gingivales humanos ha sido la liberación de LDH en el medio de cultivo.

Este modelo de ensayo ha sido asimismo utilizado en relación con el HEMA por Issa (2004). Sabemos en este sentido que la Lactato Deshidrogenasa es una enzima citoplásmica estable que se almacena en células viables. Un aumento en los niveles de LDH en el medio de cultivo indica que la estabilidad de las membranas se ha visto dañada posiblemente por alteraciones oxidativas (Thomas et al, 1993) (Yildiz et al, 1999). Es importante señalar que, como ha demostrado Marc (1991), para un determinado tipo celular en unas determinadas condiciones de cultivo, los niveles de LDH son constantes. Nuestros resultados ponen de relieve que existe liberación progresiva de LDH vinculada significativamente al incremento en las concentraciones de HEMA utilizadas en el ensayo. Cuando evaluamos los efectos de una determinada concentración de HEMA sobre la liberación de LDH nuestros resultados ponen de relieve que a las 6 horas existen ya niveles de LDH con valores estadísticamente significativos en relación con los niveles existentes una hora después de la administración de HEMA, y que estos niveles estadísticamente significativos se originan cuando las concentraciones de HEMA se sitúan entre 30 y 50 mM.

Las concentraciones de HEMA inferiores a 30 mM no generan cambios significativos en los niveles de LDH en las 6 primeras horas tras la administración de HEMA. Cuando comparamos lo que ocurre en el intervalo que va entre 6 y 12 horas, 12 y 24 horas y 24 y 48 horas, nuestros resultados demuestran que los niveles de LDH son significativos a las 12 horas para concentraciones de HEMA de 30 mM, a las 24 horas para concentraciones de HEMA de 20 mM y a las 48 horas para concentraciones de HEMA inferiores de 10 y 5 mM. Estos resultados reflejan que la LDH es, en general, un buen indicador de toxicidad celular que permite seguir la evolución temporal del proceso.

Como demuestran nuestros resultados, las concentraciones de HEMA más altas actúan de forma inmediata alterando las estructuras membranosas en un corto período de tiempo. La concentración de 30 mM parece ser crítica dado que desarrolla su efecto citotóxico y por tanto la liberación de LDH entre el período de 6 y 12 horas. Los efectos que generan concentraciones de HEMA más bajas van alterando las células de forma progresiva, comprobando en nuestros resultados que la concentración más baja de 5 y 10 mM sólo lesionan significativamente células transcurridas 48 horas. La existencia en nuestros resultados de valores significativos en los niveles de LDH tras la administración de concentraciones elevadas de HEMA entre las 24 y 48 horas hay que interpretarlas teniendo en cuenta que la significación es a la baja, esto es, que los niveles de LDH son más bajos a las 48 horas cuando se administran dichas concentraciones elevadas, lo que significa que la mayor parte de las células están muertas y que por tanto no es posible incrementar los niveles de la enzima.

Aunque algunos autores señalan que las resinas y otros sistemas adhesivos desarrollan sus efectos citotóxicos fundamentalmente durante las primeras 24 horas (Ferracane y Condon, 1990) (Ratanasathien et al, 1995), nuestros resultados ponen de manifiesto que es la concentración de HEMA la que determina el efecto citotóxico a través del tiempo y que sólo una concentración de HEMA de 30 mM ofrece una relación variable con el factor tiempo al producir su efecto citotóxico en un intervalo de amplio rango que va entre las 6 y las 12 horas.

El tercer indicador utilizado para evaluar la citotoxicidad del HEMA en fibroblastos gingivales humanos ha sido la liberación de ADN al medio. Resulta evidente que la liberación de ADN es un indicador que exige la destrucción de la envoltura nuclear y por tanto la alteración no sólo del citoplasma sino del núcleo celular.

Nuestros resultados ponen de relieve que existe una liberación progresiva vinculada significativamente al incremento de las concentraciones de HEMA utilizadas en el ensayo. Cuando, al igual que en los casos anteriores, evaluamos los efectos de una determinada concentración de HEMA sobre la liberación de ADN a lo largo del tiempo, comprobamos que los niveles de ADN en el medio no varían de modo significativo. Ello indica que para una determinada concentración de HEMA el tiempo no constituye un factor esencial para incrementar el nivel de citotoxicidad nuclear.

El cuarto y último indicador utilizado para evaluar la toxicidad del HEMA en fibroblastos gingivales humanos ha sido la determinación del patrón iónico intracelular mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X.

La técnica utilizada es una técnica que permite el análisis cualitativo y cuantitativo del perfil iónico de una muestra biológica de forma simultánea a su observación. Sin embargo, como afirma Rodríguez (2005), el microanálisis por rayos X proporciona datos físicos a partir de especímenes criohidratados y/o criodesecados, los cuales deben ser transformados en datos cuantitativos para su utilidad en biomedicina (Warley et al., 1993). Todo esto condiciona la elección de un método adecuado de preparación de los especímenes biológicos. Dicha elección dependerá, además, de la instrumentación utilizada, del tipo de espécimen, de los elementos de interés y del propósito del experimento. En nuestro grupo de investigación, se ha desarrollado en los últimos años un procedimiento técnico para analizar células completas en cultivo, de crecimiento en monocapa y en suspensión, para microanálisis por energía

dispersiva de rayos X mediante microscopía electrónica de barrido, con el objetivo de examinar el papel de los diferentes elementos (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca) en distintas condiciones experimentales (Fernández-Segura et al, 1997a; 1997b; 1999). Este procedimiento consta básicamente de tres fases: 1) adaptación de las células sobre un sustrato sólido compatible con el crecimiento celular, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X y la microscopía electrónica de barrido, 2) eliminación del medio extracelular que puede interferir con el espectro de rayos X procedente de la célula y 3) criopreparación de los especímenes.

Una de las fases más críticas en la preparación de células en cultivo es la adaptación y crecimiento de las mismas sobre un sustrato sólido compatible con el microanálisis por energía dispersiva de rayos X. A este respecto, el sustrato no debe contener elementos que puedan contribuir al espectro de rayos X y no debe interferir con el análisis celular. Asimismo, el soporte debe ser inerte para la vitalidad celular (Abraham et al, 1985) (Warley et al, 1994a). La principal ventaja de adaptar y/o cultivar las células directamente sobre el soporte radica en la posibilidad de analizar las células tras diferentes condiciones experimentales, sin la intervención de procedimientos intermedios (tratamientos enzimáticos), que pueden ocasionar daños en la membrana celular causando alteraciones en la permeabilidad celular y originando cambios en la composición elemental (Warley et al, 1994a) . Los sustratos utilizados, hasta el momento presente, han sido muy diversos – cubreobjetos de vidrio y plástico, discos de grafito y rejillas (Au, Ti) de microscopía electrónica recubiertas con películas plásticas (fomvar, pioloform) -, siendo, en ocasiones, necesario recubrir la superficie del sustrato con películas de poli-L-lisina o componentes de la matriz extracelular como el colágeno (von Euler et al, 1993) y la lámina (Warley et al, 1994b) para favorecer la adhesión celular.

Nuestro grupo propone la utilización de las unidades Millicell® para cultivo celular sobre membrana, las cuales constituyen una herramienta de gran utilidad, tanto para el estudio de líneas celulares de crecimiento en monocapa (MCF-7, LLC-PK₁) y en suspensión (U937) (Fernández-Segura et al., 1997a; 1997b; 1999). Los resultados demuestran que estas unidades proporcionan estabilidad al contenido elemental y no interfieren con los elementos del espectro de rayos X procedentes de la célula. Además, estas unidades, insertables en pocillo de placa de cultivo, permiten un acceso a ambos dominios, (apical y basolateral) de la monocapa celular, posibilitando el establecimiento de modelos toxicológicos y farmacológicos "in vitro".

Uno de los principales problemas al utilizar células en cultivo completas, no seccionadas, lo constituye el medio de cultivo, el cual debe ser eliminado para no interferir con el microanálisis de las células. Esta eliminación debe realizarse previamente al proceso de criopreparación mediante el lavado de las células con soluciones lavadoras, las cuales deben eliminar de una forma efectiva el medio de cultivo, no deben interferir con el análisis y no deben alterar la permeabilidad de la membrana plasmática o causar alteración y redistribución de la composición iónica intracelular (Warley et al, 1997) (Zierold et al, 1988). Tres tipos, fundamentales, de soluciones han sido empleadas: 1) soluciones isotónicas volátiles como el acetato de amonio, 2) soluciones isotónicas no volátiles como la sacarosa y el manitol, y 3) el agua destilada. Desde el punto de vista fisiológico, las soluciones isotónicas deben ser las soluciones lavadoras más efectivas debido al escaso riesgo de efectos osmóticos. Paradójicamente, diferentes grupos de investigación han demostrado, a este respecto, que el agua destilada a 4°C constituye, desde el punto de vista morfológico y microanalítico, la solución lavadora mas efectiva (Fernandez-Segura et al, 1997a) (Roomans, 1991) (Warley et al, 1994b) solución ésta que fue, en consecuencia, utilizada en nuestra Tesis Doctoral.

Como hemos comentado anteriormente, la aplicación del microanálisis por energía dispersiva de rayos X al material biológico requiere la elección de métodos de preparación que eviten o reduzcan la pérdida y/o redistribución de los diferentes elementos y en especial de los elementos difusibles. A este respecto, los métodos convencionales de preparación de muestras biológicas para microscopía electrónica – y que tiene por base la utilización de fijadores químicos, la deshidratación, la inclusión en material plástico, la polimerización a temperaturas altas y el ultracorte – no constituyen un procedimiento adecuado para preservar la integridad del contenido de los elementos a analizar. Por el contrario, las técnicas de crio – preparación constituyen, en la actualidad, los métodos ideales para el estudio de la composición elemental, y muy especialmente de los elementos difusibles, de células y tejidos, mediante técnicas microanalíticas (Fernandez Segura, 1999) (Warley, 1997) (Warley y Skepper, 2000) (Zierold et al, 1988).

En nuestra tesis utilizamos este método ya que la señal de fondo es medida debajo del pico característico de cada elemento, en vez de elegir una región del espectro de rayos X libre de picos (4.2-6.2 keV). Por tanto, el fundamento del método de la razón P/B es que la concentración de un elemento en el área de análisis en la muestra es proporcional al número de cuentas netas de la señal característica de ese elemento dividido por el fondo existente debajo del pico. El interés del método P/B es que resulta independiente de las variaciones en la intensidad de corriente, así como de la absorción debida a las irregularidades de la superficie de la muestra siendo, por tanto, el método de elección para el análisis cuantitativo de la composición elemental de especímenes biológicos gruesos examinados en un microscopio electrónico de barrido.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X ha sido utilizado hasta el momento para evaluar alteraciones en el transporte iónico tanto en condiciones fisiológicas

como patológicas (Hongpaisan y Roomans 1999) (Roomans, 1999; 2002a; 2002b) (Roomans y Von Euler 1996) (Zhang y Roomans, 1997; 1998). Esta metodología ha comenzado también a utilizarse para evaluar más correctamente los procesos de muerte celular denominados por necrosis y por apoptosis a través de las alteraciones iónicas que acontecen en estos fenómenos. En este sentido, y en relación con la muerte celular por necrosis, diferentes autores han analizado las alteraciones en la composición iónica, fundamentalmente en relación con el ion Ca, en cultivos de células cardíacas neonatales de rata sometidas a diferentes condiciones experimentales como hipoxia química, inhibición de la bomba de Na⁺/K⁺ ATPasa dependiente y de la depleción de ATP intracelular (Akar et al, 2003) (Buja, 1985) (Morris et al, 1989) (Jones et al., 1989) (McLaughlin et al, 2004) (Salido et al, 2001; 2004) (Skepper, 1999) (Thandroyen, 1992). Fernandez Segura et al (1999) estudió el comportamiento iónico en la células apoptóticas y su alteración tras ser inducidas por la irradiación con luz ultravioleta. Estas células se caracterizan por mostrar un incremento en el contenido de Na y un descenso en el contenido de Cl y K. Asimismo Skepper et al (1999) describe resultados microanalíticos similares en un modelo de apoptosis en macrófagos. Recientemente estos hallazgos han sido confirmado en células prostáticas tratadas con etoposido (Salido et al, 2001; 2004) (Vilches et al, 2004).

Sin embargo, la mayoría de estos estudios no ofrecen una información detallada de las alteraciones iónicas desde una perspectiva temporal ni indican el posible papel que pueden desempeñar los diferentes iones en el desencadenamiento, control y progresión de la lesión celular, y muy especialmente el papel que pueden desempeñar los iones monovalentes en los distintos tipos de muerte celular.

En nuestro estudio y mediante la aplicación de la metodología que acabamos de describir, pudimos comprobar que a las 6 horas de la administración de concentraciones bajas de HEMA, 5 mM y 10 mM, se produce una profunda alteración del perfil iónico del fibroblasto gingival. Los datos ponen de relieve en ambos casos respecto del control y en ambos casos entre sí una disminución progresiva de Fósforo, Cloro y Potasio. La disminución de Cloro y Potasio se ha relacionado, como se indicó con anterioridad, con un proceso de muerte por apoptosis. En general dicho proceso cursa con un incremento del Sodio, circunstancia ésta que existe en nuestro material aunque sin significación estadística, posiblemente porque los efectos del HEMA no llegan a ser, a estas dosis y en el tiempo estudiados, lo suficientemente citotóxicos como para alterar los canales que condicionan el incremento de Sodio en el interior de la célula. A pesar de ello, el estudio del índice K/Na, que según Rooman (2001) constituye uno de los criterios más sensibles y fiables de viabilidad celular, puso de relieve en nuestro caso un descenso significativo de dicho indicador, lo que refuerza la idea de daño celular preapoptótico asociado al HEMA. Tales cambios preapoptóticos también se confirman con el dato de la disminución del Cloro, circunstancia ésta que no ocurre en el proceso de la necrosis.

Existen sin embargo datos contradictorios. Los valores de Magnesio, por ejemplo, se alteran significativamente cuando la dosis es de 10 mM, pero no cuando la dosis es de 5 mM. Estos datos son asimismo muy significativos, pues la disminución de dicho elemento se ha relacionado con el descenso en la concentración de ATP (Buja et al, 1993) (Di Francesco, 1998) (Rodríguez, 2005).

Cuando la dosis de HEMA administrada es de 5 mM la no disminución de Magnesio indica indirectamente que no existe una disminución de la reserva energética, lo cual hay que relacionarlo con el proceso de preapoptosis al que antes hacíamos referencia. Sin embargo, la disminución de Magnesio al incrementarse la dosis de HEMA implica

una disminución de la reserva energética, fenómeno que deber relacionarse, sin embargo, con el proceso de necrosis.

Por otra parte la disminución del Fósforo está igualmente relacionada con los procesos de necrosis dado que el elemento se relaciona con la masa celular analizada, esto es, con los constituyentes orgánicos intracelulares. Su disminución se relacionaría por tanto con la existencia de un cierto daño estructural (Rooman, 2002b).

En consecuencia, los efectos del HEMA sobre los fibroblastos gingivales ponen de relieve cuando se analizan con Microscopía Electrónica Analítica, cuáles son los elementos químicos esenciales que se alteran significativamente. De los datos obtenidos no puede establecerse “ab initio” la existencia de un proceso conducente a una muerte celular por efecto citotóxico de carácter apoptótico o necrótico, si bien el importante descenso de Cloro y Potasio nos induce a pensar que el proceso de muerte celular es de naturaleza fundamentalmente apoptótica. Es importante señalar que los datos obtenidos por Microscopía Electrónica Analítica no exigen la destrucción de la membrana celular, lo que permite evaluar los efectos del HEMA con anticipación al resto de las metodologías utilizadas.

El estudio de la citotoxicidad por HEMA, utilizando la metodología desarrollada en la presente tesis doctoral permite establecer por tanto, en los tiempos y concentraciones estudiados, indicadores de citotoxicidad – vinculados a la cuantificación del nivel de celularidad –, citoplásmicos – vinculados a la liberación de enzimas –, nucleares – vinculados a la liberación de ADN – y microanalíticos – vinculados a la definición del perfil iónico –, los cuales, analizados de forma individual y conjunta, permiten establecer modelos de toxicidad, susceptibles de ser aplicados no sólo al estudio de citotoxicidad por HEMA sino a otros biomateriales de interés en el ámbito de los sistemas dentales y de la Ingeniería Tisular.

5. CONCLUSIONES

1. El método in vitro propuesto, basado en la utilización de fibroblastos gingivales humanos procedentes de biopsias, constituye un modelo experimental idóneo para evaluar la citotoxicidad por HEMA. Dicho modelo permite establecer indicadores de citotoxicidad morfológicos – vinculados a la cuantificación del nivel de celularidad – , citoplásmicos – vinculados a la liberación de enzimas –, nucleares – vinculados a la liberación de ADN – y microanalíticos – vinculados a la definición del perfil iónico –. El modelo permite asimismo el análisis de los datos aportados utilizando conjuntamente los cuatro criterios.
2. La evaluación de la citotoxicidad del HEMA en fibroblastos gingivales humanos mediante la determinación por colorimetría del nivel de celularidad en el cultivo pone de relieve la existencia de una relación directa entre el incremento de la concentración de HEMA y la reducción de la celularidad en el cultivo, circunstancia que resulta a su vez independiente del factor tiempo.
3. La evaluación de la citotoxicidad del HEMA en fibroblastos gingivales humanos mediante liberación de LDH en el medio pone de relieve la existencia de una relación directa entre el incremento de la concentración del HEMA y el incremento del nivel de LDH. Dicho fenómeno muestra en relación con el factor tiempo un proceso secuencial de citotoxicidad, que vincula las concentraciones más elevadas y más bajas de HEMA con la producción de efectos citotóxicos semejantes, diferidos en el tiempo.
4. La evaluación de la citotoxicidad del HEMA en fibroblastos gingivales humanos mediante liberación de ADN en el medio pone de relieve una relación directa entre el incremento de la concentración de HEMA y el aumento de la liberación de ADN en el cultivo, circunstancia que resulta, a su vez, independiente del factor tiempo.

5. La evaluación de la citotoxicidad del HEMA en fibroblastos gingivales humanos mediante Microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X pone de relieve la existencia, a concentraciones bajas de HEMA, 5 y 10 mM, de un perfil iónico en los niveles de Cloro y Potasio que se relacionan con un perfil microanalítico de carácter preapoptótico. El descenso del valor K/Na indica la pérdida de la viabilidad celular y contribuye, junto al descenso de Cloro y Potasio, a identificar el mecanismo de muerte celular como un proceso de naturaleza apoptótica.

6. BIBLIOGRAFÍA

ABRAHAM EH, BRESLOW JL, EPSTEIN J, CHANG-SING P, LECHENE C (1985) *Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport*. Am J Physiol; 248:154-164.

AKAR JG, EVERETT TH, HO R, CRAFT J, HAINES DE, SOMLYO AP, SOMLYO AV (2003) *Intracellular chloride accumulation and subcellular elemental distribution during atrial fibrillation*. Circulation; 107:1-6.

AMUSSEN E (1985) *Clinical relevance of physical, chemical and bonding properties of composite resins*. Op Dent; 10: 61 – 73.

ARCOS D, PÉREZ DEL REAL R, VALLET – REGÍ M (2002) *A novel bioactive and magnetic biphasic material*. Biomaterials; 23 (10): 2151 – 2158

ARREBOLA F, CAÑIZARES J, CUBERO MA, CRESPO PV, WARLEY A, FERNÁNDEZ SEGURA E (2005) *Biphasic behavior of changes in elemental composition during staurosporine – induced apoptosis*. Apoptosis; 10: 1317 – 1331.

ARREBOLA F, FERNÁNDEZ SEGURA E, CAMPOS A, CRESPO PV, SKEPPER JN, WARLEY A (2006) *Changes in intracellular electrolyte concentrations during apoptosis induced by UV irradiation of human myeloblastic (U937) cells*. Am J Physiol Cell Physiol; 290: C638 – C649.

BARBER RD, HARMER DW, COLEMAN RA, CLARK BJ (2005) *GADPH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. Physiol Genomics; 21:389 – 395.

BERGLUND JD, NEREM RM, SAMBANIS A (2004) *Incorporation of Intact Elastin Scaffolds in Tissue Engineered Collagen-Based Vascular Grafts*. Tissue Engineering; 10: 1526-1535.

BLOTTIERE HM, DACULSI G, ANEGON I, POUEZAT JA, NELSON PN, PASSUTI N (1995) *Utilization of activated U937 monocytic cells as a model to evaluate biocompatibility and biodegradation of synthetic calcium phosphate*. Biomaterials; 16:497-503.

BOEKESTEIN A, STOLS ALH, STADHOUDERS A (1980) *Quantitative in X-ray microanalysis of biological bulk specimens*. Scanning Electron Microsc; Pt 2:321-324.

BOEKESTEIN A, THIEL F, STOLS ALH, BOUW E, STADHOUDERS A (1984) *Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic sample*. J Microsc; 134:327-334.

BOUILLAGUET S, WATAHA JC, HANKS CT, CINCCHI B, HOLZ J (1996) *In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA*. Journal of endodontics. 22 (5): 244 – 288.

BOUILLAGUET S, WATAHA JC, VIRGILLITO M, GONZÁLEZ L (1998) *Effects of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1*. Dental materials; 16: 213 – 217.

BRITTBURG M, LINDHL A, NILSSON A et al (1994) *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. New England Joint Medicine; 331: 889 – 895.

BUJA LM, HAGLER HK, PARSONS D, CHIEN K, REYNOLDS RC, WILLERSON JT (1985) *Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid*. Laboratory Investigation; 53:397-411.

BUJA LM, EIGENBRODT MD, EIGENBRODT EH (1993) *Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death*. Arch Pathol Lab Med; 117:1208-1214.

BUJAN J, GARCÍA – HONDUVILLA N, CONTRERAS L, GIMENO MJ, ESCUDERO C, BELLÓN JM, SAN – ROMÁN J (1996) *Coating PTFE vascular prostheses with fibroblastic matrix improves cell retention when subjected to blood flow*. Journal of Biomedical Materials Research; 39: 32 – 39.

CAMPOS MUÑOZ, A (2004) *Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de Ingreso. Real Academia Nacional de Medicina*.

CAMPOS A, LÓPEZ – ESCÁMEZ JA, CAÑIZARES FJ, CRESPO PV (1992) *Electron probe X – ray microanalysis of Ca and K distributions in the otolith membrane*. Micron and Microscopia Acta; 23:349 – 350.

CAMPOS A, LÓPEZ – ESCÁMEZ JA, CAÑIZARES FJ, CRESPO PV, BAEYENS JM (1994) *Gentamicin ototoxicity in otoconia: quantitative electron probe x – ray microanalysis*. Acta Otolaryngol (stockh); 114:18 – 23.

CAMPOS A, SÁNCHEZ – QUEVEDO MC, FERNÁNDEZ – SEGURA E, MOREU G, RODRÍGUEZ IA, ALAMINOS A (2006) *Evaluation of the cytotoxicity of 2 – hydroxymethyl – methacrylate (HEMA) used as biomaterial in tissue engineering*. *Cytotherapy*; 8 (suppl 2): 46.

CERDÁ TRIAS MJ, BARTRA TOMÁS J (2003) *Anafilaxia de contacto por adhesivo dental*. *Alergol inmunol Clin*; 18: 155 – 156.

CIMPAN MR, CRESSEY LI, SKANG N, HALSTENSEN A, LIE SA, GJERTSEN BT, MATRE R (2000) *Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U937 human monoblastoid cells*. *Eur J Oral Sci*; 108:59-69.

COSTA CAS, VAERTEN MA, EDWARDS CA, HANKS CT (1999) *Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23*. *Dent Mater*; 15:434-441.

CRESPO PV, LÓPEZ ESCÁMEZ JA, CAÑIZARES FJ, CAMPOS A (1993) *X-ray microanalytical determination of P, S and K concentration in the gelatinous membrane of the utricle*. *Acta otolaryngol*; 113:176-180.

DE DIEGO E, VILLANUEVA PEÑA A, ROCA EDREIDA A, MARTÍN GARCÍA A, MEANA INFIESTA A, GÓMEZ LLAMES S, GÓMEZ ROMÁN J (2004) *Estudio experimental sobre la viabilidad del injerto libre de epitelio urinario autólogo cultivado in vitro*. *Actas Urol Esp*; 28: 714 – 731.

DI FRANCESCO A, DESNOYER RW, COVACCI V, WOLF FI, ROMAI A, CITTADINI A AND BOND M (1998) *Changes in Magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells*. Arch Biochem Biophys; 360:149 – 157.

DUCKEYNE P, HASTING G (1984) *Metal and Ceramic Biomaterials, Vol.1: Structure. Vol.2: Strength and surface*. CRC Press Inc., USA.

ELIADES G, PALAGHIAS G, VOUGIOUKLAKIS G (1990) *Surface reactions of adhesives on dentin*. Dent Mat; 6:208 – 216.

ERICKSON RL (1992) *Surface interactions of dentin adhesive materials*. Oper Dent; 5:81 – 94.

ESPINOSA – FERNÁNDEZ R, ESPINOSA – SÁNCHEZ D (1999) *Difusión de los adhesivos dentarios en el complejo pulpo dentinario, un estudio in vivo*. Revista ADM; 62 (1): 5 – 11.

FERNANDEZ-SEGURA E, CAÑIZARES FJ, CUBERO MA, REVELLES F, CAMPOS A (1997a) *Electron probe x-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy*. Cell Biol Int; 21:665-669.

FERNANDEZ-SEGURA E, CAÑIZARES FJ, CUBERO MA, REVELLES F, CAMPOS A (1997b) *Backscattered electron imaging of cultured cells: Application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope*. J Microsc; 188:72-78.

FERNANDEZ-SEGURA E, CAÑIZARES FJ, CUBERO MA, WARLEY A, CAMPOS A (1999a) *A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe X – ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscope*. Exp Cell Res; 253:454-462.

FERNÁNDEZ -SEGURA E, CAÑIZARES FJ, CUBERO MA, WARLEY A, CAMPOS A (1999b) *Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron Probe X-ray microanalysis*. Exp Cell Res; 253:454-462.

FERRACANE JL, CONDON JR (1999) *Rate of elution of leachable components from composites*. Dent Mater J; 6: 282 – 7.

FERRARIS ME, CAMPOS A (2002) *Histología y embriología bucodental*. 2nd ed, Editorial Medica Panamericana, Madrid.

FRESHNEY AR (1994) *Culture of animals cells. A manual of basic technique*. 2nd ed, Alan R Liss, New York.

GARDNER J, PEEL M (1991) *Introduction to sterilization, disinfection and infection control*. Churchill, Livingstone.

GEURTSSEN W, LEHMANN F, SPAHL W, LEYHAUSEN G (1998) *Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures*. J Biomed Mater Res; 41: 474 – 80.

GISBERT CALABUIG JA (1998) *Medicina legal y toxicología*. Masson S.A, Barcelona.

GOLDSTEIN JI, ROMING AD, NEWBURY DE, LYMAN CE, ECHLIN P, FIORO C, JOY DC, LIFSHIN E (1992) *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Plenum Press, New York.

HALL TA, GUPTA BL (1986) *EDXS quantization and application to biology. Principles of analytical electron microscopy*. Joy DC, Romir AD, Goldstein JI (eds) Plenum Publish. Co., London: 219-248.

HEBLING J, GIRO EM, COSTA CA (1999) *Biocompatibility of an adhesive system applied on exposed human pulp*. J Endod; 25: 676 – 82.

HONGPAISAN J, ROOMANS GM (1999) *Retaining ionic concentrations during in vitro storage of tissue for microanalytical studies*. J Microsc; 193:257-67.

HUNT TK (1996) *Can adhesions be prevented?*. J Am Coll Surg; 183: 297-306.

ISSA Y, WATTS DC, BRUNTON PA, WATERS CM, DUXBURY AJ (2004) *Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblast in vitro*. Dental Materials; 20: 12 – 20.

JENSEN N, LINBLAD B, BERGOVIST D (1994) *Endothelial cell seeded Dacron aorbifurcated grafts: platelet deposition and long term follow up*. Joint carviovascular surgery; 35: 425 – 432.

JONES RL, MILLER JC, HAGLER HK, CHIEN KR, WILLERSON JT, BUJA ML (1989) *Association between inhibition of arachidonic acid release and prevention of calcium loading during ATP depletion in cultured rat cardiac myocytes.* Am J Pathol; 135:541-56.

KAGA M, NODA M, FERRACANE JL, NAKAMURA W, OGUCHI H, SANO H (2001) *The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells.* Dent Mater; 17:333 – 339.

KEHE K, REICHL FX, DURNER J, WALTHER U, HICKEL R, FORTH W (2001) *Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells.* Biomaterials; 22:317 – 322.

KRAEMER E, BONAFE A, URIBE ECHERVARRÍA LJ, CÁCERES A, URIBE ECHEVARRÍA J (1999) *Efectos de los adhesivos dentinarios sobre la morfología y organización del citoesqueleto neuronal.* Actas de XXXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Odontológicas; 305.

LANGER R, VACANTI JP (1995) *Tissue engineering.* Science; 260: 920 – 926.

LANZA R, LANGER R, VACANTI J (2000) *Principles of Tissue Engineering.* 2nd ed. Academic Press. Burlington.

LECHNE C (1989) *Electron probe analysis of transport properties of cultured cells.* In: Zierold K, Hagler HK (Eds) Springer-Verlag, Berlin; 236 – 247.

LEE DY, CHO KH (2005) *The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems*. Arch Dermatol Res; 296: 296 – 302.

LEE SD, HSIUE GH, KAO CY, CHANG PCT (1997) *Artificial cornea: surface modification of silicone rubber membrane by graft polymerization of p – HEMA via glow discharge*. Biomaterials; 17: 587 – 595.

LEKIC PC, PENDER N, MC CULLOCH CAG (1997) *Is Fibroblast heterogeneity relevant to health, diseases and treatments of periodontal tissues?* Crit. Rev. Oral Biol. Med.; 8 (3): 253 – 268.

LÓPEZ ESCÁMEZ JA, CAÑIZARES FJ, CRESPO PV, CAMPOS A (1992) *Electron probe microanalysis of the otolithic membrane. A methodological and quantitative study*. Scanning Microsc; 6:765 – 772 .

LÓPEZ ESCÁMEZ JA, CRESPO PV, CAÑIZARES FJ, CAMPOS A (1993) *Standards for quantification of element in the otolithic membrane by electron probe x – ray microanalysis: calibration curves and electron beam sensivity*. Journal of Microscopy; 171:215 – 222.

LÓPEZ-ESCÁMEZ JA, CAMPOS A (1994) *Standards for X-ray microanalysis of calcified structures*. Scanning Microsc 8:171 – 185.

MARC A, WANGER A, MARTIAL A, GOERGEN JL, ENGASSER JM, GEUGEY Y, PINTON H (1991) *Potential a pitfalls of using LDH release for the evaluation of animal cell death kinetics*. In: Spier RE, Griffiths JB, Meigner B, editors. *Productions of biologicals form animal cells in culture*. London: Butterworth – Heinemann; 569 – 574.

MCLAUGHLIN CW, ZELHUBER-MCMILLAN S, MACKNIGHT ADC, CIVAN MM (2004) *Electron microprobe analysis of ouabain-exposed ciliary epithelium: PE-NPE cell couplets form the functional units*. *Am J Physiol Cell Physiol*; 286:1376 – 1389.

MELCION C, ADOLPHE M, MARANO F (1995) *Méthodes générales d'études de la cytotoxicité*. En: Adolphe M, Guillouzo A, Marano F (eds) *Toxicologie Cellulaire in vitro Méthodes et applications*; 49 – 68.

MORRIS AC, HAGLER HK, WILLERSON JT, BUJA LM (1989) *Relationship between calcium loading and impaired energy metabolism during Na⁺, K⁺ pump inhibition and metabolic inhibition in cultured neonatal rat cardiacmyocytes*. *J Clin Invest*; 83:1876 – 1887.

NAHRA SAAD D, CASTILLA CÉSPEDES M, VILA DOMENECH J (1998) *Estudio clínico prospectivo y comparativo entre lentes intraoculares de HEMA y de silicona. Primeros dos meses*. *Revista Microcirugía ocular*, 3. Septiembre.

NAKABAYASHI N (1984) *Biocompatibility and promotion of adhesion to tooth substances*. *Crc Crit. Rev Bio – Compatibility*; 1: 25 – 52.

NAVARRO FA, MIZUNO S, HUERTAS JC, GLOWACKI J, ORGILL DP (2001) *Perfusion of medium improves growth of human oral neomucosal tissue constructs*. Wound Repair Regen; 9 (6): 507 – 512.

PARK KD, OKANO T, JOJIRI C et al (1988) *Heparin immobilization onto segmented polyurethane area surface: effect of hydrophilic spacers*. J Biomed Mater Res; 22: 977 – 992.

PERIS C, CISNEROS A, MARTÍNEZ – COSTO R, MENEZO JL (1999) *Estudio comparativo de la biocompatibilidad de la HEMA y silicona para lentes fáquicas en altos miopes*. Microcirugía Ocular.

RATANASATHIEN S, WATAHA JC, HANKS CT, DENNISON JB (1995) *Citotoxic interactive effects of dentin bonding components in mouse fibroblast*. J Dent Res; 74: 1602 – 6.

RATNER B, HOFFMAN AS, SCHOEN F, LEMONS J (1996) *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. J Dent Res; 74 (9): 1602 – 1606.

RHEINWALD JG, GREEN H (1975a) *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell; 6(3): 331 - 43.

RHEINWALD JG, GREEN H (1975b) *Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma*. Cell;6 (3): 317 – 30.

RODRÍGUEZ IA (2005) *Efecto Citotóxico de los Sistemas Adhesivos Dentales Estudio Microscópico y Microanalítico*. Tesis Doctoral.

ROOMANS GM (1988) *Quantitative X-ray microanalysis of biological specimens*. J Electron Microsc Tech; 9:19 – 43.

ROOMANS GM (1991) *Cryopreparation of tissue for clinical applications of X-ray microanalysis*. Scanning Microsc; 5: 95 – 106.

ROOMANS GM (1999) *X-ray microanalysis of cultured cells in the scanning electron microscope and the scanning transmission electron microscope: a comparison*. Scanning Microsc; 13: 159 – 165.

ROOMANS GM (2001) *Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis*. Expert Opin Investig Drugs; 10: 1 – 19.

ROOMANS GM (2002a) *Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cell attached to biomaterials*. Eur Cell Mater 18:1 – 8.

ROOMANS GM (2002b) *X-ray microanalysis of epithelial cells in culture*. Methods Mol Biol; 188: 273 – 289.

ROOMANS GM, VON EULER A (1996) *X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology*. Cell Biol Int; 20:103 – 109.

ROSATO VD, ROSATO M (2004) *Plastic Product Material and Process Selection Handbook*. Elsevier Advanced Technology. Burlington; 35 – 39.

SALIDO M, VILCHES J, LÓPEZ A (2000) *Neuropeptides bombesin and calcitonin induce resistance to etoposide induced apoptosis in prostate cancer cell line*. *Histol Histopathol*; 15: 729 – 738.

SALIDO M, VILCHES J, LOPEZ A, ROOMANS GM (2001) *X-ray microanalysis of etoposide-induced apoptosis in the PC-3 prostatic cancer cell line*. *Cell Biology International*; 25: 499 – 508.

SALIDO M, VILCHES J, ROOMANS GM (2004) *Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis*. *Cell Biology International*; 28: 397 – 402.

SCHUSTER GS, CAUGHMAN GB, RUEGGERBERG FA (2000) *Changes in cell phospholipid metabolism in vitro in the presence of HEMA and its degradation products*. *Dent Mater*; 16:297 – 302.

SOUZA COSTA CA, HEBLING J, SOUZA PP (1999) *Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDCP – 23*. *Dent Mat*; 15: 434 – 441.

SKEPPER JN, KARYDIS I, GARNETT MR, HEGYI L, HARDWICK SJ, WARLEY A, MITCHINSON MJ, CARY NR (1999) *Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: an X-ray microanalytical study*. *J Pathol*; 188:100 – 106.

SLATER K (2001) *Cytotoxicity test for high-throughput drug discovery*. Curr Opin Biotechnol; 12:70 – 74.

SPAGNUOLO G, GALLER K, SCHMALZ G, COSENTINO C, RENGO S, SCHWEIKL H (2004a) *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells*. J Dent Res; 83:703 – 704.

SPAGNUOLO G, MAURO C, LEONARDI A, SANTILLO M, PATERNO R, SCHWEIKL H, AWEDIMENTO EV, RENGO S (2004b) *NF- κ B protection against apoptosis induced by HEMA*. J Dent Res; 83:837 – 842.

STANISLAWSKI L, LEFEUVRE M, BOURD K, SHEILI – MAJD E, GOLBERG M, PERIANIN A (2003) *TEGDMA – induced toxicity in human fibroblast is associated with early drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species*. J Biomed Mater Res. 66: 476 – 482.

STATHAM PJ, PAWLEY JB (1978) *A new method of particle X-ray microanalysis on peak to background measurements*. Scanning Electron Microsc; 1:469 – 478.

THANDROYEN FT, BELLOTO D, KATAYAMA A, HAGLER HK, WILLERSON JT, BUJA LM (1992) *Subcellular electrolyte alterations during progressive hypoxia and following reoxygenation in isolated neonatal rat ventricular myocytes*. Circulation Research; 71:106 – 119.

THOMAS JP, GEIGER PG, GIROTTI AW (1993) *Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid peroxide – and iron – mediated reactions*. J lipid Res; 34: 434 – 439.

VACANTI C, LANGER R, SCHOOL B (1991) *Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation in vivo*. *Plas Reconstr Surg*; 88: 753 – 759.

VALLET – REGÍ M, RÁMILA A (2000) *New bioactive glass and changes in porosity during the growth of carbonate hydroxyapatite layer on glass surface*. *Chemistry of Materials*; 12: 961 – 965.

VILCHES J, SALIDO M, FERNANDEZ-SEGURA E, ROOMANS GM (2004) *Neuropeptides, apoptosis and ion changes in prostate cancer. Methods of study and recent developments*. *Histol Histopathol*; 19: 951 – 961.

VON EULER A, PALSGARD E, VULT VON STEYERN C, ROOMANS GM (1993) *X-ray microanalysis of epithelial and secretory cells in culture*. *Scanning Microsc*; 7:191 – 202.

WALTHER UI, SIAGAN II, WALTHER SC, REICH FX, HICKEL R (2004) *Antioxidate vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines*. 49:125 – 131.

WARLEY A (1993) *Quantitative X-ray microanalysis on thin sections in biology: appraisal and interpretation of results*. In: Sigee DC, Morgan AJ, Summer AT, Warley A (eds) *X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections*. *J Microsc*; 175:143 – 153.

WARLEY A (1994) *The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis*. Scanning Microsc; VIII: 129 – 138.

WARLEY A (1997) *X-ray microanalysis for biologists*. Portland Press, London, UK.

WARLEY A, CRACKNELL KPB, CAMMISH HB, TWORT CHC, WARD JPT, HISRT SJ (1994) *Preparation of cultured airway smooth muscle for study of intracellular element concentration by X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections*. J Microsc; 175:143-153.

WARLEY A, FERNÁNDEZ – SEGURA E, LÓPEZ – ESCÁMEZ J, CAMPOS A (1994) *Changes in elemental concentrations in k562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X – ray microanalysis*. Cell Biol Int; 18: 915 – 916.

WARLEY A, SKEPPER JN (2000) *Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis*. J Microsc; 198:116-23.

WILLIAM D (1987) *Definitions in Biomaterials*. Elsevier. Oxford.

WILSON JD, CLARK AE, HENCH LL (1991) *Histological comparison of ceramic and titanium implants in cats*. Int J Oral Maxillofac Implants; 6 (1): 9 – 10.

WICHTERLE O, LIM D (1960) *Hydrophilic gel for biological use*. Nature; 185: 117 – 118.

WROBLEWSKI J, MULLER RM, WROBLESKI R, ROOMANS GM (1983) *Quantitative X-ray microanalysis of semi-thick cryosections*. Histochem; 77: 447 – 463.

WROBLEWSKI J, ROOMANS GM (1984) *X-ray microanalysis of single and cultured cells*. Scanning Electron Microsc; IV:1875 – 1882.

WROBLEWSKI R, JOHANSSON H, GRIMELIUS L (1996) *X-ray microanalysis of elemental changes in human parathyroid glands in primary and secondary hyperparathyroidism*. Histochem Cell Biol; 105: 467 – 473.

YILDIZ D, LIU YS, ERCAL N, ARMSTRONG DW (1999) *Comparison of pure nicotine – and smokeless tobacco extract – induced toxicities and oxidative stress*. Arch Environ Contam Toxicol; 37: 434 – 439.

ZHANG W, ROOMANS GM (1998) *Volume-induced chloride transport in HT29 cells studied by X-ray microanalysis*. Microsc Res Tech; 40:72 – 78.

ZIEROLD K, SCHÄFER D (1988) *Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis*. Scanning Microsc; 2:1775 – 1790.

ZILLA P, DEUTSCH M, MEINHART J (1994) *Clinical in vitro endothelization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow – up over three years*. J Vasc; 35: 425 – 432.

ZUCCO F (1992) *Use of continuous cell lines for toxicological studies*. In: Castell JV, Gómez Lechon MJ (eds) *In vitro alternative to animal phafmaco-toxicology*. Farmaindustria, Madrid.