

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**AISLAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD  
MICROANALÍTICO PARA INGENIERÍA TISULAR  
DE LOS CONDROCITOS DEL TEJIDO  
CARTILAGINOSO HIALINO Y FIBROSO**

***TESIS DOCTORAL***

**RAÚL ROSALES IBÁÑEZ**

**2008**





**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Histología

*Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS - 115*

**“AISLAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD MICROANALÍTICO PARA  
INGENIERÍA TISULAR DE LOS CONDROCITOS DEL TEJIDO  
CARTILAGINOSO HIALINO Y FIBROSO”**

*Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por el Proyecto de Excelencia titulado “ELABORACIÓN DE ORGANOS Y TEJIDOS ARTIFICIALES PARA SU APLICACIÓN TERAPEUTICA” – P06-CTS-2191 de la Junta de Andalucía*

Granada, a 22 de marzo de 2008.

**AISLAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD MICROANALÍTICO PARA  
INGENIERÍA TISULAR DE LOS CONDROCITOS DEL TEJIDO  
CARTILAGINOSO HIALINO Y FIBROSO**

Memoria que presenta el Licenciado en Odontología  
Raúl Rosales Ibáñez  
para aspirar al título de Doctor

Fdo.: Raúl Rosales Ibáñez

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Antonio Campos Muñoz  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Miguel Alaminos Mingorance  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Universidad de Granada

VºBº El Director de la Tesis

Fdo.: Dr. María del Carmen Sánchez Quevedo  
Doctora en Ciencias Químicas  
Universidad de Granada

Departamento de Histología  
Universidad de Granada  
2008

**A mi madre y mis hermanos**

## **AGRADECIMIENTOS**

Resulta fácil escribir los nombres de todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo de investigación, pero me resulta muy difícil en unas líneas poder expresar mi agradecimiento a los que de una u otra manera han contribuido tanto profesional como personalmente, durante estos años, a la culminación de esta Tesis Doctoral.

Debo agradecer en primer lugar al Dr. Antonio Campos, por haber depositado su confianza en mí, por toda su ayuda, por su permanente apoyo, facilitando todos los recursos para la realización de este trabajo Me ha enseñado la importancia de la investigación en cultivos de células, así como transmitirme sin egoísmos sus enormes conocimientos en el ámbito de la medicina, además de estructurar de forma decisiva este trabajo.

Mi mayor gratitud al Dr. Miguel Alaminos Mingorance que ha estado a mi lado ayudándome y animándome constantemente, por sus consejos en momentos críticos y su permanente apoyo, de igual forma en transmitirme sus conocimientos, aportando además ideas esenciales y el enorme esfuerzo que ha desarrollado para la realización de esta Tesis, a él debo gran parte la realización de esta obra, así como también el haber disfrutado haciéndola.

A la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Sánchez-Quevedo, por transmitirme sus conocimientos y el gran aporte científico para la realización de este trabajo de investigación, así como contribuir en espacios de alegría en los momentos más difíciles que duró el doctorado.

A Ingrid Johanna Garzón, por su ayuda y su apoyo y por estar siempre al pendiente de los cultivos celulares y de todo lo referente al trabajo del *sweet lab*.

A mis amigos, especialmente a los Dres. Amaury de Jesús Pozos Guillen, con todo su apoyo, consejos, y además de guiarme por el camino adecuado para la realización del doctorado, a Joel David Flores Rivas por sus consejos acertados y por depositar su confianza y su gran apoyo en todos los aspectos, así como a José Salomé Murguía, al maestro Francisco Mercado Franco, Javier de la Rosa Jourdan, José Francisco Licea Tovar, Jorge, Nieves Pozo, Ricardo Ruíz, Ruthi y Marthita, que me brindaron su incondicional apoyo y siempre creyeron en mí y estuvieron impulsándome en cada momento. Forman parte de mi vida; a todos ustedes mil gracias.

Ivonne Andrea y Fabián, que juntos iniciamos esta aventura fuera de nuestros países, y siempre me estuvieron apoyando, aconsejando y, sobre todo, hicieron más amena la estancia fuera de mi país con sus muestras de cariño y compañía.

A Roxanne Olvera por todas sus muestras de cariño y apoyo, y por estar siempre pendiente en los momentos más difíciles de mi vida.

A Cristi, mi asistente en la consulta privada, ya que con su ayuda y trabajo a distancia logramos sacar el consultorio adelante y, sobre todo, por el enorme apoyo que de su parte recibí.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México, por conducto del Sr. Rector, el Licenciado Mario García Valdés, al Dr. Mario Arévalo Mendoza director de la Facultad de Estomatología sin cuyo apoyo no hubiese sido posible la realización del doctorado.

A la Universidad de Granada por permitirme ser parte de su Historia y ser un egresado más de esta gran institución y sobretodo a España, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de estudiar en ese hermoso país.

# ÍNDICE

Introducción .....	4
1. Estructura histológica del tejido cartilaginoso .....	6
1.1. Clasificación histológica del cartílago .....	8
1.1.1. El cartílago hialino	
a.- Condrocitos.....	9
b.- Matriz cartilaginosa.....	11
1.1.2. El cartílago fibroso.....	14
1.1.3. El cartílago elástico.....	16
1.2. Histogénesis y desarrollo del cartílago .....	17
2. Terapia celular con condrocitos.....	19
3. Evaluación de la viabilidad de las células mantenidas en cultivo.....	24
3.1. Detección de alteraciones de la permeabilidad celular	
3.2. Microanálisis por energía dispersiva de rayos X.....	26
Objetivos.....	28
Objetivo general.....	29
Objetivo específicos.....	29
Materiales y métodos.....	30
1. Aislamiento y generación de cultivos primarios de condrocitos .....	31
2. Subcultivo celular .....	33
3. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayos de exclusión de colorantes vitales.....	35
4. Determinación de la viabilidad celular mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos x .....	37
4.1. Adhesión de las células al soporte.....	37
4.2. Eliminación del medio de cultivo .....	38
4.3. Criofijación y criodesecación de las muestras.....	38

4.4. Recubrimiento de las muestras .....	40
4.5. Observación y análisis de las muestras mediante microscopía electrónica analítica .....	41
5. Evaluación microscópica de los cultivos de condrocitos .....	46
6. Análisis estadístico.....	46
Resultados .....	48
1. Cultivo celular .....	49
2. Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayos de exclusión de colorantes orgánicos (azul tripán) .....	51
3. Evaluación de la viabilidad celular mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos x .....	55
3.1. Resultados cualitativos .....	56
3.2. Resultados cuantitativos.....	83
Discusión.....	108
Conclusiones.....	117
Referencias bibliográficas.....	119

# **INTRODUCCIÓN**

Desde su incorporación generalizada por Bichat a principios del s. XIX, bajo la influencia de Pinel, Condillac y Barthez, la noción de **tejido**, aún no basada en la observación microscópica, fue progresivamente afianzándose en el modo de entender y de describir el cuerpo humano (Laín, 1982). El mérito de Bichat fue demostrar, en su *Anatomía General*, que el organismo humano está constituido por partes elementales o tejidos que se repiten y se combinan de modo diferente para constituir los distintos órganos de nuestra anatomía y, en último término, todo nuestro organismo.

El desarrollo también a principios del s. XIX, de la teoría celular con Dutrochet, Schleiden y Schwann postulando que la unidad estructural de los seres vivos radicaba en las células, ayudó a definir el concepto inicial de **tejido** (Mazarello, 1999). El organismo humano se entiende formado, a partir de ese momento, por partes similares o tejidos y éstos, a su vez, constituidos por conjuntos de células. Los tejidos corporales, fruto de la integración de ambos conceptos mencionados anteriormente, serán, desde entonces, el objetivo prioritario de un área, la Histología, que es la rama del saber que se ocupa del estudio sistemático de la estructura corporal humana (Campos, 2004).

El reto de la histología de nuestros días es pasar del conocimiento descriptivo y funcional de los tejidos que constituyen nuestro cuerpo a través de distintos instrumentos y técnicas amplificantes, a la utilización de este conocimiento para explicar la enfermedad y las distintas acciones terapéuticas, así como a la construcción y configuración de nuevos tejidos (Hardingham *et al.*, 2002, Campos, 2004).

En la medicina y a nivel de órganos, aparatos y sistemas, la sustitución terapéutica de las estructuras lesionadas es muy antigua. La utilización de prótesis no biológicas, las únicas utilizadas durante mucho tiempo, han evolucionado en su complejidad desde miembros artificiales o dentaduras que se adhieren al cuerpo, pero que no se injertan, hasta marcapasos o componentes del sistema esquelético, cerámicos, plásticos o metálicos, que se injertan pero que biológicamente no se integran (Hardingham *et al.*, 2002, Campos, 2004).

Durante los últimos tiempos, ha surgido un nuevo campo de la medicina que está íntimamente ligado al conocimiento y el desarrollo de la histología, la cual se conoce con el nombre de **Ingeniería Tisular** (Campos, 2004). Según Campos (2004), la Ingeniería Tisular se puede definir como la construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización médica, para restaurar, sustituir o incrementar las

actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos. La investigación en *Ingeniería Tisular* comenzó en 1987, cuando el Profesor Fung de la Universidad de California en San Diego 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, no sólo como una línea de investigación fundamental y prioritaria en las universidades, en los hospitales y en las agendas de los gobiernos (Brittberg, 2001; Campos, 2004; Tabak, 2004), sino, además, como una actividad industrial de primera magnitud llamada a tener un enorme impacto en la economía y en el desarrollo de los países más avanzados (Campos, 2004; Tabak, 2004).

Aunque recientemente se están realizando investigaciones en el área de la Ingeniería Tisular en odontología (Tabak, 2004; Elisseff, 2005), poco se sabe sobre el impacto de ésta para el odontólogo y qué tipo de *tejido oral* puede ser cultivado y regenerado. Aún así, se espera que la Ingeniería Tisular abra nuevos campos para el odontólogo, desde una aplicación de células progenitoras en la cavidad bucal, hasta el *cultivo* de diferentes tipos de *sustitutos tisulares* relacionados con ésta, incluyendo hueso (Laurencin *et al.*, 1999), piel (Meana *et al.*, 1998; Llamas *et al.*, 2004 y 2006; García *et al.*, 2007), mucosa oral, (Alaminos *et al.*, 2007; Sánchez-Quevedo *et al.*, 2007) dentina, pulpa dental, glándulas salivales y el propio cartílago (Kaigler *et al.*, 2001). En efecto, una de las áreas en las que la Ingeniería Tisular ha logrado un mayor desarrollo es la construcción de tejido cartilaginoso artificial para su posible utilización en la patología articular (Tuli *et al.*, 2003; Redman *et al.*, 2005). El hecho de que el cartílago sea un tejido carente de vasos sanguíneos, hace que este tejido pueda ser reproducido en laboratorio con mayor facilidad que otros tejidos más complejos.

Además, en esta área, la viabilidad de las células cartilaginosas constituye un objetivo prioritario a la hora de asegurar la eficacia terapéutica de estos tejidos artificiales. A este respecto, la presente Tesis Doctoral tiene por objeto evaluar la viabilidad de los condrocitos de dos tipos diferentes de tejido cartilaginoso para su utilización en protocolos de terapia celular.

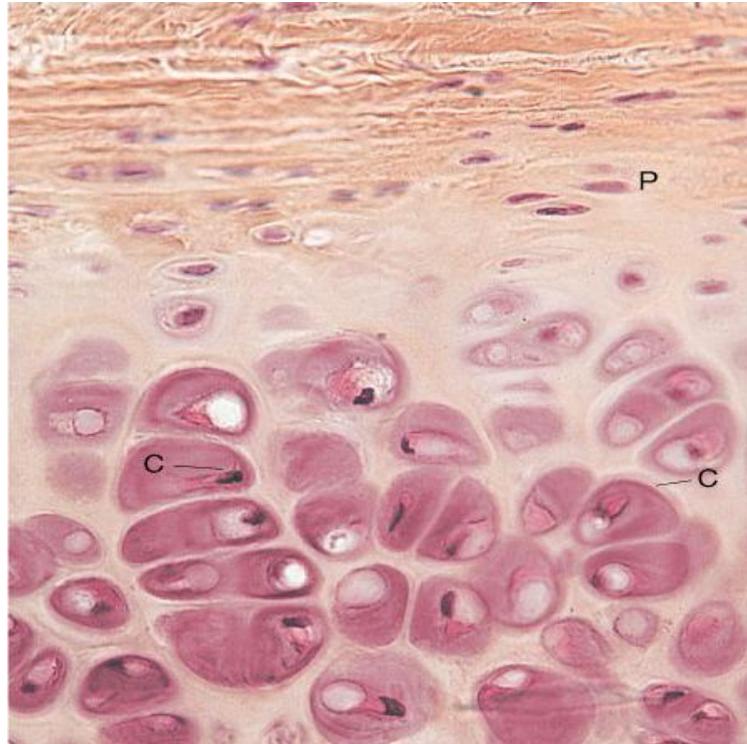
En este capítulo introductorio expondremos sucesivamente la histología del cartílago, las técnicas de terapia celular con condrocitos desarrolladas hasta el momento presente y los principales métodos que se utilizan para determinar la viabilidad de las células mantenidas en cultivo. Finalmente, expondremos los objetivos generales y los objetivos específicos de la Tesis Doctoral.

## 1. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO

El **cartílago** (del latín *cartilago* y del griego *chondros*) es una forma especializada de tejido conectivo, compuesto, como otros tejidos conectivos, por células y componentes extracelulares. Las células, denominados **condrocitos**, están aisladas en pequeños espacios de la abundante matriz extracelular, la cual está compuesta por fibras incluidas en una sustancia fundamental. A diferencia de otros tejidos conectivos, el cartílago no contiene vasos ni terminaciones nerviosas, por lo que las células se han de nutrir por difusión a través de la sustancia fundamental, que es un gel coloidal firme rico en agua.

En el ser humano adulto hay relativamente poco cartílago, pero en el feto y la infancia el cartílago desempeña un papel muy importante en el organismo. Es un componente capaz de crecer con gran rapidez y al mismo tiempo tener cierta consistencia; estas dos propiedades lo hacen ideal como material esquelético durante el desarrollo fetal. La mayor parte del esqueleto se forma primero sobre la base de los moldes de cartílago, que luego serán reemplazados por hueso. Además, el crecimiento longitudinal de los huesos largos durante el periodo de crecimiento del individuo, la infancia y la adolescencia, depende de la presencia de cartílago en las zonas de crecimiento de esos huesos. En el esqueleto del individuo adulto aparece cartílago sólo bajo la forma de cartílagos articulares, costales e intervertebrales, si bien forma una armazón rígido para las vías aéreas y el pabellón auricular. A excepción del cartílago articular de las articulaciones sinoviales, todos los demás están rodeados por una capa de tejido conectivo de colágeno denso, denominado membrana del cartílago o **pericondrio**. El cartílago puede ser hialino, elástico o fibroso Finn (2002). El **cartílago hialino** se deriva del griego *hyalos*, que significa vidrio, y constituye el tipo de cartílago más prevalente y el de más amplia distribución (Figura 1). El **cartílago fibroso** y el **elástico** son variaciones histológicas del cartílago hialino, diferenciándose de éste fundamentalmente en el contenido de fibras, su constitución bioquímica y su función biofísica.

Para el desarrollo y el mantenimiento del cartílago tienen gran importancia ciertos factores y hormonas de crecimiento, en especial relacionadas con el crecimiento longitudinal de los huesos largos (Finn, 2002).



**Figura 1.** Imagen de microscopía óptica en la que se aprecia la estructura básica del tejido cartilaginoso. C: condrocitos. P: pericondrio.

Las propiedades especiales de los distintos tipos de cartílago, permiten que estos se adapten a sus funciones específicas. Por ejemplo, los cartílagos articulares permiten el movimiento de los extremos articulares de los huesos casi sin que existan fricciones entre ellos, al mismo tiempo que, por ser un gel rígido, pueden absorber presiones y golpes importantes. Se cree que esta última función se debe al elevado contenido de agua en los dominios de los proteoglicanos. Ante la presión se eliminan las moléculas de agua de los dominios, para volver cuando termina el efecto de carga.

En los oídos y las vías aéreas, el cartílago forma un esqueleto rígido que permite ciertos movimientos y variaciones de forma.

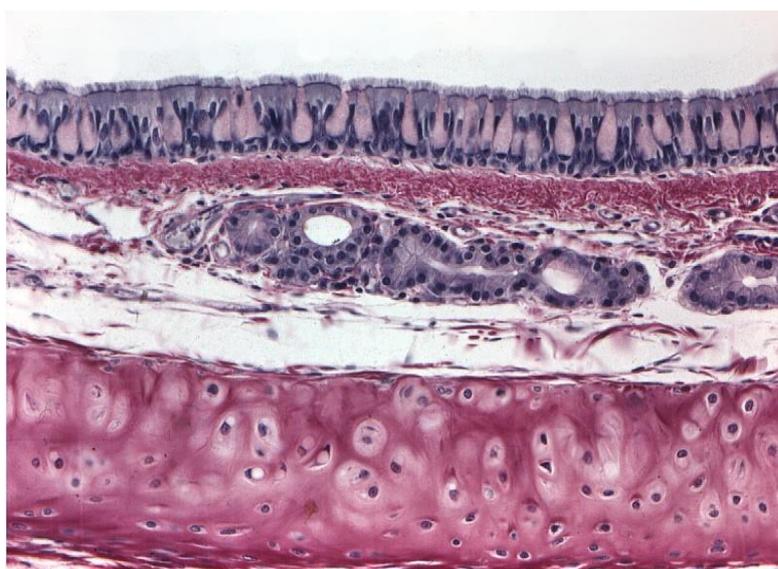
Respecto a su regeneración, el crecimiento y la proliferación activa del cartílago se limita a los primeros años de la vida.

## 1.1. Clasificación histológica del cartílago

Atendiendo a su estructura histológica, podemos encontrar tres tipos fundamentales de cartílago: el cartílago hialino, el cartílago fibroso y el cartílago elástico. A continuación expondremos brevemente las principales características de cada uno de ellos.

### 1.1.1. El cartílago hialino

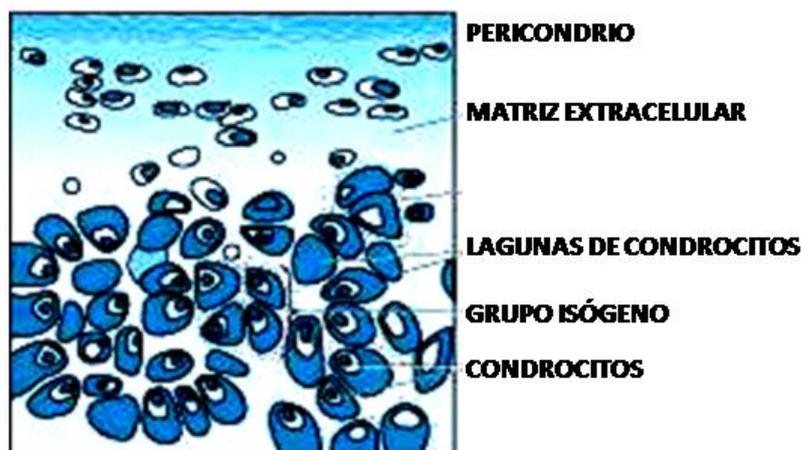
El **cartílago hialino** se deriva del griego *hyalos*, que significa vidrio (Lesson y Lesson, 1989), es el más abundante en la anatomía por lo que suele describirse como ejemplo general del cartílago (Mow *et al.* 1984), (Kuettner *et al.* 1987). En estado fresco, el cartílago hialino tiene un aspecto vidrioso azulado. En el individuo adulto, el cartílago hialino aparece en los cartílagos costales, como parte del esqueleto nasal, en la laringe, en la tráquea (Figura 2), en los bronquios y recubriendo las superficies articulares. Como todos los tipos de cartílago, el hialino está constituido por células (condrocitos) y matriz extracelular (Figura 3).



**Figura 2.** Estructura histológica de la tráquea humana. Junto con distintos tipos de tejido epitelial y conjuntivo, en la parte más inferior de la imagen se aprecia el abundante tejido cartilaginoso hialino existente a este nivel.

### a.- **Condrocitos**

Las células cartilaginosas o **condrocitos** se encuentran en las lagunas de la **matriz extracelular**. Son grandes, con diámetro hasta de 40  $\mu\text{m}$ . Los **condrocitos** más inmaduros (denominados **condroblastos**) y cercanos al **pericondrio**, se ubican en lagunas ovales, aplanadas en sentido paralelo a la superficie, mientras que los **condrocitos** maduros ubicados más en la profundidad del cartílago se ubican en lagunas más redondeadas. Las células jóvenes son aplanadas o elípticas, con su eje mayor paralelo a la superficie. Hacia el interior se hacen ovales o hipertróficas y se hallan en los nidos celulares o **grupos isógenos**. En el cartílago fetal, las células son a menudo aplanadas y rara vez se observan **nidos celulares**. Los **condrocitos** sufren un considerable grado de encogimiento durante la preparación técnica, y por tanto raras veces se adaptan a la forma de las lagunas.



**Figura 3.** Ilustración esquemática en la que se representa la estructura tisular básica del tejido cartilaginoso.

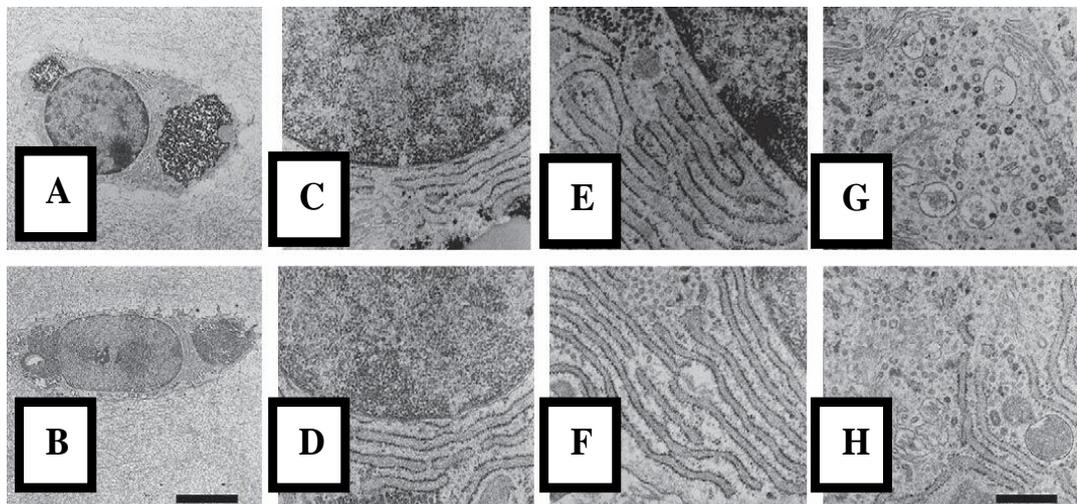
El núcleo es ovoide y se observan uno o dos nucleolos. Las organelas citoplasmáticas de los **condrocitos** son semejantes a los que se encuentran en los **fibroblastos**, que también sintetizan matriz extracelular. Hay un abundante retículo endoplasmático granuloso y un notable complejo de Golgi. El citoplasma de las células cartilaginosas es basófilo y puede ser vacuolado, también hay gotitas de lípido, glucógeno, mitocondrias y pigmentos. Las vesículas secretoras se relacionan con la región del Aparato de Golgi, y secretan material a la matriz

circundante. Las células cartilaginosas maduras se encuentran en general hacia el centro de la masa cartilaginosa, presentando un retículo endoplasmático rugoso menos abundante y una región de Golgi con grandes cúmulos de glucógeno citoplasmático (Lesson y Lesson, 1989) (Figura 4).

Durante el proceso de diferenciación a *condrocito* maduro, la basofilia se torna gradualmente en acidofilia y se retrae el retículo endoplasmático rugoso.

Los *condrocitos* sintetizan moléculas de adhesión celular, de las cuales la mejor estudiada es la condronectina. La condronectina es una glucoproteína del mismo tipo que la fibronectina y fija los *condrocitos* a la matriz extracelular para cual la condronectina tiene sitios de unión específicos (Finn, 2002). Cerca de la superficie articular presentan morfología alargada en una sección longitudinal, pero cuando el plano de corte del tejido es tangencial, su apariencia es discoide. Las células de superficie son menos activas que las localizadas en capas profundas.

A mayor profundidad, los *condrocitos* son menos numerosos, de mayor tamaño, más redondeadas y con mayor actividad metabólica. Los *condrocitos* vivos aislados *in vitro* exhiben un movimiento ameboide. Cambian constantemente su forma mediante la emisión de pseudópodos.

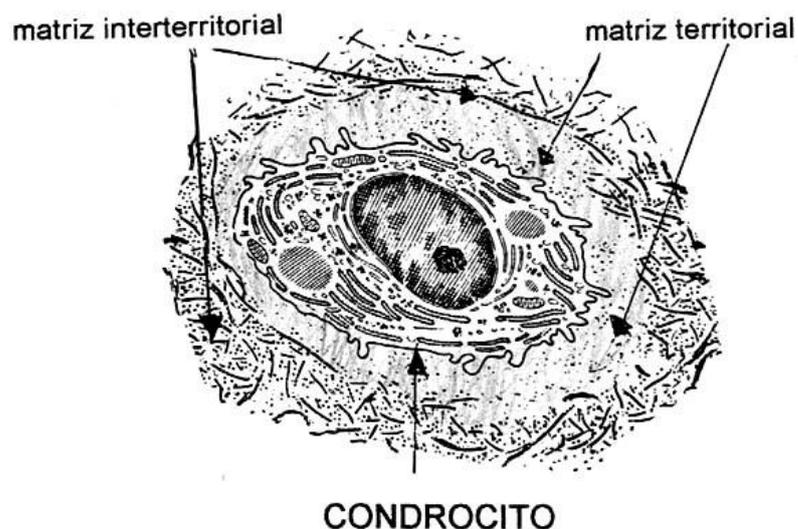


**Figura 4.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se puede apreciar la ultraestructura de un condrocito humano maduro. A, B: células cartilaginosas inmersas en la matriz extracelular; C,D: núcleo celular; E,F: retículo endoplasmático rugoso; G, H: aparato de Golgi.

### **b.- Matriz cartilaginosa**

La **matriz cartilaginosa** constituye un material denso que se sitúa entre las lagunas de condrocitos y que aporta resistencia y elasticidad al cartilago. Estructuralmente, la matriz está constituida principalmente por **fibras de colágeno** (especialmente tipo II) además de otros componentes como los **proteoglicanos**. Desde el punto de vista macroscópico y en los cortes comunes de cartilago hialino, la matriz cartilaginosa parece carecer de estructura puesto que el colágeno aparece bajo la forma de finas fibrillas que tienen índice de refracción muy similar al de la sustancia fundamental. En este caso se dice que las fibrillas están enmascaradas. Se pueden observar mediante microscopia electrónica.

En los preparados teñidos con hematoxilina-eosina la matriz es acidófila cerca del **pericondrio** (en la zona de los condrocitos inmaduros), pero se torna gradualmente más basófila a medida que se penetra en la profundidad del cartilago, al mismo tiempo que las lagunas se hacen más ovas. Alrededor de cada grupo isógeno, se observa una basofilia muy marcada, denominada **matriz territorial**, siendo la **matriz interterritorial** la que se localiza entre distintas zonas de matriz territorial (Figura 5).



**Figura 5.** Representación de un condrocito en su laguna condrocítica tal como se observaría al microscopio electrónico de transmisión.

La sustancia fundamental adopta una coloración metacromática intensa. En su mayor parte se compone de proteoglicanos, cuyos glucosaminoglicanos principales son condroitinsulfatos y queratansulfato. La basofilia se debe a los grupos sulfatos muy ácidos, mientras que la notable basofilia de la matriz territorial se debe al mayor contenido de proteoglicanos sulfatados en esta zona. Los proteoglicanos también conforman agregados por unión con hialurónico (Finn 2002).

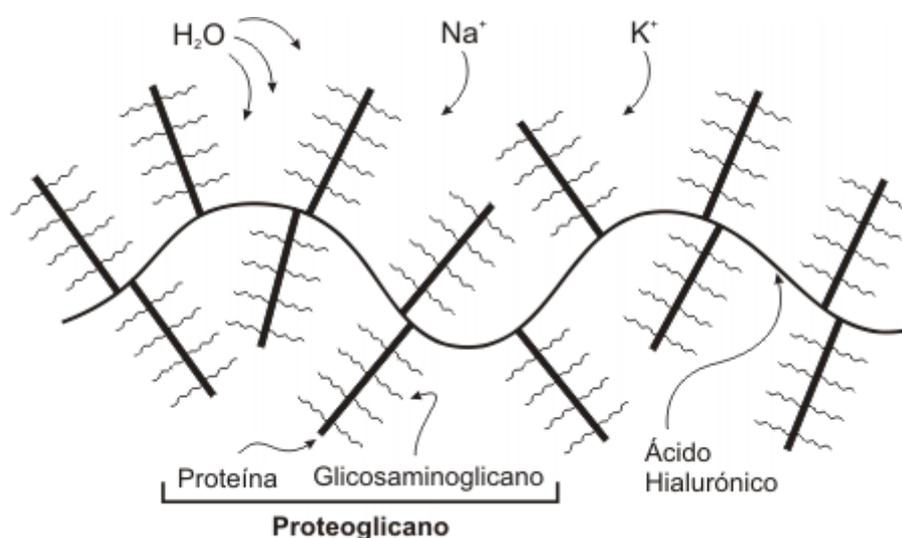
La *matriz* está constituida principalmente por **fibras de colágeno** (especialmente tipo II) además de otros componentes como los **proteoglicanos**, como veremos a continuación:

- **Proteoglicanos.** Los proteoglicanos son complejos proteico-sacáridos formados por cadenas de glucosaminoglicanos unidas a un filamento proteico central mediante enlaces covalentes (Figura 6). Los *proteoglicanos* es el segundo componente más abundante del cartílago articular, constituyendo del 5 al 10% del peso total de éste (Maroudas, 1979; Muir, 1983; Poole, 1986).

Los *glucosaminoglicanos* constituyen el 95% de los *proteoglicanos*, y son básicamente el condroitín-sulfato y el queratán-sulfato. Estos polianiones se unen covalentemente a un filamento proteico central para formar el monómero de *proteoglicano*. Este filamento presenta varias regiones. La primera región es la N-terminal y posee dos dominios globulares (G1 y G2), unos de los cuales es rico en queratán-sulfato, y el otro es rico en condroitín-sulfato. La segunda región un dominio globular C- terminal (G3). Los *proteoglicanos* se pueden encontrar de dos formas en la matriz cartilaginosa: en forma de monómeros de *proteoglicanos* (decorina, biglicano, lumicano y fibromodulina), o en forma de agregados o grandes complejos macromoleculares de *proteoglicanos* de los cuales el agregado es el más abundante. Los agregados de *proteoglicanos* se forman por la unión de varios de estos monómeros con una cadena de ácido hialurónico a través del dominio globular G1 mediante una proteína de unión. El tamaño de los agregados varía dependiendo del tamaño de la cadena de ácido hialurónico.

En estado fresco, la matriz contiene alrededor del 75% de agua bajo la forma de gel coloidal firme, lo cual permite la nutrición del cartílago por difusión de nutrientes y gases a través de la fase acuosa de este gel.

Se cree que los *proteoglicanos* se combinan con cationes y por tanto desempeñan un papel importante en el transporte de agua y electrólitos dentro de la matriz (Lesson y Lesson, 1989). Los *proteoglicanos* son sintetizados y excretados al exterior por los condrocitos, previamente a su excreción, a los *proteoglicanos* se les acopla gran cantidad de polisacaridos por glucosilación ligado al aparato de Golgi.



**Figura 6.** Agregado molecular compuesto por: proteoglicanos; glicosaminoglicanos y ácido hialurónico

- **Fibras de colágeno.** Las **fibras de colágeno** representan más del 40 % del peso seco de la matriz cartilaginosa. En su mayor parte, la matriz cartilaginosa está formada por colágeno tipo II, el cual es característico del cartílago y se encuentra en muy pocas otras localizaciones. Las fibrillas del colágeno de tipo II son muy delgadas y forman un reticulado especialmente denso alrededor de las lagunas de *condrocitos*. También hay pequeñas cantidades de tipos más raros de colágeno sobre todo (tipo IX, X y XI), que se entretajan al reticulado de fibrillas de colágeno tipo II, con lo cual éste se estabiliza.

Estudios autorradiográficos han demostrado con claridad que el *condrocito* produce el colágeno y el *proteoglicano* de la matriz cartilaginosa. Se ha demostrado que el ciclo secretor de las moléculas de colágeno por parte del condrocito se relaciona con las condiciones de secreción de otras proteínas incluyendo los *proteoglicanos*.

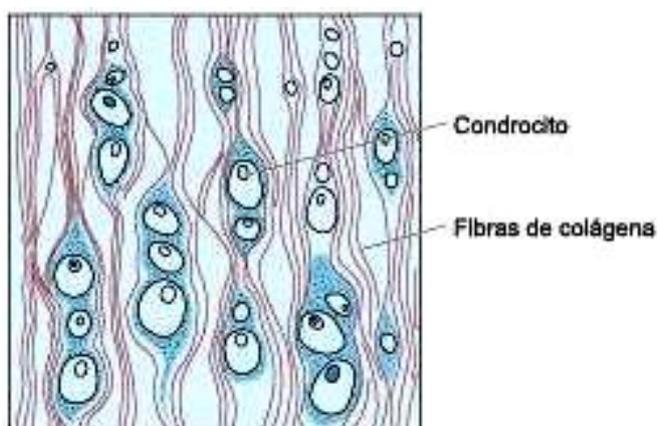
### 1.1.2. El cartílago fibroso

El **cartílago fibroso o fibrocartílago** es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino, dado que se compone de una combinación de fibras densas de colágeno y de células cartilaginosas ubicadas en lagunas y rodeadas por cantidades variables de matriz hialina. Su composición y estructura básicas son comparables a las que acabamos de estudiar para el cartílago hialino, con presencia de abundantes condrocitos inmersos en una matriz extracelular rica en fibras de colágeno y proteoglicanos. Sin embargo, existen importantes diferencias respecto al cartílago hialino, lo cual confiere ciertas propiedades particulares al cartílago fibroso (Figuras 7 y 8).

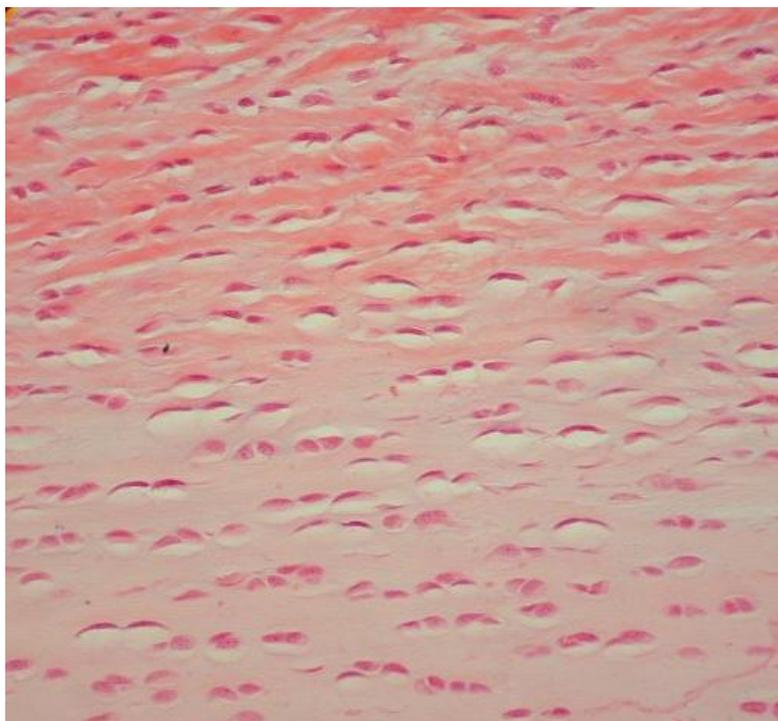
En el cartílago fibroso, las cantidades relativas de *fibras de colágeno*, células cartilaginosas y matriz hialina son muy variables. A menudo las células cartilaginosas se disponen en hileras entre las que se encuentran densos haces ondulantes de *fibras de colágeno*. Aquí, el colágeno es frecuentemente del tipo I, es decir, el mismo tipo que el del tejido conectivo en general, lo cual subraya el carácter de mezcla entre cartílago hialino y tejido conectivo que presenta el *cartílago fibroso*.

El *cartílago fibroso* se encuentra en relación con ciertas articulaciones. Así, los discos intervertebrales están compuestos en su mayor parte por cartílago fibroso, al igual que el cartílago articular en algunas articulaciones. Lo mismo se observa en los bordes articulares, los meniscos y los discos intraarticulares existentes, por ejemplo, en el interior de la articulación témporo-mandibular. Por último, a menudo se encuentran pequeñas cantidades de cartílago fibroso en los sitios de inserción de los ligamentos y tendones, cerca del cartílago articular hialino.

El *cartílago fibroso* se continúa gradualmente con el tejido circundante (tejido conectivo de colágeno, cartílago hialino o hueso) y carece de pericondrio (Finn, 2002).



**Figura 7.** Estructura esquemática del tejido cartilaginoso fibroso. Se pueden apreciar las abundantes fibras que se disponen en la matriz extracelular del tejido.



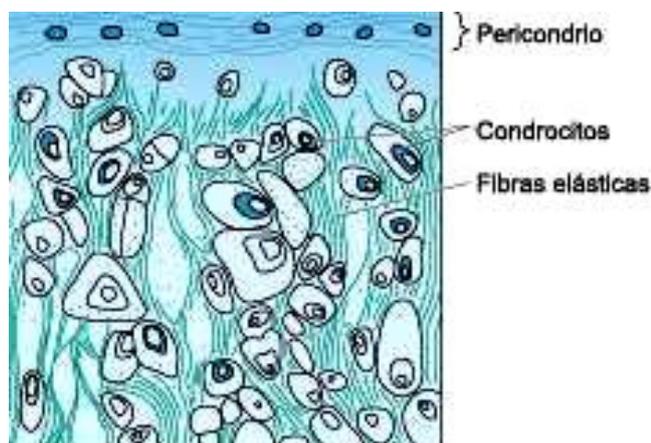
**Figura 8.** Preparación histológica correspondiente al cartilago fibroso teñido con hematoxilina y eosina.

### 1.1.3. El cartílago elástico

El **cartílago elástico** es poco abundante, encontrándose formando parte del cartílago de la epiglotis, del cartílago corniculado (o de Santorini) y del cartílago cuneiforme (o de Wrisberg) de la laringe, y en las paredes del conducto auditivo externo y la trompa de Eustaquio. A simple vista, el cartílago elástico es amarillento y presenta mayor elasticidad y flexibilidad que el cartílago hialino.

Desde el punto de vista histológico, el cartílago elástico es similar al cartílago hialino, con una diferencia importante: la matriz presenta un entretejido denso de finas **fibras elásticas**, que son basófilas en los cortes teñidos con *hematoxilina* y *eosina*, se tiñen con colorantes selectivos como la orceína. Las fibras elásticas son muy densas alrededor de las lagunas de condrocitos (Figura 9).

Cabe destacar, además, que en el cartílago elástico también aparecen fibrillas de colágeno, incluso en mayor cantidad que las elásticas. Al igual que en el cartílago hialino, el colágeno es, en su mayor parte, de tipo II (Finn, 2002).



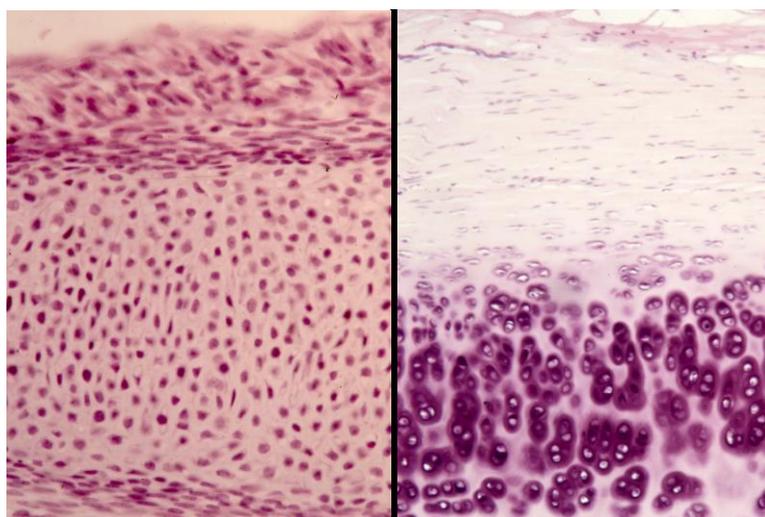
**Figura 9.** Estructura esquemática del tejido cartilaginoso elástico. Se pueden apreciar las fibras elásticas que forman parte de la matriz extracelular.

## 1.2. Histogénesis y desarrollo del cartílago

Al igual que otros tejidos, el cartílago se desarrolla a partir del **mesénquima**. En la cabeza éste se caracteriza por ser de origen ectodérmico (no derivado del mesodermo, como es normal para el *mesénquima*), dado que evoluciona de células que migran desde la cresta neural.

Este **ectomesénquima** da origen al tejido conectivo, el *cartílago* y el tejido óseo del esqueleto facial y de algunos de los huesos del cráneo. Con independencia del origen, ya hacia la quinta semana de vida se distinguen zonas en las cuales las células del *mesénquima* se hacen redondas y forman cúmulos celulares densos, denominados núcleos cartilaginosos o centros de condricación. Durante la diferenciación aumenta el tamaño de las células, que comienzan a secretar la sustancia fundamental metacromática y el tropocolágeno, que se polimeriza fuera de la célula para formar microfibrillas de colágeno. A medida que aumenta la cantidad de *matriz*, la consistencia del tejido se hace más elástica y firme, ubicándose las células en pequeños espacios denominadas **lagunas**. Gradualmente, las células se diferencian a células cartilaginosas maduras o **condrocitos** y, al mismo tiempo, se desarrolla a partir del **mesénquima** y alrededor del modelo cartilaginoso, una capa de células aplanadas y de fibras, las cuales forman el *pericondrio* que rodea al cartílago. En cuanto se forman las primeras células cartilaginosas a partir del *mesénquima*, se produce el consiguiente crecimiento del cartílago de dos maneras. En primer lugar, en el centro de condricación tiene lugar el **crecimiento por divisiones mitóticas** de las células cartilaginosas a partir de *condroblastos*, e inmediatamente después de la mitosis las células hijas producen una delgada pared de matriz extracelular. Tras una nueva división de las células hijas, se forma un pequeño grupo de cuatro células, que a su vez se puede dividir. Este crecimiento interno del cartílago se denomina **crecimiento intersticial**. Cada uno de los pequeños grupos formados contiene células originadas por divisiones mitóticas a partir de un único **condroblasto** (Figura 10), por los que se denominan *grupos isógenos*.

La otra forma de crecimiento, denominada **crecimiento aposicional** tiene lugar por diferenciación a *condrocitos* de varias células mesénquimáticas alrededor del cartílago en formación. Después de la formación del *pericondrio*, tiene lugar la diferenciación de las células en el interior, en la denominada *capa condrogénica*. Durante toda la vida fetal, y a velocidad más reducida, en el periodo de crecimiento de la infancia y la pubertad, se produce un crecimiento aposicional continuo desde el *pericondrio*. Las lagunas ubicadas inmediatamente por debajo del *pericondrio* contienen, por lo tanto, las células cartilaginosas recién formadas. El crecimiento intersticial sólo tiene lugar en el cartílago joven (Finn, 2002).



**Figura 10.** Imagen histológica de microscopía óptica de condroblastos en desarrollo (izquierda) y de condrocitos maduros (derecha).

## 2. TERAPIA CELULAR CON CONDROCITOS

Durante las últimas décadas, son numerosas las técnicas y los métodos que se han desarrollado para el cultivo de distintos tipos de células humanas y animales en laboratorio. A continuación, presentaremos una breve reseña histórica de las principales técnicas que se han propuesto para el cultivo y el implante de condrocitos con vistas a su posible utilización terapéutica.

En lo que respecta al cartílago, el aislamiento de condrocitos del cartílago articular fue realizado inicialmente por Smith (1965), quien logró demostrar la supervivencia *in vitro* de los mismos a bajas temperaturas. Chesterman *et al.*, lograron aislar en 1968 condrocitos del cartílago articular de conejos, retirando la matriz extracelular mediante un proceso enzimático (papaína, colagenasa, pronasa). Posteriormente, estos autores injertaron los condrocitos en un corte realizado en la superficie articular del húmero, obteniendo como reparación un tejido fibroso.

Unos años más tarde, Bentley *et al.* (1971 y 1974) presentaron sus experiencias en el aislamiento de condrocitos procedentes del cartílago articular, observando una escasa supervivencia de los condrocitos articulares cuando éstos eran trasplantados en defectos articulares en los patillos tibiales de conejos de laboratorio.

Al mismo tiempo, Elves demostró en 1974 el papel protector de la matriz cartilaginosa, identificando la presencia de antígenos del cartílago con un alto grado de histocompatibilidad con los linfocitos, así como la disminución de estos antígenos cuando el cartílago era tratado con papaína para el aislamiento de los condrocitos.

Poco tiempo después, Green (1977) realizó experimentos iniciales en los que sembró condrocitos sobre matriz ósea estéril para luego ser implantados en ratones atímicos, y el resultado fue que formaron tejido cartilaginoso.

En esta misma línea, el *instituto ortopédico de Nueva York* realizó en 1982 un ensayo *in vivo*, el cual consistió en cultivar condrocitos articulares autólogos de conejos de laboratorio para regenerar o cubrir defectos de cartílago realizados en estos animales. Las conclusiones de este estudio demostraron que, en el grupo en el que se implantaron los condrocitos cultivados, la reparación o el relleno del defecto alcanzó el 80%, mientras que en el grupo control no se observó relleno de la lesión (Jato Díaz *et al.*, 2005).

El procedimiento de cultivos celulares aplicados a los condrocitos ha permitido aumentar el número de células y mantener su fenotipo. Así, durante los años ochenta se incorporaron los geles de colágeno a los cultivos de condrocitos (Wakitani *et al.*, 1989), proporcionando una mejor fijación y un mejor medio para la síntesis celular de macromoléculas de la matriz cartilaginosa.

Bujía *et al.* (1993) demostraron que la rediferenciación de los condrocitos en medios de cultivo tridimensionales (suspensión y gel de agarosa) fue completa, adquiriendo de nuevo una morfología y funcionalidad equiparables a la de los tejidos normales. Por otro lado, Brittberg *et al.* publicaron en 1994 en la revista *New England Journal of Medicine* los resultados de un estudio piloto realizado en 23 pacientes, siendo éste el primer estudio en el que se publicaban los resultados de este procedimiento aplicado a seres humanos.

Posteriormente, (Park *et al.* 1995) presentaron una técnica para realizar injertos articulares en conejos de laboratorio utilizando cultivos tridimensionales. En este estudio, se demostró que el implante subcutáneo de este tipo de tejidos era bien tolerado y presentaba adecuados niveles de diferenciación y biointegración.

El trasplante autólogo de condrocitos es una técnica que habitualmente se realiza en dos tiempos (Kaigler *et al.*, 2001; Jato Díaz *et al.*, 2006). En un primer tiempo, se toma una biopsia de cartílago humano, la cual se procesa en laboratorio para aislar el máximo número posible de condrocitos viables a partir de los cuales se generarán cultivos primarios de este tipo de células (Kaigler *et al.*, 2001). En una segunda fase, los condrocitos previamente aislados y expandidos en laboratorio son implantados en determinadas localizaciones del organismo mediante transferencia celular. De este modo, se pretende que estas células puedan suplir la deficiencia estructural o funcional que en ese tipo de células se hubieran podido producir (Dove, 2002).

Posteriormente, se comprobó que la tasa real de reparación del cartílago dañado una vez implantadas las células mediante transferencia celular, era menor de lo que se esperaba (Wada *et al.*, 2003). En realidad, se cree que la tasa de reparación del tejido dañado inmediatamente después de la transferencia celular es muy baja, pero que ésta se va incrementando conforme pasan los días, llegando a la reparación casi completa tras un período de 9-12 meses.

Avalia (2003), en su trabajo de evolución clínica de trasplante autólogo de condrocitos, describe la extracción 300-500 mg de láminas de cartílago articular mediante artroscopia, técnica especialmente útil cuando se utiliza en zonas que soportan bajos niveles de carga (por ejemplo, el ángulo opuesto del cóndilo femoral). La muestra así obtenida por estos autores se cultivó durante 3-4 semanas hasta obtener un número suficiente de condrocitos para proceder a su injerto. El número medio de condrocitos implantados fue de 19 millones y el número mínimo fue de 12 millones. Según estos autores, sólo en un caso aparecieron complicaciones intraoperatorias, las cuales estuvieron relacionadas con un número escaso de células en el cultivo primario. Los resultados globales después de dos años de las intervenciones fueron satisfactorios.

Al mismo tiempo, (Wan-Ju Li *et al.* 2003) llevaron a cabo un estudio en el que cultivaban los condrocitos inmersos en matriz tridimensional de nanofibras de poli-E-caprolactona. De este modo, se pretendía generar un sustituto tridimensional del cartílago mediante elaboración de un constructo por Ingeniería Tisular. Los resultados de este procedimiento demostraron una adecuada maduración de los condrocitos, los cuales mantenían un estado funcional en este tipo de matriz extracelular, la cual favorecía la proliferación celular y el mantenimiento del fenotipo condral.

Otros autores (Uematsu *et al.*, 2004) utilizaron cultivos de células madre para la generación de cartílago mediante técnicas de *transdiferenciación*. Según estos investigadores, la utilización de matrices extracelulares y factores de crecimiento específicos permite la diferenciación de células indiferenciadas hacia condrocitos adultos, incluso en los casos en los que se utilizaron células madre de estirpe no cartilaginosa. Estos condrocitos adultos podrían ser transferidos a un receptor, comprobándose su utilidad a la hora de favorecer la reparación de defectos de la superficie articular condral.

En esta misma línea, Pineda *et al.* evaluaron en 2004 las características morfológicas y bioquímicas de los condrocitos humanos y de animales de laboratorio mantenidos en cultivo. Estos autores realizaron dos tipos de cultivos: uno en cultivo celular en monocapa, y otro en cultivo tridimensional. En el primer caso, las células adoptaron una morfología poliédrica, con espacios prominentes entre ellas. Estas células sintetizaron glucosaminoglucanos en cultivo, pero la producción de proteoglucanos fue escasa, difundiendo hacia el medio de cultivo la mayor parte de los proteoglucanos producidos por las células debido a la falta de una matriz que los

retenga. En el segundo caso, cuando los condrocitos se cultivaron tridimensionalmente en presencia de una matriz extracelular de colágeno tipo I, estos condrocitos mantuvieron su morfología esférica, sintetizando componentes característicos de la matriz extracelular como son los glucosaminoglucanos sulfatados y el colágeno tipo II.

Por otro lado, (Darling *et al.* 2004) utilizaron TGF-B como factor de crecimiento para la estimulación de la proliferación de condrocitos, concluyendo que TGF-B1 tiene mejor efecto en la proliferación celular después de ocho días de cultivo, mientras que IGF-1 es capaz de incrementar la expresión del gen del colágeno tipo II. Por tanto, recomiendan agregar factores de crecimiento para la rápida construcción de cartílago en el reemplazo del tejido dañado para su uso clínico en humanos.

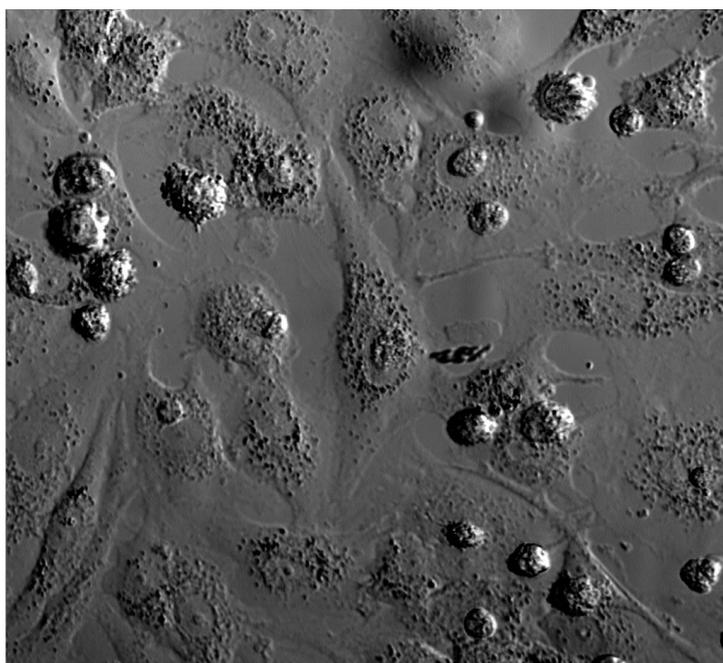
Ya en 2005, Richmond *et al.* llevaron a cabo un ensayo para la evaluación de cuatro factores de crecimiento en cultivos de condrocitos articulares. Las conclusiones de este estudio fueron que la utilización de suero bovino fetal, así como FGF-2 y TGF-B1, resultan en adecuados niveles de proliferación celular, mientras que BMP-2 e IGF-1 induce menores niveles de proliferación, pero mejor morfología celular de los condrocitos cultivados.

Casi al mismo tiempo, (Glowacki *et al.* 2005) demostraron que el uso de matrices extracelulares de colágeno poroso favorece el cultivo de condrocitos articulares de vaca, mejorándose y promoviéndose la condroinducción y la condrogénesis al utilizar factores de crecimiento en el cultivo.

Más recientemente, el desarrollo de las técnicas de cultivo tridimensional basadas en nuevos biomateriales y de la Ingeniería Tisular en su conjunto, han derivado en la generación de diferentes modelos de cartílago artificial generados en laboratorio. Uno de estos modelos es el que propusieron Oliveira *et al.* en 2006 utilizando matrices de hidroxiapatita y quitosán. Según estos autores, estos biomateriales permiten el desarrollo de cartílago y hueso en el laboratorio a partir de células de la médula ósea. De igual modo, (Jiang *et al.* 2007) utilizaron biomateriales compuestos de ácido DL-poli-láctico-co-glicólico para la reparación de defectos del cartílago articular con buenos resultados, mientras que (Liao *et al.*, 2007) describieron el uso de biomateriales de ácido hialurónico, colágeno tipo I y poli-propilén-fumarato.

Finalmente, Saris *et al.* demostraron recientemente (2008) que el implante de condrocitos autólogos es una técnica sencilla que arroja muy buenos resultados. En concreto, estos autores llevaron a cabo un ensayo clínico controlado en el que

demostraron que la regeneración del cartílago es superior en los pacientes en los que se implantan los condrocitos cultivados en comparación con los casos en los que se utiliza una técnica quirúrgica convencional. La conclusión es que la terapia celular con condrocitos autólogos es una técnica muy buena para la reparación de defectos sintomáticos del cartílago articular.



**Figura 11.** Células cartilaginosas mantenidas en cultivo para su utilización en terapia celular.

### **3. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MANTENIDAS EN CULTIVO**

La determinación de la viabilidad de las células mantenidas en cultivo constituye un requisito importante antes de que estas células puedan ser implantadas *in vivo*. En este sentido, se han descrito diversos métodos y técnicas útiles para la evaluación de la viabilidad de las células, los cuales se pueden utilizar tanto para células en cultivo sometidas a pases sucesivos como para evaluar células cultivadas en presencia de un compuesto más o menos citotóxico (ensayos toxicológicos). A continuación expondremos brevemente las bases de las principales técnicas para la evaluación de la viabilidad celular.

#### **3.1. Detección de alteraciones de la permeabilidad celular**

En primer lugar, los métodos basados en la detección de alteraciones de la permeabilidad de la membrana son probablemente los más numerosos y utilizados, pudiendo distinguir dentro de éstos fundamentalmente dos variantes:

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

Los métodos que emplean colorantes habitualmente consisten en la utilización de un colorante que, en función de sus características, es capaz de penetrar y colorear el interior de las células vivas o bien de las células muertas. La proporción relativa de las células coloreadas o no, refleja el número exacto de las células vivas o muertas y, en consecuencia, la viabilidad del conjunto de la población celular. El conteo de las diferentes poblaciones celulares puede ser efectuado por métodos microscópicos, citometría de flujo, espectrofotometría o espectrofluometría automatizada (Slater, 2001). Con frecuencia, se han utilizado colorantes orgánicos

como el azul tripán o el ioduro de pro pido, los cuales son capaces de teñir y colorear únicamente las células muertas, siendo expulsados activamente del citoplasma celular cuando las células están vivas. Por ese motivo, este tipo de ensayos se denominan con frecuencia *ensayos de exclusión de colorantes orgánicos*.

Por otra parte, los métodos basados en la medición de la liberación de moléculas intracelulares al medio de cultivo, están fundamentados en las alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bajo la acción de determinados tóxicos o bien por envejecimiento celular espontáneo. Dichos métodos comprenden dos tipos de ensayos, uno enzimático y otro radiactivo, siendo más utilizados los primeros. Uno de los ensayos enzimáticos más comunes es la determinación del enzima citosólico *lactato deshidrogenasa* (LDH) en el medio de cultivo, enzima que es liberada al medio extracelular únicamente cuando la membrana plasmática ha sido gravemente alterada. Otras moléculas de interés a la hora de evaluar la viabilidad celular son las enzimas mitocondriales o incluso el ADN nuclear. Niveles elevados de cualquiera de estas moléculas en el medio de cultivo son claros indicativos de que un porcentaje significativo de células ha sido destruido y, por tanto, de que la viabilidad celular es baja (Ikegami *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Posadas *et al.*, 2007).

Uno de los métodos más utilizados en biología y biomedicina es el de la determinación de la viabilidad celular mediante la prueba del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este compuesto, de color amarillento, es capaz de reducirse y adquirir color morado por acción de las enzimas intramitocondriales de las células vivas. Por este motivo, la adición de MTT al medio de cultivo y la posterior cuantificación colorimétrica del producto nos puede dar una idea bastante fiable del número de células vivas y muertas que existen en el cultivo celular (Brink *et al.*, 2008; Meriç *et al.*, 2008).

Finalmente, los métodos radiactivos suelen basarse en la medida de la liberación del  $\text{Cr}^{51}$ , isótopo radiactivo que se une de manera no covalente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. Las células muertas liberan el  $\text{Cr}^{51}$ , en el medio extracelular, el cual puede ser cuantificado por un contador gamma (Rinaldi *et al.*, 1998).

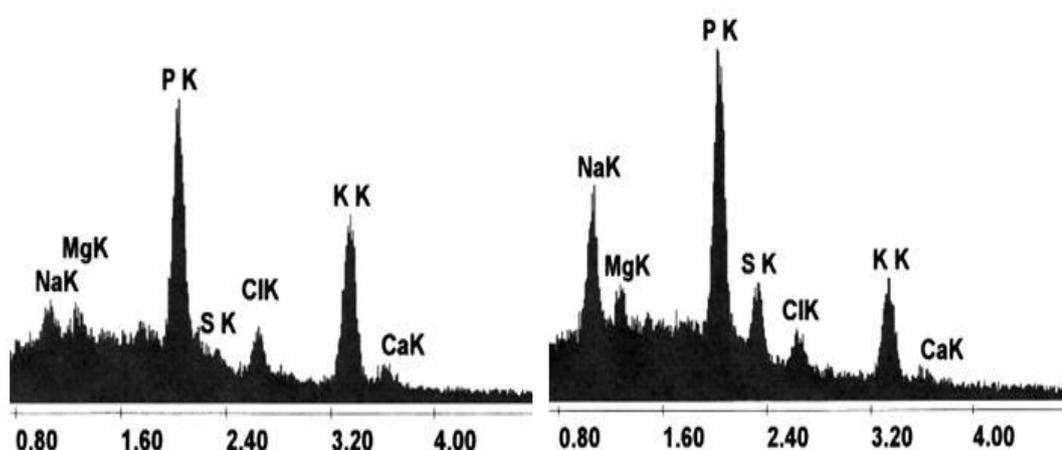
### **3.2. Microanálisis por energía dispersiva de rayos X**

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

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

Debido a su especificidad por número atómico, el análisis de los rayos X emitidos por la muestra nos permite conocer la composición de la misma. Dicho análisis consiste en medir la energía de los fotones producidos, previa transformación de su energía electromagnética en señal eléctrica utilizando un espectrómetro de dispersión de energía. Posteriormente, los impulsos eléctricos son clasificados utilizando un analizador multicanal acoplado a dicho sistema, originando un espectro a partir del cual es posible derivar la composición química del espécimen visualizado en el microscopio electrónico (Figura 12). El espectro es un histograma de frecuencia que muestra el número de rayos X detectados para cada rango de energía y está constituido por una serie de picos, designados indistintamente como líneas, de intensidad variable (rayos X característicos), los cuales están superpuestos a un fondo continuo de menor intensidad (rayos X continuos, radiación de fondo o radiación blanca) (Goldstein *et al.*, 1992; Roomans y von Euler, 1996). El estudio de muestras biológicas con Microscopía Electrónica Analítica permite asimismo la cuantificación de los elementos objeto de estudio, lo cual exige el desarrollo de protocolos específicos (Campos *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 1994; Crespo *et al.*, 1993; Fernández-Segura *et al.*, 1999a y 1999b; López-Escámez *et al.*, 1992 y 1993; López-Escámez y Campos, 1994; Warley *et al.*, 1994; Warley, 1997).



**Figura 12.** Espectros microanalíticos correspondientes a dos células de endotelio corneal de conejo de laboratorio. Cada uno de los picos corresponde a la emisión de rayos X de un elemento intracelular concreto.

# **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer los patrones de viabilidad de los condrocitos de dos variedades distintas de tejido cartilaginoso: el tejido cartilaginoso fibroso (fibrocartílago del disco intraarticular de la articulación témporo-mandibular) y el tejido cartilaginoso hialino (cartílago articular del fémur).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Establecer el patrón microanalítico *in vitro* del condrocito del tejido cartilaginoso fibroso.
- 2.- Establecer el patrón microanalítico *in vitro* del condrocito del tejido cartilaginoso hialino.
- 3.- Determinar el índice de viabilidad celular en los tres primeros subcultivos del tejido cartilaginoso fibroso.
- 4.- Determinar el índice de viabilidad celular en los tres primeros subcultivos del tejido cartilaginoso hialino.
- 5.- Establecer indicadores de selección de condrocitos del cartílago fibroso o hialino, de acuerdo a los criterios de viabilidad.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. AISLAMIENTO Y GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CONDROCITOS**

En esta Tesis Doctoral, hemos aislado y mantenido en cultivo células correspondientes a dos tipos distintos de cartílago de ratas albinas Wistar machos de 400 g de peso medio:

- Tejido cartilaginoso fibroso (fibrocartílago) del disco intraarticular de la articulación témporo-mandibular.
- Tejido cartilaginoso hialino (cartílago hialino) de la articulación fémoro-tibial de la rodilla.

Todos los animales utilizados en esta Tesis Doctoral fueron adquiridos en el Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada, después de superar satisfactoriamente el periodo de cuarentena exigido y de obtener los correspondientes informes favorables del comité de ética y experimentación animal de la Universidad de Granada.

Para llevar a cabo este estudio, se procedió al sacrificio de todos los animales de experimentación mediante inyección intracardiaca de cloruro potásico 1 M tras sedación profunda con ketamina intramuscular. A continuación, y una vez sacrificadas las ratas de experimentación, se levó a cabo la disección quirúrgica de las articulaciones témporo-mandibular y fémoro-tibial de cada animal, siguiendo todos los patrones de asepsia y antisepsia que se requieren para este tipo de intervenciones, y así evitar posible contaminación del tejido obtenido.

Posteriormente, tras exponer la articulación témporo-mandibular, se disecaron los ligamentos intraarticulares y la cápsula articular para liberar el disco de la articulación témporo-mandibular de la rata, el cual se obtuvo íntegro. Al mismo tiempo, una vez expuesto el cartílago articular de la articulación fémoro-tibial de la rodilla de la rata, se llevó a cabo la toma de muestras de cartílago hialino mediante obtención de delgadas láminas de cartílago de la superficie articular utilizando una hoja de bisturí. Todos los tejidos obtenidos fueron inmediatamente conservados en medio de transporte tisular a 4°C, donde se mantuvieron hasta el momento de su procesamiento. Este medio de transporte consistió en un medio básico DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich ref. D5796, St. Louis,

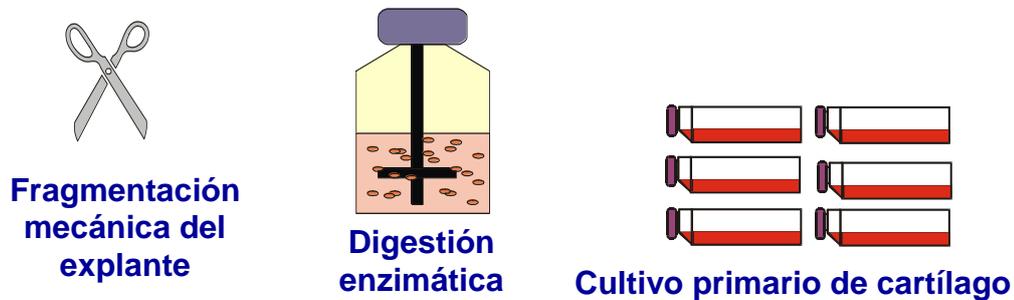
Missouri, EEUU) suplementado con antibióticos y antimicóticos (500 U/ml de penicilina G, 500 µg/ml de estreptomicina y 1.25 µg/ml de anfotericina B, Sigma-Aldrich ref. A5955) pero sin suero bovino fetal. La composición del medio DMEM se detalla en la Tabla 1 de esta Tesis Doctoral.

Para llevar a cabo la disgregación de la matriz extracelular del cartílago y conseguir la separación de los condrocitos de dicha matriz, tanto las muestras de fibrocartílago del disco intraarticular como las del cartílago hialino de la articulación témporo-mandibular se incubaron en una disolución de colagenasa I de *Clostridium hystoliticum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% a 37°C durante 12 h (Figura 13). Esta solución es capaz de digerir el colágeno y la matriz extracelular y liberar los condrocitos existentes en el cartílago.

Para la obtención de las células disgregadas de la matriz extracelular, las muestras digeridas en colagenasa se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos, recogiendo el precipitado *pellet* celular correspondiente. Posteriormente, este precipitado celular se cultivó en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie tipo Falcon<sup>®</sup> con medio de cultivo QN. El medio QN fue inicialmente descrito por De Diego *et al.* (2004) y Llamas *et al.* (2004) para el cultivo de queratinocitos de la piel, habiendo demostrado su utilidad en el cultivo de diversos tipos de células humanas y animales (Alaminos *et al.*, 2006 y 2007; Sánchez-Quevedo *et al.*, 2007). La composición de este medio de cultivo es la siguiente:

- Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM): 300 ml (Sigma-Aldrich ref. D5796) (Tabla 1).
- Medio HAM-F12: 150 ml (Sigma-Aldrich Ref. N6658) (Tabla 1).
- Toxina colérica: 8 ng/ml (Sigma-Aldrich Ref. C3012).
- Adenina: 24 µg/ml (Sigma-Aldrich Ref. A9795).
- Hidrocortisona: 0,4 mg/ml (Sigma-Aldrich Ref. H0888).
- Insulina: 5 mg/ml (Sigma-Aldrich Ref. I2767).
- Triyodotironina: 1,3 ng/ml (Sigma-Aldrich Ref. T5516).
- Suero bovino fetal (SBF): 50 ml (Sigma-Aldrich ref. F9665).
- Antibióticos y antimicóticos: 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B (Sigma-Aldrich Ref. A5955).

Todos los cultivos celulares se incubaron a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo. Los medios de cultivo se renovaron cada tres días hasta su posterior subcultivo.



**Figura 13.** Representación esquemática del procesamiento realizado a las muestras de cartílago obtenidas en esta Tesis Doctoral.

## 2. SUBCULTIVO CELULAR

Cuando la monocapa de células del cartílago alcanzó la semiconfluencia, las células se lavaron con 5 ml de PBS (tampón fosfato, Sigma-Aldrich ref. P4417) para eliminar cualquier resto del medio de cultivo y las células muertas. A continuación, se cubrió toda la superficie de cultivo con aproximadamente 2 ml de solución de disociación celular (Sigma-Aldrich ref. C5789) para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo, incubándose 5-10 minutos a 37 °C.

Transcurrido ese tiempo, y tras comprobar que las células se habían separado del frasco, se añadieron 5 ml de medio QN para inactivar el efecto de la solución de disociación, recogiendo ambos en un tubo cónico que se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. El precipitado o *pellet* celular que se obtuvo se resuspendió en medio de cultivo QN y se sembró en nuevos frascos de cultivo con medio QN.

COMPONENTE	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)	Medio de cultivo Ham F12
<b>SALES INORGÁNICAS</b>		
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.265	0.0441
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	—	0.0000025
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	0.0001	—
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	—	0.000834
KCl	0.4	0.224
MgCl•6H <sub>2</sub> O	—	0.123
MgSO <sub>4</sub>	0.09767	—
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	0.14204
NaCl	6.4	7.599
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.109	—
NaHCO <sub>3</sub>	3.7	1.176
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	—	0.000863
<b>AMINOÁCIDOS</b>		
Glicina	0.03	0.00751
L-Alanina	—	0.009
L-Arginina•HCl	0.084	0.211
L-Asparagina•H <sub>2</sub> O	—	0.01501
L- Ácido Aspártico	—	0.0133
L-Cisteína•2HCl	0.0626	0.035
L- Ácido Glutámico	—	0.0147
L-Glutamina	0.584	0.146
L-Histidina•HCl•H <sub>2</sub> O	0.042	0.02096
L-Isoleucina	0.105	0.00394
L-Leucina	0.105	0.0131
L-Lisina•HCl	0.146	0.0365
L-Metionina	0.03	0.00448
L-Fenilalanina	0.066	0.00496
L-Prolina	—	0.0345
L-Serina	0.042	0.0105
L-Treonina	0.095	0.0119
L-Triptófano	0.016	0.00204
L-Tirosina•2Na•2H <sub>2</sub> O	0.10379	0.00778
L-Valina	0.094	0.0117
<b>VITAMINAS</b>		
Colina	0.004	—
D- Ácido Pantoténico •½Ca	0.004	0.00048
Ácido Fólico	0.004	0.00132
Hipoxantina	—	0.00408
Ácido Linoleico	—	0.0000084
Mio-Inositol	0.0072	0.018
Ácido nicotínico	0.004	0.000037
Piridoxina•HCl	0.004	0.000062
Riboflavina	0.0004	0.000038
Tiamina•HCl	0.004	0.00034
Ácido Tióctico	—	0.00021
Timidina	—	0.00073
Vitamina B-12	—	0.00136
<b>OTROS</b>		
D-Glucosa	4.5	1.802
Fenol rojo•Na	0.0159	0.0013
Ácido pirúvico	—	0.11
Putrescina•HCl	—	0.000161

**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo DMEM y HAM-F12 utilizados en este trabajo. Todos los valores están expresados en gramos por litro de medio de cultivo.

### **3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE ENSAYOS DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES VITALES**

Para determinar la viabilidad celular mediante ensayos de exclusión de colorantes vitales, se utilizó el método de tinción con **azul tripán** y contaje celular en cámara de Neubauer.

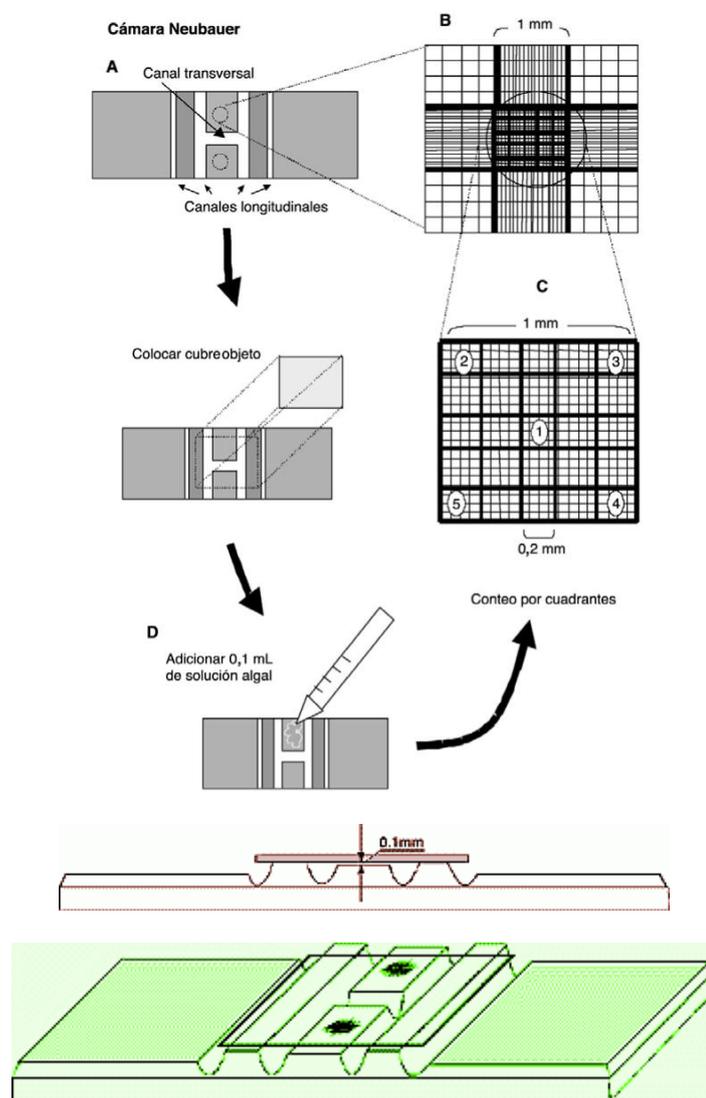
La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio óptico. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado, con la ayuda de un diamante, una cuadrícula de 3 x 3 mm<sup>2</sup>, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando la cámara se cubre con un cubreobjetos, éste dista de la superficie marcada 0,1 milímetros, siendo el volumen comprendido entre la superficie y el cubreobjetos de 0,1 milímetro cúbico, es decir 0,1 microlitro. Esto permite hacer un cálculo del número de células existente en un volumen fijo. Dentro de cada cuadrícula existen áreas de contaje de 1 mm<sup>2</sup>.

Por otro lado, el azul tripán es un colorante soluble en agua, altamente tóxico, que posee grupos cargados amino y sulfato. La utilidad de este colorante en biología es muy importante, habiéndose utilizado este método para determinar la viabilidad de distintos tipos de células (Alaminos *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007; You *et al.*, 2008). En general, el azul tripán es capaz de teñir de color azul solamente las células muertas o aquéllas en las que la membrana celular ha sido fragmentada. Sin embargo, las células vivas son capaces de excluir activamente este colorante y, por tanto, mantienen su color original translúcido o blanco.

Para llevar a cabo este ensayo, en primer lugar se procedió a tripsinizar los cultivos celulares para separar las células del frasco de cultivo, centrifugándose la mezcla para obtener un precipitado o *pellet* celular tal como se expuso en el apartado anterior, el cual se diluyó en una pequeña cantidad de medio de cultivo. A continuación, se tomaron 50 µl de la suspensión celular obtenida, el cual se incubó en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml con un volumen equivalente (50 µl) de solución de azul tripán al 0,4% (Sigma-Aldrich ref. T8154) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó una muestra de 10-15 µl de la mezcla que se colocó en una cámara de Neubauer (Figura 14), procediéndose al recuento de las

células vivas (blancas, birrefringentes) y muertas (azules) utilizando un microscopio óptico Leica Laborlux 12 (Leica, Barcelona, España). Para el cálculo del porcentaje de células vivas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = \left[ \frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ células vivas} + \text{N}^\circ \text{ células muertas}} \right] \times 100$$



**Figura 14.** Representación esquemática de la cámara de Neubauer utilizada para el conteo de células viables mediante la técnica del azul tripán.

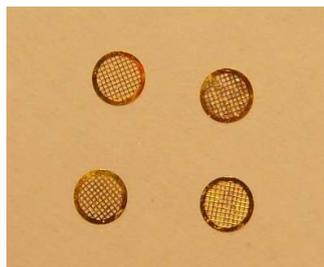
## **4. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X**

Para analizar la viabilidad celular de los condrocitos obtenidos a partir de las muestras de cartílago fibroso e hialino mediante *microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EPXMA)* las células se cultivaron sobre rejillas de soporte cubiertas con Pioloformo, las cuales se lavaron y criofijaron tal como se describe a continuación.

### **4.1. Adhesión de las células al soporte**

Las células mantenidas en frascos de cultivo con medio de QN se subcultivaron sobre rejillas de oro de 3 mm de diámetro especiales para microscopía electrónica (Fedelco ref. G100 – G3) (Figura 15) recubiertas con Pioloformo (SPI-CHEM ref. 2466). Para ello, en primer lugar se procedió a eliminar los restos de materia orgánica que pudiesen haberse depositado sobre las rejillas de oro mediante lavado de éstas con cloroformo. Posteriormente, se aclararon con etanol absoluto y se lavaron nuevamente en ácido acético al 2%, dejándose secar al aire. Para permitir el crecimiento de las células sobre las rejillas de oro, se aplicó una fina capa de Pioloformo (Figura 16) sobre estas rejillas. El Pioloformo o polivinil-butiral es un compuesto orgánico soluble en cloroformo que es capaz de formar películas muy delgadas de un material similar al plástico que permite la adhesión y el crecimiento celular en su superficie. Finalmente, las rejillas de oro cubiertas con Pioloformo se depositaron sobre cubreobjetos de vidrio de 11 mm de diámetro (Fedelco ref. 06-K-F 0513), esterilizándose mediante irradiación ultravioleta durante 12 h.

Una vez subcultivadas las células sobre las rejillas cubiertas con Pioloformo, los condrocitos se incubaron durante 24 – 48 h en medio de cultivo QN para permitir la adhesión de las células a esta superficie.



**Figura 15.** Rejillas de oro sobre las que se depositó una fina capa de Pioloformo para permitir la adhesión celular.

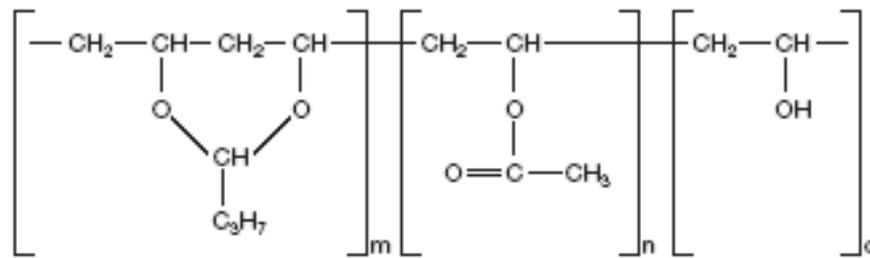


Figura 16. Estructura química del *polivinil butiral* (pioloformo).

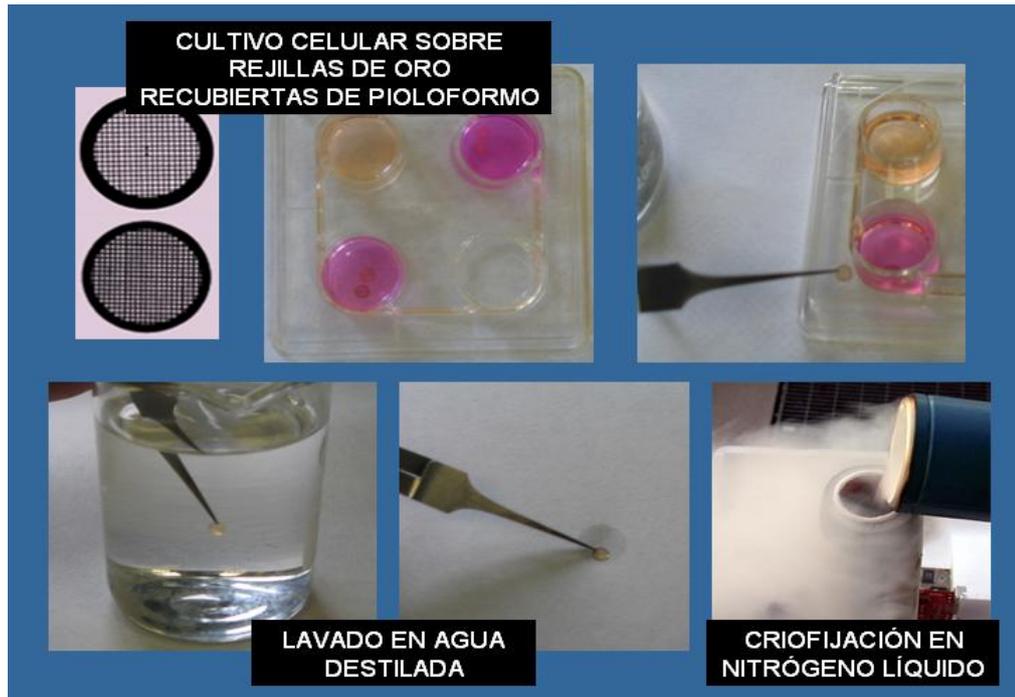
## 4.2. Eliminación del medio de cultivo

Con el fin de eliminar la contribución del medio extracelular al espectro de rayos X en los análisis de los condrocitos, se procedió al lavado de las rejillas conteniendo las células de acuerdo con los criterios establecidos previamente por diferentes autores, (Abraham *et al.*, 1985; Borgman *et al.*, 1994; Fernández-Segura *et al.*, 1997a; Lechene, 1988; von Euler *et al.*, 1992; Warley, 1994; Wroblewski *et al.*, 1983; Wroblewski y Roomans, 1984; Zierold y Schäfer, 1988), eligiendo como solución lavadora el agua destilada. De este modo, todas las muestras se lavaron mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4°C, durante 5 segundos. La solución lavadora se mantuvo en constante movimiento por agitación magnética (Figura 17).

## 4.3. Criofijación y criodesecación de las muestras

Después de lavar las rejillas que contenían las células a analizar, se eliminó rápidamente el exceso de agua con un papel filtro, realizándose la criofijación celular mediante inmersión rápida de todas las muestras en nitrógeno líquido (Figura 17). Las rejillas con las células criofijadas se introdujeron en un portamuestras de aluminio preenfriado a -196°C mediante inmersión en nitrógeno líquido.

Las células criofijadas y depositadas en el interior del portamuestras se transfirieron de forma inmediata a un sistema de criodesecación de alto vacío Emitech K775 (Emitech, Watford, Reino Unido) con el objetivo de extraer el agua de las células por sublimación (Figura 18). Las muestras se criodesecaron durante un total de 12 horas a una presión de vacío de 10<sup>-5</sup> mbar siguiendo el perfil de temperaturas mostrado en la Tabla 2, de acuerdo con los criterios establecidos por Warley y Skepper (2000).



**Figura 17.** Preparación de los condrocitos mantenidos en cultivo para análisis mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X. En la parte superior se muestran rejillas de oro, así como los micropocillos donde se cultivan las células sobre las rejillas de oro cubiertas con Ploloformo. Posteriormente, las rejillas con las células cultivadas se lavan en agua destilada, se secan en papel absorbente para eliminar el exceso de agua y se criofijan por inmersión en nitrógeno líquido.



**Figura 18.** Criodesecador utilizado para el procesamiento de las células analizadas en esta Tesis Doctoral.

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

**Tabla 2.** Perfil de temperaturas e intervalos de tiempo utilizados para la criodesecación de las muestras en un sistema de alto vacío

#### **4.4. Recubrimiento de las muestras**

Tras la criodesecación, las células se recubrieron con una superficie conductora de electricidad para facilitar el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica y detección analítica. En concreto, las rejillas criodesecadas y montadas sobre el portamuestras de aluminio se recubrieron con una fina capa de carbón utilizando un evaporador Emitech (Watford, Reino Unido) dotado de un hilo de grafito (Electron Microscopy Sciences, Madrid) en condiciones de alto vacío.

#### **4.5. Observación y análisis de las muestras mediante microscopía electrónica analítica**

En la presente Tesis Doctoral, hemos determinado el contenido iónico de Na, K, P, Mg, S, Cl y Ca de seis poblaciones celulares diferentes, analizándose hasta 25 células en cada una de ellas:

- Condrocitos del *cartílago fibroso* pertenecientes al *cultivo primario* (primer pase celular).
- Condrocitos del *cartílago fibroso* pertenecientes al *primer subcultivo* (segundo pase).
- Condrocitos del *cartílago fibroso* pertenecientes al *segundo subcultivo* (tercer pase).
- Condrocitos del *cartílago hialino* pertenecientes al *cultivo primario* (primer pase).
- Condrocitos del *cartílago hialino* pertenecientes al *primer subcultivo* (segundo pase).
- Condrocitos del *cartílago hialino* pertenecientes al *segundo subcultivo* (tercer pase).

La cuantificación del contenido iónico de los condrocitos cultivados se llevó a cabo mediante microscopía electrónica analítica, utilizando un microscopio electrónico de barrido Phillips XL 30 (Phillips, Eindhoven, Holanda) acoplado a un detector de energía dispersiva de rayos X EDAX DX4i con una ventana CDU ultrafina (EDAX, Eindhoven, Holanda) y un sistema de detección de electrones retrodispersados de estado sólido (K.E. Develoment, Cambridge, Reino Unido). La configuración geométrica de este equipamiento posibilita la detección simultánea de electrones secundarios y rayos X.

Para la visualización de las muestras en el microscopio electrónico de barrido mediante electrones secundarios, se fijaron los siguientes parámetros:

Voltaje del microscopio.....	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.....	500
Tiempo de adquisición.....	200 s
Tamaño del haz de electrones (spot size) .....	6
Distancia de trabajo.....	10mm
Área de análisis.....	puntiforme y estática

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 previamente conocidos (Boekestein *et al.*, 1980 y 1984; Roomans, 1988; Statham 1998). 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:

- $C_{\text{spc}}$  es la concentración del elemento a cuantificar,
- P corresponde a las cuentas netas de la señal característica del elemento,
- B es la radiación continua medida debajo del pico, es decir, tomada entre los mismos niveles de energía de la señal característica,
- $Z^2/A$  es el valor medio del número atómico al cuadrado por el peso atómico, correspondiente un valor específico para el dextrano y las células (Warley, 1997).

La preparación de los patrones de calibración se realizó de acuerdo con las pautas previamente establecidas en nuestro laboratorio (Crespo *et al.*, 1993; López-Escámez y Campos, 1994) utilizando diferentes sales ( $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) disueltas en una matriz orgánica. Para ello, se prepararon soluciones de cada sal a diferentes concentraciones en dextrano al 20% (300 kD). Los patrones se montaron sobre membranas microporosas de las unidades Millicell<sup>®</sup> y se criofijaron mediante inmersión en nitrógeno líquido. En esta fase del proceso, así como en la posterior criodesecación, montaje y recubrimiento, se siguió el mismo procedimiento que se expuso para la preparación de células humanas para microanálisis. Los patrones se analizaron en el microscopio electrónico de barrido y se microanalizaron inmediatamente después de su preparación para evitar su contaminación o modificación química, adquiriéndose entre 15 y 20 espectros para cada concentración de patrón, utilizando las mismas condiciones de análisis que se utilizaron para las células cultivadas sobre rejillas de oro.

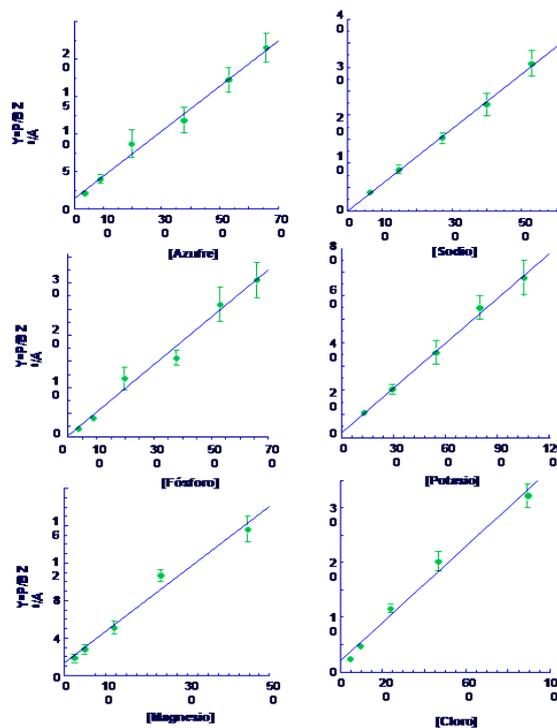
El análisis de los patrones de dextrano al 20% conteniendo concentraciones conocidas de sales de Na, Cl, Mg, P, S, K y Ca, nos permitió realizar la calibración de las concentraciones de los citados elementos frente a la señal P/B. La concentración de cada elemento en el estándar es directamente proporcional a la razón P/B de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

La relación entre  $P_{std}/B_{std}$  frente a la concentración de cada elemento se estudió mediante regresión lineal simple (Figura 19).



**Figura 19.** Representación de la razón  $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$  como una función de  $C_{std}$  para los patrones de S, Na, P, K, Mg y Cl a 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 cultivadas sobre rejillas de oro cubiertas con Pioloformo. Las soluciones en dextrano al 20% con las diferentes concentraciones de las sales inorgánicas empleadas se depositaron sobre filtros de policarbonato (tamaño de poro de 0,4  $\mu$ 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 previamente.

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

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

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

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

Donde:

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

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

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

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

## **5. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS CULTIVOS DE CONDROCITOS**

Para el análisis de las células mediante microscopía óptica, las muestras crecidas en frascos de cultivo o en portaobjetos dotados de cámara de cultivo, se fijaron en formaldehído al 4%, lavándose posteriormente con agua destilada. A continuación, las células se tiñeron durante 15 minutos con hematoxilina (ref. 254766, Panreac Química, Madrid), lavándose abundantemente con agua y tiñéndose con eosina hidroalcohólica (ref. 251301, Panreac Química, Madrid) durante 10 minutos. Tras lavar las muestras con alcohol 70%, las células se dejaron secar al aire y se examinaron mediante el microscopio óptico.

Para el estudio de los cultivos celulares mediante microscopía electrónica de barrido, los condrocitos cultivados sobre rejillas de oro cubiertas con Pioloformo y utilizados para microanálisis por energía dispersiva de rayos X se recubrieron con átomos de oro en un recubridor tipo *Sputtering* Polaron E5000, analizándose en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizando el modo de alto vacío.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En esta Tesis Doctoral se hicieron dos tipos de comparaciones estadísticas. Por un lado, se compararon los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca entre los distintos grupos de muestras considerados. Por otro lado, se compararon los valores de viabilidad celular obtenidos mediante el ensayo con azul tripán.

Las pruebas estadísticas que se utilizaron en cada caso son las que se detallan a continuación:

- Para identificar diferencias globales entre los tres pases sucesivos de cada tipo celular analizado en esta Tesis Doctoral (pases 1 a 3 de condrocitos del cartílago fibroso y pases 1 a 3 de condrocitos del cartílago hialino), se utilizaron las pruebas estadísticas de *Friedman* y *W de Kendall*. La obtención de valores significativos en estas pruebas indicaría la existencia de diferencias globales entre los tres pases celulares comparados.
  - En primer lugar, la **prueba de Friedman** es el equivalente no paramétrico de un diseño de medidas repetidas para una muestra o un análisis de varianza de dos factores con una observación por casilla. Friedman contrasta la hipótesis nula de que las k variables relacionadas procedan de la misma población. En cada caso, las k variables se ordenan en un rango de 1 a k. El estadístico de contraste se basa en estos rangos.
  - En segundo lugar, la **prueba W de Kendall** es una normalización del estadístico de Friedman. La prueba W de Kendall se puede interpretar como el coeficiente de concordancia, que es una medida de acuerdo entre evaluadores. Cada caso es un juez o evaluador y cada variable es un elemento o persona que está siendo evaluada. Para cada variable, se calcula la suma de rangos. La W de Kendall varía entre 0 (no hay acuerdo) y 1 (acuerdo completo).
- Para la comparación por pares de muestras relacionadas (por ejemplo, pase 2 frente a pase 3 para un mismo tipo de cartílago) se utilizó la **prueba de los rangos con signo de Wilcoxon**, mientras que la comparación por pares de muestras no relacionadas (por ejemplo, pase 1 de cartílago fibroso frente a pase 1 de cartílago hialino) se llevó a cabo utilizando la **prueba no paramétrica de Mann-Whitney**.

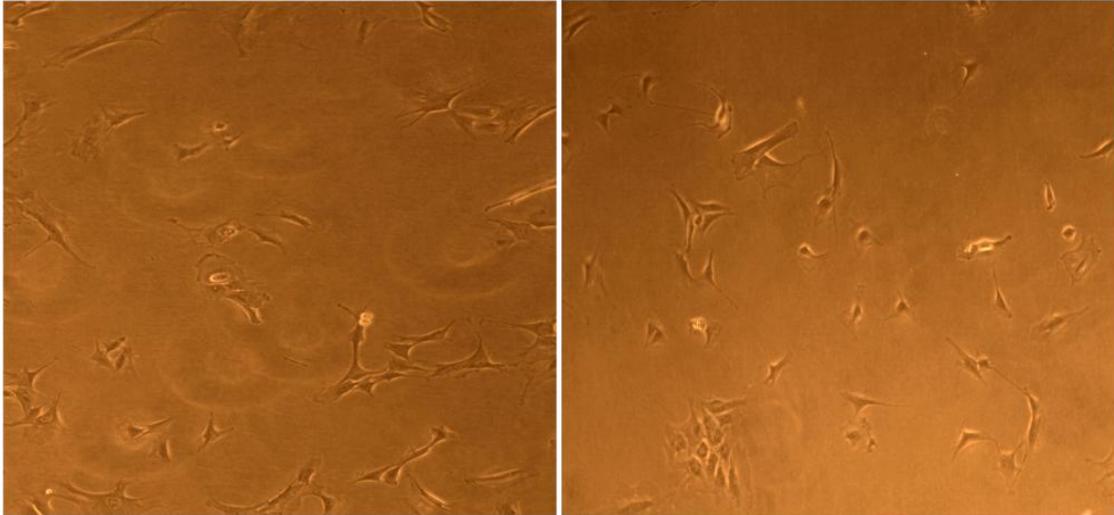
En todos los casos se seleccionó un valor de significación  $p < 0.01$  para las pruebas estadísticas de doble cola.

# **RESULTADOS**

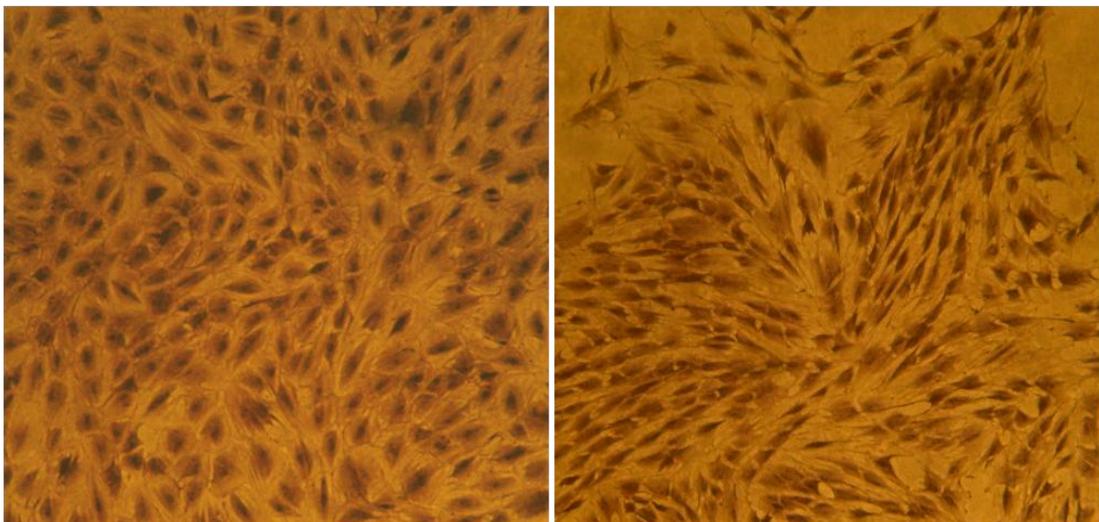
## **1. CULTIVO CELULAR**

Utilizando los métodos descritos en el apartado anterior, las células cartilaginosas de ambas variedades de tejido (fibroso e hialino) crecieron de forma adecuada en los tres subcultivos analizados en la presente Tesis Doctoral, alcanzando en cada uno de ellos el nivel de confluencia en un periodo aproximado de 11 días ( $11,5 \pm 2,8$  días). Sin embargo, en el tercer subcultivo correspondiente al tejido cartilaginoso fibroso, el número de células no llegó a alcanzar el nivel de confluencia en el periodo anteriormente indicado, mostrando tasas de proliferación celular sensiblemente inferiores.

En cultivo, tanto las células correspondientes a tejido cartilaginoso fibroso como las células del tejido cartilaginoso hialino, presentaron morfología estrellada, poligonal o incluso fusiforme, no detectándose diferencias morfológicas entre ambos tipos de tejidos (Figuras 20 y 21).



**Figura 20.** Imagen de microscopio óptico de contraste de fases en la que se aprecian cultivos no confluentes de células del tejido cartilaginoso fibroso (izquierda) y del tejido cartilaginoso hialino (derecha). Magnificación  $\times 200$ .



**Figura 21.** Imagen de microscopía correspondiente a células subconfluentes del tejido cartilaginoso fibroso (izquierda) y del tejido cartilaginoso hialino (derecha) fijadas en formaldehído 4% y teñidas con hematoxilina y eosina. Magnificación  $\times 200$ .

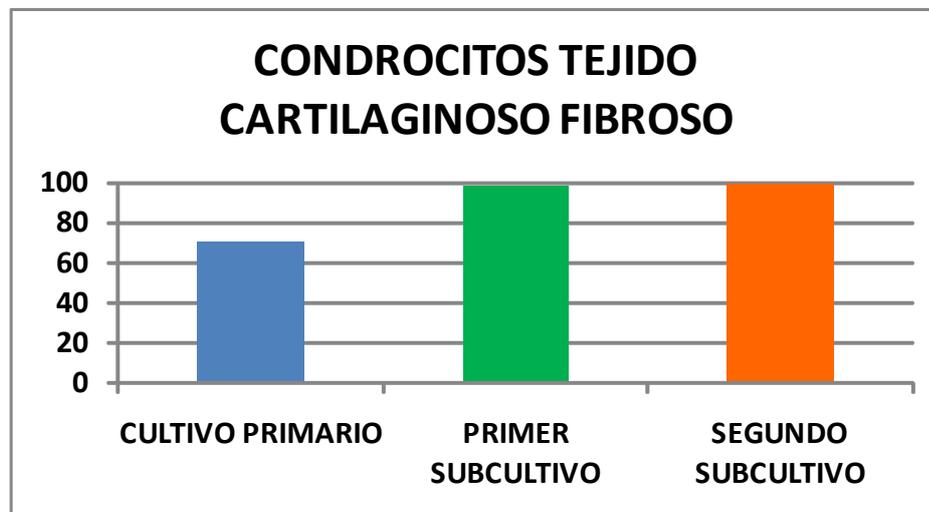
## **2. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE ENSAYOS DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES ORGÁNICOS (AZUL TRIPÁN)**

Los resultados obtenidos en los cuatro ensayos realizados en los tres sucesivos subcultivos de ambos tipos celulares (células procedentes del tejido cartilaginoso fibroso y del tejido cartilaginoso hialino) se indican en las Tablas 4 y 5 y se expresan gráficamente en las Figuras 22 y 23. En dicha Tabla se muestran los valores medios de los cuatro ensayos en forma de porcentaje de células viables respecto de aquéllas que han incorporado el colorante.

El análisis estadístico de los resultados arriba indicados se explicita en las Tablas 6 y 7.

CONDROCITOS TEJIDO CARTILAGINOSO FIBROSO	CULTIVO PRIMARIO	PRIMER SUBCULTIVO	SEGUNDO SUBCULTIVO
MEDIDA 1	73,3	97,4	97,9
MEDIDA 2	53,8	98,5	98,7
MEDIDA 3	78,6	99,3	99,3
MEDIDA 4	76,2	98,5	98,8
<b>MEDIA</b>	<b>70,5</b>	<b>98,4</b>	<b>98,7</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	<b>11,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>

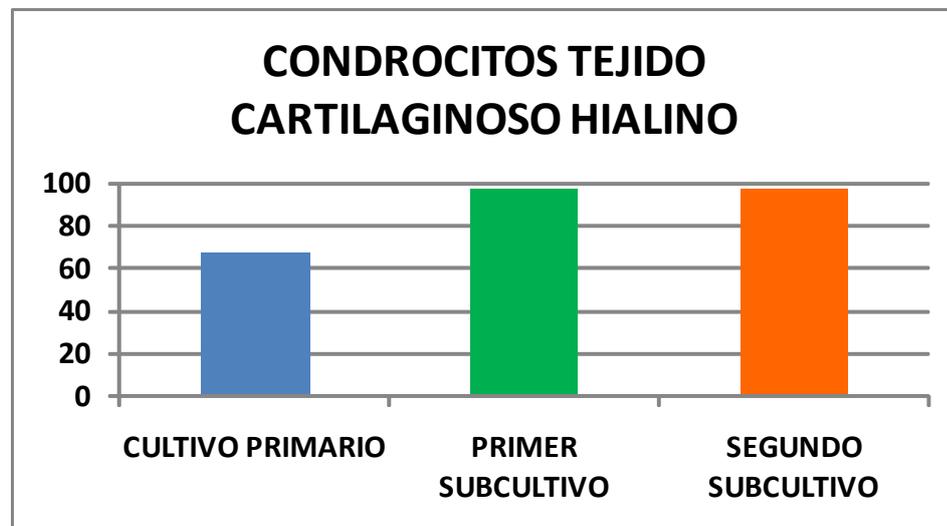
**Tabla 4.** Viabilidad de los cultivos de células del tejido cartilaginoso fibroso determinada mediante la técnica del azul tripán en los tres primeros pases celulares. En cada caso, se realizaron cuatro medidas independientes, calculándose la media y la desviación estándar de las cuatro determinaciones.



**Figura 22.** Histograma en el que se representan los valores medios de viabilidad de los tres primeros pases de las células del tejido cartilaginoso fibroso determinada mediante la técnica del azul tripán.

CONDROCITOS TEJIDO CARTILAGINOSO HALINO	CULTIVO PRIMARIO	PRIMER SUBCULTIVO	SEGUNDO SUBCULTIVO
MEDIDA 1	76,2	96,7	96,6
MEDIDA 2	54,5	99,4	98,4
MEDIDA 3	80,0	94,0	97,7
MEDIDA 4	58,3	99,4	97,1
<b>MEDIA</b>	<b>67,3</b>	<b>97,4</b>	<b>97,5</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	<b>12,7</b>	<b>2,6</b>	<b>0,8</b>

**Tabla 5.** Viabilidad de los cultivos de células del tejido cartilaginoso hialino determinada mediante la técnica del azul tripán en los tres primeros pases celulares. En cada caso, se realizaron cuatro medidas independientes, calculándose la media y la desviación estándar de las cuatro determinaciones.



**Figura 23.** Histograma en el que se representan los valores medios de viabilidad de los tres primeros pases de las células del tejido cartilaginoso hialino determinada mediante la técnica del azul tripán.

	<b>Azul tripán</b>
<b>U de Mann-Whitney</b>	59,5
<b>W de Wilcoxon</b>	137,5
<b>Z</b>	-0,721844776
<b>Valor de significación p</b>	<b>0,4703</b>

**Tabla 6.** Comparación estadística de los niveles de viabilidad de todas las células del tejido cartilaginoso fibroso frente a todas las células del tejido cartilaginoso hialino, determinados mediante la técnica del azul tripán. Se muestran los valores U, W y Z para la prueba estadística U de Mann-Whitney, así como el valor de significación  $p$  (en negrita).

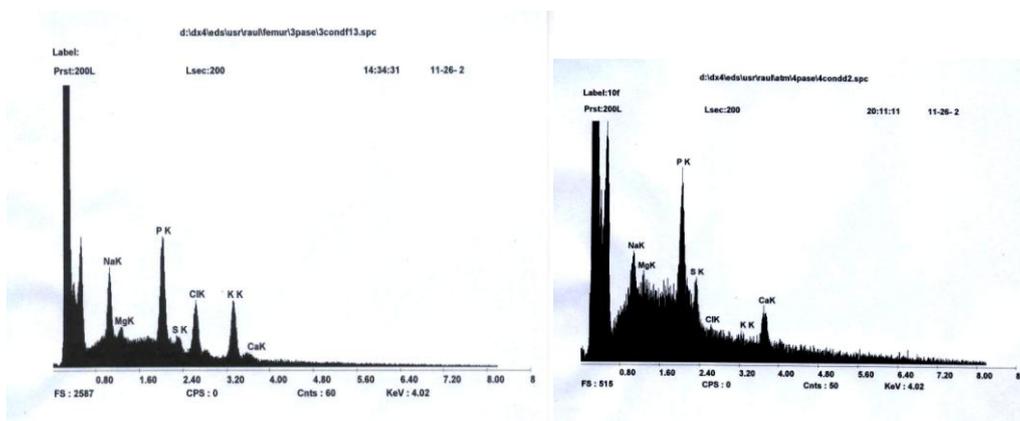
	<b>T.C.F. 1</b>	<b>T.C.F. 2</b>	<b>T.C.F. 3</b>	<b>T.C.H. 1</b>	<b>T.C.H. 2</b>	<b>T.C.H. 3</b>
<b>T.C.F. 1</b>	-	<b>0,0679</b>	<b>0,0679</b>	<b>0,8845</b>		
<b>T.C.F. 2</b>	<b>0,0679</b>	-	<b>0,0679</b>		<b>1,0000</b>	
<b>T.C.F. 3</b>	<b>0,0679</b>	<b>0,0679</b>	-			<b>0,0433</b>
<b>T.C.H. 1</b>	<b>0,8845</b>			-	<b>0,0679</b>	<b>0,0679</b>
<b>T.C.H. 2</b>		<b>1,0000</b>		<b>0,0679</b>	-	<b>0,7150</b>
<b>T.C.H. 3</b>			<b>0,0433</b>	<b>0,0679</b>	<b>0,7150</b>	-

**Tabla 7.** Valores de significación estadística  $p$  para las comparaciones de los niveles de supervivencia celular determinada mediante azul tripán entre dos subcultivos distintos de células del mismo tipo de tejido (tejido cartilaginoso fibroso -T.C.F.- o tejido cartilaginoso hialino -T.C.H.-) y para las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a tejidos distintos (T.C.F. frente a T.C.H.). Las comparaciones de entre dos subcultivos del mismo tipo de células se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a distintos tipos de células se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. (1) cultivo primario; (2) primer subcultivo; (3) segundo subcultivo.

### 3. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

La utilización de la microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X nos permitió obtener espectros individualizados para cada una de las células cartilagosas objeto de estudio. En cada uno de esos espectros se observaron los picos correspondientes a los diferentes elementos existentes a nivel intracelular, así como el fondo o *background* correspondiente a la emisión de la radiación no característica (Figura 24).

A continuación, expondremos sucesivamente los resultados cualitativos y cuantitativos, una vez calculados éstos de acuerdo con la metodología previamente descrita en esta Tesis Doctoral.



**Figura 24.** Espectro microanalítico correspondiente a una célula del tejido cartilaginoso fibroso del primer subcultivo y a una célula del tejido cartilaginoso hialino del primer subcultivo. Cada pico representa cualitativamente el contenido celular de un elemento específico.

### **3.1. Resultados cualitativos**

En las Tablas 8 a 13, se indican los valores de cuentas por segundo (CPS), radiación de fondo (*background*) y relación pico-fondo (P/B) para los principales elementos existentes en cada célula (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca).

**Tabla 8.** Microanálisis cualitativo para los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso fibroso en cultivo primario. Se muestran los valores de cuentas por segundo (CPS), radiación de fondo (*background*) y relación pico-fondo (P/B) para cada elemento.

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 1	Na	0,09	0,22	0,40
	Mg	0,12	0,24	0,52
	P	1,12	0,20	5,57
	S	0,43	0,12	3,44
	Cl	0,33	0,11	3,00
	K	0,97	0,12	8,08
	Ca	0,00	0,12	0,00
Célula 2	Na	0,16	0,14	1,15
	Mg	0,12	0,08	1,50
	P	0,69	0,15	4,57
	S	0,25	0,11	2,27
	Cl	0,25	0,05	4,55
	K	0,48	0,06	8,00
	Ca	0,03	0,06	0,42
Célula 3	Na	0,19	0,24	0,81
	Mg	0,15	0,16	0,97
	P	0,98	0,20	4,90
	S	0,16	0,17	0,97
	Cl	0,23	0,12	1,84
	K	0,63	0,06	10,58
	Ca	0,06	0,06	1,00
Célula 4	Na	1,29	2,30	0,56
	Mg	1,84	2,34	0,78
	P	13,15	2,57	5,13
	S	3,85	1,78	2,15
	Cl	3,64	1,36	2,69
	K	10,51	1,22	8,61
	Ca	0,49	1,05	0,46
Célula 5	Na	1,41	2,34	0,60
	Mg	1,67	2,38	0,70
	P	11,64	2,41	4,82
	S	3,02	1,88	1,61
	Cl	3,02	1,41	2,14
	K	9,30	1,23	7,56
	Ca	0,44	1,09	0,40

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 6	Na	1,65	4,08	0,41
	Mg	2,11	3,77	0,56
	P	15,18	3,60	4,22
	S	4,61	2,51	1,84
	Cl	4,66	1,82	2,56
	K	12,93	1,56	8,29
	Ca	0,41	1,44	0,28
Célula 7	Na	2,14	3,97	0,54
	Mg	2,38	3,78	0,63
	P	15,59	3,84	4,06
	S	4,26	2,88	1,48
	Cl	5,47	2,06	2,66
	K	15,98	1,82	8,78
	Ca	0,61	1,62	0,38
Célula 8	Na	2,88	3,90	0,74
	Mg	2,49	3,97	0,63
	P	17,86	4,47	3,99
	S	4,46	3,13	1,42
	Cl	6,14	2,22	2,77
	K	17,00	2,19	7,74
	Ca	0,39	1,95	0,20
Célula 9	Na	1,89	5,23	0,36
	Mg	2,01	4,84	0,42
	P	17,69	4,47	3,96
	S	4,87	3,31	1,47
	Cl	5,18	2,45	2,11
	K	16,36	2,26	7,24
	Ca	0,51	2,01	0,26
Célula 10	Na	2,81	5,14	0,55
	Mg	2,42	5,34	0,45
	P	23,50	5,22	4,50
	S	5,49	3,64	1,51
	Cl	6,54	2,62	2,49
	K	20,92	2,23	9,36
	Ca	0,75	2,01	0,37

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 11	Na	1,76	4,19	0,42
	Mg	2,32	4,34	0,54
	P	18,78	4,47	4,20
	S	5,74	3,16	1,82
	Cl	4,80	2,33	2,06
	K	18,41	2,24	8,22
	Ca	0,31	2,13	0,15
Célula 12	Na	3,34	7,45	0,45
	Mg	4,09	7,27	0,56
	P	30,51	7,30	4,18
	S	7,11	5,66	1,26
	Cl	8,49	4,24	2,00
	K	27,33	3,09	8,84
	Ca	1,08	2,84	0,38
Célula 13	Na	1,92	3,06	0,63
	Mg	2,14	3,15	0,68
	P	18,43	3,87	4,77
	S	4,15	2,62	1,58
	Cl	4,42	1,84	2,40
	K	14,05	1,62	8,67
	Ca	0,22	1,46	0,15
Célula 14	Na	2,31	3,36	0,69
	Mg	1,82	3,63	0,50
	P	15,96	3,76	4,24
	S	3,01	2,62	1,15
	Cl	4,01	1,84	2,19
	K	12,28	1,75	7,04
	Ca	0,34	1,59	0,22
Célula 15	Na	1,18	3,78	0,31
	Mg	1,62	3,59	0,45
	P	15,56	3,41	4,56
	S	4,31	2,46	1,75
	Cl	3,10	1,83	1,70
	K	10,98	1,81	6,07
	Ca	0,50	1,59	0,31

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 16	Na	1,03	2,93	0,35
	Mg	1,25	2,74	0,46
	P	12,11	2,41	5,01
	S	3,07	1,88	1,63
	Cl	2,55	1,42	1,79
	K	8,08	1,17	6,88
	Ca	0,34	1,12	0,31
Célula 17	Na	3,07	4,89	0,63
	Mg	2,67	4,72	0,57
	P	18,33	5,34	3,43
	S	5,07	3,88	1,31
	Cl	6,30	2,72	2,32
	K	17,18	2,22	7,74
	Ca	0,94	2,02	0,47
Célula 18	Na	3,75	5,26	0,71
	Mg	2,55	5,49	0,46
	P	21,43	5,37	3,99
	S	5,91	4,16	1,42
	Cl	7,57	3,25	2,33
	K	18,70	2,72	6,86
	Ca	1,11	2,44	0,45
Célula 19	Na	4,14	4,94	0,84
	Mg	3,51	5,22	0,67
	P	21,58	5,43	3,98
	S	5,42	4,07	1,33
	Cl	8,09	3,07	2,63
	K	18,23	2,74	6,65
	Ca	1,29	2,44	0,53
Célula 20	Na	4,68	4,36	1,07
	Mg	2,91	4,78	0,61
	P	19,82	5,62	3,53
	S	4,92	3,92	1,25
	Cl	7,43	2,88	2,58
	K	16,42	2,58	6,38
	Ca	3,26	2,35	1,39

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 21	Na	4,24	4,92	0,86
	Mg	2,79	5,25	0,53
	P	21,18	6,25	3,39
	S	5,16	4,31	1,20
	Cl	7,91	3,01	2,63
	K	19,46	2,62	7,42
	Ca	1,52	2,37	0,64
Célula 22	Na	5,16	5,79	0,89
	Mg	3,19	6,37	0,50
	P	22,42	6,74	3,47
	S	5,40	4,56	1,18
	Cl	8,51	3,36	2,53
	K	18,93	3,12	6,06
	Ca	6,72	2,81	2,39
Célula 23	Na	5,15	5,50	0,94
	Mg	4,19	5,36	0,78
	P	25,07	6,05	4,15
	S	5,76	4,42	1,30
	Cl	9,47	3,34	2,84
	K	21,94	2,64	8,31
	Ca	1,90	2,52	0,76
Célula 24	Na	3,95	5,31	0,74
	Mg	2,83	5,16	0,55
	P	17,67	4,99	3,55
	S	4,28	3,86	1,11
	Cl	7,41	3,11	2,38
	K	15,77	2,67	5,90
	Ca	1,23	2,42	0,51
Célula 25	Na	0,74	2,65	0,28
	Mg	1,08	2,61	0,41
	P	11,05	2,67	4,13
	S	1,89	1,97	0,96
	Cl	2,40	1,38	1,74
	K	8,76	1,20	7,30
	Ca	0,25	1,08	0,23

**Tabla 9.** Microanálisis cualitativo para los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso fibroso en el primer subcultivo. Se muestran los valores de cuentas por segundo (CPS), radiación de fondo (*background*) y relación pico-fondo (P/B) para cada elemento.

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 1	Na	1,47	4,96	0,30
	Mg	1,19	5,16	0,23
	P	15,55	4,76	3,27
	S	3,53	3,30	1,07
	Cl	2,93	2,25	1,30
	K	8,36	1,79	4,67
	Ca	0,00	1,80	0,00
Célula 2	Na	0,00	1,41	0,00
	Mg	0,41	2,43	0,17
	P	11,11	4,45	2,50
	S	4,12	3,77	1,10
	Cl	3,57	3,12	1,15
	K	11,24	2,52	4,46
	Ca	0,51	2,04	0,25
Célula 3	Na	1,02	6,28	0,16
	Mg	1,95	6,69	0,29
	P	17,82	5,01	3,56
	S	5,22	3,87	1,35
	Cl	2,69	2,97	0,90
	K	9,66	2,38	4,07
	Ca	0,00	2,08	0,00
Célula 4	Na	0,29	1,26	0,23
	Mg	1,10	2,25	0,49
	P	13,14	4,28	3,07
	S	4,17	3,79	1,10
	Cl	3,31	3,25	1,02
	K	11,91	2,93	4,07
	Ca	0,00	2,55	0,00
Célula 5	Na	1,13	7,41	0,31
	Mg	2,23	8,24	0,26
	P	22,42	6,32	2,87
	S	7,86	5,35	1,13
	Cl	4,53	4,16	0,71
	K	12,09	3,18	2,72
	Ca	0,62	2,64	0,14

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 6	Na	2,28	9,67	0,31
	Mg	2,12	10,76	0,26
	P	18,16	1,93	2,87
	S	6,07	3,94	1,13
	Cl	2,96	6,37	0,71
	K	8,66	2,81	2,72
	Ca	0,37	34,67	0,14
Célula 7	Na	1,00	9,31	0,11
	Mg	2,27	9,69	0,23
	P	29,90	7,12	4,20
	S	4,74	5,06	0,94
	Cl	4,39	3,62	1,21
	K	11,59	3,20	3,62
	Ca	0,47	2,65	0,18
Célula 8	Na	1,32	9,64	0,14
	Mg	1,49	9,47	0,16
	P	12,20	5,80	2,11
	S	5,14	4,59	1,12
	Cl	2,46	3,71	0,66
	K	6,80	2,70	2,52
	Ca	0,22	2,70	0,08
Célula 9	Na	2,09	8,20	0,25
	Mg	2,42	8,57	0,28
	P	20,83	5,91	3,52
	S	5,58	4,75	1,17
	Cl	4,32	3,38	1,28
	K	10,97	2,66	4,12
	Ca	0,67	2,34	0,28
Célula 10	Na	2,02	8,44	0,24
	Mg	2,70	8,28	0,33
	P	19,97	6,30	3,17
	S	5,59	4,80	1,17
	Cl	5,40	3,44	1,57
	K	15,41	2,85	5,41
	Ca	0,44	2,34	0,19

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 11	Na	2,56	7,67	0,33
	Mg	2,30	8,01	0,29
	P	15,19	5,26	2,89
	S	4,25	4,09	1,04
	Cl	1,93	3,22	0,60
	K	6,23	2,33	2,68
	Ca	0,50	2,01	0,25
Célula 12	Na	0,74	8,24	0,09
	Mg	2,01	8,41	0,24
	P	10,16	5,93	1,71
	S	6,65	4,88	1,36
	Cl	2,80	3,72	0,75
	K	6,14	3,32	1,85
	Ca	0,17	2,82	0,06
Célula 13	Na	4,60	10,20	0,45
	Mg	2,85	9,56	0,30
	P	16,67	6,38	2,61
	S	8,23	5,07	1,62
	Cl	3,70	4,16	0,89
	K	8,46	3,13	2,70
	Ca	0,58	2,84	0,21
Célula 14	Na	4,53	8,81	0,51
	Mg	2,41	9,55	0,25
	P	20,82	6,78	3,07
	S	9,06	5,73	1,58
	Cl	4,93	4,57	1,08
	K	9,87	3,26	3,03
	Ca	0,31	2,96	0,10
Célula 15	Na	3,39	9,96	0,34
	Mg	1,87	9,65	0,19
	P	22,16	6,89	3,22
	S	6,71	5,30	1,27
	Cl	3,78	3,92	0,96
	K	11,62	2,96	3,93
	Ca	0,63	2,43	0,10

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 16	Na	2,81	5,79	0,49
	Mg	2,32	6,14	0,38
	P	19,02	5,30	3,59
	S	4,36	4,42	0,99
	Cl	2,85	3,21	0,89
	K	9,89	2,36	4,20
	Ca	0,00	2,55	0,00
Célula 17	Na	2,39	9,40	0,25
	Mg	3,44	9,02	0,38
	P	24,69	6,92	3,57
	S	5,30	5,18	1,02
	Cl	3,66	3,75	0,98
	K	8,82	3,28	2,69
	Ca	0,00	3,02	0,00
Célula 18	Na	5,61	9,19	0,61
	Mg	4,59	9,71	0,47
	P	26,77	7,07	3,78
	S	10,16	5,77	1,76
	Cl	4,18	4,59	0,91
	K	15,65	3,46	4,52
	Ca	0,29	3,24	0,09
Célula 19	Na	1,75	8,15	0,21
	Mg	2,25	8,63	0,26
	P	25,77	7,03	3,66
	S	5,43	5,16	1,05
	Cl	3,26	3,88	0,84
	K	9,22	2,93	3,15
	Ca	0,81	2,63	0,31
Célula 20	Na	2,42	9,05	0,27
	Mg	4,04	9,09	0,44
	P	23,08	7,36	3,14
	S	14,09	5,91	2,39
	Cl	4,80	4,34	1,10
	K	13,64	3,15	4,32
	Ca	0,68	2,81	0,24

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 21	Na	2,42	9,05	0,27
	Mg	4,04	9,09	0,44
	P	23,08	7,36	3,14
	S	14,09	5,91	2,39
	Cl	4,80	4,34	1,10
	K	13,64	3,15	4,32
	Ca	0,68	2,81	0,24
Célula 22	Na	4,30	8,84	0,51
	Mg	3,35	8,10	0,41
	P	35,02	7,32	4,78
	S	1,93	5,18	0,37
	Cl	4,60	3,55	1,30
	K	17,50	2,65	6,60
	Ca	0,50	2,74	0,18
Célula 23	Na	1,36	10,29	0,13
	Mg	1,76	9,68	0,18
	P	16,17	6,26	2,58
	S	7,32	5,12	1,43
	Cl	4,00	3,95	1,01
	K	8,57	2,94	2,91
	Ca	0,68	2,88	0,24
Célula 24	Na	2,09	5,53	0,38
	Mg	2,24	6,66	0,34
	P	16,85	5,87	2,87
	S	6,52	4,98	1,31
	Cl	2,48	4,03	0,62
	K	8,16	2,99	2,73
	Ca	0,24	2,68	0,09
Célula 25	Na	1,87	8,34	0,22
	Mg	2,22	8,43	0,26
	P	10,43	5,47	1,91
	S	5,28	4,59	1,15
	Cl	2,18	3,72	0,59
	K	4,70	2,64	1,78
	Ca	0,27	2,50	0,11

**Tabla 10.** Microanálisis cualitativo para los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso fibroso en el segundo subcultivo. Se muestran los valores de cuentas por segundo (CPS), radiación de fondo (*background*) y relación pico-fondo (P/B) para cada elemento.

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 1	Na	4,94	7,63	0,65
	Mg	1,72	7,49	0,23
	P	13,48	5,17	2,61
	S	4,55	4,05	1,12
	Cl	1,31	2,91	0,45
	K	0,71	2,49	0,28
	Ca	2,01	2,83	0,71
Célula 2	Na	2,70	6,85	0,39
	Mg	0,52	6,96	0,07
	P	11,90	4,88	2,44
	S	4,75	3,59	1,32
	Cl	1,25	2,59	0,48
	K	0,37	2,49	0,15
	Ca	3,14	2,91	1,08
Célula 3	Na	2,95	5,54	0,53
	Mg	0,94	5,70	0,16
	P	8,06	3,79	2,13
	S	4,22	3,16	1,34
	Cl	0,78	2,49	0,31
	K	0,57	2,07	0,28
	Ca	2,09	2,22	0,94
Célula 4	Na	1,30	8,35	0,16
	Mg	1,38	7,48	0,19
	P	12,57	4,98	2,53
	S	2,91	3,77	0,77
	Cl	1,12	2,82	0,40
	K	0,44	2,72	0,16
	Ca	4,47	3,27	1,37

**Tabla 11.** Microanálisis cualitativo para los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso hialino en cultivo primario. Se muestran los valores de cuentas por segundo (CPS), radiación de fondo (*background*) y relación pico-fondo (P/B) para cada elemento.

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 1	Na	12,42	8,07	1,54
	Mg	5,86	7,53	0,78
	P	29,01	7,05	4,11
	S	4,75	5,24	0,91
	Cl	11,41	3,92	2,91
	K	21,45	2,94	7,30
	Ca	0,34	2,57	0,13
Célula 2	Na	9,91	7,11	1,39
	Mg	4,77	6,48	0,70
	P	23,39	5,74	4,07
	S	4,49	4,30	1,04
	Cl	8,77	3,27	2,68
	K	15,57	2,53	6,16
	Ca	0,47	2,19	0,21
Célula 3	Na	9,48	8,10	1,17
	Mg	6,53	7,30	0,89
	P	26,33	6,87	3,83
	S	4,99	5,51	0,91
	Cl	10,51	4,20	2,50
	K	18,34	3,14	5,83
	Ca	0,62	2,67	0,23
Célula 4	Na	6,67	5,61	1,19
	Mg	3,35	5,83	0,57
	P	17,78	5,62	3,16
	S	5,98	3,96	1,51
	Cl	7,73	2,79	2,78
	K	10,70	2,41	4,43
	Ca	0,89	2,12	0,42
Célula 5	Na	3,38	4,49	0,75
	Mg	2,01	4,82	0,42
	P	18,79	5,65	3,33
	S	6,99	4,38	1,60
	Cl	7,47	3,27	2,28
	K	13,06	2,54	5,14
	Ca	0,44	2,25	0,20

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 6	Na	3,16	4,76	0,67
	Mg	1,54	4,43	0,35
	P	4,86	3,04	1,60
	S	2,47	2,40	1,03
	Cl	0,75	1,85	0,41
	K	0,98	1,13	0,87
	Ca	1,90	0,92	2,07
Célula 7	Na	6,05	5,24	1,15
	Mg	3,10	5,80	0,53
	P	22,31	5,78	3,86
	S	5,70	44,10	1,29
	Cl	7,91	3,38	2,34
	K	15,31	2,52	6,08
	Ca	0,34	2,26	0,15
Célula 8	Na	6,43	6,05	1,06
	Mg	2,86	6,36	0,45
	P	18,09	5,63	3,21
	S	5,18	4,30	1,21
	Cl	6,41	3,15	2,03
	K	12,81	2,48	5,15
	Ca	0,58	2,13	0,27
Célula 9	Na	6,12	6,36	0,96
	Mg	2,92	6,43	0,45
	P	20,50	6,04	3,39
	S	4,48	4,51	0,99
	Cl	6,03	3,36	1,80
	K	11,49	2,71	4,24
	Ca	0,23	2,38	1,00
Célula 10	Na	4,55	3,58	1,27
	Mg	2,48	4,41	0,56
	P	23,17	5,81	3,99
	S	4,12	4,34	0,95
	Cl	9,35	3,14	2,97
	K	15,03	2,43	6,19
	Ca	0,70	2,20	0,32

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 11	Na	1,89	1,96	0,97
	Mg	1,13	2,54	0,45
	P	16,56	3,84	4,32
	S	3,85	2,94	1,31
	Cl	7,14	2,38	3,00
	K	13,48	1,98	6,81
	Ca	0,39	1,82	0,21
Célula 12	Na	5,93	3,18	1,86
	Mg	2,87	4,26	0,67
	P	25,68	5,47	4,69
	S	5,07	4,12	1,23
	Cl	10,43	3,05	3,43
	K	17,83	2,67	6,68
	Ca	0,23	2,37	0,10
Célula 13	Na	2,70	1,78	1,52
	Mg	1,20	1,80	0,67
	P	8,68	1,92	4,51
	S	2,37	1,47	1,61
	Cl	3,53	1,15	3,07
	K	5,97	1,02	5,85
	Ca	0,17	0,96	0,17
Célula 14	Na	1,23	1,10	1,12
	Mg	0,74	1,28	0,58
	P	5,38	1,61	3,34
	S	1,63	1,13	1,44
	Cl	2,33	0,74	3,15
	K	4,25	0,67	6,39
	Ca	0,31	0,64	0,47
Célula 15	Na	2,72	2,72	1,00
	Mg	1,32	2,60	0,51
	P	8,99	2,12	4,25
	S	2,65	1,50	1,77
	Cl	3,01	1,12	2,68
	K	4,27	1,04	4,09
	Ca	0,18	0,92	0,20

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 16	Na	4,28	5,11	0,84
	Mg	2,64	4,90	0,54
	P	14,45	5,17	2,79
	S	5,82	3,68	1,58
	Cl	5,91	2,55	2,32
	K	14,15	2,02	7,01
	Ca	0,30	1,78	0,17
Célula 17	Na	5,61	6,01	0,93
	Mg	3,19	6,55	0,49
	P	22,05	6,64	3,32
	S	5,14	4,71	1,09
	Cl	8,16	3,41	2,39
	K	13,55	3,12	4,35
	Ca	0,22	2,66	0,08
Célula 18	Na	4,68	6,93	0,68
	Mg	3,72	6,89	0,54
	P	20,58	6,96	2,96
	S	5,87	5,30	1,11
	Cl	10,35	3,94	2,63
	K	19,89	2,82	7,07
	Ca	0,00	2,48	0,00
Célula 19	Na	5,26	8,69	0,61
	Mg	3,96	7,74	0,51
	P	18,22	6,11	2,98
	S	5,36	4,30	1,25
	Cl	12,94	3,24	4,00
	K	23,32	3,02	7,76
	Ca	0,12	2,57	0,04
Célula 20	Na	6,53	7,86	0,83
	Mg	3,80	7,55	0,50
	P	23,23	6,72	3,46
	S	5,55	4,99	1,11
	Cl	10,93	3,62	3,01
	K	19,23	3,22	5,96
	Ca	0,21	2,90	0,07

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 21	Na	6,96	7,86	0,89
	Mg	3,57	7,74	0,46
	P	27,25	6,96	3,92
	S	5,27	5,05	1,04
	Cl	10,52	3,70	2,84
	K	19,90	3,12	6,37
	Ca	0,22	2,81	0,08
Célula 22	Na	5,93	7,21	0,82
	Mg	3,53	6,77	0,52
	P	19,45	6,03	3,23
	S	5,01	4,55	1,10
	Cl	8,84	3,39	2,61
	K	15,92	2,62	6,09
	Ca	0,40	2,41	0,17
Célula 23	Na	7,14	7,32	0,98
	Mg	3,60	6,74	0,53
	P	24,83	6,21	4,00
	S	4,78	4,73	1,01
	Cl	8,49	3,52	2,42
	K	15,86	2,71	5,84
	Ca	0,30	2,48	0,12
Célula 24	Na	11,42	12,20	0,94
	Mg	6,03	11,73	0,51
	P	34,84	10,51	3,32
	S	6,45	7,36	0,88
	Cl	11,26	5,20	2,16
	K	22,85	3,99	5,73
	Ca	0,75	3,62	0,21
Célula 25	Na	2,65	4,36	0,61
	Mg	1,71	4,39	0,39
	P	8,75	3,93	2,22
	S	3,40	2,94	1,16
	Cl	4,51	2,15	2,10
	K	9,42	1,68	5,61
	Ca	0,54	1,48	0,36

**Tabla 12.** Microanálisis cualitativo para los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso hialino en el primer subcultivo. Se muestran los valores de cuentas por segundo (CPS), radiación de fondo (*background*) y relación pico-fondo (P/B) para cada elemento.

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 1	Na	16,41	9,02	1,82
	Mg	2,84	8,83	0,32
	P	25,64	6,57	3,90
	S	8,87	5,03	1,77
	Cl	18,03	3,87	4,66
	K	15,75	2,49	6,31
	Ca	1,21	2,97	0,61
Célula 2	Na	19,94	9,14	2,18
	Mg	2,50	8,47	0,30
	P	23,94	5,43	4,40
	S	7,91	4,32	1,83
	Cl	20,36	3,31	6,15
	K	16,82	1,91	8,78
	Ca	1,29	1,51	0,85
Célula 3	Na	15,76	7,20	2,19
	Mg	2,61	6,99	0,37
	P	21,85	5,05	4,33
	S	5,82	4,20	1,39
	Cl	14,67	3,23	4,54
	K	14,56	1,73	8,42
	Ca	1,07	1,35	0,79
Célula 4	Na	15,11	7,22	2,09
	Mg	2,18	7,01	0,31
	P	21,66	5,07	4,28
	S	6,45	3,87	1,67
	Cl	12,66	2,87	4,41
	K	13,18	1,65	7,99
	Ca	1,22	1,35	0,90
Célula 5	Na	7,39	4,50	1,64
	Mg	1,10	4,55	0,24
	P	9,36	2,71	3,45
	S	3,53	2,44	1,44
	Cl	8,11	1,96	4,14
	K	8,93	1,07	8,35
	Ca	0,88	0,83	1,05

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 6	Na	9,83	4,89	2,01
	Mg	1,40	4,48	0,31
	P	9,35	2,79	3,36
	S	5,78	2,58	2,24
	Cl	7,72	2,13	3,63
	K	7,28	1,24	5,87
	Ca	0,98	0,96	1,02
Célula 7	Na	36,04	9,84	3,66
	Mg	2,67	10,22	0,26
	P	34,79	7,91	4,40
	S	9,77	6,67	1,46
	Cl	33,15	5,28	6,28
	K	17,17	3,13	5,48
	Ca	2,08	2,49	0,83
Célula 8	Na	29,73	9,52	3,12
	Mg	2,66	8,85	0,30
	P	27,38	6,18	4,43
	S	7,39	4,94	1,50
	Cl	25,09	3,76	6,68
	K	12,97	2,11	6,16
	Ca	1,75	1,66	1,05
Célula 9	Na	39,05	12,64	3,09
	Mg	3,90	12,69	0,31
	P	40,70	9,89	4,14
	S	13,34	8,29	1,61
	Cl	36,83	6,24	5,91
	K	17,58	2,98	5,89
	Ca	2,38	2,38	1,00
Célula 10	Na	31,74	9,40	3,38
	Mg	4,82	10,57	0,46
	P	37,28	9,60	3,89
	S	20,40	8,56	2,38
	Cl	40,91	6,65	6,15
	K	18,64	3,24	5,74
	Ca	2,54	2,61	0,97

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 11	Na	10,56	6,31	1,67
	Mg	2,61	7,17	0,36
	P	21,90	5,28	4,14
	S	6,91	4,76	1,45
	Cl	15,15	3,89	3,90
	K	19,28	2,32	8,31
	Ca	1,71	1,85	0,92
Célula 12	Na	17,85	7,80	2,29
	Mg	2,84	8,16	0,35
	P	30,49	6,28	4,86
	S	5,93	4,97	1,19
	Cl	19,14	3,82	5,02
	K	18,17	2,27	8,02
	Ca	2,20	1,80	1,22
Célula 13	Na	22,59	11,03	2,05
	Mg	4,34	11,19	0,39
	P	42,69	7,72	5,53
	S	8,27	6,12	1,35
	Cl	22,49	4,62	4,86
	K	26,39	2,61	10,11
	Ca	2,54	2,10	1,21
Célula 14	Na	20,97	10,57	1,98
	Mg	4,12	10,84	0,38
	P	38,65	7,49	5,16
	S	9,10	5,85	1,56
	Cl	21,18	4,55	4,65
	K	24,83	2,92	8,49
	Ca	1,70	2,34	0,73
Célula 15	Na	17,33	8,17	2,12
	Mg	3,62	7,74	0,47
	P	25,83	6,07	4,26
	S	6,82	4,57	1,49
	Cl	14,63	3,39	4,31
	K	18,03	2,06	8,77
	Ca	1,57	1,67	0,94

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 16	Na	35,01	13,40	2,61
	Mg	6,41	13,65	0,47
	P	54,43	10,10	5,39
	S	8,60	7,66	1,12
	Cl	28,88	5,76	5,01
	K	31,59	3,43	9,21
	Ca	2,42	2,67	0,91
Célula 17	Na	22,48	12,02	1,87
	Mg	4,44	11,98	0,37
	P	43,47	8,76	4,96
	S	8,95	6,30	1,42
	Cl	23,81	4,83	4,93
	K	28,18	3,43	8,21
	Ca	1,73	2,70	0,64
Célula 18	Na	42,17	13,39	3,15
	Mg	5,14	12,99	0,40
	P	40,77	9,55	4,27
	S	16,93	7,82	2,17
	Cl	40,33	6,16	6,55
	K	26,50	3,79	6,99
	Ca	2,26	2,99	0,75
Célula 19	Na	49,80	15,34	3,25
	Mg	6,09	14,90	0,41
	P	46,03	10,49	4,39
	S	18,75	9,53	1,97
	Cl	57,03	7,55	7,56
	K	27,38	3,82	7,17
	Ca	2,99	2,99	1,00
Célula 20	Na	27,83	10,59	2,63
	Mg	2,53	10,77	0,23
	P	30,29	8,16	3,71
	S	12,06	6,80	1,77
	Cl	30,09	5,28	5,70
	K	19,60	2,91	6,73
	Ca	2,29	2,30	1,00

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 21	Na	24,47	12,33	1,98
	Mg	5,80	12,24	0,47
	P	37,96	8,19	4,63
	S	7,53	6,74	1,12
	Cl	18,74	5,22	3,59
	K	20,70	2,92	7,09
	Ca	2,72	2,33	1,17
Célula 22	Na	24,43	11,31	2,16
	Mg	4,04	11,34	0,36
	P	43,20	8,13	5,31
	S	8,27	6,38	1,30
	Cl	23,13	4,82	4,79
	K	27,14	2,80	9,69
	Ca	1,96	1,96	0,86
Célula 23	Na	17,59	8,02	2,19
	Mg	2,78	8,45	0,33
	P	29,93	5,97	5,01
	S	5,62	4,82	1,17
	Cl	18,70	3,82	4,90
	K	18,03	2,47	7,28
	Ca	2,27	1,97	1,15
Célula 24	Na	31,53	12,59	2,51
	Mg	5,91	12,35	0,48
	P	47,97	9,11	5,27
	S	8,93	6,84	1,30
	Cl	28,66	5,20	5,52
	K	30,08	3,30	9,13
	Ca	2,23	2,57	0,87
Célula 25	Na	34,76	11,40	3,05
	Mg	4,43	11,29	0,39
	P	37,96	7,61	4,99
	S	5,75	6,01	0,96
	Cl	25,12	4,73	5,31
	K	14,36	3,09	4,65
	Ca	2,02	2,39	0,85

**Tabla 13.** Microanálisis cualitativo para los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso hialino en el segundo subcultivo. Se muestran los valores de cuentas por segundo (CPS), radiación de fondo (*background*) y relación pico-fondo (P/B) para cada elemento.

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 1	Na	2,80	4,61	0,61
	Mg	1,19	4,39	0,27
	P	5,86	2,97	1,97
	S	2,21	2,24	0,99
	Cl	0,88	1,67	0,53
	K	0,81	0,99	0,82
	Ca	2,06	0,83	2,47
Célula 2	Na	6,44	7,61	0,85
	Mg	1,46	7,61	0,19
	P	8,88	4,82	1,84
	S	2,97	3,97	0,75
	Cl	0,80	3,12	0,25
	K	1,34	1,90	0,71
	Ca	3,20	1,53	2,08
Célula 3	Na	3,66	7,26	0,51
	Mg	1,08	7,18	0,15
	P	9,76	4,88	2,00
	S	2,88	3,69	0,78
	Cl	0,70	2,81	0,25
	K	1,31	1,76	0,74
	Ca	2,87	1,37	2,09
Célula 4	Na	5,41	12,08	0,45
	Mg	2,18	12,63	0,17
	P	15,56	8,01	1,97
	S	4,80	6,07	0,79
	Cl	1,68	4,64	0,36
	K	2,01	2,97	0,67
	Ca	5,18	2,37	2,19
Célula 5	Na	2,73	7,38	0,37
	Mg	1,42	7,34	0,19
	P	8,43	4,43	1,90
	S	3,36	3,89	0,86
	Cl	0,83	3,04	0,27
	K	1,68	1,59	1,06
	Ca	3,53	1,29	2,73

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 6	Na	3,16	4,76	0,67
	Mg	1,54	4,43	0,35
	P	4,86	3,04	1,60
	S	2,47	2,40	1,03
	Cl	0,75	1,85	0,41
	K	0,98	1,13	0,87
	Ca	1,90	0,92	2,07
Célula 7	Na	4,20	6,97	0,60
	Mg	1,90	6,69	0,28
	P	8,18	4,72	1,73
	S	3,42	3,72	0,92
	Cl	1,10	2,87	0,38
	K	1,11	1,71	0,65
	Ca	2,50	1,37	1,83
Célula 8	Na	3,60	5,68	0,63
	Mg	1,04	5,83	0,18
	P	11,11	3,59	3,10
	S	2,22	2,74	0,81
	Cl	0,75	2,21	0,34
	K	0,73	1,66	0,44
	Ca	3,04	1,28	2,37
Célula 9	Na	6,33	7,09	0,89
	Mg	2,52	6,89	0,37
	P	13,73	4,68	2,93
	S	2,46	3,37	0,73
	Cl	1,19	2,55	0,47
	K	1,59	1,74	0,91
	Ca	3,26	1,35	2,41
Célula 10	Na	6,33	7,09	0,89
	Mg	2,52	6,89	0,37
	P	13,73	4,68	2,93
	S	2,46	3,37	0,73
	Cl	1,19	2,55	0,47
	K	1,59	1,74	0,91
	Ca	3,26	1,35	2,41

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 11	Na	5,72	7,12	0,80
	Mg	2,24	6,81	0,33
	P	10,69	4,57	2,34
	S	2,20	3,28	0,67
	Cl	1,11	2,42	0,46
	K	1,37	1,53	0,89
	Ca	3,04	1,22	2,50
Célula 12	Na	5,11	5,20	0,98
	Mg	2,09	5,34	0,39
	P	9,02	3,65	2,47
	S	1,78	2,86	0,63
	Cl	0,81	2,19	0,37
	K	1,17	1,33	0,89
	Ca	2,50	1,04	2,39
Célula 13	Na	5,06	6,51	0,78
	Mg	1,88	6,65	0,28
	P	13,35	4,55	2,93
	S	2,05	3,39	0,60
	Cl	0,61	2,55	0,24
	K	1,19	1,61	0,74
	Ca	4,11	1,30	3,16
Célula 14	Na	7,62	4,18	1,82
	Mg	1,96	3,91	0,50
	P	12,85	2,44	5,27
	S	1,47	1,66	0,88
	Cl	0,61	1,24	0,49
	K	0,91	0,88	1,02
	Ca	4,05	0,71	5,66
Célula 15	Na	4,62	4,95	0,93
	Mg	1,04	4,95	0,21
	P	6,32	3,04	2,08
	S	2,49	2,28	1,09
	Cl	1,00	1,70	0,59
	K	1,12	1,00	1,12
	Ca	1,95	0,79	2,47

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 16	Na	6,74	5,70	1,18
	Mg	1,43	5,57	0,26
	P	7,26	3,52	2,06
	S	2,41	2,72	0,89
	Cl	1,10	2,05	0,54
	K	1,16	1,20	0,97
	Ca	3,18	0,94	3,37
Célula 17	Na	5,92	4,85	1,22
	Mg	2,11	4,91	0,43
	P	5,91	3,20	1,84
	S	2,78	2,41	1,15
	Cl	1,50	1,91	0,79
	K	1,08	1,38	0,79
	Ca	2,51	1,08	2,32
Célula 18	Na	3,77	3,03	1,24
	Mg	0,54	3,19	0,17
	P	3,59	1,82	1,97
	S	1,57	1,61	0,98
	Cl	0,50	1,27	0,39
	K	0,74	0,71	1,03
	Ca	1,57	0,58	2,71
Célula 19	Na	5,17	5,38	0,96
	Mg	0,98	5,96	0,16
	P	8,96	3,65	2,45
	S	2,41	2,98	0,81
	Cl	1,12	2,35	0,48
	K	1,29	1,45	0,89
	Ca	2,08	1,13	1,84
Célula 20	Na	5,72	6,16	0,93
	Mg	1,09	6,47	0,17
	P	9,60	3,78	2,54
	S	2,52	3,30	0,76
	Cl	0,62	2,64	0,24
	K	1,17	1,55	0,75
	Ca	2,40	1,23	1,95

Nº Célula	Elemento	CPS	Background	P/B
Célula 21	Na	8,86	6,69	1,33
	Mg	1,49	6,93	0,22
	P	9,64	4,01	2,40
	S	2,65	2,83	0,94
	Cl	1,26	2,22	0,57
	K	1,07	1,76	0,61
	Ca	3,04	4,91	2,20
Célula 22	Na	5,11	4,72	1,08
	Mg	0,48	4,97	0,10
	P	4,59	2,56	1,80
	S	2,02	2,16	0,93
	Cl	1,06	1,80	0,59
	K	0,92	1,29	0,71
	Ca	1,79	1,03	1,73
Célula 23	Na	9,62	6,76	1,42
	Mg	1,33	6,55	0,20
	P	10,64	3,95	2,69
	S	2,93	3,12	0,94
	Cl	0,82	2,40	0,34
	K	1,34	1,50	0,89
	Ca	2,96	1,23	2,42
Célula 24	Na	5,69	5,12	1,11
	Mg	1,33	4,88	0,27
	P	5,60	3,12	1,79
	S	3,28	2,45	1,34
	Cl	1,38	1,89	0,73
	K	1,08	1,17	0,92
	Ca	1,87	0,94	1,98

### **3.2. Resultados cuantitativos**

En las Tablas 14 a 25, se describen los valores cuantitativos para cada elemento y para cada una de las células analizadas en cada subcultivo celular. A continuación, en las Tablas 26 y 27 y en las Figuras 25 a 32 se muestran los valores medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca, así como el cociente K/Na para el conjunto de células del tejido cartilaginoso fibroso y del cartílago cartilaginoso hialino.

Del mismo modo, en las Figuras 33 a 48 se expresan los histogramas correspondientes a cada elemento en los tres pases sucesivos que se analizaron en ambos tipos celulares (tejido cartilaginoso fibroso y del cartílago cartilaginoso hialino).

Los valores de significación  $p$  obtenidos mediante el análisis estadístico de los resultados se muestran en las Tablas 28 a 37.

**Tabla 14.** Determinación de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca mediante microscopía electrónica analítica en células del tejido cartilaginoso fibroso en cultivo primario. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

N ° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 1	33,9084	27,49812	385,41615	187,308	239,379	414,26968	0
Célula 2	97,48665	79,3215	316,22115	123,6015	363,05815	410,168	20,46702
Célula 3	68,66451	51,29457	339,0555	52,8165	146,81912	542,44718	48,731
Célula 4	47,47176	41,24718	354,97035	117,0675	214,64317	441,44331	22,41626
Célula 5	50,8626	37,0167	333,5199	87,6645	170,75702	387,60876	19,4924
Célula 6	34,75611	29,61336	292,0029	100,188	204,27008	425,03659	13,64468
Célula 7	45,77634	33,31503	280,9317	80,586	212,24938	450,15938	18,51778
Célula 8	62,73054	33,31503	276,08805	77,319	221,02661	396,83754	9,7462
Célula 9	30,51756	22,21002	274,0122	80,0415	168,36323	371,20204	12,67006
Célula 10	46,62405	2379,645	311,3775	82,2195	198,68457	479,89656	18,03047
Célula 11	35,60382	28,55574	290,619	99,099	164,37358	421,44762	7,30965
Célula 12	38,14695	29,61336	289,2351	68,607	159,586	453,23564	18,51778
Célula 13	53,40573	35,95908	330,06015	86,031	191,5032	444,51957	7,30965
Célula 14	58,49199	26,4405	293,3868	62,6175	174,74667	360,94784	10,72082
Célula 15	26,27901	23,79645	315,5292	95,2875	135,6481	311,21497	15,10661
Célula 16	29,66985	24,32526	346,66695	88,7535	142,82947	352,74448	15,10661
Célula 17	53,40573	30,14217	237,33885	71,3295	185,11976	396,83754	22,90357
Célula 18	60,18741	24,32526	276,08805	77,319	185,91769	351,71906	21,92895
Célula 19	71,20764	35,43027	275,3961	72,4185	209,85559	340,95215	25,82743
Célula 20	90,70497	32,25741	244,25835	68,0625	205,86594	327,10898	67,73609
Célula 21	72,90306	28,02693	234,57105	65,34	209,85559	380,43082	31,18784
Célula 22	75,44619	26,4405	240,10665	64,251	201,87629	310,70226	116,46709
Célula 23	79,68474	41,24718	287,15925	70,785	226,61212	426,06201	37,03556
Célula 24	62,73054	29,08455	245,64225	60,4395	189,90734	302,4989	24,85281
Célula 25	23,73588	21,68121	285,77535	52,272	138,83982	374,2783	11,20813

**Tabla 15.** Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso fibroso en cultivo primario. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
<b>Media</b>	<b>54,02</b>	<b>126,87</b>	<b>294,22</b>	<b>83,66</b>	<b>194,47</b>	<b>394,95</b>	<b>24,68</b>	<b>7,31</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>20,21</b>	<b>469,48</b>	<b>39,35</b>	<b>27,99</b>	<b>45,24</b>	<b>57,54</b>	<b>23,71</b>	

**Tabla 16.** Determinación de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca mediante microscopía electrónica analítica en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes al primer subcultivo. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

<b>N ° Célula</b>	<b>[Na]</b>	<b>[Mg]</b>	<b>[P]</b>	<b>[S]</b>	<b>[Cl]</b>	<b>[K]</b>	<b>[Ca]</b>
<b>Célula 1</b>	25,4313	12,16263	226,26765	58,2615	103,7309	239,43557	0
<b>Célula 2</b>	0	8,98977	172,9875	59,895	91,76195	228,66866	12,18275
<b>Célula 3</b>	13,56336	15,33549	246,3342	73,5075	71,8137	208,67297	0
<b>Célula 4</b>	19,49733	25,91169	212,42865	59,895	71,8137	208,67297	0
<b>Célula 5</b>	10,17252	13,22025	210,3528	72,963	86,97437	215,85091	11,69544
<b>Célula 6</b>	26,27901	13,74906	198,58965	61,5285	56,65303	139,45712	6,82234
<b>Célula 7</b>	9,32481	12,16263	290,619	51,183	96,54953	185,60102	8,77158
<b>Célula 8</b>	11,86794	8,46096	146,00145	60,984	52,66338	129,20292	3,89848
<b>Célula 9</b>	21,19275	14,80668	243,5664	63,7065	102,13504	211,23652	13,64468
<b>Célula 10</b>	20,34504	17,45073	219,34815	63,7065	125,27501	277,37611	9,25889
<b>Célula 11</b>	27,97443	15,33549	199,97355	56,628	47,8758	137,40628	12,18275
<b>Célula 12</b>	7,62939	12,69144	118,32345	74,052	59,84475	94,85135	2,92386
<b>Célula 13</b>	38,14695	15,8643	180,59895	88,209	71,01577	138,4317	10,23351
<b>Célula 14</b>	43,23321	13,22025	212,42865	86,031	86,17644	155,35113	4,8731
<b>Célula 15</b>	28,82214	10,04739	222,8079	69,1515	76,60128	201,49503	12,67006
<b>Célula 16</b>	41,53779	20,09478	248,41005	53,9055	71,01577	215,3382	0
<b>Célula 17</b>	21,19275	20,09478	247,02615	55,539	78,19714	137,91899	0
<b>Célula 18</b>	51,71031	24,85407	261,5571	95,832	72,61163	231,74492	4,38579
<b>Célula 19</b>	17,80191	13,74906	253,2537	57,1725	67,02612	161,50365	15,10661
<b>Célula 20</b>	22,88817	23,26764	217,2723	130,1355	87,7723	221,49072	11,69544
<b>Célula 21</b>	43,23321	21,68121	330,7521	20,1465	103,7309	338,3886	8,77158
<b>Célula 22</b>	11,02023	9,51858	178,5231	77,8635	80,59093	149,19861	11,69544
<b>Célula 23</b>	32,21298	17,97954	198,58965	71,3295	49,47166	139,96983	4,38579
<b>Célula 24</b>	18,64962	13,74906	132,16245	62,6175	47,07787	91,26238	5,36041
<b>Célula 25</b>	17,80191	8,98977	107,9442	65,8845	43,08822	87,67341	13,15737

**Tabla 17.** Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso fibroso en el primer subcultivo. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

	<b>[Na]</b>	<b>[Mg]</b>	<b>[P]</b>	<b>[S]</b>	<b>[Cl]</b>	<b>[K]</b>	<b>[Ca]</b>	<b>K/Na</b>
<b>Media</b>	<b>23,26</b>	<b>15,34</b>	<b>211,04</b>	<b>67,61</b>	<b>76,06</b>	<b>181,85</b>	<b>7,35</b>	<b>7,82</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>12,82</b>	<b>4,98</b>	<b>51,65</b>	<b>19,50</b>	<b>20,90</b>	<b>60,25</b>	<b>5,04</b>	

**Tabla 18.** Determinación de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca mediante microscopía electrónica analítica en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes al segundo subcultivo. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

<b>N ° Célula</b>	<b>[Na]</b>	<b>[Mg]</b>	<b>[P]</b>	<b>[S]</b>	<b>[Cl]</b>	<b>[K]</b>	<b>[Ca]</b>
<b>Célula 1</b>	55,10115	121,6263	180,59895	60,984	35,90685	14,35588	34,59901
<b>Célula 2</b>	33,06069	3,70167	168,8358	71,874	38,30064	7,69065	52,62948
<b>Célula 3</b>	44,92863	8,46096	147,38535	72,963	24,73583	14,35588	45,80714
<b>Célula 4</b>	13,56336	10,04739	175,06335	41,9265	31,9172	8,20336	66,76147
<b>Célula 5</b>	49,16718	8,46096	134,93025	74,052	39,09857	12,30504	42,88328

**Tabla 19.** Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso fibroso en el segundo subcultivo. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

	<b>[Na]</b>	<b>[Mg]</b>	<b>[P]</b>	<b>[S]</b>	<b>[Cl]</b>	<b>[K]</b>	<b>[Ca]</b>	<b>K/Na</b>
<b>Media</b>	<b>39,16</b>	<b>30,46</b>	<b>161,36</b>	<b>64,36</b>	<b>33,99</b>	<b>11,38</b>	<b>48,54</b>	<b>0,29</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>16,43</b>	<b>51,02</b>	<b>19,41</b>	<b>13,59</b>	<b>5,88</b>	<b>3,25</b>	<b>12,07</b>	

**Tabla 20.** Determinación de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca mediante microscopía electrónica analítica en células del tejido cartilaginoso hialino en cultivo primario. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

N ° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 1	117,83169	37,0167	281,62365	56,628	213,84524	315,82936	10,23351
Célula 2	99,18207	47,06409	265,01685	49,5495	199,4825	298,90993	11,20813
Célula 3	100,87749	30,14217	218,6562	82,2195	221,82454	227,13053	20,46702
Célula 4	63,57825	22,21002	230,41935	87,12	181,92804	263,53294	9,7462
Célula 5	130,54734	31,19979	220,73205	124,146	193,89699	353,25719	20,95433
Célula 6	97,48665	28,02693	267,0927	70,2405	186,71562	311,72768	7,30965
Célula 7	89,85726	23,79645	222,11595	65,8845	161,97979	264,04565	13,15737
Célula 8	81,38016	23,79645	234,57105	53,9055	143,6274	217,38904	4,8731
Célula 9	107,65917	29,61336	276,08805	51,7275	236,98521	317,36749	15,59392
Célula 10	82,22787	23,79645	298,9224	71,3295	239,379	349,15551	10,23351
Célula 11	157,67406	35,43027	324,52455	66,9735	273,68999	342,49028	4,8731
Célula 12	128,85192	35,43027	312,06945	87,6645	244,96451	299,93535	8,28427
Célula 13	94,94352	30,67098	231,1113	78,408	251,34795	327,62169	22,90357
Célula 14	84,771	26,96931	294,07875	96,3765	213,84524	209,69839	9,7462
Célula 15	71,20764	28,55574	193,05405	86,031	185,11976	359,40971	8,28427
Célula 16	78,83703	25,91169	229,7274	59,3505	190,70527	223,02885	3,89848
Célula 17	57,64428	28,55574	204,8172	60,4395	209,85559	362,48597	0
Célula 18	51,71031	26,96931	206,2011	68,0625	319,172	397,86296	1,94924
Célula 19	70,35993	26,4405	239,4147	60,4395	240,17693	305,57516	27,77667
Célula 20	75,44619	24,32526	271,2444	56,628	226,61212	326,59627	3,89848
Célula 21	69,51222	27,49812	223,49985	59,895	208,25973	312,24039	8,28427
Célula 22	83,07558	28,02693	276,78	54,9945	193,09906	299,42264	5,84772
Célula 23	79,68474	26,96931	229,7274	47,916	172,35288	293,78283	10,23351
Célula 24	51,71031	20,62359	153,6129	63,162	167,5653	287,63031	17,54316
Célula 25	83,07558	35,95908	180,59895	76,23	142,82947	365,04952	24,85281

**Tabla 21.** Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso hialino en cultivo primario. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	88,37	29,00	243,43	69,41	208,77	305,25	11,29	3,45
Desviación Estándar	25,47	5,71	42,12	17,44	40,43	49,57	7,41	

**Tabla 22.** Determinación de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca mediante microscopía electrónica analítica en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes al primer subcultivo. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

N ° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 1	184,80078	15,8643	304,458	99,6435	490,72695	450,15938	41,42135
Célula 2	185,64849	19,56597	299,61435	75,6855	362,26022	433,23995	38,49749
Célula 3	177,17139	16,39311	296,1546	90,9315	351,88713	409,65529	43,8579
Célula 4	139,02444	12,69144	238,72275	78,408	330,34302	428,11285	51,16755
Célula 5	170,38971	16,39311	232,4952	121,968	289,64859	300,96077	49,70562
Célula 6	310,26186	13,74906	304,458	79,497	501,10004	280,96508	40,44673
Célula 7	264,48552	15,8643	306,53385	81,675	533,01724	315,82936	51,16755
Célula 8	261,94239	16,39311	285,0834	87,6645	471,57663	301,98619	48,731
Célula 9	286,52598	24,32526	269,16855	129,591	490,72695	294,29554	47,26907
Célula 10	141,56757	19,03716	286,4673	78,9525	311,1927	426,06201	44,83252
Célula 11	194,12559	18,50835	336,2877	64,7955	400,56086	411,19342	59,45182
Célula 12	173,78055	20,62359	382,64835	73,5075	387,79398	518,34981	58,96451
Célula 13	167,84658	20,09478	357,0462	84,942	371,03745	435,29079	35,57363
Célula 14	179,71452	24,85407	294,7707	81,1305	343,90783	449,64667	45,80714
Célula 15	221,25231	24,85407	372,96105	60,984	399,76293	472,20591	44,34521
Célula 16	158,52177	19,56597	343,2072	77,319	393,37949	420,93491	31,18784
Célula 17	267,02865	21,1524	295,46265	118,1565	522,64415	358,38429	36,54825
Célula 18	275,50575	21,68121	303,76605	107,2665	603,23508	367,61307	48,731
Célula 19	222,94773	12,16263	256,71345	96,3765	454,8201	345,05383	48,731
Célula 20	167,84658	24,85407	320,37285	60,984	286,45687	363,51139	57,01527
Célula 21	183,10536	19,03716	367,42545	70,785	382,20847	496,81599	41,90866
Célula 22	185,64849	17,45073	346,66695	63,7065	390,9857	373,25288	56,04065
Célula 23	185,64849	17,45073	346,66695	63,7065	390,9857	373,25288	56,04065
Célula 24	258,55155	20,62359	345,28305	52,272	423,70083	238,41015	41,42135
Célula 25	177,17139	22,21002	320,37285	72,963	326,35337	329,67253	47,75638

**Tabla 23.** Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso hialino en el primer subcultivo. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	205,62	19,02	312,51	82,92	408,41	383,79	46,66	1,87
Desviación Estándar	48,54	3,65	39,88	19,93	81,46	71,57	7,44	

**Tabla 24.** Determinación de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca mediante microscopía electrónica analítica en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes al segundo subcultivo. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

N ° Célula	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Célula 1	51,71031	14,27787	136,31415	53,9055	42,29029	42,04222	120,36557
Célula 2	72,05535	10,04739	127,3188	40,8375	19,94825	36,40241	101,36048
Célula 3	43,23321	7,93215	138,39	42,471	19,94825	37,94054	101,84779
Célula 4	38,14695	8,98977	134,2383	43,0155	28,72548	34,35157	106,72089
Célula 5	31,36527	10,04739	131,4705	46,827	21,54411	54,34726	133,03563
Célula 6	56,79657	18,50835	110,712	56,0835	32,71513	44,60577	100,87317
Célula 7	50,8626	14,80668	119,70735	50,094	30,32134	33,32615	89,17773
Célula 8	53,40573	9,51858	214,5045	44,1045	27,12962	22,55924	115,49247
Célula 9	75,44619	19,56597	202,74135	39,7485	37,50271	46,65661	117,44171
Célula 10	70,35993	6,34572	110,02005	57,717	43,88615	56,3981	106,23358
Célula 11	67,8168	17,45073	161,9163	36,4815	36,70478	45,63119	121,8275
Célula 12	83,07558	20,62359	170,91165	34,3035	29,52341	45,63119	116,46709
Célula 13	66,12138	14,80668	202,74135	32,67	19,15032	37,94054	153,98996
Célula 14	154,28322	26,4405	364,65765	47,916	39,09857	52,29642	275,81746
Célula 15	78,83703	11,10501	143,9256	59,3505	47,07787	57,42352	120,36557
Célula 16	100,02978	13,74906	142,5417	48,4605	43,08822	49,73287	164,22347
Célula 17	103,42062	22,73883	127,3188	62,6175	63,03647	40,50409	113,05592
Célula 18	105,11604	8,98977	136,31415	53,361	31,11927	52,80913	132,06101
Célula 19	81,38016	8,46096	169,52775	44,1045	38,30064	45,63119	89,66504
Célula 20	78,83703	8,98977	175,7553	41,382	19,15032	38,45325	95,02545
Célula 21	112,74543	11,63382	166,068	51,183	45,48201	31,27531	107,2082
Célula 22	91,55268	5,2881	124,551	50,6385	47,07787	36,40241	84,30463
Célula 23	120,37482	10,5762	186,13455	51,183	27,12962	45,63119	117,92902
Célula 24	94,09581	14,27787	123,85905	72,963	58,24889	47,16932	96,48738

**Tabla 25.** Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso hialino en el segundo subcultivo. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	78,38	13,13	159,23	48,39	35,34	43,13	120,04	0,55
Desviación Estándar	28,72	5,42	52,98	9,38	12,04	8,58	38,27	

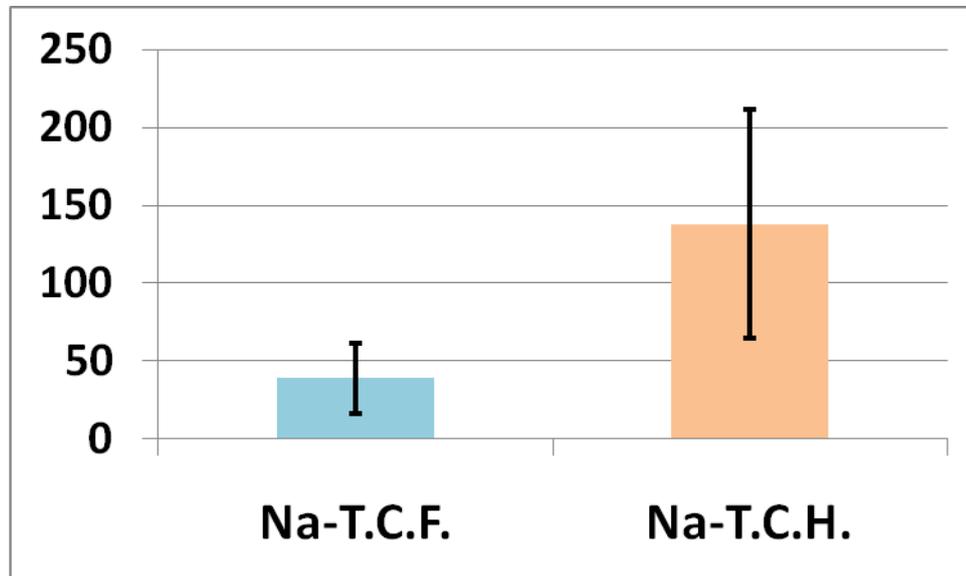
**Tabla 26.** Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso fibroso en el conjunto de los tres subcultivos analizados en esta Tesis Doctoral. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
<b>Media</b>	<b>38,69</b>	<b>67,41</b>	<b>244,33</b>	<b>74,61</b>	<b>126,06</b>	<b>263,22</b>	<b>18,97</b>	<b>6,80</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>22,22</b>	<b>318,09</b>	<b>64,84</b>	<b>24,52</b>	<b>72,22</b>	<b>141,62</b>	<b>20,75</b>	

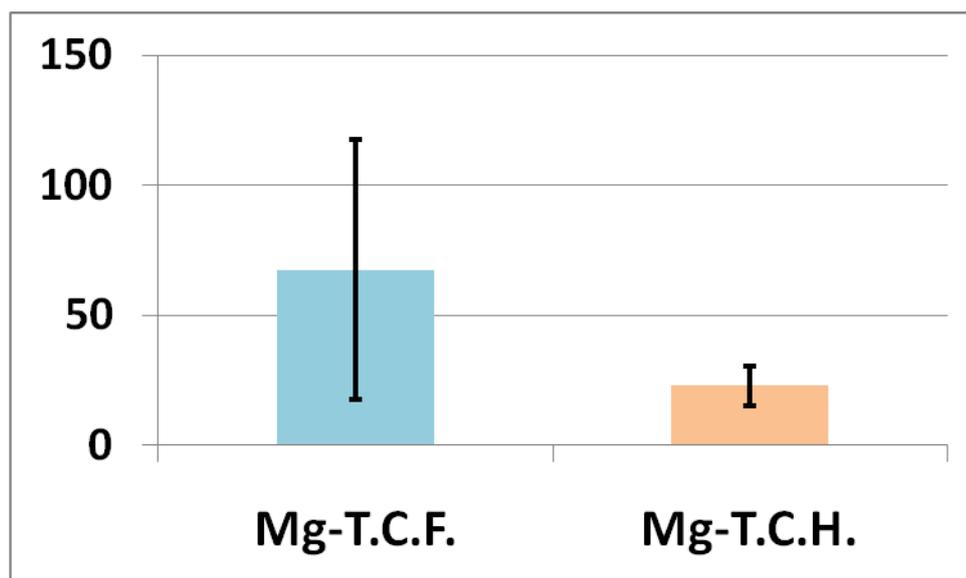
**Tabla 27.** Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en células del tejido cartilaginoso hialino en el conjunto de los tres subcultivos analizados en esta Tesis Doctoral. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco.

	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
<b>Media</b>	<b>124,74</b>	<b>20,48</b>	<b>239,46</b>	<b>67,16</b>	<b>219,97</b>	<b>246,77</b>	<b>58,51</b>	<b>1,98</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>68,18</b>	<b>8,23</b>	<b>77,07</b>	<b>21,47</b>	<b>161,79</b>	<b>154,11</b>	<b>50,54</b>	

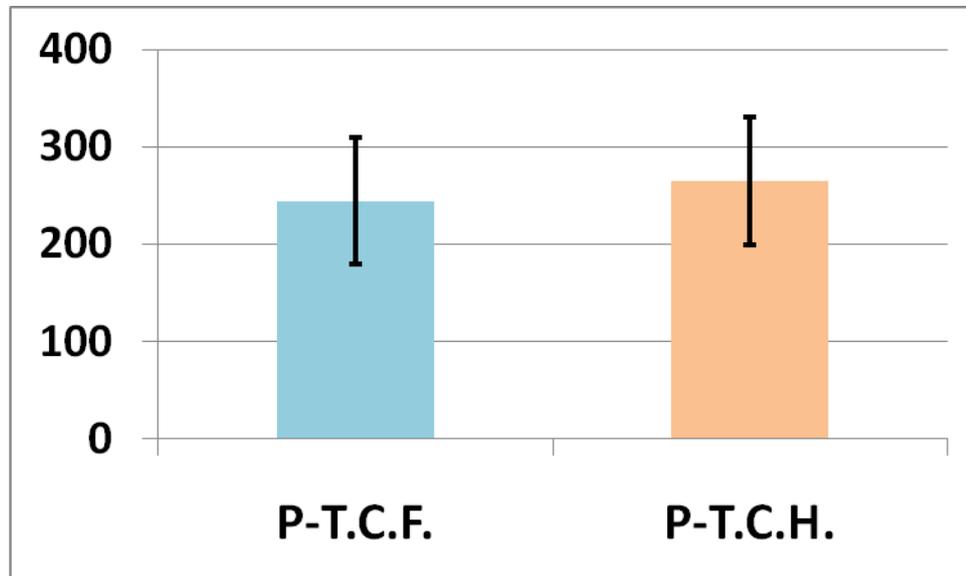
**Figura 25.** Histograma en el que se representan los valores medios de sodio en células del tejido cartilaginoso fibroso (T.C.F.) y del tejido cartilaginoso hialino (T.C.H.). Las barras de error representan valores de desviación estándar.



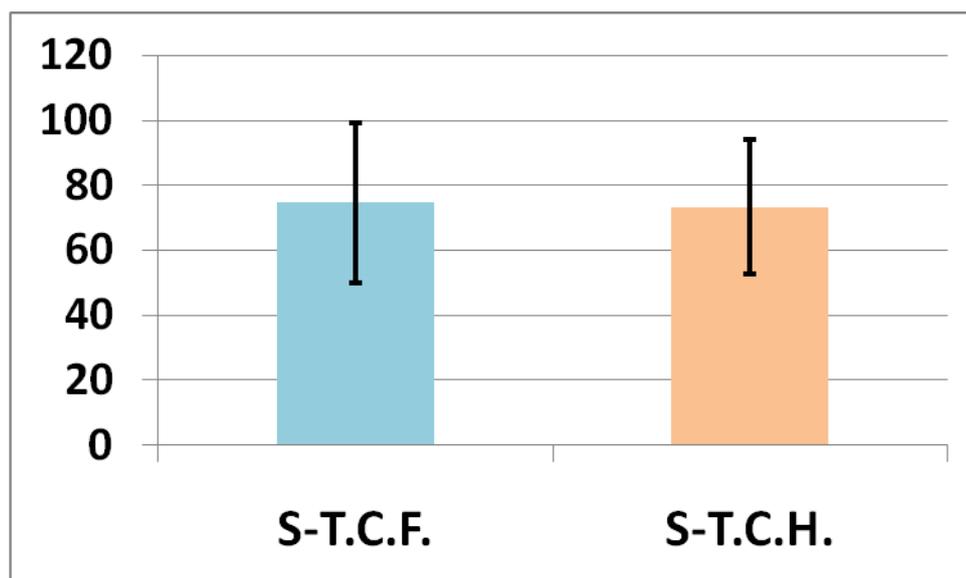
**Figura 26.** Histograma en el que se representan los valores medios de magnesio en células del tejido cartilaginoso fibroso (T.C.F.) y del tejido cartilaginoso hialino (T.C.H.). Las barras de error representan valores de desviación estándar.



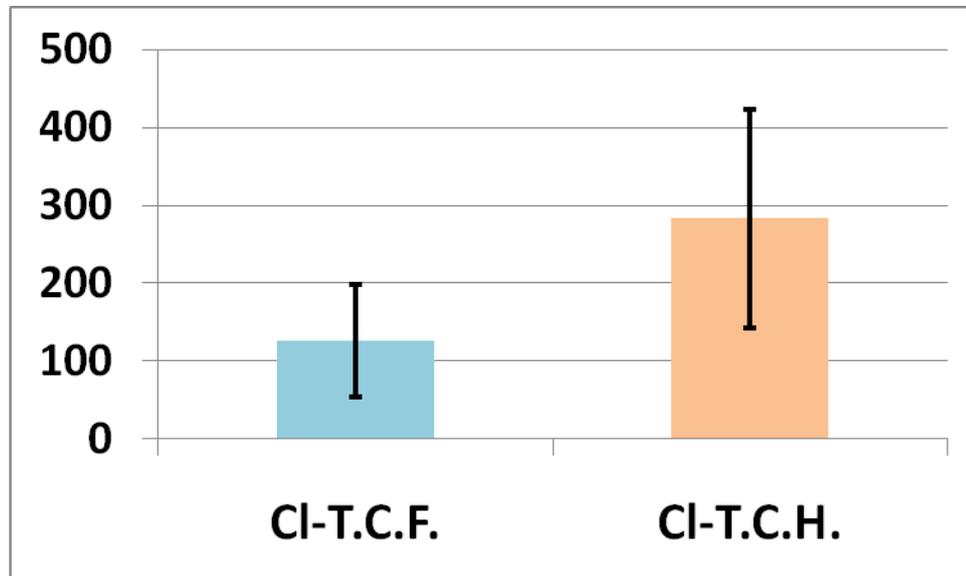
**Figura 27.** Histograma en el que se representan los valores medios de fósforo en células del tejido cartilaginoso fibroso (T.C.F.) y del tejido cartilaginoso hialino (T.C.H.). Las barras de error representan valores de desviación estándar.



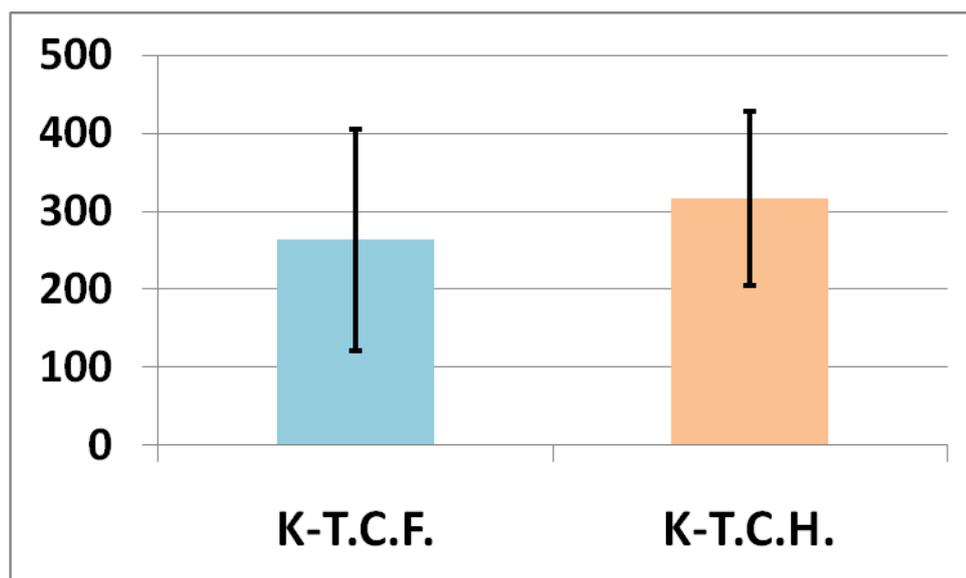
**Figura 28.** Histograma en el que se representan los valores medios de azufre en células del tejido cartilaginoso fibroso (T.C.F.) y del tejido cartilaginoso hialino (T.C.H.). Las barras de error representan valores de desviación estándar.



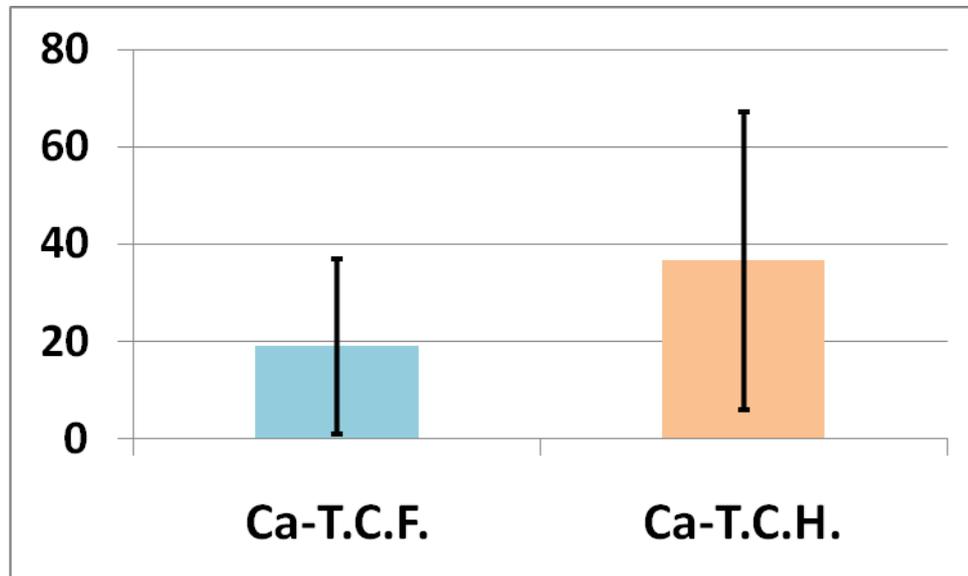
**Figura 29.** Histograma en el que se representan los valores medios de cloro en células del tejido cartilaginoso fibroso (T.C.F.) y del tejido cartilaginoso hialino (T.C.H.). Las barras de error representan valores de desviación estándar.



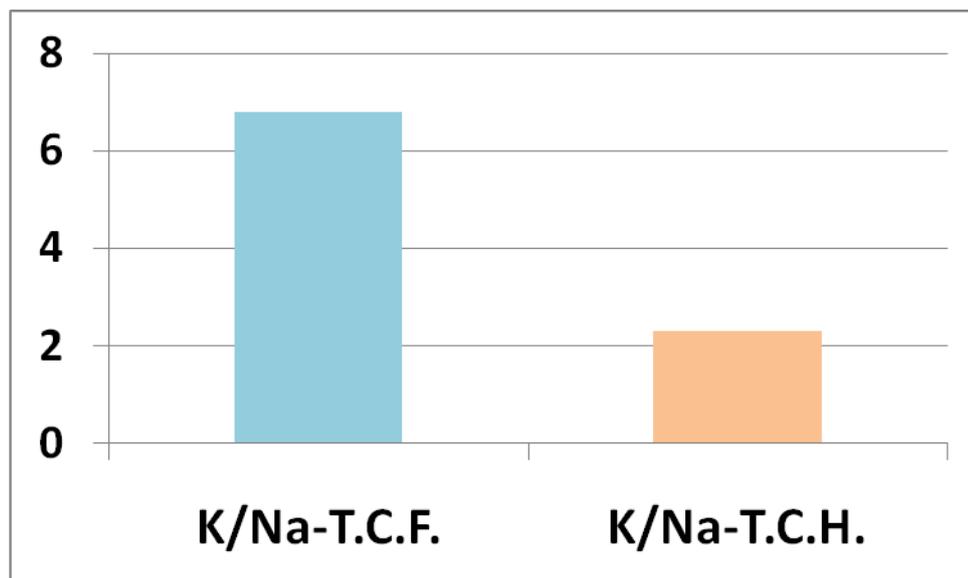
**Figura 30.** Histograma en el que se representan los valores medios de potasio en células del tejido cartilaginoso fibroso (T.C.F.) y del tejido cartilaginoso hialino (T.C.H.). Las barras de error representan valores de desviación estándar.



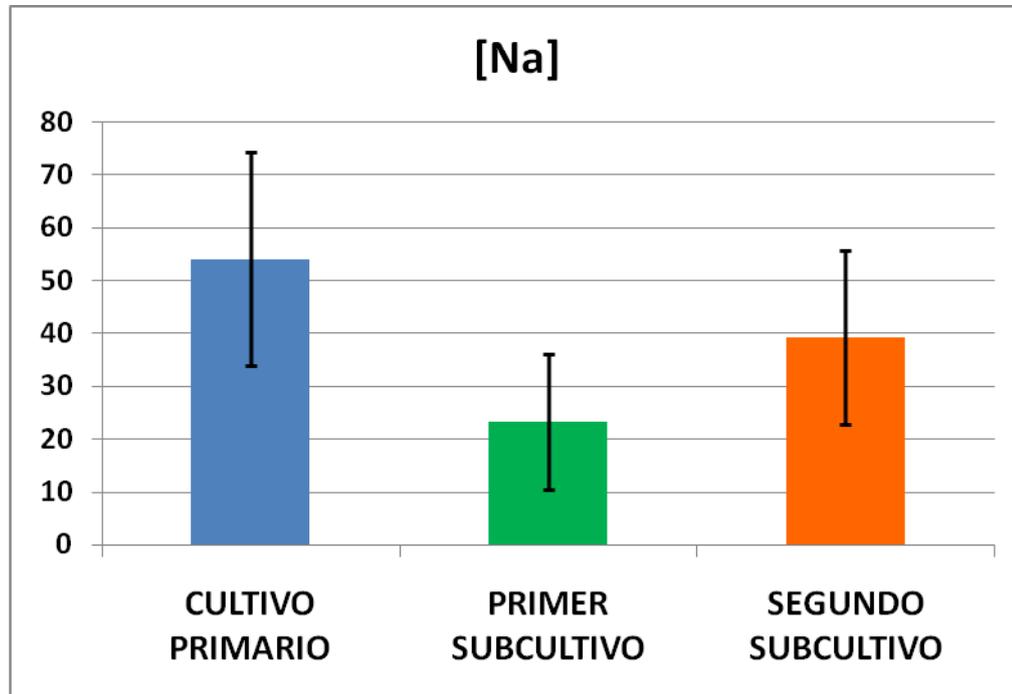
**Figura 31.** Histograma en el que se representan los valores medios de calcio en células del tejido cartilaginoso fibroso (T.C.F.) y del tejido cartilaginoso hialino (T.C.H.). Las barras de error representan valores de desviación estándar.



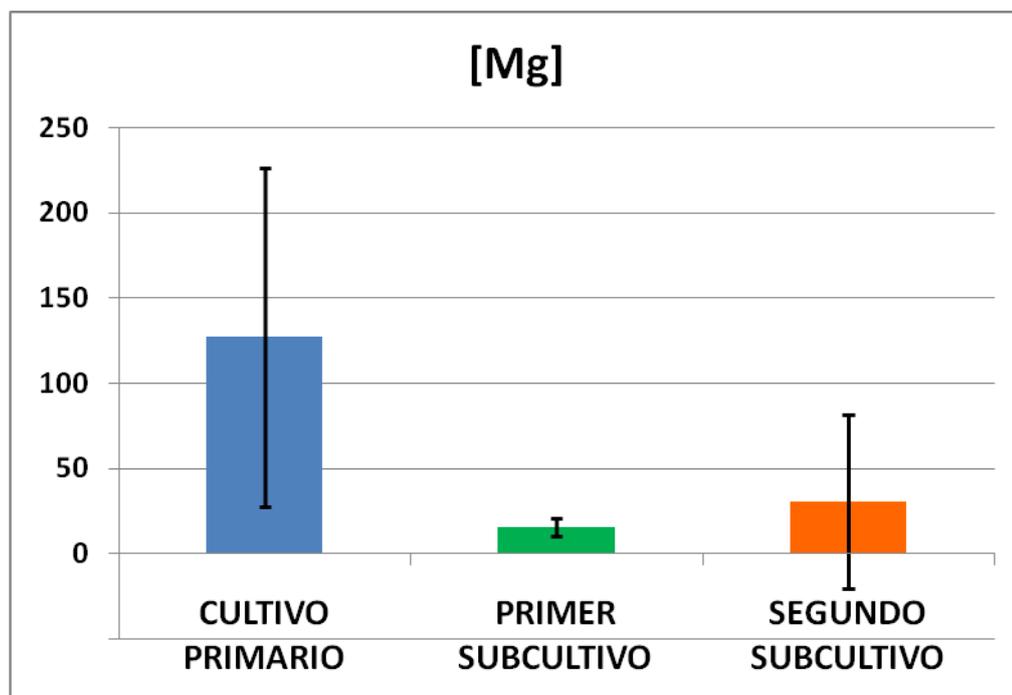
**Figura 32.** Índices potasio-sodio para las células del tejido cartilaginoso fibroso (T.C.F.) y del tejido cartilaginoso hialino (T.C.H.).



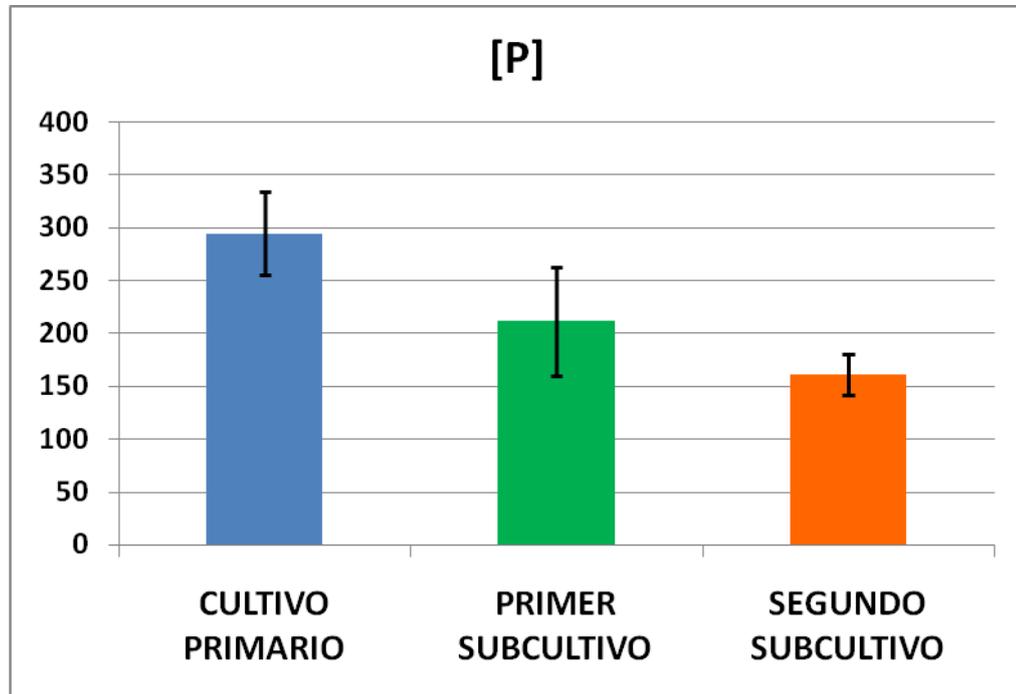
**Figura 33.** Histograma en el que se representan los valores medios de sodio en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



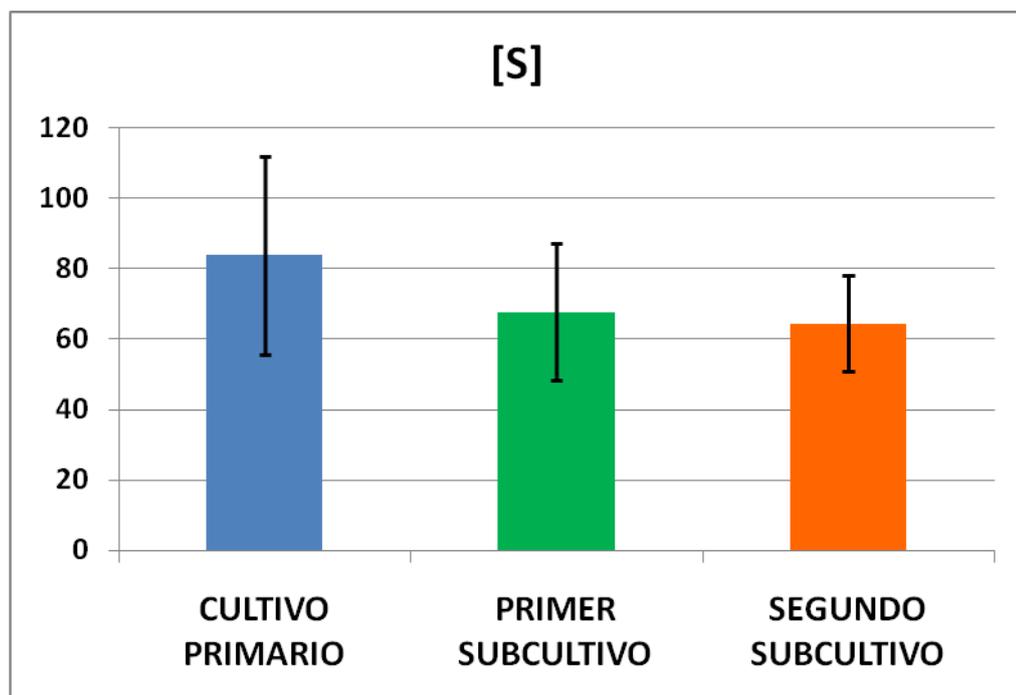
**Figura 34.** Histograma en el que se representan los valores medios de magnesio en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



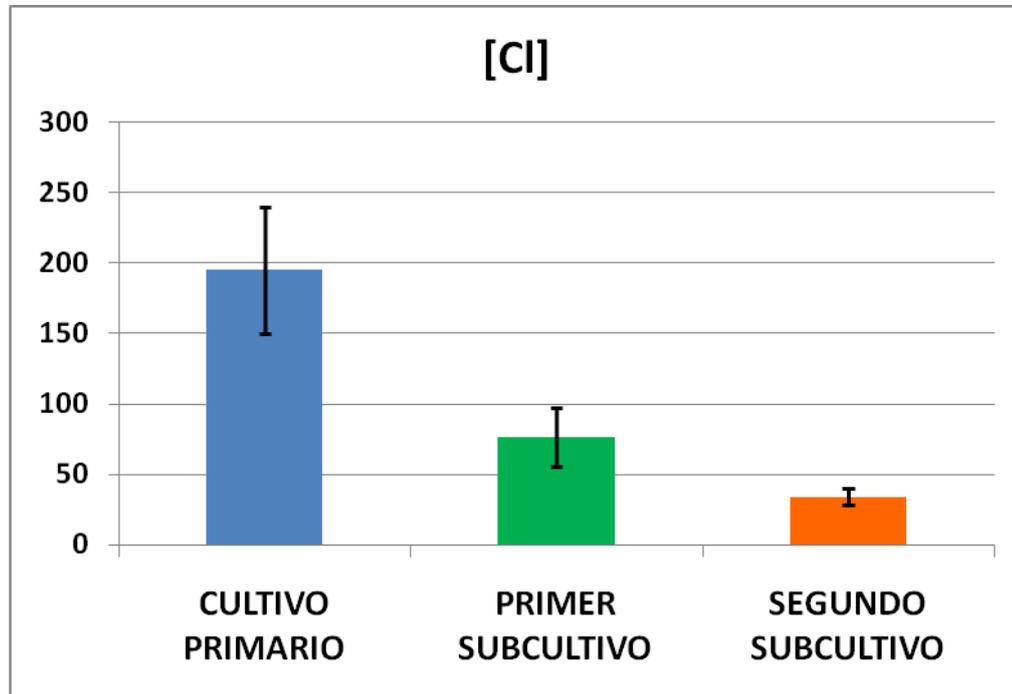
**Figura 35.** Histograma en el que se representan los valores medios de fósforo en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



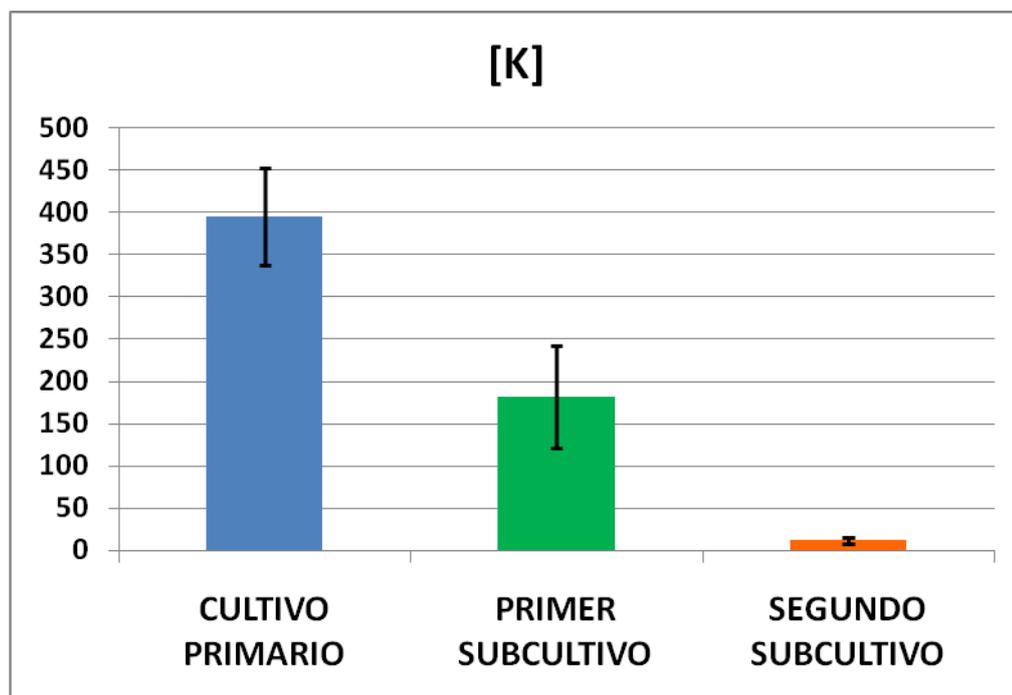
**Figura 36.** Histograma en el que se representan los valores medios de azufre en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



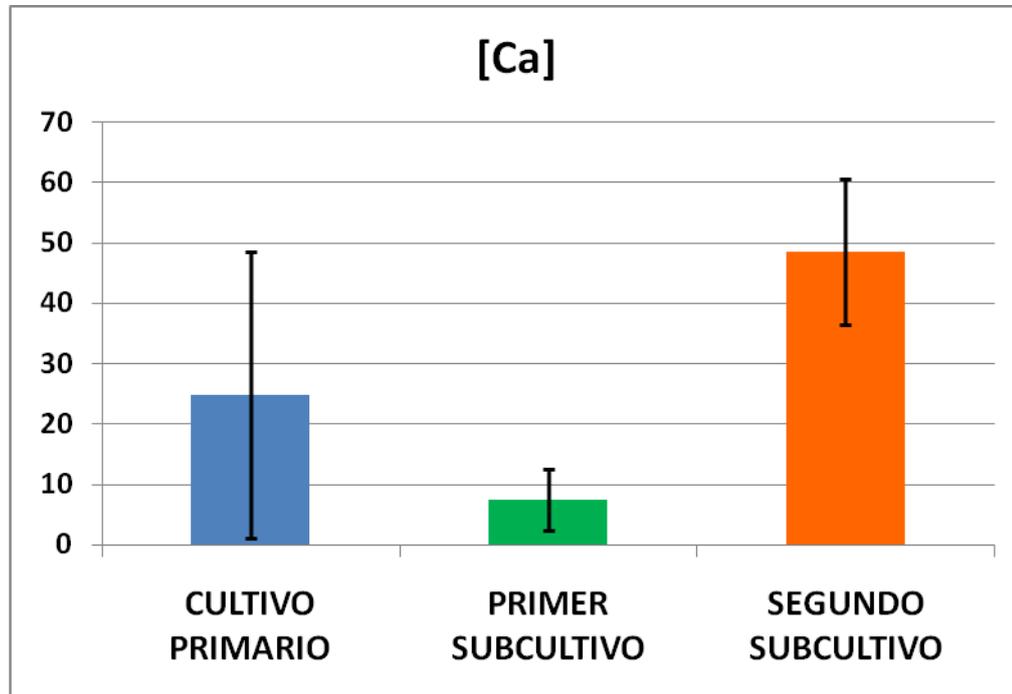
**Figura 37.** Histograma en el que se representan los valores medios de cloro en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



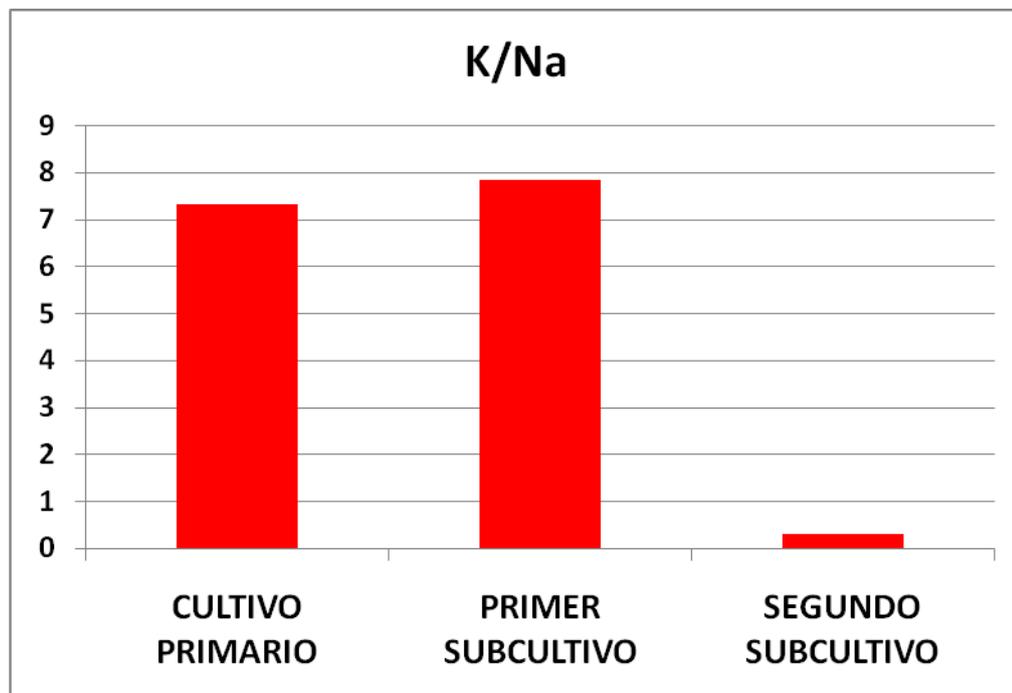
**Figura 38.** Histograma en el que se representan los valores medios de potasio en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



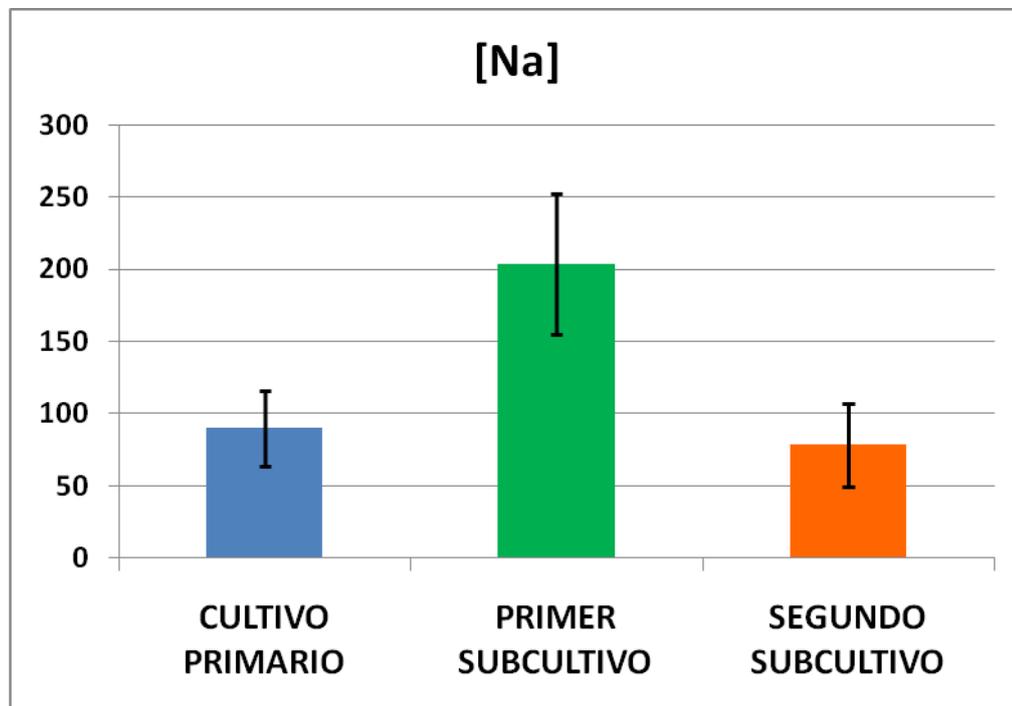
**Figura 39.** Histograma en el que se representan los valores medios de calcio en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



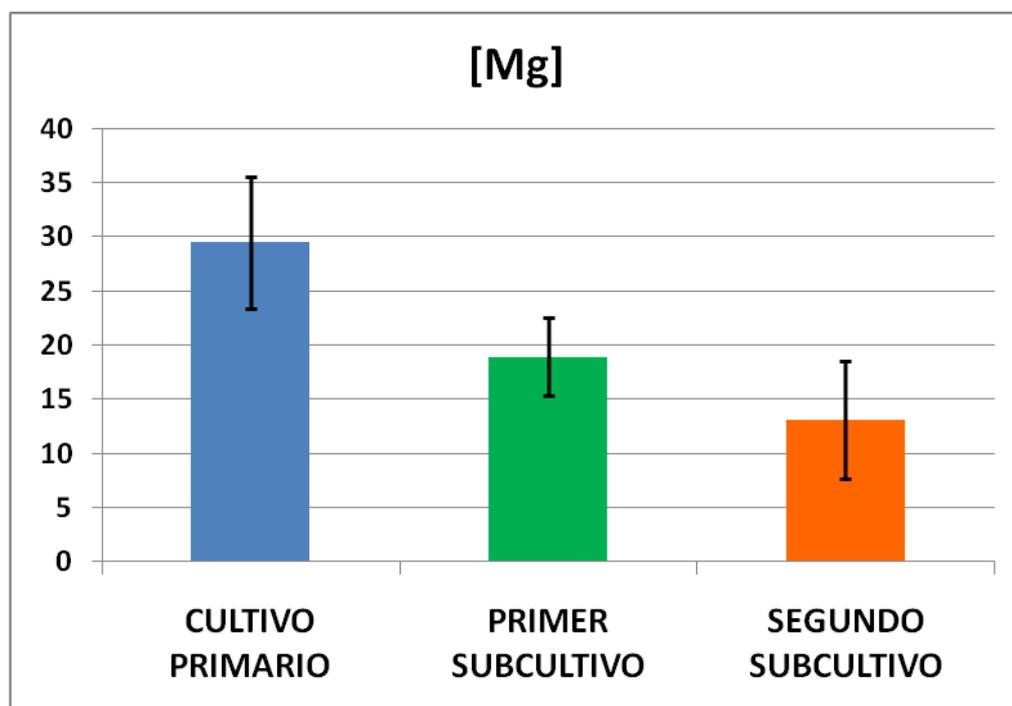
**Figura 40.** Histograma en el que se representan los valores medios para el índice potasio/sodio en células del tejido cartilaginoso fibroso correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo.



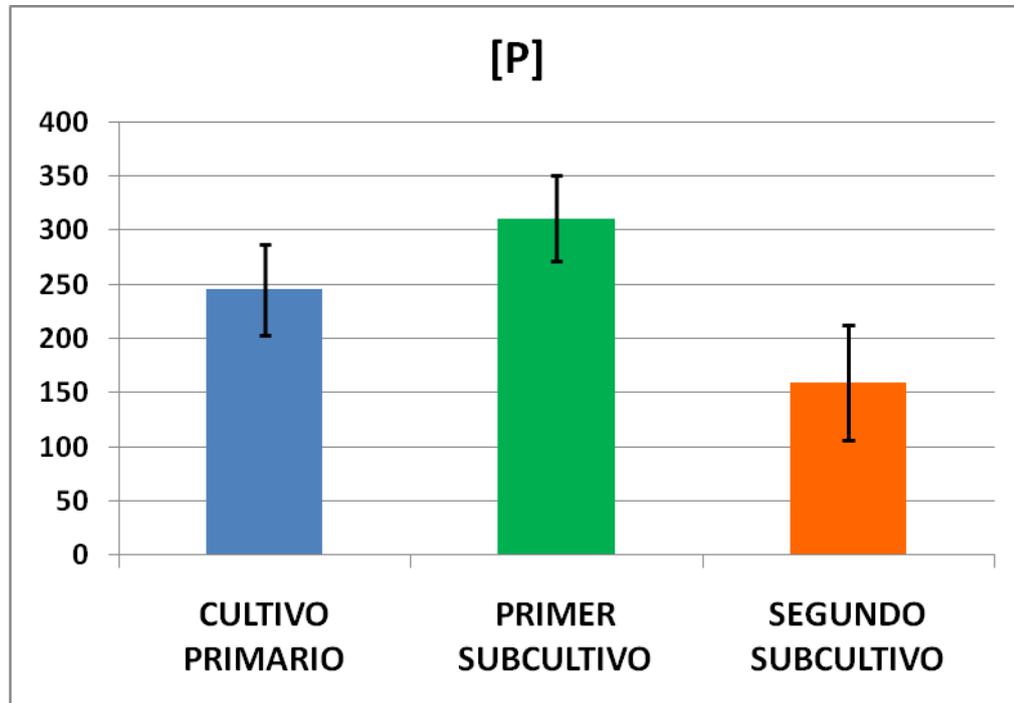
**Figura 41.** Histograma en el que se representan los valores medios de sodio en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



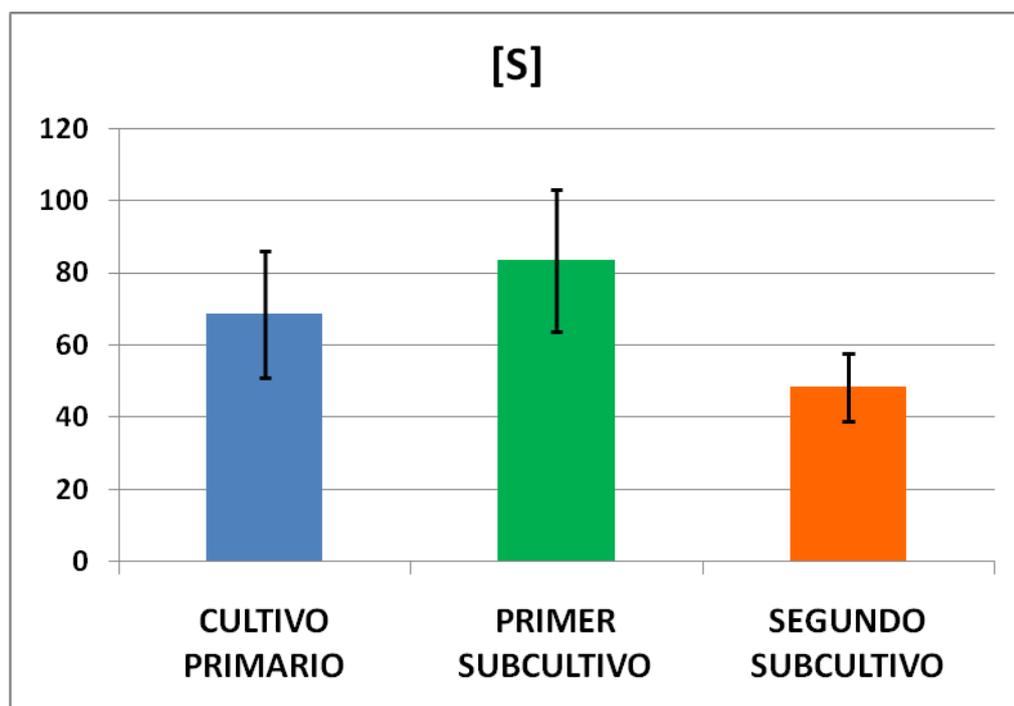
**Figura 42.** Histograma en el que se representan los valores medios de magnesio en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



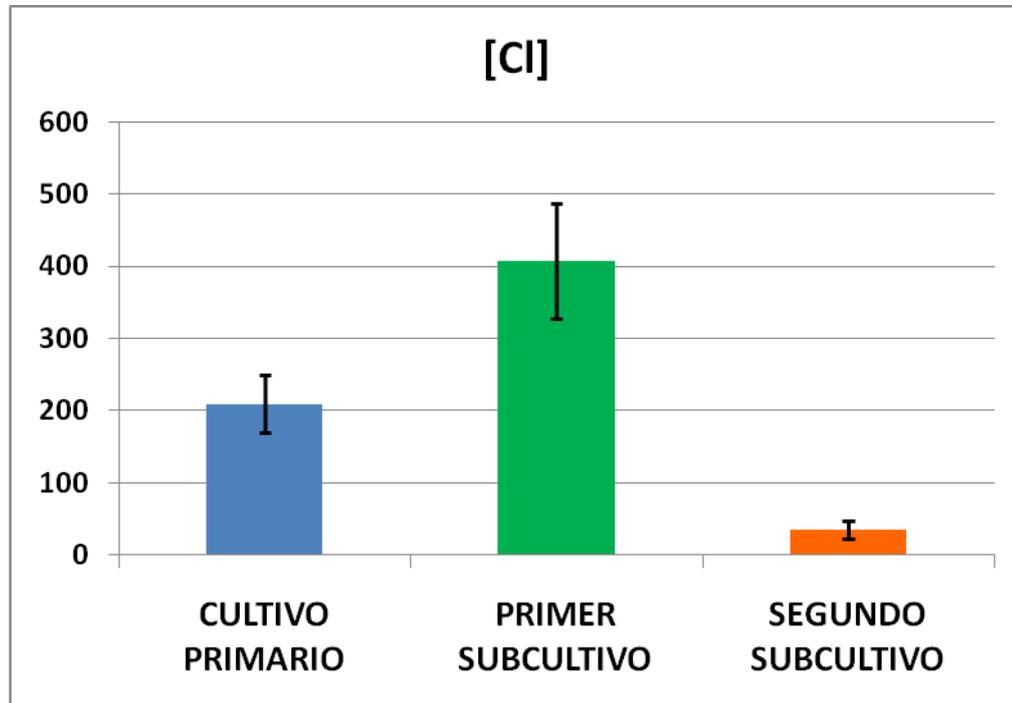
**Figura 43.** Histograma en el que se representan los valores medios de fósforo en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



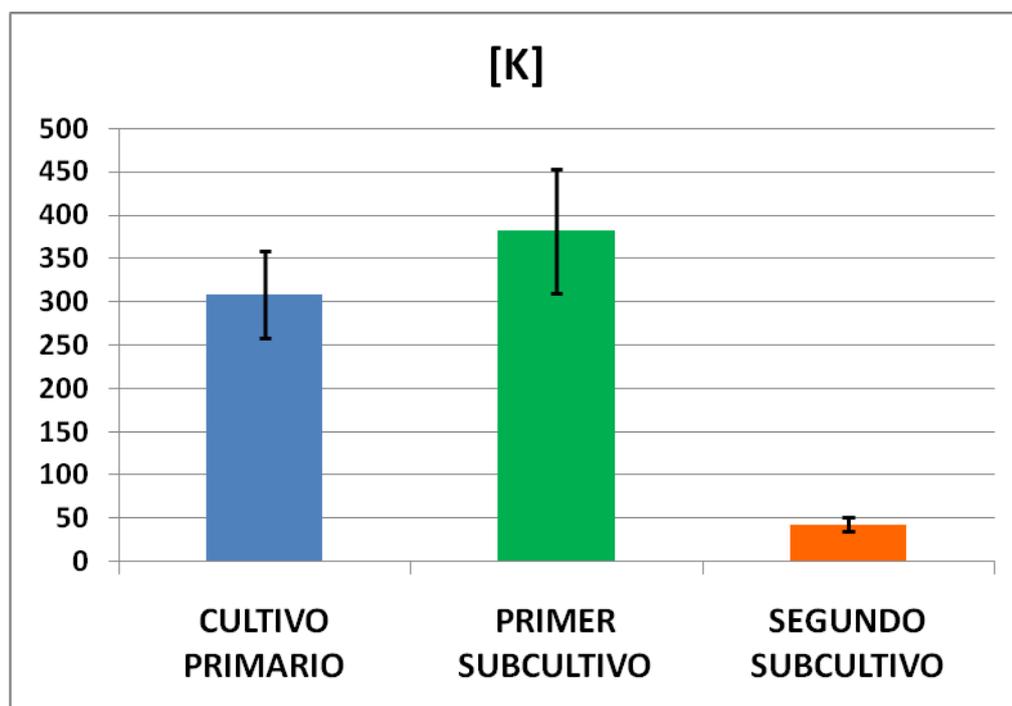
**Figura 44.** Histograma en el que se representan los valores medios de azufre en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



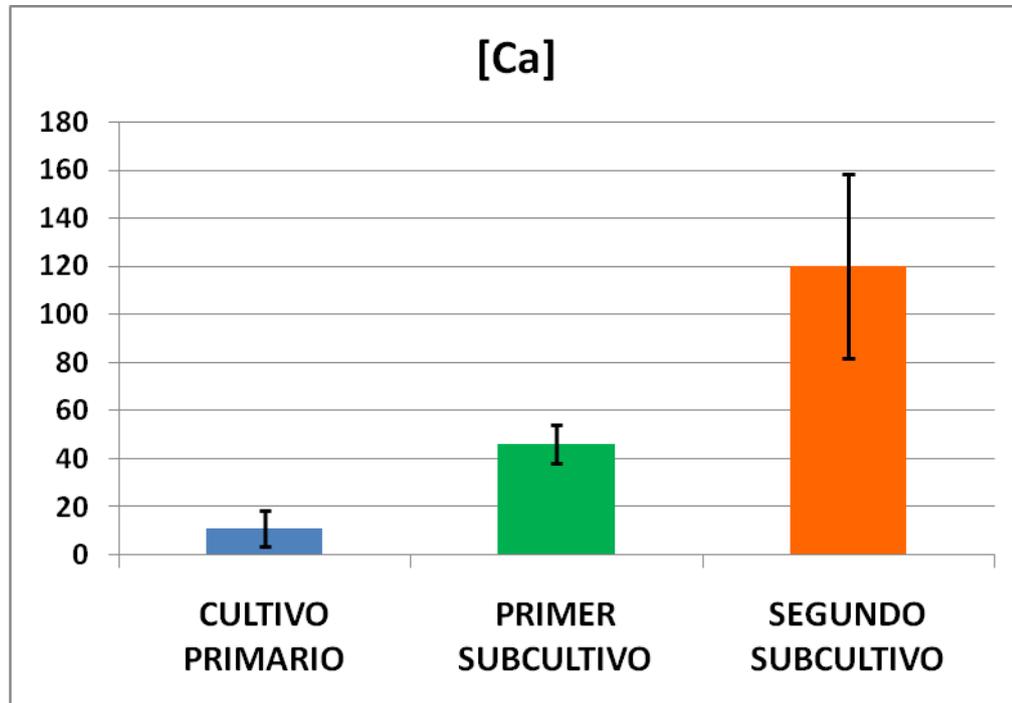
**Figura 45.** Histograma en el que se representan los valores medios de cloro en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



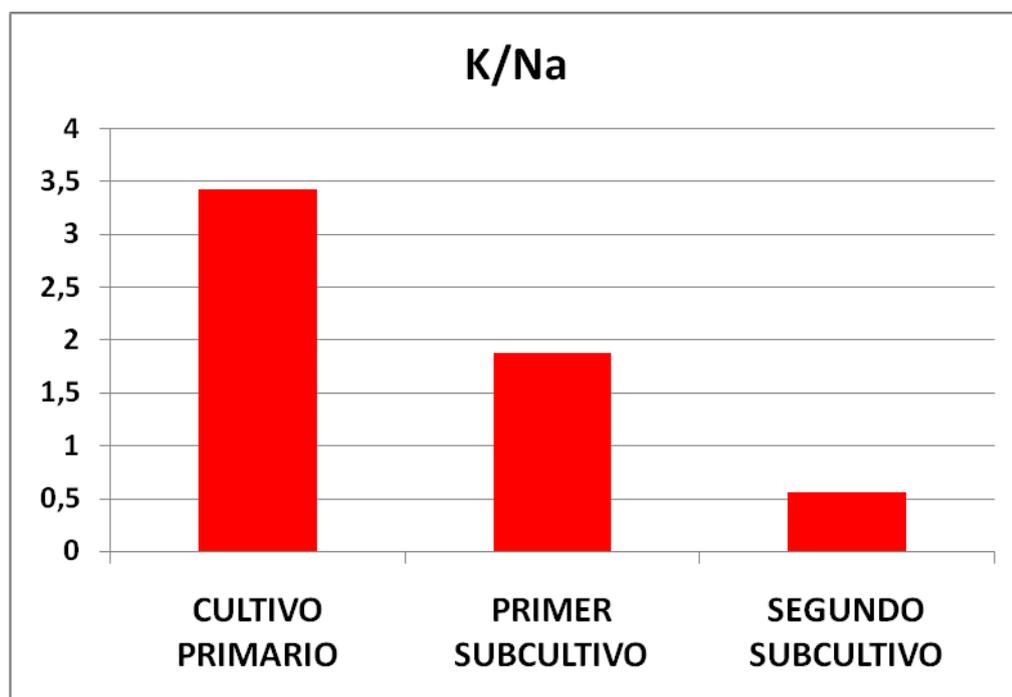
**Figura 46.** Histograma en el que se representan los valores medios de potasio en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



**Figura 47.** Histograma en el que se representan los valores medios de calcio en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo. Las barras de error representan valores de desviación estándar.



**Figura 48.** Histograma en el que se representan los valores medios para el índice potasio/sodio en células del tejido cartilaginoso hialino correspondientes a los tres primeros pases celulares en cultivo.



**Tabla 28.** Comparación estadística de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca entre todas las células pertenecientes al tejido cartilaginoso fibroso y todas las células del tejido cartilaginoso hialino, independientemente del pase celular al que éstas pertenezcan, utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para cada elemento, se muestran los valores U, W y Z de la prueba estadística, así como el valor de significación p (en negrita). Los valores que resultaron estadísticamente significativos se señalan en amarillo.

	<b>Na</b>	<b>Mg</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>Cl</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>
<b>U de Mann-Whitney</b>	259,5	1836,5	1973,5	1580	1480,5	1931	980
<b>W de Wilcoxon</b>	1799,5	4611,5	4748,5	4355	3020,5	4706	2520
<b>Z</b>	-8,45616	-0,94557	-0,29289	-2,16711	-2,64081	-0,49529	-5,02514
<b>Valor de significación p</b>	<b>2,76E-17</b>	<b>0,3443</b>	<b>0,7696</b>	<b>0,0302</b>	<b>0,0082</b>	<b>0,6203</b>	<b>5,03E-07</b>

**Tabla 29.** Comparación estadística global de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en las células del tejido cartilaginoso hialino pertenecientes a los tres pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral. Para identificar diferencias globales entre los tres pases celulares, se utilizaron las pruebas estadísticas de Friedman y W de Kendall. Los valores que se presentan en esta tabla corresponden a valores p de significación para cada prueba estadística, señalándose en amarillo aquéllos que resultaron estadísticamente significativos.

	<b>FRIEDMAN</b>	<b>W KENDALL</b>
<b>Na</b>	<b>7,81E-18</b>	<b>7,81E-18</b>
<b>Mg</b>	<b>7,81E-18</b>	<b>7,81E-18</b>
<b>P</b>	<b>7,81E-18</b>	<b>7,81E-18</b>
<b>S</b>	<b>7,81E-18</b>	<b>7,81E-18</b>
<b>Cl</b>	<b>7,81E-18</b>	<b>7,81E-18</b>
<b>K</b>	<b>7,81E-18</b>	<b>7,81E-18</b>
<b>Ca</b>	<b>5,77E-17</b>	<b>5,77E-17</b>

**Tabla 30.** Comparación estadística global de los contenidos intracelulares de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en las células del tejido cartilaginoso fibroso pertenecientes a los tres pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral. Para identificar diferencias globales entre los tres pases celulares, se utilizaron las pruebas estadísticas de Friedman y W de Kendall. Los valores que se presentan en esta tabla corresponden a valores p de significación para cada prueba estadística, señalándose en amarillo aquéllos que resultaron estadísticamente significativos.

	FRIEDMAN	W KENDALL
Na	8,90E-13	8,90E-13
Mg	1,21E-13	1,21E-13
P	1,21E-13	1,21E-13
S	1,21E-13	1,21E-13
Cl	1,21E-13	1,21E-13
K	1,21E-13	1,21E-13
Ca	6,71E-09	6,71E-09

**Tabla 31.** Valores de significación estadística  $p$  para las comparaciones de los niveles intracelulares de sodio entre dos subcultivos distintos de células del mismo tipo de tejido (tejido cartilaginoso fibroso -T.C.F.- o tejido cartilaginoso hialino -T.C.H.-) y para las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a tejidos distintos (cultivo primario, primer subcultivo o segundo subcultivo de T.C.F. frente a T.C.H.). Las comparaciones de entre dos subcultivos del mismo tipo de células se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a distintos tipos de células se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores estadísticamente significativos se señalan en amarillo. (1) cultivo primario; (2) primer subcultivo; (3) segundo subcultivo.

Na	T.C.F. 1	T.C.F. 2	T.C.F. 3	T.C.H. 1	T.C.H. 2	T.C.H. 3
T.C.F. 1	-	3,61E-05	0,1380	9,23E-06		
T.C.F. 2	3,61E-05	-	0,0796		1,32E-09	
T.C.F. 3	0,1380	0,0796	-			0,0067
T.C.H. 1	9,23E-06			-	1,23E-05	0,3835
T.C.H. 2		1,32E-09		1,23E-05	-	1,82E-05
T.C.H. 3			0,0067	0,3835	1,82E-05	-

**Tabla 32.** Valores de significación estadística  $p$  para las comparaciones de los niveles intracelulares de magnesio entre dos subcultivos distintos de células del mismo tipo de tejido (tejido cartilaginoso fibroso -T.C.F.- o tejido cartilaginoso hialino -T.C.H.-) y para las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a tejidos distintos (cultivo primario, primer subcultivo o segundo subcultivo de T.C.F. frente a T.C.H.). Las comparaciones de entre dos subcultivos del mismo tipo de células se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a distintos tipos de células se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores estadísticamente significativos se señalan en amarillo. (1) cultivo primario; (2) primer subcultivo; (3) segundo subcultivo.

Mg	T.C.F. 1	T.C.F. 2	T.C.F. 3	T.C.H. 1	T.C.H. 2	T.C.H. 3
T.C.F. 1	-	1,38E-05	0,5002	0,1425		
T.C.F. 2	1,38E-05	-	0,5002		0,0044	
T.C.F. 3	0,5002	0,5002	-			0,2474
T.C.H. 1	0,1425			-	2,05E-05	1,80E-05
T.C.H. 2		0,0044		2,05E-05	-	0,0002
T.C.H. 3			0,2474	1,80E-05	0,0002	-

**Tabla 33.** Valores de significación estadística  $p$  para las comparaciones de los niveles intracelulares de fósforo entre dos subcultivos distintos de células del mismo tipo de tejido (tejido cartilaginoso fibroso -T.C.F.- o tejido cartilaginoso hialino -T.C.H.-) y para las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a tejidos distintos (cultivo primario, primer subcultivo o segundo subcultivo de T.C.F. frente a T.C.H.). Las comparaciones de entre dos subcultivos del mismo tipo de células se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a distintos tipos de células se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores estadísticamente significativos se señalan en amarillo. (1) cultivo primario; (2) primer subcultivo; (3) segundo subcultivo.

P	T.C.F. 1	T.C.F. 2	T.C.F. 3	T.C.H. 1	T.C.H. 2	T.C.H. 3
T.C.F. 1	-	0,0001	0,0431	0,0001		
T.C.F. 2	0,0001	-	0,0431		7,24E-08	
T.C.F. 3	0,0431	0,0431	-			0,3554
T.C.H. 1	0,0001			-	3,22E-05	0,0001
T.C.H. 2		7,24E-08		3,22E-05	-	2,35E-05
T.C.H. 3			0,3554	0,0001	2,35E-05	-

**Tabla 34.** Valores de significación estadística  $p$  para las comparaciones de los niveles intracelulares de azufre entre dos subcultivos distintos de células del mismo tipo de tejido (tejido cartilaginoso fibroso -T.C.F.- o tejido cartilaginoso hialino -T.C.H.-) y para las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a tejidos distintos (cultivo primario, primer subcultivo o segundo subcultivo de T.C.F. frente a T.C.H.). Las comparaciones de entre dos subcultivos del mismo tipo de células se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a distintos tipos de células se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores estadísticamente significativos se señalan en amarillo. (1) cultivo primario; (2) primer subcultivo; (3) segundo subcultivo.

S	T.C.F. 1	T.C.F. 2	T.C.F. 3	T.C.H. 1	T.C.H. 2	T.C.H. 3
T.C.F. 1	-	0,0383	0,1380	0,0189		
T.C.F. 2	0,0383	-	0,6858		0,0025	
T.C.F. 3	0,1380	0,6858	-			0,0262
T.C.H. 1	0,0189			-	0,0143	0,0001
T.C.H. 2		0,0025		0,0143	-	3,87E-05
T.C.H. 3			0,0262	0,0001	3,87E-05	-

**Tabla 35.** Valores de significación estadística  $p$  para las comparaciones de los niveles intracelulares de cloro entre dos subcultivos distintos de células del mismo tipo de tejido (tejido cartilaginoso fibroso -T.C.F.- o tejido cartilaginoso hialino -T.C.H.-) y para las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a tejidos distintos (cultivo primario, primer subcultivo o segundo subcultivo de T.C.F. frente a T.C.H.). Las comparaciones de entre dos subcultivos del mismo tipo de células se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a distintos tipos de células se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores estadísticamente significativos se señalan en amarillo. (1) cultivo primario; (2) primer subcultivo; (3) segundo subcultivo.

Cl	T.C.F. 1	T.C.F. 2	T.C.F. 3	T.C.H. 1	T.C.H. 2	T.C.H. 3
T.C.F. 1	-	1,22E-05	0,0431	0,1229		
T.C.F. 2	1,22E-05	-	0,0431		1,33E-09	
T.C.F. 3	0,0431	0,0431	-			0,9080
T.C.H. 1	0,1229			-	1,23E-05	1,82E-05
T.C.H. 2		1,33E-09		1,23E-05	-	1,82E-05
T.C.H. 3			0,9080	1,82E-05	1,82E-05	-

**Tabla 36.** Valores de significación estadística  $p$  para las comparaciones de los niveles intracelulares de potasio entre dos subcultivos distintos de células del mismo tipo de tejido (tejido cartilaginoso fibroso -T.C.F.- o tejido cartilaginoso hialino -T.C.H.-) y para las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a tejidos distintos (cultivo primario, primer subcultivo o segundo subcultivo de T.C.F. frente a T.C.H.). Las comparaciones de entre dos subcultivos del mismo tipo de células se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a distintos tipos de células se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores estadísticamente significativos se señalan en amarillo. (1) cultivo primario; (2) primer subcultivo; (3) segundo subcultivo.

K	T.C.F. 1	T.C.F. 2	T.C.F. 3	T.C.H. 1	T.C.H. 2	T.C.H. 3
T.C.F. 1	-	1,23E-05	0,0431	3,70E-06		
T.C.F. 2	1,23E-05	-	0,0431		3,88E-09	
T.C.F. 3	0,0431	0,0431	-			0,0005
T.C.H. 1	3,70E-06			-	0,0005	1,82E-05
T.C.H. 2		3,88E-09		0,0005	-	1,82E-05
T.C.H. 3			0,0005	1,82E-05	1,82E-05	-

**Tabla 37.** Valores de significación estadística  $p$  para las comparaciones de los niveles intracelulares de calcio entre dos subcultivos distintos de células del mismo tipo de tejido (tejido cartilaginoso fibroso -T.C.F.- o tejido cartilaginoso hialino -T.C.H.-) y para las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a tejidos distintos (cultivo primario, primer subcultivo o segundo subcultivo de T.C.F. frente a T.C.H.). Las comparaciones de entre dos subcultivos del mismo tipo de células se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que las comparaciones entre iguales subcultivos correspondientes a distintos tipos de células se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores estadísticamente significativos se señalan en amarillo. (1) cultivo primario; (2) primer subcultivo; (3) segundo subcultivo.

Ca	T.C.F. 1	T.C.F. 2	T.C.F. 3	T.C.H. 1	T.C.H. 2	T.C.H. 3
T.C.F. 1	-	0,0001	0,0796	0,0022		
T.C.F. 2	0,0001	-	0,0431		1,29E-09	
T.C.F. 3	0,0796	0,0431	-			0,0005
T.C.H. 1	0,0022			-	1,23E-05	1,82E-05
T.C.H. 2		1,29E-09		1,23E-05	-	1,82E-05
T.C.H. 3			0,0005	1,82E-05	1,82E-05	-

# **DISCUSIÓN**

La **construcción de tejidos biológicos artificiales** y su utilización terapéutica para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos es, como indicamos en la introducción de la presente tesis doctoral, el objetivo de la **Ingeniería Tisular** (Campos, 2004). Las estructuras del aparato locomotor, especialmente el hueso y el cartílago, han sido objeto de especial interés en este campo, dada la incidencia de la patología vinculada a los tejidos que conforman las distintas unidades anatómicas de dicho aparato.

En relación con el cartílago articular, es importante reseñar que su capacidad de regeneración y reparación es muy limitada (Redman *et al.*, 2005). En relación con la reparación del tejido cartilaginoso, dos son los objetivos de cualquier terapéutica sustitutiva de este tipo de tejido: Por un lado, la propia sustitución del defecto cartilaginoso con un nuevo tejido y, por otro, la integración del nuevo tejido con el tejido nativo existente. La carencia de vascularización en el tejido cartilaginoso dificulta cualquier proceso reparativo e impide, a diferencia de otras estructuras corporales, la regeneración mediada por células madre que son vehiculadas por el torrente circulatorio (Hicks *et al.*, 2006).

La Ingeniería Tisular aplicada al tejido cartilaginoso, dada la importante prevalencia de la patología degenerativa articular, se ha configurado en el momento presente como una de las herramientas más prometedoras a la hora de paliar algunas de las deficiencias antes comentadas (Tuli *et al.*, 2003). En este sentido, hasta la fecha se han ensayado diferentes modelos para la **formación de nuevo tejido cartilaginoso**, los cuales van desde la terapia celular por condrocitos aislados hasta la elaboración de constructos cartilaginosos tridimensionales que incorporan células cartilaginosas a distintos biomateriales, añadiéndose en algunos protocolos distintos factores de crecimiento (por ejemplo, el factor de transformación beta o TGF- $\beta$ s) (Tuli *et al.*, 2003; Steinert *et al.*, 2007). La terapia celular y los distintos constructos de cartílago han generado resultados muy diversos, habiéndose descrito, entre los problemas más significativos, la insuficiente diferenciación celular, la pérdida del número de células implantadas, la degeneración de las matrices utilizadas como biomateriales y la falta de integración del nuevo tejido en el sujeto que lo recibe (Steinert *et al.*, 2007). En este contexto, Goldstein afirma que el éxito de cualquier protocolo de Ingeniería Tisular exige una adecuada combinación de cuatro factores: las células, los factores de crecimiento, los biomateriales y las condiciones ambientales.

La célula, en nuestro caso la célula cartilaginosa, objetivo de estudio en la presente Tesis Doctoral es, por tanto, en lo que a su actividad funcional se refiere, un elemento esencial para el éxito de cualquier protocolo de Ingeniería Tisular que tenga por objetivo la fabricación de tejido cartilaginoso con destino a la terapéutica. Para que la Ingeniería Tisular del cartílago tenga éxito, es por tanto necesario asegurar que las células utilizadas para este fin, **sean capaces de sobrevivir** y mantener niveles adecuados de actividad mecánica y metabólica similares a los que existen en el cartílago ortotípico (Gorti *et al.*, 2003) De este modo, sería posible predecir la mayor o menor integración de una población celular determinada, una vez implantada *in vivo*. Un factor decisivo en la **evaluación de la viabilidad de las células** a utilizar en Ingeniería Tisular es el tiempo de permanencia en cultivo con carácter previo a la construcción del nuevo tejido y a su aplicación terapéutica. En este sentido, diferentes autores han demostrado que las células mantenidas en cultivo tienden a envejecer y perder viabilidad después de varios pases celulares (Alaminos *et al.*, 2007; Balconi y Dejana, 1986; Rodríguez-Morata *et al.*, 2008). A este respecto, Rodríguez Morata y cols., utilizando células endoteliales vasculares, y Alaminos y cols., utilizando células endoteliales corneales, pusieron de relieve no sólo las variaciones de viabilidad según los pases celulares, sino, además, la heterogeneidad de respuesta en tipos celulares diferentes (Alaminos *et al.*, 2007; Rodríguez-Morata *et al.*, 2008).

Un factor que no ha sido considerado en los protocolos de Ingeniería Tisular aplicados hasta la fecha al cartílago, es el **tipo de célula cartilaginosa** utilizada y el origen de ésta. A tal efecto, es sabido que existen importantes diferencias entre los distintos tipos de células cartilaginosas existentes en los distintos tipos de tejido cartilaginoso. Aunque dichas células comparten características estructurales y ultraestructurales, la elaboración de la matriz extracelular que éstas llevan cabo, pone en evidencia una actividad biosintética claramente diferenciada entre ambas. Así, mientras las células del cartílago hialino elaboran una matriz extracelular que contiene fundamentalmente colágeno tipo II, las células del tejido cartilaginoso fibroso elaboran normalmente una matriz extracelular rica en colágeno tipo I (Bont *et al.*, 1985; Hamerman, 1989).

En la presente Tesis Doctoral, hemos realizado un **estudio de viabilidad de la célula cartilaginosa desde una doble perspectiva** con el objeto de establecer el patrón de célula cartilaginosa más viable para su utilización en Ingeniería Tisular. Por un lado, hemos evaluado la viabilidad celular a través de diferentes pases o subcultivos. Por otro lado, a su vez hemos realizado un estudio comparativo entre dos tipos de células cartilaginosas: las del tejido cartilaginoso fibroso y las del tejido cartilaginoso hialino.

Hasta el presente, el estudio de la viabilidad de las células en cultivo se ha realizado básicamente utilizando el método del **azul de tripán** mediante cámara de Neubauer. El azul tripán es un colorante orgánico 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** se caracteriza, a nivel morfológico, por la sucesión de una serie de signos concretos, como son: a) las alteraciones de la membrana plasmática, las cuales conllevan 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, con una disminución paralela del volumen citoplasmático secundario a una pérdida de agua y a la condensación de las proteínas, permaneciendo intacta la mayoría de los orgánulos celulares 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 *et al.*, 2001).

Por todo lo expuesto anteriormente, la mayor parte de los autores coinciden en afirmar que la técnica del azul tripán sólo es capaz de identificar aquellas células que se encuentran en una **fase avanzada de apoptosis**, puesto que durante las distintas fases se mantiene la integridad de la membrana celular (Alaminos *et al.*, 2007).

Nuestros resultados, tras la utilización de Azul tripán, en los tres sucesivos pases ensayados en la presente Tesis Doctoral en ambos tipos de células, ponen de relieve que no existen diferencias significativas entre los dos tipos de células cartilaginosas analizadas, así como tampoco entre los tres pases ensayados en cada uno de los tipos celulares considerados (tejido cartilaginoso fibroso y tejido cartilaginoso hialino). A pesar de ello, nuestro análisis reveló la existencia de una

tendencia no significativa en los diferentes países, la cual sugiere que la viabilidad en el cultivo primario tiende a ser menor que en los países sucesivos. Posiblemente, como también ocurre en otros tipos celulares, ello se podría deber a la contaminación del cultivo primario con otros tipos de células existentes en el cartílago y que inicialmente podrían estar presentes en el cultivo y que, al no encontrar el medio de cultivo adecuado, evolucionarán hacia la muerte celular. Asimismo, en el cultivo primario existen células diferenciadas que no tienen capacidad de proliferar, cuya viabilidad es, por tanto, muy baja. A todo ello hay que sumar la adaptación que las células extraídas del cartílago deben realizar en un nuevo micromedioambiente (el cultivo celular) en comparación con la biología celular que desarrolla en el seno del tejido nativo. En consecuencia, el estudio de la viabilidad mediante la técnica del azul tripán no evidenciaría la necesidad de seleccionar ni pase ni tejido a la hora de diseñar un protocolo de terapia por Ingeniería Tisular.

Uno de los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar la viabilidad celular mediante la aplicación de **microanálisis por energía dispersiva de rayos X** (microscopía electrónica analítica). La aplicación de la microscopía electrónica analítica permite analizar *in situ* la composición química de las células, al mismo tiempo que su observación microscópica. Existe un amplio número de técnicas analíticas para estimar el contenido de distintos elementos inorgánicos en especímenes biológicos. Entre ellos, destacan la espectroscopia por absorción atómica o la fotometría de llama (Carini, 1995, 1997 y 2000), técnicas que requieren un número elevado de células y que consideran sólo uno o dos cationes simultáneamente, no siendo capaces de proporcionar información sobre la localización subcelular de estos elementos, 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, permitiendo el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones con  $Z \leq 11$  que están presentes en el espécimen irradiado por el haz de electrones (Crespo, 2001; Warley, 1990 y 1994).

En nuestras células cartilaginosas, hemos analizado 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 algo distinto en términos microanalíticos (Roomans, 1999). En nuestros

resultados, es posible evidenciar en los tres subcultivos, que los patrones microscópicos poseen un carácter ortotípico, no presentando 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**. Nuestro análisis pone de relieve, en los espectros obtenidos, la presencia de los elementos Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca. Las células lavadas según el procedimiento descrito en el capítulo 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 (Warley, 1994; Roomans, 1996; Fernández-Segura, 1997b). Por este motivo, se utilizó esta solución para este trabajo de investigación Doctoral.

El P es un elemento que se relaciona, desde el punto de vista microanalítico, con la masa celular analizada, la concentración de constituyentes orgánicos intracelulares, el contenido en ácidos nucleicos y el nivel de fosforilación celular. Roomans (2002 b) indica que la concentración de este elemento 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 de P.

Por otra parte, los valores de S constituyen un indicador microanalítico del contenido de proteínas, glicosaminoglucanos y proteoglucanos a nivel celular (Sánchez-Quevedo *et al.*, 1989; Roomans, 2002).

Otro de los elementos analizados es el Mg. El Mg es un catión divalente que interviene en un número muy amplio de reacciones intracelulares, presentándose en la mayor parte de los casos en su forma iónica  $Mg^{++}$ , la cual interviene en reacciones de fosforilación y replicación de ADN. Estudios previos han demostrado un descenso en la concentración elemental de Mg en relación al descenso en la concentración de ATP celular (Buja *et al.*, 1985; Di Francesco *et al.*, 1998).

Por otra parte, el descenso de Cl es un indicador precoz de apoptosis que, en general, coincide con la disminución de K y el aumento de Na (Skepper, 1999; Alaminos *et al.*, 2007; Salido *et al.*, 2004). Por ello, la determinación microanalítica de Cl es fundamental en cualquier cultivo celular a la hora de evaluar la viabilidad de las células que forman parte del mismo.

Finalmente, y en relación con los niveles intracelulares de Ca, es sabido que éstos se incrementan significativamente en algunos tipos de muerte celular (Johnson *et al.*, 1993).

Bauer (1976) y con posterioridad Roomans (2001) establecieron 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 la razón o **cociente K/Na** constituye un excelente indicador del daño celular, desde el punto de vista microanalítico.

En el análisis microanalítico cuantitativo de los tres subcultivos estudiados en esta Tesis Doctoral para cada tipo celular, hemos encontrado numerosas diferencias de carácter estadísticamente significativo entre las concentraciones medias de los distintos elementos. En primer lugar, el estudio comparado de carácter global, esto es, comprendiendo los tres pases celulares en su conjunto, entre los dos tipos de células cartilaginosas (del tejido cartilaginoso fibroso y del tejido cartilaginoso hialino), pone de relieve la existencia de **diferencias significativas para el Na, el Cl y el Ca**, de forma que los niveles de estos tres elementos son más elevados en el tejido cartilaginoso hialino que en el tejido cartilaginoso fibroso.

El índice K/Na, considerados los tres pases en su conjunto, muestra una cifra muy elevada (6,80) en el tejido cartilaginoso fibroso respecto de la cifra existente en el tejido cartilaginoso hialino (1,98). Nuestros resultados parecerían indicar que **las células del tejido cartilaginoso hialino son menos viables que las del tejido cartilaginoso fibroso**. Cuando se realiza el estudio comparado entre las células de cada tipo de tejido cartilaginoso para cada pase celular, nuestros resultados ponen de relieve que, asimismo, existen diferencias significativas para algunos subcultivos.

A los efectos de precisar las diferencias más significativas, se discutirán a continuación nuestros resultados en cada uno de los dos tipos de tejido cartilaginoso considerados en este trabajo.

En relación con el **tejido cartilaginoso fibroso**, el estudio estadístico global revela diferencias significativas entre los tres pases celulares estudiados en cada uno de los siete elementos cuantificados mediante microanálisis (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca). Asimismo, nuestra comparación entre pases celulares sucesivos para este tipo de tejido cartilaginoso, pone de relieve la existencia de diferencias significativas entre el cultivo primario y el primer subcultivo para los elementos Na, Mg, P, Cl, K y Ca, disminuyendo los valores de dichos elementos en el **primer subcultivo**, no siendo significativa la diferencia entre los dos primeros pases celulares cuando se analiza la concentración de S. Estos datos no impiden que **el cociente K/Na se eleve en el primer subcultivo** respecto del cultivo primario.

Cuando se analizan comparativamente el primer y el segundo subcultivo en el tejido cartilaginoso fibroso, no se observan diferencias significativas en las concentraciones de los siete elementos analizados, aunque **el índice K/Na disminuye drásticamente** y los valores de Ca aumentan. Estos hechos habría que relacionarlos con una mayor tendencia a la **muerte celular** en el segundo subcultivo respecto del primero. La ausencia de significación estadística habría que relacionarla con el número de células que fue posible microanalizar en el segundo subcultivo, el cual fue muy reducido debido precisamente a la menor viabilidad que ofrecen las células de este segundo subcultivo.

En relación con el **tejido cartilaginoso hialino**, el estudio estadístico global revela diferencias significativas entre los tres pases celulares estudiados para cada uno de los siete elementos cuantificados en esta Tesis Doctoral (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca). Asimismo, nuestro estudio estadístico por pares pone de relieve la existencia de diferencias significativas entre el cultivo primario y el primer subcultivo para los elementos Na, Mg, P, Cl, K y Ca. En concreto, todos los elementos indicados, a excepción del Mg, incrementan significativamente su valor en el **primer subcultivo**. El S no muestra diferencias significativas entre los dos primeros pases celulares. El incremento de las concentraciones antes señaladas resulta paradójico, en el sentido de que la subida de P, K y Cl resultan indicadores compatibles con una mejora de la viabilidad celular, si bien la subida de Ca y Na o la bajada del Mg, lo son de pérdida de la viabilidad. Cuando se estudia el índice K/Na, se comprueba que el resultado final del proceso es una **pérdida de viabilidad**, dada la disminución de este indicador crítico de acuerdo con lo postulado por Roomans y Warley.

Cuando comparamos en el tejido cartilaginoso hialino los valores del primer y el segundo subcultivo, se observan diferencias significativas para los siete elementos analizados (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca). Todos los elementos menos el Ca, disminuyen sus concentraciones en el **segundo subcultivo** respecto al primero, lo que habría que relacionar con un progresiva pérdida de viabilidad celular. Este hecho queda ratificado por la **disminución del índice K/Na**. En efecto, la disminución de P y S se relaciona con la disminución de la síntesis de componentes estructurales vinculados al componente proteico y a la presencia de glicosaminoglicanos. La disminución del Mg se relaciona con la pérdida de los recursos energéticos vinculados a una menor producción de ATP a nivel mitocondrial. La bajada de Cl y K, junto con la subida de Ca, aunque éstas no se acompañen de subida de Na, hay que vincularlas a una disminución de la viabilidad celular mediada por un **proceso de preapoptosis** (Alaminos *et al.*, 2007; Warley *et al.*, 1990; Zierold *et al.*, 1997).

Los resultados que acabamos de reseñar y discutir en el contexto de la bibliografía existente al respecto, ponen de relieve la **sensibilidad de la microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X**, comprobándose que las células que mostraban adecuados niveles de viabilidad celular cuando se utilizó la técnica del azul tripán, podrían no ser útiles para la Ingeniería Tisular si se utiliza la **microscopía electrónica analítica** como herramienta para evaluar la viabilidad celular.

Si, como hemos indicado en la Introducción de esta Tesis Doctoral y al comienzo de esta Discusión, el futuro de la terapéutica sustitutiva del cartílago está vinculada a la **Ingeniería Tisular**, resulta evidente tras analizar los resultados de nuestro trabajo y su valoración en el contexto de la bibliografía existente, que los **estudios de viabilidad** abren un nuevo campo en relación con la eficacia terapéutica de los protocolos terapéuticos a aplicar. En este contexto, la **microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X** puede jugar un papel fundamental a la hora de asegurar los criterios de calidad necesarios para la instauración de dichos protocolos terapéuticos.

# **CONCLUSIONES**

La microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X utilizada en la presente Tesis Doctoral permite identificar criterios de viabilidad cuantificables previos a la destrucción y muerte celular, a diferencia de los métodos clásicos de exclusión de colorantes vinculados a la destrucción previa de los elementos celulares. Dicha metodología posibilita el examen microscópico de los elementos celulares y la determinación del patrón iónico intracelular sin generar alteraciones artefactuales significativas. Por todo ello, de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, pueden emitirse las siguientes **Conclusiones**:

1.- La evaluación con microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X de los condrocitos del **tejido cartilaginoso fibroso** pone de relieve la existencia de **diferencias significativas** entre los tres pases celulares analizados para cada uno de los siete elementos cuantificados (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca). Dichos elementos, con excepción del S, disminuyen significativamente entre el primer y el segundo pase, sin que existan diferencias significativas entre éste y el tercero.

2.- La evaluación con microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X de los condrocitos del **tejido cartilaginoso hialino** pone de relieve la existencia de **diferencias significativas** entre los tres pases celulares analizados para cada uno de los siete elementos cuantificados (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca). Dichos elementos, con excepción del S y del Mg, se incrementan significativamente entre el primer y el segundo pase. En el tercer pase, los siete elementos, excepto el Ca, disminuyen significativamente sus concentraciones respecto del segundo.

3.- La evaluación con microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X de los condrocitos del **tejido cartilaginoso fibroso** pone de relieve que el **índice K/Na** es elevado (superior a 7) en los dos primeros pases, disminuyendo drásticamente (inferior a 1) en el tercero, lo que evidencia un alto nivel de viabilidad en los dos primeros subcultivos.

4.- La evaluación con microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X de los condrocitos del **tejido cartilaginoso hialino** pone de relieve que el **índice K/Na** disminuye progresivamente desde el primero hasta el tercer pase, variando desde niveles medios (3,45) en el primer pase hasta niveles bajos (0,55) en el tercero, lo que evidencia un nivel de viabilidad celular decreciente en los tres subcultivos estudiados.

5.- El estudio comparado de la evaluación microanalítica por energía dispersiva de rayos X pone de relieve un alto nivel de viabilidad en las células del **tejido cartilaginoso fibroso** en relación con las células del **tejido cartilaginoso hialino**, de acuerdo con los valores globales medios del índice K/Na en ambos tipos de células y en los tres subcultivos estudiados. Los dos primeros pases en el tejido cartilaginoso fibroso, y el primero en el tejido cartilaginoso hialino, constituyen, atendiendo a criterios de viabilidad celular, los primeros subcultivos de condrocitos a seleccionar en los **protocolos de Ingeniería Tisular** relacionados con el tejido cartilaginoso.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abraham, E, M.;H Breslow, J, L.; Epstein, J.; Chang-Sing, P.; Lechene, C.(1985): Preparation of individual human diploid fibroblast and study of ion transport. 248,154-164.
- Alaminos M, Sanchez-Quevedo, M, C.; Muñoz-Avila, J, I.; Serrano, D.; Medialdea, S.; Carreras, I, Carreras I. and Campos A. (2006): Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarosa scaffold. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci 47,3311-3317.
- Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. (2007) Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. J Tissue Eng Regen Med. Sep-Oct;1(5):350-9.
- Agencia de avalación de tecnoloxias sanitarias de Galicia, junta de Galicia, conselleria de sanidade, secretaria xeral subdirección xeral de aseguramento e planificación. (2003): uso tutelado de transplante autologo de condrocitos, 1-39.
- Balconi G, Dejana E. (1986) Cultivation of endothelial cells: limitations and perspectives. Med Biol.;64(5):231-45.
- Bentley, G.; Greer, R, B. (1971) Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. Nature; 230: 385-388.
- Bentley, G.; Smith, A, U.; Mkerjhee, R. (1978). Insoleted epiphyseal chondrocyte allografts into joint surfaces. Ann Reum Dis; 37: 449-458.
- Boekestein, A.; Stols, A, L.; Stadhouders, A, M. (1980):Quantitation in x ray microanalysis of biological bulk specimens. Scan Electron Microsc.,321-324.
- Bont LGM de, Haan P de, Boering G. Cartilage of temporomandibular joint. Ned Tijdschr Tandheelkd 1985; 92: 184-189.
- Borgmann S, Granitzer M, Crabbé J, Beck FX, Nagel W and Dorge A. (1994): Electron microprobe analysis of electrolytes in whole cultured epithelial cells. Scanning Microsc. Suppl. 8 139-148.
- Brink CB, Pretorius A, van Niekerk BP, Oliver DW, Venter DP. (2008) Studies on cellular resilience and adaptation following acute and repetitive exposure to ozone in cultured human epithelial (HeLa) cells. Redox Rep.;13(2):87-100.
- Brittberg, M; Nilsson, A; Lindahl, A; Ohlsson, Claes; Peterson, L. (2001): Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes; clinical orthopaedics and related research, 236: 270-283.
- Bujía, J; Sittinger, M; Pitzke, P; Wilmes, E; Hammer, C. (1993): Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. ORL, 55:347-351.

- Buja LM, Hagler HK, Parsons D, Chien K, Reynolds RC, Willerson JT, (1985): Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid. *Lab Invest* 53:397-411.
- Campos, A.; López-Escámez, J.A.; Cañizares, F, J.; Crespo, P, V. (1992): Electrón probe X-ray microanálisis of Ca and K distributions in the otolithinc membrana, *Micro and Microscopica Acta*, 23:349-350
- Campos, A.; López-Escámez, Crespo, P, V, J.A.; Cañizares, F, J.; Baeyens, J.M. (1994) Gentamicin ototoxicity in otoconia: quantitative electrón probe x-ray microanalysis, *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, 114:18-23.
- Campos, A. Rodriguez, I.A, Sanchez-Quevedo, M.C, García, J.M. Nieto-Albano, O.H, and Gomez de Ferraris, M.E. (2000): Mineralization of human premolar occlusal fissures. a quantitative histochemical microanalysis. *histol histopathol*, 15(2):499-502.
- Campos, A. (2004): cuerpo, histología y medicina. de la descripción microscópica de la ingeniería tisular, instituto de España real academia nacional de medicina, Madrid: 21-57.
- Carini, R. Autelli, G. Bellomo, M.U. Dianzani, and E. Albano. (1995) Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxin. *Biochim Biophys Res commun*, 206:180-185,
- Carini, G. Bellomo, M.G. de Cesaris, and E. Albano. (1997) Glycine protect against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na<sup>+</sup> overload in the rat. *hepatology*, 26:107-112,
- Carini R, M.G. de Cesaris, R.Splendore, M. Bagnati, G. Bellomo, and E. Alabano. (2000) Alterations of Na<sup>+</sup>-homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *biochim biophys acta*, 1500:297-305.
- Chesterman, P, J,; Smith, A, U, (1968). Homotrasplantation of articular cartilage and insolated chondrocytes. An experimental studying rabbits. *J Bone Joint Surg*; 50B: 184-197.
- Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Sep;33(9):1673-90.
- Crespo, P, V,; López-Escámez, J.A.; Cañizares, F, J.; Campos, A. (1993): X-ray microanalytical determination of P, S, and K concentrations in the gelatinuos membrana of utricle, *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, 113:176-180, 1993.
- Crespo, P, V,; Arrebola, F,; Zabiti, S,; Cañizares, F, J,; Cubero, M, A,; Warley, A,; Fernández-Segura, E,; Campos, A. (2001): Preparation of cultured cells for study of intracellular element concentrations by X-ray microanálisis usign scanning electron microscope, *Scanning*, 23:138-139.

- De Diego E, Villanueva A, Roca A, Martín B, Meana A, Gómez S y Gómez J. Estudio experimental sobre la viabilidad del injerto libre de epitelio urinario autólogo cultivado in vitro. *Actas Urol Esp* 2004; 28: 714-731.
- Di Francesco A, Desnoyer RW, Covacci V, Wolf FI, Romani A, Cittadini A, Bond M, (1998): Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* 360:149-157.
- Dove, A. (2002): Cell-based therapies go live, *Nature Biotech.*, 20: 339-343.
- Elisseeff, J; Puleo, C; Yang, F; Sharma, b. (2005): advances in skeletal tissue engineering with hydrogels, *orthod craniofacial res*, 8: 150-161.
- Elves, M, W. (1974). A study transplanted antigens on chondrocytes from articular cartilage. *J. Bone Joint Surg*; (1974). 56A: 178-185.
- Fernández-Segura, E,; Cañizarez, F, J,; Cubero, M,A,; Revelles, F, ; Campos, A. (1997): Backscattered electron imaging of cultured cells: application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope, *Journal of Microscopy*, 188:72-78.
- Fernández-Segura, E,; Cañizarez, F, J,; Cubero, M,A,; Campos, A,; Warley, A. (1999): A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe X-ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscopy, *Journal of Microscopy*, 196:19-25.
- Fernández-Segura, E,; Cañizarez, F, J,; Cubero, M,A,; Warley, A,; Campos, A. (1999b): Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis, *Experimental cell Research.*, 253:454-462.
- Finn G. (2002) *Histología*, Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, Madrid: 1, 263-267.
- García M, Escámez MJ, Carretero M, Mirones I, Martínez-Santamaría L, Navarro M, Jorcano JL, Meana A, Del Río M, Larcher F. (2007) Modeling normal and pathological processes through skin tissue engineering. *Mol Carcinog*. Aug;46(8):741-5.
- Glowacki J, Yates KE, MacLean R, Mizuno S. (2005): In vitro engineering of cartilage: effects of serum substitutes, TGF- $\beta$ , and IL-1  $\alpha$ . *Orthod Craniofacial Res* 8; 200-208.
- Goldstein, A.D. Roring, D.E. Newbury, C.E. Lyman, P. Echlin P, C. Fioror, D.C. Joy, and E. Lifshin. (1992). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Plenum Press, New York.
- Green, W.T; (1977): *Basic science and pathology orthopaedic and related research*; 124: 237:250.
- Gorti GK, Lo J, Falsafi S, Kosek J, Quan SY, Khuu DT, Koch RJ. Cartilage tissue engineering using cryogenic chondrocytes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Aug;129(8):889-93.

- Ikegami E, Fukazawa R, Kanbe M, Watanabe M, Abe M, Watanabe M, Kamisago M, Hajikano M, Katsube Y, Ogawa S. Edaravone, a potent free radical scavenger, prevents anthracycline-induced myocardial cell death. *Circ J.* 2007 Nov;71(11):1815-20.
- Hamerman D.(1989). The biology of osteoarthritis. En: Epstein F. editor. *The New England Journal of Medicine*; 1322-1330.
- Hall, T, A,; Gupta, B, L. (1984): The application of EDXS to the biological sciences. *J Microsc.* Nov;136(Pt 2):193-208.
- Hardingham, T.; Tew, S.; Murdoch A. (2002): *Tissue Engineering: chondrocytes and cartilage, Arthritis Reserch*, 4: 63-68.
- Hicks DL, Sage AB, Schumacher BL, Jadin KD, Agustin RM, Sah RL, Watson D. Stored human septal chondrocyte viability analyzed by confocal microscopy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Oct;132(10):1137-42.
- Hu J, Xu YJ, Zhang ZX, Tian F. Effect of cigarette smoke extract on proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells and the relevant roles of protein kinase C. *Chin Med J (Engl).* 2007 Sep 5;120(17):1523-8.
- Ikegami, E.; Fukazagua, F.; Kambe, M.; Watanabe, M.; Kamisago, M.; Hajikano,M.; Katsube, Y.; Owaba, S, (2007):71:(11):1815-1820.
- Jato, D. T; Ruano, R.A; Cerdá, M.T; Mejuto, M. T. (2005): Agencia de avalación de tecnoloxias sanitarias de Galicia, junta de Galicia, conselleria de sanidade, secretaria xeral subdirección xeral de aseguramento e planificación. 01, 1-68.
- Jiang CC, Chiang H, Liao CJ, Lin YJ, Kuo TF, Shieh CS, Huang YY, Tuan RS. Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. *J Orthop Res.* 2007 Oct;25(10):1277-90.
- Johnson EM Jr, Deckwerth TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci.* 1993;16:31-46.
- Kaigler, D. Mooney, D. (2001): Tissue engineering's Impact on Dentistry, *Journal of Dental Education*, 65, 5: 456.462.
- Kuettner KE, Schelerbach R, Hascall VC, (1987). *Articular cartilage biochemistry.* New York: Raven Press.
- Laín Entralgo, P. *Historia de la Medicina*, Salvat Editores, Barcelona, 1982.
- Laurencin, C.T; Ambrosio, A.M.A; Borden, M.D; Cooper, JR. J.A. (1999): Tissue engineering: orthopaedic applications, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 01: 19-46.

- Lechene C. (1988): Electron probe analysis of transport properties of cultured cells. *Electron Microanalysis. Applications in Biology and Medicine* (ed. By K. Zierold, H. K. Hagler), pp 237-249. Springer, Heidelberg.
- Lesson T; Lesson R; Paparo A. (1989): *Texto y Atlas de Histología*, Editorial Interamericana McGraw-Hill pag. 159-167.
- Li, W, J,; Danielson, K, G,, Alexander, P, G,; Tuan, R, S,; (2033): Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds, 67(4):1105-14.
- Liao E, Yaszemski M, Krebsbach P, Hollister S. Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen I hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Eng.* 2007 Mar;13(3):537-50.
- Llames SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguín P, Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation.* 2004 Feb 15;77(3):350-5.
- Llames S, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holguín P, Miralles F, Otero J, Meana A. 2006. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank.*;7(1):47-53.
- López-Escámez, J,A,; Cañizarez, F,J,; Crespo, P, V,; Campos, A. (1992a): Electrón probe microanálisis of otholitic membrana. A methodological and quantitative study, *Scanning microscopy*, 6:765-772.
- López-Escámez, Crespo, P, V,; J,A,; Cañizarez, F,J,; Campos, A. (1992b): Dependence between saccule and utricle in Ca and K concentrations determined by electrón probe X-ray microanalysis, *Micron and microscopica Acta*, 23:367-368.
- López-Escámez, Crespo, P, V,; J,A,; Cañizarez, F,J,; Campos, A. (1993): Standards for quantification of element in the otholithic membrana by electrón probe x-ray microanalysis: calibration curves and electron beam sensivity, *Journal of Microscopy*, 171:215-222.
- López-Escámez,; Campos,A, (1994): Standards for X-ray microanalysis of calcified structures, *Scanning Microscopy*, 8:171-185.
- Maroudas, A.: Physicochemical properties of articular cartilage. In: *Adult articular cartilage*, Freeman, M. A. R. ed., pp. 215-290. Kent, England: Pitman Medical. 1979.
- Mazzarrello, P. Unifying concept: the history of cell, *Nature Cell Biology*, (1999) 1:E13-E15.
- Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. *J Biomech* 1984; 102:73-84.

- Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. 1998 Nov;24(7):621-30.
- Meriç G, Dahl JE, Ruyter IE. Cytotoxicity of silica-glass fiber reinforced composites. *Dent Mater*. 2008 Mar 10 [fecha de publicación on-line].
- Muir H. Proteoglycans as organizers of the extracellular matrix. *Biochem Soc Trans* 1983; 11:613-622.
- Oliveira JM, Rodrigues MT, Silva SS, Malafaya PB, Gomes ME, Viegas CA, Dias IR, Azevedo JT, Mano JF, Reis RL. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2006 Dec;27(36):6123-37.
- Park SS, Ward MJ. (1995): Tissue-engineered cartilage for implantation and grafting. *Facial Plast Surg*, 110:278-248.
- Park C, Moon DO, Ryu CH, Choi BT, Lee WH, Kim GY, Choi YH. beta-Sitosterol sensitizes MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2008 Mar;29(3):341-8.
- Posadas I, Vellecco V, Santos P, Prieto-Lloret J, Ceña V. Acetaminophen potentiates staurosporine-induced death in a human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol*. 2007 Mar;150(5):577-85.
- Poole AR.(1986). Proteoglycans in health and disease: structure and functions. *Biochem J*; 236:1-14.
- Redman SN, (2005). Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*. Apr 14;9:23-32.
- Rinaldi M, Tricarico M, Bonmassar E, Parrella P, Barrera G, Fazio VM. Effect of 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, on NK susceptibility of human K562 target cells. *Anticancer Res*. 1998 Sep-Oct;18(5A):3591-5.
- Rodríguez-Morata A, Garzón I, Alaminos M, García-Honduvilla N, Sánchez-Quevedo MC, Buján J, Campos A. (2008) Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Annals of Vascular Surgery*. (en prensa).
- Roomans, G. (1988): Introduction to X-ray microanalysis in biology. *J Electron Microsc Tech*. 1988 May;9(1):3-17.
- Roomans G.M and Von Euler A. (1996) X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *cell biol int*, 20(2): 103-109.
- Roomans GM. (1999): X-ray microanalysis of cultured cells scanning electron microscope and the scanning transmission electron microcpe: A comparison. *Scanning Microsc* 13:159-165.

- Roomans G. M: (2000): Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur. Cell. Mater.* 18, 1-8.
- Roomans GM, (2001): Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investing Drugs* 10:1-19.
- Roomans, G, M. (2002b): X-ray microanalysis of epithelial cell sinculture. *Methods Mol. Biol* 188, 273-289.
- Ruano-Ravina A, Jato Díaz M. (2006). Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* Jan;14(1):47-51.
- Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Haspl M, Bohnsack M, Fortems Y, Vandekerckhove B, Almqvist KF, Claes T, Handelberg F, Lagae K, van der Bauwhede J, Vandenuecker H, Yang KG, Jelic M, Verdonk R, Veulemans N, Bellemans J, Luyten FP. (2008) Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med.* Feb;36(2):235-46.
- Sanchez-Quevedo, M,C,; Crespo, P, V,; García, J, M,; Campos, A. (1989): X-ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine, *Bone and Mineral*, 6:323-329.
- Sanchez-Quevedo, M,C,; Alaminos, M,; Capitan, L, M,; Moreu, G,; Garzon, A,; Crespo, P v,; and Campos, A. (2007). Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs Developer by tissue engineering. *Cellullar and Mollecular Biology*, 22:631-640.
- Skepper NF, Naridys I, Garnett, MR, Hegyi L, Hardwick SJ, Warley A, Mistchinson MJ, Cary NR. (1999): Cahanges in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: An X-ray microanalytical study. *J Pathol* 188:100-106.
- Smith, A.U. (1965): Survival of forzen chondorcytes isolated from cartilage of adult mammals, *Nature*; 783-784.
- Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U. (2007) Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther.*;9(3):213.
- Salido M, Vilches J, Roomans GM. (2004): Changes in elemental concentration in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int.* 28:397-402.
- Statham, P, J,; (1998): Measuring Performance of Energy-Dispersive X-ray Systems. *Microsc Microanal.* 1998 Nov;4(6):605-615.

- Tabak, L. A. (2004): Dental, oral and craniofacial research: the view from the NIDCR, *J Dent Res*, 83 (3): 196-197.
- Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(5):235-8.
- You Z, Dong Y, Kong X, Beckett LA, Gandour-Edwards R, Melamed J. Midkine is a NF-kappaB-inducible gene that supports prostate cancer cell survival. *BMC Med Genomics*. 2008 Feb 14;1:6.
- Von Euler, Wróblewski, R.; Roomans, G, M. (1992) Correction for extraneous background in X-ray microanalysis of cell cultures. *Scanning Microsc*. Jun;6(2):451-6.
- Wada, M.; Watanabe, A.; Yamshita, T.; Isobe, T.; Moriya, H.(2003): Evaluation of articular cartilage with 3D-SPGR MRI after autologous chondrocyte implantation,8(4)514-517.
- Warley A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc*. 1990 Feb;157(Pt 2):135-47.
- Warley, A.; Fernández-Segura, E.; López-Escámez, J. A.; Campos, A. (1994): Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis, *Cell Biology International*, 18:915-916.
- Warley, A. (1997): X-ray microanalysis for biologists. Practical methods in electron microscopy, Glauert, A, M. (ed) Portland Press, London.
- Warley, A.; Skepper, J, N. (2000): Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. *J Microsc*. May;(Pt 2):116-23.
- Wakitani, S.; Kimura, T, Hirooka, A.; Ochi, T.; Yoneda, M.; Owaki, H.; Ono, K.; Yasui, N. (1989): Repair of rabbit articular surfaces with allografts of chondrocytes embedded in collagen gels. *May*;63(5):529-38.
- Wroblewski, R.; Roomans, G, M. (1984): X-ray microanalysis of single and cultured cells. *Scan Electron Microsc*. 1984;(Pt 4):1875-82.
- Wróblewski, R. (1993): Intracellular and extracellular elemental composition of the endolymphatic sac studied by X-ray microanalysis. *Scanning Microsc*. Dec;7(4):1221-32.
- Zierlod, K.; Schafer, D. (1988): Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc*. 1988 Sep;2(3):1775-90.
- Zierlod, K. (1997): Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* 144:70-76.
- Zierold K. 1997. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* 144:70–76.