

2 ej 129

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA

MORFOLOGIA DINAMICA DE LAS CELULAS ENDOTELIALES
DE LOS VASOS AORTOCORONARIOS CULTIVADOS IN VITRO

TESIS RECEPCIONAL

QUE PRESENTA PARA OPTAR POR EL TITULO DE BIOLOGA

DIANA LIGIA MARTIN-DEL CAMPO FLORES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Dedicatorias -----	1
Agradecimientos -----	7
Resumen -----	10
Introducción -----	12
Justificación del Tema -----	17
Antecedentes -----	22
Material y Método -----	27
Resultados -----	31
Discusión -----	44
Conclusiones -----	62
Ilustraciones -----	68
Bibliografía -----	65

RESUMEN

El significado morfológico y funcional de la célula endotelial , como primer elemento celular de barrera dinámica entre la sangre y los demás tejidos, ha sido objeto de investigación desde los más tempranos conocimientos histológicos del árbol vascular y, contrario a los múltiples intentos por estudiarla, en planteamientos multidisciplinarios, poco se ha podido penetrar en su biología dinámica, debido en parte, a dificultades técnicas y a la aparente simplicidad de tan singular variedad celular.

En este trabajo se pretende establecer el patrón morfodinámico de las células endoteliales del árbol aortocoronario, aprovechando las particulares ventajas que ofrece para la Biología Celular el cultivo in vitro de células y tejidos al disociar los elementos tisulares de la pared vascular .

Nuestros resultados, obtenidos mediante la observación minuciosa al microscopio fotónico bajo diversos sistemas ópticos y su asociación con la microcinematografía espaciada, fueron en términos generales espectaculares, por la belleza y realismo de las imágenes que expresan los diferentes fenómenos celulares, entre los cuales destacan la pinocitosis endocitósica; la dinámica de la membrana celular; el tipo

de uniones célula-célula que se establecen; y la transformación fibroblástica nomicoplásica que sufre la célula endotelial cultivada in vitro, base citomorfológica de las fibrinas y esclerosis del miocardio.

Morfología dinámica de las células endoteliales
de los vasos aortocoronarios
cultivados in vitro

Introducción

De los tres elementos principales que constituyen el aparato -- circulatorio: a) el corazón, b) los vasos y c) la sangre; el primero y el último son los que más han atraído la atención de los biólogos y los mé dicos. El corazón por su característico movimiento fué rápidamente - percibido por el hombre y su contracción se ha interpretado por siglos como sinónimo de vida, aún cuando bien se sabe que la vida del indivi- duo no empieza con los latidos cardíacos, ni cesa cuando el corazón -- deja de latir. En cuanto a la sangre, su valor vital, nunca ha sido sub- estimado; la muerte por hemorragia o por otras alteraciones hemáticas, siempre ha sido bien comprendida y temida por el hombre.

En cambio, los vasos, el árbol arterio venoso linfático, adver- tidos desde los más tempranos conocimientos anatómicos, han sido es- timados con menor significado vital y siempre relacionados a las con- secuencias derivadas de la pérdida de sangre que sus traumatismos o

patología ocasionan al romperse la pared o por obstrucción de su luz - impidiendo la circulación sanguínea.

Sin embargo, a pesar de la aparente simplicidad estructural de los conductos vasculares, arteriales y venosos, poco se ha penetrado en el conocimiento de la morfología celular de la pared vascular, tanto en el conjunto de sus componentes como en su forma individual. Histológicamente, se distinguen en la pared vascular tres capas: a) la íntima o endotelial, b) la media o muscular y c) la adventicia o fibroconectiva. Estas capas alcanzan su mayor desarrollo y diferenciación en los vasos de gran y mediano calibre, mientras que en los vasos pequeños - se van adelgazando y perdiendo su individualidad, hasta que en los segmentos capilares, sólo quedan las células endoteliales formando la pared.

Por otro lado, el papel conductor de los vasos en la circulación sanguínea ha atraído la mayor parte de la atención, restándosela a las células que constituyen el revestimiento íntimo de los vasos, ya sanguíneos o linfáticos, denominadas endoteliales, que aparentan, desde el punto de vista morfológico, una gran simplicidad estructural y que por su situación en los vasos se les asigna una papel de barrera y conductor de flujo hemático o linfático a lo largo de todo el árbol circulatorio vascular y de pared o membrana permeable en aquellos vasos que alcanzan la intimidad de los tejidos.

Durante el desarrollo filogénico y evolución de los vasos desde puntos de vista de la Morfología Comparada, los líquidos intersticiales, al principio, y la hemolinfa y sangre después, circulan y se almacenan en grietas, cavernas tisulares y pasajes revestidos por delgadas capas endoteliales.

A medida que los vasos se constituyen, tanto en lo anatómico como en lo funcional, la capa de células endoteliales se va consolidando y en torno a ella se agregan y disponen las demás células de las capas que hemos mencionado, la media muscular y la adventicia fibroconectiva.

En forma similar, durante el desarrollo onto e histogénico, los vasos sanguíneos son, al principio sólo yemas o puntas de células endoteliales; después se agregan a ellas los demás elementos y se constituyen así los vasos tal como los conocemos.

Durante la destrucción de los tejidos, en particular, la traumática, los tejidos de reparación comprenden el llamado tejido de granulación, que no es otra cosa, que la emergencia de yemas o brotes vasculares, constituidos al principio por células endoteliales; después se forman las demás capas y los vasos se integran completamente.

Adviértase que al describir la formación de los vasos durante su desarrollo embrionario, así como durante las heridas y cicatrización, no existe dificultad para hacerlo aún cuando desconocemos por completo los factores y mecanismo que determinan y regulan la angiogénesis.

Finalmente, existe en la economía de los órganos, algunos cuya función característica se realiza únicamente mediante los vasos sanguíneos capilares que están constituidos sólo por revestimiento endotelial, tal es el caso de los alvéolos pulmonares y de los glomérulos renales, entre otros.

En esta rápida y con seguridad incompleta lista de ejemplos en los cuales se destaca el significado y valor morfológico funcional de la capa endotelial de los vasos, queremos sentar nuestra justificación de escoger a las células endoteliales de los vasos sanguíneos como elemento de estudio morfodinámico, ya que pese a ser un tema que ha sido abordado desde diferentes enfoques, entre otros, estudios bioquímicos, citohistológicos, e inclusive de análisis ultraestructural electrón microscópico, poco se ha logrado en la integración e interpretación de las diferentes capas en la propia circulación y en los fenómenos de difusión y permeabilidad, por lo que existe hasta el momento una lamentable disociación morfofuncional.

Mediante modelos celulares experimentales "in vitro" nos proponemos estudiar y conocer cada vez mejor la morfología, estructura y función de los vasos sanguíneos más allá de su simple papel de conductores de la sangre en la circulación sanguínea y, sobre todo, con las células endoteliales aisladas y cultivadas "in vitro" lograr la caracterización morfodinámica de tan singular estirpe celular.

Con sólo imaginarnos las condiciones anatomofuncionales de los vasos en el cerebro, en el miocardio, en el riñón y en el pulmón, tenemos que admitir que son muy diferentes y que en cada uno de esos órganos los vasos sanguíneos, en particular los segmentos finos, las arteriolas, los capilares y las vénulas, desarrollan sus funciones en circunstancias muy diferentes, tanto en condiciones normales, como durante procesos patológicos y es de esperar que las células endoteliales también tengan una cierta particularidad funcional en cada órgano.

El cultivo in vitro de las células endoteliales y la Cardioangiología

Justificación del Tema

El conocimiento sobre la Biología, la morfología y dinámica de las células endoteliales, no sólo enriquecerá el conocimiento sobre Biología Celular, sino que es particularmente importante para la Cardioangiología y la Angiología ya que todo el aparato cardiovascular, incluyendo el corazón está revestido por células endoteliales y ellas participan de una u otra manera en los procesos funcionales y los mecanismos de regulación de la circulación, muy en especial, de la permeabilidad y de la selectividad del paso de sustancias y líquidos del torrente circulatorio hacia los tejidos y de estos hacia la circulación. Desde el punto de vista patológico los endotelios, en particular los aorto coronarios, participan desde el principio en procesos dismetabólicos tan importantes como la aterogénesis, la trombosis y la esclerosis consecutivas a regímenes tensionales elevados.

Al lado de los fenómenos de permeabilidad y de participación de las células endoteliales en los complejos mecanismos de circulación, las células endoteliales tienen una muy especial participación en los fenómenos de regeneración y cicatrización, particularmente en el

miocardio; y la mayor parte de los importantes y graves fenómenos - de hipersensibilidad e inmunidad que afectan a los vasos se inician en los endotelios, basta mencionar la Fiebre Reumática, el Lupus eritematoso, la Periarteritis nodosa, entre otras graves enfermedades que nutren la Consulta y atraen la atención del Instituto Nacional de Cardiología.

Desde el punto de vista biológico la célula endotelial por su especial localización en la pared vascular constituye un elemento de contención y barrera mecánica sujeto a los cambios tensionales de la presión vascular sanguínea. Pocas células podríamos afirmar están en contacto con tantas sustancias como lo pueden estar las células endoteliales y su papel dentro de la morfología y fisiología vasculares es muy singular.

La razón por la que se escogieron las células endoteliales del territorio aortocoronario fué porque en esta área vascular es donde tienen lugar, con mayor frecuencia, procesos alterativo degenerativos dismetabólicos que cursan con depósitos ateromatosos (colesterol y otros lípidos) con las conocidas consecuencias de la aterosclerosis -- aortocoronaria, así mismo, muy comprometidas con la génesis del infarto del miocardio.

Por lo antes mencionado, creemos que quedó suficientemente justificado estudiar y conocer cada vez más y mejor la Biología de las células endoteliales, muy en particular, su morfología dinámica.

Estamos conscientes de que las células endoteliales vasculares han sido y son objeto de numerosos estudios desde muy diversos puntos de vista. Nosotros hemos puesto especial atención al estudio morfo-dinámico de las células endoteliales del revestimiento cardiovascular por nuestro último objetivo de emplear estas células como modelos - biológicos experimentales para investigar con ellos los mecanismos - de citopatogenicidad de procesos morbosos cardiovasculares.

Hipótesis

La conducta morfodinámica de las células endoteliales vasculares durante los mecanismos de permeabilidad, tanto en condiciones normales como experimentales, es muy difícil y complicada de estudiar *in situ*, mientras que pensamos que las condiciones que nos ofrece su cultivo in vitro facilitarán su observación directa y esperamos penetrar en la participación morfodinámica de estas células en su fisiología y patología vasculares más allá del simple papel de elementos limitantes en la pared de la red vascular.

Por otra parte, la fisiología y la fisiopatología de las células endoteliales las consideramos en estrecha relación con las características organoterritoriales. Según este pensamiento, esperamos descubrir e identificar particulares propiedades morfológicas y funcionales en las células endoteliales vasculares del territorio aorto-coronario y de la masa miocárdica.

Objetivos

Obtener y cultivar *in vitro* células endoteliales de la capa íntima de la aorta y de los vasos arteriales coronarios del corazón para -

estudiar y conocer su morfología en asociación con su conducta dinámica y, con ellas, construir modelos biológicos experimentales que permitan *in vivo* e *in vitro* una observación estructural muy fina relacionada con actividades celulares.

Antecedentes

Nuestro interés por estudiar a las células endoteliales cultivadas in vitro, derivó de la consideración de que contrario a su aparente simplicidad estructural cuando se les observa "in situ" en los cortes histológicos, su participación funcional, como elementos de barrera dinámica entre el torrente sanguíneo y los tejidos, debía estar más relacionada con la biología celular de estos elementos, la cual resulta ideal estudiarla según el cultivo de células y tejidos.

A continuación se ofrece un breve relato histórico bibliográfico del cultivo in vitro de los vasos, destacando los hechos más notables. A los interesados en antecedentes históricos se recomienda la magnífica monografía sobre Aterosclerosis de Pollak (1), publicada en 1969.

Desde los inicios del Cultivo de Tejidos, Carrel y Burrows -- (2), en 1910, realizaron el primer cultivo de tejido vascular; en su informe se hizo una breve referencia de las células endoteliales como "células de notable y reiterada forma laminar aplanada".

Para la siguiente década, Rienhoff (3); en 1922, observó vasos capilares in vitro en un cultivo de mesonefros y metanefros pro-

venientes de embrión de pollo de 8 a 10 días de edad. Años después - Máximow (4), en 1925, describió células endoteliales en un cultivo de piñón. El siguiente trabajo sobre vasos lo realizó Bloom (5), en 1929; donde hacía referencia al crecimiento dominante de fibroblastos en cultivos de explantes de aorta de embriones de cobayo. En estas comunicaciones los autores describen con insistencia la forma plana, como mosaico de las células endoteliales y su agrupación laminar pavimentosa.

En 1931, Shibuya (6) hizo un informe más completo y detallado en el cual describía células endoteliales en cultivos de aorta de conejo adulto, que habían empezado a crecer entre las 24 a 48 horas, después de la siembra; dichas células se mantuvieron vivas en cultivo de 6 a 72 días y se hizo notable que a partir del sexto día en los cultivos aparecieron fibroblastos e histiocitos, lo que fué interpretado en ese entonces como metaplasia, bajo el término de "metamorfosis" de células endoteliales a otro tipo de células. Por ese mismo año Lewis (7) vió capilares nuevos que contenían restos de sus eritrocitos en cultivos de órganos de embrión de pollo de 7 a 8 días de edad.

Durante todo este tiempo, se hicieron importantes contribuciones al mejoramiento de las técnicas empleadas en el Cultivo de Tejidos, sin embargo poco se logró en la obtención, aislamiento y caracterización de las células endoteliales, problema que ha sido crucial, desde el inicio de este tipo de investigaciones hasta nuestros días.

Transcurrieron poco más de 20 años para que el tema fuera retomado y se realizaran nuevos intentos en la obtención de cultivos de células endoteliales. Tal es el caso de los trabajos de Parshley et al (8) en 1953 y de Lazzarini (9) en 1959, quienes describieron crecimiento de células endoteliales en cultivo in vitro y mencionaron un patrón de crecimiento del endotelio en mosaico.

A pesar de que se realizaron muchos otros trabajos, un buen número de ellos no contribuyó al mejor conocimiento de las células endoteliales, debido a errores de interpretación que se hicieron con ellos; sin embargo, muchos otros si fueron trascendentes por los datos que sacaron a la luz sobre la morfología y el comportamiento de las células endoteliales in vitro.

En términos generales, casi todos los investigadores describían o hacían mención de la presencia de células endoteliales en los cultivos provenientes sobre todo de aorta; sin embargo, pocas contribuciones hubo con respecto a nuevas técnicas de obtención y cultivo de colonias puras.

Por otro lado, muchos investigadores atraídos por la belleza y ventajas que tiene y proporcionaron las electrón micrografías, intentaron caracterizar a las células endoteliales a través del microscopio electrónico de transmisión, Farquhar (10), 1961 y Weibel y Palade (11), 1964.

Sin embargo el interés y entusiasmo por obtener un modelo biológico dinámico, hizo que las investigaciones no fueran abandonadas y, por el contrario, se implementaron nuevas técnicas de siembra que ayudaron a la obtención de cultivos puros, tal fué el caso de Brandwood (12), 1961-1963, quien preparó para sus estudios delgadas láminas de la íntima de la aorta de células endoteliales.

Con esta técnica se llegó a obtener una población celular menos variada de lo que se obtenía de un explante con todos los elementos del vaso. Por su parte, en 1967 Robertson (13), preparó el explante entre dos cubreobjetos de manera que, la capa íntima estuviera en contacto con un vidrio y la capa adventicia en contacto con el otro vidrio, de esta forma se pretendía obtener células endoteliales únicamente en uno de los cubreobjetos; los resultados presentados no fueron del todo congruentes con los objetivos de la técnica, pero significaron un paso más en la obtención de células endoteliales puras.

Debido a las no pocas dificultades que tuvieron los investigadores con la caracterización de las células endoteliales en un cultivo heterógeno, se intentó obtener a la célula endotelial aislada del resto de las otras células que constituían el tejido de procedencia, mediante técnicas basadas en la disgregación enzimática, utilizando principalmente soluciones de colagenasa (14) Folkman 1979; Del Vecchio (15) 1977; Jaffé (16) y soluciones de tripsina (17) Pomerat 1963.

Entre otras muchas dificultades que plantea el cultivo "in vitro" de las células endoteliales está el de su correcta identificación - y seguro reconocimiento entre la población celular que integra el halo de crecimiento. Hasta el momento predominan aún consideraciones basadas en la personal experiencia y en criterios de grupo que constituyen "escuela".

Recientemente se ha intentado identificar y caracterizar a las células endoteliales con técnicas más objetivas, como las basadas en inmunofluorescencia, con anticuerpos monoclonales; los resultados son muy alentadores, pero aún incompletos.

Como apéndice a esta breve relación histórica mencionaremos que en Departamento de Cultivo de Tejidos del Instituto desde su creación en 1954, ha existido la constante inquietud por sembrar, cultivar, identificar, reconocer y caracterizar morfológicamente a las células endoteliales. En este trabajo se virtió mucho de la experiencia de nuestro Departamento y en él se aplican las modificaciones a las técnicas de siembra y de cultivo y se vierten nuestras ideas y consideraciones apoyadas en la observación in vivo de las células mediante la aplicación de los sistemas ópticos fotónicos de la Moderna Microscopía.

Material y Método

El material biológico empleado para la elaboración e ilustración de este trabajo procedió de los vasos del territorio arterial aorto coronario de rata, perro, gato y conejo. Todos los ejemplares procedían del Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. A excepción de las ratas que pertenecían a la cepa Wistar, el resto de los animales no se precisó con detalle, raza especial; sólo se procuró contar con ejemplares de ambos sexos, jóvenes y adultos.

Los animales fueron sacrificados por traumatismo craneo encefálico; el corazón y la aorta fueron retirados a cielo abierto por toracotomía. Las piezas anatómicas fueron colocadas en solución salina -- (Hepes) estéril, 25mM. En cada caso mediante tijeras, bisturí y pinzas finas se obtuvo el tronco aortocoronario y de él se extrajeron fragmentos anulares, unos del nacimiento de los vasos coronarios de la aorta y otros, de las coronarias ya en su trayecto miocardio parietal.

Los cultivos se practicaron, unos, según los procedimientos propios del Departamento de Cultivo de Tejidos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, otros, según adaptaciones a las técnicas de siembra en laminillas flotantes, en tubos de ensayo, el método de la cámara de Rose y la dispersión celular por digestión enzimática. Otros cultivos se realizaron según Fresney y Wilmer (18).

Los fragmentos de aorta y de la pared coronaria, se recibieron en Solución Salina Equilibrada (Hepes), 25mM, estéril y después de lavados, fueron tallados hasta dimensiones extremas de pequeñez menores a 1 mm^3 , que se emplearon como fragmentos matrices. Los explantes fueron sembrados según la técnica de coágulo de plasma de gallo y extracto embrionario de pollo de 9 días sobre cubreobjetos. El coágulo, además de servir como adherente y substrato a las células para su crecimiento, aporta nutrientes y otras sustancias que promueven el crecimiento celular. Los explantes así sembrados se incubaron en tubos de ensayo a 37°C en tambor rotatorio. Como medio biológico de cultivo se empleó 50% de líquido de ascitis de pacientes cardiopatas, con 45% de solución salina equilibrada (Hepes) 25mM y 5% de extracto embrionario de pollo, más penicilina streptomicina al 1.25% (Gibco).

Con el propósito de obtener células endoteliales lo más numerosas y libres de otras variedades celulares, unos fragmentos fueron colocados por su cara endotelial directamente en contacto con la superficie del cubreobjetos, como se le ocurrió a Robertson (13), confiando en que tanto la emigración celular como la proliferación ulteriores procedentes de la capa íntima endotelial se realizará desde el principio sobre la superficie de cristal, proporcionándonos así, una cierta pureza y homogeneidad en la población celular. Como testigos para comen-

tarios futuros, también se sembraron fragmentos semejantes a los descritos, pero con la superficie adventicia en contacto con la superficie de cristal.

Finalmente se sembraron delgados segmentos anulares de arterias coronarias de calibre delgado; esperando que las células de la capa íntima al emigrar y proliferar lo hicieran hacia el espacio luminal del vaso, mientras que las demás células derivadas de las capas media y adventicia, sobre todo, esta última, lo hicieran hacia la periferia del fragmento. La Lámina I ilustra en los esquemas 1-7 las variables que se siguieron en la siembra de los fragmentos matrices, así como los sitios de donde provienen los explantes matrices.

Fragmentos de aorta y del principio de la red coronaria fueron sometidos a disgregación tisular por acción enzimática según el método de Folkman (19) utilizando soluciones de colagenasa (Sigma Chemical) al 0.2% disuelta en Buffer salino de fosfatos, pH 7.2 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células sueltas así obtenidas fueron sembradas en botellas de Carrel que se incubaron a 37°C en reposo con 3 ml. de medio nutritivo de Ascitis.

Los cultivos, en sus tubos de incubación, se observaron diariamente al microscopio con luz tangencial. Se hicieron apreciaciones de cambios de pH en el medio (utilizando rojo fenol como indicador) y del crecimiento de halos celulares neoformados en torno a los fragmentos.

Los cultivos se incubaron en tambores rotatorios de una hasta 4 y 5 semanas.

Basándonos en la vitalidad, supervivencia y en las expresiones fisiológicas celulares tales como pinocitosis, movimiento de membrana y pinocitosis entre otras, los mejores cultivos se pasaron a Cámara de Rose y a Cámara Húmeda, se hicieron estudios y observaciones con los Sistemas Ópticos de: Contraste de Fases, Contraste Diferencial de Interferencia, Campo Oscuro y Campo de Luz Polarizada.

De otros cultivos se practicaron, previa fijación en alcohol metílico, tinciones según la técnica de Jacobson (Técnica panóptica a base de May-Grünwald Giemsa).

Del material vivo y del teñido con resultados más demostrativos se hicieron registros fotomicrográficos y fotomicrocinematográficos. Con las mejores imágenes se ilustra este trabajo.

Los registros fotomicrocinematográficos seon de particular valor y utilidad para estudio y análisis de la morfología dinámica de las células. Se hicieron películas con cadencia de una imagen cada quince segundos y su proyección a 24 imágenes por segundo nos permite un factor de aceleración y análisis de 360X, es decir, la vida celular de 24 horas, la podemos ver y estudiar en 4 minutos.

RESULTADOS

Nuestros resultados fueron numerosos variados y muchos de ellos novedosos, serán expuestos en varias comunicaciones que nos proponemos hacer en un futuro inmediato.

En este trabajo, nos referiremos a: a) lo acontecido a los fragmentos de siembra en su historia in vitro de sobrevivencia, emigración y porliferación y, b) lo referente a la morfología dinámica observada en las células endoteliales propiamente dichas, objeto principal de esta comunicación.

Antes de iniciar el relato descriptivo de los resultados conviene comentar que con lo observado en los cultivos no pudo establecerse diferencia en relación al origen y procedencia de los explantes (rata, perro, gato y conejo) por lo que nuestra descripción será global.

a) observaciones en los fragmentos matrices

Los fragmentos matrices de acuerdo con su tamaño, forma y posición exhibieron diversos patrones de cultivo in vitro en el momento de su siembra. En unos casos, los fragmentos estaban formados por todos sus elementos constitutivos, de manera que en ellos estaban pre-

sentes la capa íntima, con sus células endoteliales e histiocitos subíntimos, la capa media, con sus elementos fibromusculares lisos y la capa adventicia, con su abundante tejido fibroconectivo, Lámina II nos ilustra estos eventos.

La Lámina I en el esquema 3 es una concepción de la estructura histológica normal de la pared de la aorta y de una arteria coronaria, los esquemas 4-7 nos ilustran los componentes tisulares y celulares que de ella se derivan y que de una manera u otra se manifestaron durante el cultivo in vitro.

Por otro lado, otro grupo de explantes estaba conformado por fragmentos de la aorta y de la coronaria a los cuales se les despojó de las capas media y adventicia, por desprendimiento mecánico de la capa íntima. En estos casos el fragmento era prácticamente laminar y formado por la capa de células endoteliales y algunos elementos fibrocelulares laxos de la capa subíntima.

La lámina III ilustra a la notable emigración de elementos microamiboides (linfocitos, monocitos y algunos macrófagos) que se presenta durante las primeras 24 a 48 horas de la siembra, en la mayoría de los explantes. Después, entre 72 a 96 horas se inició la emergencia de brotes, estos se transformaron en largas puntas de crecimiento que, sin perder continuidad con su sitio de origen se extendían y penetraban en el halo de crecimiento a distancias muy considerables. Las células que se identificaron en estos brotes y yemas de crecimiento

con nucleolo prominente; estas células por su morfología, su manera de aparecer en el borde del explante y su ulterior conducta en la formación del halo de crecimiento, fueron consideradas como células conectivas procedentes de las ya existentes en el tejido del fragmento, es decir, células de los tejidos, Histiocitos (según las ideas de Maximow y del Maestro Costero (20,21), entre otros investigadores). La aparición de ellas en el borde tisular se acompañó de cambios en su morfología y desplazamientos activos entre las fibras conectivas hasta alcanzar el borde. Las figuras de la Lámina IV ilustran estas ideas y ejemplifican los resultados que estamos describiendo.

A las 120 - 150 horas de cultivo in vitro y después de los primeros brotes celulares, la emigración celular fué aún mayor y se combinó con notable proliferación lo que se tradujo en amplios y tupidos halos celulares en los cuales pudieron advertirse otras variedades celulares, como células musculares lisas, además de las células endoteliales y fibroblastos.

A los ocho días en casi todos los explantes, se había desarrollado un enorme halo celular integrado principalmente por células endoteliales y fibroblastos formando nidos de las primeras, rodeados a manera trabecular por fascículos de fibroblastos. La observación de los nidos de células laminares mostró células muy iguales entre sí, planas, poliédricas, de núcleo grande, claro y vesiculoso, de citoplasma claro, granular con abundantes organelos y que por su relación de unas con

otras formaban mosaicos. Estas células, sin problemas, fueron identificadas por los datos mencionados como células endoteliales. Lámina V

Cuando la cara endotelial, capa íntima, de los fragmentos arteriales fueron colocados directamente sobre la superficie de cristal de la laminilla de siembra y cultivo, los sucesos celulares derivaron de las células contenidas en la capa íntima (endoteliales, histiocitos y fibroblastos) y fueron diferentes a aquellos otros observados cuando la capa adventicia fué la que se puso en contacto directo con el cristal de la laminilla.

En esta oportunidad las primeras células emergiendo de los bordes del fragmento se advirtieron casi al final de la primera semana y lo hicieron no por brotes separados sino en forma laminar y en amplias zonas de los bordes. Estos mosaicos laminares manifestaron gran capacidad de emigración y proliferación muy uniforme, de manera que su crecimiento fué expansivo, uniforme y en torno al fragmento original. El halo celular derivado de la emigración y proliferación de células endoteliales fué en monocapa; en las células fueron abundantes las figuras de división celular mitótica, particularmente después de la primera semana; en torno a los diez días de cultivo las divisiones celulares fueron muy frecuentes, como lo ilustran las figuras 23 - 29, de la Lámina VI.

En estos halos es notable la regularidad de las células en su dis

posición general y en su morfología particular. De entre estas células tomamos a aquella que representará nuestro modelo para describirlo en su morfología y en sus relaciones dinámicas.

b) Observaciones de células endoteliales

Las figuras de las Láminas VII ilustran los principales hechos morfodinámicos de las células endoteliales, motivo de este estudio. De acuerdo con las descripciones ya clásicas, las células tomadas de la mitad del halo de emigración y crecimiento, son muy semejantes entre sí, planas, delgadas, laminares, poligonales con correspondencia de sus lados o bordes entre sí; en esta situación establecen y guardan relaciones con las células vecinas mediante abundantes, cambiantes, prolongaciones celulares citoplásmicas, tipo puente.

La célula endotelial tipo que ahora se describe es notablemente rica en detalles estructurales, en particular cuando es observada al Sistema Optico de Contraste de Fases, entonces la imagen morfológica contrasta con la aparente simplicidad estructural de las mismas células endoteliales cuando se observan in situ en preparaciones histológicas como puede apreciarse en la Lámina VIII en sus figuras 34-37.

En las imágenes de las células endoteliales in situ vistas en preparaciones histológicas parece no advertirse estructura en el citoplasma; la membrana celular plasmática luce rígida, confinada al papel

de límite celular y de relación con otras semejantes formando la capa íntima endotelial del vaso. En cambio, las imágenes de las células endoteliales, las mismas que revisten la luz de las arterias o vasos arteriolares, pero cultivadas in vitro, se ven tan diferentes que no parecería que son las mismas. Su disposición y adherencia sobre la superficie de cristal se traduce en una extremada delgadez laminar del citoplasma, lo que se acompaña de una gran separación y dispersión de los organelos y en general de las partes de la célula; entonces la imagen 35 de la Lámina VII nos muestra una célula muy extendida, plana, de extraordinaria delgadez en el citoplasma; el núcleo se advierte grande, vesículoso, transparente.

En la morfología de las "células endoteliales tipo" es frecuente observar actividad endocitósica en forma de pinocitosis. El cambio de medio nutritivo suele ir seguido de un notable incremento de la pinocitosis, en estos casos, mediante activos movimientos envolventes y engolfantes de la membrana plasmática se capturan del exterior pequeñas gotas del medio líquido nutritivo que, en forma de vacuolas, se les ve desplazarse hacia el centro metabólico celular; muy frecuentemente hacia la vecindad del núcleo. Sin embargo; llama la atención que la pinocitosis no es ni muy frecuente ni muy intensa y los volúmenes líquidos que se mueven por pinocitosis son pequeños; en las mejores condiciones y en forma comparativa la pinocitosis en células epiteliales es

mucho más activa y de grandes volúmenes de manejo.

En nuestra experiencia no hemos visto fenómenos de transporte líquido, mediante vacuolas, del interior de la célula hacia la periferia. También conviene anotar que la pinocitosis más activa se advierte en las células situadas en la periferia del halo, cuando tienen una parte de su cuerpo libre, sin relación con otras células. En algunos casos, pudimos observar actividad pinocítica en células endoteliales.

Lámina IX figuras 38-42

En las células endoteliales después de una semana de cultivo empieza a ser notable y visible en muchas de ellas el aparato de Golgi en términos de una gran agrupación gránulo, vácuolo, canalicular yuxtannuclear. El tamaño y extensión de este aparato, así como la densidad de sus elementos es variable y cambiante de una célula a otra y aún dentro de una misma célula dependiendo de su actividad o momento funcional. Con frecuencia las vacuolas pinocíticas después de su viaje por citoplasma desde su lugar de origen en la membrana plasmática, llegan hasta la vecindad, penetran en el aparato de Golgi y ahí "desaparecen" sin llegar a estancarse o desarrollar lagunas del líquido nutritivo. Algunas vacuolas pinocíticas poco después de su formación se reúnen y funden por coalescencia con otras semejantes y, en su viaje hacia la zona yuxtannuclear, se les adhieren algunas granulaciones finas, densas, oscuras a la fase y así, acompañadas por estas granulaciones

llegan hasta el aparato de Golgi y ahí "desaparecen" las vacuolas y los gránulos se incorporan a los demás elementos granulares del aparato de Golgi.

En estas células endoteliales, consideradas como el prototipo de ellas en los cultivos *in vitro*, es notable la abundancia y variedad de organelos. Los registros microcinematográficos de estas células muestran gran actividad móvil de sus organelos con desplazamientos de la periferia yuxta membrana hacia el centro yuxtenuclear de la célula, en ocasiones acompañando aparentemente a las vesículas pinocíticas y en otras simplemente desplazándose ellos solos.

En estas células (millares de ellas observadas) no fué posible ver figuras morfológicas de fagocitosis. Este fenómeno es más notable en atención a la abundancia de fragmentos y detritus celulares presentes en el cultivo. En ocasiones durante la emigración y proliferación celulares que integran el halo de crecimiento, las células endoteliales se desplazan y "tropiezan" con restos celulares, sin fagocitarlos, unas veces se detiene el desplazamiento ante el obstáculo que representa el fragmento celular, en otros casos, la célula endotelial pasa por encima de los detritus.

La mayoría de las células endoteliales, como las que estamos describiendo, llegado cierto momento entre (24 y 36 horas de establecido el cultivo) entran en actividad de división mitótica y las nuevas

células se acomodan en el halo y contribuyen a su crecimiento y expansión.

En cambio, muchas de las células endoteliales situadas en la periferia, borde, del halo de crecimiento suelen separarse del conjunto, se sueltan, y emigran más allá del borde del halo, quedan aisladas y muestran una serie de modificaciones morfofodinámicas que gradualmente les van semejando a fibroblastos; es decir, se transforman en elementos estelares con varias prolongaciones citoplásmicas que suelen continuarse con delgadas y tenues fibrillas; antes de que aparezcan las fibrillas, el citoplasma se vuelve granuloso, la célula se desplaza poco y de una o dos extremidades estelares, generalmente opuestas y situadas en el eje mayor de la célula, aparecen delgados filamentos que se identifican de reticulina y de precolágena. De manera que, en conjunto, podemos referirnos a que algunas células endoteliales de la periferia del halo celular experimentan transformación fibroblástica seguida de actividad fibrogénica. El fenómeno inverso, transformación de un fibroblasto hacia célula endotelial, no lo hemos observado. Lámina X figuras 43-48.

La mayoría de las células endoteliales tienen un núcleo grande, vesículoso, transparente, prácticamente hialino, rodeado o limitado por una membrana nuclear muy notable al contraste de fases, sin embargo, de vez en cuando pueden observarse células endoteliales semejantes a las descritas, pero con dos núcleos situados en el centro ce-

lular, dispuestos uno al lado o enfrente del otro, en ocasiones contactando por sus membranas.

El nucléolo en estas células suele ser grande, prominente, raras veces único, lo común es observar dos o más nucléolos de tamaños diversos y polimorfos.

Una célula endotelial guarda relaciones con otra o más células endoteliales vecinas de diversas maneras; en unos casos, cuando son sólo dos células y el contacto es ocasional, frente a frente, el contacto se establece por delgadas prolongaciones citoplásmicas, pseudotelares, arborescentes, este contacto no suele ser ni muy firme ni muy permanente, las células con facilidad retraen y modifican las prolongaciones citoplásmicas para volver a lanzarlas una contra la otra célula y establecer nuevos contactos. En otras ocasiones, cuando el contacto se establece en los bordes latero lateral de dos células, las células se aproximan bastante hasta casi adosarse; entonces cada célula emite numerosas y cortas prolongaciones citoplásmicas que entran en contacto con su semejante de la otra célula o pueden ponerse en contacto directamente con la membrana plasmática de cada célula; de esta manera se establecen cortos y firmes puentes membranocitoplásmicos que aún cuando están en continuo movimiento unen en forma más firme y prolongada a las dos células. Entre un puente y otro quedan espacios lacunares. Estas uniones por firmes que parezcan y que en realidad -

lo son constituyen simples contactos de membrana a membrana plasmática, las prolongaciones celulares de un lado y del otro no penetran o atraviesan la membrana ni alcanzan la intimidad del citoplasma, es decir, no establecen relaciones sincitiales, cada célula, por estrecho y firme que sea su contacto con la otra, sigue conservando su integridad y unidad celular.

Los movimientos conjuntos de todos los elementos integrantes del halo, entre ellos, las células endoteliales, o los movimientos aislados de pequeños grupos de células ocasionan estas uniones celulares que proporcionan a toda la lámina celular gran elasticidad, resistencia de unión y facilidad de soltarse de las células del conjunto. Este tipo de unión de las células endoteliales nos interesa mucho para establecer una comparación con la unión celular que se establece entre ellas in situ, en la pared del vaso y el papel que juegan durante los fenómenos de permeabilidad o de filtración de líquidos por las uniones celulares.

Las uniones celulares de las células endoteliales como las hemos descrito son muy semejantes y recuerdan a las que se establecen entre las células epiteliales y que a su vez son muy semejantes a las uniones de tipo epiteliofibrillas de la capa espinosa del estrato germinal de los epitelios.

La observación y estudio comparativos de los halos de creci-

miento celular de cultivos de una y de dos semanas pone de manifiesto la dominancia de las células endoteliales sobre cualquier otra variedad celular, por ejemplo, sobre los fibroblastos, células musculares lisas, macrófagos y cualquier otra variedad celular; sin una contabilidad celular estricta, podemos estimar en tres cuartas partes las células endoteliales y el restante 25% de células compuesto por las demás variedades. Esta aparente proporción cambia rápidamente después de la tercera y cuarta semanas de cultivo, en estos casos la dominancia celular se invierte, cada vez van siendo más numerosos los fibroblastos; los macrófagos y las células musculares lisas y, sobre todo, las células endoteliales van disminuyendo progresivamente.

Generalmente la dominancia de fibroblastos se deriva de una notable actividad proliferativa de estas células; con frecuencia de los bordes del fragmento matriz emergen puntas de salida de fibroblastos que en capas superpuestas sobre la monocapa del halo principal invaden y crecen hasta alcanzar mayores dimensiones que el crecimiento de las células endoteliales. Sin embargo, muchos otros fibroblastos, en plena actividad fibrogénica derivan de fenómenos de diferenciación sobre las células endoteliales de la periferia del halo.

La Lámina XII ilustra en sus Figuras 54-57 imágenes de células musculares lisas, como se advierte aún cuando algunas de ellas se aplanan y adhieren al portaobjetos de crecimiento, la mayoría

de ellas conserva la forma fusiforme, alargadas con núcleo vesicular, grande, claro y nucléolo prominente. La observación prolongada de las células musculares lisas, en particular en registros microcinematográficos, lenta y reptante, permite observar la contracción de algunas de ellas, por sí solas o bajo el estímulo térmico de intensidad luminosa.

Las células musculares lisas crecen y se cultivan formando pequeños grupitos de células; de cualquier manera, el número total de las células musculares lisas es muy reducido en el mejor de los cultivos. Estas células proceden de las musculares lisas de la capa media de la pared arterial del fragmento sembrado o de los vasa vasorum contenidos en el explante.

Finalmente, los compuestos elásticos, fibras o láminas de la pared de la aorta y de las arterias coronarias no participan de la actividad celular aún cuando permanecen en el fragmento matriz durante todo el tiempo de incubación y cultivo y pueden ser identificados en las observaciones "in vivo" y en las preparaciones fijadas y teñidas.

Discusión

Las células endoteliales de los vasos aorta coronarios cultivadas in vitro resultaron ser, como se había previsto en la hipótesis de este trabajo, un magnífico material biológico para estudiar su morfología y dinámica, es decir, su biología celular en relación a su participación en los mecanismos de regulación en la circulación sanguínea y, muy en especial, en la permeabilidad a nivel de la red capilar.

Aislar y caracterizar morfodinámicamente las células endoteliales de la pared de los vasos aorta coronarios no fué fácil; las numerosas dificultades técnicas con las que tropezamos nos recuerdan a las que tuvieron otros investigadores al tratar de aislarlas y obtener con ellas cultivos puros, casi colonias, con los mismos propósitos de caracterizarlas. Por ejemplo Robertson (13) recurrió a sembrar fragmentos vasculares de aorta apoyando la capa íntima sobre la superficie de cristal del cubreobjetos de siembra. Nosotros también recurrimos a un procedimiento semejante con resultados comparables a los de Robertson. Por otro lado, otros investigadores, entre ellos Pomerat (17), Folkman (14), del Vecchio (15) y Jaffé (16), recurrieron a la digestión enzimática de fragmentos de pared arterial con tripsina y colagenasa buscando la liberación y separación de las células

endoteliales de las demás células que constituyen la pared vascular. Los resultados obtenidos por estos investigadores pueden resumirse de la siguiente manera: Pomerat (17), empleando la tripsina, observó después de 5 a 6 días en los cultivos primarios abundantes células mesenquimatosas o poliédricas laminares que después de un primer - trasplante tienden a formar colonias "epitelioides"; muchas de ellas con el tiempo adoptan morfología estelar semejante a la de los fibroblastos. Folkman (14), del Vecchio (15) y Jaffé (16), por separado, emplearon perfusiones in situ de soluciones de colagenasa en redes ca pilares (Folkman), en segmentos venosos (Jaffé) y en la red vascular de la glándula adrenal (del Vecchio).

Aún en estos casos y en manos de tan experimentados investigadores la separación de las células endoteliales fué muy difícil y en todo caso fué necesaria una correcta identificación, ya que con la acción enzimática se liberan, no sólo, las células endoteliales, sino -- otras muchas (fibroblastos, histiocitos, células musculares lisas), - procedentes de las restantes capas de integración histológica de las -- arterias y venas. Así, los autores mencionados y una amplia pleyade de seguidores, entre ellos, Zetter (22), Gospodarowicz y col. (23), Young y col. (24), recurrieron a la identificación mediante mecanismos de inmunología celular y fluorescencia a la energía ultravioleta. El procedimiento, bello en imágenes, no tiene la especificidad buscada. Otro grupo de investigadores, entre ellos Weibel y Palade (11),

Farquhart (10), recurrieron a la electronmicroscopía y creen, los- dos primeros, haber encontrado unas estructuras electronmicroscópi- cas que, actualmente se les denomina "cuerpos de Weibel y Palade" y parecen ser específicos de las células endoteliales. Estas estructuras son cuerpos bacilares de 3.2 micras de largo, rodeados de una gruesa membrana de 60 a 80 $\overset{\circ}{\text{Å}}$, del tipo de unidad de membrana; su cuerpe- cillo está formado por pequeños y delgados tubulos cilíndricos de 150- a 200 $\overset{\circ}{\text{Å}}$. Su sección transversal muestra la presencia de 6 a 26 túbu- los. Estos cuerpos de Weibel y Palade, según los propios autores po- drían ser observados en microscopía fotónica si son teñidos con azul de bromofenol de mercurio, que los tñe de azul, así como con Sudán Negro disuelto en alcohol. Estos cuerpecillos se pueden confundir con facilidad con mitocondrias a la observación con microscopios de luz.

Nuestros métodos y técnicas no incluyeron la Electronmicros- copía, por ello no discutimos los hallazgos de Weibel y Palade desde- este punto de vista; en cambio, nuestra amplia experiencia en micros- copía fotónica, en particular con el Sistema Optico de Contraste de Fa- ses en células vivas, nos permite comentar que hasta el momento no hemos visto en nuestro material ninguna estructura de las dimensiones y características de los "cuerpos de Weibel y Palade". Sin embargo - Zetter (22) comenta que los "cuerpos de Weibel y Palade" están pre- sentes en las células endoteliales humanas, mientras que no lo están -

en las de bovino; esta diferenciación en las especies podría explicar que en nuestro material no hayamos podido indentificarlas.

También intentamos la separación mecánica de la capa íntima de las restantes capas de la pared arterial. Este método requiere de gran habilidad técnica ya que se acompaña de mucho traumatismo celular; proporcionó células endoteliales en reducido número y en forma irregular, lo que limita su confiabilidad, pero nos proporcionó valiosa información para la identificación y el conocimiento de sus principales cualidades morfológicas.

Finalmente, nuestras observaciones y resultados comprenden la siembra y cultivo de pequeños fragmentos de aorta y coronarias adheridos, por su capa íntima mediante coágulo de fibrina a la superficie del cubreobjetos de cultivo.

Obtener células endoteliales de la pared vascular, en particular de segmentos aortocoronarios, sembrarlas, cultivarlas y después estudiarlas desde el punto de vista de la morfología dinámica, resulta, aún muy difícil en cuanto a procedimientos técnicos, lo cual repercute en una continua inseguridad de obtener precisamente las células endoteliales en tales condiciones biológicas que permitan su ulterior siembra y cultivo. Opinamos que la siembra de pequeños fragmentos de la pared arterial sigue siendo el procedimiento recomendable para obtener las células endoteliales, aceptando que vendrán mezcladas con

otras variedades celulares y que su reconocimiento e identificación - requieren hasta el momento de una amplia experiencia personal en -- morfología celular in vitro que permita identificar las células con -- corrección en los halos de emigración y proliferación en los cultivos. Por el mo mento no parece existir un recurso técnico fácil, rápido, - sencillo y seguro para obtener las células endoteliales en cantidades - suficientes para construir con ellas modelos celulares experimentales. Quizá, la combinación de recursos nos conduzca a una mejor solución al actual problema. Por ejemplo, siguiendo los intentos de Pomerat (17), entre otros, se podríán, mediante resiembras sucesivas, se- leccionar y resembrar células endoteliales. Este procedimiento im- plica, de todas las maneras, la siembra primaria, la experiencia de reconocerlas en el halo de crecimiento y las difíciles maniobras de re- cogerlas, transportarlas y resembrarlas en otros recipientes para cul- tivarlas hasta desarrollar colonias de células endoteliales.

En nuestro caso, cuyos objetivos principales eran observacio- nes y estudios morfodinámicos, no precisamos de grandes cantidades - de células, pero sí tener la seguridad de su procedencia y naturaleza; es decir, células endoteliales del revestimiento íntimo de vasos arte- riales aortocoronarios. Este requerimiento creemos fué satisfecho - con las siembras que realizamos: siembras de fragmentos de pared - arterial con adherencia de la capa íntima al cristal del cubreobjetos de

siembra, así como cultivo de la siembra de la suspensión celular obtenida por acción enzimática (tripsina y colagenasa) de fragmentos de arterias del árbol aortocoronario.

A Jaffé y Col. (16) y Branwood (12) también les llamó la atención la forma y el peculiar arreglo que toman las células endoteliales de manera tal que recuerdan el crecimiento in vitro de los epitelios en el halo de crecimiento; estos autores emplearon el término de "epitelio pavimentoso" para describir el crecimiento en monocapa, sin sobrelapación celular, de las células endoteliales humanas derivadas del cultivo in vitro de las venas umbilicales. Descripciones y comentarios afines a la forma y crecimiento de las células endoteliales cultivadas in vitro, se encuentran en las comunicaciones de Kempski y Col. (25) y en la excelente monografía de Pollack (1) sobre cultivo de tejidos y aterosclerosis.

Los criterios que empleamos para calificar de célula endotelial a los elementos celulares del halo de crecimiento fueron los siguientes:

1. célula que se adhiere y se extiende en sus máximas dimensiones sobre la superficie de cristal de siembra y cultivo o sobre la superficie del coágulo del plasma que se empleó para sujetar al implante.

2. Célula de forma poliédrica irregular, de bordes bien definidos que se armonizan y adaptan a los bordes de las células endoteliales vecinas y forman así extensos y laminares mosaicos.

3. Las células endoteliales ya aisladas o reunidas, formando láminas, muestran su membrana plasmática con prolongaciones digitiformes o filamentosas en continuo movimiento y cambio morfológico, lo que determina un continuo movimiento ondulante o en fleco, generalmente asociado con las primeras figuras morfodinámicas de la pinocitosis.

4. Comparadas las células endoteliales con cualquier otra variedad celular de la economía corporal, son ellas las que más se extienden y alcanzan las mayores dimensiones conservando una armonía en sus proporciones y dimensiones, por lo que el mosaico que constituyen suele ser muy regular.

5. Estas células crecen y proliferan generalmente en monocapa, es excepcional ver que se agrupen en dos o más niveles y de hacer lo suele ser en la inmediata vecindad de los bordes del fragmento matriz y por corta distancia hacia el halo de proliferación. Sin embargo para Schwartz (26) existen diferentes patrones de crecimiento de las células endoteliales in vitro; su opinión y experiencia se basa en sus estudios sobre aortas de bovino cultivadas in vitro.

6. La particular disposición laminar, en mosaico y la extraordinaria delgadez que llegan a tener estas células hace que todos sus componentes celulares y los organelos resalten y se observen con extraordinaria nitidez, en particular bajo las observaciones al contraste

de fases.

A qué se debe la particular forma en mosaico y disposición laminar de las células endoteliales ha sido tema de investigación y discusión prácticamente de todos los interesados en estas células. Hasta el momento no contamos con una explicación satisfactoria, para algunos autores se trata de estereotropismo, para nosotros, podría tratarse de una derivada morfológica de una ancestral función de permeabilidad y recubrimiento de la pared vascular; conviene recordar aquí que en los invertebrados, las grietas y cavernas parenquimatosas se recubren tempranamente de células endoteliales.

7. El citoplasma es abundante, muy claro y extendido, en el se observan numerosos organelos, del tipo mitocondrias filamentosas o bacilares, simples o dicotomizadas. Las dimensiones que pueden tener estos organelos son el límite de observación clara y nítida para nuestros sistemas ópticos microscópicos fotónicos. Más allá de estas dimensiones, sólo el microscopio electrónico es capaz de penetrar en las imágenes de alta resolución.

8. En las células endoteliales es muy notable el conjunto estructural que constituye el Aparato de Golgi en diferentes grados de desarrollo; en unas células puede ser muy discreto, constituido sólo por granulos y finos grumos reunidos en la zona yuxtannuclear, mientras en otras células alcanza su máximo desarrollo y dimensiones entonces en el cual se pueden distinguir e identificar estructuras granulosas, tubu-

lares, vacuolares, grumosas en gran complejidad morfodinámica, esta complejidad y desarrollo estructural traduce marcada actividad metabólica de las células endoteliales generalmente relacionada con actividades secretoras y de síntesis de productos celulares. Hasta el momento ignoramos las consecuencias de esta actividad metabólica y desconocemos el producto secretado, así como su relación con las funciones de las células endoteliales con la circulación sanguínea y su participación en los mecanismos de permeabilidad.

9. El aparato de Golgi puede estar rodeado por citoplasma claro, pero en muchas ocasiones suele estar rodeado por abundantísimas y finas gotitas muy uniformes entre sí, brillantes al contraste de fases y al campo de luz polarizada, ignoramos su naturaleza y composición bioquímica así como su relación con el aparato de Golgi.

10. El citoplasma laminar y extradelgado de las células endoteliales que estamos describiendo suele en no pocas ocasiones mostrar reforzamientos a manera de tono fibrillas variables en número y orientación, generalmente relacionadas con el sentido y magnitud de las fuerzas que actúan sobre la célula. En trabajos de Wechezak (27) refuerzan estas consideraciones. Quien observó cambios en la reorganización del citoesqueleto cuando las células endoteliales fueron sometidas a cambios de corrientes que actuaban sobre su superficie.

11. El núcleo es grande, vesiculoso, claro, generalmente úni-

co, rara vez doble, observaciones que coinciden con las Kempski y (25) y Bowman y col. (28) quienes trabajaron con células endoteliales del árbol cerebrovascular y con vasos del oído interno respectivamente, donde se refieren al núcleo celular como redondo o elíptico y ligeramente hipocromático, con la presencia de uno o más nucléolos prominentes.

12. La membrana nuclear es muy nítida y dibuja un contorno ovoide de muy regular del núcleo; de grosor muy uniforme en algunas células pueden observarse invaginaciones digitiformes de la membrana nuclear que le imprimen al núcleo una morfología irregular, pseudolobulada. En estos núcleos, pueden observarse con gran precisión todos los cambios que les afectan durante la división celular mitótica mejor que en ninguna otra variedad celular. El nucléolo suele ser muy grande, prominente y por excepción único, generalmente es numeroso (2 a 6) igualmente densos y prominentes. Son células que una vez establecidas tienen gran actividad de multiplicación. En cultivos mixtos, es decir, no seleccionados, coexisten células endoteliales y otras células -- en particular, fibroblastos, son estas las dos variedades que en cultivo alcanzan el mayor número de divisiones mitóticas por campo y por tiempo. Para Branwood (12) la frecuencia con la cual coexisten células endoteliales y fibroblastos en estos cultivos sería una característica de relación y citodiferenciación intercelular.

13. Aspectos dinámicos más destacados en las células endoteliales.

Observaciones directas prolongadas de células endoteliales vivas bajo el sistema de contraste de fases o mediante el análisis de los registros microcinematográficos permiten observaciones morfodinámicas de las principales funciones y actividades celulares; de entre ellas, por su riqueza de detalles y su trascendental significado biológico mencionamos la división celular, la translación, la pinocitosis y los cambios morfológicos que experimenta la célula en relación a su momento biológico. En opinión de Payling (29) las divisiones mitóticas tan abundantes en las células endoteliales no están en relación con la edad del organismo, el número de ellas varía de un animal a otro y en la aorta las mitosis son más frecuentes en el arco aórtico y en sitios de constricción vascular.

14. Incorporación de líquidos del exterior hacia el interior de la célula. La incorporación de líquidos involucra en primer término a la membrana celular que, en el caso de las células endoteliales, exhibe activos movimientos ya ondulantes, ya digitiformes y hasta filopódicos que tienen como resultante final la captura por englobamiento de pequeñas cantidades del líquido. La porción de la membrana involucrada en la captura del líquido se separa totalmente del resto de la membrana celular y rodeando a la gota líquida, forma una unidad morfodinámica que se dirige hacia el centro de la célula. Por el momento y

después de numerosísimas observaciones no contamos con un argumento satisfactorio para explicar cómo es que el complejo membrana gota líquida se dirige hacia el centro celular. La ausencia de estructuras relacionables con el movimiento de las vacuolas hacia el centro celular comprende observaciones electrón microscópicas. En algunas células endoteliales la ingestión de líquidos y su transporte hacia el centro celular, hacia el aparato de Golgi, es muy abundante y activa. Tradicionalmente, desde Lewis y Lewis (7) esta incorporación de líquidos se ha calificado de Pinocitosis y se ha adscrito a una forma de endocitosis; pensamos que nuestras observaciones apoyan estas ideas. Sin embargo, resta mucho por aclarar y demostrar cuando se opina que el papel de permeabilidad que la célula endotelial desempeña en la pared vascular se realiza mediante pinocitosis y hasta se propone que las vesículas líquidas son tan pequeñas que se les denomina microvesículas y al fenómeno micropinocitosis. Creemos que es necesario, en todo caso, diferenciar el transporte líquido relacionado con la nutrición celular, es decir, la verdadera Pinocitosis endocítica, del transporte de líquidos de un lado a otro de la pared celular relacionado con los fenómenos o mecanismos de permeabilidad entre el interior del vaso y el medio tisular que le rodea.

Desde el punto de vista citomorfodinámico las vacuolas de la pinocitosis endocitósica empiezan en la membrana citoplásmica, se dirigen hacia el centro metabólico funcional de la célula, hacia la zona

yuxtannuclear y ahí "desaparecen". Con frecuencia las vesículas se reúnen con otras vecinas, por coalescencia, forman otras vesículas más grandes, finalmente las vacuolas al acercarse a la zona yuxtannuclear disminuyen cada vez más de tamaño hasta desaparecer en la íntima vecindad del núcleo o en el seno mismo del aparato de Golgi. Estas vesículas pinocíticas entran en estrecha relación con granulaciones citoplásmicas densas desde la parte media de la distancia que recorren desde la membrana hasta el núcleo. En la medida que las vesículas pinocíticas van desapareciendo, las granulaciones son más abundantes y más densas.

Por otra parte en el citoplasma de nuestras células endoteliales no fué posible observar imágenes morfodinámicas del transporte transmural de vesículas pinocíticas formadas en alguna parte de la membrana citoplásmica y que sin pasar por la zona nuclear, atraviesan la célula y salgan vía membrana en posición opuesta a su formación.

Este hecho morfodinámico creemos que es de gran importancia para explicar la dinámica de la permeabilidad endotelial transmural ya que desde Palade (30) se invoca y se acepta el paso, en un sentido y en otro, de líquidos a través de la célula endotelial. Nosotros en las células endoteliales cultivadas in vitro y procedentes de la capa íntima de vasos arteriales, con imágenes morfológicas extraordinarias, no vimos imágenes relacionables con el transporte transmural. No podemos asegurar que este fenómeno no suceda in situ en donde las células endo-

teliales están sujetas a juegos de presiones hemodinámicas y a otros fenómenos tisulares que repercuten en la fisiología de la pared endotelial, pero, in vitro sólo fué notable la pinocitosis endocítica.

Sin embargo, buscando imágenes citomorfodinámicas que puedan explicar o relacionarse con los procesos de permeabilidad transmural mediante las células endoteliales, encontramos que las células endoteliales in vitro, en el halo de emigración y proliferación, establecen relaciones con las células vecinas en forma especial, mediante prolongaciones citoplásmicas que, al entrar en contacto las de una célula con las vecinas, forman espacios que recuerdan en conjunto al arreglo fenestrado en las uniones de las células endoteliales, tanto de los endotelios propiamente fenestrados como de los capilares sinusoides del hígado, bazo, etc, así como de las uniones transitoriamente fenestradas como se advierte en algunos endotelios capilares.

También in vitro, en los cultivos y mediante la microcinematografía hemos observado uniones intercelulares de células endoteliales, al principio muy estrechas pero poco a poco cuando las células se separan unas de otras, dejan entre ellas, a nivel de sus membranas, puentes citoplásmicos y ventanas (fenestradas); unos y otras, filamentos y ventanas pueden, suclen, desaparecer en otros momentos por nueva consolidación de las aproximaciones y uniones celulares, para tiempo después volver a formarse los puentes y las ventanas.

Cavallo y col. (31) trabajando en angiogenesis de tumores observó que el endotelio muestra fenestraciones periódicas, las cuales aparecen como interrupciones repetidas; el número y distribución del fenestrado es muy variable de una porción de la pared a otra, datos compatibles con nuestras observaciones. Conviene recordar que nuestras observaciones las hemos realizado con células endoteliales de vasos aorta y coronarios, ancestralmente considerados vasos con endotelio cerrado no fenestrado.

Este dato morfodinámico observado en la relación vecinal de las células endoteliales que crecen en el halo de cultivo celular explicaría en forma muy clara la capacidad que tienen las células endoteliales para aproximar sus bordes celulares y establecer muy estrechas y resistentes uniones como las que se observan entre las células endoteliales in situ en los denominados capilares cerrados. Pero que en relación a los momentos funcionales estas mismas células endoteliales pueden entre abrir sus uniones y originar fenestras funcionales, como las que se observan en la microscopía electrónica, para volver a desaparecer nuevamente.

De Bono y col. (32) observó que las uniones célula-célula tan comunes in vivo, e in vitro parece ser que se forman hasta que las células se han aplanado en un substrato adecuado; estas uniones que dan lugar a las aperturas transendoteliales se pierden o se reducen en número considerable, cuando las células son cultivadas, datos pro-

porcionados por Jaffé y col. (16) en su trabajo de cultivo de células endoteliales humanas provenientes de vena umbilical.

Por estos espacios es más satisfactoria la explicación del paso de líquidos y contenido capilar hacia los tejidos y de los tejidos hacia el vaso. Las presiones hidrostática, oncótica y otros factores auspiciarían o interferirían el paso transmural intercelular.

Esta nuestra idea, se refuerza con las opiniones de otros investigadores como Cavallo y col. (31), Milici y col. (33) y Wong y col. (34), quienes dicen que el fenestrado endotelial provee un arreglo donde las sustancias filtradas pueden penetrar la pared del capilar sin pasar a través del citoplasma del endotelio, también opinan que el endotelio esta fenestrado en tejidos donde hay una rápida transferencia de grandes cantidades de producto de secreción o nutrientes absorbido.

La observación morfodinámica in vitro nos permite suponer que las células endoteliales in situ, en los vasos capilares, aún en los llamados "cerrados", en relación al momento funcional de la circulación son capaces de formar ventanas o de cerrarse por completo.

Este mecanismo relacionado con la permeabilidad capilar, a la luz de observaciones en células endoteliales cultivadas, nos parece -- más factible para explicar el paso de líquidos y sustancias a través de

la pared endotelial que invocar la pinocitosis transportativa.

La magnífica revisión que Florey (30) realizó en torno a este problema nos ilustra como ha cambiado el enfoque que se le ha dado al problema de permeabilidad de los vasos; durante siglos se le quiso ver como un fenómeno estático, de ahí la idea de la existencia de poros y canales. Nuestro enfoque dinámico refuerza la idea de que el paso de líquidos y sustancias se realiza principalmente por las uniones celulares y no a través del citoplasma de las células endoteliales.

Milici y col. (33) llaman la atención sobre la formación de ventanas "fenestros" y canales entre las células endoteliales de capilares durante su cultivo in vitro.

Para de Bono y col. (32) la formación de ventanas y canales serían la expresión morfodinámica de la interacción intercelular endotelial.

Sin embargo, para Branwood (12) la formación de ventanas y canales intercelulares sólo se observa en células cultivadas in vitro y cuando las células se han adherido a un substrato plano, liso y resistente.

Cavallo y col. (31) trabajando en angiogénesis experimental en tumores observan que las ventanas y canales intercelulares son más abundantes en aquellos sitios donde existe una gran transferencia rápida de grandes cantidades de productos de secreción o de absorción de nutrientes.

En nuestro material y experiencia la pinocitosis que se observa en nuestras células endoteliales procedentes de los vasos aortocoronarios es principalmente endocitósica; no advertimos evidencias de pinocitosis transportativa relacionada con la permeabilidad celular.

Conclusiones

1. El cultivo in vitro de células endoteliales de los vasos aortocoronarios del miocardio resultó ser un modelo citológico muy adecuado para observar y estudiar la citomorfodinámica de dichas células.

2. Obtener células endoteliales separadas del resto de los constituyentes de los vasos plantea dificultades técnicas que exigen habilidad y experiencia técnicas en esta particular rama de la biología celular.

3. Salvadas las dificultades técnicas mencionadas, de la caparintima de los vasos aortocoronarios del miocardio, obtuvimos y desarrollamos magníficos cultivos de células endoteliales de gran pureza celular para nuestros propósitos de su caracterización morfodinámica.

4. El empleo de sistemas ópticos (Campo Claro, Campo Oscuro, Luz Polarizada, Contraste de Fases, Interferencia Policromática de la Luz, Contraste Diferencial de Interferencias) asociados a la particular disposición laminar de extraordinaria delgadez citoplásmica y disposición en mosaico proporcionó bellas, novedosas y valiosas imágenes morfodinámicas de la biología celular de tan particular variedad celular. En estas condiciones la estructura celular y subcelular son ricas.

en detalles e información dinámica.

5. Con tan magnífico material observamos y estudiamos las imágenes morfodinámicas relacionadas con el problema de la permeabilidad de la célula endotelial al paso de los líquidos y sustancias. En nuestras células endoteliales fueron abundantes y muy ricas en detalles las imágenes de Pinocitosis endocitósica, mientras que nunca observamos Pinocitosis transportativa.

6. Las células endoteliales prácticamente puras que crecieron en el halo de emigración y proliferación de los cultivos y en algunos sitios donde se desarrollaron las células endoteliales a manera de "colonias" pudimos observar y estudiar los fenómenos morfodinámicos de su interrelación en los bordes celulares de células vecinas. En base a nuestras observaciones mediante microcinematografía espaciada pudimos observar y estudiar la frecuencia y facilidad con que las células endoteliales establecen relación entre sus bordes, en unos momentos en forma muy estrecha, íntima y firme mientras que en otros momentos, en esos mismos sitios las uniones celulares se vuelven laxas, se establecen puentes citoplásmicos y se forman ventanas de tamaño variable, las cuales pueden volver a desaparecer en pocos minutos.

7. Pensamos que merced a esta facultad morfodinámica de las células endoteliales para establecer uniones celulares dinámicas relacionadas con los momentos funcionales de las células la pared que re-

presentan las células endoteliales en los llamados capilares cerrados puede fácilmente atravesarse no necesariamente por micropinocitosis transportativa, sino por la aparición y apertura de ventanas o fenestras, no tan grandes y permanentes como en el caso de los endotelios de los capilares sinusoides fenestrados, sino pequeñas y transitorias.

8. En las células endoteliales después de la tercera semana de cultivo es frecuente observar en ellas cambios morfodinámicos relacionados con la transformación y actividad fibroblástica.

BIBLIOGRAFIA

1. Pollak O J, Tissue Cultures Monographs on Atherosclerosis. Vol. 1 Williams & Wilkins Company-Baltimore pp. 68-71, 1969.
2. Carrel A, Burrows M I, Cultivation of adult tissues and organs outside the body. J. Amer. Med. Ass. 55:1379-1381, 1910.
3. Rienhoff W F, Jr. Development and growth the metanephros on permanent Kidney in chick embryo (8-10 day's incubation). Johns Hopk. Hosp. Bull. 33: 392,406, 1922.
4. Maximow A, Über die Entwicklungsfähigkeiten der Blutleu Kozyten und des Blutgefössendothels bei Entzündung und in Gewebeskulturen. Klin. Wschr. 4:1486-1488, 1925.
5. Bloom W, Studies on fibers in tissue cultures. II. The development of elastic fibers in cultures of embryonic heart and aorta. Arch.Zellforsch. 9:6-13, 1929.
6. Shibuya T, On the pure cultivation of endothelial cells from aorta and their differentiation. Kitasato Arch. Exp. Med. 8:68-88, 1931.
7. Lewis W H, The out growth of endothelium and capillaries in tissue culture. Johns Hopk. Hosp. Bull. 48:242-253, 1931.
8. Parshley M S, Deterling R A Jr., Coleman C C Jr., The cultivation in vitro of fresh normal adult aorta(dog, cat, rabbit, goat, monkey, and human). Amer. J. Anat. 93:221-272, 1953.
9. Lazzarini A A Jr., Studies on the effect of lipid emulsions on arterial intimal cells in tissue culture in relation to atherosclerosis. Thesis. Cornell University 106 pp. 1959.
10. Farquhar M, Fine structure and function in capillaries of the anterior Pituitary gland. Angiology. 12:270-276, 1961.

11. Weibel E R, Palade G E, New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J. Cell. Biol.* 23:101-112, 1964.
12. Branwood A W, Growth pattern of arterial endothelium in tissue culture and the effect of lipids, heparin and estradiol on tissue cells. *Cardiovascular Tissue Culture Conf.* Dover; Del. USA. 1961, (Resumen).
13. Robertson A L, Selective isolation of cell monolayers from mammalian organ cultures for metabolic studies. *Abstract. In Vitro.* 3:174-178, 1967.
14. Folkman J, Haudenschild C C, Zetter B, Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(10):5217-5221, 1979.
15. Del Vecchio P J, Ryan U S, Ryan J W, Aislamiento de segmentos de capilares de la glándula adrenal de rata. *J. Cell. Biol.* 75:112-116, 1977.
16. Jaffé E A, Nachman R L, Becker C, Minick R C, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 52:2745-2756, 1973.
17. Pomerat C M, Slick W C, Isolation and growth of endothelial cells in tissue culture. *Nature* 198 (1): 859-861, 1963.
18. Freshney R I, Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R. Liss. Inc. New York, 1984.
19. Folkman J, Haudenschild C C, Angiogenesis in vitro. *Nature.* 288:551-556, 1980.
20. Costero I, Caracterización del sistema fibroblástico I: Bases doctrinales. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 24:237-249, 1954.
21. Costero I, Pomerat C M, Barroso-Moguel R, Chévez Z, Caracterización del sistema fibroblástico II. Fibrogénesis intracelular en tejido conectivo cultivado. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 24:337-372, 1954.
22. Zetter R B, Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumor derived factor. *Nature* 285(1): 427-432, 1980.
23. Gospodarowicz D, Moran J, Braun D, Birdwell C, Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: Fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 73(11): 4120-4124, 1976.

24. Young W C, Herman I M, Extracellular matrix modulation of endothelial cell shape and motility following injury in vitro. *J. Cell Sci.* 73:19-32, 1985.
25. Kempski O, Spatz M, Valet G, Baethmann A, Cell volume regulation of cerebrovascular endothelium in vitro. *J. Cell. Phys.* 123:51-54, 1985.
26. Schwartz S M, Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells. *In vitro* 14 (12): 966-979, 1978.
27. Wechezak A R, Fibroconectin and F-actin redistribution in culture endothelial cells exposed to shear stress. *Lab. Invest.* 56(6): 639-642, 1985.
28. Bowman P D, Rarey K, Rogers C, Goldstein G W, Primary culture of capillary endothelial cells from the spiral ligament and stria vascularis of bovine inner ear. Retention of several endothelial cells properties in vitro. *Cell Tissue Res.* 241: 479-486, 1985.
29. Payling W H, Mitosis Patterns in aortic endothelium. *Atherosclerosis.* 15:93-100, 1972.
30. Florey H, Exchange of substances between the blood and tissues. *Nature.* 192: 908-912, 1961.
31. Cavallo TR, Sade J, Folkman J, Tumor angiogenesis. Rapid induction. *J. Cell Biol.* 54: 408-420, 1972.
32. de Bono D, Green C, Interaction between vascular endothelial cells and vascular intimal spindle-shaped cells in vitro. *J. Cell Sci.* 60:89-102, 1983.
33. Milici A J, Furie M B, Carley W W, The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 (18): 6181-6185, 1985.
34. Wong M K, Gotlieb A J, In vitro reendothelization of a single cell. *Lab. Invest.* 51 (1): 75-81, 1984.

Lámina I

Representación esquemática que ilustra desde el sitio anatómico de donde se obtuvieron los fragmentos matrices hasta los principales resultados obtenidos al ser cultivados in vitro.

Figura 1. Esquema de la aorta en el nacimiento de las arterias coronarias y vascularización del miocardio ventricular en su parte alta. De estos sitios se tomaron los explantes para la siembra.

Figura 2. Esquema de la porción de la pared de la aorta y del nacimiento de la arteria coronaria. Los fragmentos para sembrar se tallaron de estos sitios.

Figura 3. Representación esquemática de un corte transversal de la aorta en la porción donde nace una arteria coronaria. Se ilustran los diferentes componentes tisulares que forman la pared aorto coronaria (capa íntima, capa media y capa adventicia) y los diferentes tipos celulares que las integran, (células endoteliales, histiocitos, fibroblastos, células musculares lisas, células cebadas y células amiboides) y que durante la siembra y cultivo in vitro emigran, forman el halo de crecimiento y expresan su citobiología dinámica.

Figura 4. Cuando los explantes arteriales fueron colocados con la cara adventicia en contacto con la laminilla de siembra las células derivadas fueron desde el principio histiocitos y fibroblastos; varios días después aparecieron las células endoteliales, estableciéndose una población celular muy heterogénea.

Figura 5. Explantes semejantes a los de la Fig. 2. se sembraron poniendo la cara íntima de la porción arterial en contacto con la superficie de la laminilla; la población celular derivada de estos cultivos fue bastante homogénea y formada desde el principio por células endoteliales.

Figura 6. Esquema de un fragmento de miocardio conteniendo vasos de pequeño calibre de la red coronaria que irriga la masa miocárdica; se ilustran las principales variedades celulares que se derivaron durante el cultivo: células endoteliales, histiocitos, fibroblastos y células musculares cardíacas.

Figura 7. Esquema que ilustra los principales cambios observados en los vasos capilares durante su cultivo in vitro. Las células endoteliales emigran de su sitio, adoptan forma amiboide y después se adaptan a la superficie del cristal de siembra y forman las típicas láminas de células planas.

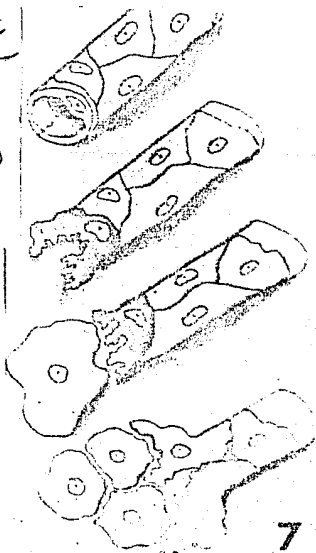
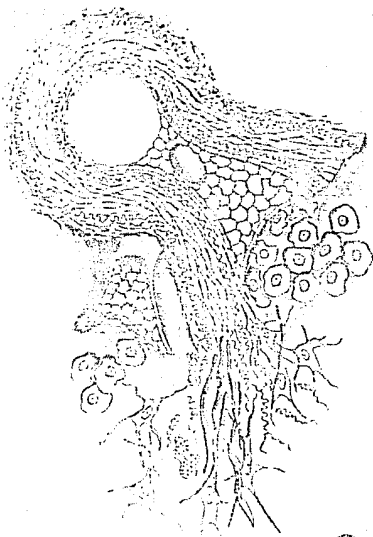
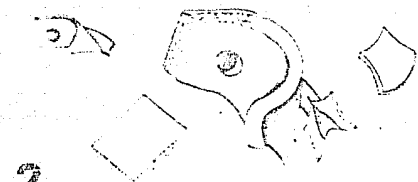
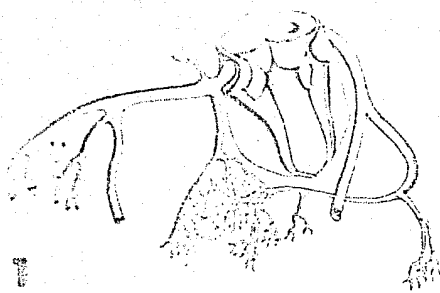
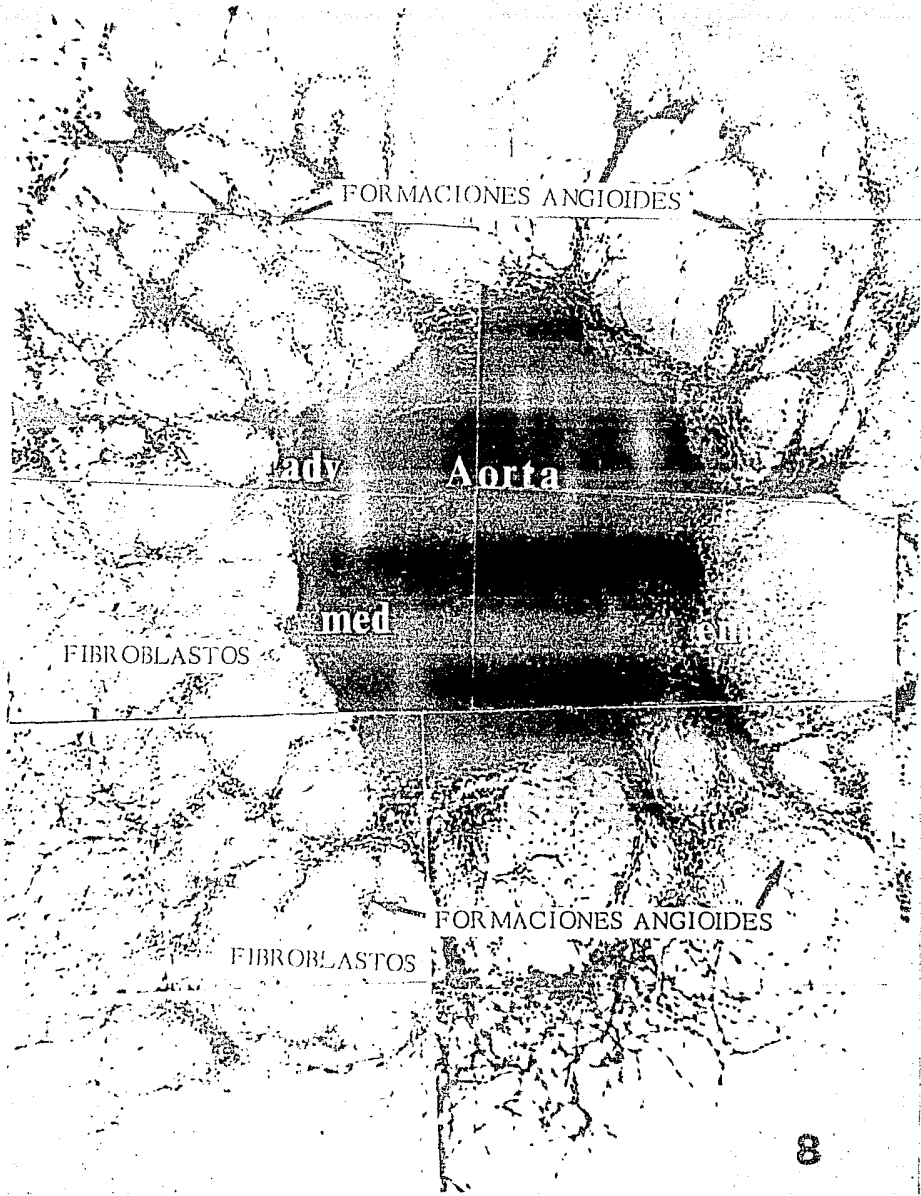


Lámina II
Cultivo de Aorta

Composición en mosaico de 18 campos microscópicos de un cultivo de 2 semanas de un fragmento anular de aorta. Se identifican las capas media y adventicia de la pared arterial. El halo de emigración, crecimiento y proliferación es amplio, muy celular y con notable diferenciación histiogénica angioide. La mayor parte de las células son de las variedades histiocitos, fibroblastos y células endoteliales, en cultivo mixto heterogeneo con gran citodiferenciación.

Aorta de rata. Técnica de Jacobson. 64 X.



FORMACIONES ANGIOIDES

ady Aorta

med

FIBROBLASTOS

FORMACIONES ANGIOIDES

FIBROBLASTOS

Lámina III

Prototipo amiboide libre en emigración

Cultivo de arteria coronaria de rata. Durante las primeras 24 a 48 horas de cultivo, lo más notable es la emigración de células amiboides, macro y microfágicas.

La Fig. 9 corresponde a una imagen de macrófagos (elementos esferoides brillantes). Las células aplanadas son las primeras endoteliales que formaran el halo laminar.

Contraste de Fases. 400 X.

Figs. 10, 11 y 12 células amiboides microfágicas (linfocitos, monocitos, eosinófilos) en emigración; el citoplasma es abundante y en muchas células vacuolar.

Técnica de Jacobson. Campo Claro.

Fig. 10, 250 X; Fig. 11, 500 X; Fig. 12, 625 X.

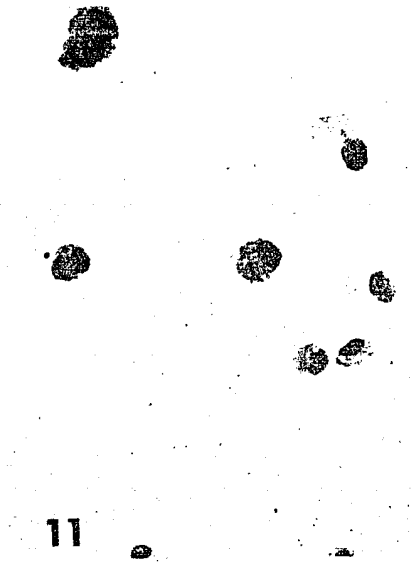
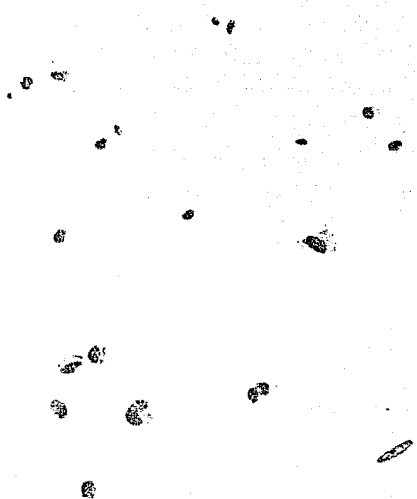


Lámina IV

Prototipo histiocítico y fibroblástico

Fig. 13. Fragmento de arteria coronaria de rata. Cultivo de 48 horas emergencia de 4 histiocitos de citoplasma espinoso y varicoso.

Contraste de Fases. 400 X.

Figs. 14 y 15. Cultivos de arteria coronaria de rata. Cultivos de 72 - 96 horas, emergencia y proliferación de fibroblastos e histiocitos formando un denso halo de células estelares con tendencia a aplanarse e ir formando parte del halo.

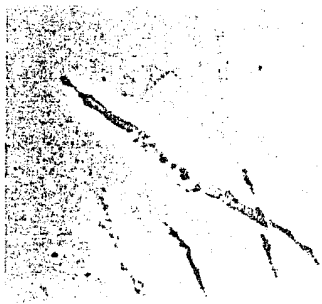
Contraste de Fases. 250 X.

Fig. 16. Conjunto puro de fibroblastos estelares de prolongaciones varicosas. No se advierte actividad fibrogénica.

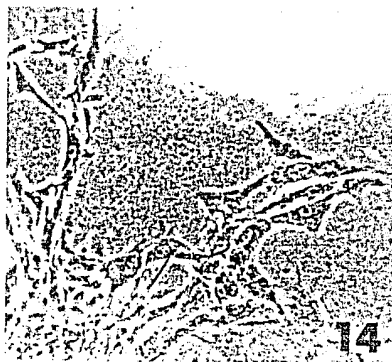
Contraste de Fases. 400 X.

Figs. 17 y 18. Afortunadas imágenes de fibrogénesis en fibroblastos de dos semanas de cultivo. Arteria coronaria de rata.

Contraste de Fases. 650 X.



13



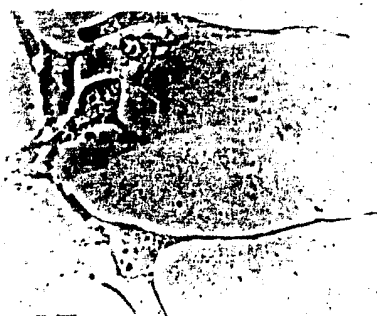
14



15



16



17



18

Lámina V

Células endoteliales típicas

Figuras 19 a la 22. Conjunto de imágenes obtenidas de un cultivo prácticamente puro de células endoteliales derivadas de la siembra de fragmentos de arteria coronaria cuando la capa íntima se puso en contacto directo con el cristal de la laminilla de siembra y cultivo. Cultivo de dos semanas.

La Figura 19 ilustra un típico halo de proliferación de puras células endoteliales en su disposición laminar "epiteloides".

Contraste de Fases. 250 X.

Las Figuras 20, 21 y 22 ilustran con detalles estructurales poco frecuentes, la morfología característica de las células endoteliales y algunas de sus peculiares relaciones celulares relacionadas con la formación de "ventanas" o "fenestras".

Contraste de Fases. 900 X.

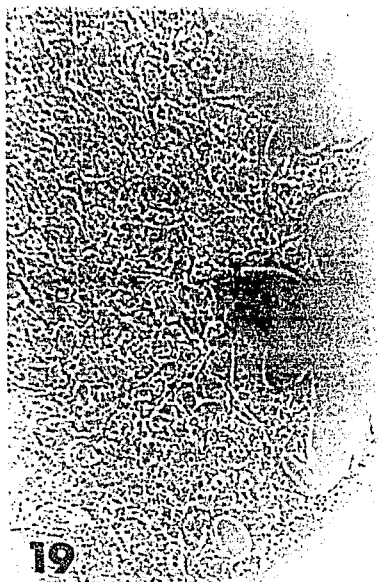


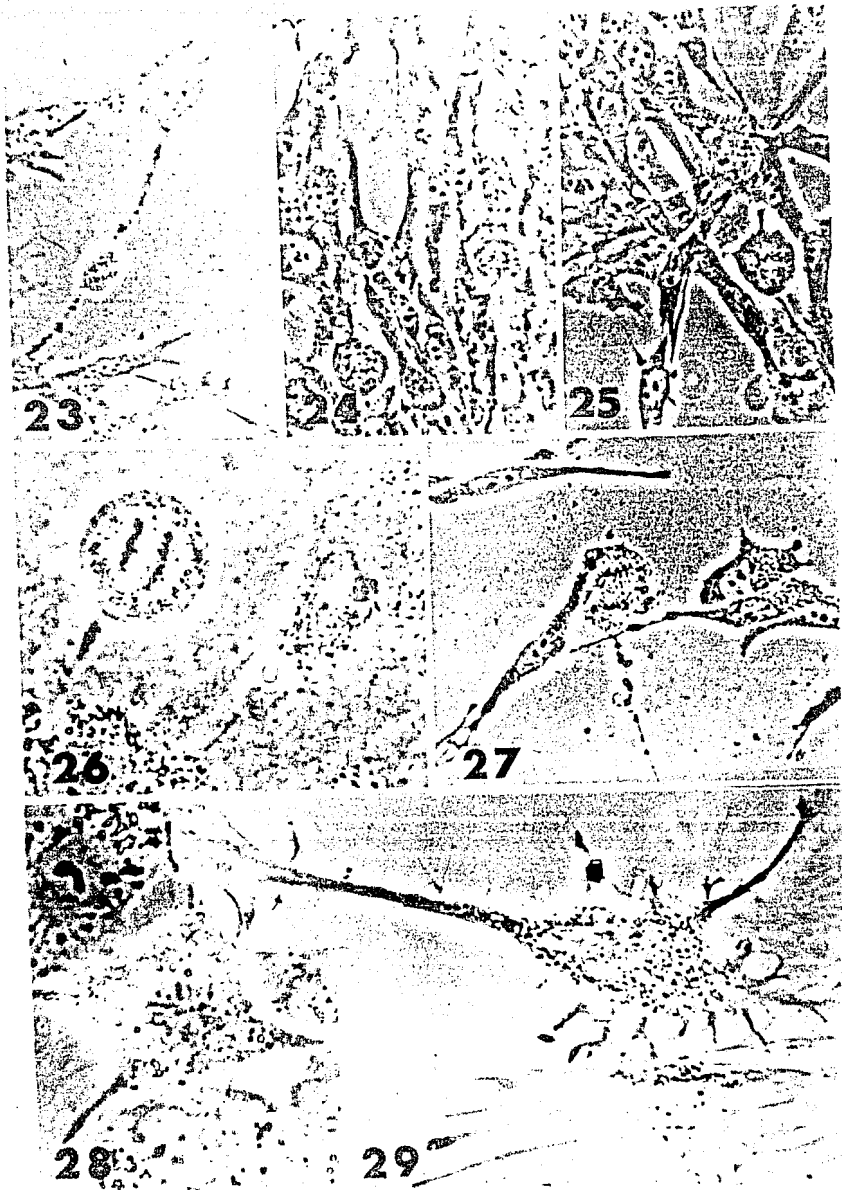
Lámina VI
Actividad Mitótica

Figuras 23 a la 29. Ejemplos de la gran actividad proliferativa mitótica en las células del halo a partir del cuarto día de cultivo hasta dos semanas.

Las imágenes ilustran anafases y telofases en donde los cromosomas y el huso acromático se observan con extraordinarios detalles.

Cultivo de aorta y arteria coronaria de rata.

Contraste de Fases. Figs. 23 a 25, 500 X; Fig. 26, 1000 X; Fig. 27, 800 X; Fig. 28, 1000 X; Fig. 29, 650 X.



23

24

25

26

27

28

29

Lámina VII

Morfología y relaciones intercelulares de las células
endoteliales.

Segmentos de la periferia del halo de proliferación de células endoteliales puras derivadas de la capa íntima de arteria coronaria cultivadas in vitro durante 10 días.

Figuras 30 a la 33. Células endoteliales típicas que después de agruparse en mosaicos de células planas, laminares, forman ventanas, espacios entre sus bordes de relación celular en los cuales se advierte colección líquida que, al aumentar e infiltrarse entre las células, las separa cada vez más hasta formar espacios muy amplios.

Este fenómeno puede ser regresivo y las células vuelven a entrar en estrecho contacto de sus bordes.

Todas las células muestran, con finos detalles, su estructura "in vivo"; la célula de la Fig. 33 está extremadamente extendida y exhibe su citoplasma, núcleo y nucléolo muy delgados.

Contraste de Fases. 900 X.

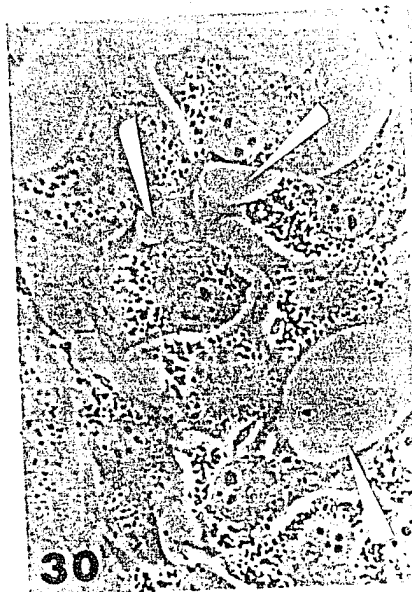


Lámina VIII

Morfología ultraestructural de células endoteliales

Cuatro extraordinarias imágenes ricas en detalles ultraestructurales en relación a diferentes estados funcionales de las células endoteliales.

Las Figs. 34, 35 y 36 son particularmente afortunadas en mostrar aparatos yuxtancleares de Golgi en diferentes grados de evolución funcional. En la Fig. 34 predominan los organelos granulares y vacuolares, mientras que en las células de las figuras 35 y 36 son principalmente filamentosos y vacuolares; en estas mismas células la membrana nuclear, el núcleo y los nucléolos [parecen dibujados].

Las Figs. 36 y 37 ilustran aspectos filamentosos, filopódicos, de la membrana en expresiones morfológicas desmosómicas. En la célula de la Fig. 37, se observan organelos mitocondriales filamentosos y abundantes filopodios.

Contraste de Fases. Figs. 34, 900 X; Figs. 35 y 36 y 37, 2000 X.

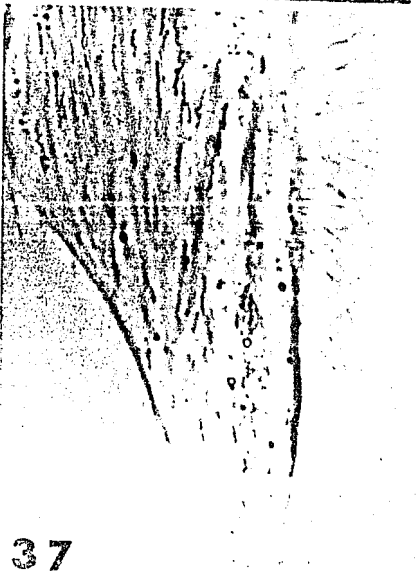
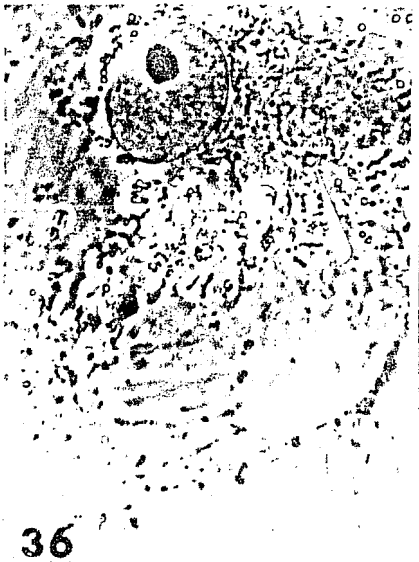


Lámina IX

Pinocitosis

Figuras 38 a 42. Imágenes de conjunto y detalles de endocitosis en las células endoteliales del borde del halo de crecimiento. La mayor parte de las células muestran en su citoplasma vacuolas pinocíticas en número y tamaño variable.

Este tipo de pinocitosis (que la hemos calificado de Pinocitosis endocítica metabólica) es muy activa en los márgenes libres de las células. Las imágenes de esta Lámina se complementan con las de la Lámina XIII.

Escasas o numerosas, pequeñas o grandes, - todas estas vacuolas nacen por engolfamiento de la - membrana, se dirigen hacia la región yuxtannuclear y en la zona ultraestructural del aparato de Golgi, desaparecen.

Cultivo de células endoteliales derivadas de la capa íntima de arteria coronaria; 2 semanas de cultivo *in vitro*.

Contraste de Fases. Figs. 38 y 39, 390 X; Figs. 40 y 41, 800 X; Fig. 42, 1600 X.



Lámina X

Nomicoplasia fibrogénica

Principales cambios de células endoteliales - relacionadas con su "transformación" y actividad fibrogénica.

Células endoteliales procedentes de la capa íntima de la arteria coronaria; dos semanas de cultivo.

Figura 43. Imagen típica de una célula endotelial aislada, laminar, delgada con notable actividad de su membrana plasmática; núcleo grande, vesicular, pálido, aparato de Golgi y endoplasma granuloso. Ninguna estructura podría relacionarse con fibrogénesis.

Contraste de Fases. 900 X.

Figuras 44, 45 y 46. Modificaciones membrano-citoplásmicas que terminan en la formación de prolongaciones filamentosas persistentes, simples o ramificadas, estelares que imprimen a la célula endotelial aspecto de fibroblasto en actividad fibrogénica.

Contraste de Fases. 900 X. Fig. 46, 800 X.

Figura 47. Dos células endoteliales en plena actividad fibrogénica reticular intracelular (inofibrillas, protofibrillas de Mason, de Costero, respectivamente).

Contraste de Fases. 800 X.

Figura 48. Campo del halo de proliferación endotelial con profundos cambios hacia fibroblastos y fibrogénesis activa.

Células y fibras en típica disposición reticular.
Contraste de Fases. 500 X.

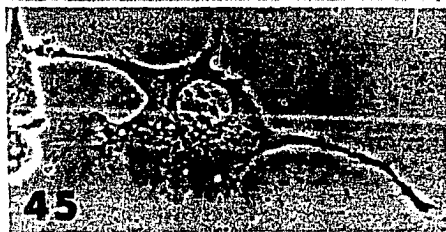


Lámina XI

Detalles ultraestructurales especiales de células endoteliales

Fig. 49. Célula endotelial de la capa íntima de la arteria coronaria. Célula binucleada con finos detalles ultraestructurales de la membrana nuclear, morfología nucleolo-nucleolar; concentración yuxt nuclear de organelos mitocondriales filamentosos (Aparato de Golgi). Estas imágenes son características de células de gran actividad metabólica.

Contraste de Fases. 1800 X.

Fig. 50. Célula endotelial con núcleo vesiculoso, pálido, transparente, membrana nuclear poco diferenciada, nucléolo múltiple y polimorfo. El aparato de Golgi está constituido prácticamente sólo por organelos microvacuolares, que recuerdan a células secretoras.

Contraste de Fases. 950 X.

Fig. 51. Dos células endoteliales derivadas de la pared de un vaso capilar del tejido miocárdico. En un largo trayecto las dos células conservan su estrecha unión íntima (parece una línea simple); en el segmento inferior se advierte separación a la manera de fenestración.

Contraste de Fases. 800 X.

Figs. 52 y 53. Conjuntos de células endoteliales derivadas de la pared de finos vasos capilares del tejido miocárdico que aún conservan sus relaciones de uniones celulares, a pesar de haberse desintegrado el vaso capilar. Típica morfología estructura y disposición de las células endoteliales de procedencia capilar. Formaciones intercelulares a manera de "fenestraciones"; filopodios filamentosos.

Contraste de Fases. 650 X.

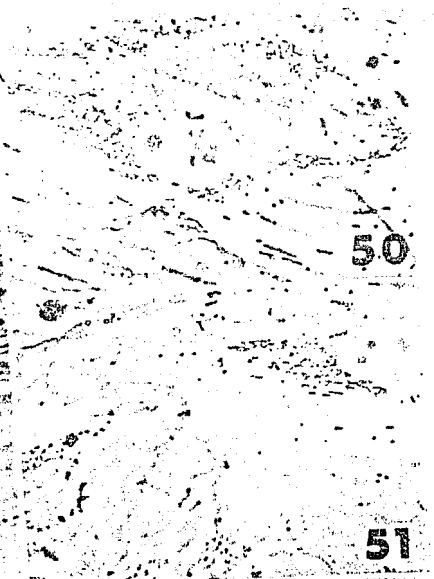
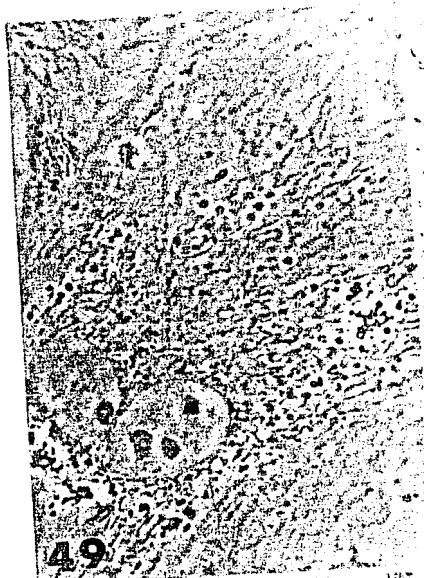


Lámina XII

Células musculares lisas

Figuras 54 a la 57.

Células musculares lisas derivadas de la pared arterial, de la capa fibromuscular retículo elástica. Las células marcadas no son musculares, todas las demás, independientemente de su morfología son musculares lisas. Estas células, en su magnífico crecimiento y cultivo in vitro son "contaminantes" de los cultivos de células endoteliales y confirman las magníficas condiciones biológicas de los cultivos. Contraste de Fases. Figs. 54, 55 y 56, 650 X; Fig. 57, 450 X.

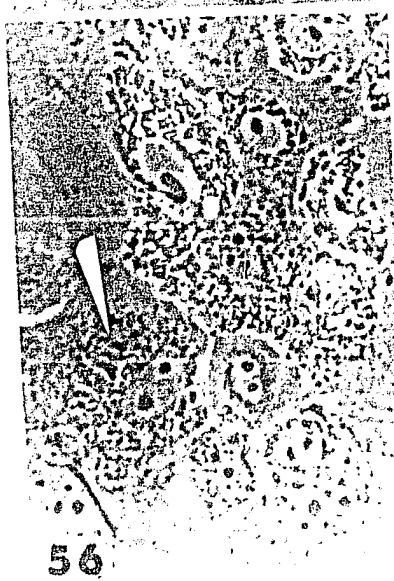
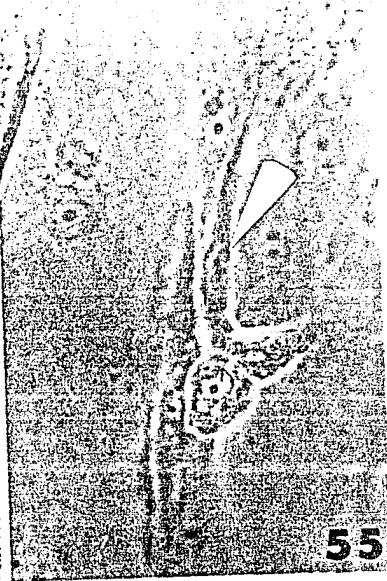
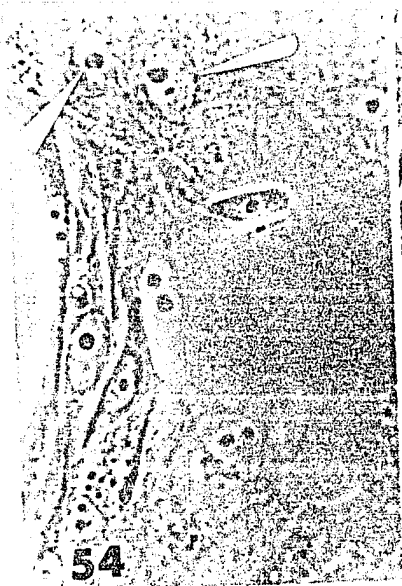


Lámina XIII

Pinocitosis

Análisis de la Pinocitosis endocítica mediante una serie secuencial en el mismo lugar de una misma célula endotelial y entre cada microfotografía existen 6 minutos de diferencia; todo el proceso transcurrió en 48 minutos.

De la Figura 58 a la 66 los principales cambios se advierten en la membrana plasmática en relación con la captura de las gotas líquidas (que lucen como vacuolas); puede observarse, con lujo de detalles, la relación membrana líquido, su tránsito hacia el núcleo y su destino metabólico final.

La zona señalada con la letra G corresponde a una porción del aparato de Golgi en la inmediata vecindad del núcleo; las finas granulaciones anulares forman parte del endoplasma perinuclear granular. Con las letras V y un número se indica el orden en el tiempo de formación de dicha vacuola, desde su origen en la membrana hasta su arribo a la zona yuxtanuclear, y su relación con otras vacuolas.

Este estudio demuestra, entre otras cosas, que las vacuolas entran a la célula, pero no salen, es decir, no hay transporte transcelular.

Célula endotelial de arteria coronaria; 10 días de cultivo in vitro.

Contraste de Fases. 3200 X.

