

Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana

EVALUATION OF CELL VIABILITY AND APOPTOTIC PATTERNS IN STEM CELLS ISOLATED FROM HUMAN DENTAL PULP

Martín Piedra M. A., Garzón I., Sánchez Quevedo M. C., Alaminos M.

Grupo de Ingeniería Tisular. Departamento de Histología. Facultad de Medicina, Universidad de Granada

Resumen

Introducción: El desarrollo de sustitutos biológicos mediante Ingeniería Tisular requiere de la utilización de una fuente de células madre que, además de ser capaz de autorenovarse y diferenciarse, mantengan una funcionalidad y viabilidad óptima justo en el momento de su uso. El estudio de la viabilidad celular constituye un importante control de calidad, especialmente en aquellas poblaciones celulares con un alto potencial para su utilización en Ingeniería Tisular, como son las células madre de la pulpa dental (DPSC). El objetivo de este trabajo es la evaluación de la viabilidad durante los tres primeros subcultivos de células madre de la pulpa dental humana (hDPSC).

Material y métodos: Se obtuvieron 3 subcultivos consecutivos de hDPSC de terceros molares humanos sanos (N = 3) mediante un proceso de digestión enzimática. La concentración intracelular de los iones sodio (Na), potasio (K), y cloro (Cl) fue determinada mediante microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X (EPXMA). El porcentaje de células en apoptosis (fragmentación de DNA) fue determinado mediante el ensayo de fluorescencia TUNEL en el primer y tercer subcultivo.

Resultados: En el segundo subcultivo se detectó un descenso significativo del potasio ($p = 0,011$) indicando un descenso en la viabilidad celular. En el tercer subcultivo, los niveles de cloro y sodio aumentaron de forma significativa ($p = 0,010$ y $p = 0,002$), generando un perfil iónico compatible con células en estado apoptótico. La fluorescencia a partir del ensayo TUNEL reveló $2,76 \pm 1,80$ % de células apoptóticas en el tercer subcultivo, mientras que en el primer subcultivo, dicha proporción fue de $0,55 \pm 0,27$ %.

Discusión: Las hDPSC se encuentran de forma nativa en la pulpa dental y estas condiciones nativas se pueden alterar cuando pasan a las condiciones de un medio de cultivo in vitro. Estas alteraciones pueden ser la respuesta a un proceso de adaptación. Dicha adaptación, junto con el estrés adicional generado por el tratamiento enzimático realizado para digerir la matriz extracelular, tiene como consecuencia una pérdida transitoria y leve de la viabilidad producida por un mecanismo de apoptosis. En resumen, los 3 primeros subcultivos de hDPSC deberán ser descartados para su uso en ingeniería tisular, por ser células en un estado de apoptosis activa.

Palabras clave: Células madre de la pulpa dental, microanálisis por energía dispersiva de rayos X, viabilidad celular, ingeniería tisular.

Abstract

Introduction: The development of biological substitutes by Tissue Engineering needs the use of a stem cell source able not only to self-replicate and differentiate, but also to maintain optimal functionality and cell viability when used. The evaluation of cell viability is considered an important quality control, especially in cell lineages with high capabilities for being used in tissue engineering, as dental pulp stem cells (DPSC). The aim of this research is to evaluate the cell viability through three human dental pulp stem cells (hDPSC) subcultures.

Materials and methodology: Three consecutive hDPSC subcultures were obtained from human sound third molars (N = 3) by enzymatic digestion. Intracellular ionic concentration of sodium (Na), potassium (K) and chlorine (Cl) was determined by electron probe X-ray microanalysis (EPXMA). Apoptotic cells percentage (DNA fragmentation) was determined by TUNEL fluorescence assay at first and third subculture.

Results: A significant decrease of potassium was detected at second subculture ($p = 0,011$), suggesting a loss of cell viability. At third subculture, chlorine and sodium statistically increased ($p = 0,010$ y $p = 0,002$), inducing an apoptotic-like ionic profile. Fluorescence from TUNEL assay revealed $2,76 \pm 1,80$ % of apoptotic cells at third subculture, while that ratio was $0,55 \pm 0,27$ % at first subculture.

Discussion: hDPSC are natively stored in the dental pulp and these native conditions may be altered by the *in vitro* cell culture conditions. In this regard, these alterations could be in response to an adaptative process. This adaptative process, besides cell stress as a consequence of an enzymatic treatment for the extracellular matrix digestion, produces a mild and temporary loss of cell viability by apoptosis. In summary, the first, second and third subculture of hDPSC should be discarded for the use in tissue engineering as they are apoptotic.

Key words: Dental pulp stem cells, electron probe X-ray microanalysis, cell viability, tissue engineering.

1. Introducción

Las técnicas de Ingeniería Tisular tienen como objetivo el desarrollo de sustitutos biológicos que puedan restaurar, mantener, o incluso mejorar la función de los tejidos naturales (1-2). Para la producción de dichos tejidos artificiales, se requiere la utilización de células madre; una matriz extracelular tridimensional que permita su crecimiento, proliferación y diferenciación; y también determinados factores de crecimiento inductores(3).

Las células madre son un elemento clave en las terapias de Medicina Regenerativa e Ingeniería Tisular. Las células madre son aquellas que tienen la capacidad de replicarse continuamente así como producir células progenitoras que puedan diferenciarse hacia otros tipos de células (4). En este sentido, se han identificado células madre en prácticamente todos los tejidos adultos (5). Sin embargo, existe la necesidad de buscar nuevas fuentes de células madre cuya obtención sea fácil, poco invasiva y sea factible incluso en individuos de edades avanzadas.

Uno de los nichos recientemente descritos para la obtención de células madre que pueden ser factibles en las aplicaciones de los protocolos de Ingeniería Tisular son los dientes. En el interior de los dientes se localiza un tejido conjuntivo laxo denominado "pulpa dental" responsable de la irrigación e inervación del diente, así como la reparación

de algunos tejidos duros como consecuencia de agresiones externas. Formando parte de la pulpa dental se ha descrito una población de células madre que reciben el nombre de *Dental Pulp Stem Cells* (DPSC), las cuales son células indiferenciadas con muchas similitudes con las células madre mesenquimales obtenidas de la médula ósea (6-7). Ambos tipos de células comparten características propias de células madre mesenquimales como la expresión positiva de CD44, CD90, CD105, CD146, y Stro-1, o la expresión negativa de CD45 (8-9), así como la capacidad de diferenciarse hacia células óseas, cartilaginosas, adiposas, miogénicas y progenitores neurales (10) y de producir tejidos mineralizados tanto *in vitro* como *in vivo*(11-13).

Estudios recientes han demostrado que las células en cultivo tienden a sufrir un proceso de adaptación a las nuevas condiciones ambientales (*in vitro*), así como a entrar en senescencia y perder viabilidad cuando se subcultivan de forma secuencial (14-15). La viabilidad de las células madre de la pulpa humana (hDPSC) ha sido poco estudiada hasta la actualidad. No se ha identificado adecuadamente en qué subcultivo estas células presentan un momento óptimo para su utilización en protocolos de Ingeniería Tisular.

En este sentido, existen una gran variedad de ensayos de viabilidad celular, cada uno de los cuales aporta una información diferente según su fundamento biológico.

Uno de los métodos más interesantes diseñados para evaluar la viabilidad celular es la microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X (EPXMA), la cual no sólo permite una determinación precisa de la viabilidad celular en un momento dado, sino que además puede identificar los mecanismos que conducen a la muerte celular a partir de la cuantificación de los iones que participan de forma importante en la fisiología celular (14-21). La EPXMA, así, nos permite detectar la apoptosis en un estado muy precoz mientras que otras técnicas, como el ensayo de fluorescencia TUNEL (*transferase dUTP Nick end labeling*) son capaces de detectar la apoptosis ya instaurada. En el caso del ensayo TUNEL, la detección de oligonucleótidos, resultados de la fragmentación de ADN, es indicativo de la presencia de apoptosis celular. El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de las células madre de la pulpa dental humana (hDPSC) durante los tres primeros subcultivos, mediante microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X (EPXMA) y el ensayo de fluorescencia TUNEL (*transferase dUTP Nick end labeling*).

2. Materiales y métodos

La obtención de células de la pulpa dental se realizó a partir de dientes humanos de adultos jóvenes (18-30 años) extraídos por motivos odontológicos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada y siempre bajo la prescripción de un profesional facultativo. Los dientes seleccionados fueron terceros molares maxilares (N = 3) libres de caries y enfermedad periodontal. Una vez realizada la exodoncia, los dientes fueron almacenados en medio de transporte e inmediatamente transportados al laboratorio de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Obtención de primocultivos de DPSC

El protocolo utilizado para obtener las hDPSC ya ha sido descrito con anterioridad (7). Los dientes se lavaron con suero salino tamponado con fosfato (Sigma-Aldrich Company, Ltd, UK) y posteriormente se usó una hoja de bisturí estéril para eliminar

cualquier resto de tejido blando sobre la superficie del diente. Se realizó un corte transversal en el diente a nivel de la unión amelo-cementaria con un disco de diamante a baja velocidad e irrigación continua con suero salino tamponado con fosfato. Una vez separada la corona de la raíz dental, se accedió a la cámara pulpar. La pulpa dental fue cuidadosamente retirada usando una lima K-30 de endodoncia (Denstply/Maillefer, Ballaigues, Switzerland) para separar el tejido laxo de las paredes dentinarias. La pulpa extraída se sometió a un proceso de digestión enzimática con una solución de 3 mg/mL de colagenasa tipo I durante 6 horas a 37° C y 5% CO₂. Una vez digerida la matriz extracelular de la pulpa, la solución de colagenasa se centrifugó durante 10 min (1.000 rpm) para obtener un pellet que posteriormente se resuspendió en Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de una solución antibiótica que contiene 10.000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B (todos son productos comercializados por Sigma-Aldrich Company, Ltd, UK), obteniéndose así los cultivos primarios.

Obtención de subcultivos

Los cultivos primarios de hDPSC se mantuvieron en condiciones de cultivo celular (37° C y 5% CO₂) cambiando el medio cada 3 días hasta que alcanzaron un estado de confluencia. Para obtener el siguiente subcultivo, las células fueron disociadas mediante un proceso de tripsinización previamente descrito (14). Se utilizó una solución de 0,5 g/L de tripsina bovina y 0,2 g/L de ácido etilendiaminotetraacético (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steimheim, Alemania) durante 4 minutos a 37° C y 5% CO₂. La inactivación de la tripsina se consiguió mediante medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal (SBF).

Microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EPXMA)

Las hDPSC confluentes se subcultivaron sobre rejillas de oro recubiertas con Pioloform (polivinil butiral) (Ted Pella, Inc., Redding, CA) con una densidad de 5×10^3 células en cada

rejilla, y cultivadas en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de una solución antibiótica. Tras 24 horas, las rejillas cultivadas con células se lavaron durante 5 segundos en agua destilada fría, y posteriormente secadas y criofijadas mediante inmersión en nitrógeno líquido (22). Las rejillas cultivadas con células criofijadas, fueron deshidratadas durante 24 horas con un E5300 Polaron freezer-drier y posteriormente recubiertas con carbón al vacío antes de ser microanalizadas.

El EPXMA se realizó con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 equipado con un detector para microanálisis EDAX DX-4 y un detector de electrones retrodispersados. Las condiciones analíticas fueron: tilt angle 00, take-off angle 61,348 y una distancia a la muestra de 10 mm. El voltaje de aceleración fue 10 kV. Todos los espectros microanalíticos se realizaron en "spot mode" a 10.000X (equivalente a un punto de 50 nm de diámetro) durante 200 segundos, con un promedio de 500 cuentas por segundo. Todas las determinaciones se realizaron en el área central del núcleo celular. Para determinar el contenido total de los iones potasio (K), cloro (Cl) y sodio (Na) se utilizó el método de la ratio pico/fondo (23-25) tomando como referencia un estándar compuesto por 20% de dextrano y sales inorgánicas en cantidades conocidas(26).

El contenido iónico total es el promedio de la determinación iónica en 50 hDPSC cultivadas de 3 pulpas dentales diferentes, para cada uno de los subcultivos incluidos en este estudio.

Ensayo Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

El ensayo TUNEL se realizó para detectar la fragmentación de DNA mediante el marcado del extremo terminal de oligonucleótidos con un fluorocromo. Las hDPSC fueron cultivadas en portaobjetos tipo Chambers con una concentración de 1×10^4 células por pocillo con DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibióticos hasta que se alcanzó la confluencia. En este momento las células fueron lavadas con solución tampón fosfato y fijadas en etanol 70% durante 5

minutos. El ensayo TUNEL se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche, Mannheim, Alemania) y los núcleos fueron contrastados con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vectashield mounting médium with DAPI, Vector Laboratoires, Burlingame, California). Las fotografías se realizaron con un microscopio óptico de fluorescencia (Nikon Eclipse 90-i, Nikon Instruments Inc, NY, USA) a 465 nm para la fluoresceína (TUNEL) y 360 nm para el DAPI.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo y un análisis inferencial mediante el test de Wilcoxon usando el software informático SPSS 15 (SPSS Inc, Chicago, USA). El nivel de significación estadística se determinó con $p \leq 0.05$.

3. Resultados

La utilización de los protocolos previamente descritos permitió obtener de manera eficiente 3 subcultivos de células madre de la pulpa dental humana (hDPSC). Las células cultivadas presentaron un citoplasma elongado y fusiforme con un núcleo elíptico y central (Fig. 1).

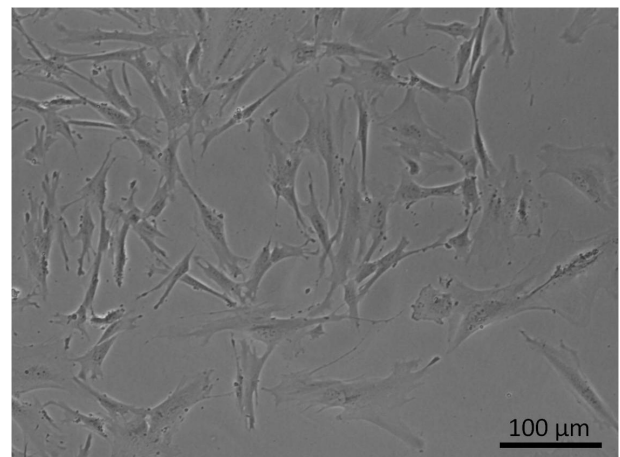


Figura 1: Microfotografía de hDPSC en cultivo tras una semana (10X). Las células cultivadas presentaron un citoplasma elongado y fusiforme con un núcleo elíptico y central.

La concentración intracelular de iones como sodio (Na), potasio (K) o cloro (Cl), determinada mediante EPXMA, mostró cambios entre los diferentes subcultivos (Tabla 1). El sodio intracelular se mantuvo constante durante los

dos primeros subcultivos, mientras que en el tercer subcultivo aumentó de forma significativa hasta $77,19 \pm 35,35$ mmol/Kg ($p = 0,010$).

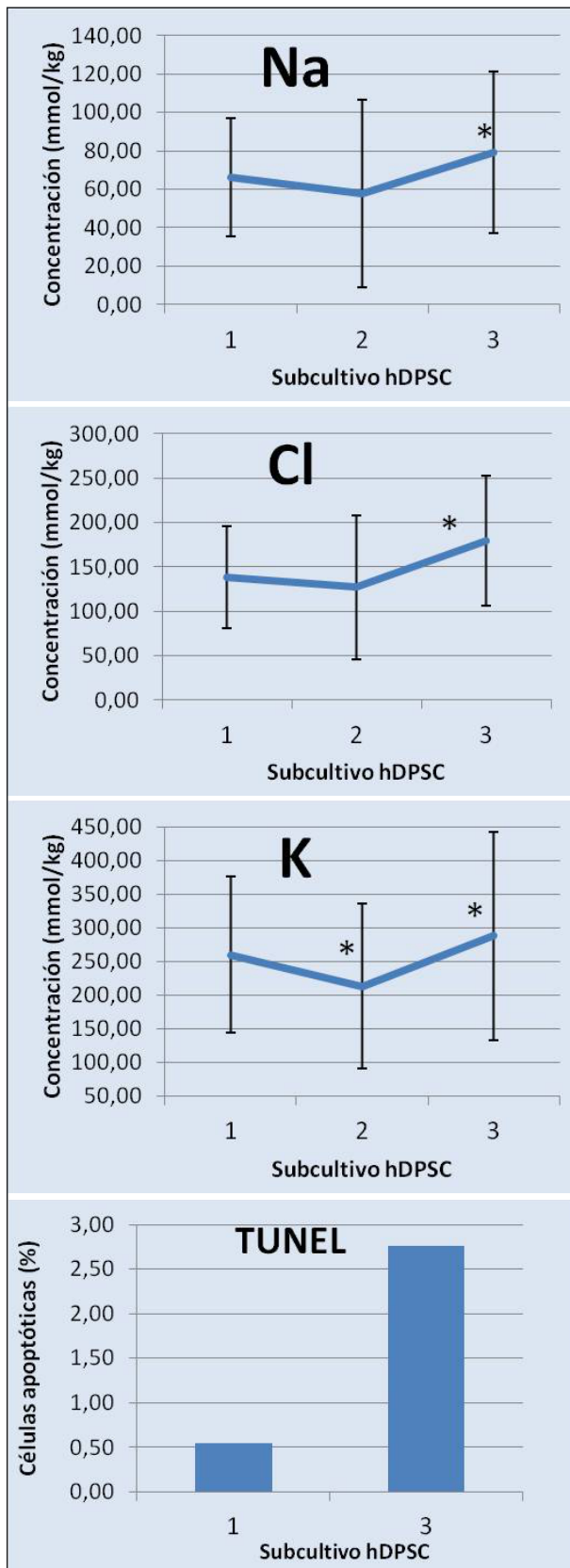


Figura 2. Concentración intracelular de los iones sodio (Na), cloro (Cl) y potasio (K). Porcentaje de células en apoptosis detectadas mediante el ensayo *Tranferase dUTP Nick-End-Labeling* (TUNEL).

La determinación intracelular de cloro se incrementó significativamente en el último subcultivo, alcanzando valores de $126,73 \pm 80,59$ mmol/Kg ($p = 0,010$). El ion potasio disminuyó su concentración a $212,74 \pm 122,20$ mmol/Kg ($p = 0,011$) en el segundo subcultivo. En el tercer subcultivo, la concentración intracelular de potasio aumentó de forma significativa hasta $281,46 \pm 96,68$ mmol/Kg ($p = 0,002$) (Fig. 2)

El ensayo de TUNEL (*Tranferase dUTP Nick End Labeling*) mostró una mayor proporción de células en apoptosis en el tercer subcultivo ($2,76 \pm 1,80$ %) en relación al primer subcultivo de hDPSC ($0,55 \pm 0,27$ %) (Fig.3).

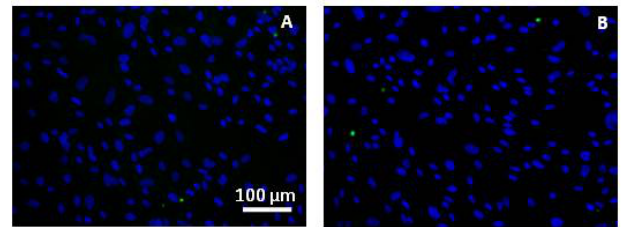


Figura 3. Microfotografías de hDPSC (10X) marcadas mediante el ensayo *Tranferase dUTP Nick-End-Labeling* (TUNEL). En verde, el núcleo de las células en apoptosis (fragmentación de DNA). En azul, el núcleo de células viables (DAPI).

Subcultivo		EPXMA			TUNEL
		Na (mmol/kg)	K (mmol/kg)	Cl (mmol/kg)	(% apoptosis)
1	Media	66,49	259,51	138,11	0,55
	Desviación	30,76	116,07	57,20	0,27
2	Media	57,83	212,74	126,93	-
	Desviación	48,97	122,20	80,59	-
3	Media	79,19	287,46	179,45	2,76
	Desviación	42,19	154,85	72,87	1,80

Tabla 1: Resultados de la cuantificación de la concentración intracelular de iones sodio (Na), cloro (Cl), y potasio (K) y del porcentaje de células apoptóticas en subcultivos de hDPSC.

4. Discusión

El desarrollo de tejidos artificiales mediante Ingeniería Tisular requiere de la utilización de una fuente de células madre que, además de presentar la capacidad de proliferación, auto-renovación y multipotencialidad, tengan un estado funcional compatible con la realización de dichas funciones en el preciso momento de

su utilización; esto es, que se empleen células en un momento de viabilidad óptimo, tratando de descartar aquellos subcultivos celulares en los que las células muestran signos de senescencia o de muerte celular.

La evaluación de la viabilidad de una población celular sirve, por tanto, como un procedimiento de control de calidad para establecer el momento óptimo de utilización de dichas células para el desarrollo de sustitutos biológicos. Entre las técnicas que clásicamente se han utilizado para evaluar la viabilidad celular se encuentra el test de exclusión con azul tripán, ya que se trata de un ensayo rápido, sencillo y que no requiere de mucho instrumental técnico. Sin embargo, este tipo de métodos son poco sensibles ya que basan su resultado en la integridad de la membrana plasmática, detectando la muerte celular sólo en estadios avanzados en los que se produce la disrupción de dicha membrana(14, 27)

El desarrollo de nuevas técnicas, basadas en diferentes aspectos de la biología celular ha permitido la monitorización de la viabilidad celular de una forma mucho más sensible y precisa, lo que permite una detección más fiable de cualquier cambio que pueda surgir en una determinada población celular durante diferentes subcultivos consecutivos.

El objetivo de este trabajo es evaluar, mediante ensayos de viabilidad de alta sensibilidad, la adaptación de las células madre de la pulpa dental humana (hDPSC) de un ambiente *in vivo* a un ambiente *in vitro* (*ex vivo*), mediante la monitorización de su viabilidad celular durante los 3 primeros pases utilizando una técnica altamente sensible como el microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EPXMA). Los resultados muestran una disminución significativa de la concentración intracelular de potasio en el segundo pase ($p = 0,011$), acompañada de una disminución en los niveles del ion cloro, mientras que el sodio se mantuvo estable. Este perfil iónico es típico de una población celular en un estado pre-apoptótico (21, 26, 28) en el cual, el potasio y el cloro inicialmente disminuyen su concentración, como consecuencia de la contracción pre-apoptótica, seguido de un incremento significativo posterior de cloro ($p = 0,010$) y de sodio ($p = 0,010$), tal y como reflejan los resultados obtenidos en este estudio. El aumento de células apoptóticas detectadas mediante el ensayo TUNEL (*transferase dUTP*

nick end labeling) en el tercer pase confirma el estado pre-apoptótico de las hDPSC en el segundo pase, y el establecimiento de dicha apoptosis (fragmentación de DNA) en el tercer pase.

Estos resultados están en concordancia con otros trabajos previos realizados mediante EPXMA sobre diferentes poblaciones celulares adultas y diferenciadas (14, 17), e incluso sobre células madre mesenquimales como las células madre de la gelatina de Wharton (15). Estudios recientes han relacionado este perfil iónico microanalítico con la expresión de algunos genes pro-apoptóticos como BNIP3L o FASTKD2(15).

Esta disminución de la viabilidad celular durante los primeros pases, mediada por un mecanismo de apoptosis, puede ser consecuencia del proceso de adaptación celular a las condiciones de cultivo celular (*in vitro*). Además, el método de aislamiento y obtención del primocultivo celular requiere de una digestión enzimática que, además de eliminar la matriz extracelular, podría afectar a la funcionalidad de la membrana plasmática durante los primeros pases, generando un perfil iónico intracelular muy similar al obtenido en este estudio(29-30).

Este estudio se ha realizado sobre los tres primeros subcultivos de hDPSC con el objetivo de evaluar la viabilidad de estas células durante la adaptación a un medio de cultivo *in vitro*. Sería conveniente la realización de estudios similares en siguientes subcultivos con la finalidad de establecer una curva de viabilidad más completa en el tiempo, así como determinar el subcultivo en el que la tasa de apoptosis sea mínima y la viabilidad celular sea óptima.

En resumen, la identificación de la curva de viabilidad celular establece un importante control de calidad, ya que nos permitirá detectar aquellos subcultivos que tengan una mayor funcionalidad como los más apropiados para su uso en Ingeniería Tisular y Terapia Celular. De la misma manera, esta metodología nos permitirá descartar la utilización para estos fines de aquellos pases con menor viabilidad o en proceso de muerte celular. En este sentido, los tres primeros subcultivos de hDPSC deberán ser descartados para su uso en Ingeniería Tisular, por ser células en un estado de apoptosis activa.

Referencias

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
2. Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 2008;36(6):379-86.
3. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998;16(3):247-52.
4. Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev* 2004;13(5):452-5.
5. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003;5(5):362-9.
6. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81(8):531-5.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13625-30.
8. Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol* 2011;136(4):455-73.
9. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(3):191-9.
10. Yang X, Zhang W, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, et al. Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1(2):128-35.
11. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008;4(1):21-6.
12. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005;20(8):1394-402.
13. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006;206(3):693-701.
14. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Munoz-Avila JJ, Garcia JM, Crespo PV, Gonzalez-Andrades M, et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol* 2007;211(3):692-8.
15. Garzon I, Perez-Kohler B, Garrido-Gomez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martín-Piedra MA, et al. Evaluation of the Cell Viability of Human Wharton's Jelly Stem Cells for Use in Cell Therapy. *Tissue Eng Part C Methods* 2012.
16. Fernandez-Segura E, Warley A. Electron probe X-ray microanalysis for the study of cell physiology. *Methods Cell Biol* 2008;88:19-43.
17. Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, et al. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg* 2008;22(3):440-8.
18. Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater* 2002;3:1-8.
19. Warley A, Fernandez-Segura E, Lopez-Escamez JA, Campos A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int* 1994;18(9):915-6.
20. Warley A, Stephen J, Hockaday A, Appleton TC. X-ray microanalysis of HeLa S3 Cells. I. Instrumental calibration and analysis of randomly growing cultures. *J Cell Sci* 1983;60:217-29.
21. Zierold K, Hentschel H, Wehner F, Wessing A. Electron probe X-ray microanalysis of epithelial cells: aspects of cryofixation. *Scanning Microsc Suppl* 1994;8:117-26; discussion 26-7.
22. Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, Chang-Sing P, Lechene C. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol* 1985;248(1 Pt 1):C154-64.
23. 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;134:327-34.
24. Fernandez-Segura E, Canizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* 1997;21(10):665-9.
25. Statham PJ, Pawley JB. A new method for particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microscopy* 1978;1:469.
26. Warley A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc* 1990;157(Pt 2):135-47.
27. Rodriguez IA, Lopez-Gonzalez G, Rodriguez MA, Campos-Sanchez F, Alaminos M. Biological evaluation of 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) toxicity in human gingival fibroblasts with histochemical X-ray microanalysis. *J Adhes Dent* 2011;13(4):375-81.
28. Zierold K. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144(1):70-6.
29. Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 1):G591-8.
30. Van Landuyt KB, Jones EA, McGonagle D, Luyten FP, Lories RJ. Flow cytometric characterization of freshly isolated and culture expanded human synovial cell populations in patients with chronic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12(1):R15.