



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**“MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
ANALÍTICA DE LA CÉLULA
ENDOTELIAL. SISTEMATIZACIÓN DE
LOS PATRONES MICROSCÓPICOS Y
MICROANALÍTICOS”**

ALEJANDRO RODRÍGUEZ MORATA

TESIS DOCTORAL

JULIO, 2005

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**“MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
ANALÍTICA DE LA CÉLULA
ENDOTELIAL. SISTEMATIZACIÓN DE
LOS PATRONES MICROSCÓPICOS Y
MICROANALÍTICOS”**

ALEJANDRO RODRÍGUEZ MORATA
TESIS DOCTORAL
JULIO, 2005

LOS PROFESORES, D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, D. EDUARDO ROS DIE, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y DÑA. MARIA DEL CARMEN SÁNCHEZ QUEVEDO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA ,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta D. Alejandro Rodríguez Morata al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, cuyo tema es: “**Microscopía Electrónica Analítica de la Célula Endotelial. Sistematización de los Patrones Microscópicos y Microanalíticos**”, ha sido realizada bajo nuestra dirección, siendo fiel expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan meritorias que le hacen acreedor del título de DOCTOR, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, Julio de 2005

Fdo.: Prof. Dr. Antonio Campos Muñoz

Prof. Dr. Eduardo Ros Die

Prof. Dra. M^aCarmen Sánchez Quevedo

Dedicada a mi PADRE

AGRADECIMIENTOS

Nunca el agradecimiento puede quedar suficientemente reflejado por escrito por cuanto las palabras -aunque transductoras ideales de sentimientos- tienen cualidad física y es en otro rango más espiritual donde nace y permanece la gratitud.

No obstante y por las presentes líneas, tengo el deber de reconocer ante muchas personas que el presente trabajo, de años de gestación y desarrollo, además de exigir de un considerable esfuerzo y encono personal de este dúctil autor, Especialista en Angiología y Cirugía Vascular, jamás hubiera dejado atrás dicha categoría de “proyecto” para convertirse hoy en Tesis Doctoral. En este trascendente cambio han intervenido un considerable número de ellas que, sean o no reflejadas en este escrito, tienen cada una un lugar preciso de mi alma.

En primer lugar, agradecer eternamente a Mi Familia su inagotable espíritu de lucha y esfuerzo para que mi camino en la vida haya sido siempre inexorable en una línea de progresivo desarrollo personal. A ellos les debo mi vida entera.

Agradecer a Estela Gutiérrez López su dulce aliento de ánimo, siempre inagotable, para que mis proyectos sean una realidad superada.

Agradecer a mi amigo del alma, Nicolás Marín Ruiz, su apoyo “multidisciplinar”, sin el cual todo este trabajo hubiera sido imposible.

Agradecer al profesor Dr. D. Antonio Campos Muñoz la incuestionable confianza que ha depositado en mí. Su fuerza y orientación ya fueron cruciales en la Facultad y han sido constante guía durante estos años de proyecto.

Agradecer al profesor Dr. D. Eduardo Ros Die, muy especialmente, así como a todos los compañeros del equipo de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Clínico S. Cecilio de Granada, el haber creído en mi proyecto y en la apertura de horizontes entre la Cirugía Vascular y la Ingeniería Tisular como entidades complementarias.

Agradecer a la profesora Dra. Dña. M^a Carmen Sánchez Quevedo el indescriptible esfuerzo personal que ha llevado a cabo para que este proyecto prosperase.

Agradecer al profesor Dr. D. Vicente Crespo Ferrer, profesor Dr. D. Eduardo Fernández Segura, profesor Dr. D. Francisco Arrebola Vargas, Dr. D. Miguel Alaminos Mingorance y Dña. M^a Ángeles Robles el apoyo prestado para el desarrollo de técnicas de cultivo y preparación de las muestras hasta su microanálisis, desde un punto de vista científico; así como la dimensión humana que me han brindado durante los años de este trabajo.

Finalmente, agradecer al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico S. Cecilio la posibilidad de obtención de material biológico suficiente para su posterior procesamiento.

ÍNDICE.-

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.-

I. LA CÉLULA ENDOTELIAL

II. FISIOLÓGÍA DE LA CÉLULA ENDOTELIAL

- 1) El endotelio como barrera de permeabilidad selectiva**
- 2) El endotelio como regulador del tono vascular**
- 3) El endotelio como regulador del equilibrio hemostático**

III. FISIOPATOLOGÍA DE LA CÉLULA ENDOTELIAL

- 1) La disfunción endotelial y el estrés oxidativo**
- 2) Activación endotelial en sepsis e inflamación**
- 3) Respuesta endotelial a la angioplastia y *stenting***

IV. ENDOTELIO Y REPARACIÓN TISULAR

- 1) Equilibrio celular y renovación en el tejido endotelial**
- 2) Endotelio y angiogénesis**

V. ENDOTELIO E INGENIERÍA TISULAR

- 1) Endotelio *in vitro*. Cultivos celulares de células endoteliales**
- 2) Endotelio e injertos vasculares**

VI. LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ANALÍTICA

VII. OBJETIVOS

CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS

I. OBTENCIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

- 1) Material fungible e instrumental**
 - a) Medio de lavado, transporte y cultivo**
 - b) Enzimas proteolíticas**
 - c) Equipamiento**

2) Método de extracción y cultivo celular

a) Primocultivo

b) Subcultivos

3) Recuento y viabilidad celular

4) Material de estudio

II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ANALÍTICA

1) Material fungible e instrumental

a) Reactivos y material de laboratorio

b) Equipamiento

2) Método de estudio

a) Preparación de rejillas para microanálisis

b) Criofijación de muestras

c) Criodesecación, descongelación y metalización de muestras

d) Parámetros instrumentales de análisis

f) Análisis cuantitativo

3) Método estadístico

4) Material de estudio

CAPÍTULO III. RESULTADOS

I. OBTENCIÓN, CULTIVO Y VIABILIDAD CELULAR

II. RESULTADOS MICROSCÓPICOS

1) Microscopía óptica

2) Microscopía electrónica de barrido con electrones secundarios y electrones retrodispersados

III. RESULTADOS MICROANALÍTICOS

1) Resultados cualitativos

a) Células endoteliales del primer subcultivo

b) Células endoteliales del segundo subcultivo

c) Células endoteliales del tercer subcultivo

2) Resultados cuantitativos

3) Resultados estadísticos

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

I. INTRODUCCIÓN.-

La construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización médica mediante la integración de los mismos en la estructura corporal humana para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos, es a lo que desde hace apenas quince años se denomina Ingeniería Tisular. Su influencia en la Medicina Clínica es exponencialmente creciente, especialmente en el campo de la Cirugía. (Campos A, 2004)

En la Angiología y Cirugía Vascular el uso de las técnicas de Ingeniería Tisular es asimismo creciente en distintos campos. Entre ellos, merecen especial mención el desarrollo de cultivos y cocultivos celulares de elementos de carácter endotelial para el revestimiento de injertos artificiales y el desarrollo de injertos dermo-epidérmicos artificiales en úlceras vasculares.

En la presente tesis doctoral, como capítulo introductorio de la misma, vamos a exponer sucesivamente los aspectos básicos que sustentan el conocimiento necesario para alcanzar los objetivos que en esta tesis tenemos planteados.

A este respecto abordaremos sucesivamente la naturaleza estructural, funcional y fisiopatológica de la célula endotelial, la participación del endotelio en la reparación tisular de las estructuras vasculares y la participación del mismo en los programas de Ingeniería Tisular que tienen por base los cultivos celulares.

Por otra parte, abordaremos también en la introducción el reciente desarrollo de la Microscopía Electrónica Analítica y su utilidad en el estudio de la viabilidad celular.

Finalmente, estableceremos el objetivo general y los objetivos específicos de la tesis.

I. LA CÉLULA ENDOTELIAL

El cuerpo humano posee aproximadamente 100 trillones de células, con aproximadamente 260 fenotipos diferentes, que se asocian en el espacio y el tiempo para formar tejidos y órganos. A pesar de la complejidad de nuestro organismo, existen sólo cuatro tipos básicos de tejidos: epitelial, conjuntivo, muscular y nervioso. Asociados en diferentes proporciones, conforman los diferentes órganos y aparatos de nuestra economía corporal. (Campos, 2004).

Si bien el tejido epitelial deriva de las tres hojas germinativas, el epitelio subespecializado en tapizar la luz vascular y cámaras cardiacas –endotelio- sólo tiene origen mesodérmico. A partir de las células mesenquimatosas indiferenciadas, derivadas del mesodermo, se diferencian las distintas líneas celulares que conducen hasta las células maduras, a saber, fibroblastos, adipocitos, condroblastos y condrocitos, osteoblastos y osteocitos, célula endotelial y mesotelial (Junqueira LC, 2003).

Las células endoteliales se unen consistentemente entre sí conformando una capa semipermeable que tapiza los vasos de toda nuestra economía, constituyendo una interfase dinámica entre la sangre y el resto del organismo. El endotelio globalmente es considerado como un órgano por su gran envergadura (aproximadamente 1×10^{13} células, entre 720 y 1000 gramos y entre 4000 y 7000 m² de superficie total) y por su versatilidad. Se trata de un epitelio de revestimiento monoestratificado y pavimentoso que representa el elemento más noble del vaso sanguíneo, donde integra la túnica íntima. Sus células son poligonales y planas, con el eje mayor orientado en sentido del flujo sanguíneo, de entre 25 y 50 micras y entre 10 y 15 el eje transversal. El núcleo celular suele orientarse asimismo en el sentido del eje mayor de la célula. En su citoplasma se aprecian con microscopia electrónica, aparte de las organelas citoplasmáticas habituales, los característicos cuerpos de Weibel-Palade, que son gránulos secretorios donde se almacena el factor von Willebrand. El citoesqueleto de la célula endotelial está formado por tres tipos de estructuras bien definidas: microtúbulos, microfilamentos (filamentos de actina) y filamentos intermedios, que están formados a su vez por vimentina. Los filamentos intermedios definen la forma y la arquitectura interna celular, permiten el transporte intracelular, mediante procesos de endocitosis y exocitosis, participan activamente en la mitosis y en los procesos de modulación de

receptores de superficie y participan en los procesos de interacciones intercelulares (Yoon M, 1998; Bouïs D, 2001; Sumpio B, 2002; Howell GJ, 2004).

El polo apical de la célula endotelial se encuentra recubierto de un glicocáliz que contiene proteínas, glicoproteínas, sialoconjugados y proteoglicanos. Esta capa está íntimamente ligada a la parte externa de la membrana plasmática y contiene sitios de unión y receptores para diversas proteínas plasmáticas que son adsorbidas al glicocáliz, internalizadas (vía endocitosis) o selectivamente transportadas a través de la célula (vía transcitosis). Las moléculas de esta capa pueden ser directamente producidas por la célula endotelial o sintetizadas en otros tejidos con su subsiguiente unión al glicocáliz endotelial. La superficie interna basal de la célula endotelial está en contacto, a través de filamentos electrodensos (hemidesmosomas), con el tejido conectivo subendotelial. Es la zona donde se localizan las proteínas de adhesión como el fibrinógeno, la fibronectina o la vitronectina (Florian JA, 2003; Junqueira LC, 2003).

II. FISIOLÓGÍA DE LA CÉLULA ENDOTELIAL

Las funciones de las células endoteliales son múltiples, destacando especialmente su función de intercambio, metabólica, hemostática y reguladora del tono vascular.

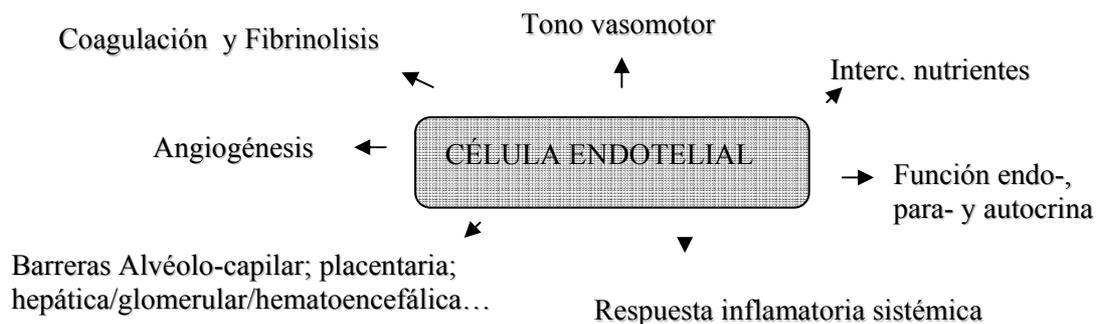


Figura 1. Esquema de las funciones del órgano endotelial.

1) El endotelio como barrera de permeabilidad selectiva

Permite por vía transcelular el paso de agua, gases respiratorios, pequeñas moléculas grasas e incluso de ciertas macromoléculas (Reunkin EM, 1982). Por vía paracelular, la trasmigración de leucocitos. En las uniones intercelulares se encuentran las *zónulas ocluyentes* y las *uniones adherentes*. Ambos sistemas de unión tienen un

fuerte anclaje al citoesqueleto, que gobierna fundamentalmente la vía transcelular. Las células endoteliales están expuestas a fuerzas de cizallamiento y a la presión hidrostática por parte del torrente circulatorio, adaptándose sus propiedades de barrera progresivamente a las presiones sistémicas (Shin H, 2003; Waschke J, 2005). Dentro de las *uniones adherentes* se encuentra la VEcadherina, cuya fosforilación influye directamente en la permeabilidad vascular, angiogénesis, trasmigración de leucocitos e inhibición del crecimiento por contacto de la célula endotelial (Chiu Y, 2004).

El *complejo de unión* se encuentra en los extremos del polo apical de la célula endotelial. Consta de varias proteínas: *occludina*, relacionada con la resistencia al estrés del cizallamiento, la *claudina* y las *junctional adhesion molecules (JAMs)*, relacionadas con la trasmigración de leucocitos (Chiu Y, 2004).

2) El endotelio como regulador del tono vascular

La célula endotelial sintetiza y libera sustancias vasodilatadoras: óxido nítrico (NO), prostaciclina y adenosina, que se contrarrestan en un equilibrio constante con otras vasoconstrictoras como la endotelina-I, la angiotensina II y el tromboxano A2. El óxido nítrico –la más relevante- deriva de la L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), que puede tener varias isoformas. La NOS-III o NOS-Endotelial (eNOS) es calcio-calmodulina dependiente y de expresión constitutiva. Genera cantidades pequeñas de NO durante periodos cortos y su actividad se regula por agentes vasoactivos como la acetilcolina y la bradiquinina. Otra isoforma es la NOS-II o inducible (i-NOS). Prácticamente no se expresa en condiciones fisiológicas, pero es inducida por citoquinas como IL-1beta o el TNF-alfa. La i-NOS genera grandes cantidades de óxido nítrico durante períodos de tiempo prolongados (Furchgott RF, 1980; Moncada S, 1991; Sessa WC, 1994; Nathan C, 1994; Barbosa-Barros M. 2002).

El NO ejerce además otras funciones biológicas vitales: tiene efecto antiagregante y antiadherente plaquetario, inhibe la adhesión de leucocitos a la pared vascular, disminuye la proliferación y migración de células musculares lisas e inhibe la apoptosis de la célula endotelial mediante inhibición de la activación de la caspasa 3 (Makhoul R, 1999; Dimmeler S, 1999).

3) El endotelio como regulador del equilibrio hemostático

Las sustancias de actividad biológica procoagulante o antifibrinolítica que sintetiza y libera el endotelio son: factor von Willebrand (vWF), factor tisular – tromboplastina- (TF), lipid-mediator platelet-activating factor (PAF), inhibidor del plasminógeno activado (PAI-1 y PAI-2), Tromboxano A2 (TXA2) y factor V. Las sustancias de actividad biológica anticoagulante o fibrinolítica son: prostaciclina (PGI2), óxido nítrico (NO), trombomodulina, proteína S, heparán sulfato, proteoglicanos, activador del plasminógeno tisular (t-PA), Urokinasa (UK), Antitrombina III (Sumpio B, 2002).

De forma natural, el cociente PGI2/TXA2 es siempre mayor de uno en los endotelios sanos. La carga electronegativa que los proteoglicanos brindan al endotelio también repele la carga positiva de las plaquetas. Hay dos mediadores liberados por células endoteliales activadas que favorecen la agregación plaquetaria: el lipid-mediator platelet-activating factor (PAF), sintetizado por estas células cuando son estimuladas por la trombina, histamina o citoquinas. El segundo es el factor von Willebrand (vWF), cuya fuente principal es el endotelio, que es constitutivamente secretado en el plasma y la matriz subendotelial. Este factor se almacena en altas cantidades en los corpúsculos de Weibel-Palade, que pueden ser rápidamente movilizados en respuesta a trombina u otros activadores. Además, el vWF fija y estabiliza al factor VIII y es necesario para la agregación plaquetaria al endotelio dañado. En las células endoteliales, la trombina provoca también la aparición de P-selectina y quemoquinas. Las células endoteliales también cambian su perfil e incrementan la permeabilidad. Estos cambios inician un estado procoagulante y proinflamatorio. Es por ello que un estado séptico grave puede llevar a la coagulación intravascular diseminada (Michiels C, 2003; Esmon Ch, 2004).

III. FISIOPATOLOGÍA DE LA CÉLULA ENDOTELIAL

La pérdida de la capacidad del endotelio para modular el comportamiento fisiológico del lecho vascular es lo que se denomina actualmente *disfunción endotelial* (DE).

1) La disfunción endotelial y el estrés oxidativo

La presencia de factores de riesgo de arteriosclerosis conduce, directa o indirectamente, a la DE manifestada como una reducida biodisponibilidad del NO en todo el territorio arterial, con sus consecuencias lógicas. La modificación de estos factores de riesgo mejora esta situación. También el tratamiento con IECA mejora la DE. (Ohara Y, 1993; Busse R, 1993; Egashira K, 1996; Mancini GB, 1996; Simón A, 2001). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los radicales libres pueden favorecer la lipoperoxidación de las membranas celulares, abocando a la muerte celular. El óxido nítrico también puede atenuar esta toxicidad por diversos mecanismos (Maxwell AJ, 1999).

Se ha demostrado que en los pacientes arterioscleróticos con isquemia de extremidades, los niveles de óxido nítrico no solo están por debajo de la normalidad sino que son, además, directamente proporcionales al grado de lesión: los claudicantes tienen proporcionalmente más niveles que aquellos con lesiones tróficas por la isquemia (Bode-Böger SM, 1996; Böger RH, 1997 y 1998).

El estrés oxidativo (definido por un aumento del cociente Radicales libres derivados del O₂ / Antioxidantes del organismo) es tolerable hasta cierto punto si su incremento es gradual. Sin embargo, llega el momento en el que la situación oxidativa es excesiva y ocurre la muerte celular. En el metabolismo aerobio normal de la célula se crea un estrés oxidativo tolerable. Situaciones en las que el estrés oxidativo es patológico son arritmias cardíacas severas, síndrome isquemia-reperusión, enfermedades degenerativas, enfermedades infecciosas, incluso el propio envejecimiento. Algunas enzimas celulares -SOD, catalasa, peroxidasa- tienen potencial antirradical libre. La melatonina también actúa como antioxidante natural. El glutathione es el mayor antioxidante celular en eucariotas. En el ámbito clínico, la N-acetil cisteína, vitaminas C, E y manitol también tienen potencial antioxidante y antirradical libre. (López Espada C, 2003; León J, 2004; Jeremias A, 2004).

2) Activación endotelial en sepsis e inflamación

En el estado séptico, las células endoteliales son órgano diana de bacterias, virus y citoquinas proinflamatorias. Las endotoxinas y exotoxinas o la invasividad de

gérmenes intracelulares activan a la célula endotelial. Entre los virus que han demostrado producir una invasión celular del endotelio se encuentran: Parainfluenza, Adenovirus, Herpes Simple, Poliovirus, Echovirus, Citomegalovirus, HTLV-1, VIH, Coxsackie B, Flavivirus, Filovirus, Hantavirus y Arenavirus (Lassa). Incluso, hay una teoría infecciosa sobre la arteriosclerosis donde se pondera enormemente la infección crónica de la célula endotelial por gérmenes intracelulares como la *Chlamydia pneumoniae*, entre otros. (Keller T, 2003; Linares-Palomino JP, 2004; Gutiérrez J, 2004)

La activación endotelial (endotoxinas, exotoxinas, citoquinas) se sigue de un aumento en la síntesis de factor tisular (TF), vWF, IL-6, IL-8, proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y del factor de activación plaquetaria. Así, el consumo de factores de coagulación y de plaquetas sumado a alteraciones en la fibrinólisis, lleva a un cuadro de coagulación intravascular diseminada con trombosis de vasos de pequeño calibre, infarto tisular masivo y fallo multiorgánico (Esmon Ch, 2004; Sumpio B, 2002).

En pacientes con estados sépticos, en estados de shock, con síndromes coronarios agudos y en la arteriosclerosis se detectan niveles altos de algunas moléculas de adhesión para leucocitos, expresadas en la membrana de las células endoteliales: ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina, PECAM-1. Ello es reflejo de su activación y ocasiona la adherencia y activación –con sus consecuencias- de leucocitos y un estado de disfunción endotelial (Pohlman T, 2000; Shebuski RJ, 2002; Keller T, 2003).

3) Respuesta endotelial a la angioplastia y *stenting*

Junto a la lesión longitudinal y transversal de las tres capas arteriales, la muerte y denudación endotelial es efecto directo tras la angioplastia transluminal. La disrupción del endotelio supone la pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto, y conduce a la rápida mitosis en las células de los extremos de la ruptura. La denudación endotelial también se sigue de un depósito de fibrina y de inflamación de la pared vascular. Ocurre una agregación de plaquetas, leucocitos y liberación de factores de crecimiento, citoquinas, proteasas y radicales libres. Esta cadena de eventos explica la reestenosis y la hiperplasia miointimal, así como los casos de trombosis aguda post-angioplastia. Cuando la denudación endotelial es mínima no ocurre hiperplasia. Hay

una relación directamente proporcional entre la magnitud del daño histológico (en profundidad y extensión), la respuesta de hiperplasia intimal y la demora en la reendotelización (Martínez-González J, 2000; Kipshidze N, 2004).

Si tras la angioplastia se implanta un stent coronario, en humanos, se calcula que por encima de los tres meses hay una completa reendotelización, aunque es un endotelio con cierto grado de disfunción (van Beusekom H, 1998; Grewe PH, 2000). El uso de radiaciones láser de baja potencia y dosis, aplicadas intracoronarias no causan efecto térmico y sí un estímulo del VEGF que acelera la reendotelización y evita la hiperplasia tras la implantación del stent (Regar E, 2003). El uso de stents farmacológicos – impregnados en VEGF o estradiol- también aceleran la reendotelización (Swanson N, 2003; Swanson N, 2003; Abizaid A, 2004).

IV. ENDOTELIO Y REPARACIÓN TISULAR

1) Equilibrio celular y renovación en el tejido endotelial

En el hombre adulto se forman cerca de 100.000 nuevas células cada segundo, mientras un número similar desaparece por apoptosis. A este equilibrio dinámico entre proliferación y muerte celular se le conoce como *homeostasis*. Su importancia y equilibrio son primordiales en muchos procesos tan esenciales como la regulación del crecimiento, equilibrio celular y renovación en los tejidos normales, así como en algunos procesos patológicos donde su desequilibrio conduce a la formación de tumores. La apoptosis es un proceso perfectamente definido que tiene lugar sobre todo en los tejidos que son mitóticamente muy activos. A lo largo de nuestra vida, alrededor del 99.9% de nuestras células seguirán este mismo destino (Vaux DL, 1994; Montaner B, 2000).

Las células endoteliales están normalmente en una fase quiescente. En el adulto, su ciclo celular varía de meses a años. Sólo las células endoteliales de vasos endometriales y del cuerpo lúteo tienen un ciclo celular de semanas. Sin embargo, tras un daño celular se activan, modifican su fenotipo, migran y proliferan para cicatrizar – reendotelizar- la lesión en pocos días. Las células endoteliales (normales, estromales) de

tumores sólidos (parénquima tumoral) pueden tener un ciclo celular de 1 a 2 semanas. Ello se debe básicamente a la alta concentración de factores angiogénicos, tanto en tumores primarios como metastáticos (Bachetti T, 2000).

Tras cada división celular, los telómeros (parte extrema de cada cromosoma que contiene DNA no codificante –heterocromatina- que protege al resto del DNA codificante en cada cromosoma) sufren una pérdida sustancial, por lo que su acortamiento lleva a la senescencia a la célula, hasta que se desencadena la muerte celular. La telomerasa es una enzima celular que habitualmente se dedica a la reparación de las pérdidas normales de telómeros tras la mitosis; sin embargo, su vida es igualmente limitada. Del mismo modo, la sobreexpresión de telomerasa es característica de *stem cell* y de células tumorales (Holt SE, 1996; Freedman DA, 2005).

La célula endotelial tiene una serie de estímulos fisiológicos que la hacen persistir en el tiempo, bloqueando la apoptosis. Son múltiples: 1.- Contacto intercelular, célula-célula o bien con la membrana basal. La pérdida de los anclajes físicos supone el desencadenamiento de la apoptosis. La matriz extracelular genera señales de supervivencia que suprimen el gen P-53 (la fibronectina es el más señalado). Esto es relevante durante la migración por el intersticio de las células endoteliales, en la angiogénesis. 2.- Factores de crecimiento, *in vivo* e *in vitro*. La presencia de VEGF, FGF y ECGF (tirosina fosforilasa) se relaciona con la inhibición de la apoptosis de la célula endotelial. 3.- Angiopoyetina-1, ligada a su receptor Tie-2, promueve asimismo señales de supervivencia. 4.- Fuerzas de cizallamiento del torrente circulatorio. El *shear stress* provoca sobrerregulación del gen de la eNOS, lo cual produce niveles altos de NO local, que inhibe la activación de la caspasa-3. El estrés tangencial también sobrerregula el gen de la Superóxidodismutasa (SOD) en la célula endotelial. Es conocida la influencia de esta enzima antirradical libre de las especies reactivas del oxígeno sobre la apoptosis (Dimmeler S, 1999).

La célula endotelial tiene también innumerables potenciales desencadenantes de la muerte celular por apoptosis. La exposición al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o al interferón gamma (IF- γ), angiostatina, monocitos preactivados por lipopolisacáridos bacterianos o por radiaciones ionizantes, desencadenan la apoptosis

de la célula endotelial. En la respuesta sistémica inflamatoria secundaria a sepsis, hay altos niveles de TNF- α y LPS, por lo que algunos expertos piensan que el órgano endotelial es la diana del shock séptico. La LDL oxidada (ox-LDL) aumenta la lipoperoxidación de las membranas celulares, conduciéndolas a la muerte celular por apoptosis. La adición de antioxidantes como vitaminas C y E previene la activación de la caspasa-3 por la ox-LDL, bloqueando la apoptosis (Choy J, 2001; Mallat Z, 2000).

2) Endotelio y angiogénesis

El término angiogénesis hace referencia a la capacidad especial de crear estructuras vasculares *ex novo* a partir de otras preexistentes. Como arteriogénesis indicamos, por el contrario, aquel desarrollo exponencial (que no multiplicación) de arteriolas que ya existen previamente. La finalidad en ambos casos es mejorar la perfusión de órganos o tejidos isquémicos.

Ambos fenómenos se imbrican tanto en el desarrollo embrionario como en la fisiopatología de la isquemia aguda y crónica de las extremidades o del miocardio. En la arteriogénesis, arteriolas de entre 30 y 50 μ pueden llegar a desarrollarse hasta 25 veces su tamaño en situaciones de isquemia. No todas las arteriolas de una extremidad o del miocardio lo hacen. Sólo las mejores en calibre inicialmente se desarrollan (se estima que el 10% del total) a partir de un complejo mecanismo de remodelación total de íntima, media y adventicia. Este proceso se inicia en horas, pero tarda días en completarse (Scholz D, 2001).

La angiogénesis representa un fenómeno fisiológico en la cicatrización de heridas y reparación tisular en general; además, juega un papel importante en el campo de la fisiopatología de enfermedades como la Artritis Reumatoide, Psoriasis y Retinopatía Diabética Proliferativa, entre otras, y especialmente en el crecimiento tumoral primario y metastásico. Del mismo modo, en la patología vascular cuenta con un papel importante en la recanalización de las trombosis venosas, en la inestabilidad de placas de ateroma, en el engrosamiento miointimal, etc. (Rodríguez-Morata A, 2003)

En la práctica clínica también se hace uso de factores angiogénicos con finalidades terapéuticas y excelentes resultados en pacientes con síndromes coronarios o

de isquemia de extremidades inferiores de diversa etiología. A esto se denomina actualmente Angiogénesis Terapéutica y supone un instrumento crucial y de futuro en la lucha contra la isquemia tisular (Isner JM, 1996 y 1998; Vale PR, 2001; Henry TD, 2001; Rissanen TT, 2001; Lederman RJ, 2002; Wahlberg E, 2003; Rajagopalan S, 2003; Palmer-Kazen U, 2004; Collison DJ, 2004)

Las células endoteliales son el elemento necesario para la angiogénesis. La llegada de factores angiogénicos a la superficie endotelial, como es exclusivo del VEGF y de miocitos de la pared vascular (VEGF y FGFs), desencadena un aumento de la permeabilidad vascular, en ambos casos mediada por el NO. El fibrinógeno se libera al intersticio donde se polimeriza en una red de fibrina que sirve de andamiaje para células endoteliales activadas (mitosis) y pericitos adventiciales. La disrupción de la membrana basal y degradación de la matriz extracelular es llevada a cabo fundamentalmente por metaloproteasas (estreptomelisinasa, colagenasa, gelatinasa) y plasmina, sintetizadas localmente, penetrando así las células endoteliales por fibrinolisis en esa red, migrando, proliferando y, finalmente, organizándose en nuevas estructuras tubulares. Existe un equilibrio entre la síntesis y liberación de metaloproteasas y la inhibición de sus antagonistas, inhibidor tisular de las proteasas de la matriz (TIMP), habitualmente en el vaso estable. Si bien, en angiogénesis y arteriogénesis se sobreexpresan unas y se bloquean las TIMP. Se atribuye a esta familia enzimática un papel primordial y rector en la morfogénesis, angiogénesis, reparación tisular, patología inflamatoria, invasión tumoral primaria y metastásica (Collen A, 1998; Vailhe B, 1998 y 1999; Chang Ch, 2001; Burbridge MF, 2002; Kleinman H, 2003).

La angiogénesis en procesos inflamatorios crónicos se relaciona también con la síntesis de metaloproteasas, que puede inducirse por citoquinas como el factor de necrosis tumoral y la IL-1, sintetizadas por mononucleares en infiltrados crónicos. El propio FGFb puede estimular la síntesis de metaloproteasas en el endotelio. Los monocitos son absolutamente fundamentales en la angiogénesis y arteriogénesis *in vivo*. El endotelio activado expone moléculas quimiotácticas –proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)- una importante fuente de actividad angiogénica, pudiendo liberar VEGF y FGFs directamente (Panutsopoulos D, 2003).

La angiogénesis ocurre de forma reactiva al daño tisular y a la hipoxia local. La célula endotelial sometida a hipoxia sobrerregula la transcripción de genes que codifican para factores angiogénicos, sus receptores y enzimas de remodelación de la matriz extracelular (VEGF, endotelina-1, trombospondina 1, colagenasa IV). Sin embargo, la hipoxia prolongada precipita directamente la apoptosis. Existen también otros compuestos angiogénicos, pero de menor relevancia: factor de crecimiento de células endoteliales, factor de crecimiento de hepatocitos, péptido derivado de la cadena α de laminina-1, neuropéptido Y y algunas chemoquinas. (Pohlman T, 2000; Rodríguez-Morata A, 2003)

Factor	Composición	Síntesis	Acciones	Observaciones
VEGF	-Glicoproteína con cinco isoformas: 121,145,165,189,206 (165, la más potente)	-C.E. -CML -FB -M -QC	-Receptores tirosina quinasa (flk-1;flt-1) exclusivos de C.E. y embrionarias (mitogénico) -Quimiotaxis macrófagos -Inhibe apoptosis C.E. -Moviliza células pluripotenciales desde M.O.	-Induce síntesis de NO -Efecto paracrino -Hemivida: 6' -Potencia: ++++
FGFb	-Polipéptido 18-23 KD	-C.E. -FB -M	-Mitogénico de C.E., CML y FB	-Posible inducción de NO -Almacenado en subendotelio -Hemivida: 46' -Potencia: ++
FGFa	-Polipéptido 154 a.a	-C.E. -FB -M	-Mitogénico de C.E. y CML	-Almacenado en subendotelio -Heparina lo protege de inactivación y centuplica su efecto -Potencia: +

TABLA I. Características principales de los factores angiogénicos más importantes relacionados con la célula endotelial. VEGF: Vascular endotelial growing factor. FGFb/a: basic/acid fibroblastic growing factor. C.E: células endoteliales; M: monocitos; FB: fibroblastos; CML; células musculares lisas; QC: queratinocitos; NO: óxido nítrico; a.a: aminoácidos; M.O: médula ósea; +: potencia angiogénica (+/++++) (Rodríguez-Morata A, 2003)

V. ENDOTELIO E INGENIERÍA TISULAR

1) Endotelio *in vitro*. Cultivos celulares de células endoteliales

La mayor parte del conocimiento morfológico y funcional de la célula endotelial viene de experimentos *in vitro* con células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC). Cualquier célula endotelial *in vitro* en óptimas condiciones puede lograr hasta diez generaciones sucesivas, lo que puede durar hasta cinco meses. Se admite que, después de lograda esta meta productiva, entra en una etapa de senescencia, formándose

células aberrantes, gigantes, multinucleadas que mueren. Por ello, es imposible llevar a cabo experimentos *in vitro* a largo plazo (Jaffe E, 1973; Bouïs D, 2001).

El comportamiento de las células endoteliales difiere en función del vaso de origen. Pueden llevar a cabo distintas funciones dependiendo del lugar donde estén emplazadas, incluso dentro del mismo órgano. Por ejemplo, las de placenta humana tienen morfología diferente que las del cordón umbilical: más elongadas, forman redes, crecen en estructuras espiroideas en la superficie de la monocapa original. El endotelio de los vasos cerebrales organiza la barrera hematoencefálica, por lo que es un endotelio continuo, con complejos de unión desarrollados, a diferencia del endotelio fenestrado de los sinusoides esplénicos donde hay discontinuidad inter e intracelular, etc (Schütz M, 1996).

Cultivar células endoteliales conduce a la pérdida de funciones específicas y la introducción de características metabólicas distintas, no presentes *in vivo*. En primer lugar, el crecimiento de células endoteliales *in vitro* excede sobradamente en rapidez al real, *in vivo*. Este fenómeno puede contrarrestarse con el uso de agentes inhibidores de factores angiogénicos para convertir al endotelio *in vitro* en quiescente. En cualquier caso, el aislamiento de la célula endotelial nos brinda una oportunidad para observar fenómenos fisiopatológicos (Bacchetti T, 2000).

Podemos aislar células endoteliales a partir de digestión enzimática. Esto es recomendable para vasos largos, como la vena safena o la vena de cordón umbilical. La colagenasa es la enzima más usada y nos ofrece buenas proporciones en número y pureza de células endoteliales, en cambio su principal desventaja es la acumulación en superficie de detritus celulares proteicos, lo que puede dificultar algún tipo de estudio de expresión en membrana. Otra forma de aislamiento es trocear y digerir enzimáticamente el producto, que suele ser habitualmente de poca entidad: vasos microscópicos de piel o corteza suprarrenal. De ese modo, la selección de células endoteliales se hace mediante filtrado o por anticuerpos endotelio-específicos. Suelen estudiarse procesos inflamatorios o angiogénicos, aunque el principal inconveniente es la contaminación con otras líneas celulares. Otra forma de aislamiento es el legrado mecánico de grandes vasos, o por arrastre de perfusión retrógrada con microtransportadores, instilados por

vénulas, en corazón o pulmón. Así hay poco daño celular y alta pureza, pero resulta poco rentable en densidad de población recogida. (Jaffe E, 1973; Gospodarowicz D, 1976; Folkman J, 1979; Schelling ME, 1988; García-Honduvilla N, 2001)

También es posible acceder a líneas de células endoteliales comercializadas. Vienen libres de micoplasmas y se presentan en medios ya suplementados. No obstante, la densidad celular es pobre, aparte de su elevado coste.

El cultivo de células endoteliales debe llevarse a cabo en medios especiales, que deben contener no sólo aminoácidos, vitaminas, carbohidratos y sales. La adición de factores de crecimiento es absolutamente necesaria, por lo que se aprovecha su alta concentración en el suero fetal bovino, muy por encima del suero humano. También pueden añadirse, en bajas concentraciones, extractos puros de estos factores de crecimiento, los más usados son el VEGF y ECGF.

2) Endotelio e injertos vasculares

La eficacia de un injerto vascular dependerá de sus propiedades intrínsecas (polaridad, porosidad, diámetro), del medio ambiente donde se inserta y de variables del paciente: estado hemodinámico, grado de patología distal y progresión de su enfermedad, estado de hipercoagulabilidad, etc (Xue L, 2000).

Por inertes que sean los materiales que se usan como injertos, politetrafluoroetileno expandido (PTFEe) o polietil-entereftalato (Dacron), generan una reacción compleja pero predecible por parte del huésped. En cualquier caso, siempre son reconocidos como agentes extraños al organismo, que pretenderá su integración y remodelamiento. La integración del injerto en el sistema circulatorio genera desde los primeros latidos una adsorción de proteínas plasmáticas (proteínas del complemento, fibrinógeno, albúmina, inmunoglobulina G, etc.) que sigue una secuencia gradual. En primer lugar, las proteínas de mayor concentración aunque con poco peso molecular se adhieren al injerto, siendo sustituidas por otras de menor concentración pero mayor peso específico (efecto Vroman). Por ejemplo, el fibrinógeno es sustituido por kininógeno y factor XII de la coagulación, proteínas que forman parte del inicio de la cascada intrínseca de la coagulación (Jung SY, 2003).

Los elementos formes del torrente circulatorio interaccionan, más que con la superficie del material sintético, con la capa proteica que queda en su superficie. El fibrinógeno y la fibronectina tienen (al igual que otras como laminina y vitronectina) una secuencia RGD (arg-gly-asp) que fija su ligando en las plaquetas: la glicoproteína IIb/IIA. Ocurre así una adherencia y activación plaquetaria, con liberación de quimiotácticos de leucocitos. Éstos, además, se fijan a IgG y al fibrinógeno, aunque se ha demostrado que pierden capacidad inmune sobre bacterias si están adheridos a proteínas fijas (De La Cruz C, 1998). Todo ello genera una interfase sangre-injerto procoagulante, además de suponer una traba para la reendotelización desde extremos nativos, ya que la activación de los neutrófilos genera una liberación de radicales libres y proteasas que lo impiden.

Tras el implante de un injerto se pierde la inhibición por contacto del endotelio y se sintetizan factores de crecimiento (VEGF, FGFs) como respuesta al insulto mecánico e isquémico de la pared vascular durante la cirugía, activándose las células musculares lisas y endoteliales. La migración de ambos componentes a lo largo de la capa de proteínas y agregado leucoplaquetario se va llevando a cabo, sincrónicamente, junto a una síntesis acelerada de matriz extracelular, por parte de las células musculares. Esta población, que podemos denominar “miointimal”, va remodelando el injerto. En los animales de experimentación, la reendotelización de los injertos sintéticos es completa, en humanos, donde para vasos de mediano y pequeño calibre se usa PTFE, habitualmente con mínima porosidad, solo abarca 1 ó 2 centímetros más allá de cada anastomosis. Además, las células endoteliales, que tienen potencial para unas 70 mitosis, por lo que se explica también que no reendotelizen la prótesis, pueden medir varias decenas de centímetros y la densidad celular es de unas 1000 células endoteliales por mm² desde ambos extremos tan sólo. (Xue L, 2000; Martínez-González J, 2000; García-Honduvilla N, 2001)

Se han descrito islotes de células endoteliales en porciones centrales de injertos, sin conexión física con las de los extremos del injerto. Estas células endoteliales pueden ser algunas de las que existen circulantes libres por el torrente sanguíneo que se han adherido a su superficie, o bien células madre con posibilidad de diferenciarse en

endoteliales, también circulantes. (Kouchi Y, 1998). Por otro lado, la porosidad del material explica también éste fenómeno. El PTFE tiene una estructura microscópica donde aparecen mezcladas pequeñas agrupaciones en forma de nodos, interconectados por microfibras. La longitud de estas fibras; dicho de otro modo, la distancia internodal, es sinónimo de la porosidad del material. En injertos estándares, comercializados, suele ser de 30µm y son pobremente incorporados por los tejidos intersticiales que lo rodean. Está demostrado que incrementando la distancia internodal (la porosidad) desde 60 a 90µm se acelera la incorporación del injerto. La porosidad de 60µm es la que más permite la integración y penetración de neocapilares intersticiales a través del PTFE hasta contactar con la neoíntima y un aporte de células endoteliales distinto al de las zonas perianastomóticas (Hazama K, 2004).

Con la finalidad de mejorar la permeabilidad de los injertos se han seguido distintas líneas de investigación. Una de ellas es la modificación de su superficie interna impregnándola o cubriéndola con sustancias: carbono, silicona, gelatina, albúmina, colágeno. El carbono tiene carga electronegativa -evita la adhesión plaquetaria- y es hidrófobo (menos trombogenicidad). Los polímeros de silicona ofrecen una superficie más lisa que la textura natural del PTFE y parece que reducen la hiperplasia intimal. La albúmina disminuye la adhesión de leucocitos y plaquetas a la superficie del PTFE. El colágeno nativo es trombogénico intrínsecamente, por lo que se manipula para eliminar esta trombogenicidad. Resulta un buen sustrato para la reendotelización. La gelatina es un derivado del colágeno y sus propiedades son similares. En cualquier caso, al recubrir las prótesis con material proteico, se resta adhesión plaquetaria (y, secundariamente, de leucocitos), se proporciona un sustrato para la neoíntima más apropiado que el material nativo y cuando este sustrato se degrada el tejido intersticial, lo integra mejor (Xiao L, 2004; Prasad-Chennazhy K, 2005).

Una forma de mejorar la permeabilidad de los injertos es crear los injertos de material biodegradable que sirvan como andamiaje de la neoíntima. Otra, sembrando células endoteliales en monocapa *in vitro* previo al implante en quirófano del injerto. Una dificultad que se presenta es lograr una densidad celular alta, entendiendo que la normal está en torno a 1000 células por cada mm². Además, las células endoteliales se adhieren poco y con dificultad a injertos sintéticos. Este aspecto se ha mejorado con el

uso de proteínas de anclaje como fibronectina, colágeno, laminina, fibrina, péptidos con la secuencia RGD, etc; sin embargo, el porcentaje de descamación es del 20% en la primera hora y del 60% de pérdida celular en 24 horas. Una línea de investigación más compleja y reciente es la del cocultivo (células endoteliales + fibroblastos o células musculares lisas). Además, se somete a estos injertos durante su crecimiento en laboratorio a sistemas de fluidos (su medio de cultivo) pulsátiles. Aquellos injertos provenientes de cocultivos sembrados en laboratorio con un sistema de circuito cerrado de perfusión del medio de crecimiento a ritmo pulsátil han demostrado más retención y menos dilatación patológica tras su implante que los no sometidos a pulsatilidad. (Zünd G, 1998; Sullivan S, 2000; Thomas AC, 2003; Mitchell Sh, 2003; Buján J, 2004; Rashid S, 2004; Turner NJ, 2004)

En el mismo sentido, la siembra de células endoteliales sobre la superficie luminal de los stents, previo a su liberación, ha dado hasta el momento resultados deficitarios, con pérdidas de hasta el 83% de la población celular por las fuerzas de cizallamiento con el torrente sanguíneo. Se trabaja en la dirección de aumentar el anclaje celular al material, a partir de proteínas plasmáticas, como fibronectina, fibrinógeno y vitronectina (Thompson MM, 1993).

Otro tipo de injerto vascular cada vez más usado es el heterólogo. La explantación de arterias de donante y su criopreservación hacen posible disponer de material vivo para reconstrucción arterial infragenicular en los casos donde no puede usarse el injerto princeps –vena autóloga. Los principales problemas que presentan los injertos criopreservados se derivan de las fracturas espontáneas que aparecen durante el proceso de descongelación y que conducen a la formación de pseudoaneurismas post-implantación y a la pérdida endotelial cuando el injerto descongelado es puesto en carga. El endotelio sujeto a criopreservación es frágil, teniendo que soportar sustancias tóxicas usadas como vasoprotectores o *criomedios* antes de la congelación – dimetilsulfóxido, habitualmente- y la agresión que supone el proceso de congelación (1°C/minuto), almacenamiento (siempre por debajo de -80°C) y descongelación (rápida: inmersión en baño a 37°C; lenta: 1°C/minuto hasta temperatura ambiente). Los últimos estudios al respecto sugieren que un almacenamiento a -145°C seguido de una

descongelación lenta es la técnica menos agresiva para el endotelio del injerto criopreservado (Pascual G, 2004).

El endotelio de los injertos venosos usados como by-pass en miembros inferiores ante las situaciones de trombosis aguda, mantiene su superficie y capacidad de producir prostaciclina –señal de viabilidad celular- intacta en las primeras 48 horas, hecho admitido de forma clásica en la práctica quirúrgica del cirujano vascular. Sin embargo, en estudios en modelos caninos, cuando se prolonga esta trombosis hasta 7 días, hay una pérdida celular endotelial, por lo que una trombectomía sólo repermeabiliza un injerto sin endotelio. El proceso de reendotelización antes comentado comienza, pudiendo culminar con una neointima, en al menos 30 días (Rose D, 1997).

VI. LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ANALÍTICA

El desarrollo progresivo de la Microscopía Electrónica en el último tercio del s. XX y la aplicación conjunta de la misma y los sistemas de detección de rayos X desarrollados sincrónicamente, han permitido conocer, en un corto periodo de tiempo – segundos- e *in situ* la morfología y la composición química de una determinada muestra biológica por medio de técnicas no destructivas.

Existe un amplio número de técnicas analíticas para estimar el contenido de los elementos inorgánicos en los especímenes biológicos como la espectroscopía por absorción atómica y la fotometría de llama (Carini R, 1995; 1997; 2000). Estas técnicas, aparte de requerir un número elevado de células, tan sólo consideran uno o dos cationes simultáneamente. Así mismo, el empleo de métodos electrofisiológicos o fluorimétricos, mediante el uso de indicadores fluorescentes específicos para iones (Fura-2, Fluo-3) para evaluar las actividades de los diferentes iones, no proporcionan información sobre la localización subcelular debido a su baja resolución microscópica. Por el contrario, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X es una técnica que combina la posibilidad del análisis químico con el poder de resolución del microscopio electrónico y, por tanto, posibilita correlacionar la información estructural con el contenido elemental. Además, permite 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 sólo un número de células pequeño.

La determinación 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 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 y rellena el defecto 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: rayos X característicos y rayos X 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 interactuar con el núcleo atómico. La energía de los rayos X característicos depende del número atómico del elemento y puede ser utilizada para identificar un elemento químico presente en la muestra (Goldstein JI, 1992; Roomans GM, 1996; von Euler, 1996).

El análisis de rayos X emitidos por la muestra va a permitir conocer la composición de la misma, pudiendo analizarse de forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa (Armstrong JY, 1991). 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 detectado 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).

La aplicación de la microscopía electrónica analítica ha tenido una amplia difusión entre los diferentes campos de la ciencia, incorporándose en algunos de ellos con carácter casi indispensable. Tal es el caso de la metalurgia, mineralogía, petrología y, en general, en las ciencias de los materiales. Su aplicación al estudio de la composición elemental de las muestras biológicas está permitiendo obtener una importante información relacionada con la identificación y transporte de iones difusibles, la identificación de depósitos orgánicos y la composición de macromoléculas, por lo que su utilización es cada vez mayor en distintos campos de investigación, tales como la microbiología, biología vegetal y animal, toxicología, medioambiente y medicina.

Un aspecto fundamental relacionado con la aplicación del microanálisis por energía dispersiva de rayos X al estudio de muestras biológicas lo constituye la diferencia existente en la dureza de los distintos tipos de muestras, lo que ha llevado a clasificar las mismas en tejidos duros y tejidos blandos (Sigeo DC, 1988). El microanálisis de tejidos duros está ampliando muy considerablemente, entre otros aspectos, el conocimiento de sus diferentes grados de mineralización, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y experimentales (Campos A, 2000; Sánchez-Quevedo MC, 2004). Así mismo, la posibilidad de valorar la reacción del organismo frente a la aplicación de diferentes prótesis e implantes, vasculares o no, mediante la utilización de la microscopía electrónica analítica, está favoreciendo los estudios relacionados con los procesos de biocompatibilidad y degradación (Huang J, 1997; Raso DS, 1999; Matsuno H, 2001; Fathi MH, 2003).

En relación con los tejidos blandos, ha sido a partir de la última década cuando un número creciente de laboratorios de investigación ha desarrollado y empleado dicha metodología para analizar el contenido elemental de las células aisladas y en cultivo, lo que ha supuesto una importante fuente de información en su aplicación a la patología para el estudio de enfermedades de distinta índole y fundamentalmente las relacionadas con los cambios iónicos, como la fibrosis quística, la enfermedad de Alzheimer y aquellas en las que es posible la identificación de partículas como la asbestosis, beriliosis y silicosis. (Zahm JM, 2001; Ramonet D, 2002; Perna F, 2002; Butnor KJ, 2003).

La aplicación de la microscopía electrónica analítica al estudio de células aisladas y en cultivo, de gran interés en biomedicina por el fácil control de su micro-medioambiente, puede aportar una información suplementaria a los estudios ultraestructurales, bioquímicos y fisiológicos, al ofrecer más ventajas que otras metodologías utilizadas en el análisis de la composición elemental de células en cultivo como la absorción atómica y la fotometría de llama, ya que permite el análisis *in situ* de células individuales, subpoblaciones dentro del cultivo y organelas, así como el análisis simultáneo de todos los elementos presentes en la muestra ($Z \geq 5$). En este sentido, está resultando de especial interés para el estudio de los reservorios iónicos intracelulares en

células epiteliales en los procesos de proliferación celular y oncogénesis (Fernandez-Segura E, 1997; Fernandez-Segura E, 1999; von Euler A, 1993).

OBJETIVOS

La importancia de la célula endotelial en la configuración estructural y funcional de los vasos sanguíneos, de acuerdo con lo que se ha descrito anteriormente, exige que cualquier terapéutica que utilice dichas células en Angiología y Cirugía Vascul ar esté fundamentada en criterios de viabilidad celular sólidamente establecidos. El desarrollo de la Microscopía Electrónica Analítica, ya descrito en el capítulo introductorio, permite en el momento presente evaluar células en cultivo susceptibles de ser utilizadas en Ingeniería Tisular.

La determinación de indicadores microanalíticos en células endoteliales de donantes en distintas fases de cultivo con destino a su posterior uso terapéutico constituye el **objetivo general** básico de esta Tesis Doctoral. Para alcanzarlo se han establecido asimismo los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Establecer el modelo experimental de evaluación de la viabilidad endotelial con microscopía electrónica analítica.
- 2) Establecer los patrones microscópicos de las células endoteliales en cultivo primario y sus tres posteriores subcultivos, con microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.
- 3) Establecer los patrones microanalíticos de las células endoteliales en los tres primeros subcultivos, con microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X.
- 4) Establecer los indicadores de viabilidad de la célula endotelial en los tres primeros subcultivos, para su utilización en programas de Ingeniería Tisular.

MATERIAL Y MÉTODOS.-

I. OBTENCIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

1. Material fungible e instrumental

a) Medio de lavado, transporte y cultivo

- Minimum Essential Medium Eagle (MEM)

Minimum Essential Medium Eagle modified, (ref. M2414; SIGMA). Nos servimos de él para lavado y transporte del extracto de tejido vivo que constituirá el primocultivo. Le añadimos un 1% de solución con penicilina, estreptomicina y anfotericina B (Antibiotic Antimycotic Solution 100x, ref. A5955; SIGMA).

- Medio M199

Medium 199, (ref. M4530; SIGMA). Lo utilizamos para el cultivo celular. Lo suplementamos con un 20 % de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum, ref. F9665; SIGMA), 5 mgr de factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) por cada 100 ml (Endothelial Cell Growth Supplement, E2759; SIGMA), con 2 mM/l de L-glutamina (L-Glutamine solution, liquid 200 mM, ref. G7513; SIGMA) y la misma dosis y composición de antimicrobianos que para el MEM.

b) Enzimas proteolíticas

- Colagenasa

Añadimos 100 mgr de colagenasa tipo I (Collagenase Type I, liofilizada y preparada desde *Clostridium Hystolicum*; ref. 17100-017; INVITROGEN CORPORATION; GIBCO) en 100 ml de MEM base, más 1.5 ml de Cl_2Ca 1M. Esterilizamos por filtración en filtros de 0.22 micras (ref. F8148; Millipore; SIGMA) alicuotando directamente de 10 en 10 ml, almacenándolos a $-20^{\circ}C$.

- Tripsina

Utilizamos Tripsina-EDTA 1x (Trypsin-EDTA solution liquid, 1 ×, ref. T4299; SIGMA) almacenada también a $-20^{\circ}C$ en alícuotas de 1.5 ml.

c) Equipamiento

- Cámara de flujo laminar vertical
- Material quirúrgico: guantes estériles, pinzas de mosquito, pinzas de disección, seda de 2/0 recta (ETHICON)
- Sonda nasogástrica pediátrica y sistema de suero, estériles
- Pipetas
- Frascos tipo Eppendorf (Daslab, LaborTecnica, Granada, España)
- Tubos cónicos de centrifuga de 50 ml (NUCLON)
- Centrifugadora 2.0RS (Heraeus, Madrid, España)
- Falcom de 25 cm² (NUNC, Roskilde, Dinamarca)
- Estufa de CO₂ para cultivo Forma Scientific (Ohio, USA)
- Microscopio Óptico Invertido (Nikon Diaphot; Nikon; Japón)
- Cámaras para recuento celular de Neubauer

2. Métodos de extracción y cultivo celular

a) Primocultivo

Las células endoteliales fueron obtenidas de la vena umbilical de cordón umbilical humano (HUVEC). Para ello, se escogieron tan sólo cordones de madres sanas, sin diferenciar entre parto vaginal o cesárea. Consideramos un criterio de exclusión aquellos partos donde hubo sufrimiento fetal u otra complicación obstétrica.

Tras el parto, se procede al doble clampaje del cordón. Es deseable al menos conseguir alrededor de 20 cm. El resto se usa habitualmente para determinaciones de rutina (gasometría y pH). En la propia área quirúrgica se procede al lavado exhaustivo del cordón para eliminar restos orgánicos que si bien son estériles en vida intrauterina pueden quedar contaminados a su paso por el canal del parto. También se practica un lavado profuso del interior de la vena umbilical con suero fisiológico frío a presión. Los extremos del cordón se seccionan quirúrgicamente para facilitar su canulación.



Figura 2. Cordón umbilical humano (20 cm) apto para su procesamiento.

Inmediatamente se sumerge el cordón en la solución de transporte MEM, a 4°C, donde puede permanecer incluso hasta 48 horas en refrigeración (4°C) con buen rendimiento posterior. En ningún caso el tiempo entre la recogida y el procesado excedió de las 8 horas en nuestro material.

En el laboratorio y en condiciones de esterilidad –cámara de flujo laminar vertical, guantes y material quirúrgico- se recogía el cordón. Con un fragmento de 3 cm de sonda nasogástrica pediátrica o con un fragmento de sistema de suero –siempre estéril- dependiendo de calibres, se canulan ambos extremos y se dan sendos puntos de transfijión para fijarlo consistentemente al cordón. A continuación, instilamos soluciones directamente de la pipeta a cualquiera de estas cánulas, que se adaptan perfectamente.



Figura 3. La canulación de la vena umbilical con sonda nasogástrica permite la adaptación directa de la pipeta.

Se lava con posterioridad, con al menos 50 ml de MEM, para eliminar los posibles restos sanguíneos que queden en su interior. Retiramos el MEM con aire – pipeta vacía- y acto seguido rellenamos totalmente la luz con colagenasa tipo I al 0.1 %. Cuando introducimos la colagenasa por la pipeta cerramos la cánula con una pinza mosquito, se rellena así la luz y por último cerramos con otro mosquito el otro extremo. Incubamos a 37° C durante 15 minutos, temperatura y tiempo óptimos para la perfecta actuación de la colagenasa, que debe levantar las células endoteliales sin dañar la membrana basal. Transcurrido ese tiempo, pasamos 30 ml de MEM por un extremo, recogiendo el producto completo en dos tubos cónicos de centrifuga de 50 ml. Centrifugamos a 200 g (1016 rpm) durante 7 minutos, a temperatura ambiente.



Figura 4. Se clampa directamente sobre las sondas de canulación.

Tras la centrifugación, eliminamos el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende en 5 ml de M199 completo. Sembramos con posterioridad en dos falcoms de 25 cm² de superficie. Añadimos 2 ml más de M199 e incubamos a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂, para mantener el pH del medio, condiciones que dotan a las células endoteliales de un ambiente apto para su multiplicación y crecimiento.

b) Subcultivos

El medio es renovado al día siguiente de realizado el cultivo, para eliminar la pequeña concentración de colagenasa que pueda quedar. Posteriormente, esta

renovación es llevada a cabo cada 72 horas, hasta que la monocapa llega a la semiconfluencia, lo que tiene lugar aproximadamente dos semanas después. Sólo subcultivamos y estudiamos aquellos primocultivos que llegaron a esta etapa sin dificultad.

Cuando la monocapa de células endoteliales llega a la semiconfluencia se lava su superficie con 5 ml de PBS (Phosphate buffered saline; P-4417; SIGMA) para eliminar restos de medio y se añade tripsina (1.5 ml) incubándose 5 minutos a 37°C.

Transcurrido ese tiempo, se añaden 5 ml de M199 para anular el efecto de esta enzima y se recoge el material en un tubo cónico donde se centrifuga también a 200 g (1016 rpm) durante 5 minutos. El precipitado celular que se obtiene se resuspende en nuevo medio y se siembra en rejillas de microanálisis, en nuevos falcoms y otra parte se utiliza para recuento celular.

Llegados al estado de semiconfluencia los cultivos primarios (primocultivos) se procedió sistemáticamente a su recuento, subcultivo en nuevos falcoms (primeros subcultivos) y también directamente sobre rejillas para microanálisis. En los falcoms, una vez llegados a la fase, de nuevo, de semiconfluencia se procedió igualmente una segunda y una tercera vez (segundo y tercer subcultivos) como se esquematiza en la figura 5.

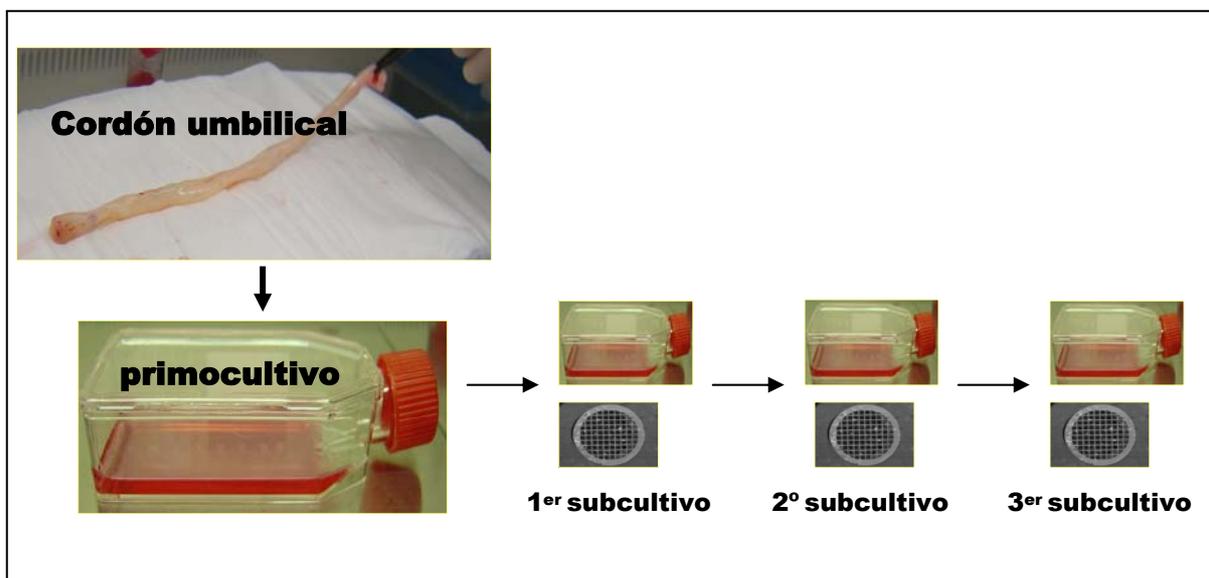


Figura 5. Esquema general de sistemática de cultivos y subcultivos.

3. Recuento y viabilidad celular

Utilizamos para la caracterización morfológica de nuestras células endoteliales un Microscopio Óptico Invertido. En dicho instrumento se apoya todo el trabajo de extracción, cultivo y subcultivos en falcoms y rejillas de microanálisis así como el del recuento celular. El análisis de las células endoteliales en cultivo se ha hecho directamente sobre el sustrato original, sin tinciones ni preparación especial.

Hemos realizado los recuentos celulares como control del cultivo primario, con carácter previo al desarrollo de subcultivos y siembra en rejillas. El recuento celular se lleva a cabo con el método de tinción con Azul de Tripán sobre una cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer presenta dos zonas de contaje y, dentro de cada una, presenta un cuadrado de 3 x 3 mm. La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio óptico. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado, con la ayuda de un diamante, una cuadrícula de 3 x 3 mm², con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro. Ésto permite hacer un cálculo del número de células existente en un volumen fijo. Dentro de cada cuadrícula existen áreas de contaje de 1 mm². Para el recuento, se consideran únicamente las células que están por completo dentro del área, sin tener en cuenta las células que tocan la línea superior o la derecha pero no la inferior o la izquierda. El azul tripán es un colorante soluble en agua, altamente tóxico, que posee grupos cargados amino y sulfato. Éstos le impiden atravesar las membranas celulares intactas y, por tanto, tiñe solo las células muertas o dañadas, resultando de gran interés para calcular el número de células y su viabilidad.

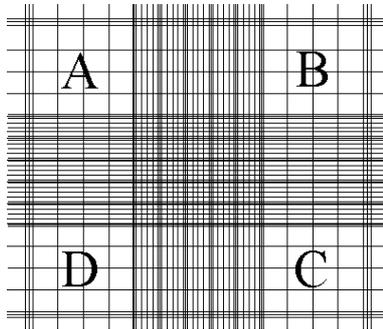


Figura 6. Cámara de Neubauer

Se toman 50 μ l de la suspensión de células y se depositan en un frasco tipo Eppendorf. Se añaden otros 50 μ l de solución de azul tripán al 0'4%, preparada en 0'81 % de cloruro de sodio y 0'06 % de fosfato de potasio dibásico (Trypan Blue Solution 0'4 %, ref. T8154; SIGMA). Tras 5 minutos incubando a temperatura ambiente se toma una muestra de 10-15 μ l y se coloca en la cámara de Neubauer. Se procede al recuento de las células utilizando un microscopio óptico Leitz Laborlux 12 (Leica, Barcelona, España). Observamos dos tipos de células: unas birrefringentes, que corresponden a células vivas, y otras teñidas de azul, que son células con la membrana celular dañada y que por tanto han dejado pasar al colorante (células muertas). Se calcula la proporción existente de cada una mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = (\text{N}^\circ \text{ células vivas} / \text{N}^\circ \text{ células vivas} + \text{N}^\circ \text{ células muertas}) \times 100$$

La fórmula de contaje celular:

$$\text{Células/ml} = \text{n}^\circ \text{ células en el área} \times 10.000 \times \text{factor de dilución}$$

4) Material de estudio

Hemos recogido y procesado un total de 18 cordones umbilicales, extrayendo endotelio de su vena y cultivándolo. De este volumen han sido eliminados seis de ellos por diferentes motivos: dos por contaminación y cuatro por falta de adaptación celular a las rejillas de microanálisis. En ningún caso tuvimos pérdidas por falta de adherencia y crecimiento en falcoms.

Los 12 primocultivos de células endoteliales útiles fueron subcultivados hasta tres veces, mediante las técnicas anteriormente comentadas.

II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ANALÍTICA

1. Material fungible e instrumental

a) Reactivos y material de laboratorio

- Resina de pioloform (#2466, 10G; SPI-CHEM PIOLOFORM RESIN)
- Nitrógeno líquido
- Agua destilada y autoclavada
- Placas de Petri estériles
- Material quirúrgico: pinzas automáticas

b) Equipamiento

- Unidades Millicell[®] para cultivo en placa de 24 pocillos, de 12 mm de diámetro, con filtro de policarbonato con poros de 0´4 µm (Sigma-Química; Madrid, España)
- Rejillas de oro para microanálisis (3mm de diámetro; referencia 05-G-G100 Au; FEDELCO S.L.)
- Pinzas automáticas de punta fina (ref. 72850-F; Style Kopinc 5; ANAME, Madrid)
- Cubreobjetos de 11 mm de diámetro (ref. 06-K-F 0513; FEDELCO, S.L; MADRID)
- Cámara de Criodesecación (Emitech K775; EMITECH, Watford, UK)
- Evaporador (metalizador) (Emitech, Watford, UK)
- Hilo de grafito (Electron Microscopy Sciences, Aname, Madrid).
- Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL-30 (Eindhoven, Holanda), acoplado a:
 - sistema de Energía Dispersiva de Rayos X (EDAX DX4i) equipado con detector de ventana ultrafina (permite el análisis de elementos con $N > 4$)
 - sistema de detección de electrones retrodispersados de estado sólido (K.E. Development, Cambridge, Reino Unido).

2. Método de estudio

a) Preparación de rejillas para microanálisis

Las rejillas de oro para microanálisis fueron recubiertas previamente con una capa de resina de pioloform que tapiza las soluciones de continuidad que las rejillas tienen. A una capa de resina suspendida en agua ultrapura se le depositan con sumo cuidado cuatro rejillas, separadas lo mínimo entre sí. Encima de las mismas se deposita un cubreobjetos de 11 mm de diámetro. Sobre un papel resistente se recoge todo ello hundiendo el papel sobre uno de los extremos de este pioloform flotando en la superficie. Se adhiere perfectamente al papel y una vez seco (24 horas) se recorta el cubreobjetos y deposita en un frasco de cultivo especial (figura X). Se esteriliza con radiación ultravioleta y queda apto para recibir un subcultivo celular.



Figura 7. Rejillas de oro (3mm) para microanálisis cubiertas por cubreobjetos (11mm) y pioloform.

b) Criofijación de muestras

La criofijación es el proceso que lleva nuestro material biológico desde su temperatura de cultivo (37°C) en menos de 10 segundos hasta los -196°C que tiene el nitrógeno líquido. Sacamos los cubrerrejillas a una placa de Petri con M199 a 37°C. Se separan con pinzas automáticas las rejillas del cubrerrejillas, con ayuda de bisturí de punta fina. Se introducen en agua bidestilada y autoclavada a 4° C y en ligero movimiento por un agitador imantado, sólo 4 segundos. Secamos la rejilla en papel de filtro durante 1 segundo e inmediatamente se sumerge en nitrógeno líquido. Las muestras criofijadas se introducen en un tubo de criocongelación de 2 ml, y se almacenan en un contenedor de nitrógeno líquido hasta su posterior procesamiento.

c) Criodesecación, descongelación y metalización de muestras

Las rejillas almacenadas en nitrógeno líquido pasan a una cámara de alto vacío (10^{-5} mbar) para comenzar el proceso de criodesecación que llevará a las células en el proceso de sublimación desde los -80°C a los $+25^{\circ}\text{C}$, a través de seis etapas en un total de 23 horas.

Segmento	Temperatura inicial	Temperatura final	Tiempo
1	-100°C	-100°C	3 horas
2	-100°C	-70°C	1 hora
3	-70°C	-70°C	3 horas
4	-70°C	-50°C	1 hora
5	-50°C	-50°C	3 hora
6	-50°C	$+25^{\circ}\text{C}$	12 horas

Tabla II. Perfil de temperaturas utilizado para la criodesecación de las células endoteliales en un sistema de criodesecación Emitech K775.

La última fase del proceso consiste en proveer a las muestras de una superficie conductora de la electricidad, que facilite el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica y detección analítica. Para ello las muestras son recubiertas con una capa de carbón utilizando un evaporador con hilo de grafito.

d) Parámetros instrumentales de análisis

Para visualizar las muestras mediante electrones secundarios, los parámetros fijados fueron los siguientes:

- Voltaje del microscopio.....los análisis se realizaron a 10 kV
- Angulación de superficie..... 0°
- Distancia de trabajo..... 10 mm

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....en torno a 500
- Tiempo de adquisición200 s
- Tamaño del haz de electrones (*spot size*).....en torno a 6
- Distancia de trabajo libre.....10 mm
- Área de análisispuntiforme y estático

e) Análisis cuantitativo

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 (Statham PJ, 1978; Boekestein A, 1980 y 1984; Roomans GM, 1988). 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, P corresponde a las cuentas netas de la señal característica del elemento, B es la radiación continua medida debajo del pico (i.e. tomada entre los mismos niveles de energía que la señal característica) Z^2/A es el valor medio del número atómico al cuadrado dividido por el peso atómico, correspondiente a un valor específico para el dextrano al 20% –patrón estándar- y las células (Warley A, 1997).

La preparación de los estándares se realizó de acuerdo con las pautas establecidas en la Unidad de Microscopía Electrónica Analítica del Departamento de Histología de la Universidad de Granada, utilizando como patrones sales de NaHPO_4 , MgCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y K_2SO_4 disueltas en una matriz orgánica (Crespo PV, 1993; López-Escámez JA, 1994). 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 expuesto en los apartados 2.a, b y c. Los patrones se analizaron en el microscopio 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 condiciones de análisis expuestas en el apartado anterior.

El análisis de los patrones de dextrano al 20% conteniendo concentración de sales de Na, Mg, P, S, K y Ca conocidas, 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 estándares y 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 (figura 8). Como k , constante de calibración, depende de la diferencia en el Z^2/A -factor G- entre el estándar y la célula, para valorar la influencia de dicho factor en el ajuste de la curva, empleamos la siguiente ecuación:

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

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

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

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

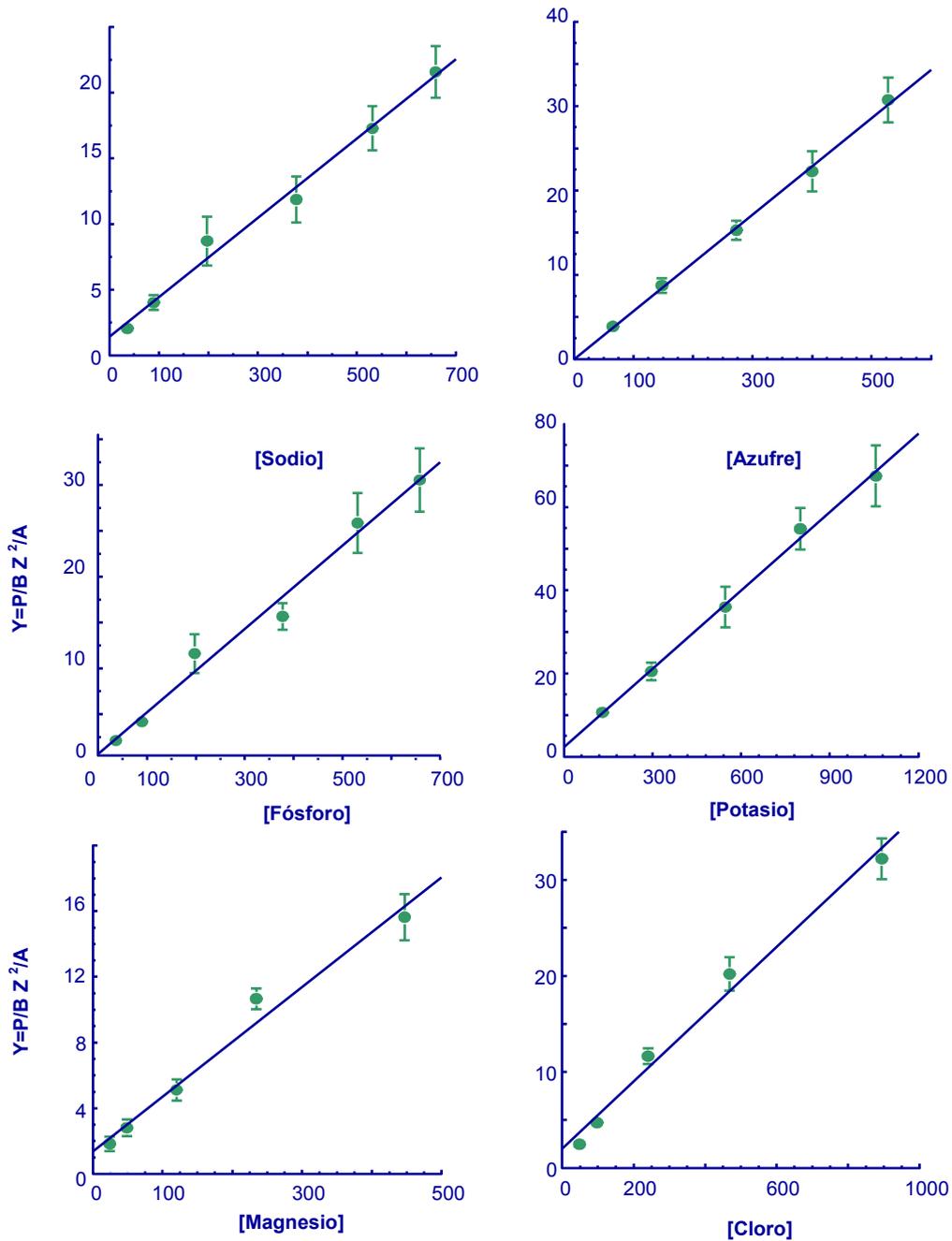
En la Tabla III mostramos las ecuaciones de regresión obtenidas para todos los elementos cuando $Y = P_{\text{std}}/B_{\text{std}} \cdot Z^2/A$ se calibró frente a C_{std} para los elementos Na, Mg, P, S, Cl, K analizados a 10 kV.

Los valores del patrón estándar para los distintos elementos fueron los siguientes (moles/kilo de masa seca): Na= 84,771; Mg= 52,881; P= 69,195; S= 54,45; Cl= 79,793; K= 51,271.

Elemento		
Na	$Y = 3,75 + 0,032 x$	$(r = 0,99 P < 0,001)$
Mg	$Y = 1,07 + 0,052 x$	$(r = 0,98 P < 0,01)$
P	$Y = 0,64 + 0,042 x$	$(r = 0,99 P < 0,01)$
S	$Y = 1,38 + 0,052 x$	$(r = 0,97 P < 0,01)$
Cl	$Y = 1,42 + 0,036 x$	$(r = 0,99 P < 0,01)$
K	$Y = 3,32 + 0,054 x$	$(r = 0,99 P < 0,01)$

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

Fig. 8. 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 $0.4 \mu\text{m}$) aislados de sus soportes de poliestireno, 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.



3. Método Estadístico

Para el análisis reglado de los datos de las células de los distintos subcultivos se utilizaron tanto la hoja de cálculo Excel 2002 de Microsoft como el paquete estadístico SPSS v. 12, donde se aplicaron los test de Friedman, Wilcoxon y Kendall.

4. Material de estudio

Se realizó el estudio microanalítico en 150 células distintas, 50 de cada uno de los 3 subcultivos. Seleccionamos aleatoriamente 35 de cada subcultivo para realizar las determinaciones.

En estas células se realizaron determinaciones de los iones Na, Mg, P, S, Cl, K. Para ellos, se obtuvo el espectro correspondiente que se analizó de forma cualitativa y cuantitativa con un tratamiento estadístico independiente y adecuado, como posteriormente podrá observarse.

RESULTADOS.-

I. OBTENCIÓN, CULTIVO Y VIABILIDAD CELULAR

El tiempo desde la siembra en falcom del primocultivo hasta la obtención de una monocapa celular semiconfluente, osciló entre 10 y 16 días como valores extremos (13.1 +/- 1.8) (Tabla IV).

El recuento y cálculo de viabilidad mediante la técnica del azul tripán se realizó en el paso de primocultivo a primer subcultivo. Se obtuvo un alto porcentaje de viabilidad celular, con un valor medio de 90.55 +/- 1.99 (Tabla IV).

N	Válidos	
		12
Media		13,1
Mediana		13,5
Moda		14
Desv. típ.		1,8
Mínimo		10
Máximo		16

Tiempo de semiconfluencia

N	Válidos	
		12
Media		90.55
Mediana		90.16
Moda		87.26
Desv. típ.		1.99
Mínimo		87.26
Máximo		94.74

Porcentajes de viabilidad

Tabla IV. Tiempo de semiconfluencia y porcentaje de viabilidad de los distintos primocultivos.

II. RESULTADOS MICROSCÓPICOS

1) Microscopía Óptica

Tras separarlas de la membrana basal de la vena umbilical, las células endoteliales -carentes de anclaje- tienen una morfología esférica, birrefringente y se agrupan en pequeños conglomerados de varias células. Esta primera fase de adaptación dura varias horas, pues las células van anclándose paulatinamente al sustrato que les ofrece el falcom. Formarán colonias de poca densidad celular con anclajes individuales progresivamente más firmes, adquiriendo su morfología poligonal habitual, ya descrita en el apartado correspondiente del capítulo introductorio (figura 9).

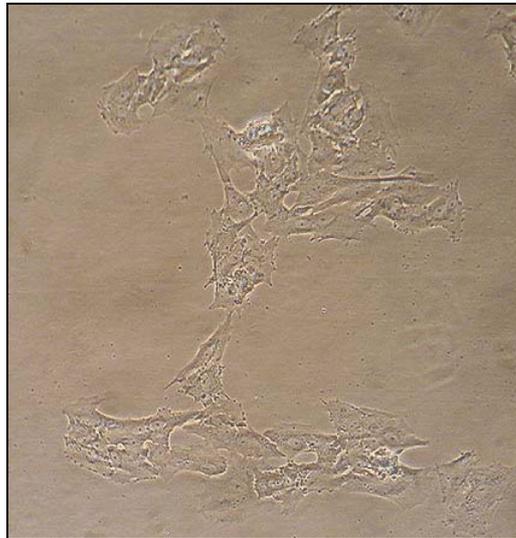


Figura 9. Colonias de células endoteliales a las 20 horas de la siembra. (M.O. 10x)



Figura 10. Detalle de las prolongaciones de células endoteliales en desarrollo (M.O.20x)



Figura 11. Células endoteliales en desarrollo (M.O.20x)

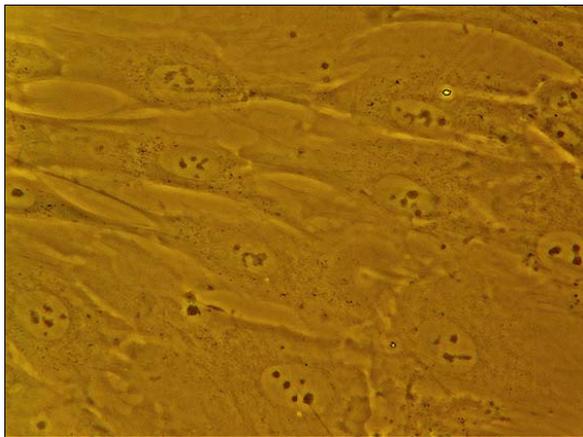


Figura 12. Detalle de los abundantes nucléolos, señal de alto metabolismo celular, en el núcleo de células endoteliales en fase de proliferación (M.O.20x)

La proximidad de otros elementos celulares resulta fundamental (tanto para el crecimiento como para la inhibición del mismo por contacto), por lo que podemos ver en microscopía óptica las prolongaciones citoplasmáticas que emiten estas células, a veces superiores a la longitud del cuerpo celular. Van progresivamente creciendo - íntimamente unidas por uniones intercelulares- hasta llegar al estado de semiconfluencia, en el que la monocapa celular, con su aspecto clásico en “empedrado” (“cobblestone”) rellena prácticamente todo el frasco de cultivo. Es este el momento idóneo para proceder al subcultivo, pues el contacto de la monocapa con los extremos del frasco de cultivo detiene el crecimiento del conjunto de la misma (Figura 10).

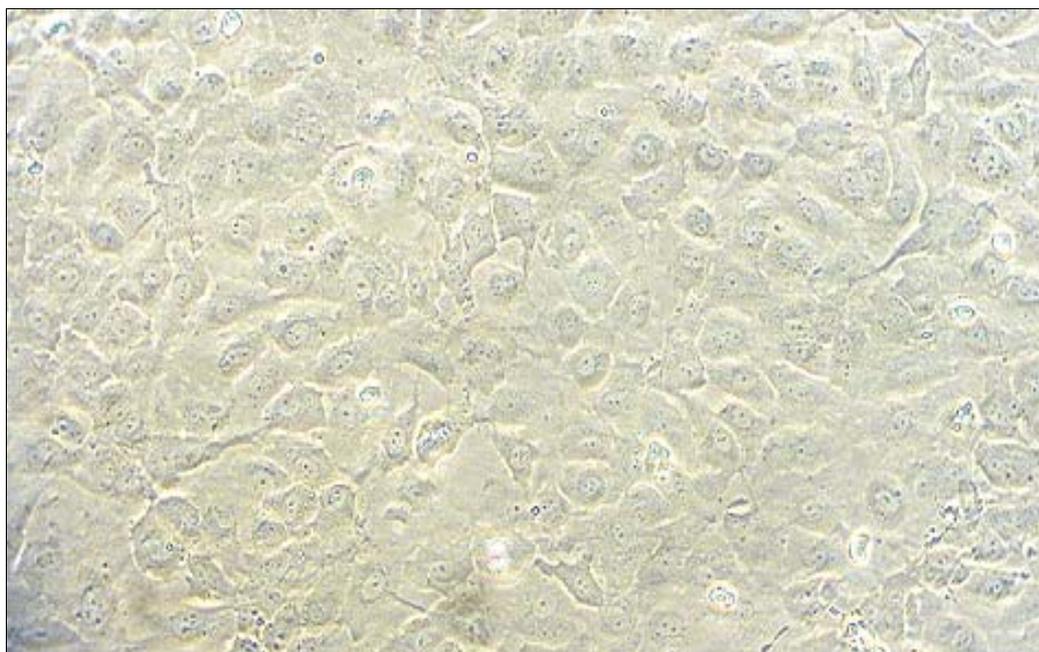


Figura 13. Aspecto típico de la monocapa de células endoteliales. (M.O. 20x)

En los tres subcultivos sucesivos no hemos apreciado diferencias macroscópicas notorias entre una u otra fase. En ninguno de los tres subcultivos se apreciaron signos de senectud celular, (i.e. dispersión celular, formación de células gigantes multinucleadas y pérdida de las prolongaciones citoplasmáticas).

2) Microscopía Electrónica de Barrido con electrones secundarios y electrones retrodispersados

Para llevar a cabo el estudio microscópico y microanalítico, las células endoteliales se cultivaron sobre rejillas, como hemos indicado en el capítulo de material y métodos. La adaptación de estas células a las rejillas de microanálisis es tórpida, no así su crecimiento. La densidad celular se reduce notablemente cuando se cultiva en estas rejillas, a pesar de mantener los mismos medios y condiciones de cultivo. La morfología es igual en la fase de adaptación y crecimiento, si bien las células suelen estar íntimamente ancladas a los márgenes metálicos de la rejilla y no al pioloform libre, motivo por el que se dificulta aún más su estudio microanalítico cualitativo y cuantitativo, que no morfológico (Figuras 14, 15).

La morfología con Microscopía Electrónica de Barrido pone de relieve que las células endoteliales ofrecen una morfología poligonal alargada que muestra asimismo finas prolongaciones. El núcleo es central y ocupa un área importante del volumen celular. Los datos morfológicos son similares tanto con Microscopía Electrónica de Barrido con electrones secundarios como con electrones retrodispersados (Figuras 16, 17, 18 y 19).

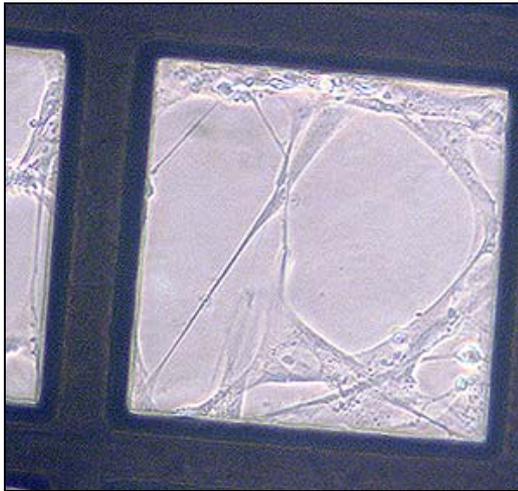


Figura 14. Las células endoteliales tienden a anclarse firmemente a la rejilla y no al pioloform libre. (M.O. 20x)

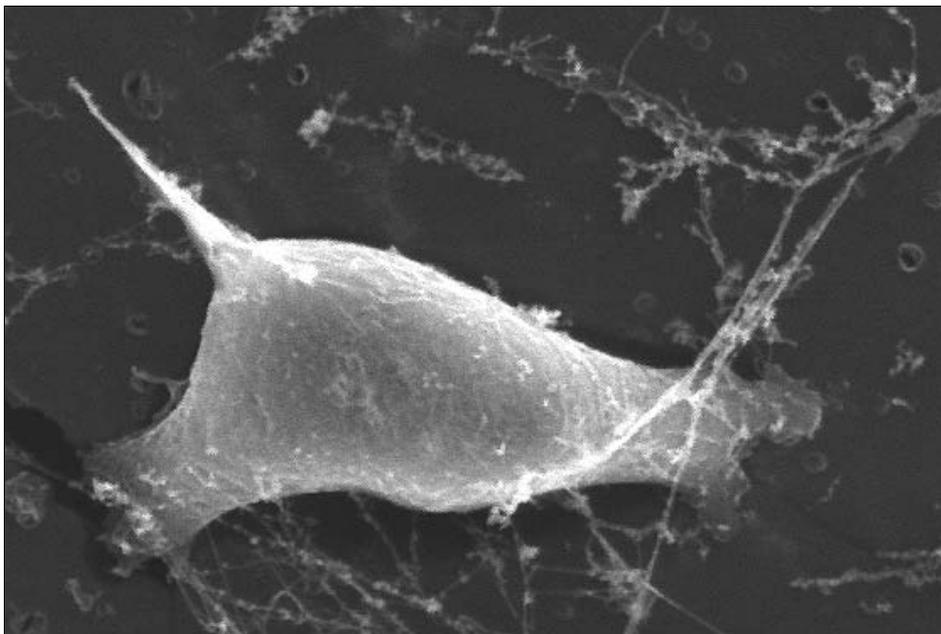


Figura 15. Células endotelial en etapa proliferativa (M.E.B. 1274x)

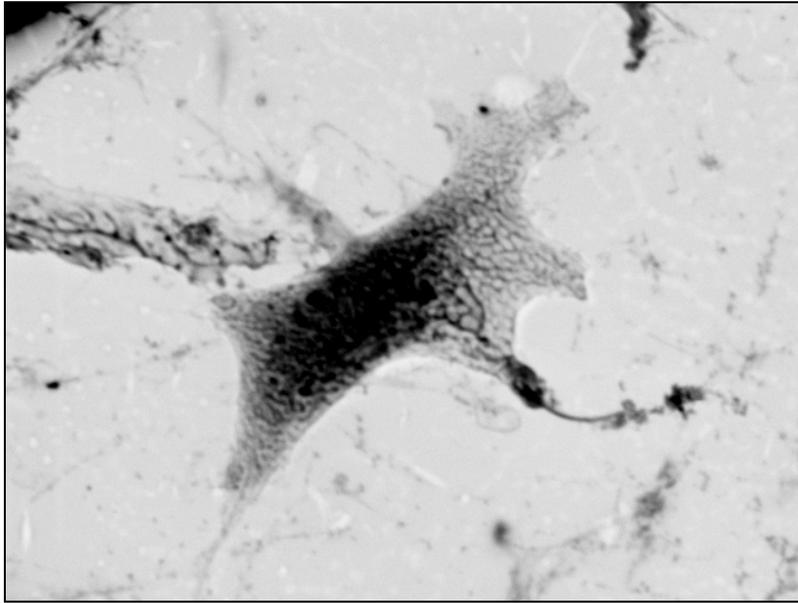


Figura 16. Imagen de célula endotelial con la técnica de electrones retrodispersados (1250x).

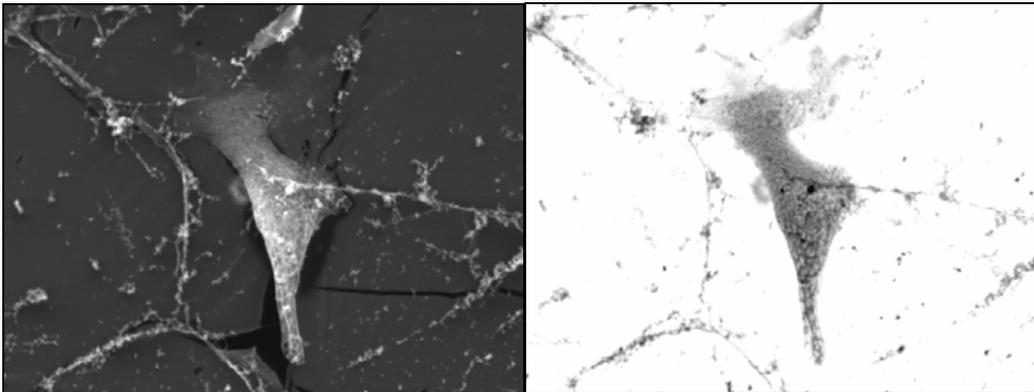


Figura 17. Célula endotelial, vista con electrones secundarios y retrodispersados (izqda. y dcha. respectivamente) (1000x)

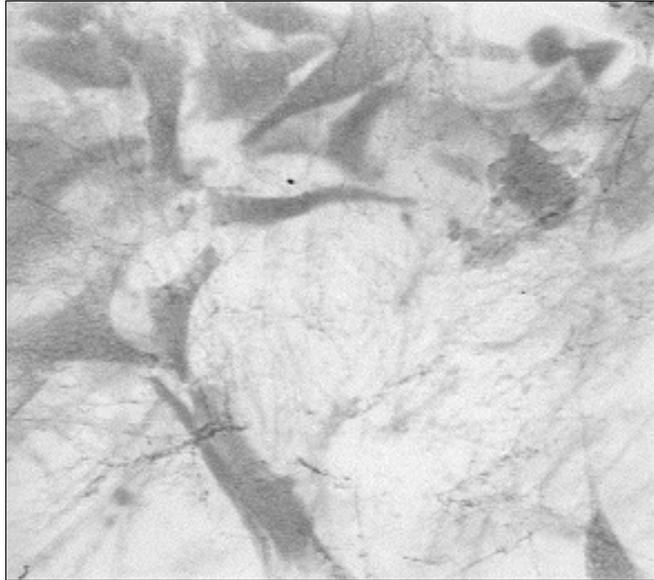


Figura 18. Colonia de células endoteliales vistas con electrones retrodispersados (M.O. 250x)

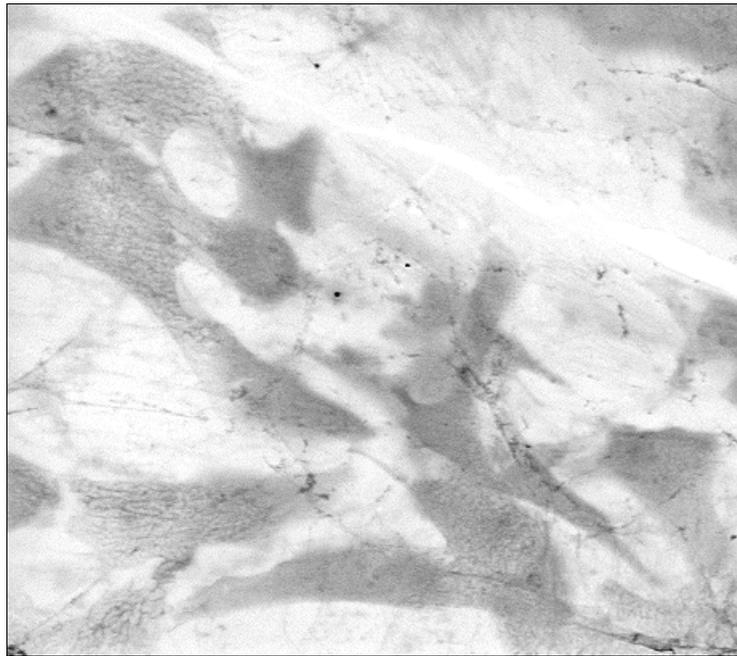


Figura 19. Colonia de células endoteliales vistas con retrodispersados (M.E.B 500x)

III. RESULTADOS MICROANALÍTICOS

1) Resultados cualitativos

El análisis cualitativo de las células endoteliales pone de relieve la presencia de los iones Na, Mg, P, S, Cl y K en los espectros obtenidos de cada una de las células.

La proximidad de la célula analizada al metal de la rejilla genera un espectro donde los picos si bien pueden tener una altura normal, tienen su base más ensanchada por el bombardeo electrónico de la estructura metálica con número atómico próximo a alguno de nuestros iones objeto, por ejemplo el P.

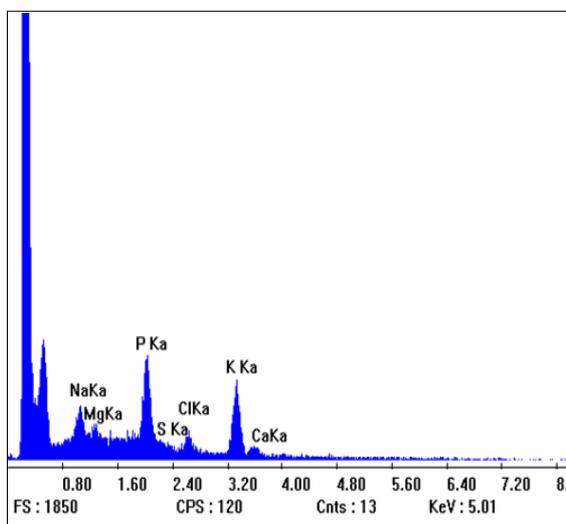


Figura 20. Perfil iónico –cualitativo- de una célula endotelial normal.

Durante el proceso de microanálisis no fue estudiada de forma cuantitativa ninguna célula cuyo análisis espectral tuviera contaminación por proximidad al metal de la rejilla. En la Figura 20 se aprecia el espectro ortotípico de una célula endotelial normal.

A continuación, presentamos los resultados cualitativos del microanálisis de cada una de las 35 células de los tres subcultivos. En los mismos se describe el orbital atómico “K” de cada ión analizado (Na, Mg, P, S, Cl, K) –*Elemento*-, el número total de cuentas por segundo que emite al ser bombardeado con el haz electrónico -*CPS*-, así como el *background* o radiación de fondo y la relación de estos dos productos, *P/B* (*pico/fondo*).

a) CELULAS ENDOTELIALES DEL PRIMER SUBCULTIVO

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
1	Na K	7.14	6.64	1.07
	Mg K	1.77	6.43	0.28
	P K	12.84	3.88	3.31
	S K	3.19	2.88	1.11
	Cl K	6.57	2.04	3.22
	K K	10.44	1.39	7.48

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
2	Na K	2.19	3.06	0.72
	Mg K	1.22	3.32	0.37
	P K	10.18	2.67	3.80
	S K	2.29	1.94	1.18
	Cl K	3.00	1.36	2.21
	K K	8.52	1.02	8.36

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
3	Na K	2.61	3.05	0.86
	Mg K	0.70	3.28	0.21
	P K	8.88	2.42	3.66
	S K	2.23	1.75	1.28
	Cl K	3.57	1.21	2.95
	K K	8.37	0.93	9.05

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
4	Na K	1.79	3.62	0.50
	Mg K	1.22	3.74	0.33
	P K	12.19	3.02	4.04
	S K	2.24	2.06	1.09
	Cl K	2.98	1.33	2.24
	K K	10.32	1.08	9.60

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
5	Na K	2.30	3.09	0.74
	Mg K	0.96	3.64	0.26
	P K	10.25	2.62	3.92
	S K	2.43	1.80	1.35
	Cl K	3.44	1.16	2.97
	K K	9.26	0.82	11.29

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
6	Na K	2.07	2.96	0.70
	Mg K	1.53	3.20	0.48
	P K	9.86	2.49	3.95
	S K	2.49	1.87	1.34
	Cl K	3.15	1.34	2.36
	K K	9.19	0.93	9.94

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
7	Na K	2.31	2.97	0.77
	Mg K	1.21	3.27	0.37
	P K	12.34	2.71	4.55
	S K	1.64	2.08	0.79
	Cl K	3.55	1.53	2.31
	K K	11.72	1.10	10.70

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
8	Na K	2.02	2.58	0.78
	Mg K	1.48	2.84	0.52
	P K	8.65	2.38	3.64
	S K	1.74	1.69	1.03
	Cl K	2.71	1.15	2.35
	K K	7.24	0.94	7.66

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
9	Na K	1.17	2.28	0.51
	Mg K	0.90	2.39	0.38
	P K	6.95	1.82	3.82
	S K	1.32	1.29	1.02
	Cl K	1.65	0.88	1.88
	K K	6.14	0.63	9.75

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
10	Na K	7.85	7.17	1.09
	Mg K	1.45	6.72	0.21
	P K	13.50	4.58	2.95
	S K	2.60	3.36	0.77
	Cl K	6.82	2.31	2.95
	K K	10.62	1.42	7.46

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
11	Na K	7.38	4.08	1.81
	Mg K	1.01	3.93	0.26
	P K	8.97	2.91	3.08
	S K	3.08	2.41	1.28
	Cl K	7.41	1.88	3.95
	K K	10.12	1.06	9.55

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
12	Na K	1.92	2.42	0.79
	Mg K	1.38	2.62	0.53
	P K	10.15	2.29	4.44
	S K	1.37	1.79	0.76
	Cl K	2.72	1.36	2.00
	K K	8.97	0.99	9.06

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
13	Na K	3.15	3.55	0.89
	Mg K	1.62	3.69	0.44
	P K	14.40	3.00	4.80
	S K	1.84	2.12	0.87
	Cl K	4.82	1.49	3.25
	K K	13.89	1.35	10.29

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
14	Na K	1.49	3.99	0.37
	Mg K	1.21	4.06	0.30
	P K	13.14	2.96	4.43
	S K	2.64	2.02	1.31
	Cl K	3.86	1.32	2.92
	K K	10.47	1.14	9.14

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
15	Na K	1.40	3.02	0.46
	Mg K	1.23	3.08	0.40
	P K	8.46	2.46	3.43
	S K	2.04	1.67	1.22
	Cl K	2.64	1.07	2.48
	K K	8.64	0.77	11.21

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
16	Na K	2.46	4.72	0.52
	Mg K	1.91	4.70	0.41
	P K	14.47	3.65	3.96
	S K	3.01	2.73	1.10
	Cl K	4.26	1.96	2.17
	K K	3.46	1.33	10.12

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
17	Na K	2.87	4.05	0.71
	Mg K	1.42	4.05	0.35
	P K	10.49	3.22	3.26
	S K	2.38	2.44	0.97
	Cl K	4.39	1.78	2.46
	K K	11.07	1.21	9.19

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
18	Na K	1.55	2.79	0.56
	Mg K	1.29	2.79	0.46
	P K	8.31	2.27	3.66
	S K	2.00	1.64	1.22
	Cl K	2.94	1.15	2.55
	K K	8.10	1.00	8.10

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
19	Na K	3.73	5.27	0.71
	Mg K	2.47	5.49	0.45
	P K	15.85	4.66	3.40
	S K	1.70	3.13	0.54
	Cl K	4.39	2.04	2.15
	K K	16.95	1.77	9.58

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
20	Na K	3.86	6.37	0.61
	Mg K	2.07	6.64	0.31
	P K	20.48	5.28	3.88
	S K	3.73	3.70	1.01
	Cl K	5.93	2.48	2.39
	K K	18.50	1.99	9.29

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
21	Na K	10.79	6.38	1.69
	Mg K	1.44	6.09	0.24
	P K	11.76	4.36	2.70
	S K	2.42	3.38	0.72
	Cl K	9.22	2.49	3.70
	K K	10.15	1.58	6.42

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
22	Na K	3.50	3.69	0.95
	Mg K	1.49	4.01	0.37
	P K	13.52	3.00	4.51
	S K	5.35	2.30	2.33
	Cl K	6.47	1.69	3.83
	K K	12.77	1.15	11.10

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
23	Na K	3.83	5.14	0.74
	Mg K	3.01	5.80	0.52
	P K	22.09	5.03	4.40
	S K	8.64	3.73	2.31
	Cl K	6.34	2.62	2.42
	K K	19.64	1.76	11.13

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
24	Na K	12.35	7.18	1.72
	Mg K	0.00	6.60	0.00
	P K	6.36	3.85	1.66
	S K	2.92	3.31	0.88
	Cl K	10.31	2.71	3.80
	K K	6.73	1.73	3.90

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
25	Na K	4.61	4.80	0.96
	Mg K	2.31	4.33	0.53
	P K	17.77	3.85	4.62
	S K	1.68	3.16	0.53
	Cl K	7.26	2.38	3.04
	K K	18.08	1.74	10.39

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
26	Na K	17.40	8.28	2.10
	Mg K	3.15	7.06	0.45
	P K	25.58	6.03	4.25
	S K	3.36	4.67	0.72
	Cl K	14.88	3.61	4.12
	K K	22.27	2.82	7.90

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
27	Na K	7.70	5.31	1.45
	Mg K	1.73	4.93	0.35
	P K	17.25	4.45	3.88
	S K	2.82	3.32	0.85
	Cl K	8.62	2.40	3.58
	K K	16.50	1.75	9.45

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
28	Na K	5.56	4.01	1.39
	Mg K	0.70	3.57	0.20
	P K	5.20	2.53	2.06
	S K	1.75	2.00	0.88
	Cl K	5.08	1.44	3.53
	K K	4.76	1.08	4.43

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
29	Na K	7.99	4.66	1.71
	Mg K	1.83	4.08	0.45
	P K	14.15	3.93	3.60
	S K	2.33	3.05	0.77
	Cl K	8.75	2.12	4.12
	K K	15.27	1.43	10.64

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
30	Na K	14.62	6.74	2.17
	Mg K	1.29	6.32	0.20
	P K	14.30	4.57	3.13
	S K	2.93	3.76	0.78
	Cl K	14.57	3.32	4.40
	K K	11.89	2.16	5.49

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
31	Na K	7.89	4.39	1.80
	Mg K	2.11	4.07	0.52
	P K	16.10	3.52	4.58
	S K	2.39	2.62	0.91
	Cl K	8.06	2.04	3.96
	K K	15.77	1.68	9.39

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
32	Na K	10.71	6.15	1.74
	Mg K	0.76	5.13	0.15
	P K	10.70	3.69	2.92
	S K	2.14	2.79	0.77
	Cl K	9.97	2.20	4.53
	K K	9.70	1.47	6.60

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
33	Na K	6.58	4.81	1.37
	Mg K	1.28	4.55	0.28
	P K	8.36	3.25	2.57
	S K	2.44	2.73	0.87
	Cl K	6.19	2.10	2.95
	K K	7.20	1.40	5.12

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
34	Na K	11.56	5.40	2.14
	Mg K	1.34	5.02	2.27
	P K	15.43	3.89	3.97
	S K	2.52	2.78	0.91
	Cl K	11.85	2.28	5.20
	K K	15.44	1.78	8.65

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
35	Na K	13.38	7.66	1.74
	Mg K	1.92	6.59	0.29
	P K	13.38	4.51	2.97
	S K	3.65	3.73	0.98
	Cl K	10.81	3.20	3.38
	K K	11.68	2.04	5.74

b) CÉLULAS ENDOTELIALES DEL SEGUNDO SUBCULTIVO

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
1	Na K	2,02	5,15	0,39
	Mg K	0,87	4,39	0,20
	P K	7,76	3,34	2,32
	S K	1,60	2,50	0,64
	Cl K	4,50	1,87	2,41
	K K	8,46	1,53	5,53

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
2	Na K	8,27	7,84	1,05
	Mg K	0,76	7,01	0,11
	P K	16,66	5,07	3,29
	S K	2,66	3,78	0,70
	Cl K	7,03	2,74	2,57
	K K	12,85	2,42	5,31

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
3	Na K	9,84	6,61	1,49
	Mg K	1,28	5,97	0,21
	P K	14,65	5,20	2,82
	S K	2,26	3,68	0,61
	Cl K	6,39	2,61	2,45
	K K	10,35	2,15	4,81

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
4	Na K	3,69	5,93	0,62
	Mg K	1,53	5,82	0,26
	P K	18,33	5,21	3,52
	S K	1,99	3,74	0,53
	Cl K	6,10	2,58	2,36
	K K	17,06	2,10	8,12

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
5	Na K	9,59	8,56	1,12
	Mg K	1,77	7,28	0,24
	P K	19,05	6,49	2,94
	S K	4,24	4,61	0,92
	Cl K	8,32	3,55	2,34
	K K	10,71	2,52	4,25

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
6	Na K	6,66	6,88	0,97
	Mg K	0,69	5,57	0,12
	P K	12,82	4,43	2,89
	S K	2,73	3,40	0,80
	Cl K	6,64	2,53	2,62
	K K	10,27	1,68	6,11

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
7	Na K	11,28	8,40	1,34
	Mg K	1,00	6,34	0,16
	P K	15,61	5,05	3,09
	S K	2,77	3,83	0,72
	Cl K	6,91	2,83	2,44
	K K	9,77	1,98	4,93

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
8	Na K	10,85	6,54	1,66
	Mg K	1,06	5,26	0,20
	P K	11,48	3,67	3,13
	S K	2,97	2,81	1,06
	Cl K	7,53	2,04	3,69
	K K	8,54	1,33	6,42

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
9	Na K	11,32	6,66	1,70
	Mg K	1,10	5,76	0,19
	P K	14,46	4,57	3,16
	S K	3,21	3,32	0,97
	Cl K	6,66	2,28	2,92
	K K	9,42	1,51	6,24

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
10	Na K	4,10	5,80	0,71
	Mg K	1,13	6,26	0,18
	P K	8,19	4,18	1,96
	S K	2,83	3,20	0,88
	Cl K	4,42	2,35	1,88
	K K	7,99	1,57	5,09

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
11	Na K	11,27	9,27	1,22
	Mg K	3,53	9,41	0,38
	P K	25,10	7,26	3,46
	S K	4,93	5,60	0,88
	Cl K	11,12	4,16	2,67
	K K	20,79	2,85	7,29

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
12	Na K	11,68	9,48	1,23
	Mg K	2,15	8,65	0,25
	P K	21,88	6,18	3,54
	S K	4,43	4,80	0,92
	Cl K	9,66	3,62	2,67
	K K	18,30	2,57	7,12

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
13	Na K	10,82	7,00	1,55
	Mg K	1,15	5,92	0,19
	P K	13,10	4,05	3,23
	S K	3,38	3,11	1,09
	Cl K	9,43	2,24	4,21
	K K	12,41	1,29	9,62

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
14	Na K	7,50	5,49	1,37
	Mg K	2,71	4,84	0,56
	P K	15,68	3,93	3,99
	S K	3,56	3,09	1,15
	Cl K	7,41	2,35	3,15
	K K	15,79	1,73	9,13

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
15	Na K	15,77	9,90	1,59
	Mg K	3,06	9,00	0,34
	P K	28,47	6,22	4,58
	S K	4,45	4,57	0,97
	Cl K	11,68	3,13	3,73
	K K	19,09	1,91	9,99

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
16	Na K	6,66	6,07	1,10
	Mg K	3,13	6,60	0,47
	P K	25,63	4,93	5,20
	S K	4,57	3,53	1,29
	Cl K	8,65	2,42	3,57
	K K	23,56	1,79	13,16

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
17	Na K	7,68	5,04	1,52
	Mg K	2,57	5,04	0,51
	P K	16,35	3,98	4,11
	S K	3,35	2,92	1,15
	Cl K	7,32	2,09	3,50
	K K	17,52	1,63	10,75

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
18	Na K	5,70	6,14	0,93
	Mg K	2,23	6,01	0,37
	P K	16,25	3,91	4,16
	S K	4,64	2,82	1,65
	Cl K	7,82	1,98	3,95
	K K	15,81	1,70	9,30

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
19	Na K	17,49	10,44	1,68
	Mg K	4,28	9,45	0,45
	P K	32,87	7,20	4,57
	S K	4,78	5,04	0,95
	Cl K	13,41	3,31	4,05
	K K	20,41	2,30	8,87

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
20	Na K	6,39	5,66	1,13
	Mg K	2,43	5,76	0,42
	P K	19,44	4,43	4,39
	S K	3,95	3,32	1,19
	Cl K	8,17	2,41	3,39
	K K	19,50	1,75	11,14

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
21	Na K	5,02	5,91	0,85
	Mg K	1,72	6,49	0,27
	P K	11,90	4,38	2,72
	S K	3,28	3,19	1,03
	Cl K	4,62	2,20	2,10
	K K	10,76	1,50	7,17

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
22	Na K	3,21	4,08	0,79
	Mg K	1,24	3,72	0,33
	P K	9,49	2,68	3,54
	S K	2,28	2,02	1,13
	Cl K	4,38	1,46	3,00
	K K	10,21	1,06	9,63

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
23	Na K	3,04	5,51	0,55
	Mg K	1,76	5,53	0,32
	P K	12,18	4,27	2,85
	S K	3,56	3,17	1,12
	Cl K	5,04	2,35	2,14
	K K	12,40	1,99	6,23

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
24	Na K	7,18	5,74	1,25
	Mg K	1,32	5,22	0,25
	P K	13,55	3,80	3,57
	S K	3,01	2,85	1,06
	Cl K	5,24	2,02	2,59
	K K	8,15	1,23	6,63

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
25	Na K	15,45	7,49	2,06
	Mg K	1,96	6,44	0,30
	P K	15,98	4,51	3,54
	S K	5,24	3,41	1,54
	Cl K	11,33	2,49	4,55
	K K	13,74	1,86	7,39

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
26	Na K	3,70	3,91	0,95
	Mg K	1,60	3,97	0,40
	P K	11,38	3,18	3,58
	S K	2,48	2,20	1,13
	Cl K	4,86	1,45	3,35
	K K	11,40	1,06	10,75

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
27	Na K	11,34	6,99	1,62
	Mg K	1,92	6,45	0,30
	P K	18,11	4,51	4,02
	S K	3,71	3,40	1,09
	Cl K	9,06	2,46	3,68
	K K	12,41	1,66	7,48

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
28	Na K	2,27	2,40	0,95
	Mg K	0,62	2,58	0,24
	P K	5,97	1,64	3,64
	S K	2,22	1,21	1,83
	Cl K	1,87	0,85	2,20
	K K	5,24	0,64	8,19

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
29	Na K	1,33	1,80	0,74
	Mg K	0,88	2,20	0,40
	P K	6,12	1,54	3,97
	S K	1,70	1,17	1,45
	Cl K	3,14	0,86	3,65
	K K	6,09	0,58	10,50

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
30	Na K	2,74	2,84	0,96
	Mg K	1,17	2,84	0,41
	P K	8,60	2,10	4,10
	S K	2,69	1,52	1,77
	Cl K	3,91	1,06	3,69
	K K	8,72	0,83	10,51

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
31	Na K	1,75	2,65	0,66
	Mg K	1,26	2,91	0,43
	P K	9,80	2,20	4,45
	S K	2,93	1,63	1,80
	Cl K	2,83	1,17	2,42
	K K	8,82	0,92	9,59

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
32	Na K	2,12	2,47	0,86
	Mg K	0,98	2,83	0,35
	P K	8,82	2,25	3,92
	S K	1,99	1,71	1,16
	Cl K	3,35	1,24	2,70
	K K	9,55	0,84	11,37

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
33	Na K	2,03	1,57	1,29
	Mg K	0,85	2,06	0,41
	P K	5,28	1,56	3,38
	S K	1,93	1,14	1,69
	Cl K	2,35	0,79	2,97
	K K	4,50	0,54	8,33

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
34	Na K	1,57	2,08	0,75
	Mg K	0,77	2,23	0,35
	P K	6,91	1,66	4,16
	S K	1,75	1,21	1,45
	Cl K	3,14	0,81	3,88
	K K	7,26	0,48	15,13

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
35	Na K	1,58	1,88	0,84
	Mg K	1,12	2,27	0,49
	P K	7,70	1,73	4,45
	S K	2,06	1,25	1,65
	Cl K	2,70	0,87	3,10
	K K	8,40	0,64	13,13

c) CÉLULAS ENDOTELIALES DEL TERCER SUBCULTIVO

Nº orden	Elemento	CPS	Background	P/B
1	Na K	2,64	3,33	0,79
	Mg K	0,96	3,96	0,24
	P K	12,97	3,16	4,10
	S K	12,72	2,27	5,60
	Cl K	4,66	1,54	3,03
	K K	10,01	1,11	9,02

Nº orden	Elemento	CPS	Background	P/B
2	Na K	2,35	3,43	0,69
	Mg K	1,21	4,13	0,29
	P K	8,31	3,02	2,75
	S K	3,05	2,28	1,34
	Cl K	3,17	1,62	1,96
	K K	8,86	0,96	9,23

Nº orden	Elemento	CPS	Background	P/B
3	Na K	6,56	4,99	1,31
	Mg K	1,89	4,95	0,38
	P K	10,13	3,64	2,78
	S K	2,06	2,67	0,77
	Cl K	5,97	1,88	3,18
	K K	9,82	1,34	7,33

Nº orden	Elemento	CPS	Background	P/B
4	Na K	1,33	2,24	0,59
	Mg K	0,76	2,38	0,32
	P K	7,72	1,89	4,08
	S K	2,45	1,40	1,75
	Cl K	2,04	1,04	1,96
	K K	7,63	0,96	7,95

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
5	Na K	3,60	4,73	0,76
	Mg K	1,84	4,95	0,37
	P K	13,70	3,79	3,61
	S K	4,62	2,65	1,74
	Cl K	4,16	1,77	2,35
	K K	10,20	1,38	7,39

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
6	Na K	1,19	2,47	0,48
	Mg K	0,82	2,47	0,33
	P K	6,30	1,86	3,39
	S K	1,91	1,33	1,44
	Cl K	3,58	0,94	3,81
	K K	8,60	0,75	11,47

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
7	Na K	4,86	6,95	0,70
	Mg K	2,28	7,12	0,32
	P K	22,18	5,34	4,15
	S K	2,97	3,85	0,77
	Cl K	2,93	2,59	1,13
	K K	11,81	1,64	7,20

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
8	Na K	3,04	2,70	1,13
	Mg K	1,08	3,26	0,33
	P K	9,01	2,76	3,26
	S K	2,63	1,88	1,40
	Cl K	3,03	1,20	2,53
	K K	7,17	0,85	8,44

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
9	Na K	1,75	3,46	0,51
	Mg K	1,07	3,42	0,31
	P K	8,28	2,53	3,27
	S K	2,00	1,74	1,15
	Cl K	2,87	1,12	2,56
	K K	8,71	0,85	10,25

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
10	Na K	3,41	3,54	0,96
	Mg K	1,12	3,93	0,28
	P K	8,51	2,99	2,85
	S K	2,39	2,11	1,13
	Cl K	3,75	1,39	2,70
	K K	7,18	0,97	7,40

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
11	Na K	3,07	2,85	1,08
	Mg K	1,54	3,23	0,48
	P K	12,53	2,60	4,82
	S K	2,11	1,79	1,18
	Cl K	3,11	1,17	2,66
	K K	9,74	0,96	10,15

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
12	Na K	2,63	2,36	1,11
	Mg K	1,95	3,60	0,54
	P K	12,93	3,22	4,02
	S K	2,97	2,22	1,34
	Cl K	2,64	1,47	1,80
	K K	11,20	1,22	9,18

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
13	Na K	2,04	3,53	0,58
	Mg K	1,51	3,89	0,39
	P K	11,69	3,15	3,71
	S K	3,19	2,32	1,38
	Cl K	4,80	1,59	3,02
	K K	8,39	0,96	8,74

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
14	Na K	1,22	1,63	0,75
	Mg K	0,98	1,74	0,56
	P K	4,93	1,33	3,71
	S K	1,86	0,92	2,02
	Cl K	1,68	0,61	2,75
	K K	4,82	0,55	8,76

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
15	Na K	3,61	3,48	1,04
	Mg K	2,06	3,66	0,56
	P K	13,97	2,61	5,35
	S K	2,97	2,04	1,46
	Cl K	5,36	1,55	3,46
	K K	13,65	1,18	11,57

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
16	Na K	3,48	4,47	0,78
	Mg K	2,19	4,22	0,52
	P K	16,04	3,34	4,80
	S K	2,81	2,38	1,18
	Cl K	6,64	1,65	4,02
	K K	17,62	1,38	12,77

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
17	Na K	2,49	2,62	0,95
	Mg K	1,67	2,70	0,62
	P K	11,02	2,57	4,29
	S K	2,17	1,78	1,22
	Cl K	4,64	1,16	4,00
	K K	10,65	0,76	14,01

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
18	Na K	4,11	6,22	0,66
	Mg K	2,68	6,78	0,40
	P K	18,74	4,97	3,77
	S K	5,28	3,64	1,45
	Cl K	10,29	2,55	4,04
	K K	22,84	1,84	12,41

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
19	Na K	3,46	2,64	1,31
	Mg K	2,60	3,54	0,73
	P K	13,02	3,18	4,09
	S K	2,46	2,12	1,16
	Cl K	6,68	1,32	5,06
	K K	13,38	1,20	11,15

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
20	Na K	4,31	4,98	0,87
	Mg K	2,25	5,78	0,39
	P K	21,08	4,71	4,48
	S K	4,12	3,40	1,21
	Cl K	8,35	2,35	3,55
	K K	22,62	1,67	13,54

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
21	Na K	4,47	3,14	1,42
	Mg K	1,78	3,34	0,53
	P K	11,78	2,59	4,55
	S K	3,06	1,99	1,54
	Cl K	7,37	1,46	5,05
	K K	14,65	0,95	15,42

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
22	Na K	2,14	2,44	0,88
	Mg K	1,62	2,53	0,64
	P K	8,94	2,50	3,58
	S K	1,85	1,80	1,03
	Cl K	4,36	1,23	3,54
	K K	11,25	0,76	14,80

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
23	Na K	4,02	5,40	0,74
	Mg K	1,98	5,45	0,36
	P K	22,18	4,88	4,55
	S K	2,64	3,41	0,77
	Cl K	7,38	2,39	3,09
	K K	17,89	1,71	10,46

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
24	Na K	4,87	6,48	0,75
	Mg K	2,50	6,43	0,39
	P K	20,29	4,93	4,12
	S K	1,72	3,54	0,49
	Cl K	6,17	2,45	2,52
	K K	17,42	1,92	9,07

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
25	Na K	3,82	5,09	0,75
	Mg K	2,63	5,34	0,49
	P K	22,50	4,78	4,71
	S K	2,94	3,36	0,88
	Cl K	7,41	2,28	3,25
	K K	20,06	1,72	11,66

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
26	Na K	2,56	3,74	0,68
	Mg K	1,23	3,84	0,32
	P K	10,49	2,66	3,94
	S K	3,02	1,91	1,58
	Cl K	6,30	1,32	4,77
	K K	14,01	1,01	13,87

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
27	Na K	3,47	2,96	1,17
	Mg K	1,76	3,18	0,55
	P K	11,41	2,60	4,39
	S K	2,01	1,91	1,05
	Cl K	6,00	1,36	4,41
	K K	13,39	1,09	12,28

Nº orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
28	Na K	5,22	4,68	1,12
	Mg K	1,96	4,89	0,40
	P K	18,43	3,81	4,84
	S K	3,61	2,69	1,34
	Cl K	8,09	1,76	4,60
	K K	15,36	1,09	14,09

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
29	Na K	3,04	3,15	0,97
	Mg K	1,83	3,46	0,53
	P K	11,10	2,88	3,85
	S K	2,09	2,13	0,98
	Cl K	6,03	1,50	4,02
	K K	14,48	1,05	13,80

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
30	Na K	2,54	3,68	0,69
	Mg K	1,08	3,89	0,28
	P K	6,74	2,47	2,73
	S K	2,31	1,84	1,26
	Cl K	2,51	1,29	1,95
	K K	5,97	0,91	6,56

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
31	Na K	3,66	8,07	0,45
	Mg K	3,36	8,48	0,40
	P K	36,60	6,80	5,38
	S K	3,10	4,74	0,65
	Cl K	7,84	3,12	2,51
	K K	30,01	2,23	13,46

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
32	Na K	3,86	4,76	0,81
	Mg K	2,27	5,26	0,43
	P K	15,48	3,96	3,91
	S K	3,81	2,92	1,30
	Cl K	8,66	2,06	4,20
	K K	17,93	1,37	13,09

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
33	Na K	3,92	5,94	0,66
	Mg K	2,87	5,01	0,57
	P K	18,58	4,16	4,47
	S K	2,22	2,88	0,77
	Cl K	8,35	1,86	4,49
	K K	17,80	1,28	13,91

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
34	Na K	3,55	5,28	0,67
	Mg K	1,37	5,82	0,24
	P K	15,19	3,88	3,91
	S K	3,41	2,87	1,19
	Cl K	7,76	2,03	3,82
	K K	18,20	1,38	13,19

N° orden	Elemento	CPS	<i>Background</i>	P/B
35	Na K	3,02	4,76	0,63
	Mg K	1,51	5,15	0,29
	P K	11,29	3,47	3,25
	S K	2,71	2,78	0,97
	Cl K	4,05	2,12	1,91
	K K	10,02	1,40	7,16

2) Resultados cuantitativos

En las Tablas V a IX se expresan los valores cuantitativos de los distintos elementos en milimoles/kilo de masa seca, en cada una de las células de los tres subcultivos. Los resultados cuantitativos se obtienen al aplicar la metodología descrita para ello en el capítulo de material y métodos.

La Tabla X recoge las medias y desviaciones estándar de cada elemento en los distintos subcultivos.

En las Figuras 21 a 26 se representan en histogramas las medias de los valores de cada elemento en los tres subcultivos. Cada escala, medida en moles/kg de masa seca, se adapta en el eje de ordenadas a los valores máximos de los elementos.

Tabla IV. Resultados cuantitativos para el Na

Nº orden	Na-subcultivo 1º	Na- subcultivo 2º	Na-subcultivo 3º
1	90,70	134,78	66,96
2	61,03	89,00	57,64
3	72,90	126,30	111,05
4	42,38	52,55	50,01
5	62,73	94,94	64,42
6	59,33	82,22	40,69
7	65,27	113,59	59,33
8	66,12	140,71	94,94
9	43,23	144,11	42,38
10	92,40	60,18	82,22
11	153,43	103,42	91,55
12	66,96	104,26	66,12
13	75,44	131,39	49,16
14	31,36	116,13	63,57
15	38,99	134,78	87,31
16	44,08	128,85	66,12
17	60,18	78,83	74,59
18	47,47	141,56	62,73
19	60,18	95,79	63,57
20	51,71	72,05	63,57
21	143,26	66,96	111,05
22	80,53	46,62	73,75
23	62,73	105,96	120,37
24	145,80	174,62	80,53
25	81,38	80,53	55,94
26	178,01	137,32	57,64
27	122,91	79,68	99,18
28	117,83	62,73	94,09
29	144,95	82,22	81,38
30	183,95	55,94	58,49
31	152,58	72,90	38,14
32	147,50	109,35	68,66
33	116,13	63,57	64,42
34	181,40	71,20	56,79
35	147,50	69,51	53,40

TablaV. Resultados cuantitativos para el Mg

N° orden	Mg-subcultivo 1°	Mg- subcultivo 2°	Mg-subcultivo 3°
1	14,80	8,98	12,69
2	19,56	5,81	15,33
3	11,10	11,63	20,09
4	17,45	13,74	16,92
5	13,74	12,69	19,56
6	25,38	6,34	17,45
7	19,56	8,46	16,92
8	27,49	10,57	17,45
9	20,09	10,04	16,39
10	11,10	9,51	14,80
11	13,74	19,56	25,38
12	28,02	13,22	28,55
13	23,26	10,04	20,62
14	15,86	29,61	29,61
15	21,15	17,97	29,61
16	21,68	26,96	27,49
17	18,50	19,56	33,84
18	24,32	23,79	19,03
19	23,79	22,21	20,62
20	16,39	13,74	25,91
21	12,69	17,45	38,60
22	19,56	16,92	20,62
23	27,49	13,22	28,02
24	0	15,86	32,78
25	28,02	21,15	21,15
26	23,79	15,86	16,92
27	18,50	12,69	29,61
28	10,57	21,15	21,15
29	23,79	21,68	28,02
30	10,57	22,73	14,80
31	27,49	18,50	21,15
32	7,932	21,68	22,73
33	14,80	18,50	30,14
34	14,27	25,91	12,16
35	15,33	30,14	15,33

Tabla VI. Resultados cuantitativos para el P

N° orden	P-subcultivo 1°	P- subcultivo 2°	P-subcultivo 3°
1	229,03	208,96	283,69
2	262,94	226,95	190,28
3	253,25	195,12	192,36
4	279,54	243,56	281,62
5	271,24	202,74	250,48
6	273,32	199,97	235,26
7	314,83	213,81	287,85
8	251,86	216,58	226,26
9	264,32	219,34	226,26
10	204,12	135,62	197,20
11	213,12	239,41	333,51
12	307,22	244,95	277,47
13	332,13	223,49	256,71
14	306,53	276,08	257,40
15	237,33	316,91	370,88
16	274,01	284,39	332,13
17	225,57	287,15	247,71
18	253,25	316,22	314,83
19	235,26	303,07	285,08
20	268,47	188,21	325,90
21	186,82	244,95	283,00
22	312,06	197,20	309,30
23	304,45	247,02	314,83
24	114,86	245,64	297,53
25	319,68	247,71	260,86
26	294,07	70,578	272,62
27	268,47	251,86	303,76
28	142,54	274,01	334,90
29	249,10	284,39	266,40
30	216,58	307,22	188,21
31	316,91	271,24	372,26
32	200,66	233,87	271,93
33	177,83	287,85	308,60
34	274,70	308,60	271,24
35	205,50	325,90	224,88

Tabla VII. Resultados cuantitativos para el S

N° orden	S-subcultivo 1°	S- subcultivo 2°	S-subcultivo 3°
1	60,43	49,54	65,34
2	64,25	38,65	72,96
3	69,69	33,21	41,92
4	59,35	28,85	95,28
5	73,50	50,09	95,28
6	72,96	43,56	78,40
7	43,01	39,20	41,92
8	56,08	57,71	76,23
9	55,53	52,81	62,61
10	41,92	47,91	62,07
11	69,69	47,91	64,25
12	41,38	50,09	72,41
13	47,37	59,35	75,14
14	71,32	62,61	109,99
15	66,42	52,81	79,49
16	59,89	62,61	64,25
17	52,81	89,84	56,08
18	66,42	51,72	42,47
19	29,40	64,79	26,68
20	54,99	56,08	47,91
21	39,20	61,52	63,16
22	126,86	60,98	65,88
23	125,77	57,17	83,85
24	47,916	83,85	66,42
25	28,85	61,52	78,95
26	39,20	59,35	86,03
27	46,28	100,73	57,17
28	47,91	78,95	72,96
29	41,92	96,37	53,36
30	42,47	98,01	68,60
31	49,54	63,70	35,39
32	41,92	92,56	70,78
33	48,46	78,40	41,92
34	49,54	89,84	64,79
35	53,36	66,97	53,36

Tabla VIII. Resultados cuantitativos para el CI

N° orden	CI-subcultivo 1°	CI- subcultivo 2°	CI-subcultivo 3°
1	256,93	177,93	240,97
2	176,34	204,27	156,39
3	235,38	195,49	253,74
4	178,73	189,10	155,59
5	236,98	187,51	187,51
6	188,31	209,85	304,80
7	184,32	194,69	90,166
8	187,51	294,43	201,87
9	150,01	232,99	203,47
10	235,38	150,01	214,64
11	315,18	213,04	210,65
12	159,58	213,04	143,62
13	259,32	335,92	241,77
14	232,99	252,14	221,82
15	197,88	297,62	275,28
16	173,15	280,07	319,96
17	196,29	315,18	284,06
18	203,47	323,95	257,73
19	171,55	270,49	200,28
20	190,70	166,76	260,12
21	295,23	239,37	403,75
22	305,60	171,55	284,06
23	193,09	207,46	404,55
24	303,21	362,26	318,37
25	242,57	268,10	322,36
26	328,74	293,63	382,20
27	285,65	174,74	351,88
28	281,66	292,84	366,24
29	328,74	294,43	319,96
30	351,08	192,30	154,79
31	315,98	216,23	201,07
32	361,46	236,98	336,72
33	235,38	309,59	359,06
34	414,92	249,75	305,60
35	269,70	288,05	152,40

Tabla IX. Resultados cuantitativos para el K

N° orden	K-subcultivo 1°	K- subcultivo 2°	K-subcultivo 3°
1	383,50	296,85	461,95
2	428,62	271,73	473,23
3	464,00	246,10	377,35
4	492,20	416,32	407,60
5	578,84	217,90	380,43
6	509,63	313,26	591,66
7	548,59	253,79	369,15
8	392,73	329,15	432,72
9	499,89	318,90	528,60
10	382,48	261,99	379,40
11	489,63	373,76	520,40
12	464,51	365,04	472,71
13	527,57	491,68	447,59
14	468,61	469,64	453,23
15	574,74	512,71	592,69
16	518,86	549,62	599,35
17	471,18	476,82	758,81
18	415,29	455,79	537,83
19	491,17	572,69	465,02
20	476,30	368,63	599,35
21	329,15	493,73	571,67
22	569,10	319,41	692,15
23	570,64	339,92	790,59
24	199,95	378,89	714,20
25	532,70	551,67	638,32
26	405,04	378,89	711,12
27	484,51	416,32	632,68
28	227,13	534,24	722,40
29	545,52	538,34	707,53
30	281,47	494,25	335,82
31	481,43	582,95	688,56
32	338,38	427,08	673,70
33	262,50	776,24	710,10
34	443,49	667,54	673,70
35	294,29	587,56	366,07

SUBCULTIVO 1°	MEDIAS	DESV. ESTÁNDAR	SUBCULTIVO 2°	MEDIAS	DESV ESTÁNDAR	SUBCULTIVO 3°	MEDIAS	DESV ESTÁNDAR
[Na]	94,07	46,56	[Na]	97,84	32,26	[Na]	70,62	20,35
[Mg]	18,34	6,57	[Mg]	16,80	6,41	[Mg]	22,33	6,62
[P]	252,62	51,11	[P]	244,02	53,19	[P]	275,81	47,74
[S]	56,73	21,02	[S]	62,55	18,83	[S]	65,52	17,87
[Cl]	246,94	66,35	[Cl]	242,91	55,68	[Cl]	259,64	81,18
[K]	444,10	102,08	[K]	429,98	129,92	[K]	556,51	133,82

Tabla X. Valor de las medias y desviaciones estándar de cada elemento en los distintos subcultivos

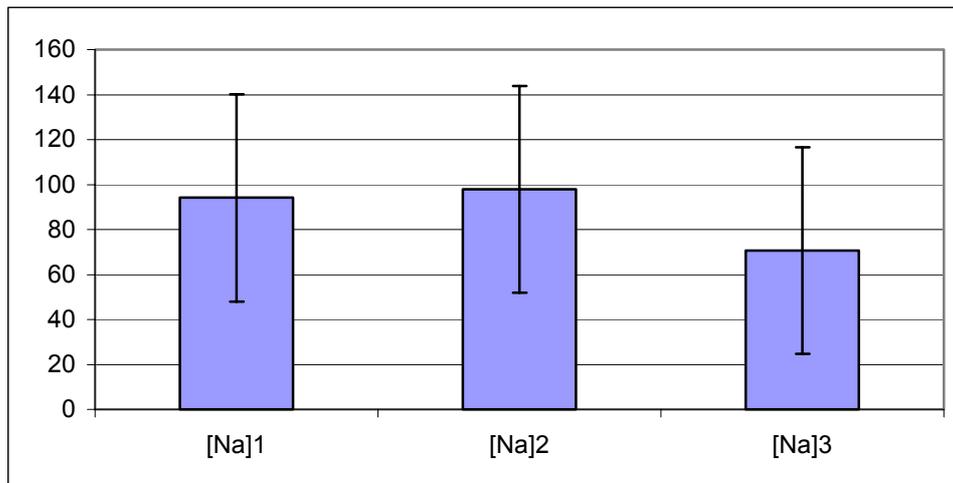


Figura 21

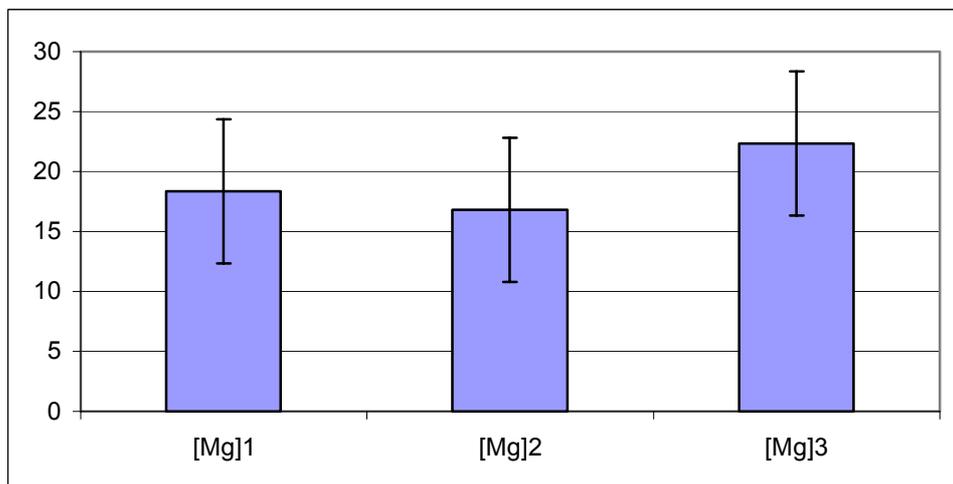


Figura 22

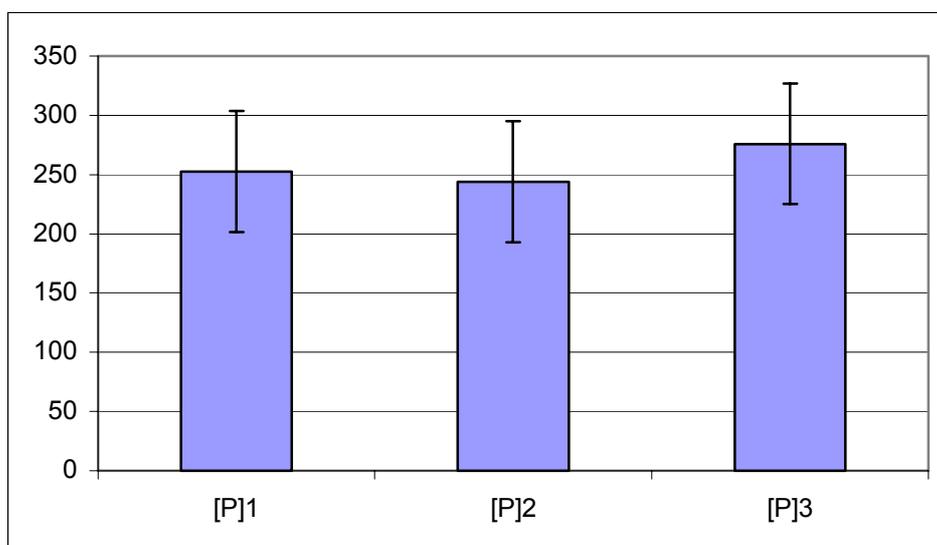


Figura 23

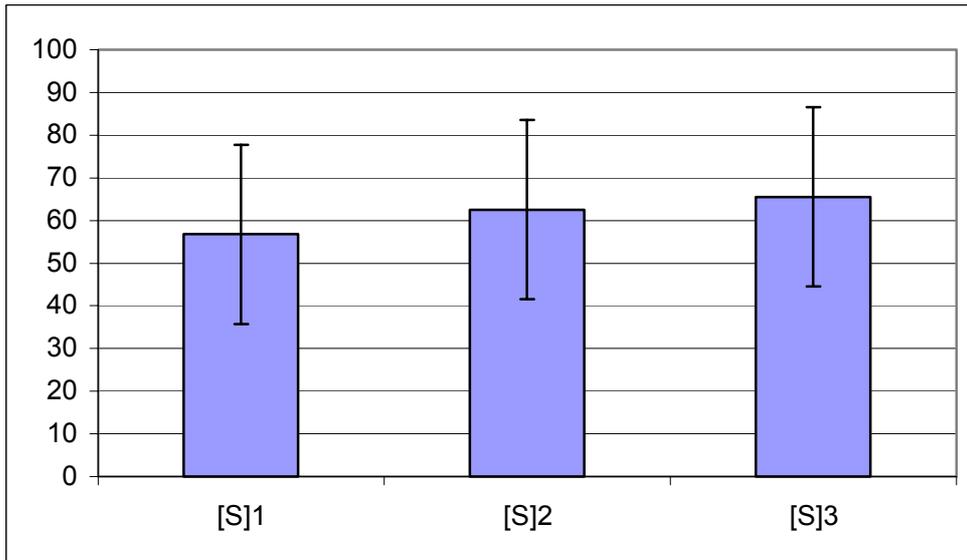


Figura 24

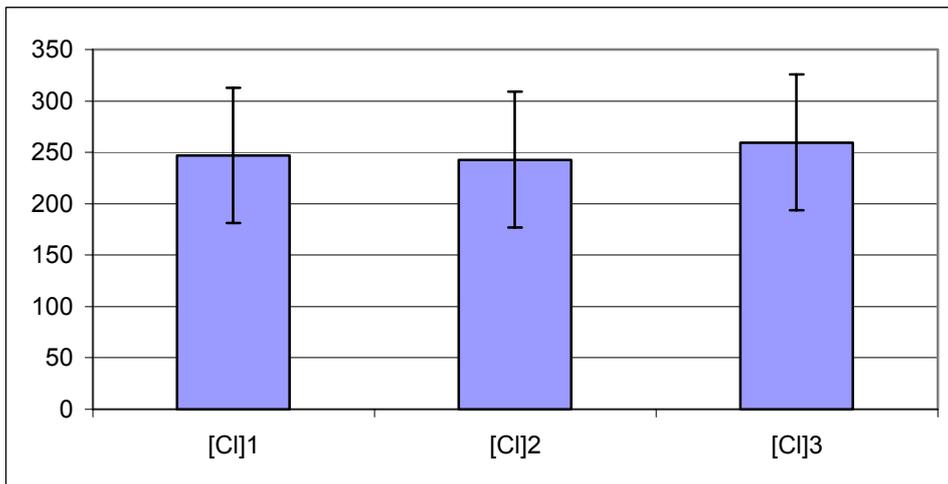


Figura 25

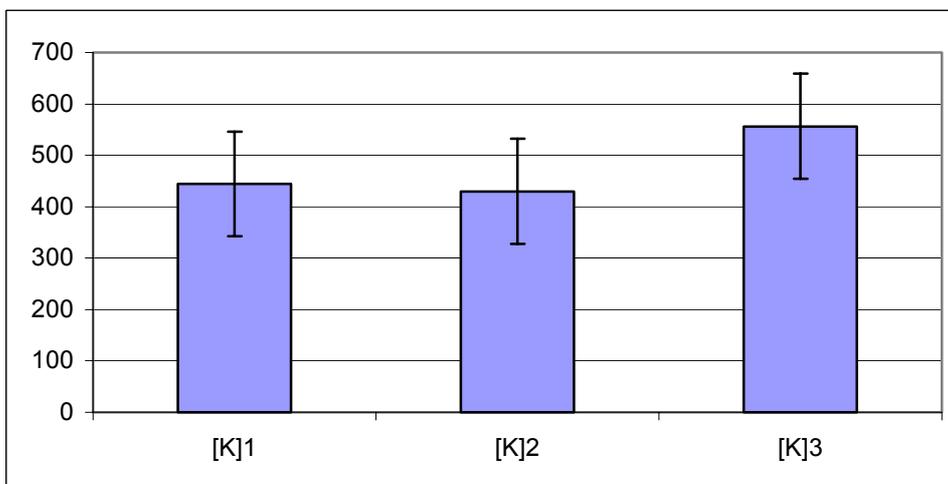


Figura 26

3) Resultados estadísticos

Para resolver el test de hipótesis planteado, (H_0 = no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de un elemento en sus distintas fases de subcultivo; H_1 = sí existen diferencias) consideramos nuestras muestras *relacionadas o apareadas* en sentido estadístico. Así, optamos por los test no paramétricos de Friedman y la W de Kendall. Se han subrayado los resultados estadísticamente significativos.

1.-Sodio

Prueba de Friedman

N	35
Chi-cuadrado	10,80
gl	2
Sig. asintót.	<u>,005</u>

Prueba W de Kendall

N	35
W de Kendall ^a	,154
Chi-cuadrado	10,80
gl	2
Sig. asintót.	<u>,005</u>

a: Coeficiente de concordancia

2.- Magnesio

Prueba de Friedman

N	35
Chi-cuadrado	12,89
Gl	2
Sig. asintót.	<u>,002</u>

Prueba W de Kendall

N	35
W de Kendall	,18
Chi-cuadrado	12,89
Gl	2
Sig. asintót.	<u>,002</u>

3.- Fósforo

Prueba de Friedman

N	35
Chi-cuadrado	5,20
gl	2
Sig. asintót.	<u>,074</u>

Prueba W de Kendall

N	35
W de Kendall	,074
Chi-cuadrado	5,20
Gl	2
Sig. asintót.	<u>,074</u>

4.- Azufre

Prueba de Friedman

N	35
Chi-cuadrado	6,34
Gl	2
Sig. asintót.	<u>,042</u>

Prueba W de Kendall

N	35
W de Kendall	,091
Chi-cuadrado	6,34
Gl	2
Sig. asintót.	<u>,042</u>

5.- Cloro

Prueba de Friedman

N	35
Chi-cuadrado	,44
gl	2
Sig. asintót.	<u>,80</u>

Prueba W de Kendall

N	35
W de Kendall	,006
Chi-cuadrado	,44
Gl	2
Sig. asintót.	<u>,80</u>

6.- Potasio

Prueba de Friedman

N	35
Chi-cuadrado	17,65
gl	2
Sig. asintót.	<u>< 0,01</u>

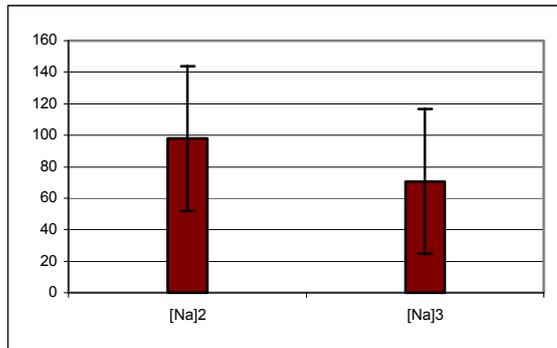
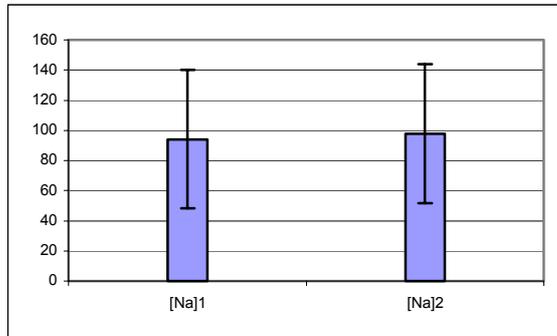
Prueba W de Kendall

N	35
W de Kendall	,25
Chi-cuadrado	17,65
Gl	2
Sig. asintót.	<u>< 0,01</u>

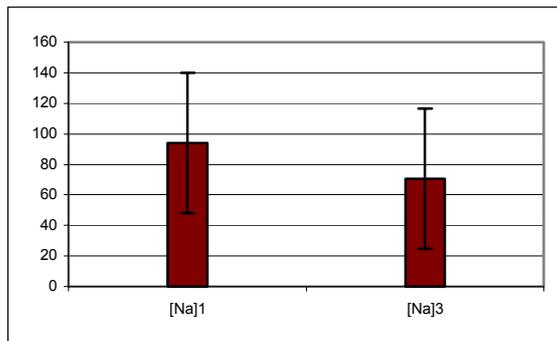
Para realizar un análisis estadístico de los distintos subcultivos con comparaciones 2 a 2 de las muestras utilizamos el test no paramétrico para muestras relacionadas de Wilcoxon que a continuación presentamos. Se han subrayado los resultados estadísticamente significativos. El número que aparece junto a cada elemento indica el subcultivo correspondiente, 1º, 2º ó 3º. En los histogramas se representan las medias de sendos subcultivos junto a una línea de tendencia, para objetivar en qué sentido se produce el incremento o descenso, dependiendo de cada caso. Igualmente se indica en leyenda paralela los casos en que las medias tienen diferencias estadísticamente significativas.

1.- Sodio

	[Na]2 - [Na]1	[Na]3 - [Na]2	[Na]3 - [Na]1
Sig. asintót. (bilateral)	,768	<,001	,024



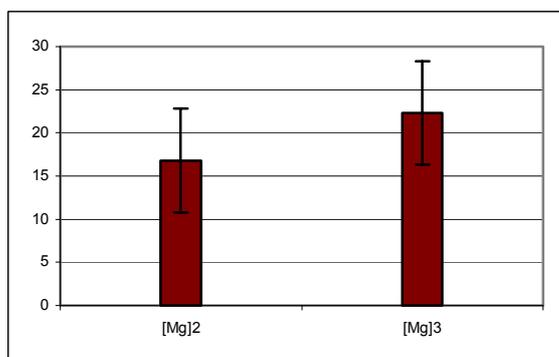
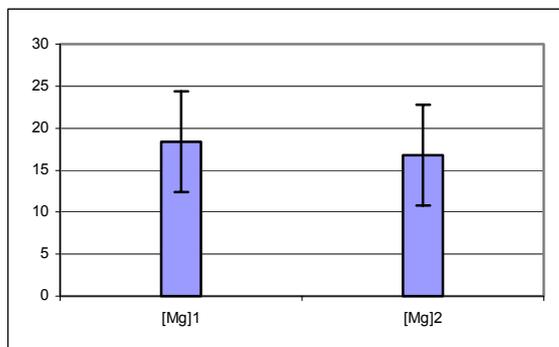
(Significación estadística)



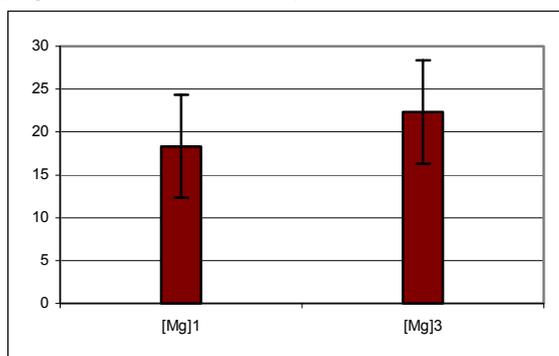
(Significación estadística)

2.- Magnesio

	[Mg]2 - [Mg]1	[Mg]3 - [Mg]2	[Mg]3 - [Mg]1
Sig. asintót. (bilateral)	<u>,294</u>	<u>,001</u>	<u>,042</u>



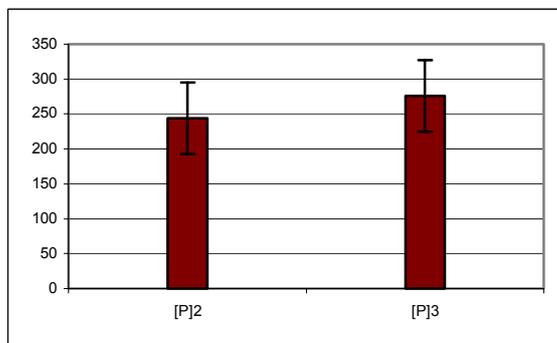
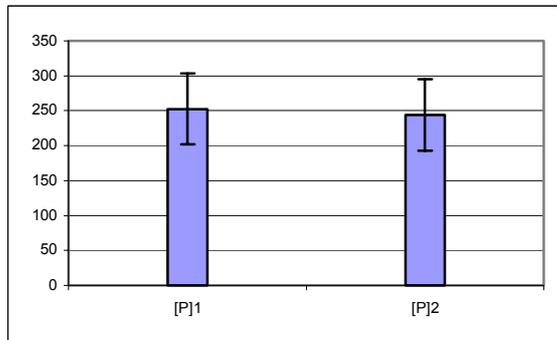
(Significación estadística)



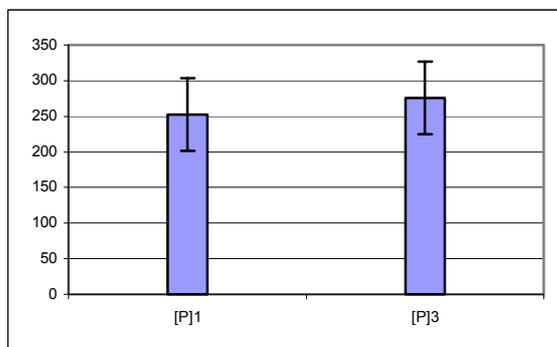
(Significación estadística)

3.- Fósforo

	[P]2 - [P]1	[P]3 - [P]2	[P]3 - [P]1
Sig. asintót. (bilateral)	,555	<u>,003</u>	,179

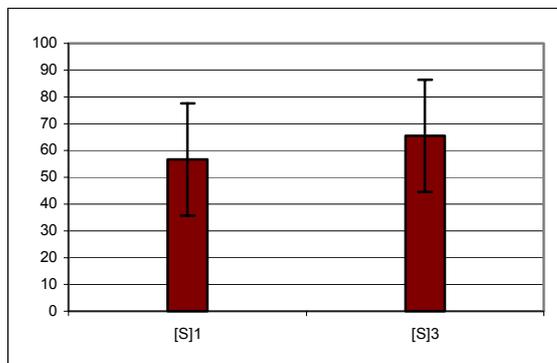
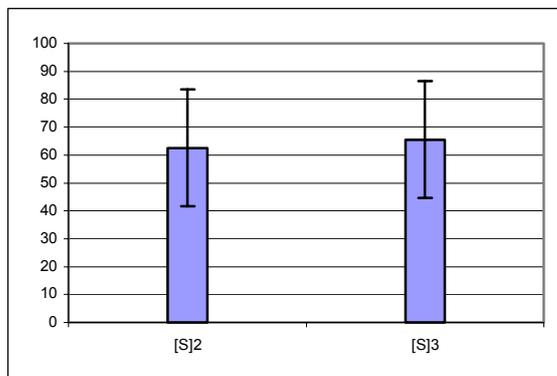
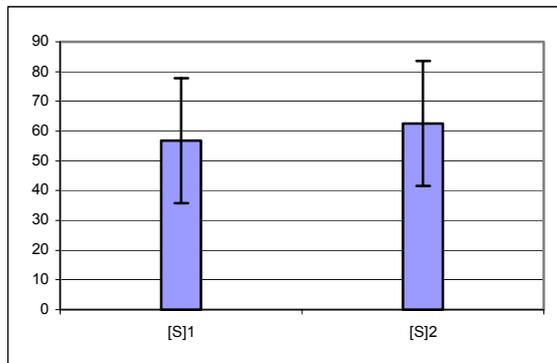


(Significación estadística)



4.- Azufre

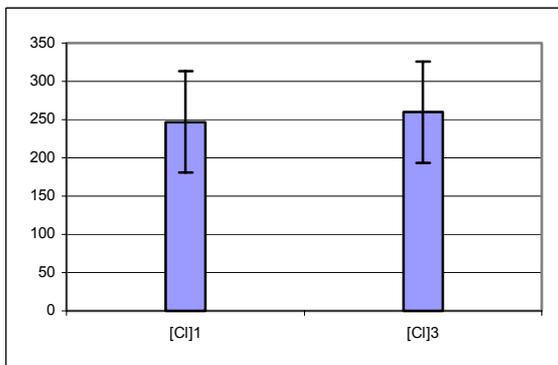
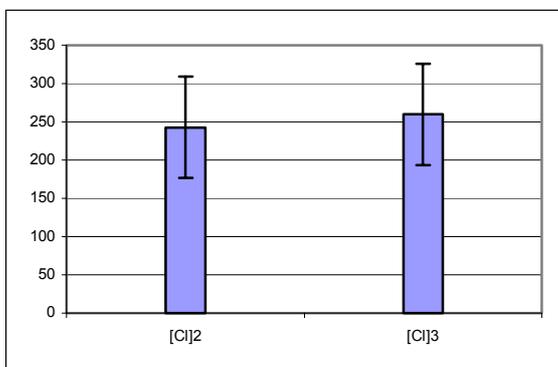
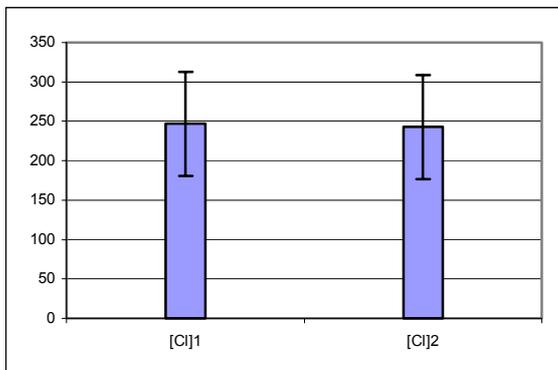
	[S]2 - [S]1	[S]3 - [S]2	[S]3 - [S]1
Sig. asintót. (bilateral)	,229	,561	<u>,015</u>



(Significación estadística)

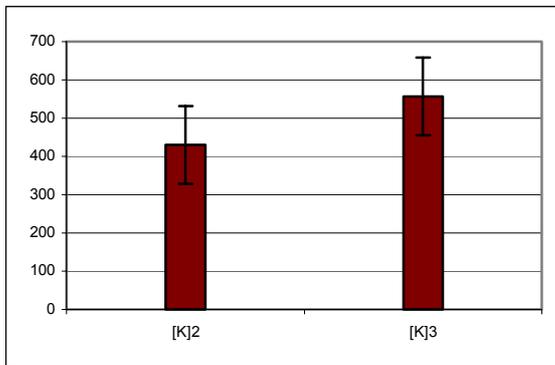
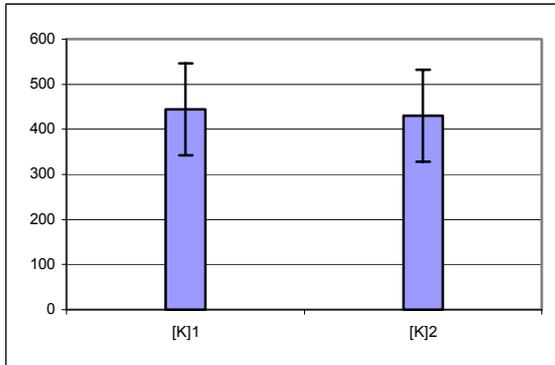
5.- Cloro

	[C]2 - [C]1	[C]3 - [C]2	[C]3 - [C]1
Sig. asintót. (bilateral)	,806	,278	,404

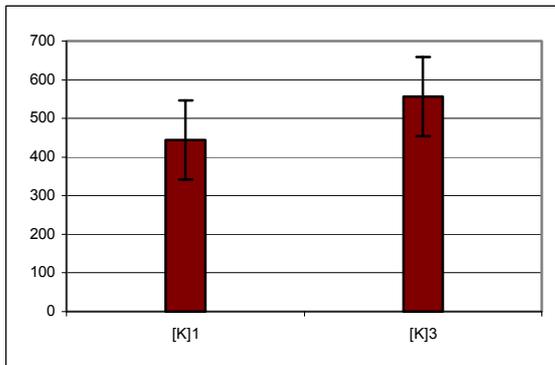


6.- Potasio

	[K]2 - [K]1	[K]3 - [K]2	[K]3 - [K]1
Sig. asintót. (bilateral)	,404	<u>≤,000</u>	<u>≤,001</u>



(Significación estadística)



(Significación estadística)

DISCUSIÓN.-

La construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización médica para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos, es, como indicamos en la introducción de la presente Tesis Doctoral, a lo que desde hace apenas quince años se denomina Ingeniería Tisular. Aunque su desarrollo se remonta aproximadamente a más de 25 años, este término se acuñó en 1987 cuando el Profesor Fung, de la Universidad de California, en San Diego (USA) lo propuso en una reunión de la National Science Foundation de Estados Unidos. Desde entonces, el desarrollo de la Ingeniería Tisular ha sido espectacular y la construcción de tejidos para su uso en medicina empieza a configurarse como una línea de investigación fundamental en universidades y hospitales (Campos A, 2004).

Tres son los componentes utilizados en Ingeniería Tisular para construir tejidos artificiales: células, matrices extracelulares y señales moleculares de distinta naturaleza (factores de crecimiento).

En las dos últimas décadas, la investigación en el uso de materiales como sustitutos vasculares ha girado en torno a la mejora de sus características intrínsecas y de su interacción con el tejido huésped: endotelización, porosidad e integración en el tejido huésped, generación de hiperplasia en los lugares de anastomosis, adsorción de proteínas plasmáticas, etc; todo ello, con la finalidad de prolongar su permeabilidad primaria (Xue L, 2000). Hasta la fecha, los materiales sintéticos más usados han sido el PTFEe (politetrafluoroetileno expandido) y el Dacron (polietil-entereftalato). Para aumentar su permeabilidad han surgido varias líneas de investigación, como se expuso en el capítulo introductorio. Así, se ha trabajado en el sentido de su impregnación de la superficie luminal con carbono, silicona, gelatina, albúmina, colágeno y en la creación de injertos de material biodegradable que sirven como andamiaje de la neoíntima (Xiao L, 2004; Prasad-Chennazhy K, 2005).

Los materiales biológicos heterólogos utilizados son los injertos criopreservados de donante que, sin embargo, no están exentos de problemas como las fracturas espontáneas durante su descongelación, la formación de pseudoaneurismas, la denudación endotelial y consecuente trombosis (Pascual G, 2004).

En los últimos años se ha reorientado la búsqueda de una mayor permeabilidad en la línea de hacer lo más semejante al vaso natural el injerto vascular. Por ello se ha trabajado en el sentido de recubrir de células endoteliales en monocapa o en cocultivos junto a fibroblastos o células musculares lisas la superficie luminal de injertos, incluso de stents. La selección de células endoteliales que van a formar parte del biomaterial se hace a partir de cultivos o cocultivos a partir de fuentes humanas (Zünd G, 1998; Sullivan S, 2000; Thomas AC, 2003; Mitchell Sh, 2003; Buján J, 2004; Rashid S, 2004).

En la presente Tesis Doctoral hemos pretendido esclarecer si existen diferencias entre los perfiles iónicos de las células endoteliales en distintas fases de subcultivo, precisamente para inferir de ello el momento en el que es posible disponer de una población celular más viable, estable y equilibrada con vistas a su utilización en estos biomateriales.

Por otra parte, las recientes técnicas de Ingeniería Tisular, que tienen por objetivo la elaboración de constructos vasculares, necesitan células endoteliales asimismo viables para asegurar la idoneidad estructural y funcional del nuevo órgano.

Resulta evidente que las células más apropiadas para el implante en materiales protésicos y en constructos vasculares deben ser las células endoteliales. Su obtención a partir de arterias humanas es inviable y aunque a partir de venas safenas no lo es, su extracción requiere, sin embargo, una flebectomía quirúrgica. Por ello, en seres humanos, la fuente más extendida para la obtención de esta estirpe celular ha sido y es la vena procedente de cordón umbilical (Jaffe E 1973; Bouïs D, 2001). En el presente trabajo se ha escogido esta fuente como base para la obtención de células endoteliales debido en primer lugar a la relativa facilidad de obtención de dicho material biológico humano. Un material fresco, ya que no requiere intervención quirúrgica. Otra de las ventajas de la utilización de venas umbilicales es la facilidad de obtener células endoteliales a partir de su superficie luminal por simple perfusión de la luz endotelial venosa con enzimas proteolíticas (Jaffe E 1973; Gimbrone MA 1974), lo cual contrasta con la dificultad de perfundir las arterias umbilicales debido al alto grado de vasoconstricción a la que están sujetas (Mano Y 1983). El tratamiento con colagenasa

de tipo I de monocapas endoteliales es el menos agresivo para la integridad de los lípidos de la membrana de las células endoteliales (Thilo 1980; Kirkpatrick 1985; Sharefkin 1987). La utilización de cordones umbilicales como fuente de obtención de células endoteliales, también presenta una serie de inconvenientes. En primer lugar, nos encontramos con el bajo número de células obtenido, así como la falta de control sobre algunas variables, tales como la posibilidad de una cierta hipoxia fetal y los posibles daños que puedan provocar en el endotelio de la vena umbilical la administración de anestésicos a la madre (Gimbrone MA 1976, García-Honduvilla 2001). Para reducir ese posible factor de confusión sólo hemos aceptado cordones umbilicales de madres sin antecedentes personales de interés y a través de partos o cesáreas sin sufrimiento fetal.

Una vez extraídas las células y puestas en cultivo pudimos apreciar cómo en un cultivo primario las características presentes en las células endoteliales que forman la monocapa así como la estructura y disposición de la misma, coinciden plenamente con lo expuesto por la mayoría de los autores (Jaffe E, 1973; Gimbrone MA, 1974; Emeis 1983, García-Honduvilla 2001).

Otro punto de interés es el número de subcultivos que las células endoteliales son capaces de soportar sin sufrir modificaciones morfológicas y/o funcionales. En términos de ingeniería tisular, parece evidente pensar que las células para utilizar en la siembra de la superficie de los distintos biomateriales deben guardar la máxima similitud con las observadas en los tejidos naturales y, por ello, deben permanecer en cultivo el tiempo necesario que nos permita obtener la densidad celular suficiente para asegurarnos el completo recubrimiento de la superficie de la prótesis o del constructo.

Para algunos autores (García-Honduvilla N, 2001) las células endoteliales son capaces de mantener sus características durante los primeros subcultivos, comenzando un proceso de grandes cambios a partir del tercer subcultivo y una clara degeneración a partir del quinto. En células endoteliales corneales estudios recientes demuestran asimismo que, a partir del cuarto subcultivo, las células comienzan un proceso de degeneración y senescencia (Zhu J, 2004). En opinión de distintos autores, cualquier célula endotelial *in vitro* puede, en óptimas condiciones, lograr hasta diez generaciones sucesivas, hasta 5 meses, antes de entrar en una fase de senescencia; si bien, sabemos

que cultivar dichas células endoteliales conduce a la pérdida de funciones específicas y la introducción de características metabólicas distintas, no presentes *in vivo*. (Jaffe E, 1973; Bouïs D, 2001). Además, la tripsina, necesaria para levantar la monocapa semiconfluente y proceder al subcultivo, daña la estructura celular y la composición lipídica de la membrana plasmática de las células endoteliales. Asimismo, puede –en calidad de enzima proteolítica- actuar sobre enzimas reguladoras del ciclo de la prostaciclina, como es la ciclooxigenasa (Balconi G, 1986; García-Honduvilla, 2001), pudiendo influir indirectamente en otras proteínas estructurales alterando su equilibrio celular.

Por el mismo motivo, entenderemos la principal ventaja de adaptar y cultivar las células endoteliales directamente sobre la rejilla de microanálisis: analizamos las células sin la intervención de procedimientos intermedios (tripsinización) que pueden ocasionar daños en la membrana celular causando alteraciones en la permeabilidad celular y originando cambios en la composición elemental (Warley A, 1994).

Partiendo de estas premisas, hemos pretendido establecer el momento más adecuado según criterios de estabilidad iónica. En esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo tres subcultivos distintos a partir del primocultivo. Nuestro objetivo ha sido, como indicamos con anterioridad, establecer los patrones microscópicos y microanalíticos de viabilidad en los mismos, utilizando las nuevas técnicas de la Microscopía Electrónica Analítica sustentada en la emisión de electrones retrodispersados y de energía dispersiva de rayos X.

En el primocultivo, la célula endotelial se encuentra en un periodo de adaptación al medio de cultivo, lo cual se traduce en un crecimiento mucho más lento y en una mayor cantidad de tiempo para la formación de la monocapa. A partir de este periodo de aclimatación, 7 a 10 días, las células endoteliales comienzan a dividirse con mayor rapidez entrando en una fase exponencial de crecimiento durante los primeros subcultivos, fase que se mantiene hasta nuestro tercer subcultivo.

El medio utilizado para el transporte y lavado de los cordones umbilicales – MEM- contiene una fuente de energía y de aminoácidos en alta concentración, elimina

el calcio para permitir crecimiento celular en suspensión, y está enriquecido con bicarbonato sódico y libre de endotoxinas, como principales cualidades. El medio utilizado para el cultivo celular, M199, tiene mucho interés actualmente en cultivos de células adherentes. Tiene aminoácidos (L-glutamina), vitaminas, ácidos nucleicos y metabolitos intermediarios, suero fetal bovino y ECGF como principales suplementos para el anabolismo. El suero fetal bovino debe ser inactivado por calor previamente con el fin de destruir las moléculas del complemento y algunas inmunoglobulinas reactivas que pueda contener. Este suero contiene factores de crecimiento de pequeño peso molecular unidos a las proteínas o formados por ellas, por proteólisis, como es el caso de la fetuina. Uno de los principales beneficios de este suero es la inhibición de la proteólisis por agentes tales como la tripsina, usada para los diferentes subcultivos. Ambos medios, MEM y M199 fueron elegidos en nuestro estudio en base a la buena experiencia de otros autores con células endoteliales (García-Honduvilla, 2001).

La técnica usada para la extracción de células endoteliales fue establecida inicialmente por Jaffe y utilizada desde entonces de forma habitual para ello. (Jaffe E, 1973) Si bien se puede modificar en cuestiones o detalles menores, en esencia ha demostrado su alta fiabilidad y rendimiento en la extracción de células endoteliales sin contaminaciones (García-Honduvilla N, 2001).

En relación a los procedimientos de preparación de muestras biológicas para microscopía electrónica, los métodos convencionales, que tienen por base la utilización de fijadores químicos, deshidratación, inclusión en material plástico, polimerización a temperaturas altas y ultracorte, no constituyen un método adecuado para preservar la integridad en el contenido elemental. En nuestro trabajo, por el contrario, hemos llevado a cabo técnicas de criopreparación que constituyen, en la actualidad, métodos ideales para el estudio de la composición elemental y, muy especialmente, de los elementos difusibles de células y tejidos mediante técnicas microanalíticas (Zierold K, 1988).

Hasta el presente, el estudio de la viabilidad de las células en cultivo se ha realizado básicamente utilizando el método de azul de tripán sobre una cámara de Neubauer. Como se vió en el capítulo de material y métodos, se trata de una cámara de conteo adaptada al microscopio óptico, que permite hacer un cálculo del número de

células existente en un volumen fijo. El azul tripán es un colorante soluble en agua, altamente tóxico, que posee grupos cargados amino y sulfato que le impiden atravesar membranas celulares intactas. Es por ello que tiñe tan sólo las células muertas o con daños groseros en su membrana celular, resultando de interés para calcular el número de células y su viabilidad.

Como sabemos, el proceso de muerte celular programada a nivel morfológico, con microscopía óptica y electrónica, se caracteriza por la sucesión de una serie de signos concretos, como son: a) la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, que conlleva la pérdida de contacto con las células vecinas y la adquisición de una forma redondeada; b) la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear sin que se pierda la envoltura nuclear; c) la disgregación del núcleo en masas pequeñas de cromatina; paralelamente se produce una disminución del volumen citoplasmático debido a la pérdida de agua y la condensación de las proteínas, aunque la mayoría de los orgánulos celulares permanecen intactos y, d) la rotura de la célula en vesículas rodeadas de membrana llamadas cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por los macrófagos o por células vecinas (Choy J, 2001).

De esta forma entendemos que la técnica del azul tripán sólo distinguiría a aquella célula en fase tardía de apoptosis, puesto que durante las distintas fases se mantiene la integridad de la membrana celular.

Uno de los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar la viabilidad celular mediante la aplicación de la Microscopía Electrónica Analítica. La aplicación de la microscopía electrónica analítica permite analizar *in situ* la composición química de las muestras al tiempo que su observación morfológica. Existe un amplio número de técnicas analíticas para estimar el contenido de los elementos inorgánicos en los especímenes biológicos, como adelantábamos en el capítulo introductorio (espectroscopia por absorción atómica, fotometría de llama) (Carini R, 1995; 1997; 2000), pero requerían un número elevado de células, consideran uno o dos cationes simultáneamente y no proporcionaban información sobre la localización subcelular debido a su baja resolución microscópica. Por el contrario, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X posibilita correlacionar la información estructural con

el contenido elemental y permite el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones ($Z \leq 11$) presentes en el espécimen irradiado por el haz de electrones, en cada uno de los elementos celulares (Crespo PV, 2001).

En nuestras células endoteliales hemos analizado en todo caso el área celular correspondiente al núcleo, para que la muestra sea homogénea. Para localizar esta estructura subcelular nos guiamos por la técnica de electrones retrodispersados, evitando en todo caso analizar citoplasma fuera del área nuclear, que en opinión de expertos puede ser en términos microanalíticos algo distinto (Roomans GM, 1999). La morfología de la célula es perfectamente valorable con el barrido. En nuestros resultados es posible evidenciar en los tres subcultivos que los patrones microscópicos poseen un carácter ortotípico sin presentar signos preapoptóticos, como los que se evidencian en otras circunstancias clínicas y experimentales.

Además de una morfología ortotípica, cada célula analizada posee un determinado perfil iónico. El análisis pone de relieve, en los espectros obtenidos, la presencia de los elementos Na, Mg, P, S, Cl y K. Las células lavadas según el procedimiento descrito en el capítulo de material y métodos, presentan un perfil típico de equilibrio intracelular, con altos niveles cualitativos y cuantitativos de P y K. El contacto breve con el agua desionizada no altera la permeabilidad de su membrana y no causa redistribución de los distintos elementos, especialmente de los difusibles como Na, Cl y K, pudiendo lavarse así la superficie celular de restos del medio de cultivo. 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 más efectiva (Roomans GM, 1991; Warley A, 1994; Fernandez-Segura E, 1997b); solución ésta que fue utilizada por nuestro grupo para este trabajo de investigación doctoral.

Las células que pudieran tener un lavado insuficiente presentan un espectro de alto contenido en Na y Cl, artefactos que se originan restos de medio de cultivo en el exterior de la membrana citoplasmática.

En el análisis microanalítico cuantitativo de nuestros tres subcultivos hemos encontrado numerosas diferencias en rango estadísticamente significativo entre las concentraciones medias de los distintos elementos a lo largo de los tres subcultivos. De modo general, todos los elementos analizados aumentan progresivamente con cada subcultivo, excepto el ion Na, que desciende. En el caso del Cl no obtenemos significación en los datos.

En el análisis microanalítico cuantitativo de nuestros tres subcultivos, hemos encontrado numerosas diferencias significativas entre las concentraciones medias de los distintos elementos a lo largo de los tres subcultivos.

En este sentido, los niveles de Na disminuyen progresivamente y lo hacen de modo muy significativo entre el segundo y el tercer subcultivo. Por otra parte, el K incrementa sus niveles de manera asimismo significativa entre el segundo y el tercer subcultivos.

Bauer (Bauer 1976) y con posterioridad Roomans (Roomans GM, 2001) han establecido que microanalíticamente las concentraciones intracelulares de Na y K constituyen uno de los indicadores más sensibles y fiables de viabilidad celular. Roomans sugiere, además, que el cociente o razón K/Na constituye un excelente indicador del daño celular, desde el punto de vista microanalítico.

Nuestros datos revelan que en ninguno de los tres subcultivos se produce la inversión del cociente de viabilidad arriba indicado, esto es, ni aumenta el Na, ni disminuye el K, lo que quiere decir que al menos, microanalíticamente, hasta el nivel del tercer subcultivo, no existe indicio significativo de daño celular.

La determinación microanalítica de P y S indica que existe un progresivo incremento en ambas concentraciones.

El P es un elemento que se relacionado desde el punto de vista microanalítico con la masa celular analizada, concentración de constituyentes orgánicos intracelulares, contenido en ácidos nucleicos y nivel de fosforilación celular. Roomans (Roomans,

2002 b) indica que la concentración de fósforo permanece constante en células que no muestran un daño estructural. Por el contrario, las células caracterizadas por un daño estructural grave se caracterizan por una disminución en la concentración intracelular del fósforo.

Por otra parte, los valores de azufre constituyen un indicador microanalítico del contenido de proteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos a nivel celular (Sánchez-Quevedo, 1989, Roomans 2002).

Los resultados obtenidos en nuestra Tesis Doctoral ponen de relieve que la célula endotelial desarrolla a través de los sucesivos subcultivos estudiados, un progresivo proceso de síntesis de componentes estructurales vinculados al componente proteico y a la presencia de glicosaminoglicanos. De ello cabe deducir la preservación activa del aparato biosintético celular en los sucesivos pases de cultivos estudiados.

Los valores del Mg en nuestro estudio se incrementan progresivamente desde el primero al tercer subcultivo, siendo asimismo muy significativos estadísticamente la diferencia entre los valores de Mg existentes entre las células endoteliales del tercer subcultivo y las del primer y segundo respectivamente. El Mg es un catión divalente que interviene en un número muy amplio de reacciones intracelulares. El mismo es posible verlo en su forma iónica Mg^{2+} que interviene en reacciones de fosforilación y replicación de ADN. Estudios previos han demostrado un descenso en la concentración elemental del Mg en correlación al descenso en la concentración de ATP (Buja et al, 1985; Di Francesco et al, 1998).

En nuestros resultados el incremento de las cifras del Mg ha de asociarse en sentido contrario a lo que indican los estudios antes citados, un incremento de la concentración de ATP y en consecuencia a una idónea actividad de las estructuras mitocondriales y enzimáticas vinculadas a formación de ATP en las células endoteliales.

Finalmente nuestro estudio microanalítico pone de relieve que los niveles de Cl no se modifican de forma significativa en las células endoteliales de los tres subcultivos. Algunos autores (Fernández-Segura E, 1999b; Yu SP, 2001) han demostrado que el

descenso del Cl es un indicador precoz de la apoptosis que en general coincide con la disminución de K y el aumento de Na. Asimismo, Skepper (Skepper JN, 1999) describe resultados microanalíticos similares en modelos de apoptosis en macrófagos.

Recientemente estos hallazgos han sido confirmados en células prostáticas tratadas con etopósidos (Salido 2001, 2004).

Resulta evidente que la no disminución de los niveles de Cl existentes en las células endoteliales y las cifras por una parte disminuidas del Na y aumentadas de K son indicativos de que las células endoteliales en el tercer subcultivo no han iniciado ningún proceso de muerte celular, lo que las hace especialmente idóneas junto a los datos de actividad biosintética antes indicados para su utilización en endotelización de injertos y constructos tisulares.

Con respecto al método estadístico, de un modo general se dice que dos muestras son independientes cuando las observaciones de una de ellas no condicionan para nada a las observaciones de la otra, siendo dependientes o apareadas en caso contrario. En nuestro planteamiento, es evidente que la determinación de los elementos del citoplasma se relaciona estrechamente entre las sucesivas generaciones celulares. En Estadística, con frecuencia hay dos o más métodos distintos para resolver un mismo test de hipótesis y en tal caso debe elegirse el método más potente (que a igualdad de error alfa proporcione mayores significaciones). Los métodos no paramétricos resultan válidos en todo caso, sea cual sea la variable aleatoria de partida. Así, su aplicación no precisa de la hipótesis de Normalidad, que no tiene por qué ser verificada ni comprobada. Por todos estos motivos, se ha optado por los test de Wilcoxon, Friedman y Kendall.

CONCLUSIONES.-

1) La metodología de extracción, provisión y cultivo de células endoteliales humanas utilizada en la presente Tesis Doctoral, permite la evaluación de la viabilidad celular de dichos elementos con criterios microscópicos y microanalíticos; sin generar alteraciones artefactuales. Dicha metodología permite, asimismo, la correlación de ambos criterios en el proceso de evaluación.

2) La evaluación microscópica de la células endoteliales humana con Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Barrido con electrones secundarios y retrodispersos, es eficaz para determinar que en los tres primeros subcultivos, existe un patrón microscópico endotelial de carácter ortotípico, sin que se evidencie signo alguno de naturaleza preapoptótica ni degenerativa.

3) La evaluación con Microscopía Electrónica Analítica por Energía Dispersiva de Rayos X de las células endoteliales humanas, es capaz de demostrar, con significación estadística, patrones microanalíticos de perfil iónico diferente en los tres subcultivos estudiados, sin que ello evidencie signo alguno de carácter preapoptótico ni degenerativo.

4) La evaluación con Microscopía Electrónica Analítica cuantitativa por Energía Dispersiva de Rayos X de las células endoteliales humanas, pone de relieve el incremento progresivo del ion K en los tres subcultivos estudiados; y su correlación con la disminución progresiva del Na. El incremento progresivo de esta relación, K/Na, en presencia de un nivel mantenido de Cl a lo largo de los tres subcultivos estudiados, constituye un excelente indicador de viabilidad celular, útil para asegurar la idoneidad biológica de las células endoteliales a aplicar en terapéutica.

5) La evaluación con Microscopía Electrónica Analítica cuantitativa por Energía Dispersiva de Rayos X muestra que en los tres subcultivos estudiados, existe un progresivo incremento de P, S y Mg que se relaciona con el progresivo aumento en los tres primeros subcultivos de la actividad proliferativa y biosintética de las células endoteliales, lo que asimismo evidencia su idoneidad biológica para la aplicación terapéutica.

6) La evaluación microscópica y microanalítica de las células endoteliales humanas, permite determinar la viabilidad celular de las mismas y su idoneidad biológica para la terapéutica, utilizando criterios morfológicos (Microscopía Óptica y Microscopia Electrónica de Barrido con electrones secundarios y retrodispersos) e indicadores microanalíticos (Energía Dispersiva de Rayos X), vinculados a los niveles de Na, K, Cl, P, S y Mg, sin que se generen alteraciones artefactuales significativas.

BIBLIOGRAFIA .-

A

Abizaid A, Albertal M, Costa MA, Abizaid AS, Staico R, Feres F, Mattos LA, Sousa AG, Moses J, Kipshidize N, Roubin GS, Mehran R, New G, Leon MB, Sousa JE. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Mar 17;43(6):1118-21

Armstrong JY. Quantitative elemental análisis of individual microparticles with electrón beam instruments. In: Heinrich KFJ and Newbury DE Eds. *Electrón probe cuantitation*. Plenum Press, New York. 1991;261-315

B

Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res*, 2000; (42); 1: 9-19

Balconi G, Dejana E. Cultivation of endothelial cells: limitations and perspectivas. *Med Biol* 1986, 64:231-245

Barbosa-Barros M. Óxido nítrico: un campo abierto para la Angiología y la Cirugía Vasculat. *Angiología* 2002; 54: 472-91

Bauer PS, Bolton WE, Barranco SC. Electrón microscopy and microchemical análisis of the cystic fibrosis diploid fibroblast in vivo. *Texas Rep Biol Med* 1976; (34):113-136

Bode-Böger SM, Böger RH, Alfke H, Heinzel D, Tsikas D, Creutzig A, Alexander K, Fröhlich J. L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1996; (93):85-90

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Fröhlich J. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997; 95:2068-2074

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Fröhlich J. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1336-1344

Boekestein A, Stols ALH, Stadhouders. Quantitative in X-ray microanalysis of biological bulk specimens. *Scanning Electron Microsc* 1980;(II):321-324

Boekestein A, Thiel F, Stols ALH, Bouw E, Stadhouders A. Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic sample. *J Microsc* 1984;(134):327-334

Bouïs D, Hospers G, Meijer C, Molema G, Mulder N. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessels –related research. *Angiogenesis* 2001;(4): 91-102

Buja LM, Hagler HK, Parsons D, Chien K, Reynolds RC, Willerson JT. Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid. *Laboratory Investigation* 1985; (53):397-411

Buján J, Garcia-Honduvilla N, Bellón JM. Engineering conduits to resemble natural vascular tissue. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004 Feb;39(Pt 1):17-27

Burbridge MF, Coge F, Galizzi J, Boutin J, West D, Tucker G. The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. *Angiogénesis* 2002; (5):215–226

Busse R, Fleming I, Hecker M. Endothelium-derived bradykinin: implications for angiotensin-converting enzyme-inhibitor therapy. *J CardiovascPharmacol* 1993;22(Supl 5):3

Butnor KJ, Sporn TA, Ingram P, Gunasegaram S, Pinto JF, Roggli VL. Beryllium detection in human lung tissue using electron probe X-ray microanalysis. *Mod Pathol*. 2003;16(11):1171-7

C

Campos A, Rodríguez IA, Sanchez-Quevedo MC, Garcia JM, Nieto-Albano OH, Gomez de Ferraris ME. Mineralization of human premolar occlusal fissures. A quantitative histochemical microanalysis. *Histol Histopathol.* 2000 Apr;15(2):499-502

Campos A. Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina Española. Instituto de España. Real Academia Nacional de Medicina. 17 de Febrero 2004.

Carini R, Autelli R, Bellomo G, Dianzani MU, Albano E. Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochim Biophys Res Commun* 1995;(206):180-185

Carini R, Bellomo G, De Cesaris MG, Albano E. Glycine protect against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na⁺ overload in the rat. *Hepatology* 1997; (26):107-112

Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Bellomo G, Albano E. Alterations of Na⁺ homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *Biochim Biophys Acta* 2000;(1500):297-305

Chang Ch, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology* 2001;(11): S37-S43

Chiu Y, Kusano K, Thomas T, Fujiwara K. Endothelial Cell-Cell Adhesion and Mechanosignal Transduction *Endothelium*, 11:59–73, 2004

Choy J, Granville D, Hunt D, McManus B. Endothelial Cell Apoptosis: Biochemical Characteristics and Potential Implications for Atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 2001;(33):1673–1690

Collen A, Koolwijk P, Kroon M and van Hinsbergh V. Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 1998; 2; 153±165

Collison DJ, Donnelly R. Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: can biotechnology produce an effective collateral circulation?. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; (28):9-23

Crespo PV, López Escamez JA, Cañizares FJ, Campos A. X-ray microanalytical determination of P, S and K concentration in the gelatinous membrane of the utricle. *Acta Otolaryngol* 1993;(113):176-180

Crespo PV, Arrebola F, Zabiti S, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Fernández-Segura E, Campos A. Preparation of cultured cells for study of intracellular element concentrations by x-ray microanálisis using a Scanning electrón microscope. *Scanning* 2001; (23):138-139

D

De La Cruz C, Haimovich B, Greco R. Immobilized IgG and fibrinogen differentially affect the cytoskeletal organization and bactericidal function of adherent neutrophils. *J Surg Res.* 1998 (80):28–34

Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Sella A. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;(19):656-664

E

Egashira K, Hirooka Y, Kuga T, Mohri M, Takeshita A. Effects of L-arginine supplementation on endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms. *Circulation* 1996;94:130-134

Emeis JJ, Van Hinsbergh VM, Verheijen JH, Wijngaards G. Inhibition of tissue-type plasminógeno activator by conditioned medium from cultured human and porcine vascular endothelial cells. *Biochem & Biophys Res. Communications* 1983; 110(2):392-398

Esmon Ch. Crosstalk between inflammation and trombosis. *Maturitas* 2004, 47:305-314

F

Fathi MH, Salehi M, Saatchi A, Mortazavi V, Moosavi SB. In vitro corrosion behaviour of bioceramic, metallic, and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants. *Dent Mater.* 2003 May;19(3):188-98

Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Backscattered electron imaging of cultured cells: application to electron probe X-ray microanalysis using a Scanning electron microscope. *J Microscopy* 1997; 188:72-78

Fernandez-Segura E (b), Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A (1997a) Electron probe x-ray microanalysis of cultured epithelial tumor cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* 21:665-669.

Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Campos A, Warley A. A procedure to prepare cells in suspension for electron probe X-ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscopy. *J Microscopy* 1999; 196:19-25

Fernández-Segura E(b), Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe x-ray microanalysis. *Experimental Cell Research* 1999; 253:454-462

Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Mechanosensor on Endothelial Cells. *Circ Res.* 2003;93:e136-e142

Folkman J, Haudenschild C, Zetter BR. Long term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5217-21

Freedman DA, Folkman J. CDK2 translational down-regulation during endothelial senescence. *Experimental Cell Research* 2005; (307):118-130

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;(288):373-6

G

García Honduvilla, N. Ingeniería Tisular: células mesoteliales versus células endoteliales en la creación de bioprótesis vasculares. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá de Henares. 2001

Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture: growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1974, 60:673-684

Goldstein JI, Roming AD, Newbury DE, Lyman CE, Echlin P, Fiore C, Joy DC, Lifshin E. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Plenum Press, New York; 1992.

Gospodarowicz D, Moran J, Braun D, Birdwell C. Clonal growth of bovine endothelial cells. Fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 4120-4

Grewe PH, Deneke T, Holt SK, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Scanning electron microscopic analysis of vessel wall reactions after coronary stenting. *Z Kardiol*. 2000 Jan;89(1):21-7

Gutierrez J, Linares J, Fernandez F, Ros E, Luna JD, Mendoza J, Soto MJ, Lopez C, Maroto C. Relationship between the peripheral arterial occlusive disease and the infection by *Chlamydia pneumoniae*. *Med Clin (Barc)*. 2004 Oct 30;123(15):561-6

Hazama K, Miura H, Shimada T, Okuda Y, Murashita T, Nishibe T. Relationship between fibril length and tissue ingrowth in the healing of expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Surg Today*. 2004;34(8):685-9

H

Hall TA, Gupta BL. EDS quantitation and application to biology. Principles of analytical electron microscopy. In: Joy DC, Romir AD, Goldstein JI (eds) Plenum Publish. Co., London; 1986, pp219-248

Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 2001; 142:872-80

Holt SE, Shay JW, Wright WE. Refining the telomere-telomerase hipótesis of ageing and cancer. *Nat Biotechnol* 1996;(14):836-839

Howell GJ, Herbert SP, Smith JM, Mittar S, Ewan LC, Mohammed M, Hunter AR, Simpson N, Turner AJ, Zachary I, Walker JH, Ponnambalam S. Endothelial cell confluence regulates Weibel-Palade body formation. *Mol Membr Biol.* 2004;21(6):413-21

Huang J, Silvio LD, Wang M, Rehman I, Ohtsuki C, Bonfield W. Evaluation of in vitro bioactivity and biocompatibility of Bioglass(R)-reinforced polyethylene composite. *J Mater Sci Mater Med.* 1997;8(12):809-13

I

Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370–74

Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: Preliminary clinical results. Isner et al. *J Vasc Surg*, 1998 *J Vasc Surg* 1998;28:964-75

J

Jaffe E, Nachman R, Becker C, Miinick C. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;(52):2745-2756

Jeremias A, Dusaa C, Forudib F, Jacobsenc D, Vinned G, Nissenb S, Tuzcub EM. N-acetyl-cysteine in the prevention of vascular restenosis after percutaneous balloon angioplasty. *International Journal of Cardiology* 95 (2004) 255– 260

Jung SY, Lim SM, Albertorio F, Kim G, Gurau MC, Yang RD, Holden MA, Cremer PS. The Vroman effect: a molecular level description of fibrinogen displacement. *J Am Chem Soc.* 2003 Oct 22;125(42):12782-6

Junqueira LC, Carneiro J. Epithelial tissue. In: *Basic Histology*, 5^a Ed. Mc Graw Hill, USA. 2003; 69-93

K

Keller T, Mairuhu A, de Kruif M, Klein S, Verdes V, ten Cate H, Brandjes D, Levi M, van Gorp E. Infections and endothelial cells. *Cardiovascular Research* 60 (2003) 40–48

Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, Serruys P. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Aug 18;44(4):733-9

Kirkpatrick CJ, Melzner I, Göller T. Comparative effects of trypsin, collagenase and mechanical harvesting on cell membrana lipids studied in monolayer-cultured endothelial cells and a green monkey kidney cell line. *Biochim & Biophys Acta* 1985, 846:120-126

Kleinman H, Philp D and Hoffman M. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current Opinion in Biotechnology* 2003, 14:526–532

Kouchi Y, Onuki Y, Wu MH, Shi Q, Ghali R, Wechezak AR, Kaplan S, Walker M, Sauvage LR. Apparent blood stream origin of endothelial and smooth muscle cells in the neointima of long, impervious carotid-femoral grafts in the dog. *Ann Vasc Surg*. 1998 ;12(1):46-54

L

Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson D, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002; (359): 2053–58

Leon J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences* 75 (2004) 765–790

Linares-Palomino JP, Gutiérrez J, López-Espada C, Luna JD, Ros E, Maroto C. Genomic, serologic, and clinical case-control study of *Chlamydia pneumoniae* and peripheral artery occlusive disease. *J Vasc Surg* 2004;(40):359-66

López-Escamez JA, Campos A. Standards for X-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Microsc* 1994;(8):171-185

López Espada, C. Valoración del estrés oxidativo en el síndrome de isquemia-reperusión durante el clampaje aórtico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2003; 51-57

M

Makhoul R, Fields Ch, Cassano A. Nitric oxide and the vascular surgeon. *J Vasc Surg* 1999; 30:569-572

Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *British J Pharm* 2000;(130): 947-962

Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) study. *Circulation* 1996;94:258-265

Mano Y, Sawasaki Y, Takahashi K, Goto T. Cultivation of arterial endothelial cells from human umbilical cord. *Experientia*. 1983, 39:1144-1146

Martínez-González J, Badimon L. Reendotelización, engrosamiento intimal y remodelado vascular. ¿Un denominador común? *Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 1425-1427

Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*. 2001;22(11):1253-62

Maxwell AJ, Cooke JP. The role of nitric oxide in atherosclerosis. *Coronary Artery Disease*. 1999;10:277-286

Michiels C. Endothelial Cell Functions. *J Cel Physiol* 2003; (196):430–443

Mitchell Sh, Niklason L. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts *Cardiovascular Pathology* 12 (2003) 59– 64

Moncada S, Palmer RM, Higos EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142

Montaner Ramoneda B. Caracterización y purificación de un principio activo de origen bacteriano con actividad antitumoral. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 2000; 7-14

N

Nathan C, Xie Qw. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915

O

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hipercolesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;9:2546-2551

P

Palmer-Kazen U, Wariaro D, Luo F, Wahlberg E. Vascular endothelial cell growth factor and fibroblast growth factor 2 expression in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2004;39:621-8

Panatsopoulos D, Zafiroopoulos A, Krambovitis E, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Spandidos DA. Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression. *J Transl Med.* 2003 Oct 6;1(1):6

Pascual G, Rodríguez M, Corrales C, Turégano F, García-Honduvilla N, Bellón JM, Buján J. New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes. *Cryobiology* 2004;(48):62-71

Perna F, Iavarone M, Skrimpas S, Mazzarella G, Sanduzzi A. Detection and qualitative identification of mineral fibers and particles in alveolar macrophages of BAL fluid by SEM and EDXA. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2002 Jun-Aug;57(3-4):193-5

Pohlman T, Harlan JM. Adaptive Responses of the Endothelium to Stress. *J Surg Res* 2000;(89):85–119

Prasad-Chennazhy K, Krishnan LK. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; (26):5658-5667

R

Rajagopalan S, Mohler E, Lederman RJ, Saucedo J, Mendelsohn FO, Olin J et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial. *Am Heart J* 2003;145:1114-8

Ramonet D, Pugliese M, Rodriguez MJ, de Yebra L, Andrade C, Adroer R, Ribalta T, Mascort J, Mahy N. Calcium precipitation in acute and chronic brain diseases. *J Physiol Paris*. 2002 Apr-Jun;96(3-4):307-12

Rashid S, Salacinski H, Fuller B, Hamilton G and Seifalian A. Engineering of bypass conduits to improve patency. *Cell Prolif*. 2004;(37):351–366

Raso DS, Greene WB, Kalasinsky VF, Riopel MA, Luke JL, Askin FB, Silverman JF, Young VL. Elemental analysis and clinical implications of calcification deposits associated with silicone breast implants. *Ann Plast Surg*. 1999 Feb;42(2):117-23

Regar E, Thury A, van der Huyesen WJ, Sianos G, Vos J, Smits PC, Carlier SG, de Feyter P, Foley DP, Serruys P. Sonotherapy, antirestenotic therapeutic ultrasound in coronary arteries: the first clinical experience. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003 Sep;60(1):9-17

Reunkin EM, Curry FE. Endothelial permeability. Pathways and modulations. *Ann NY Acad Sci* 1982; 401:248-259

Rissanen TT, Vajanto I, Yla-Herttuala S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb -on the way to the clinic. *European Journal of Clinical Investigation* 2001; (31):651-666

Rodríguez-Morata A, Ros-Die E. Implicaciones fisiopatológicas de la angiogenesis en la patología vascular. *Angiología* 2003; 55: 352-60

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

Roomans GM, von Euler A. X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *Cell Biol Int* 1996; 20(2):103-109

Roomans GM. Quantitative X-ray microanalysis of biological specimens. *J Electron Microsc Tech.* 1998; 9(1):19-43.

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

Roomans GM. Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2001 10:1-19.

Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial cell sinculture. *Methods Mol Biol.* 2002; (188):273-89

Rose D, Hertz S, Eisebund D, Brener B, Manicone J, Marak J, Villanueva A, Creighton D, Parsonnet V. Endothelial cell adaptation to chronic trombosis. *Am J Surg* 1997;174:210-213

S

Salido M, Vilches J, Lopez A, Roomans GM. X-ray microanalysis of etoposide-induced apoptosis in the PC-3 prostatic cancer cell line. *Cell Biology International* 2001; (25): 499-508

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

Sanchez Quevedo MC, Crespo PV, García JM, Campos A. X ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine. *Bone Miner* 1989; (6):323-329

Sanchez-Quevedo MC, Ceballos G, Garcia JM, Luna JD, Rodriguez IA, Campos A. Dentine structure and mineralization in hypocalcified amelogenesis imperfecta: a quantitative X-ray histochemical study. *Oral Dis.* 2004 Mar;10(2):94-8

Schelling ME, Meininger CJ, Hawker JR, Granger HJ. Venular endothelial cells from bovine heart. *Am J Physiol* 1988; 254: H1211-7

Scholz D, Cai W, Schaper W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* 2001; (4):247-257

Schütz M, Friedl P. Isolation and cultivation of endothelial cells derived from human placenta. *Eur J Cell Biol* 1996; 71:395-401

Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994;31:131-143

Sharefkin JB, Van Wart HE, Williams SK. Enzymatic harvesting of adult human endothelial cells for use in autogenous endothelial vascular prosthetic seeding. *Endothelial seeding in Vasc. Surg.* 1987; Cap. 6:79-101

Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:729-735

Shin H, Bizios R, Gerritsen ME. Cyclic Pressure Modulates Endothelial Barrier Function. *Endothelium*, 10:179-187, 2003

Sigee DC. Preparation of biological samples for transmission X-ray microanalysis: a review of alternative procedures to the use of sectioned material. *Scanning Microsc.* 1988; 2(2):925-35

Simón A, Castro A, Kaski JC. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* 2001; (54):211-217

Skepper JN, Karydis I, Garnett MR, Hegyi L, Hardwick SJ, Warley A, Mitchinson MJ, Cary NR. 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* 1999;(188):100-106

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

Sullivan S, Brockbank K. Small-diameter vascular grafts *In* "Principles of Tissue Engineering"(second edition) 2000. (Lanza R P, Langer R, Vacanti J, eds.), p. 447- 454. Academic Press, California, USA.

Sumpio B, Riley JT, Dardik A. Cell in focus: endothelial cell. *Intern J Bioch and Cell Biol*. 2002;(34): 1508-1512

Swanson N, Hogrefe K, Javed Q, Gershlick AH. In vitro evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents. *Int J Cardiol*. 2003 Dec;92(2-3):247-51

Swanson N, Hogrefe K, Javed Q, Malik N, Gershlick AH. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents: in vivo effects on thrombosis, endothelialization and intimal hyperplasia. *J Invasive Cardiol*. 2003 Dec;15(12):688-92

T

Thilo DGS, Müller-Küsel S, Heinrich D, Käufer L, Weiss E. Isolation of human endothelial cells by different proteases. *Artery*. 1980, 8(3):259-266

Thompson MM, Budd JS, Eady SL, James RF, Bell PR. A method to transluminally seed angioplasty sites with endothelial cells using a double balloon catheter. *Eur J Vasc Surg.* 1993 Mar;7(2):113-21

Turner NJ, Kielty CM, Walker MG, Canfield AE. A novel hyaluronan-based biomaterial (hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials* 2004; (25):5955-5964

V

Vailhe B, Lecomte M, Wiernsperger N and Tranqui L. The formation of tubular structures by endothelial cells is under the control of fibrinolysis and mechanical factors. *Angiogenesis* 1998/1999; 2; 331±344

Vale PR, Losordo DW, Symes JF, Isner JM. Factores de crecimiento para la angiogénesis terapéutica en las enfermedades cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 1210-1224

Van Beusekom H, Whelan D, Hofma S, Krabbendam S, van Hinsbergh V, Verdouw P, van der Giessen W. Long-term endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1109 –17

Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 1994 Mar 11;76(5):777-9.

von Euler A, Palsgard E, von Steyern CV, Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial and secretory cells in culture. *Scanning Microsc.* 1993;7(1):191-201

W

Wahlberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia.. *J Vasc Surg,* 2003; (38):198-203

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.

Waschke J, Curry FE, Adamson RH, Drenckhahn D. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1296–H1305, 2005

X

Xiao L, Shi D. Role of precoating in artificial vessel endothelialization. *Chin J Traumatol*. 2004;7(5):312-6

Xue L, Greisler H. Blood vessels. *In* “Principles of Tissue Engineering“(second edition) 2000. (Lanza R P, Langer R, Vacanti J, eds.), p. 427- 446. Academic Press, California, USA.

Y

Yoon M, Moir RD, Prahlad V, Goldman RD. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J Cell Biol*. 1998 Oct 5;143(1):147-57

Yu SP, Canzoniero L, Choi D. Ion homeostasis and apoptosis. *Current Opinión in Cell Biology* 2001; (13):405-411

Z

Zabiti S, Arrebola F, Cañizares FJ, Cubero MA, Crespo PV, Fernandez-Segura E, Campos A. Changes in elemental composition during oncosis induced by chemical hypoxia: An x-ray microanalytical study. *Scanning* 2001; 23: 224

Zahm JM, Baconnais S, Davidson DJ, Webb S, Dorin J, Bonnet N, Balossier G, Puchelle E. X-ray microanalysis of airway surface liquid collected in cystic fibrosis mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(2):L309-13

Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;(45):1743-1751

Zierold K, Schäfer D. Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* 1998; (2):1775-1790

Zünd G, Hoerstrup S, Schoeberlein A, Lachat M, Uhlschmid G, Vogt P, Turina M. Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery; seeding of human fibroblast followed by human endothelial cells on resorbable mesh. *Eur J Cardio-thoracic Surg* 1998;13:160-164