

# Viabilidad de las células y liberación de prostaciclina en células endoteliales cultivadas de vena umbilical humana

A. Rodríguez-Morata<sup>1</sup>, I. Garzón<sup>2</sup>, M. Alaminos<sup>2,3</sup>, N. García-Hondurilla<sup>4</sup>,  
M.C. Sánchez-Quevedo<sup>2</sup>, J. Buján<sup>4</sup> y A. Campos<sup>2</sup>, Granada y Málaga, España

La construcción de sustitutos eficientes de los vasos sanguíneos humanos depende en gran medida del uso de células endoteliales cultivadas (CE) viables y por completo funcionales. Sin embargo, hasta la fecha, se han publicado muy pocos estudios centrados en la evaluación de la viabilidad celular de las CE cultivadas. En la presente investigación, hemos determinado la viabilidad celular, la actividad del factor de von Willebrand y de la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) en cultivos de células primarias de CE de la vena umbilical humana, para identificar el pase celular específico que es más apropiado para el desarrollo de órganos artificiales mediante ingeniería de tejidos. La viabilidad celular se determinó mediante la cuantificación de la concentración intracelular de varios iones con microanálisis de rayos X por sonda de electrones de alta sensibilidad, mientras que el factor von Willebrand se analizó mediante inmunohistoquímica y la liberación de PGI<sub>2</sub> se cuantificó mediante radioinmunoanálisis. Los resultados de los análisis de la presente investigación demuestran que el cociente K/Na fue diferente para cada pase de células (4,72 para el primero, 4,55 para el segundo y 7,82 para el tercero), lo que sugiere que la mayor viabilidad celular corresponde al tercer pase. En comparación, la producción de PGI<sub>2</sub> fue mayor en los dos primeros pases de células, con una disminución significativa en el tercero ( $6,46 \pm 0,10$ ,  $5,98 \pm 0,08$ , y  $1,62 \pm 0,05$  ng/ml de sobrenadante para el primer, segundo y tercer pase, respectivamente), mientras que la expresión del factor von Willebrand fue similar en los tres pases de células analizados en la investigación (64,12%, 66,66%, y 65,93% de células positivas, respectivamente). Estos datos sugieren que las células correspondientes al segundo pase muestran el mejor cociente de viabilidad: funcionalidad y, por esta razón, deben usarse para los protocolos de ingeniería de tejidos.

## INTRODUCCIÓN

Las células endoteliales (CE) han atraído una atención cada vez mayor en biología vascular en

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2008.03.004.

<sup>1</sup>Servicio de Cirugía Vascular, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, España.

<sup>2</sup>Departamento de Histología (Grupo de Ingeniería de Tejidos), Universidad de Granada, Granada, España.

<sup>3</sup>Fundación FIBAO y Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España.

<sup>4</sup>Departamento de Ciencias Médicas, Universidad de Alcalá, Madrid, España.

Correspondencia: Antonio Campos, Departamento de Histología, Universidad de Granada, Avenida de Madrid 11, E-18012, Granada, España. Correo electrónico: [acampos@histolii.ugr.es](mailto:acampos@histolii.ugr.es)

Ann Vasc Surg 2008; 22: 440-448

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.07.016

© Annals of Vascular Surgery Inc.

Publicado en la red: 8 de mayo de 2008

las últimas décadas. Estas células proporcionan límites estructurales de la sangre circulante en la luz y sirven de superficie tromborresistente selectivamente permeable<sup>1</sup>. Secretan miríadas de mediadores bioquímicos, que regulan el tráfico de hematíes, el tono vasomotor, crecimiento celular y remodelado vascular<sup>2,3</sup>. Además, las CE participan en los procesos inflamatorios y en los estados sépticos y desempeñan un papel básico en la angiogénesis y la aterogénesis<sup>4,5</sup>.

Desde un punto de vista funcional, el endotelio desempeña un importante papel como mediador de la coagulación y como regulador del tono vascular. La primera de estas funciones se efectúa mediante la síntesis endotelial de diversas proteínas, en particular del factor von Willebrand<sup>6</sup>, mientras que la segunda función depende principalmente de la síntesis de diversos reguladores del tono vascular

por el endotelio, en particular la prostaciclina<sup>3,7,8</sup> (PGI<sub>2</sub>). No obstante, diversos factores de riesgo (p. ej., hipertensión arterial, diabetes, envejecimiento e inflamación) pueden reducir marcadamente todas estas funciones endoteliales<sup>6</sup>.

La ingeniería de tejidos aplicada a la cirugía vascular ha desarrollado diferentes modelos de sustitutos vasculares, cuyo objetivo es mejorar la calidad de los injertos<sup>9-12</sup>. Los injertos producidos por ingeniería de tejidos se parecen cada vez más a los vasos naturales con el uso de CE sembradas en una estructura apropiada<sup>13-15</sup>. No se ha alcanzado un consenso sobre el número óptimo de pases que deben experimentar las CE antes de sembrarse con diferentes técnicas de ingeniería de tejidos<sup>16-18</sup>. El principal problema de estos injertos es la escasa retención de células una vez se someten al flujo circulatorio, debido a razones mecánicas e, indirectamente, a una reducida viabilidad de las células<sup>18,19</sup>.

Para determinar la viabilidad celular de los cultivos antes de su uso en ingeniería de tejidos, los exámenes clásicos han sido la prueba de exclusión con el colorante azul de tripano y la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio de incubación<sup>20,21</sup>. Sin embargo, estos métodos adolecen de importantes limitaciones. Ambas técnicas se basan en la rotura de la membrana celular y sabemos que, como ocurre en la fase inicial de la apoptosis, la integridad de la membrana no siempre refleja la viabilidad de la célula<sup>22</sup>. Una de las técnicas más sensibles para su valoración es la cuantificación del contenido iónico, en particular de potasio y sodio. La concentración intracelular de estos iones se correlaciona adecuadamente con el estado vital de las células y es un excelente marcador de la fisiología y viabilidad celular<sup>23-25</sup>. La estrategia más potente para cuantificar la composición elemental total es el microanálisis de rayos X con sonda de electrones asociada con microscopio electrónico, que permite determinar simultáneamente las concentraciones de los diferentes elementos y la ultraestructura de las células<sup>26-29</sup>. Utilizando esta técnica analítica y morfológica combinada, nuestro grupo ha cuantificado el contenido iónico de diferentes líneas de células, incluidas células U937<sup>23</sup>, MCF7<sup>30</sup>, y K562<sup>31</sup>, al igual que células corneales endoteliales<sup>32</sup>. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito el perfil microanalítico de células vasculares endoteliales aisladas mantenidas en cultivo.

Para identificar y evaluar la actividad celular de CE en cultivo se han usado diversos criterios morfológicos, bioquímicos e inmunológicos<sup>33</sup>. El principal de estos criterios es la cuantificación de PGI<sub>2</sub> en el sobrenadante del cultivo, que puede detectarse

como metabolito estable 6-ceto-PGF1alfa, y la detección del factor von Willebrand en las células cultivadas. Tanto la PGI<sub>2</sub> como el factor de von Willebrand intervienen en dos de las funciones más importantes de la fisiología de las CE<sup>3</sup>.

En la presente investigación, examinamos el contenido de diversos elementos clave (sodio, magnesio, fósforo, cloro, potasio y azufre) y la actividad del factor von Willebrand y de PGI<sub>2</sub> en CE vasculares aisladas mantenidas en cultivo. En los subcultivos la viabilidad de las células se evaluó con un microanálisis cuantitativo de rayos X con sonda electrónica con el objetivo de determinar el pase más apropiado para obtener CE vasculares para usar en ingeniería de tejidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos primarios y pases de CE

Se obtuvieron 12 cordones umbilicales que se preservaron a 4°C en un medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con penicilina, estreptomicina y antimicóticos (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO). Todos los cordones umbilicales se procesaron al cabo de 8 h.

Para obtener las CE de la vena umbilical humana, usamos el método de Jaffe et al<sup>34</sup>. Las CE se cultivaron en matrices de cultivo de tejido de 25 cm<sup>2</sup> con Medium 199 Plus (Sigma-Aldrich) suplementado con un 20% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich), 2 mM/l de L-glutamina, un 1% de una solución antibiótica-antimicótica y 5 mg de factor de crecimiento de CE derivadas de plaquetas humanas (ECGF). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en un incubador humidificador bajo una atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió una vez cada 3 días.

En los cultivos de células subconfluentes se llevaron a cabo subcultivos de CE con tripsina, una solución de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l). Las células se mantuvieron en cultivo hasta el tercer pase.

### Microanálisis de rayos X con sonda de electrones

Para el microanálisis de rayos X, se subcultivaron las CE utilizando tripsina-EDTA en rejillas de oro cubiertas con una capa fina de pioloformo (butiral de polivinilo) (Ted Pella, Redding, CA). Las células se sembraron a una densidad de 5.000 por rejilla y se cultivaron en un Medium 199 suplementado con un 20% de suero bovino fetal, 2 mM/l de L-glutamina, un 1% de una solución antibiótica-antimicótica y 5 mg de ECFG. Después de 24 h en

cultivo en las rejillas, se lavaron éstas con agua destilada enfriada con hielo durante 5 s para eliminar el medio extracelular. Después del lavado, se drenó el exceso de agua de la superficie y las rejillas se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido<sup>35,36</sup>. Después de una criofijación, las rejillas se colocaron en un contenedor de aluminio preenfriado para muestras a temperatura del nitrógeno líquido y se desecaron por congelación a temperaturas decrecientes durante 24 h en un equipo congelador-secador E5300 Polaron (Polaron Equipment Ltd, Watford, Reino Unido) provisto de un sistema de bomba rotatoria de vacío. Las rejillas de oro congeladas-secadas se recubrieron con carbono en un sistema de vacío y se microanalizaron al cabo de 6 h.

El microanálisis de rayos X con sonda electrónica de las muestras se efectuó con un microscopio electrónico de barrido Philips (Eindhoven, Holanda) (MEB) provisto de un sistema microanalítico EDAX DX-4 y un detector de dispersión de electrones en estado sólido. Además, las muestras se examinaron mediante MEB con una combinación de modos de imagen electrónica secundaria (ES) y dispersión de electrones (ED).

Para el microanálisis de rayos X, las condiciones analíticas fueron las siguientes: ángulo de inclinación 0°, ángulo de despegue 35° y distancia de trabajo 10 mm. El voltaje de aceleración fue de 10 kV. Todos los espectros se obtuvieron en modo *spot* a 10.000 x (equivalente a un diámetro de *spot* de 50 nm durante un tiempo de vida de 200 s), y el número de recuentos por segundo registrados por el detector fue del orden de 500. Todas las determinaciones se efectuaron en el área central del núcleo de la célula. Para determinar el contenido iónico total, usamos el método del cociente de fondo máximo/local<sup>30,37,38</sup> (M/L) con referencia a los estándares constituidos por un 20% de dextrano que contenía cantidades conocidas de sales inorgánicas<sup>39</sup>. En conjunto, cuantificamos el contenido iónico de 35 CE vasculares cultivadas en cada subcultivo.

## Cuantificación de PGI<sub>2</sub>

La cantidad de PGI<sub>2</sub> producido y liberado por las CE en cultivo se calculó como la concentración de su producto de hidrólisis estable, la 6-ceto-prostaglandina F<sub>1alfa</sub> según lo determinado mediante un equipo de inmuanoanálisis comercial (GE Healthcare, Barcelona, España) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema combina el uso de 6-ceto-prostaglandina F<sub>1alfa</sub> marcada con un radioisótópico (Amersham Pharmacia Biotech,

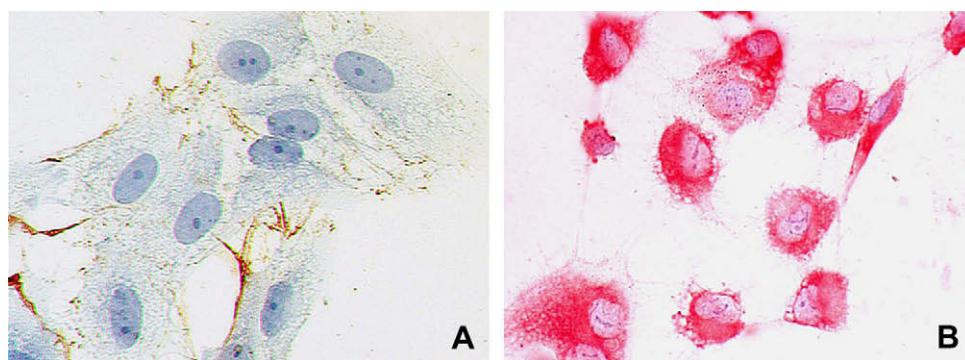
Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos) y anticuerpos específicos anti-6-ceto-prostaglandina F<sub>1alfa</sub>. Para determinar la cantidad de esta sustancia presente en los diferentes subcultivos de CE humanas, se obtuvieron los sobrenadantes del cultivo correspondientes a los tres primeros subcultivos y los niveles de este producto se determinaron midiendo el número de recuentos por minuto (cpm) con un contador gamma (Beckman, Fullerton, CA). Por último, la concentración se predijo utilizando curvas de extrapolación designadas con concentraciones conocidas de 6-ceto-prostaglandina F<sub>1alfa</sub>. La producción de prostaciclina se expresó como nanogramos de PGI<sub>2</sub> por mililitro de sobrenadante.

## Inmunocitoquímica de CD34 y factor von Willebrand

La expresión de los marcadores endoteliales CD34 y factor von Willebrand se evaluó mediante inmunocitoquímica en las CE cultivadas en superficies de cristal. Con este objetivo, se lavaron e incubaron las CE subconfluentes con anticuerpos de conejo antifactor de von Willebrand humano (Sigma-Aldrich) o con anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD34 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante una hora a 37°C o toda la noche a 4°C. Después de varios lavados con suero salino neutralizado con fosfato, durante 90 min a temperatura ambiente se usaron un anticuerpo secundario de ratón anti-conejo marcado con biotina o un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón marcado con peroxidasa. Acto seguido, se aplicó una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano durante 40 min en el caso de la inmunotinción de CD34 y para la detección de factor von Willebrand se usó avidina fosfatasa. Por último, se tiñeron mediante kit comercial de 3,3'-diaminobencidina (Sigma-Aldrich) para CD34 y Fast Red (Sigma-Aldrich) para el factor von Willebrand, y las muestras se montaron en portaobjetos para su evaluación óptica.

Para comparar la expresión del factor von Willebrand entre los tres primeros pasos de células de CE, determinamos el porcentaje de células positivas para factor von Willebrand obtenidas en cada pase. Con esta finalidad, evaluamos un total de 3.000 células de cada pase después de efectuar el procedimiento histoquímico para el factor von Willebrand descrito previamente, y contamos el número total de células von Willebrand positivas y negativas. En cada pase de células el porcentaje de células positivas se determinó usando la fórmula siguiente:

$$\frac{100 \times (\text{número de células positivas})}{(\text{número de células positivas} + \text{número de células negativas})}$$



**Fig. 1.** Detección inmunocitoquímica de CD34 y factor de von Willebrand en CE cultivadas aisladas de cordones umbilicales humanos. **A** La inmunoanálisis de CD34 se detecta en color pardo en la superficie de las células. **B** La señal intensa del factor de von Willebrand se detecta en rojo.

### Tratamiento estadístico

Para evaluar la significación estadística de las diferencias entre las concentraciones iónicas intracelulares medias, la actividad  $PGI_2$  y la expresión del factor de von Willebrand para los subcultivos *pairwise* (subcultivo 1 comparado con 2, 2 comparado con 3 y 1 comparado con 3), usamos la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Las comparaciones de los diversos subcultivos a la vez se efectuaron con la prueba de Kruskal-Wallis para muestras múltiples. Para todas las pruebas, se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  bilateral  $< 0,05$ . Todos los análisis se efectuaron utilizando el programa SPSS versión 12.1 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Para comparaciones múltiples se consideró significativo un nivel de 0,001 con un ajuste de Bonferroni porque se usaron al mismo tiempo hasta 28 pruebas estadísticas, mientras que valores de  $p$  de 0,001-0,009 se consideraron próximos a la significación.

## RESULTADOS

### Establecimiento de cultivos primarios de CE de vena umbilical humana

En esta investigación, aislamos y cultivamos eficientemente CE humanas de cordones umbilicales de recién nacidos. Las células cultivadas manifestaban una forma poligonal variable, mostrando una tasa de proliferación rápida en cultivo y alcanzando una subconfluencia alrededor del 13.º día de cultivo ( $13,1 \pm 1,8$  días). La naturaleza endotelial de las células cultivadas se demostró por la elevada expresión de CD34 y factor von Willebrand mediante inmunocitoquímica (fig. 1). No se detectaron diferencias morfológicas con microscopio óptico o electrónico entre los tres pasos de células estudiados en la presente investigación.

### Contenido iónico de las CE cultivadas

El análisis de las CE de cada subcultivo reveló que las CE cultivadas correspondientes a los tres primeros pasos se caracterizaron por elevados cocientes medios de K/Na (4,72 para el primer pase, 4,55 para el segundo y 7,82 para el tercero), correspondiendo la mayor concentración de potasio ( $567,80 \pm 3,86$  mmol/kg de peso seco) y la menor concentración de sodio ( $71,30 \pm 0,60$  mmol/kg de peso seco) al tercer pase (tabla I). En la figura 2 se muestra un ejemplo ilustrativo de un espectro correspondiente a una célula del segundo subcultivo.

La comparación global del contenido iónico intracelular entre los 3 subcultivos, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para muestras múltiples, reveló diferencias estadísticamente significativas para el contenido de potasio y diferencias casi significativas para el magnesio, sugiriendo que el contenido celular de algunos elementos clave podría variar de acuerdo con el subcultivo de células (tabla II). De forma parecida, se encontraron diferencias cuando se llevaron a cabo comparaciones estadísticas una a una entre dos diferentes pasos de células utilizando la prueba de Wilcoxon (tabla II). En primer lugar, cuando se compararon las concentraciones iónicas intracelulares entre las células del primer pase y las del segundo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los elementos analizados. Sin embargo, la comparación del segundo frente al tercer pase de células mostró un aumento significativo de potasio y magnesio en el tercer pase, con un aumento casi significativo del fósforo, mientras que las células correspondientes al segundo pase presentaban una concentración significativamente mayor de sodio. Por último, cuando se compararon el primer y el tercer pase, se detectó un aumento significativo de la concentración de potasio en el tercero (tabla II, fig. 3).

**Tabla I.** Concentraciones medias de los principales iones intracelulares analizados en células endoteliales aisladas de vena umbilical humana a partir de los subcultivos 1-3

	Pase 1	Pase 2	Pase 3
Cloro	246,95 ± 1,90	234,00 ± 1,58	259,21 ± 2,31
Magnesio	21,36 ± 0,52	16,71 ± 0,17	22,33 ± 0,19
Fósforo	252,66 ± 1,46	249,58 ± 1,37	275,71 ± 1,36
Potasio	444,11 ± 2,92	435,38 ± 4,02	557,80 ± 3,86
Sodio	94,07 ± 1,33	95,65 ± 0,95	71,30 ± 0,60
Azufre	56,71 ± 0,60	62,18 ± 0,55	72,33 ± 1,26
Cociente K/Na	4,72	4,55	7,82

Todas las concentraciones se expresan como milímoles por kilogramo de peso seco, media ± error estándar (EE). La última fila corresponde al cociente de la concentración media de potasio/sodio.

### Cuantificación de PGI<sub>2</sub> en los diferentes pasos de células

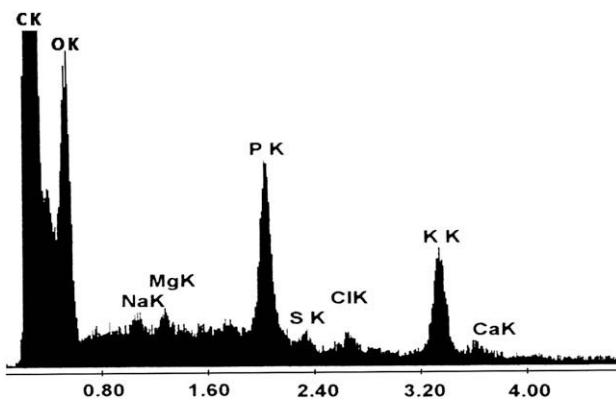
La cuantificación de PGI<sub>2</sub> producida por los diferentes pasos de CE mantenidas en cultivo demostró que la cantidad de esta sustancia varió entre los tres pasos consecutivos ( $p < 0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis). En pocas palabras, la concentración de PGI<sub>2</sub> disminuyó progresivamente entre los pasos consecutivos de células ( $6,46 \pm 0,10$  ng PGI<sub>2</sub>/ml de sobrenadante para el primer pase,  $5,98 \pm 0,08$  para el segundo y  $1,62 \pm 0,05$  para el tercero) con diferencias casi significativas para la comparación del primer y tercer pase y segundo y tercero ( $p = 0,008$  para ambas comparaciones utilizando la prueba de Wilcoxon) (tabla II, fig. 4).

### Expresión del factor de von Willebrand en los diferentes pasos de células

La inmunohistoquímica para el factor von Willebrand demostró que el 64,12% de CE en el primer pase expresaron cantidades elevadas de esta proteína, un 66,66% de células fueron positivas en el segundo pase y un 65,93% en el tercero (fig. 4). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (prueba de Wilcoxon,  $p > 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La construcción de tejidos y órganos artificiales mediante ingeniería de tejidos depende en alto grado de la disponibilidad de células viables. Por esta razón, la evaluación de la viabilidad de CE cultivadas es muy importante antes de que puedan usarse para el desarrollo de prótesis vasculares



**Fig. 2.** Espectro microanalítico correspondiente al segundo pase de las CE analizadas en la presente investigación. Los picos corresponden a la energía dispersada por los electrones localizados en las órbitas k del carbono (CK), oxígeno (OK), sodio (NaK), magnesio (MgK), fósforo (PK), azufre (SK), cloro (ClK), potasio (KK), y calcio (CaK).

biológicas o *stents* mediante ingeniería de tejidos puesto que los sustitutos vasculares con CE sembradas son significativamente más biocompatibles que los biomateriales no sembrados<sup>40,41</sup>.

Hasta la fecha, se han descrito numerosos métodos diferentes para evaluar la viabilidad de las células mantenidas en cultivo. Entre ellos, una de las técnicas más sensibles y precisas es la cuantificación del contenido iónico intracelular de sodio, potasio, cloro, fósforo y otros elementos mediante microanálisis de rayos X con sonda de electrones<sup>23-25</sup>. De hecho, la concentración intracelular de estos iones se correlaciona adecuadamente con el estado vital de las células y es un excelente marcador de la funcionalidad y viabilidad de las células, que permite al investigador identificar las células viables y muertas en el contexto de una población de células. Además, este sistema permite la identificación de células vivas pero propensas a la muerte en poco tiempo (p. ej., estadios iniciales de la apoptosis), permitiendo el análisis simultáneo de la estructura celular y las concentraciones iónicas intracelulares<sup>26-29</sup>. Por otra parte, los cambios iónicos que se producen en las células en cultivo pueden actuar como marcadores tempranos de la muerte celular y son detectables en las células antes de que aparezcan los cambios morfológicos.

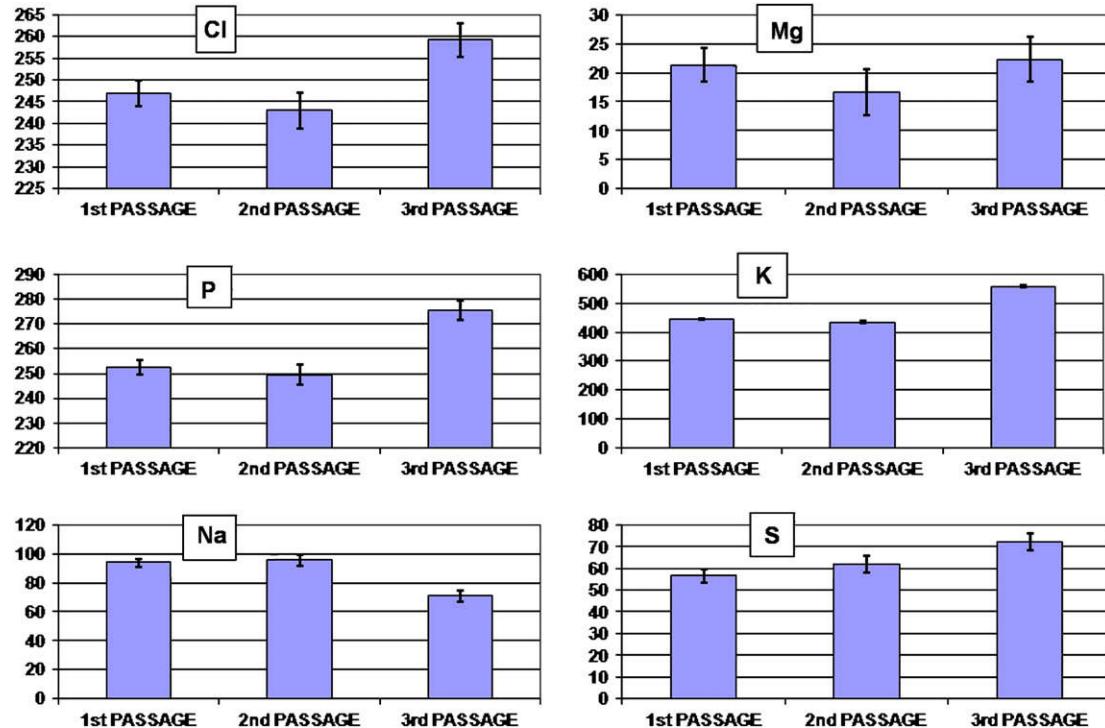
Previamente se ha demostrado que los cultivos de células tienen tendencia a envejecer y a perder viabilidad después de varios pasos<sup>32,42</sup>. Por esta razón, diversas investigaciones han centrado su objetivo en la identificación del pase celular específico que es más apropiado para la construcción de tejidos y órganos artificiales mediante ingeniería de tejidos, aunque se ha detectado una heterogeneidad

**Tabla II.** Significación estadística (valores de  $p$ ) para las comparaciones de las concentraciones intracelulares de diversos iones y para la actividad de PGI<sub>2</sub>

	1 comparado con 2 comparado con 3	1 comparado con 2	2 comparado con 3	1 comparado con 3
Cl	$p = 0,584$	$p = 0,806$ (NS)	$p = 0,278$ (NS)	$p = 0,404$ (NS)
Mg	$p = 0,006$	$p = 0,294$ (NS)	$p = 0,001$ (3)	$p = 0,042$ (3)
P	$p = 0,078$	$p = 0,555$ (NS)	$p = 0,003$ (3)	$p = 0,179$ (NS)
K	$p = 0,001$	$p = 0,404$ (NS)	$p < 0,001$ (3)	$p < 0,001$ (3)
Na	$p = 0,013$	$p = 0,768$ (NS)	$p < 0,001$ (2)	$p = 0,024$ (1)
S	$p = 0,021$	$p = 0,229$ (NS)	$p = 0,561$ (NS)	$p = 0,015$ (3)
PGI <sub>2</sub>	$p < 0,001$	$p = 0,110$ (NS)	$p = 0,008$ (2)	$p = 0,008$ (1)

1 comparado con 2 comparado con 3 corresponde a las comparaciones de múltiples grupos usando la prueba de Kruskal-Wallis (pases de células 1 comparado con 2 comparado con 3). El resto de columnas corresponde a las comparaciones *pairwise* entre los diferentes pases utilizando la prueba de Wilcoxon. Cuando las diferencias son estadísticamente significativas para estas comparaciones, se muestra entre paréntesis el pase de células con el mayor contenido del elemento específico analizado.

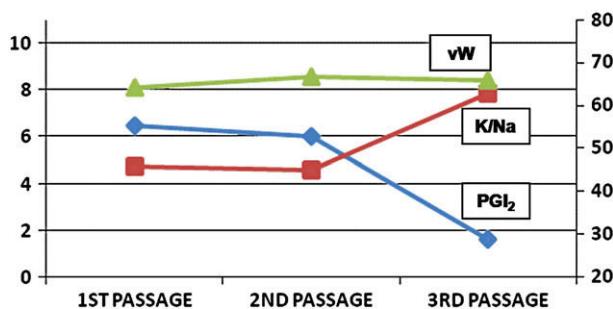
NS: no estadísticamente significativo.



**Fig. 3.** Histogramas que representan las concentraciones intracelulares medias de Cl, Mg, P, K, Na, y S para el primer, segundo y tercer pase de células. Las barras de error representan el error estándar para cada subcultivo. Todos los parámetros se expresan como milímoles por kilogramo de peso seco de célula.

elevada. Por consiguiente algunos estudios publicados sugieren que las CE pueden conservarse *in vitro* durante hasta 10 generaciones sucesivas antes de su envejecimiento<sup>34,43</sup>. Sin embargo, Bellon et al<sup>44</sup> y Conte et al<sup>17</sup> describieron que las CE son capaces de mantener las características morfológicas principales durante los cuatro primeros subcultivos, apareciendo cambios importantes a partir del tercero y una clara degeneración de las células a partir del quinto. De forma parecida, Zhu y Joyce<sup>45</sup> y

Alaminos et al<sup>32</sup> documentaron que las CE corneales muestran niveles adecuados de viabilidad hasta el cuarto subcultivo. Todos estos resultados sugieren que los tres primeros pases celulares son los más viables y que el proceso de envejecimiento se desencadena empezando a partir del cuarto pase. Por esta razón, en la presente investigación usamos los tres primeros pases de células para determinar cuál es el más adecuado para su uso en ingeniería de tejidos.



**Fig. 4.** Cociente medio K/Na, síntesis de PGI<sub>2</sub> y expresión de factor de von Willebrand en las células endoteliales correspondientes a los tres primeros pasos de células. El aumento del cociente K/Na se asocia con una disminución significativa de la síntesis de PGI<sub>2</sub> después del segundo pase de células, con niveles estables de factor de von Willebrand. PGI<sub>2</sub>: prostaciclina; vW: factor de Von Willebrand.

En este sentido, los resultados mostrados en la presente investigación revelan que las concentraciones intracelulares de algunos elementos en las CE humanas podrían diferir entre los tres primeros pasos de células, con un notable aumento del cociente K/Na desde los dos primeros pasos al tercero, asociado con una disminución significativa del sodio y un aumento del contenido de potasio. Por lo tanto, estos datos indican que la viabilidad de las CE cultivadas es mayor en el tercer pase que en los dos primeros, lo que coincide con diversas publicaciones que demostraron previamente que el cociente K/Na se asocia claramente con el estado de viabilidad de las células conservadas en cultivo y puede usarse como marcador de la viabilidad de las células o como indicador de lesión celular<sup>32,46,47</sup>. Coinciendo con los resultados del presente estudio, Adragna<sup>48</sup> utilizando CE describió un aumento exponencial del cociente K/Na relacionado con los días en cultivo y el número de subcultivos de células. De acuerdo con los resultados microanalíticos, las CE que pertenecen al tercer pase de células son las más precisas para usar en ingeniería de tejidos.

Por otra parte, encontramos que el contenido intracelular de magnesio aumentó desde el segundo al tercer pase en las CE cultivadas. De acuerdo con una investigación previa de Buja et al<sup>26</sup> y Di Francesco et al<sup>49</sup>, una posible explicación de este aumento iónico podría ser la variación de la concentración intracelular de adenosín trifosfato (ATP). Además, en la presente investigación, detectamos un aumento casi significativo de la concentración intracelular de fósforo en el tercer subcultivo de CE. Desde un punto de vista microanalítico, la concentración de fósforo sigue siendo

constante en células sin una lesión estructural y disminuye significativamente en aquellas lesionadas<sup>24</sup>. En nuestro caso, el aumento del fósforo podría asociarse con la activación celular y la mejora de la actividad biosintética y replicativa de las células en el tercer pase.

Aunque las diferencias no fueron significativas en las células de la presente investigación, identificamos una tendencia hacia una mayor concentración de cloro y azufre en las células pertenecientes al tercer subcultivo. Las variaciones de la concentración de cloro son marcadores apropiados de la apoptosis temprana en diferentes tipos de células<sup>50-52</sup>, mientras que el azufre se relaciona con el contenido intracelular de proteínas y glucosaminoglucanos<sup>24,53</sup>. En la presente investigación, las variaciones no significativas de ambos elementos (cloro y azufre) son un indicio de que los cambios microanalíticos experimentados por las CE de diferentes cultivos probablemente no se asocian con apoptosis.

Además de la viabilidad celular, el investigador debe garantizar que las células que han de usarse en ingeniería de tejidos son funcionales por completo. En la presente investigación, primero, caracterizamos las células cultivadas mediante inmunocitoquímica para los marcadores endoteliales CD34 y factor de von Willebrand para garantizar que la mayor parte de células usadas eran de origen endotelial. Por lo tanto, efectuamos un análisis secuencial de la función de las CE cuantificando la producción de dicho factor y la liberación de PGI<sub>2</sub> en las CE correspondientes a diferentes pasos de células. Los resultados de este análisis demostraron que el número de células positivas para el factor von Willebrand fue similar en los tres primeros pasos de células, lo que sugiere que las funciones asociadas con actividad del factor permanecen estables en CE cultivadas. No obstante, la capacidad de estas células para sintetizar y liberar PGI<sub>2</sub> es alta en el primer y segundo pase, detectándose niveles más bajos en el tercero. La PGI<sub>2</sub> es un potente vasodilatador y un inhibidor de la agregación plaquetaria cuya cuantificación se ha usado como marcador apropiado de la función de las CE en cultivo. Coinciendo con los resultados del presente estudio, se ha descrito que la producción de PGI<sub>2</sub> por las CE cultivadas disminuye durante el subcultivo de CE de animales y humanas<sup>54</sup>. Estos resultados indican que las CE mantenidas en cultivo son estables desde un punto de vista biológico y expresan cantidades similares de factor von Willebrand pero tienen tendencia a perder su funcionalidad con el tiempo. Por esta razón, las células del tercer pase no serían útiles para la construcción de tejidos y órganos artificiales por ingeniería de tejidos.

En resumen, todos los resultados de la presente investigación implican diversas consecuencias. Por una parte, el cociente K/Na sugiere que la mayor viabilidad celular corresponde al tercer pase de células. Por otra parte, la mayor actividad vasomotora funcional de las CE según lo determinado mediante cuantificación de PGI<sub>2</sub> se encontró en las células correspondientes al primer pase, al mismo tiempo que, según lo determinado mediante detección de factor de von Willebrand, la fase humoral de la coagulación permaneció estable. Considerado en conjunto, concluimos que el pase de células más apropiado para la ingeniería de tejidos es el segundo. En estos momentos, de acuerdo con los resultados del presente estudio, tanto la viabilidad como la función convergen y las CE muestran un equilibrio adecuado entre estos dos importantes parámetros.

*La presente investigación se financió con becas del Ministerio de Sanidad español (bezas FIS PI061784 y PI061781 del Instituto Español de Salud Carlos III).*

## BIBLIOGRAFÍA

1. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 2003;196:430-443.
2. Sumpio B, Riley JT, Dardik A. Cell in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1508-1512.
3. Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res* 2000;42: 9-19.
4. Scholz D, Cai W, Schaper W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* 2001;4:247-257.
5. Keller T, Mairuhu A, de Kruif M, et al. Infections and endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2003;60:40-48.
6. Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothelium* 2006;13:423-429.
7. Busse R, Edwards G, Feletou M, et al. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:374-380.
8. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:23-37.
9. Mitchell SH, Niklason L. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol* 2003;12: 59-64.
10. Lanni G, Napolitano MM, Scala A, et al. "Tube-guided" implant of bioprosthetic shunt for hemodialysis. *Am J Surg* 2001;181:50-51.
11. Wu HC, Wang TW, Kang PL, et al. Coculture of endothelial and smooth muscle cells on a collagen membrane in the development of a small-diameter vascular graft. *Biomaterials* 2007;28:1385-1392.
12. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med* 2007;357:1451-1453.
13. Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol* 2003;12: 271-276.
14. Williamson MR, Black R, Kielty C. PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells. *Biomaterials* 2006;27: 3608-3616.
15. Amiel GE, Komura M, Shapira O, et al. Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells. *Tissue Eng* 2006;12:2355-2365.
16. Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3311-3317.
17. Conte MS, Van Meter GA, Akst LM, et al. Endothelial cell seeding influences lesion development following arterial injury in the cholesterol-fed rabbit. *Cardiovasc Res* 2002;53: 502-511.
18. Pascual G, Escudero C, Rodríguez M, et al. Restoring the endothelium of cryopreserved arterial grafts: co-culture of venous and arterial endothelial cells. *Cryobiology* 2004;49: 272-285.
19. van Leeuwen EBM, Molema G, van Luyn MJA, et al. Scanning electron microscopic analysis of endothelial cell coverage and quality in large vessels from multi-organ donors: effects of preservation on endothelial cell integrity. *Clin Transplant* 2000;14:246-251.
20. Bouillaguet S, Wataha JC, Virgillito M, et al. Effect of sub-lethal concentrations of HEMA 2-hydroxyethylmethacrylate on THP-1 human monocyte-macrophages, *in vitro*. *Dent Mater* 2000;16:213-217.
21. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* 1987;20: 83-90.
22. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000;130: 947-962.
23. Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, et al. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* 1999;253:454-462.
24. Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial cell suture. *Methods Mol Biol* 2002;188:273-289.
25. Zierold K. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144:70-76.
26. Buja LM, Hagler HK, Parsons D, et al. Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid. *Lab Invest* 1985;53:397-411.
27. Hall TA. Capabilities and limitations of probe methods for the microanalysis of chemical elements in biology: a brief introduction. *Ultramicroscopy* 1988;24:181-184.
28. Vanthanouvong V, Hogman M, Roomans GM. In vitro and in situ experimental model for X-ray microanalysis of intestinal epithelium. *Microsc Res Tech* 2003;62:211-217.
29. Warley A. X-ray microanalysis for biologists. 1st ed. Cambridge: Portland Press, 1997.
30. Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, et al. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* 1997;21:665-669.
31. Warley A, Fernandez-Segura E, Lopez-Escamez JA, et al. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int* 1994;18:915-916.

32. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Muñoz-Avila JI, et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol* 2007;211:692-698.
33. Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res* 2000;42:9-19.
34. Jaffe E, Nachman R, Becker C, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-2756.
35. Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, et al. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol* 1985;248:154-164.
36. Warley A. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* 1994;8:129-137.
37. Statham PJ, Pawley JB. A new method for particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microsc* 1978;1:469.
38. Boekesteijn A, Thiel F, Stols ALH, et al. 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.
39. Warley A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc* 1990;157:135-147.
40. Shirota T, Yasui H, Matsuda T. Intraluminal tissue-engineered therapeutic stent using endothelial progenitor cell-inoculated hybrid tissue and in vitro performance. *Tissue Eng* 2003;9:473-485.
41. Bujan J, Garcia-Hondurilla N, Bellon JM. Engineering conduits to resemble natural vascular tissue. *Biotechnol Appl Biochem* 2004;39:17-27.
42. Balconi G, Dejana E. Cultivation of endothelial cells: limitations and perspectives. *Med Biol* 1986;64:231-245.
43. Bouis D, Hospers G, Meijer C, et al. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessels-related research. *Angiogenesis* 2001;4:91-102.
44. Bellon JM, Bujan J, Hondurilla NG, et al. Behavior of cryopreserved endothelial cells in different phases: their application in the seeding of vascular prostheses. *Ann Vasc Surg* 1995;9:266-273.
45. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1743-1751.
46. Bauer PS, Bolton WE, Barranco SC. Electron microscopy and microchemical analysis of the cystic fibrosis diploid fibroblast in vivo. *Texas Rep Biol Med* 1976;34:113-136.
47. Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol* 2007;22:631-640.
48. Adragna NC. Changes in cation composition of aortic endothelial cells in culture. *Tissue Cell* 1988;20:313-329.
49. Di Francesco A, Desnoyer RW, Covacci V, et al. Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* 1998;360:149-157.
50. Skepper JN, Karydis I, Garnett MR, et al. 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.
51. Yu SP, Canzoniero L, Choi D. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:405-411.
52. Salido M, Vilches J, Roodmans GM. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int* 2004;28:397-402.
53. Sanchez-Quevedo MC, Crespo PV, Garcia JM, et al. X-ray microanalytical histochemistry of human circum pulpar and mantle dentine. *Bone Miner* 1989;6:323-329.
54. Goldsmith JC, Jafvert CT, Lollar P, et al. Prostacyclin release from cultured and ex vivo bovine vascular endothelium. *Lab Invest* 1981;45:191-197.