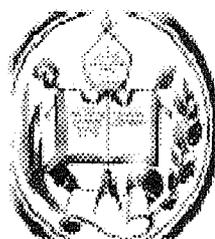


QP104
J3



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES**

**CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL Y ANÁLISIS DE
PROCESOS BIOLÓGICOS EN CARDIOMIOCITOS MURINOS
EN CULTIVOS HISTOTÍPICOS ROTATORIOS**

MSc. NANCY JAIMES MÉNDEZ

DOYACION

SERBIULA
Tulio Febres Cordero

Mérida, Venezuela
2013

Trabajo presentado como parte de los requisitos exigidos por el
Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales
de la Facultad de Medicina
de la Universidad de Los Andes,
para optar al Título de

DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

www.bdigital.ula.ve

Bajo la tutoría de la
Dra. Rosa Virginia Mendoza Briceño

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL Y ANÁLISIS DE PROCESOS BIOLÓGICOS EN CARDIOMIOCITOS MURINOS EN CULTIVOS HISTOTÍPICOS ROTATORIOS

Autora: MSc. Nancy Jaimes Méndez

Tutora: Dra. Rosa Virginia Mendoza Briceño

RESUMEN

Los cultivos primarios de miocitos cardíacos embrionarios o neonatales se han utilizado en la investigación cardiovascular por ser un modelo experimental estable, reproducible, de sencilla medición de los parámetros funcionales/estructurales y con un entorno fisiológico relativamente natural y controlado. El modelo de Cultivo Histotípico Rotatorio propuesto por Moscona, Moscona y Garber y modificado por Palacios-Prü y colaboradores, que se presenta en este trabajo posee las anteriores características, a la vez ofrece estabilidad y permite la evaluación fenotípico celular del tejido muscular cardíaco, así como la reproducibilidad determinada por el Período Crítico que corresponde a 21 días de desarrollo embrionario y 6 días de cultivo (E21-6). El análisis ultraestructural de las miofibrillas en los cardiomiocitos E21-6 revela una citoarquitectura organizada; como es la distribución de las miofibrillas ramificadas y dispuestas siguiendo el eje longitudinal de la célula e intercaladas con mitocondrias, esta conformación se relaciona con la forma alargada de los cardiomiocitos y con el aumento de la longitud de las miofibrillas; además se observa la presencia de estriaciones transversales de las sarcómeras, formando las bandas Z, A, I, H y una pseudobanda M, así como también se evidencian fascias adherentes, binucleación y esbozos del sistema de túbulos T. El proceso de diferenciación de las miofibrillas en los cardiomiocitos es progresivo en los diferentes espacios celulares y durante el mismo se sintetizan e incorporan nuevas proteínas para mantener la estructura funcional del músculo cardíaco, indicando que la estructura de la sarcómera es dinámica. Los Cultivos Rotatorios se proponen, además, como un modelo para monitorear procesos biológicos como la síntesis de ADN y la apoptosis en condiciones experimentales. El proceso de síntesis de ADN monitoreado con la técnica de BrdU en cardiomiocitos indica que los valores promedios de síntesis de ADN es mayor en los cardiomiocitos *in situ* E21 (22%) e *in situ* P5 (16%) que en los cardiomiocitos *in vitro* E21 (15%). En los cardiomiocitos E21 en Cultivos Histotípicos Rotatorios se evidencia un mayor porcentaje de apoptosis (25,72%) comparado con los observados en los cardiomiocitos E21 (5,7%) y P5 *in situ* (14,5%). En conclusión, el modelo de cultivo rotatorio permite a las células cardíacas E21 alcanzar después de 6 días de cultivo, las características fenotípicas de sus homólogas *in situ*, con mayor semejanza a los cardiomiocitos P5, indicando que las células se han adaptado a las condiciones de cultivo y han logrado restablecer una ultraestructura miotípica.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Centro de Microscopía Electrónica “*Dr. Ernesto Palacios Prù*” y del Instituto de Inmunología Clínica “*Dr. Luis Pasteur*” de la Universidad de Los Andes, quienes dieron el impulso científico, técnico y económico, necesario para el desarrollo del presente trabajo.

De igual manera se recibió el apoyo de la Universidad de Pamplona-Colombia, Institución que me concedió el beneficio de Comisión de Estudios para la realización del Postgrado.

DEDICATORIA

A la vida por haberme permitido lograr mis objetivos.

www.bdigital.ula.ve

*A mi familia, especialmente a mi madre Cecilia y mi padre José Joaquín (QEPD)
por su infinita bondad y amor.*

2.2 Cultivos Rotatorios Íntegros	35
2.3 Microscopía Electrónica	35
2.4 Obtención de Cardiomiocitos	36
2.5 Análisis de la Síntesis de ADN por Citometría de Flujo	37
2.6 Análisis del Ciclo Celular y de la Apoptosis por Citometría de Flujo	37
2.7 Análisis Estadístico	38
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1 Período Crítico para los Cardiomiocitos en Cultivos Rotatorios	38
3.2 Análisis de la Síntesis de ADN, Ciclo Celular, Apoptosis y Proliferación de los Cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios	48
3.2.1 Apoptosis y Proliferación de los Cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios	49
3.2.2 Ciclo Celular y Apoptosis	54
3.3 Análisis Estadístico	59
4. CONCLUSIONES	63
5. RECOMENDACIONES	65
6. BIBLIOGRAFÍA	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Porcentaje de síntesis de ADN en los cardiomiocitos en etapas embrionaria y postnatal	26
Tabla 2.	Proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas y pro-apoptóticas	31
Tabla 3.	Comparación morfológica entre apoptosis y necrosis	32
Tabla 4.	Porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos en cultivos en placa	34
Tabla 5.	Porcentaje de síntesis de ADN en cardiomiocitos <i>in situ</i> e <i>in vitro</i>	51
Tabla 6.	Porcentaje de apoptosis y fases del ciclo celular en cardiomiocitos <i>in situ</i> e <i>in vitro</i>	54
Tabla 7.	Comparación de los promedios \pm DE de síntesis de ADN en cardiomiocitos en cultivos histotípicos rotatorios y en edades embrionaria E21 y postnatal P5, utilizando ANOVA	59
Tabla 8.	Comparaciones múltiples de la síntesis de ADN utilizando la Prueba de Dunnett	60
Tabla 9.	Comparación de los promedios \pm DE de las etapas del ciclo celular en cardiomiocitos en cultivos histotípicos rotatorios y en edades embrionaria E21 y postnatal P5, utilizando ANOVA	61
Tabla 10.	Comparaciones múltiples de las etapas del ciclo celular utilizando la Prueba de Dunnett	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Organización de los componentes de la sarcómera del músculo cardíaco	14
Figura 2.	Características ultraestructurales de cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario <i>in situ</i> e <i>in vitro</i> y de 5 días de desarrollo postnatal <i>in situ</i>	42
Figura 3.	Cardiomiocitos de ratón E21 provenientes de cultivos histotípicos rotatorios a y b.	44
Figura 4.	Población celular con cardiomiocitos recién disociados	49
Figura 5.	Relación entre tamaño celular, granularidad celular y presencia de miosina	50
Figura 6.	Población de cardiomiocitos marcados con Miosina-PE y positivos para BrdU-FITC	50
Figura 7.	Representación de los porcentajes de síntesis de ADN	52
Figura 8.	Fase apoptótica inicial en cardiomiocitos de ratón E21 provenientes de cultivos histotípicos rotatorios	53
Figura 9.	Cuantificación de cardiomiocitos en las diferentes fases del ciclo celular	55
Figura 10.	Porcentaje de cardiomiocitos en las diferentes fases del ciclo celular	56
Figura 11.	Porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos <i>in situ</i> e <i>in vitro</i>	57
Figura 12.	Porcentaje de síntesis de ADN (fase S) en cardiomiocitos <i>in situ</i> e <i>in vitro</i>	58

INTRODUCCIÓN

Los cardiomiocitos, células musculares especializadas capaces de convertir energía química en contracción mecánica, acumulan en el citoplasma proteínas sarcoméricas con una distribución característica, desarrollando en su citoarquitectura paquetes de miofibrillas que contienen miofilamentos. Las miofibrillas tienen repetidas unidades microanatómicas, llamadas sarcómeras, que son la unidad funcional y contráctil básica del tejido cardíaco (Ehler y Perriard, 2002). La miofibrillogénesis es el proceso mediante el cual las células musculares adquieren y ensamblan su aparato contráctil altamente estructurado, durante el desarrollo muscular de los vertebrados; su importancia radica en que el corazón es uno de los primeros órganos que inician su funcionamiento en los embriones de vertebrados (Sanger y Sanger, 2002). Los cultivos primarios de miocitos cardíacos embrionarios o neonatales se han utilizado en la investigación cardiovascular durante más de 40 años y es un modelo experimental estable, reproducible, de sencilla medición de los parámetros funcionales/estructurales y con un entorno fisiológico controlado (Eschenhagen y col., 1997). De igual manera, el modelo de Cultivo Rotatorio que se presenta en este trabajo ofrece características de estabilidad y mantenimiento de las características fenotípicas propias del tejido muscular cardíaco, así como reproducibilidad determinada por el Período Crítico. Además, es un modelo de cultivo en el que se mantiene la síntesis de ADN y puede ser utilizado para estudios del proceso de apoptosis. La metodología utilizada para Cultivos Rotatorios es la propuesta por Moscona, Moscona y Garber y modificada por Palacios-Prü y colaboradores (Garber, 1963; Garber y Moscona, 1972; Moscona, 1952, 1961a, 1961b, 1962, 1964; Moscona y Moscona, 1963; Palacios-Prü y col., 1976a, 1976b, 1976c, 1977, 1978).

En esta investigación se analiza la citodiferenciación de los cardiomiocitos en ratón de edades embrionarias y postnatales, por medio del análisis ultraestructural, lo que permitió establecer el Período Crítico, así mismo se comparan las características fenotípicas de los cardiomiocitos en Cultivos Rotatorios con las presentes en los cardiomiocitos *in situ* de las edades estudiadas. Después de establecer el Período Crítico se realiza la caracterización de procesos biológicos como son la síntesis de ADN,

la apoptosis y la proliferación celular y los resultados se comparan con los presentes *in situ*.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Cultivos de Tejidos

El cultivo de tejidos fue ideado a principios del siglo XX como un método para estudiar el comportamiento de células animales, libres de variaciones sistémicas propias del organismo que las contiene. La técnica inicialmente utilizó fragmentos de tejido (explantes primarios) sin disgregar y el crecimiento celular se limitó a la migración de las células en los mismos fragmentos del tejido. A mitad del siglo XX es cuando se empiezan a realizar cultivos celulares disociados. En la actualidad "Cultivo de Tejidos" es un término genérico que incluye tanto cultivo de explantes de tejidos y de órganos como de células disociadas o aisladas (Freshney, 2000).

Existen diferentes tipos de cultivo, entre los que se pueden mencionar:

Cultivos de órganos: Es el mantenimiento o crecimiento *in vitro* de todo o parte de un órgano, de manera que permita la diferenciación y/o preservación de la arquitectura o función del órgano.

Cultivos organotípicos: Son células disociadas de un mismo linaje o de diferentes linajes o fragmentos de tejidos que se recombinan para crear un modelo de interacción celular característico de un órgano *in situ* (Freshney, 2000).

Cuando se trata de células disociadas y de diferentes linajes, las células de un mismo linaje se recombinan a través de mecanismos de interacción celular hasta formar tejidos con las características del tejido propio del órgano *in situ*.

Cultivo celular: Es el crecimiento de células disociadas a partir de un tejido por migración espontánea o dispersión mecánica o enzimática. (Freshney, 2000). El cultivo

de células puede ser derivado de células dispersas tomadas de un tejido primario o también de una línea celular.

Línea celular: Se define como la propagación de un cultivo después del primer subcultivo. Las líneas celulares pueden ser continuas, es decir, las células tienen la capacidad de sobrevivir infinitamente; este tipo de línea celular puede ser de tejido normal o neoplásico. Otro tipo de línea celular es el finito, que se define como el cultivo que es propagado por subcultivos, pero sólo es capaz de producir, antes de morir, un número limitado de generaciones celulares *in vitro* (Freshney, 2000).

Desde hace más de 30 años en la Universidad de Los Andes, en Mérida – Venezuela, se han desarrollado cultivos de tejidos utilizando diversas metodologías y diferentes tejidos, en búsqueda de garantizar que las células y tejidos cultivados desarrollen y/o mantengan condiciones óptimas de morfología y funcionalismo, de manera que sean un modelo fisiológico que permita ensayos *in vitro* con diferentes variables biológicas. Para establecer la existencia de esas condiciones óptimas es necesario lograr la histotípia del tejido cultivado, la cual a su vez está determinada por la citotípia y la topotípia de la población celular cultivada. El término Histotípia, introducido por Maximow en 1925, indica el crecimiento *in vitro* de conjuntos celulares cuya organización es semejante a la que tiene *in situ* el órgano o tejido homólogo; mientras que Citotípia se refiere a las características propias que identifican a cada tipo celular y que generalmente se alcanzan una vez que cada célula se ubica en el sitio definitivo (Topotípia) que va a ocupar en el tejido o en el órgano. El análisis de la histotípia celular comprende básicamente tres aspectos: la diferenciación citológica, la diferenciación morfológica externa y el establecimiento de interrelaciones celulares, que en conjunto definen el grado de fenotípia que se obtiene en los cultivos y son la base para determinar el Período Crítico propio de cada tejido y de cada especie animal estudiada y que no es otra cosa que el momento, en tiempo, en el cual un cultivo muestra su citotípia y su histotípia y que de acuerdo a la experiencia tiene una duración aproximada de 48h (Maximow, 1925; Palacios-Prü y col., 1976a, 1976b, 1976c, 1977; 1978).

Para la obtención de Cultivos Histotípicos Rotatorios se debe seleccionar el procedimiento adecuado que permita a las células desarrollar *in vitro* las características fenotípicas de sus homólogas *in situ*. En este sentido, en la Unidad de Cultivo de Tejidos del Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios Prú" de la Universidad de Los Andes, se han implementado dos procedimientos para cultivo de tejidos que han demostrado alta eficacia y reproducibilidad. Uno se fundamenta en el procedimiento descrito por Moscona, Moscona y Garber (Garber, 1963; Garber y Moscona, 1972; Moscona, 1952, 1961a, 1961b, 1962, 1964, 1973; Moscona y Moscona, 1963) para cultivar células disociadas y el otro procedimiento se basa en cultivar fragmentos de tejido íntegros, no disociados. En ambos casos se utilizan medios de incubación líquidos y se mantienen las células y/o los tejidos en continua rotación. Ambos procedimientos son complementarios ya que cuando se necesita explorar los mecanismos propios del reconocimiento celular, los cultivos por disociación son más convenientes; mientras que cuando el interés es estudiar la diferenciación celular y el establecimiento de interrelaciones celulares, los cultivos de fragmentos íntegros dan mejor resultado. Por otra parte, se debe considerar que la edad del tejido a cultivar es de la mayor importancia ya que se pueden cultivar células o tejidos adultos o embrionarios; sin embargo, cuando el interés es el análisis de la diferenciación celular o tisular, es obligatoria la utilización de material embrionario o en edad postnatal temprana, porque además de simplificar las condiciones experimentales, son etapas en las cuales las células tienen el máximo de potencialidad para expresarse. Finalmente, es de destacar la importancia del sistema de incubación a utilizar y en el presente trabajo no se usan sistemas de soporte y el tejido se cultiva por rotación en medios líquidos, lo cual por una parte evita que los fragmentos de tejido y/o las células desarrollen deformaciones mecánicas producidas en cultivos de base sólida y por la otra, permite que el tejido cultivado se exprese tridimensionalmente.

Teniendo en cuenta lo anterior, se habla de Cultivos Íntegros cuando fragmentos pequeños (3 mm^3 aproximadamente) de un tejido son incubados en un medio de cultivo líquido y mantenidos en rotación constante en condiciones controladas de temperatura y concentración de oxígeno y de dióxido de carbono. Mientras que los Cultivos Disociados

son células provenientes de un tejido, que son disgregadas enzimática o mecánicamente, incubadas en un medio de cultivo líquido y mantenidas, al igual que los Cultivos Íntegros, en condiciones controladas de rotación, temperatura y concentración de oxígeno y de dióxido de carbono. Estos Cultivos Disociados denominados también Agregados Celulares, fueron inicialmente desarrollados por Moscona, Moscona y Garber en el período comprendido desde 1961 a 1973, a pesar que ya habían realizado ensayos desde 1952 (Garber, 1963; Garber y Moscona, 1972; Moscona, 1952, 1961a, 1961b, 1962, 1964, 1973; Moscona y Moscona, 1963) y ofrecen la ventaja de permitir, además del crecimiento celular individualizado y el reconocimiento celular entre células de un mismo linaje, el reensamblaje de estas para la reconstrucción del tejido del cual son originarias.

Cuando se trabaja con Cultivos Íntegros y con Cultivos por Disociación se debe tener en cuenta el Período Crítico, el cual se define como el momento del desarrollo (edad embrionaria o postnatal) cuando un tejido determinado está en capacidad de expresar, en condiciones *in vitro*, sus características fenotípicas, lo que a la vez le permite manifestar la funcionalidad celular y tisular al alcanzar *in vitro*, el mayor grado de características histotípicas (Palacios-Prü y col., 1978). El Período Crítico es una característica individualizada para cada tejido y a la vez es variable de una especie animal a otra. La expresión del Período Crítico se extiende durante un lapso de aproximadamente 48 horas; por ejemplo, para la corteza cerebelosa en las aves (*Gallus gallus*) el Período Crítico es el día embrionario 16 (E16) \pm 24 horas, mientras que en el ratón (*Mus musculus*) para el mismo tejido es el día postnatal 9 (P9) \pm 24 horas.

Tomando en consideración lo expuesto anteriormente, en los Cultivos Rotatorios los fragmentos de tejido o las células disociadas son capaces de desarrollar las características fenotípicas, expresando de esta manera la citoarquitectura original del tejido del cual provienen (Palacios-Prü y col., 1976c, 1982, 1995); sin embargo, la histotípia sólo se obtiene cuando los cultivos provienen de la edad correspondiente al Período Crítico que, como se indicó anteriormente, es específica para cada tipo de tejido y para cada especie animal. Es decir que se pueden desarrollar Cultivos Rotatorios y/o Cultivos Disociados no histotípicos, cuando los fragmentos o células provienen de

edades diferentes al Período Crítico, por lo tanto los Cultivos Íntegros como los Disociados pueden ser Histotípicos o No Histotípicos.

El término Histotípia fue introducido por Maximow en 1925, para indicar el crecimiento *in vitro* de conjuntos celulares cuya organización es semejante a la que tiene el órgano o tejido homólogo *in situ*. Para determinar la histotípia de un tejido en cultivo se debe tener en cuenta el desarrollo citológico, el desarrollo de las características fenotípicas externas y el establecimiento de las interrelaciones celulares (Maximow, 1925).

Freshney en el 2000, define el Cultivo Histotípico como la técnica de conservar y mantener *in vitro* la estructura de un tejido lo más parecido morfológicamente al tejido *in situ*. Usualmente es un cultivo tridimensional en el que, a partir del cultivo de células dispersas que intentan recuperar por proliferación celular y formación de multicapas o por reagregación, se recrea una estructura igual a la del tejido del cual proviene. Esta definición coincide con la definición de Cultivo Histotípico propuesta por Palacios-Prü y col. al decir que se mantiene la estructura original del tejido, pero hay diferencias en cuanto a la metodología propuesta, debido a que Palacios-Prü y col. afirman que el Cultivo Histotípico se obtiene cuando se realiza a partir de fragmentos de tejido o de células dispersas que provienen de la edad correspondiente al Período Crítico (Freshney, 2000; Palacios-Prü y col., 1977).

1.1.2. Cultivos de Tejido Cardíaco

Las primeras referencias sobre el cultivo de este tejido datan de 1912 cuando Burrows cultivó explantes de tejido cardíaco embrionario de pollo. Posteriormente, en 1955 Cavanaugh disoció y mantuvo en cultivo células individuales de este tejido y en 1960 Harary y Farley cultivaron cardiomiocitos de mamíferos (citado por Mitcheson y col., 1998).

A partir de entonces se han utilizado y aun se siguen empleando cultivos de cardiomiocitos embrionarios, neonatales y adultos para explorar actividades intracelulares, como son la transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN), la síntesis y expresión de proteínas de los canales iónicos y las isoformas de proteínas contráctiles

(Mitcheson y col., 1998, Bird y col., 2003; Chan y col., 2008), la miofibrillogénesis (Anversa y col., 1981; Atherton y col., 1986; Atherton y Behnke, 1988; Decker y col., 1991; Dabiri y col., 1997; Dube, 2002; Sanger y Sanger, 2002; Mudry y col., 2003, Lu y Horowitz, 2008), el metabolismo energético y de fármacos, el ciclo celular (Soonpaa y Field, 1998; Maruyama y col., 2001; Pasumarthi y Fiel, 2002; Ahuja y col., 2007), la diferenciación celular (Bugaisky y Zak, 1989; Evans y col., 2003), la apoptosis (Cook y Poole-Wilson, 1999, Haunstetter e Izumo, 2000 a,b; Adachi y col., 2001; Kang e Izumo, 2003; Dorn, 2009), el flujo de calcio, estudios sobre receptores, metabolitos y transducción de señales, así como también a nivel de interacciones del medio ambiente en procesos como infecciones (Aprigliano y col., 1993; Bergdolt y col., 1994; Bustamante y col., 2002; Melo y col., 2004), interacciones receptores/ligandos y efectos tóxicos como la citotoxicidad del disulfuro de carbono (Tan y col., 2003).

Por otra parte, en las interacciones celulares se incluyen los procesos de morfogénesis, diferenciación (Bugaisky y Zak, 1989), maduración y función de los cardiomiocitos (Tobita y col., 2006), caracterización morfológica y electrofisiológica (Rohr y col., 1991; Mitcheson y col., 1998), proliferación celular (Anversa y Kajstura, 1998), adhesión celular y matriz extracelular (Simpson y col., 1993; Eppenberger y Zuppinger, 1999; Kostin y col., 1999) y por último, lo relacionado con el análisis genético como es la regulación de la expresión génica cardíaca (Risebro y col., 2009) y los mecanismos moleculares de la hipertrofia e hiperplasia cardíaca (Anversa y Olivetti, 1980; Eschenhagen y col., 1997; Zhong y col., 2006). Todos estos estudios han aportado importantes conocimientos a la investigación en el campo cardiovascular.

Actualmente, existen diferentes sistemas de cultivo de cardiomiocitos en los cuales los resultados obtenidos en la citoarquitectura (Histotípia) es uno de los parámetros que permite evaluar la calidad del cultivo. Por ejemplo, los cardiomiocitos cultivados en placas pierden características miotípicas como es el arreglo de las miofibrillas y la presencia de discos intercalares en las primeras semanas de cultivo *in vitro* (14 días), pero cuando se contraen adquieren una morfología semejante a los cardiomiocitos adultos recién aislados (Decker y col., 1991). En estos cultivos de cardiomiocitos en placa, ocurre un proceso de dediferenciación para la reorganización del citoesqueleto y

de las proteínas contráctiles, esto puede ser consecuencia del cambio de una estructura tridimensional *in situ* a una bidimensional en la placa de cultivo, es decir, el miocardio cultivado en placa es estructuralmente diferente al miocardio *in situ*. Adicionalmente, también cambia la expresión de los genes hacia un fenotipo dediferenciado, que ha podido ser demostrado utilizando como marcador la cadena pesada de la β -miosina, esta proteína está ausente en cardiomiocitos adultos pero está presente en cardiomiocitos inmaduros (Mitcheson y col., 1998).

Las transformaciones morfológicas se traducen en un cambio de su forma cilíndrica típica (dimensiones aproximadas de 100 μm x 15 μm) a pleomórficas, presentándose porcentajes de células con forma cilíndrica del 55% al día 0, del 44,5% al día P1, del 35,3% al día P3 y del 12,2% al día P5. Sin embargo, se afirma que a pesar de los cambios morfológicos, durante el primer mes de cultivo en placa los cardiomiocitos pueden expresar varios aspectos del fenotipo adulto, como son la forma cilíndrica y estrías durante las primeras 24-48 horas de cultivo, reaparición de estrías transversales y modificación en la expresión de la miosina en la segunda semana de cultivo. Estos datos sugieren que a pesar de los cambios que sufren los cardiomiocitos adultos en cultivos en placa, siguen siendo células altamente diferenciadas (en oposición a la dediferenciación); además, mantienen diversas características de las que poseen *in situ* que son apropiadas para el estudio de diferentes factores que regulan el crecimiento y diferenciación de estas células (Bugaisky y Zak, 1989). Es de destacar, que los cambios morfológicos y funcionales pueden ser debidos a la adaptación, en el tiempo, a las condiciones de este sistema de cultivo, lo cual puede alterar el fenotipo, ya que las pruebas de viabilidad indican que las alteraciones no son atribuidas a apoptosis o necrosis (Banyasz y col., 2008).

En estudios más específicos, como los relacionados al restablecimiento de los contactos celulares en cardiomiocitos adultos cultivados durante 14 días, se observa que inicialmente algunas células conservan su morfología elongada pero otras están altamente contraídas; después durante los primeros días de cultivo las células adoptan una forma redondeada y pierden la polaridad celular, pero al transcurrir el tiempo de cultivo se restablecen su morfología y desarrollan nuevas uniones celulares como las

fascias adherentes, los desmosomas y las uniones comunicantes de los discos intercalares que están presentes al día 14 de cultivo, cuando ha ocurrido la alineación de una célula con otra durante la adhesión celular y una vez establecidos los contactos celulares, se pueden evidenciar signos de contracción en la monocapa celular (Atherton y col., 1986). Otro estudio complementario con cardiomiocitos neonatales concluye que la organización de las sarcómeras en las miofibrillas se mantiene estable cuando se unen a la membrana a través de la fascias adherentes de los discos intercalares, sugiriendo que estas uniones celulares son de vital importancia en la estabilidad de la estructura miofibrilar normal en los cardiomiocitos (Eppenberger y Zuppinger, 1999).

Al cultivar cardiomiocitos embrionarios en sistemas de cultivo constituidos por andamios generalmente tubulares a los cuales se les adicionan moléculas como colágeno, con el fin de producir un modelo tridimensional de tejido cardíaco, se obtienen cardiomiocitos altamente diferenciados con su citoarquitectura típica, presentando las miofibrillas estriaciones transversales correspondientes a la banda Z, la A y la I que forman las sarcómeras, además de túbulos T longitudinales y transversales, mitocondrias y uniones celulares como desmosomas, fascias adherentes y uniones intercalares que constituyen los discos intercalares (Eschenhagen y col., 1997; Evans y col., 2003). Utilizando variaciones en estos sistemas de cultivo tridimensional, como es el uso de Matrigel en cultivos disociados mantenidos en rotación durante las primeras 24 horas para lograr la re-agregación celular y posteriormente incubados por un período aproximado de 12 días, se observa que los cardiomiocitos conservan las propiedades proliferativas y contráctiles del miocardio embrionario. Generalmente, en los cultivos tridimensionales, los cardiomiocitos están orientados a lo largo del eje longitudinal, distribuidos preferentemente en la margen exterior, con una disminución de la densidad celular hacia la parte central y muestran una organización miofibrilar con sarcómeras que contienen las bandas I y A, con mitocondrias localizadas en los espacios intermiofibrilares y desmosomas (Tobita y col., 2006). Tratando de desarrollar un modelo de cultivo tridimensional que reproduzca con la mayor aproximación a las células *in situ*, recientemente se ha propuesto un sistema de cultivo con encapsulación de los cardiomiocitos en hidrogel de fibrina el cual permite aplicar estímulos mecánicos y químicos, de modo que los cardiomiocitos son metabólicamente activos, pudiendo

remodelar la matriz extracelular, garantizando este modelo la viabilidad y la funcionalidad; aun cuando la viabilidad de las células depende, en gran parte, de la difusión del oxígeno (Yuan Ye y col., 2011).

Hasta ahora el análisis de los Cultivos Histotípicos Rotatorios se ha realizado a través de estudios ultraestructurales con microscopía electrónica de transmisión y en tejidos diferentes al cardíaco (Palacios-Prü y col., 1976a, 1976b, 1976c, 1977, 1995). Por esta razón, para caracterizar otros aspectos del comportamiento de la célula miocárdica, en el presente trabajo se propone determinar el porcentaje de síntesis de ADN en cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios, así como analizar el proceso de apoptosis versus proliferación en cardiomiocitos en ese modelo de cultivo y cotejar los resultados con los presentes en estas células *in situ*. Estos dos aspectos se analizarán partiendo de la realización de Cultivos Rotatorios de cardiomiocitos embrionarios y postnatales para comparar las características fenotípicas alcanzadas por los cardiomiocitos de las distintas edades cultivadas con las presentes en los cardiomiocitos *in situ* y poder establecer así, el Período Crítico del cardiomiocito en el ratón.

1.1.3. Ultraestructura de los Cardiomiocitos

Como se mencionó anteriormente, para determinar la viabilidad de los Cultivos Rotatorios es indispensable realizar el análisis ultraestructural (citotípica/histotípica) del tejido a estudiar, para lo cual es necesario conocer las modificaciones citoestructurales del cardiomiocito durante el desarrollo embrionario del ratón NMRI, de manera de poder realizar la comparación con las características presentes *in vitro*.

En este sentido existen diferentes reportes referentes al músculo cardíaco, como son estudios relacionados con la ultraestructura en diferentes especies de mamíferos (Chacko, 1976; Brook y col., 1983), con la estructura básica de la contracción en músculo estriado (Huxley y Hanson, 1954), con la diferenciación de los cardiomiocitos (Navaratnam y col., 1986), con el desarrollo de estructuras específicas como los discos intercalares (Muir, 1957), los desmosomas y la relación entre ambos (Grimley y Edwards, 1960), con el desarrollo postnatal de la banda M y la binucleación cardiomiocítica (Anversa y col., 1980, 1981), con la estructura y función de los túbulos T en miocitos

cardíacos de mamíferos (Brette y Orchard, 2003) y finalmente, con la citoarquitectura cardíaca durante el desarrollo del corazón en el ratón (Hirschy y col., 2006). En los últimos años se ha propuesto que los discos intercalares tienen una estructura de tipo mixto llamada unión adherente híbrida (Li y Radice, 2010) y la existencia de una comunicación heterocelular entre los cardiomiocitos y los telocitos que juegan un papel importante en la fisiología cardíaca (Gherghiceanu y Popescu, 2011).

De igual manera, también se ha estudiado la regulación del crecimiento de células cardíacas embrionarias en cultivos primarios (DeHann, 1967), en cultivos en monocapa (Jongsma y Van Rijn, 1972) y en cultivos de células adultas diferenciadas de pollo, rata y ratón (Moses y Claycomb, 1984; Nag y Cheng, 1987); así como la distribución de las uniones celulares (Kostin y col., 1999), el proceso de miofibrillogénesis (Dube, 2002), el ensamblaje de las miofibrillas en cardiomiocitos (Lu y Horowitz, 2008) y más recientemente, la ultraestructura de cardiomiocitos generados a partir de células madre (Gherghiceanu y col., 2011).

La citoarquitectura característica de los cardiomiocitos adultos está compuesta por las siguientes estructuras:

1.1.3.1 Miofibrillas

Son el primer complejo multiprotéico importante en los cardiomiocitos y se caracterizan por la expresión secuencial de proteínas sarcoméricas (Atherton y Behnke, 1988). Durante el desarrollo cardíaco, las células acumulan en su citoplasma proteínas sarcoméricas, lo cual les permite iniciar la organización de su citoarquitectura, ordenándose en paquetes de miofibrillas divididas en unidades contráctiles llamadas sarcómeras (Ehler y Perriard, 2002). En algunos estudios se reporta que en cardiomiocitos de ratones las miofibrillas ocupan una densidad del volumen celular de \approx 49% (Schaper y col., 1985).

El proceso por el cual las células adquieren y ensamblan un aparato contráctil altamente estructurado se denomina miofibrillogénesis (Dube, 2002). La ramificación de las miofibrillas se inicia principalmente en el disco Z y en algunos casos las ramificaciones

muestran configuración en forma de Y o X con puntos de intersección en el disco Z (Chacko, 1976).

Existen modelos que explican el proceso de miofibrillogénesis *in vitro* e *in situ*. En estudios en cultivos de células cardíacas de pollo, se propone que las premiofibrillas son las estructuras precursoras presentes durante el ensamblado de las miofibrillas. La premiofibrillas están compuestas de minisarcómeras separadas por cuerpos Z que contienen abundante α -actinina, filamentos de actina cortos que crecen en longitud durante la maduración y miosina tipo IIB no muscular, proteína que sirve como separador posicional para otras proteínas sarcoméricas. Las premiofibrillas se forman en los bordes de los cardiomiocitos en crecimiento y a partir de ellas se desarrollan las miofibrillas maduras. Posteriormente, los cuerpos Z se fusionan para convertirse en bandas Z, la distancia entre las bandas Z aumenta, los filamentos de actina crecen en longitud y se ensambla la titina; mientras que la miosina no muscular es remplazada por la miosina tipo II muscular para formar sarcómeras maduras. Este modelo propone tres etapas diferentes de ensamblaje de las miofibrillas: premiofibrillas, miofibrillas nacientes y miofibrillas maduras (Dabiri y col., 1997).

Además de la miosina tipo IIB no muscular, existen otras proteínas transitorias como la N-RAP que sirve de andamio molecular para el ensamblaje de la α -actinina y la actina en la estructura I - Z - I y la Krp1 que posteriormente promueve la fusión lateral de los precursores de las miofibrillas, de modo que el aumento de la longitud no ocurre por la adición secuencial de nuevas sarcómeras a los extremos de las miofibrillas, sino por coalescencia lateral de las miofibrillas cortas adyacentes (Lu y Horowitz, 2008, Risebro y col., 2009). Adicionalmente, ha sido referido que los cambios de forma de los cardiomiocitos en el ratón se correlacionan con el promedio de la longitud de las miofibrillas, de tal manera que cuando las miofibrillas se disponen estrechamente a lo largo de la membrana plasmática en el día 8,5 miden en promedio 12 μm , pero las miofibrillas están en continuo aumento de su longitud hasta llegar a 27 μm en el día embrionario 16,5, a 38 μm en el nacimiento y finalmente 42 μm en día postnatal 4, cuando la miofibrilla se extiende longitudinalmente a lo largo del citoplasma (Hirschy y col., 2006).

El ensamblaje de las miofibrillas durante el desarrollo del músculo cardíaco *in situ*, se determina por la aparición de todas las proteínas sarcoméricas distribuidas difusamente en el citoplasma, asociación de la titina con la α -actinina formando los cuerpos Z y la asociación de la titina y la α -actinina con filamentos de actina para formar el complejo I - Z - I, construyéndose así las sarcómeras inmaduras. Posteriormente, los filamentos de actina alcanzan su longitud y la tropomodulina se asocia a los extremos puntiagudos de los filamentos de actina, constituyendo sarcómeras maduras que finalmente se alinean a lo largo del eje longitudinal de la célula (Gregorio y Antin, 2001). La banda Z en las miofibrillas maduras se une a la membrana celular en sitios llamados costámeros, donde se encuentran proteínas tales como vinculina, tensina y talina (Sanger y Sanger, 2002).

Algunas de las similitudes entre los dos modelos incluyen la detección temprana de la titina, la presencia del complejo I - Z - I que comprende la primera estructura organizada que se forma independientemente de los filamentos de miosina, la presencia de diferentes isoformas de actina y el ensamblaje tardío en el extremo puntiagudo limitado por la proteína tropomodulina (Gregorio y Antin, 2001).

1.1.3.2. Sarcómeras

Son las unidades funcionales básicas que se ensamblan con precisión para constituir la unidad contráctil fundamental del tejido cardíaco (Ehler y Perriard, 2002), las cuales consisten en arreglos paralelos de filamentos de actina de aproximadamente 1 μm de largo que interdigitan con filamentos de miosina de 1,6 μm de largo, aunque en las miofibrillas nacientes las sarcómeras son ligeramente más cortas ($\approx 1,5 \mu\text{m}$), donde no es visible la banda I, lo cual sugiere que la amplitud de la banda A determina la longitud de la miofibrilla naciente (Figura 1) (Gregorio y Antin, 2001). Aproximadamente 50 sarcómeras de 2 μm de longitud promedio, componen una miofibrilla de extremo a extremo y un paquete de 50 a 100 miofibrillas constituyen una célula muscular adulta (McMullen e Izumo, 2004, Hirschy y col., 2006). Adicionalmente se conoce que la estructura de la sarcómera es dinámica, sintetizando e incorporando nuevas proteínas para reemplazar las proteínas contráctiles más antiguas o dañadas, manteniendo así la estructura funcional del músculo cardíaco (Sommer y Waugh, 1978). Estructuralmente la sarcómera corresponde a la región entre dos discos Z y está constituida por un número

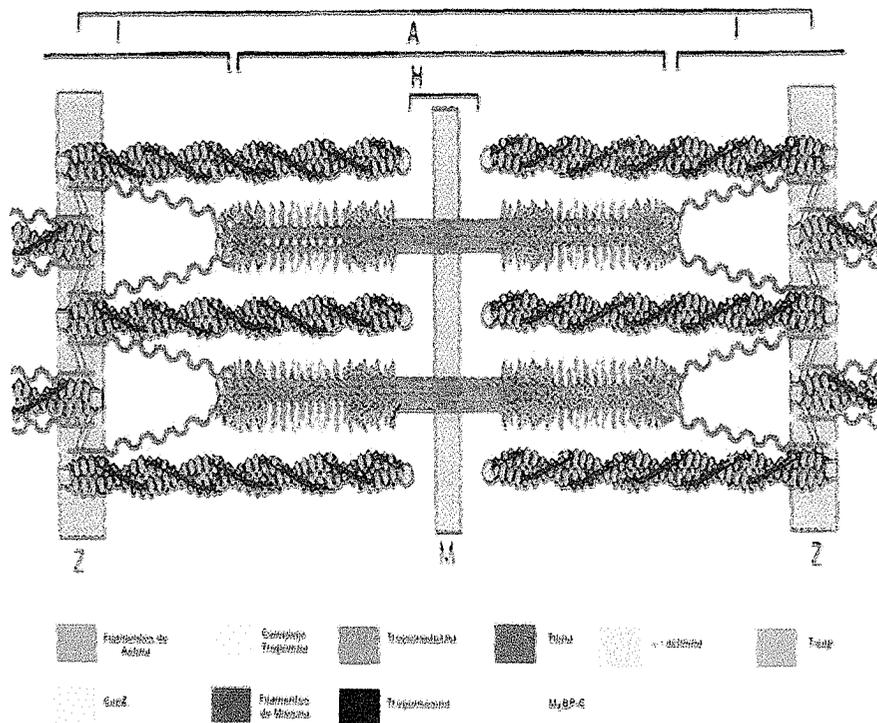


Figura 1. Organización de los componentes de la sarcómera del músculo cardíaco (Tomada de Gregorio y Antin, 2001).

variable de proteínas organizadas en filamentos gruesos, formados por la cadena liviana de la miosina y por la cadena pesada de la miosina, tanto la α MHC como la β MHC. Otro componente de las sarcómeras, son los filamentos delgados que contienen actina, proteína que durante el desarrollo cardíaco se expresa en diferentes isoformas como la α -actina de músculo liso, α -actina del músculo cardíaco y α -actina del músculo esquelético. Además, la sarcómera contiene tropomiosina, troponina C, troponina I, troponina I, filamentos de titina, nebulete, α -actinina, miomesina y proteínas M (Gregorio y Antin, 2001; McMullen e Izumo, 2004).

La titina o conectina forma el tercer sistema de filamentos y se extiende desde la banda Z a la M de la sarcómera, centrando los filamentos de miosina y actuando como un resorte elástico en la contracción muscular. Se ha propuesto además, que en los cardiomiocitos maduros, une los filamentos de miosina a la banda Z. Por otra parte, la titina interactúa directamente con otras proteínas unidas a la miosina, incluyendo las proteínas C, H y M, la miomesina y la cadena pesada de la miosina. Así mismo,

interactúa a través de los componentes de la banda Z (α -actinina y titina-cap /teletonina) con los filamentos de actina cerca de la banda Z (Gregorio y Antin, 2001; McMullen e Izumo, 2004; Shimada y col., 2002).

La miosina es una proteína (enzima) quimio-mecánica responsable de la contracción muscular y que convierte la energía liberada por la hidrólisis del ATP en fuerza mecánica (Welikson y Mikawa, 2002). Se ha indicado, que los cambios de la cadena pesada de la miosina (MHC) de β a α y de la troponina esquelética a la cardíaca en mamíferos, ocurren alrededor del nacimiento, mientras que el cambio entre las isoformas de la troponina T ocurre antes del día E16,5 (McMullen e Izumo, 2004; Siedner y col., 2003; Gregorio y Antin, 2001). En el corazón de mamíferos se expresan dos genes de la miosina de cadena pesada, la α -MHC y la β -MHC, debido a la dimerización de la α y β MCH, así como se pueden generar tres isoformas de miosina: el homodímero $\alpha\alpha$ - MHC, el heterodímero $\alpha\beta$ - MHC (V2) y un homodímero $\beta\beta$ - MCH (V3). La α - MHC es la principal isoforma que se expresa en el ventrículo y en la aurícula de mamíferos pequeños adultos, como el ratón y la rata (Welikson y Mikawa, 2002). La proteína nebulite tiene homología con la nebulina del músculo esquelético que está implicada en la organización y función de la miofibrillogénesis manteniendo la estructura y estabilidad de la banda Z (Shimada y col., 2002, Gregorio y Antin, 2001).

Las CapZ son proteínas que recubren y estabilizan la actina, se fijan a los extremos de crecimiento rápido llamados "protuberante" o más (+) de los filamentos de actina e impiden el agregado o la pérdida de las subunidades de actina, mientras que la tropomodulina cubre el extremo de crecimiento lento llamado "puntiagudo" o menos (-) de los filamentos de actina y su capacidad de recubrimiento es estimulada por la presencia de tropomiosina, lo cual sugiere que las proteínas actúan como un complejo para estabilizar los filamentos, lo cual se logra cuando estos están recubiertos en ambos extremos, garantizando que no haya pérdida de las subunidades (Gregorio y Antin, 2001; McMullen e Izumo, 2004).

Las moléculas de tropomiosina interactúan con la actina y con el complejo de troponina (troponina T, I y C) para regular la contracción y relajación de la sarcómera (Prabhakar y col., 2002). La asociación de la tropomiosina con la actina es un proceso dinámico en el sentido que la tropomiosina cambia la posición del filamento de actina durante la contracción y relajación sarcomérica en respuesta a cambios en los niveles de calcio en el mioplasma (Prabhakar y col., 2002). La concentración de Ca^{++} en el líquido extracelular, en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias está a nivel milimolar ($2,5 \times 10^{-3}$ mM/L), mientras que en la sarcómera está a nivel micromolar (10^{-5} M en la contracción y 10^{-7} M en relajación), por lo cual la entrada de Ca^{++} en el citosol se realiza a favor de su gradiente de concentración (Tresguerres, 1992). Cuando se incrementa la concentración de calcio, éste se une a la troponina C y a través de su interacción con la troponina T y la troponina I, media un cambio en la posición de la tropomiosina sobre la actina. Los movimientos de la tropomiosina y troponina I facilitan la interacción de la cabeza de la miosina con la actina, estimulando así la contracción muscular (Prabhakar y col., 2002).

La interacción de estas proteínas contráctiles se expresa morfológicamente por la presencia de estriaciones transversales en los cardiomiocitos, formando lo que ultraestructuralmente se conoce como disco Z y bandas A, I, H y M. El disco Z es el sitio de anclaje para los filamentos de actina, titina y nebulete, permitiendo la generación de la fuerza por la contracción (Gregorio y Antin, 2001). Durante la contracción muscular, cada sarcómera se retrae acercando los discos Z. La amplitud de la banda A no varía pero tanto las bandas I como la H casi desaparecen por completo. Estos cambios se explican porque los filamentos de actina y miosina se deslizan unos sobre otros, de manera que los filamentos de actina ocupan la banda A y la H (Cooper y Hausman, 2008).

1.1.3.3. Sistema de Túbulos T

Son invaginaciones de la superficie de la membrana (sarcolema y glicocálix) que forman un sistema complejo de túbulos ramificados, tanto transversal como longitudinalmente, frente a la banda Z al final de cada sarcómera. Los túbulos T del músculo cardíaco

tienen un diámetro promedio de aproximadamente 200 a 300 nm, mientras que el diámetro de los túbulos individuales puede variar de 20 a 450 nm.

Los túbulos T están presentes en el tejido cardíaco de la mayoría de las especies de mamíferos (ratones, ratas, cobayos, conejos, perros, cerdos y humanos) (Brette y Orchard, 2003), pero parecen estar ausentes en el tejido cardíaco de aves, reptiles y anfibios (Brette y Orchard, 2003; Sommer y Waugh, 1978; McNutt, 1975). En el tejido cardíaco se encuentran predominantemente en los cardiomiocitos ventriculares, pero están ausentes o menos desarrollados en aurículas y tejido de conducción. Además, el sistema de túbulos T está ausente o muestra pocas evidencias de desarrollo en cardiomiocitos ventriculares embrionarios y neonatales, habiéndose reportado que aunque varía de una especie a otra, es durante las primeras semanas de vida que se desarrolla (Brette y Orchard, 2003); sin embargo, Chacko en 1976 reportó en embriones de rata de 11 días la identificación del sistema de túbulos T y resultados similares en fetos de ovejas han sido dados por Brook y colaboradores (Brook y col., 1983). Adicionalmente, algunos reportes indican que los cardiomiocitos adultos que se mantienen en cultivo muestran una disminución progresiva en la densidad de los túbulos T, lo cual también puede ocurrir cuando hay fallas cardíacas pudiendo cambiar su morfología, indicando que la estructura de los túbulos T es lábil incluso en células maduras (Brette y Orchard, 2003). Es importante señalar que diversas proteínas involucradas en el acoplamiento excitación-contracción parecen estar concentradas en los túbulos T, permitiendo la propagación rápida del potencial de acción en el interior de la célula y la entrada de calcio que desencadena la liberación del calcio del retículo sarcoplasmático (Brette y Orchard, 2003; Soeller y Cannell, 1999).

1.1.3.4. Discos Intercalares

Es el segundo complejo multiprotéico de importancia para la funcionalidad de los cardiomiocitos. Es una región especializada de la membrana celular del músculo cardíaco que se caracteriza por la agrupación de tres uniones celulares: fascias adherentes, desmosomas y uniones comunicantes (McNutt, 1975; Atherton y col., 1986; Kostin y col., 1999; Hirschy y col., 2006).

Las fascias adherentes enlazan los filamentos de actina de las miofibrillas a la membrana celular. Los desmosomas conectan la membrana, a través de la interacción de varias proteínas, al sistema de filamentos intermedios, en este caso la desmina, que rodea los discos Z, integrando de esta manera el aparato contráctil con la membrana celular, por medio de un acoplamiento mecánico (Hirschy y col., 2006). Mientras que las uniones comunicantes son canales intracelulares que median la comunicación intercelular por la difusión de moléculas pequeñas y la propagación del impulso eléctrico (Welikson y Mikawa, 2002).

Los cardiomiocitos embrionarios tienen fuertes conexiones entre sí a lo largo de su perímetro, probablemente debido a que aún conservan su origen epitelial del mesodermo cardiogénico (Hirschy y col., 2006), evidenciándose en la etapa embrionaria temprana, discos intercalares cortos, delgados y orientados sobre todo oblicuamente al eje longitudinal de los cardiomiocitos, pero a medida que avanza el desarrollo los discos intercalares se hacen estructuras más grandes, complejas y se disponen perpendicularmente al eje del cardiomiocito (Lozyk y col., 2006). En los cardiomiocitos de 9 días de desarrollo embrionario aparecen los primeros desmosomas y fascias adherentes, pero a medida que avanza el proceso de maduración se observan los primeros discos intercalares (Navaratnam y col., 1986). En cultivos en monocapa de cardiomiocitos de rata neonatal y adulta, se ha demostrado que los discos intercalares pueden estabilizar la estructura sarcomérica de las miofibrillas por los puntos de fijación al sarcolema, a través de las fascias adherentes (Atherton y col., 1986).

1.1.3.5. Mitocondrias

Los cardiomiocitos poseen la mayor densidad mitocondrial por volumen entre todos los tipos de células de mamíferos, de modo que las mitocondrias ocupan aproximadamente el 25% en los cardiomiocitos humanos y entre 32% a 37% en los cardiomiocitos de ratón (Schaper y col., 1985; <http://www.apoptosisinfo.com/cardiomyocyte-apoptosis/>). Durante el desarrollo embrionario, las mitocondrias varían considerablemente en tamaño y forma, desde formas circulares a alargadas y pueden estar dispersas en todo el cardiomiocito, pero a medida que aumenta la cantidad de miofibrillas se forman agregados

mitocondriales que se concentran entre las miofibrillas siguiendo el eje longitudinal de las células al igual que las miofibrillas (Chacko, 1976; Brook y col., 1983).

En los cardiomiocitos la actividad mitocondrial tiene un papel clave en la generación de energía a través de la fosforilación oxidativa (Parra y col., 2008). En el corazón de mamíferos adultos, los ácidos grasos constituyen el principal sustrato energético, proporcionando el mayor rendimiento de ATP por molécula comparado con otros sustratos como la glucosa o el lactato. En contraste, en el corazón fetal que funciona en un ambiente relativamente hipóxico, los sustratos predominantes para la producción de ATP son la glucosa y el lactato, porque la producción glicolítica de ATP no requiere oxígeno. Durante el período postnatal el desarrollo del corazón experimenta un marcado cambio funcional y tiene como sustrato energético los ácidos grasos, esto coincide con la proliferación mitocondrial postnatal y el incremento en el consumo de oxígeno mitocondrial, proporcionando al corazón adulto una alta capacidad para la producción de ATP (McMullen e Izumo, 2004).

Por otra parte, las mitocondrias regulan la homeostasis del calcio al acumularlo, en forma de fosfatos, bajo situaciones extremas de sobrecarga intracelular de 10 a 100 veces la concentración de calcio en el citosol. Otra función de las mitocondrias es la participación en la producción de especies reactivas del oxígeno y en la muerte celular por apoptosis (Parra y col., 2008; <http://www.apoptosisinfo.com/cardiomyocyte-apoptosis/>).

1.1.3.6. Retículo Sarcoplasmático (RS)

Está formado por una intrincada red de túbulos que, dependiendo de la especie, constituye aproximadamente del 0,6 al 1,5% del volumen total de las células del músculo cardíaco. Los túbulos del RS miden de 20 a 60 nm de diámetro, se intercalan entre el material contráctil formando redes en todo el centro de la sarcómera y alrededor de la banda Z (Sommer y Waugh, 1978).

El RS es el principal almacén de calcio intracelular y participa de forma importante en el proceso de acoplamiento excitación-contracción regulando las concentraciones intracelulares de calcio durante la contracción y relajación muscular. Esta actividad está dada por la interacción de las principales proteínas del RS que son el canal de liberación del calcio y que son conocidos como los receptores de rianodina (RyR), la ATPasa de calcio (SERCA), fosfolamban y calsequestrina (Reyes-Juárez y Zarain-Herzberg, 2006).

1.1.3.7. Núcleo

Es una estructura voluminosa y alargada generalmente con nucléolos prominentes (Navaratnam y col., 1986). La presencia de los nucléolos puede estar relacionada con el momento celular de la actividad de síntesis de proteínas.

1.1.4 Proliferación de los Cardiomiocitos

En el desarrollo embrionario y fetal los cardiomiocitos son dependientes de la proliferación y en la etapa postnatal temprana, a pesar de encontrarse en estado diferenciado, conservan esta capacidad de división. En el período embrionario/fetal ocurre tanto la división mitótica como la diferenciación estructural del citoplasma y otros componentes citoplasmáticos, transformándose de un fenotipo de crecimiento proliferativo (hiperplasia) en la etapa embrionaria/fetal a un fenotipo de crecimiento celular maduro (hipertrofia) (Vidal-Xavier, 1997; Anversa y Kajstura, 1998; Nadal-Ginard, 2001; Tobita y col., 2006). Sin embargo, cuando el miocardio requiere un aumento en su capacidad contráctil puede satisfacer esta demanda incrementando el número de las sarcómeras en las células existentes (hipertrofia) o produciendo nuevos cardiomiocitos (hiperplasia) o la combinación de estos dos mecanismos (Nadal-Ginard, 2001). Por lo tanto, durante el desarrollo embrionario y hasta el momento del nacimiento, el corazón es dependiente de la proliferación de los cardiomiocitos. Posterior a esta etapa, los cardiomiocitos ya no experimentan hiperplasia y el crecimiento muscular es por hipertrofia celular (Vidal-Xavier, 1997).

Se ha reportado que en ratas y ratones la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos disminuye en los primeros días postnatales (aproximadamente hasta el día 5) y posteriormente, aumenta el desarrollo hipertrófico de los mismos (Anversa y col., 1980;

Hirschy y col., 2006) conduciendo a un incremento en el volumen del citoplasma. Así mismo, se observa la acumulación de células binucleadas que van aumentando con la edad, por ejemplo en ratas en los primeros días postnatales la acumulación de cardiomiocitos binucleados es de 3% y a los 11 días de edad postnatal es de aproximadamente el 50% (Anversa y col., 1980). Otros investigadores han referido que en los ratones y ratas, la acumulación de los cardiomiocitos binucleados comienza alrededor del día 4 postnatal y a la tercera semana postnatal el 85-90% de los cardiomiocitos son binucleados (Ahuja y col., 2007). Todo lo anterior permite proponer que la proliferación de los miocitos se completa en la etapa prenatal y la síntesis de ADN postnatal sólo refleja binucleación (Anversa y col., 1981). Por otro lado, existe un mayor crecimiento en el ventrículo izquierdo como consecuencia de los cambios circulatorios que ocurren en el período neonatal, lo cual explica el alto porcentaje de proliferación (61%) en el ventrículo izquierdo en los primeros días postnatales (1 al 5 día) (Olivetti y col., 1980). Aunque la proliferación es una característica de los cardiomiocitos en la etapa embrionaria y postnatal temprana, se ha encontrado que esta capacidad proliferativa en esas etapas de desarrollo, se pierde bajo condiciones de cultivo (Engel y col., 1999).

Cabe señalar que la mayoría de las investigaciones reportan que los cardiomiocitos durante la etapa postnatal no proliferan y que son células diferenciadas terminalmente, incapaces de activar el ciclo de división celular. Sin embargo, en la actualidad se propone que los cardiomiocitos adultos si son capaces de dividirse, afirmación basada en la identificación de células progenitoras cardíacas que pueden dar lugar a cardiomiocitos. Por otra parte, se acepta que los cardiomiocitos adultos tienen limitado el potencial de autorrenovación; primero, porque las células progenitoras cardíacas que proliferan pueden experimentar solamente de 3 a 4 ciclos de división celular y segundo, por la existencia de una minoría de éstas células progenitoras capaces de reingresar al ciclo celular (Ahuja y col., 2007).

En resumen, el proceso de proliferación celular incluye la síntesis de ADN genómico (fase de síntesis), división nuclear (cariocinesis) y división mitótica (citocinesis) de la fase de mitosis, etapas que forman parte del ciclo celular.

1.1.4.1 Ciclo Celular

Involucra una secuencia ordenada de eventos que incluyen la duplicación del contenido de ADN y la división celular. El ciclo celular ocurre a través de cuatro fases: G1 (Gap 1), S (síntesis de ADN), G2 (Gap 2) y M (Mitosis) (Lodish y col., 2005; Freshney, 2000). En la fase G1 la célula puede progresar hacia la síntesis de ADN y puede darse otro ciclo de división o puede salir reversiblemente del ciclo celular (G0) o irreversiblemente a comprometerse con la diferenciación. Además, es durante la G1 que la célula es particularmente susceptible para el control de la progresión del ciclo celular en un número de puntos de restricción, que determina si la célula reingresa al ciclo o se retira de este o se diferencia. La G1 es seguido por la fase S, que corresponde a la síntesis de ADN, en la cual el ADN se replica (Freshney, 2000).

Por consiguiente, la progresión del ciclo celular implica la transducción regulada de señales mitogénicas para la expresión cíclica de proteínas como las ciclinas y las proteínas quinasas dependientes de las ciclinas (Cdks). Para garantizar la correcta progresión a través de cada fase, las células desarrollan una serie de puntos de control coordinados que rigen los diferentes complejos Cdk-ciclina necesarios para los eventos del ciclo celular, su actividad está regulada por las quinasas activadoras CAK (ciclina H/Cdk7) e inhibidoras de las Cdk (CKI), tanto de manera positiva como negativa. En general, la regulación del ciclo celular en los cardiomiocitos se describe como el principal punto de control a final de la G1. Los reguladores claves en la G1 incluyen Cdk4 y Cdk6, así como las ciclinas D, estos complejos fosforilan a los miembros de la familia Rb (Rb, p107 y p130) conduciendo a la liberación del factor de transcripción E2F, el cual es requerido para la transcripción de los genes involucrados en la salida de G1 y para la síntesis de ADN. Adicionalmente, la ciclina E y la ciclina A también se expresan en la transición de la G1-S e interactúan con la Cdk2 para acelerar la fosforilación de las proteínas Rb, de esta manera regulan positivamente la fase S. Finalmente, la ciclina B y Cdc2 (p34/Cdk1) regulan positivamente el tránsito entre las fases G2/M (Ahuja y col., 2007; Pasumarthi y col., 2005).

Dentro de este marco, la ausencia del ciclo celular en los cardiomiocitos postnatales estaría relacionada con los cambios en el patrón de expresión de las principales moléculas reguladoras del ciclo celular. Es decir, las ciclinas y las Cdks se expresan con niveles altos en edades embrionarias donde la actividad del ciclo celular es mayor; mientras que en edades postnatales presentan bajos perfiles de expresión de las ciclinas A, B, D y E y sus quinasas, de manera que llegan a ser indetectables en células adultas. Además, cuando la actividad del ciclo celular en los cardiomiocitos está ausente, existe una alta expresión de inhibidores de las quinasas dependientes de las ciclinas (Cdkls) (Ahuja y col., 2007; Pasumarthi y col., 2005). Se reportan dos familias de proteínas inhibitoras específicas de las Cdks; una es la INK4 (p15, p16, p18, p19) para las Cdk4/6 y una segunda, la familia Cip/kip (p21, p27 y p57), que tienen una actividad mucho más amplia inhibiendo a Cdk4/6 como también a Cdk2 y Cdc2.

El principal objetivo de las Cdks son las proteínas Rb (retinoblastoma), la p107 y p130. Estos tres miembros de esta familia se expresan en el desarrollo de miocardio, aunque el patrón de expresión difiere temporalmente. La Rb es escasa o indetectable en el miocardio de ratón fetal de E12,5 pero es altamente cuantificable en la etapa neonatal y en adultos, de manera que en el tejido cardíaco diferenciado terminalmente se convierte en la proteína que se expresa de manera predominante. Mientras que la p107 se expresa en un patrón inverso a la Rb, es decir, elevado en el corazón embrionario y bajo en el adulto. Los mayores niveles de expresión de la P130 se determinan en el período neonatal y posteriormente presenta una baja expresión en el miocardio adulto.

Estas proteínas se conocen mejor por su papel en la inhibición de la progresión del ciclo celular mediante la regulación de los genes de respuesta al conjunto de factores de transcripción denominados E2F. En este caso, la proteína Rb en su forma hipofosforilada se une al complejo E2F, mientras que la fosforilación de la Rb y sus parientes por Cdk2 y 4 resulta en la liberación del complejo E2F, lo que permite activar la transcripción y expresión de genes necesarios para la síntesis de ADN y otras moléculas que regulan el ciclo celular, tales como ciclinas E, A, quinasa mitótica Cdc2 (p34/Cdk1) y el mismo E2F-1.

La proteína Rb participa en la mediación de la salida de G1 para continuar con la síntesis de ADN en el ciclo celular y con la irreversibilidad de la detención de este ciclo, asociada a la diferenciación terminal en varios linajes incluyendo los músculos esquelético y cardíaco, los adipocitos y los macrófagos. Así mismo, hay evidencias que Rb tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular y participa en la diferenciación en el músculo cardíaco. En diferentes estudios se ha llegado a la conclusión que la proteína Rb, juega un papel crucial en la interrupción de la proliferación cuando se da la diferenciación, más que en el mantenimiento del estado diferenciado terminal, que puede ser específico del tejido.

También se ha demostrado que en el músculo cardíaco *in situ*, las proteínas Rb y p130 tienen papeles funcionales solapados para suprimir los activadores del ciclo celular y mantener la quiescencia o inactividad en el músculo cardíaco después del nacimiento (Ahuja y col., 2007). Nadal-Ginard en el 2001 propone que la proteína Rb está relacionada con el bloqueo del ciclo celular en cardiomiocitos adultos. En ese estudio se explica que los cardiomiocitos inmaduros adecuan su capacidad de dividirse con un fenotipo diferenciado al escapar del bloqueo en su ciclo celular, porque no se detecta la proteína Rb y que en su lugar, se expresa la proteína p107, relacionada con la diferenciación celular, pero que la relación entre estas dos proteínas se invierte después del nacimiento y se mantiene así a lo largo de la vida, de manera que en los miocitos adultos y diferenciados se expresa la proteína Rb y desaparece la p107 (Nadal-Ginard, 2001).

Por otro lado, la ausencia del ciclo celular también está relacionada con la diferenciación de los tejidos, ya que estos experimentan detención en el ciclo celular como parte de su vía de diferenciación, pero no todas las células experimentan detención permanente y existen ejemplos de tipos de células altamente especializadas que tienen la capacidad de regeneración. La salida definitiva del ciclo celular y la diferenciación específica de un tipo celular, se caracteriza por la alta regulación de un conjunto de genes determinados y el no reingreso al ciclo celular en respuesta a agentes mitógenos o estrés fisiológico normal.

En los cardiomiocitos adultos no existen evidencias de formación de anillos contráctiles, lo cual puede explicar su no reingreso al ciclo celular, en razón a que la formación de anillos contráctiles es un requisito indispensable para la citocinesis, paso final de la división celular y responsable de la división y de la separación del citoplasma en células hijas para completar la mitosis a partir de la formación de un anillo contráctil de actina (forma un andamio en forma de banda circunferencial en la telofase) y miosina (forma la estructura de anillo en la telofase), además que participan otras proteínas como GTPasa y RhoA. En los cardiomiocitos embrionarios estas proteínas se expresan en niveles altos, ya que en estas células se presenta la citocinesis, pero la expresión disminuye durante el período perinatal cuando los miocitos cardíacos salen del ciclo celular.

Se ha planteado que el complejo miofibrilar que se desarrolla postnatalmente, podría ocasionar la falta de citocinesis en miocitos cardíacos adultos, ya que la organización de miofibrillas estables, ordenada y funcional, que va en aumento gradual desde la etapa embrionaria hasta la adulta, podría impedir físicamente la división celular, adicionalmente al hecho que hay bajos niveles de expresión de proteínas que regulan el ciclo celular y la citocinesis; esto podría contribuir a desacoplar eventos como la cariocinesis y la citocinesis en los cardiomiocitos postnatales. En contraste, los cardiomiocitos auriculares son de menor tamaño, con menos miofibrillas (~ 40%) y menos diferenciación, por lo tanto, pueden retener una mayor capacidad regenerativa tanto *in situ* como *in vitro* (Ahuja y col., 2007).

1.1.4.1.1 Síntesis de ADN

Es uno de los eventos que forman parte de la proliferación celular. La síntesis de ADN es común en cardiomiocitos fetales, neonatales y adultos y aunque este parámetro no evidencia necesariamente la proliferación porque es uno de los primeros eventos que se dan en las células en posible división. En el caso de cultivos histotípicos rotatorios de tejido miocárdico sí suministra información valiosa de la actividad de los cardiomiocitos, datos que son muy importantes para la caracterización, ya que no existe un reporte de la síntesis de ADN en este sistema de cultivo.

Algunos estudios reportan en el mesodermo precardiaco de ratón, un nivel alto (~ 70%) de síntesis de ADN en embriones de 8 y de 11 días de desarrollo embrionario; es decir que al comienzo de la diferenciación cardiogénica sucede la primera aparición de un fenotipo característico de los cardiomiocitos y con la técnica 3H (timidina tritiada se detecta una reducción transitoria en el índice de síntesis de ADN (~45%)) (Pasumarthi y Field, 2002).

En los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo se observa que el porcentaje de síntesis de ADN está relacionado con el desarrollo embrionario, ya que a menor desarrollo mayor el porcentaje de síntesis de ADN, como lo indica la presencia de aproximadamente un 19% de síntesis de ADN en cardiomiocitos de 18 días de desarrollo embrionario, determinado con la técnica 3H; mientras que este porcentaje de síntesis de ADN disminuye aproximadamente a 12% en los primeros días postnatales, con la técnica de BrdU. Sin embargo, los datos de la síntesis de ADN en los cardiomiocitos adultos es un tema controversial, experimentos de marcaje con 3H indican porcentajes de síntesis de ADN bajos (0,4%) hasta indetectables (0,0 %) y con BrdU se detectan porcentajes de 2,2 hasta 16 % (Tabla 1). (Soonpaa y Field, 1998; Nadal-Ginard, 2001).

Tabla 1. Porcentaje de síntesis de ADN en los cardiomiocitos en etapas embrionaria y postnatal

Edad	% de Síntesis de ADN	Técnica
18d	19,1	3H
2-3d	12	BrdU
5d	12	BrdU
4-5d	10	BrdU
32d	2,2	BrdU
4 meses	4	BrdU
5 meses	0	3H
6 meses	0,4	3H
28 meses	16	BrdU
Adultos	0,005	3H

(Soonpaa y Field, 1998; Nadal-Ginard, 2001)

En general, los estudios de síntesis de ADN en cardiomiocitos de ratones, indican que hay dos fases temporalmente distintas, una primera fase se produce en la vida fetal y se asocia exclusivamente con la proliferación de los cardiomiocitos y una segunda fase que tiene lugar en la vida postnatal (Pasumarthi y Field, 2002) puede terminar en división celular, en multinucleación o en poliploidia. De hecho, para algunos autores la síntesis de ADN postnatal en cardiomiocitos es la expresión de la binucleación, a pesar que existen evidencias de la síntesis de ADN en cardiomiocitos adultos ventriculares, que han sido relacionadas con la posibilidad de binucleación (incremento nuclear por células) y con poliploidia (incremento de ADN por núcleo), es decir, por un proceso de endorreduplicación más que con la división celular, debido a la baja incidencia de las fases mitóticas. En la actualidad se plantea la posibilidad que tanto la síntesis de ADN como la división mitótica persisten en el corazón de mamíferos adultos (Anversa y Kajstura, 1998; Sedmera y col., 2000; Ahuja y col., 2007).

1.1.5 Apoptosis

El crecimiento cardíaco es también regulado por la muerte celular, la cual puede ocurrir de una manera incontrolada vía necrosis o por un mecanismo altamente regulado denominado apoptosis. La apoptosis está controlada por una interacción compleja de numerosas señales de pro-supervivencia y pro-muerte y ha sido sugerido que estas señales juegan un importante papel en la determinación de la forma del corazón y en la formación de las cámaras durante la cardiogénesis, de manera que las estructuras innecesarias pueden ser excluidas y el tejido puede ser moldeado y esculpido (Cook y Poole-Wilson, 1999; McMullen e Izumo, 2004). Además, la apoptosis regula el número y la composición normal de las células durante el desarrollo embrionario y aun en la vida adulta de los organismos, contribuyendo en el caso del corazón a rediseñar la geometría de las cámaras cardíacas alteradas en respuesta a estímulos patológicos (hipertrofia cardíaca patológica, isquemia-reperfusión, falla cardíaca congestiva e infarto, entre otros).

Entre los posibles desencadenantes de la apoptosis se incluyen: estrés oxidativo, sobrecarga de calcio, defectos mitocondriales, estimulación de factores pro-apoptóticos

y pérdida de factores de supervivencia en los cardiomiocitos (Cook y Poole-Wilson, 1999; Kang e Izumo, 2003; McMullen e Izumo, 2004). La apoptosis es un proceso fisiológico regulado, que conlleva requerimientos energéticos y que efectúa la eliminación controlada de células. Está caracterizada por retracción celular, fragmentación del ADN, activación de caspasas y la deformación y “emburbujamiento” de la membrana celular (Kang e Izumo, 2003; Cook y Poole-Wilson, 1999). Las células apoptóticas son más pequeñas que sus homólogas en condiciones fisiológicas, debido a la pérdida de agua y las organelas celulares están muy condensados, a diferencia de la necrosis donde se edematizan. Por otro lado, la muerte celular por apoptosis se produce en células aisladas, en contraste con la necrosis, que afecta a muchas células contiguas en un tejido.

Generalmente, la necrosis resulta de la digestión enzimática de las células y la desnaturalización de sus proteínas como respuesta a una lesión grave. En la necrosis, como evento temprano se presenta la edematización de las mitocondrias, seguida por la ruptura de la membrana plasmática y la liberación de los contenidos citoplasmáticos. Las células en necrosis tienen generalmente el citoplasma eosinofílico y núcleos picnóticos o cariorrécticos o pueden desaparecer en el proceso de cariólisis. La necrosis se presenta en el infarto cardíaco (Gorczyca y col., 1998)

1.1.5.1 Mecanismos Moleculares de la Apoptosis Cardíaca

En general, el fenómeno clave de muerte celular por apoptosis es la activación de las proteasas denominadas caspasas. Esta activación puede llevarse a cabo, ya sea por la vía mitocondrial o por vía de receptores de muerte (McMullen e Izumo, 2004).

La apoptosis es un proceso bien regulado y evolutivamente conservado, en el cual intervienen genes de muerte celular (CED), los cuales se dividen en dos grupos, proteasas específicas que contiene cisteína y aspartato (caspasas) y la familia Bcl-2. Las caspasas son fundamentales para la ejecución de la apoptosis, mientras que las proteínas Bcl-2 pueden ser pro- o anti- apoptóticas y son considerados como árbitros de la supervivencia celular.

De hecho, la apoptosis puede ser iniciada por la mitocondria, que libera citocromo c al citosol en respuesta a estímulos extrínsecos, tales como el estrés metabólico en el corazón (estrés oxidativo, hipoxia, isquemia/reperfusión y acidosis). Por otra parte, la apoptosis también puede ser iniciada por la vía de receptores de muerte endógenos, la cual podría ser un importante mediador de la apoptosis en los miocitos cardíacos durante la isquemia/ reperfusión *in situ*, que conduce a la señalización de muerte interna promoviendo la muerte celular coordinada y específica. Las dos vías convergen en una vía común, la cual media el final de las alteraciones morfológicas y bioquímicas que son características de la apoptosis (Kang e Izumo, 2003; Cook y Poole-Wilson, 1999; McMullen e Izumo, 2004).

En la vía mediada por la mitocondria, la liberación al citoplasma del citocromo c forma un complejo activo con el factor 1 activador de proteínas apoptóticas (Apaf-1) y la caspasa 9; este complejo conduce al autoprosesamiento de la caspasa 9 y a la activación de caspasas efectoras tales como la caspasa 3. La vía es modulada por la proteína pro-apoptótica Bax, de la familia Bcl-2. Después, la proteína mitocondrial Smac (segundo activador de las caspasas derivado de la mitocondria), es liberada en el citosol tras la estimulación de la apoptosis y promueve la activación de la caspasa 9 por la unión al IAP (inhibidor de las proteínas apoptóticas). La liberación de citocromo c se puede inhibir por elementos anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, tales como Bcl-2 y Bcl-xL (Kang e Izumo, 2003). La participación de la mitocondria en la apoptosis se manifiesta por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la apertura de los poros de transición mitocondrial, la interrupción de la cadena de transporte de electrones, la generación de especies reactivas de oxígeno y la translocación del citocromo c al citoplasma, donde se activa la caspasa 9 con la ayuda de APF-1. Las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas contribuyen a este proceso, mediante la interrupción de la función de la membrana mitocondrial y sus proteínas asociadas. El mecanismo de interrupción de la función de la membrana mitocondrial sigue siendo un tema de conjeturas; sin embargo, algunos sugieren que los dímeros y estructuras de orden superior de algunas proteínas de la familia Bcl-2 pueden formar poros en la membrana mitocondrial (Cook y Poole-Wilson, 1999).

En la vía mediada por receptores de muerte, el ligando Fas (FasL) o el factor α de necrosis tumoral (α -TNF) se unen al receptor de muerte, originando el reclutamiento de un dominio de muerte como el FADD (Proteína Fas con dominio de muerte) o TRADD (Transductor de señal). Por ejemplo, el FADD que está asociado al Fas, produce la activación de la caspasa 8 y de las caspasas efectoras. Por otro lado, existen supresores de la apoptosis mediada por los receptores de muerte como son los ARC (represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento para caspasa) y la FLIP (proteína inhibitoria de Flice).

Ambas vías, la mediada por la mitocondria y la mediada por receptores de muerte, convergen en las caspasas efectoras, como la caspasa 3. Así mismo, las dos vías pueden interactuar a través de la proteína Bid de la familia de proteínas Bcl-2. Bid es usualmente localizada en el citosol, pero translocada a la mitocondria cuando ella, por la activación de la caspasa 8, se rompe a Bid truncado (tBid). En la mitocondria produce la liberación del citocromo c, probablemente por la interacción con agentes Bax proapoptóticos (Kang e Izumo, 2003).

Las caspasas son pro-apotóticas y actúan como pro-enzimas que se activan por la división en secuencia de proteínas específicas. Una vez activas estas enzimas tienen actividad proteolítica y seccionan sustratos específicos. Las caspasas que se activan al principio del proceso (iniciadoras) actúan sobre las caspasas posteriores (efectoras) en una cascada de caspasas que permiten la amplificación. En última instancia, la cascada de caspasas conduce a la división de las proteínas intracelulares diana, resultando en su activación o en su degradación. De esta manera, las caspasas pueden reclutar y activar las proteínas implicadas en el proceso de apoptosis, por ejemplo la endonucleasa dependiente de las caspasas, inactiva las proteínas de supervivencia, tales como las quinasas de respuesta extracelular (ERK) y la enzima de reparación del ADN poli (ADP) ribosil polimerasa (PARP) y actúan directamente sobre las proteínas del citoesqueleto produciendo cambios de la membrana plasmática.

A diferencia de las caspasas, las proteínas Bcl-2 no se activan por escisión proteolítica y, repetimos, pueden ser pro- o anti- apoptóticas. (Tabla 2) (Cook y Poole-Wilson, 1999).

Tabla 2. Proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas y pro-apoptóticas

Anti-apoptóticas	Pro-apoptóticas
Bcl-2	Bax
Bcl-x ₁	Bad
Al	Bid
Bcl-w	Bok
CED-9	Bcl-x _s

(Cook y Poole-Wilson, 1999)

1.1.5.2 Características Morfológicas de la Apoptosis en Cardiomiocitos

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por observarse en células individuales dispersas en un tejido y porque sigue procesos bien definidos, dependientes del tiempo, que dan lugar a cambios en la membrana plasmática, a la proteólisis de las proteínas intracelulares, la pérdida de la función mitocondrial y la fragmentación del ADN, pero no se produce interrupción de la membrana celular, los lisosomas permanecen intactos en el interior de la célula y no hay procesos inflamatorios o edematización, ya que las células apoptóticas son “fagocitadas” por las células vecinas o a veces por macrófagos (Cook y Poole-Wilson, 1999); <http://www.apoptosisinfo.com/cardiomyocyte-apoptosis/>).

Las características mencionadas anteriormente se reflejan en cambios morfológicos generales que incluyen contracción o dilatación de la célula, pérdida de los contactos célula-célula, deformación y “emburbujamiento” de la membrana celular, condensación nuclear, fragmentación del ADN (escalera del ADN) y finalmente, ruptura de la célula en cuerpos apoptóticos que contienen tanto fragmentos nucleares como componentes citoplasmáticos, incluyendo organelas intactas. Los cuerpos apoptóticos cuando se producen *in situ* son fagocitados por las células circundantes, sin involucrar una respuesta inflamatoria (Cook y Poole-Wilson, 1999; Gorczyca y col., 1998). El rasgo más característico de las células apoptóticas es la condensación de la cromatina en forma de agregados ubicados periféricamente adosados a la parte interna de la membrana nuclear formando masas separadas de diversos tamaños y formas.

A nivel bioquímico, la apoptosis se caracteriza por la degradación del ADN nuclear. El ADN se escinde inicialmente en secciones de 50-300 kilobases de tamaño y posteriormente, se producen fragmentos nucleosomales y oligo-nucleosomales de bajo peso molecular de moléculas de ADN de aproximadamente 180 pares de bases o múltiplos de este, aunque el escalamiento del ADN no se produce en todos los casos de muerte celular por apoptosis (Gorczyca y col., 1998).

A diferencia de la muerte celular por necrosis, la apoptosis no produce una respuesta inflamatoria y la integridad de la membrana plasmática se mantiene hasta el final del proceso, que al limitar y localizar el daño tisular previene la salida al intersticio de contenidos intracelulares nocivos (Tabla 3) (Cook y Poole-Wilson, 1999).

El proceso de apoptosis en los miocitos cardíacos es de especial importancia en comparación con otros tipos de células, por la especificidad estructural y funcional de la célula miocárdica (Maruyama y col., 2001).

Tabla 3. Comparación morfológica entre apoptosis y necrosis

Apoptosis	Necrosis
Las células aisladas o agrupaciones celulares son afectadas	Áreas de tejido destruidas
Células contraídas y pequeñas	Edema celular
Organelas intactas, compactas	Organelas dilatadas
Condensación de la cromatina	Engrosamiento de la cromatina
Membrana plasmática intacta	Ruptura de la membrana plasmática
Fagocitosis de cuerpos apoptóticos	Ruptura celular que produce inflamación

(Cook y Poole-Wilson, 1999)

Estudios de la apoptosis inducida por el ligando Fas y la actinomicina D, en cardiomiocitos adultos de rata en placas de cultivo durante 48 horas, revelan que los

primeros cambios observados son la deformación del borde celular y la modificación de la forma tipo bastón de la célula a una forma cilíndrica o cuadrada por acortamiento del eje longitudinal, pero manteniendo la función de contracción; mientras que otras células presentan forma redonda con una superficie lisa, en las cuales desaparece la función contráctil. Posteriormente, aparecen evaginaciones celulares lisas y finalmente, los cuerpos apoptóticos. En las horas iniciales de cultivo se observa contracción celular que va desapareciendo con el tiempo (Maruyama y col., 2001).

Generalmente en un cardiomiocito de forma alargada tanto el núcleo como las miofibrillas y las mitocondrias están intactos; es decir, muestran una ultraestructura normal. Mientras que en células apoptóticas de forma cuadrada, la cromatina se condensa y se distribuye en la periferia del núcleo y la estructura de las miofibrillas se altera parcialmente, perdiendo la banda Z. Posteriormente, la forma celular cambia a redonda con la superficie celular lisa y retraída al máximo, el núcleo se fragmenta, la cromatina se condensa, el citoplasma se retrae y las miofibrillas en él contenidas son difusas y con su estructura completamente modificada, las mitocondrias se retraen, se condensan y pueden contener en su interior cuerpos de aspecto rugoso (Maruyama y col., 2001).

A partir de la membrana plasmática se producen evaginaciones a manera de exocitosis celular con membranas lisas, que pueden contener fragmentos nucleares con la cromatina condensada, mitocondrias y miofibrillas desorganizadas. Finalmente, se produce la fragmentación celular formando los cuerpos apoptóticos que al igual que las evaginaciones tienen membranas lisas, orgánulos subcelulares como mitocondrias condensadas y las miofibrillas desorganizadas. Algunas células presentan membranas no continuas y de aspecto irregular, posiblemente debido a que se produce una necrosis secundaria post-apoptótica después de las 48 horas y que es definida como la degeneración de las organelas subcelulares y la ruptura de la membrana plasmática, a pesar de la presencia de la cromatina condensada apoptótica. Otras células muestran las características de necrosis oncótica, tales como cambios nucleares, interrupción de la membrana plasmática, degeneración de las organelas citoplasmáticas, mitocondrias edematizadas, cuerpos densos amorfos y miofibrillas contraídas.

1.1.5.3 Porcentaje de Apoptosis de Cardiomiocitos en Cultivo

La apoptosis es un proceso biológico constante tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa postnatal, por esta razón para la caracterización de los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios, se consideró que la determinación del porcentaje de apoptosis puede contribuir de manera importante en la búsqueda de tal caracterización.

Los reportes del porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos en cultivo referidos en diferentes estudios y con distintas metodologías son variables, como se observa en la Tabla 4. Esto puede ser debido a las diferentes condiciones del sistema de cultivo, o se puede relacionar con la etapa de desarrollo de los cardiomiocitos, ya que se ha reportado que la muerte por apoptosis en corazón de rata aumenta en forma progresiva con la edad del animal y que puede llegar a aumentar por diferentes condiciones patológicas (Nadal-Ginard, 2001). Por ejemplo, en cardiomiocitos de rata neonatal expuestos a condiciones severas de hipoxia, por el método de TUNEL o Marcado del extremo libre por dUTP por desoxi-transferasa terminal (por sus siglas en inglés *Terminal dUTP Nick End Labeling*), se determinó a las 24 horas un ~40% de células apoptóticas y de $12 \pm 3\%$ en los cardiomiocitos control (Adachi y col., 2001), mientras con la misma metodología el porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos humanos *in situ* fue casi indetectable (~ 1%) (Dorn, 2009).

Tabla 4. Porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos en cultivos en placa

Cultivos en Placa de Cardiomiocitos	Tiempo de Cultivo	% de Apoptosis	Técnica
Rata neonatal	2 días	4,3	TUNEL
Rata neonatal	4 días	16	IP
Rata neonatal	5 días	5-7	IP
Ratón neonatal	5 días	4	TUNEL
Rata adulta	2 días	15	TUNEL

(Maruyama y col., 2001; Wang y col., 2001; Webster y col., 1999; Long y col., 1997)

2. METODOLOGÍA

2.1 Animales

Las muestras de tejido se obtuvieron de ratones de cepas del Naval Medical Research Institute (NMRI), de edades embrionarias 17, 19 y 21 días (E17, E19, E21) y de 0, 1, 3 y 5 días de edad postnatal (P0, P1, P3, P5), proporcionados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. Hembras de ratones en gestación y los ratones de edad postnatal se anestesiaron con Ketamina[®] a una dosis de 240 mg/Kg-peso. A las hembras de ratones en gestación se les hizo una incisión abdominal para extraer los embriones. A cada ratón se le hizo una incisión a nivel del tórax para exponer y extraer el corazón, el cual fue colocado inmediatamente en solución Tyrode estéril. Bajo observación con lupa estereoscópica se realizó la disección del ventrículo izquierdo y se procedió a obtener muestras del músculo cardíaco. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a lo establecido por el Comité de Bioética de la Universidad de Los Andes para el uso de animales en experimentación según las exigencias establecidas en las Normas para la Utilización de Animales en Investigación contenidas en el Código de Bioética y Seguridad del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONACIT, Caracas, Venezuela) (2002) y en conformidad con las Normas establecidas por el NIH (National Institute of Health, USA) para el tratamiento ético de animales en laboratorios (1996).

2.2 Cultivos Rotatorios Íntegros

Los fragmentos de tejido se colocaron en frascos Erlenmeyer conteniendo medio basal de Eagle con L- glutamina (79,5%), suero de caballo (10%), penicilina/ estreptomycin, 5.000 U/mL/5.000 mg/mL (0,5%) y solución Tyrode (10%). El cultivo de los fragmentos íntegros se realizó por períodos de uno a seis días en incubación rotatoria en ambiente controlado con O₂ (95%) y CO₂ (5%), a 37°C y 70 rpm. Durante el tiempo de cultivo el medio se cambió cada 48 horas y se oxigenó cada 24 horas (Palacios-Prü y col., 1982).

2.3 Microscopía Electrónica

Al finalizar cada período de incubación, los cultivos fueron fijados por un período de 1 a 2 horas en mezcla 3:3 (glutaraldehído 3%, formaldehído 3% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3) (Palacios-Prü y Mendoza-Briceño, 1972). Después los fragmentos de tejido se

lavaron con tampón cacodilato y se post-fijaron por 3 a 12 horas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% preparado en el mismo tampón cacodilato. Concluido este tiempo, los cultivos fueron lavados con solución tampón y deshidratados en concentraciones ascendentes de alcohol etílico seguido de óxido de propileno, finalmente fueron infiltrados e incluidos en resina epoxídica. De los tejidos incluidos se hicieron secciones de 1 micra de espesor, las cuales fueron coloreadas con p-fenil-endiamina en solución acuosa al 1% (p/v) y secciones ultrafinas de 90 nanómetros de espesor, fueron contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo para el análisis ultraestructural (Reynolds, 1965; Watson, 1958). Para determinar el Período Crítico de los cardiomiocitos en Cultivos Rotatorios se analizó la citología de las edades embrionarias 17, 19 y 21 días (E17, E19, E21) y de 0, 1, 3 y 5 días de edad postnatal (P0, P1, P3, P5). La microscopía electrónica también se utilizó para el análisis de la apoptosis en los cardiomiocitos E21 *in vitro*, E21 y P5 *in situ*.

2.4 Obtención de Cardiomiocitos

Los cardiomiocitos citotípicos *in vitro* se obtuvieron en los cultivos primarios de cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario incubados durante 6 días (Período Crítico del tejido cardíaco en Cultivos Rotatorios). Mientras que para obtener los cardiomiocitos *in situ* de 21 días embrionarios y de 5 días postnatales se extrajo el corazón, se realizaron lavados con solución Tyrode libre de Ca^{++} y Mg^{++} , se hizo la disección del ventrículo izquierdo y se obtuvieron fragmentos de músculo cardíaco de aproximadamente 3mm^3 . Posteriormente, para la obtención de las células se aplicó el protocolo propuesto por Chlopčiková y colaboradores (Chlopčiková y col., 2001). Los fragmentos de tejido cardíaco se lavaron con solución Tyrode libre de Ca^{++} y Mg^{++} , se continuó con la disociación enzimática secuencial con tripsina al 0,2% en agitación a 37°C por 20 minutos, al finalizar el ciclo de incubación se realizó disociación mecánica, se tomó el sobrenadante, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. El concentrado celular se transfirió a una placa de cultivo con medio de cultivo basal de Eagle con L-glutamina (79,5%), suero de caballo (10%), penicilina/ estreptomycin, 5.000 U/mL/5.000 mg/mL (0,5%) y solución Tyrode (10%), se incubó a 37°C en ambiente controlado con O_2 (95%) y CO_2 (5%). Este procedimiento se repitió varias veces hasta disociar todo el tejido cardíaco (Chlopčiková y col., 2001).

2.5 Análisis de la Síntesis de ADN por Citometría de Flujo

Para el análisis de la síntesis de ADN se siguió el protocolo propuesto por el Instituto Blizzard de Ciencia Celular y Molecular con algunas modificaciones. El cultivo celular fue incubado en bromodesoxiuridina (BrdU), 10 μM (Biotechnology Santa Cruz), durante un tiempo de 45 minutos a una hora, posteriormente las células se fijaron con PAF (fenol-alcohol-formol) al 0,3% en tampón fosfato salino (PBS), durante 10 minutos a temperatura ambiente. La suspensión celular fue centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos, se lavó dos veces con PBS. Las células fueron resuspendidas en una solución de HCl a 2M por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se trataron con tampón borato (0,1M) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizaron con PBS-saponina por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 200 μl de PBS, albumina de suero bovino (BSA) 0,1% y saponina. Luego, se marcaron con 5 μl de anticuerpo monoclonal cadena pesada de la miosina cardíaca (abcam, ab15) durante 45 minutos a 4°C, se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 200 μl de PBS, BSA 0.1% y después fueron teñidas con los anticuerpos secundarios, 3 μl de anti-BrdU conjugado a FITC (Biotechnology Santa Cruz) y 2,5 μl de *donkey anti-mouse ficoeritrina* (PE), durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 200 μl de PBS, BSA 0,1% y saponina. Finalmente, fueron incubadas con 5 μl de RNasa durante 15 minutos a 37°C y se lavaron dos veces con PBS. (<http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/protocols/cellcycle/bicmsbrdu.html>).

La suspensión celular fue analizada en un citómetro de flujo FACsort mediante el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Fueron registrados 10.000 eventos y mediante un gráfico tipo “*dot-plot*”, se estableció la región donde se ubican los cardiomiocitos en el gráfico de FSC (*Forward scatter*) y las células positivas para la miosina-PE. A partir de la población seleccionada se realizó otro gráfico tipo “*dot-plot*” para ubicar la población de cardiomiocitos positivas para BrdU-FITC y Miosina-PE.

2.6 Análisis del Ciclo Celular y de la Apoptosis por Citometría de Flujo

La suspensión celular se fijó con PAF al 0,3% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y fue tratada de igual manera que las muestras para el análisis de

la síntesis de ADN, con la diferencia que primero las células se marcaron con 5 μ l de anticuerpo monoclonal cadena pesada de la miosina cardíaca (abcam, ab15) durante 45 minutos a 4°C, se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 200 μ l de PBS, BSA 0,1% y luego fueron teñidas con los anticuerpos secundarios, 2,5 μ l de *donkey anti-mouse fluorescein* (FITC) durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad y 10 μ l de Ioduro de Propidio (IP). La suspensión celular fue analizada en un citómetro de flujo FACsort mediante el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Fueron capturados 10.000 eventos y mediante un gráfico tipo “*dot-plot*”, se estableció la región donde se ubican los cardiomiocitos en un gráfico de FSC (*Forward scatter*) y las células positivas para la miosina-FITC. A partir de la población seleccionada se realizó un histograma donde fue determinada la distribución de las células en las diferentes etapas del ciclo celular.

2.7 Análisis Estadístico

Se determinaron por Citometría de Flujo los porcentajes de síntesis de ADN con la tinción de BrdU y la de IP. Así mismo, con la IP se calcularon los porcentajes de los cardiomiocitos en apoptosis y fases del ciclo celular (G0/G1, G2/M). Los resultados se examinaron aplicando el programa estadístico SPSS versión 15. Primero se realizó el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para valorar las diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de síntesis de ADN, apoptosis y fases del ciclo celular en los cardiomiocitos *in vitro* y compararlas con los porcentajes de estos procesos biológicos presentes en los cardiomiocitos *in situ*. Posteriormente, se hicieron comparaciones con la prueba de Dunnett. Los valores obtenidos se expresaron en promedio de media \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm DE$), tomando el 95% como índice de confiabilidad estadística ($p < 0,05$). Se compararon los resultados de los análisis estadísticos para determinar si existía o no diferencias significativas entre la síntesis de ADN, apoptosis y fases del ciclo celular (G0/G1, G2/M) en los cardiomiocitos *in vitro* y los porcentajes presentes de éstos parámetros en los cardiomiocitos *in situ*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Período Crítico para los Cardiomiocitos en Cultivos Rotatorios

Las células musculares se caracterizan ultraestructuralmente por la presencia de estriaciones transversales orientadas en ángulo recto al eje longitudinal de las fibras

musculares y que son el producto de la interacción de un complejo material contráctil multiprotéico, que determina la formación de una particular estructura morfológica conocida como sarcómera.

Durante el desarrollo embrionario del tejido cardíaco *in situ*, se observan cambios citológicos propios de la maduración celular y tisular. Es así como en el tejido cardíaco de 21 días de edad embrionaria (Figuras 2a, 2b, 2c) y de 5 días postnatales (Figuras 2g, 2h, 2i), se observa que el cambio más significativo en el cardiomiocito es un aumento progresivo en la cantidad y en la organización del material contráctil representado por las miofibrillas con su unidad estructural y funcional, la sarcómera. A nivel ultraestructural, en una misma célula se pueden observar miofibrillas en diversas etapas de desarrollo. Cuando los miofilamentos están dispersos, se orientan en diferentes direcciones (longitudinal, transversal y oblicuo), así como se pueden visualizar miofibrillas en formación con la estructura de la banda Z irregular (Figura 2a), sin embargo, en la mayoría de los cardiomiocitos se evidencian miofibrillas con estriaciones bien organizadas a lo largo del eje longitudinal de la célula y con varias unidades sarcoméricas, en las que se pueden identificar sus componentes ultraestructurales como son las bandas Z, A, I, H (Figuras 2b, 2c). Algunas miofibrillas rodean el núcleo y otras están dispersas en todo el citoplasma y contribuyen a incrementar la electrón-densidad del citoplasma, conjuntamente con el aumento de otras estructuras celulares. El núcleo es grande, alargado y en muchos casos presenta varios nucléolos prominentes, lo cual puede estar relacionado con el momento celular de la actividad de síntesis proteica, observándose en ocasiones la presencia de cardiomiocitos binucleados. Así mismo, muestran mitocondrias de diferentes tamaños y formas, algunas ubicadas muy cerca de las miofibrillas y otras dispersas en todo el citoplasma, pero a medida que aumenta la densidad de las miofibrillas se van ubicando en un arreglo longitudinal a las mismas y estas a su vez siguen el eje longitudinal de la célula, todo esto relacionado con el cambio de la forma de los cardiomiocitos, ya que los cardiomiocitos en ratones de 9,5-12,5 días de desarrollo embrionario tienen una forma poligonal y las miofibrillas se orientan al azar en el citoplasma; a los 16,5-18,5 días de desarrollo embrionario los cardiomiocitos se hacen alargados y por lo tanto las miofibrillas se alinean. El crecimiento longitudinal de las células es consecuencia del aumento de la longitud de las miofibrillas y la orientación

paralela, indicando que la alineación de las miofibrillas sucede de forma secuencial (Hirschy y col., 2006). Así mismo, es posible observar en algunos sitios la presencia de material electrón-denso localizado a ambos lados de las membranas celulares y que corresponde a uno de los componentes de los discos intercalares, como son los desmosomas (Figura 2a).

Conviene destacar, que algunas de las principales estructuras celulares de los cardiomiocitos, como son las miofibrillas, las uniones celulares y las mitocondrias, van cambiando su conformación progresivamente durante el desarrollo embrionario, observándose estructuras en diferentes grados de desarrollo al compararlas con la ultraestructura del cardiomiocito adulto. Por ejemplo, las miofibrillas no están concentradas en masas confluentes, sino que en la mayoría de los casos están separadas por el espacio citoplasmático definiendo en ocasiones un espacio interfibrilar irregular.

El estudio ultraestructural del miocardio cultivado por períodos cortos de tiempo, revela que el cambio más importante se observa en la estructura y desarrollo del complejo multiprotéico o miofibrillas, que son las estructuras fundamentales para la funcionalidad de los cardiomiocitos.

En este caso, en los primeros días del cultivo de cardiomiocitos en edades embrionarias, los miofilamentos están dispersos en el citoplasma y orientados en diferentes direcciones, a medida que aumenta el tiempo de cultivo, específicamente a partir del día 3, se presenta un avance en la organización de los miofilamentos, que están formados por aparentes filamentos de actina y miosina alineados por un disco Z; además, se nota un aumento en el número de las miofibrillas. Este progreso en la organización de los miofilamentos se muestra en algunos cardiomiocitos (Figuras 3a y 3b), ya que en otros se mantiene la disposición irregular de los miofilamentos (Figuras 2d y 2f). También puede señalarse que a medida que avanza la edad embrionaria (E21) se observan miofibrillas ramificadas a partir de la banda Z y con mayor número de unidades sarcoméricas. Chacko en 1976, describe que las ramificaciones de las miofibrillas ocurren en embriones de ratas de 13 días, estas ramificaciones se inician principalmente

en las regiones del disco Z y en algunos casos muestran una configuración en forma de Y o X, con puntos de inserción en el disco Z. Cabe considerar, por otra parte, que en las miofibrillas de los cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario en Cultivos Histotípicos Rotatorios, se pueden identificar las estriaciones transversales de las sarcómeras, formando lo que ultraestructuralmente se conoce como bandas Z, A, I, H y una pseudobanda M. El inicio de la organización sarcomérica se evidencia a partir del día 3 de cultivo, hasta formar, a los 6 días de cultivo, una estructura sarcomérica bien definida.

En los Cultivos Histotípicos Rotatorios de cardiomiocitos de ratón E21 también se observan las características fenotípicas de sus homólogas *in situ* (Figuras 2d, 2e, 2f, 3a, 3b, determinadas por una citoarquitectura organizada, con sus componentes principales, como es la presencia de miofibrillas intercaladas con líneas de mitocondrias siguiendo al eje longitudinal de la célula y uniones celulares que posiblemente son las precursoras de los complejos discos intercalares (Figura 2e). Así mismo, en estos cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario en cultivo se evidencian esbozos del sistema de túbulos T. Chacko en 1976, reporta que los túbulos T empiezan a aparecer en el miocardio de 11 días de desarrollo embrionario en ratas. Estudios más recientes describen que algunas células cardíacas, en las cuales se incluyen miocitos ventriculares de animales embrionarios, no tienen sistema de túbulos T o tienen un sistema muy escaso que se desarrolla durante las primeras semanas de vida, así mismo, reportan que los miocitos que se mantienen en cultivo pierden la estructura de los túbulos T (Brette y Orchard, 2003).

Las mitocondrias en los cardiomiocito en Cultivos Histotípicos Rotatorios, están presentes en gran número, con formas y tamaños variados; en los primeros días de cultivo están dispersas en todo el citoplasma, pero a medida que avanza el tiempo de cultivo y las miofibrillas se disponen siguiendo al eje longitudinal de la célula, las mitocondrias se distribuyen de la misma forma y muy cerca de las sarcómeras, de manera semejante a la descripción hecha por Navaratnam y colaboradores (Navaratnam y col., 1986) en los cardiomiocitos de embriones de ratón 9 de días de edad, quienes

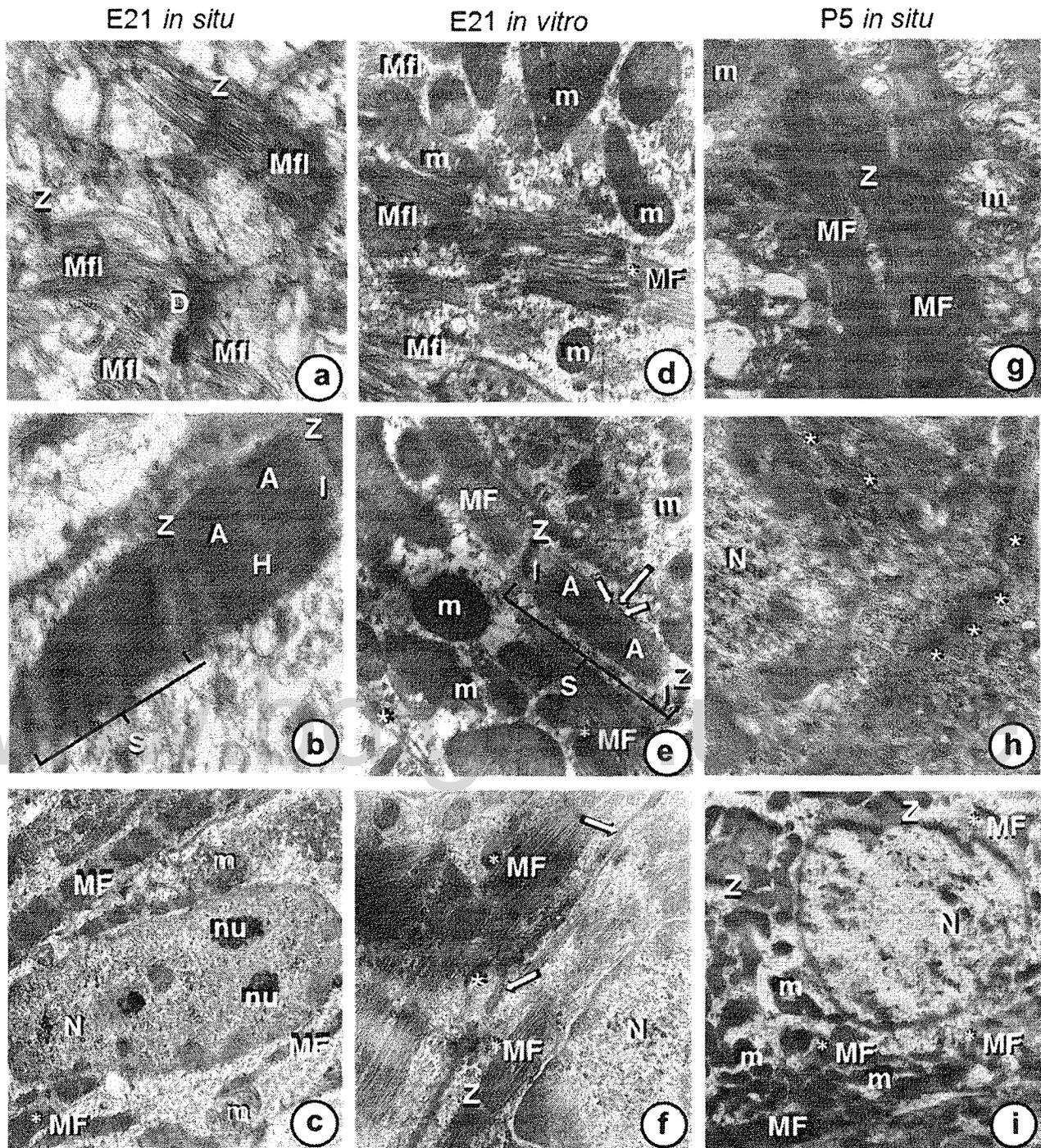


Figura 2. Características ultraestructurales de cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario *in situ* e *in vitro* y de 5 días de desarrollo postnatal *in situ*. a, Diversas fases de formación de miofibrillas donde se observan miofilamentos (Mfi) dispersos y orientados en distintas direcciones, incipientes bandas Z (Z) y una unión celular tipo desmosoma (D). b, Miofibrilla bien conformada y organizada en sarcómeros (S) que muestra las bandas Z, A, I y H. c, Muestra la citoarquitectura propia del cardiomiocito con un citoplasma medianamente electrón transparente donde se identifican miofibrillas (MF) algunas de ellas en formación (*MF), mitocondrias (m) y un núcleo alargado (N) con dos nucléolos (nu). d, Segmento del citoplasma de un cardiomiocito en el cual se observan miofilamentos (Mfi) dispersos orientados irregularmente, miofibrillas en formación (*MF), el posible inicio del ensamblaje de

una banda Z (Z) y abundantes mitocondrias (m). e, Se pueden ver miofibrillas en formación (*MF) y miofibrillas con mayor grado de desarrollo (MF) con una sarcómera (S) ya conformada por las bandas Z, I, A, H (flechas cortas y M (flecha larga). m, mitocondrias. f, Parte de dos cardiomiocitos que muestran miofibrillas en formación (*MF) identificándose claramente una banda Z (Z), el esbozo del sistema de túbulos T (flecha), una unión intercelular (asterisco). A, bandas; H, banda H; I, banda I; Z, banda Z; asteriscos, uniones intercelulares. Aumentos originales: a, 15.000X; b, 18.000X; c, 4.000X; d, 15.000X; e, 10.000X; f, 12.000 X; g, 12.000X.; h, 8.000X; i, 6.000X.

refieren que aumenta el número de mitocondrias y estas tienden a estar concentradas entre las miofibrillas (Figura 2e).

Generalmente, el núcleo de los cardiomiocitos *in vitro* se muestra de forma redonda a elongada, en ocasiones con bordes irregulares. En edades embrionarias algunas células son binucleadas, pero en edades postnatales, según lo reportado por algunos autores, aumenta la frecuencia de binucleación; característica también observada *in situ*, donde con la edad, los cardiomiocitos tienden a ser binucleados (Rohr y col., 1991), concluyendo que la mayoría de los miocitos adultos son binucleados (Ahuja y col., 2007; Pasumarthi y Field, 2002; Diez y Simm, 1998). En los ratones y ratas, la presencia de los cardiomiocitos binucleados comienza alrededor del día 4 postnatal y a la tercera semana postnatal el 85-90% de los cardiomiocitos son binucleados (Ahuja y col., 2007). Finalmente, es de hacer notar que es frecuente observar núcleos con dos o más nucléolos, lo cual puede estar relacionado con el momento celular de la actividad de síntesis protéica.

Teniendo en cuenta las características ultraestructurales de los cardiomiocitos en Cultivos Rotatorios, se determina que el Período Crítico para las células del tejido cardíaco en ratón, es a la edad embrionaria de 21 días con un tiempo de 6 días de cultivo, que es cuando adquieren las características miotípicas específicas descritas anteriormente. Una vez determinado el Período Crítico, lo cual permite la estandarización de los parámetros de edad óptima del material biológico y tiempo de incubación, se garantiza este modelo de cultivo para ser utilizado en ensayos posteriores en diferentes campos aplicativos de la biología, porque es el momento crucial para el desarrollo de las características propias de éste tejido.

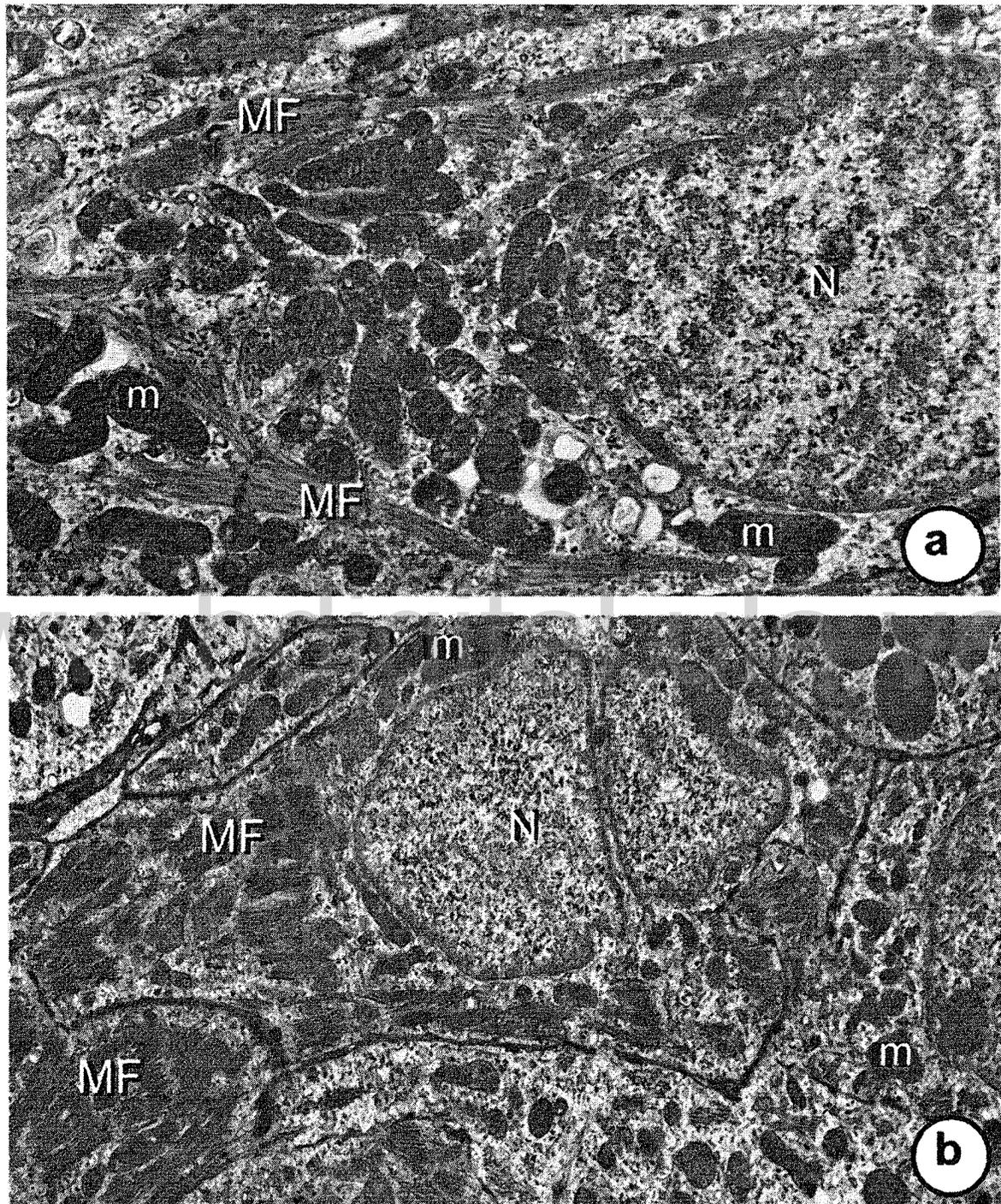


Figura 3. Cardiomiocitos de ratón E21 provenientes de cultivos histotípicos rotatorios. a y b. Células miocárdicas con su normal morfología elongada o en barra, con miofibrillas (MF) organizadas y abundantes mitocondrias (m). N, núcleo (binucleación). Aumentos originales: a, 5.000X; b, 3.000X.

Tanto en Cultivos Histotípicos Rotatorios como durante el desarrollo *in situ*, la primera estriación transversal que se observa en los cardiomiocitos es la banda Z. Sanger y Sanger (Sanger y Sanger, 2002) describen que en cultivo la formación de la banda Z se inicia en la protomiofibrilla con la fusión de los cuerpos Z. Posteriormente, en la miofibrilla madura la banda Z se une a la membrana celular a través de las proteínas costaméricas como la vinculina y talina. Por otro lado, en estudios sobre el desarrollo embrionario del tejido cardíaco, se describe que en el ratón de 9 días de edad hay evidencias de estriaciones transversales en forma de “parches” de material electrón-denso, a intervalos regulares a lo largo de los fascículos cortos de filamentos paralelos, constituyendo los precursores de la banda Z (Navaratnam y col., 1986). Así mismo, en las células cardíacas de embriones de ratón de 13 días de edad, se observa la banda Z (Risebro y col., 2009). Inicialmente, la banda Z tiene una amplitud irregular y variable y a medida que se alcanza un mayor desarrollo, estas bandas Z se alargan y se vuelven más prominentes (Lozyk y col., 2006).

Por otra parte, las características ultraestructurales del miocardio embrionario de rata han sido reportadas desde hace varios años. Uno de los primeros estudios fue el realizado por Chacko (Chacko, 1976), quien describe las fibrillas estriadas con bandas I y Z en los cardiomiocitos de rata de 11 días de desarrollo embrionario. Igualmente describe que en las miofibrillas de los cardiomiocitos de ratas perinatales se encuentran todas las bandas con excepción de la banda M (Chacko, 1976); mientras que Anversa y colaboradores (Anversa y col., 1981) reportan en músculo cardíaco de ratas de 1 a 5 días de edad postnatal, pocas evidencias de la banda M, pero empiezan a aumentar en número después del 5 día de vida postnatal y están presentes en el 60% de todas las sarcómeras a los 11 días de edad postnatal; demostrando que la banda M de músculo cardíaco de rata sufre un desarrollo significativo en el período postnatal temprano, desde día 1 hasta el día 11 después del nacimiento. En contraste, en otro reporte donde utilizan como control miocardio de embriones de ratones de 13 días de edad, ya se evidencia la banda M en las sarcómeras de los cardiomiocitos (Risebro y col., 2009).

En nuestro estudio, en cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario en Cultivos Histotípicos Rotatorios, como se observa en la figura 4c, se detecta una tenue banda M en el centro de cada sarcómera, indicando que a esta edad ya existen miofibrillas con sus sarcómeras bien desarrolladas. Según Chacko (Chacko, 1976), la banda M es una característica estructural distintiva de la miofibrilla madura, identificada ultraestructuralmente como una línea densa en el centro de cada sarcómera, así mismo Hirschy y colaboradores (Hirschy y col., 2006) concluyen que la formación de las miofibrillas es un proceso rápido y secuencial, en el cual primero se produce el disco Z, luego la banda M, seguido por el ensamblaje de los filamentos gruesos y finos.

Adicionalmente, se han propuesto varios modelos *in vitro* e *in situ* para explicar el ensamblaje de las miofibrillas, debido a que su formación implica un orden preciso de múltiples subunidades formando un arreglo lineal sarcomérico. El modelo más apropiado propone que el ensamblaje de las sarcómeras en las miofibrillas durante el desarrollo del músculo cardíaco tanto *in situ* como *in vitro*, se determina por la aparición de todas las proteínas sarcoméricas distribuidas difusamente en el citoplasma, la formación del complejo naciente I – Z – I, la intercalación de los filamentos de miosina muscular con el complejo I – Z – I y el ensamblaje de tropomodulina a los extremos puntiagudos de los filamentos delgados, formando sarcómeras maduras hasta, finalmente lograr el alineamiento de las miofibrillas maduras (Gregorio y Antin, 2001).

Otra de las características que conviene destacar es que, tanto en Cultivos Histotípicos Rotatorios como en la etapa de desarrollo *in situ* evaluado, se observan uniones intercelulares, algunas poco desarrolladas mientras que otras tienen un alto grado de desarrollo como es el caso de los desmosomas, elementos que pueden posteriormente formar parte de los discos intercalares. Como ha sido referido por otros autores, en las células del miocardio de embriones de ratón de 9 días, aparecen los primeros discos intercalares, donde se registran las uniones comunicantes, las fascias adherentes y los desmosomas (Navaratnam y col., 1986). Así mismo, se ha reportado que en embriones de ratas de 11 días de edad, los discos intercalares aparecen como pequeñas líneas onduladas, que en etapas posteriores se convierten en estructuras complejas y sirven

como límite celular y puntos de fijación para los miofilamentos y fibrillas (Chacko, 1976). Por su parte, Lozyk y colaboradores describen, en el desarrollo embrionario temprano de ratón (12,5-13,5 días,) los discos intercalares de los cardiomiocitos como estructuras cortas, delgadas y con frecuencia, orientadas oblicuamente al eje longitudinal de los cardiomiocitos, pero a medida que progresa el desarrollo, los discos intercalares son más grandes, más complejos y predominan en orientación perpendicular al eje del cardiomiocito (Lozyk y col., 2006).

Por lo general, en los cardiomiocitos las uniones celulares inicialmente se concentran en la zona periférica de la membrana, pero a medida que avanza el desarrollo, estos componentes de los discos intercalares se bipolarizan de forma secuencial, siendo un proceso lento que para las uniones adherentes y desmosomas es alcanzado sólo después del nacimiento y para las uniones comunicantes incluso más tarde (Hirschy y col., 2006). Algunos estudios describen la importancia de las fascias adherentes para la citoarquitectura cardíaca, ya que estos complejos de proteínas de membrana enlazan el citoesqueleto de actina a la membrana, es decir, sirven de sitio de anclaje de las miofibrillas a través de los filamentos delgados. Esto confirma la importancia de las fascias adherentes en la miofibrillogénesis. Por otra parte, los desmosomas son proteínas transmembrana que enlazan el sistema de filamentos intermedios (desmina) a la membrana a través de la interacción de varias proteínas. La desmina rodea a los discos Z e integran el aparato contráctil a la membrana plasmática. Una posible explicación de la distribución embrionaria diferente de los desmosomas y las fascias adherentes, puede ser el modo distinto de ensamblaje de estas estructuras de contacto, existiendo en el mismo lapso de tiempo una restricción para la bipolaridad. Esto sugiere que los cambios que afectan las fascias adherentes y los desmosomas durante el desarrollo son probablemente coordinados por ambas uniones, las cuales a su vez proporcionan el acoplamiento mecánico, que es esencial para la función de los cardiomiocitos, ya que tanto las fascias adherentes como los desmosomas parecen desempeñar principalmente funciones mecánicas (Hirschy y col., 2006).

En los cardiomiocitos, tanto en cultivos como en desarrollo embrionario, se observan ribosomas en cantidades y características ultraestructurales propias de ellos. Sin

embargo, algunos autores proponen que la cantidad de ribosomas es inversamente proporcional al desarrollo, es decir a mayor desarrollo menor es el número de ribosomas. Navaratnam y colaboradores describen que en los cardiomiocitos de embriones de ratón de 8 días, la matriz del citoplasma está ocupada por gran cantidad de ribosomas separados o agrupados formando polisomas, pero que estos parecen disminuir junto con el retículo endoplasmático rugoso en etapas posteriores del desarrollo (Navaratnam y col., 1986). Una descripción similar se hace en los cardiomiocitos de embriones de rata de 10 días y se propone una estrecha asociación de los ribosomas y polisomas con el desarrollo de las miofibrillas (Chacko, 1976).

3.2 Análisis de la Síntesis de ADN, Ciclo Celular, Apoptosis y Proliferación de Cardiomiocitos (E21 *in vitro*, E21 y P5 *in situ*) en Cultivos Histotípicos Rotatorios

Es de vital importancia poder identificar los cardiomiocitos que están replicando su ADN en una población heterogénea, como es el caso del presente estudio, debido a que el condicionamiento de una célula a proliferar se realiza en la fase G1 inmediatamente antes de iniciar la síntesis de ADN y progresa a través del resto del ciclo celular. La detección de la síntesis de ADN en esta etapa permite establecer la regulación del crecimiento en cultivos celulares.

En este trabajo, se investiga la proliferación celular utilizando BrdU, tinción que detecta la incorporación de estos análogos de timina en el ADN recién sintetizado. Cabe aclarar, que el etiquetado y tinción de las células con BrdU, en combinación con la tinción de ADN total con IP y el análisis por citometría de flujo, ofrecen la medida más precisa de las células en las diversas fases del ciclo celular, es decir, es un método que combina la detección de la síntesis de ADN activo a través de la tinción de anticuerpos de base de BrdU, con el contenido de ADN total a partir de IP. Esto permite la clara separación de las células en G1 de la fase S temprana, o fase S tardía de la de G2/M. Además, este enfoque puede ser utilizado para investigaciones posteriores, por ejemplo la evaluación de fármacos que puedan causar estímulos diferentes sobre la regulación de la progresión del ciclo celular en Cultivos Histotípicos Rotatorios de cardiomiocitos.

El análisis de síntesis de ADN y ciclo celular se realiza a partir de una población de cardiomiocitos recién dissociada, donde existe una mezcla de cardiomiocitos en forma cilíndrica y cardiomiocitos contraídos de forma redondeada y restos celulares con morfologías y tamaños variados (Figura 4). Para confirmar la identidad de los cardiomiocitos se marcan con el anticuerpo monoclonal de cadena pesada de la miosina (ab15), una proteína sarcomérica que se expresa en las miofibrillas de vertebrados y se localiza intracelularmente.

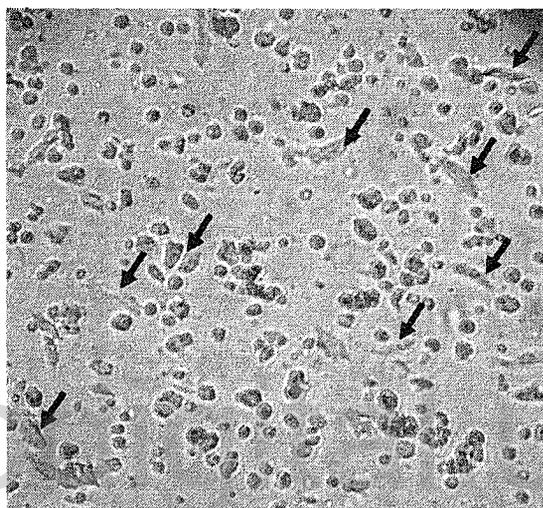


Figura 4. Población celular con cardiomiocitos recién dissociados. Los cardiomiocitos están indicados por flechas. Aumento original: 100X.

Posteriormente para el análisis por FACsort, la suspensión de cardiomiocitos recién preparada se fija con PAF. El tamaño celular en el gráfico de puntos mostrado en la figura 5, representa el parámetro de dispersión física de las células, es decir, la dispersión frontal (tamaño de las células (FSC)) en el eje Y, versus la dispersión lateral (granularidad (SSC)) en el eje X. La población marcada representa los cardiomiocitos (Figuras 5a y 5b).

3.2.1. Apoptosis y Proliferación de los Cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios

La proliferación celular se midió a través de la incorporación de BrdU-FITC. En el gráfico tipo "dot-plot" se indica que los cardiomiocitos marcados con Miosina-PE y que fueron

positivos para BrdU-FITC se consideraron en estado proliferativo. Un total de 10.000 eventos fueron analizados por FACsort y se promediaron para dar un número representativo de las células proliferantes (Figura 6).

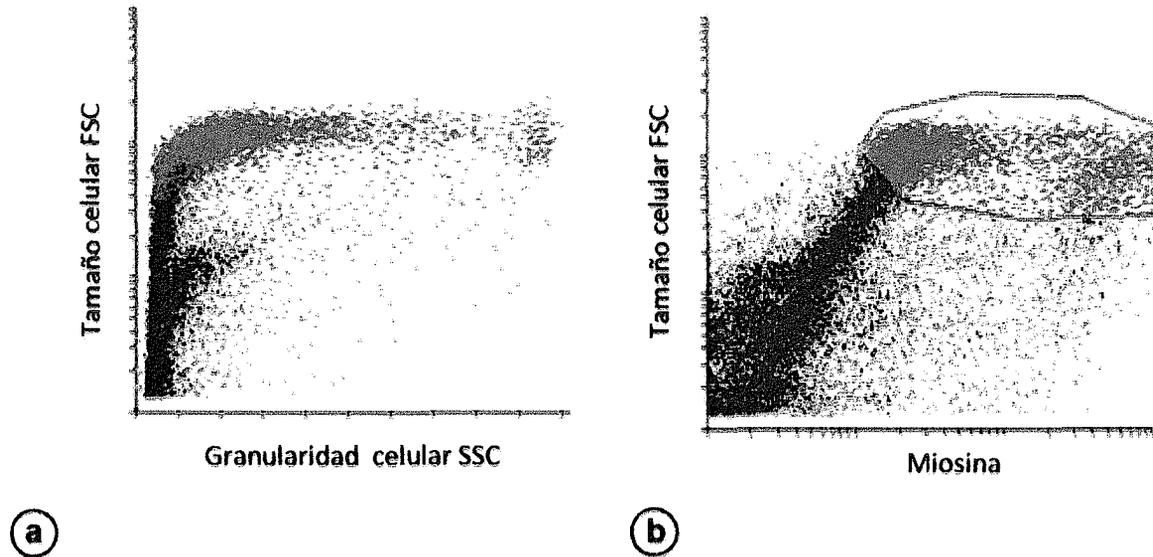


Figura 5. Relación entre tamaño celular, granularidad celular y presencia de miosina. a, Tamaño de celular (FSC) relacionado con la granularidad celular (SSC). **b,** Comparación del tamaño celular (FSC) con la presencia de cardiomiocitos marcados con anticuerpo monoclonal de cadena pesada de la miosina.

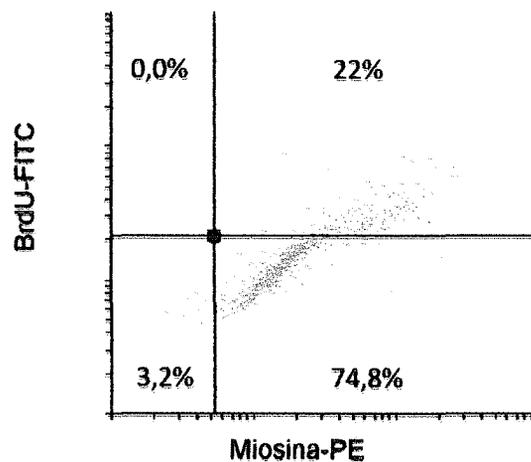


Figura 6. Población de cardiomiocitos marcados con Miosina-PE y positivos para BrdU-FITC

La capacidad proliferativa de los cardiomiocitos E21 *in situ* y E21 *in vitro* (Cultivo Histotípico Rotatorio), así como P5 *in situ*, determinada con la tinción de BrdU, evidencia que en los cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario, el número de células positivas para BrdU fue de $\approx 22\%$, mientras que en cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionarios en Cultivos Histotípicos durante 6 días, el número de células positivas para el BrdU se redujo a un $\approx 15\%$, comportamiento casi similar al porcentaje de células positivas para el BrdU que presentan los cardiomiocitos *in situ* de 5 días posnatal que fue de $\approx 16\%$ (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de síntesis de ADN en cardiomiocitos *in situ* e *in vitro*

Cardiomiocitos	% de Síntesis de ADN
E21 <i>in situ</i>	22 (\pm DE1,41)
E21 <i>in vitro</i>	15 (\pm DE5,65)
P5 <i>in situ</i>	16 (\pm DE4,24)

Los datos indican que el porcentaje de síntesis de ADN tiene una tendencia a disminuir a mayor desarrollo y en los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos. Estos datos, sugieren que el período embrionario tardío se caracteriza inicialmente por una mayor proliferación celular ($\approx 22\%$), la cual disminuye tanto en cultivos de cardiomiocitos embrionarios E21 ($\approx 15\%$), como en la edad postnatal ($\approx 16\%$) a medida que el corazón alcanza el volumen normal (Figura 7).

De los resultados de los porcentajes de síntesis de ADN obtenidos en el desarrollo embrionario y postnatal de cardiomiocitos de ratón, evidentemente se observa que el porcentaje de síntesis de ADN es mayor en la edad embrionaria (≈ 22) y disminuye en la edad postnatal (≈ 16), comportamiento este similar al reportado por Soonpaa y Field para cardiomiocitos de 18 días de desarrollo embrionario ($\approx 19,1$) y en edad postnatal (≈ 12)

(Soonpaa y Field, 1998). Además, el porcentaje de síntesis de ADN en los cardiomiocitos embrionarios en Cultivos Histotípicos (≈ 15) es cercano al obtenido en los

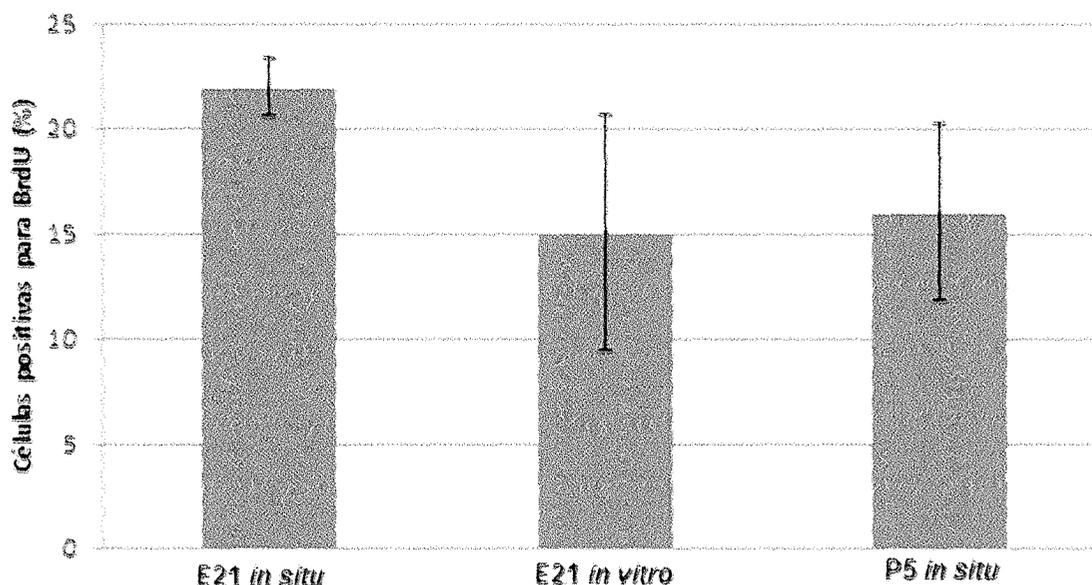


Figura 7. Representación de los porcentajes de síntesis de ADN

cardiomiocitos en edad postnatal *in situ* (P5), indicando que es posible que los cardiomiocitos al adaptarse al sistema de cultivo continúan su desarrollo celular durante el tiempo de incubación (6 días).

Al analizar por microscopía electrónica de transmisión el proceso de apoptosis en cardiomiocitos E21 en Cultivos Histotípicos Rotatorios, se observan células redondeadas, retraídas y con desorganización de la citoarquitectura, aunque no se logró visualizar condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, "emburbujamiento" del sarcolema, ni formación de cuerpos apoptóticos que aparecen posterior a la fragmentación celular, características apoptóticas descritas por algunos investigadores (Cook y Poole-Wilson, 1999; Gorczyca y col., 1998). En las figuras 8a y 8b se muestran cardiomiocitos contraídos que han cambiado su forma alargada a un aspecto redondeado, el borde celular es liso, en el citoplasma se ven miofibrillas parcialmente desorganizadas, mitocondrias retraídas y el núcleo también muestra signos de

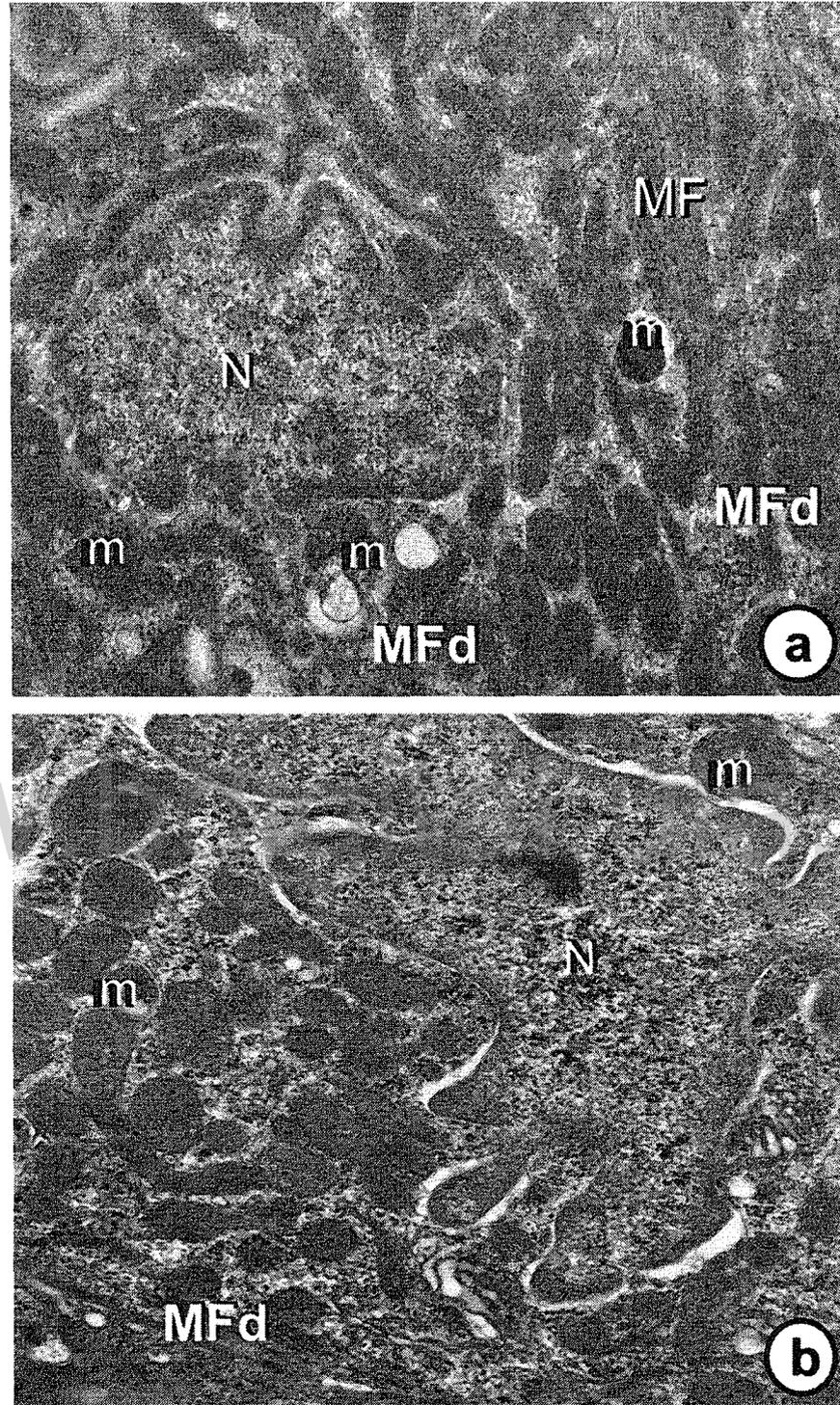


Figura 8. Fase apoptótica inicial en cardiomiocitos de ratón E21 provenientes de cultivos histotípicos rotatorios. Tanto en la imagen **a** como en la **b**, se observa que las miocélulas tienden a hacerse redondeadas y con signos de retracción celular indicada por mitocondrias (m) contraídas, condensación nuclear con marcada presencia de invaginaciones y evaginaciones, aumento del espacio perinuclear y miofibrillas parcialmente desorganizadas (MFd). N, núcleo; MF, miofibrillas. Aumentos originales: a, 5.000 X; b, 7.000X.

condensación, características estas que se observan en la fase inicial del proceso de apoptosis descrita por Maruyama y colaboradores (Maruyama y col., 2001).

3.2.2. Ciclo Celular y Apoptosis

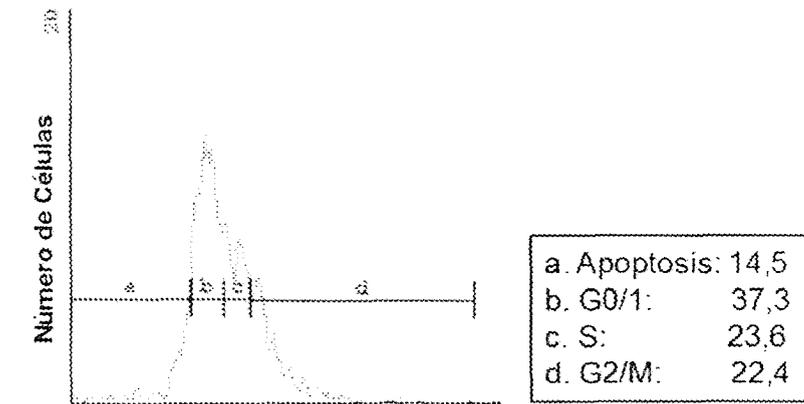
La citometría de flujo es una herramienta útil que permite el análisis de la dinámica del ciclo celular y aporta evidencias del efecto de ciertas condiciones que pueden inducir la muerte celular o apoptosis. Al aplicar esta metodología las células se fijan previamente, se permeabilizan y se exponen al IP, un indicador fluorescente que se intercala y reacciona con el ADN celular; por lo tanto, en un histograma una célula en estado G1, emitirá menor fluorescencia con el IP que una célula en fase S.

En resumen, la intensidad de la fluorescencia en el eje X, se grafica en comparación al número de células analizadas. El ciclo celular se analiza con el software Cell Ques Pro que proporciona el porcentaje de células que se encuentran en cada fase celular. De este modo, para los cardiomiocitos E21 *in situ* el 32,8% de la población celular se encuentra en fase G0/G, 26,51% en S y 34,3% en G2/M. Para los cardiomiocitos E21 *in vitro* 45,08% de la población celular se encuentra en fase G0/G, 19,34 % en S y 7,55% en G2/M y para P5 *in situ* el 37,3% de la población celular se encuentra en fase G0/G, 23,6 % en S y 22,4% en G2/M (Tabla 6, Figuras 9 y 10).

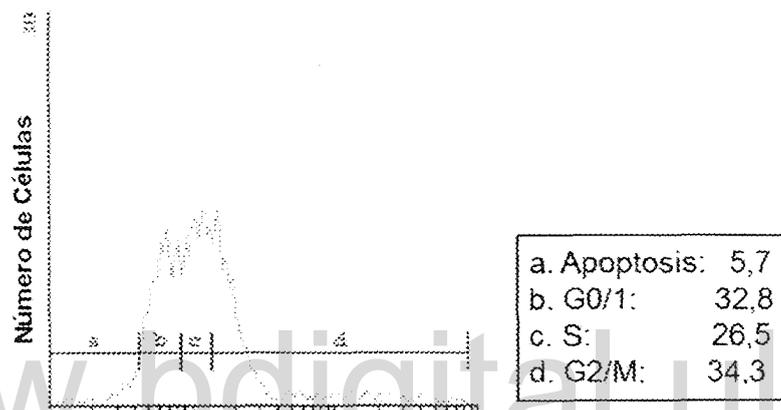
Tabla 6. Porcentaje de apoptosis y fases del ciclo celular en cardiomiocitos *in situ* e *in vitro*

Cardiomiocitos	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
P5 <i>in situ</i>	14,5	37,3	23,66	22,4
E21 <i>in situ</i>	5,7	32,8	26,51	34,3
E21 <i>in vitro</i>	25,72	45,08	19,34	7,55

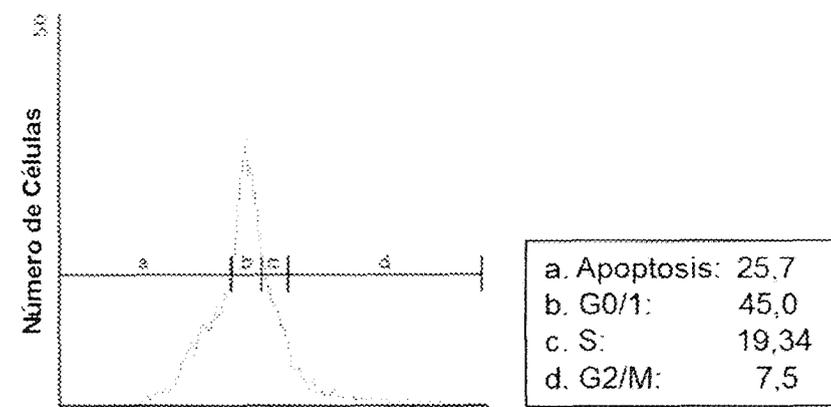
Cada histograma indica el número de células frente al contenido de ADN en células que están en apoptosis (Apo) y en fase G0/G1 (2n) o S/M (4n) del ciclo celular. Como se puede evidenciar, una alta población de cardiomiocitos se encuentra en G0/G1 tanto en condiciones *in situ* como *in vitro*, lo cual puede estar relacionado con la detención del



(a) Contenido de ADN- IP



(b) Contenido de ADN- IP



(c) Contenido de ADN- IP

Figura 9. Cuantificación de cardiomiocitos en las diferentes fases del ciclo celular. a, Porcentaje de cardiomiocitos P5 *in situ*. b, Porcentaje de cardiomiocitos E21 *in situ*. c, Porcentaje de cardiomiocitos E21 *in vitro*.

ciclo celular de estas células diferenciadas, como ha sido planteado por varios autores, entre los que se pueden mencionar a Ahuja y colaboradores (Ahuja y col., 2007). Por otro lado, el porcentaje de células que se encuentran en fase S se puede relacionar con la particularidad que, aunque la población de cardiomiocitos en su mayoría está diferenciada aún mantiene un porcentaje de células ($\approx 12\%$ en ratones) que están ingresando al ciclo celular, evento que puede ser observado durante los primeros 5 días postnatales, como lo refieren Soonpaa y Field (Soonpaa y Field, 1998). En el caso particular de los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios (E21), se puede decir que presentan un menor porcentaje de síntesis de ADN ($\approx 19,34\%$) si se comparan con los porcentajes de E21 y P5 *in situ*, a pesar que diversos autores reportan que a mayor desarrollo embrionario menor es el porcentaje de síntesis de ADN (Soonpaa y Field, 1998; Pasumarthi y Field, 2002). La disminución observada en el porcentaje de síntesis de ADN en los cardiomiocitos E21 *in vitro* y el aumento en el porcentaje de la apoptosis en los cardiomiocitos E21 *in vitro* (Figura 10) puede ser debido a la influencia de las condiciones de cultivo (interacción de otros grupos celulares donde puede ser importante factores de señalización indispensables para mantener el funcionamiento celular) a pesar que muestran características fenotípicas propias del tejido, como se observó con el análisis ultraestructural.

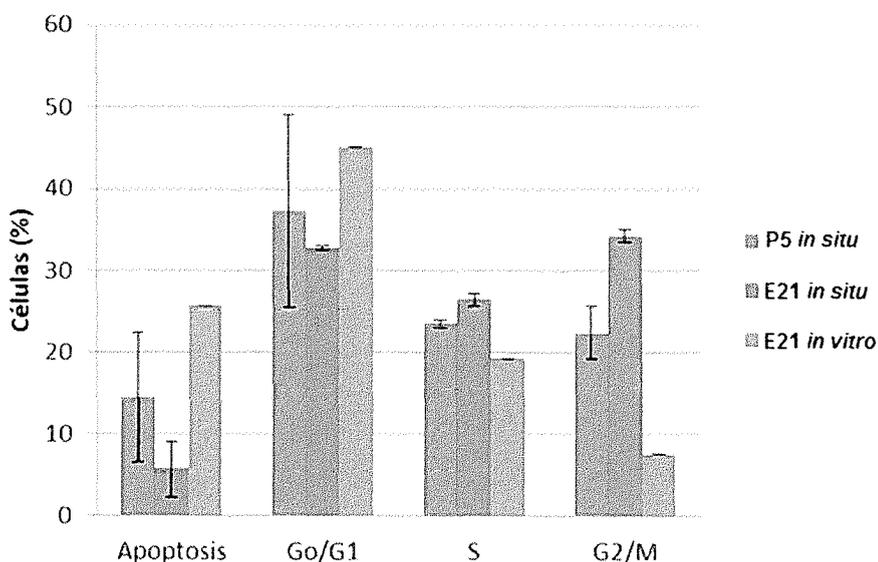


Figura 10. Porcentaje de cardiomiocitos en las diferentes fases del ciclo celular.

El análisis del contenido de ADN de las células mediante la activación de la fluorescencia en el FACSort después de la tinción con IP, mostró tasas de apoptosis de 5,7% en los cardiomiocitos E21 *in situ*, 25,72% en cardiomiocitos E21 *in vitro* y 14,5% en cardiomiocitos P5 *in situ* (Figura 11). Mientras que el porcentaje de la población de cardiomiocitos que se encuentran en la fase S es de 26,51% para los cardiomiocitos E21 *in situ*, 19,34% en cardiomiocitos E21 en cultivo y 23,6 % en cardiomiocitos P5 *in situ*, el porcentaje restante corresponde a las células en G0/G1 y G2/M (Figura 12).

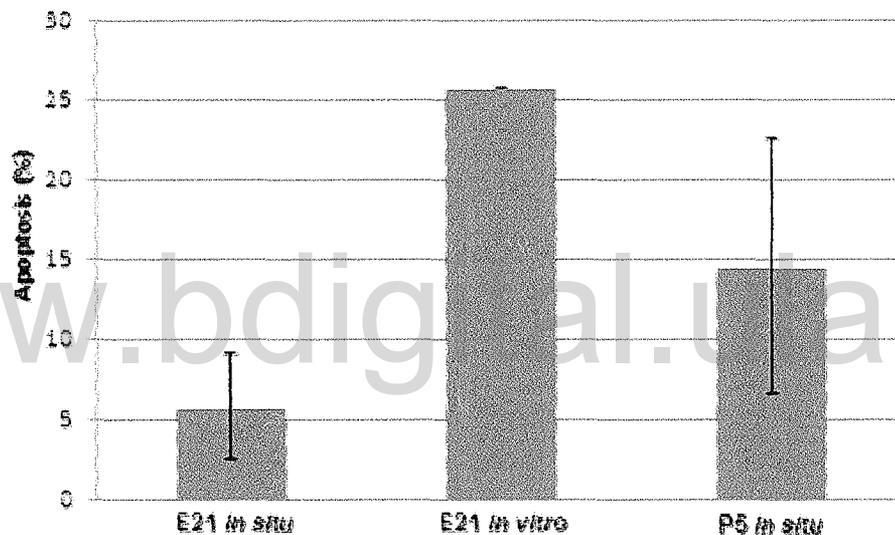


Figura 11. Porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos *in situ* e *in vitro*.

En cuanto a los porcentajes de apoptosis en los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios E21 ($\approx 25,72\%$) y P5 ($\approx 14,5\%$) son relativamente altos en comparación con los obtenidos en los cardiomiocitos E21 *in situ* ($\approx 5,7\%$). Hay autores que aportan cifras hasta de 16% de apoptosis en cardiomiocitos de rata neonatal en cultivos en placa. Sin embargo, este resultado y los nuestros contrastan con lo reportado por Wang y colaboradores en cultivos en placa de cardiomiocitos de ratón neonatal ($\approx 4\%$) y por Adachi y colaboradores ($\approx 12\%$) y por Long y colaboradores ($\approx 4,3\%$) en cultivos en placa

de cardiomiocitos de rata neonatal (Long y col., 1997; Adachi y col., 2001; Wang y col., 2001).

La apoptosis puede aumentar por diferentes condiciones patológicas; además, es un proceso permanente en el ciclo de vida de los organismos, que se inicia en la remodelado de estructuras embrionarias y que continua por procesos fisiológicos, patológicos (Nadal-Ginard, 2001) o inflamatorios (Cook y Poole-Wilson, 1999; Dorn, 2009; Long y col., 1997). Los datos de apoptosis en los cardiomiocitos *in situ* expresan que a mayor desarrollo embrionario mayor es el porcentaje de apoptosis y la diversidad de los datos puede deberse a las condiciones de cada cultivo de referencia y a la especificidad y sensibilidad de la técnica empleada (IP o TUNEL).

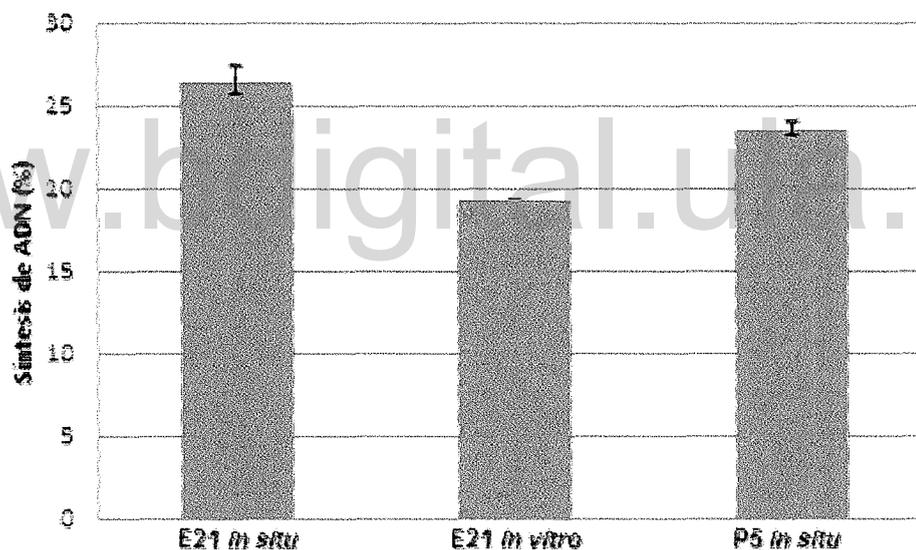


Figura 12. Porcentaje de síntesis de ADN (fase S) en cardiomiocitos *in situ* e *in vitro*.

Por otra parte, el incremento de la apoptosis en los cardiomiocitos E21 en cultivos puede atribuirse a la ausencia de algunas condiciones fisiológicas que se dan *in situ* (interacciones celulares, presión arterial, mecanismos de señalización intracelular, entre otros).

3.3. Análisis Estadístico

Cuando se compara el porcentaje de síntesis de ADN en los cardiomiocitos (E21) en Cultivos Histotípicos Rotatorios con el porcentaje de la síntesis de ADN en los cardiomiocitos E21 y P5 *in situ*, utilizando ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0,05$, los resultados muestran un $p(0,328)$ para la síntesis de ADN con la tinción de BrdU, lo cual indica la existencia de diferencias no significativas en los valores promedio (%) de síntesis de ADN. Mientras que la síntesis de ADN con la tinción de IP con un $p(0,002)$ muestra diferencias significativas en los valores promedios de síntesis de ADN (Tabla 7).

A partir del resultado anterior, donde la síntesis de ADN fue significativa con la tinción de IP, se procedió a realizar la prueba de Dunnett, donde se observó que los valores promedios (%) de síntesis de ADN con la tinción IP en los cardiomiocitos E21 y P5 *in situ*, muestran un $p(0,002)$ para E21 y un $p(0,007)$ para P5, lo cual revela la existencia de diferencias significativas en los valores promedios de síntesis de ADN en los cardiomiocitos *in situ* comparados con los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios (Tabla 8).

Tabla 7. Comparación de los promedios \pm DE de síntesis de ADN en cardiomiocitos en cultivos histotípicos rotatorios y en edades embrionaria E21 y postnatal P5, utilizando ANOVA

	Cardiomiocitos	% Síntesis Promedios \pm DE	p
Tinción BrdU	Cultivo Histotípico Rotatorio (E21)	15,00 \pm 5,65	0,328
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (E21)	22,00 \pm 1,41	
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (P5)	16,00 \pm 4,24	
Tinción IP	Cultivo Histotípico Rotatorio (E21)	19,34 \pm 0,00	0,002
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (E21)	26,51 \pm 0,84	
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (P5)	23,60 \pm 0,42	

La diferencia significativa que reporta el análisis estadístico en los valores promedios (%) de síntesis de ADN con la tinción IP en los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios en comparación con los cardiomiocitos E21 y P5 *in situ* indica que sobre este proceso biológico pueden tener influencia algunos eventos extrínsecos (estrés, niveles nutricionales, interacciones ambientales, entre otros) e intrínsecos (moléculas de señalización, potenciales de membrana, flujos de calcio, por citar algunas) determinantes del funcionamiento de cualquier organismo *in situ*. Sin embargo, también puede influir la especificidad y sensibilidad de la técnica utilizada, ya que el BrdU es un análogo desoxirribonucleótido mientras el IP se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos. Por otro lado, en los Cultivos Histotípicos Rotatorios los fragmentos de tejido están en un ambiente relativamente controlado con nutrientes e incubación rotatoria constante, mientras que los cardiomiocitos *in situ* están expuestos a la fisiología del organismo donde diversos factores pueden influir en la expresión de proteínas que participan en la síntesis de ADN.

Tabla 8. Comparaciones múltiples de la síntesis de ADN utilizando la Prueba de Dunnett

Modelo de cultivo	Tinción IP	Diferencia de Medias	p
Cultivo Rotatorio (19,34)	Edad embrionaria <i>in situ</i> E21 (26,51)	7,17000*	0,002
	Edad postnatal <i>in situ</i> P5 (23,66)	4,2600*	0,07

*La diferencia de medias es significativa < 0,05

Para determinar si existía o no diferencias en los porcentajes de apoptosis y las fases del ciclo celular (G0/G1, G2/M) entre los cardiomiocitos en cultivo y los porcentajes presentes de éstos parámetros en los cardiomiocitos *in situ*, se utilizó ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los resultados muestran un $p(0,063)$ para la apoptosis y un $p(0,328)$ para la fase G0-G1, revelando que no existen diferencias significativas en los valores promedios (%) de apoptosis y fase G0-G1 en los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios en comparación con los cardiomiocitos de edad embrionaria E21

y postnatal P5, pero sí existen diferencias significativas $p(0,02)$ entre los valores promedio (%) de los cardiomiocitos en fase G2-M en Cultivos Histotípicos Rotatorios y los cardiomiocitos embrionarios y postnatales (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de los promedios \pm DE de las etapas del ciclo celular en cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios y en edades embrionaria E21 y postnatal P5, utilizando ANOVA

	Cardiomiocitos	Promedios \pm DE	p
Apoptosis (%)	Cultivo Histotípico Rotatorio (E21)	25,72 \pm 0,00	0,063
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (E21)	5,70 \pm 3,35	
	Edad postnatal <i>in situ</i> (P5)	14,50 \pm 8,04	
G0-G1 (%)	Cultivo Histotípico Rotatorio (E21)	45,08 \pm 0,00	0,328
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (E21)	32,83 \pm 0,24	
	Edad postnatal <i>in situ</i> (P5)	37,34 \pm 11,80	
G2-M (%)	Cultivo Histotípico Rotatorio (E21)	7,55 \pm 0,00	0,02
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (E21)	34,30 \pm 0,76	
	Edad postnatal <i>in situ</i> (P5)	22,43 \pm 3,21	

Posteriormente, se realizó la prueba de Dunnett en los valores promedio donde existen diferencias significativas, en este caso para la fase G2/M $p(0,01)$ en los cardiomiocitos embrionarios de 21 días tanto *in vitro* como *in situ* (Tabla 10).

Tabla 10. Comparaciones múltiples de las etapas del ciclo celular utilizando la Prueba de Dunnett

Modelo de cultivo	G2-M (%)	Diferencia de Medias	p
Cultivo Rotatorio E21 (7,55)	Edad embrionaria <i>in situ</i> E21 (34,30)	26,7500*	0,01
	Edad postnatal <i>in situ</i> P5 (22,43)	14,8850*	0,07

*La diferencia de medias es significativa $< 0,05$

La lectura del análisis estadístico indica que los cardiomiocitos en el modelo de Cultivos Histotípicos Rotatorios no alteran el proceso de apoptosis ni las fases del ciclo celular G0/G1 y S (tinción de BrdU); además, que el comportamiento de estos parámetros biológicos es muy similar al de los cardiomiocitos *in situ*, por lo tanto se puede decir que este modelo de cultivo es estable y reproducible para evaluar la influencia de factores en el proceso de apoptosis y síntesis de ADN, pero no para evaluar el proceso de proliferación que culmina con la división celular, ya que los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios se detienen antes de la fase G2/M o muy poca población está en esta fase, es decir que aunque los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios son viables y expresan las características fenotípicas propias del tejido cardíaco, no culminan la proliferación celular, evento que si se da en los cardiomiocitos *in situ*.

www.bdigital.ula.ve

4. CONCLUSIONES

Con el análisis de las características ultraestructurales se determinó que el Período Crítico de los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios corresponde a la edad embrionaria de 21 días (E21) \pm 24 horas.

En los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios se evidenció una diferenciación progresiva de su citoarquitectura que se inicia a los 3 días de cultivo y finaliza a los 6 días de cultivo. Las miofibrillas presentaron las estriaciones transversales de las sarcómeras, formando lo que se conoce ultraestructuralmente como bandas Z, A, I, H y con menor evidencia la banda M (pseudobanda M), las miofibrillas se encontraron intercaladas con líneas de mitocondrias y además, se observaron uniones celulares, esbozos del sistema de túbulos T y binucleación, características fenotípicas de los cardiomiocitos *in situ* y con mayor semejanza a los cardiomiocitos P5.

El proceso de síntesis ADN monitoreado con la técnica de BrdU indica que los valores promedios de síntesis de ADN es mayor en los cardiomiocitos *in situ* E21 (22%) y P5 (16%) que en los cardiomiocitos *in vitro* E21 (15%) a pesar de ser un evento que se mantiene durante el desarrollo de los cardiomiocitos y que se ha relacionado con el proceso de binucleación en este tipo celular; además, coincide con el hecho que la síntesis de ADN en edades postnatales es menor *in situ* y mayor en el desarrollo embrionario.

En los Cultivos Histotípicos Rotatorios de cardiomiocitos E21 se determina un mayor porcentaje de apoptosis (25,72) comparado con los presentes en los cardiomiocitos E21 (5,7) y P5 *in situ* (14,5); sin embargo, el análisis estadístico nos indica que no hay diferencias significativas entre las evidencias de este proceso biológico en cardiomiocitos en cultivo e *in situ*, por tal razón este sistema de cultivo se presenta como una opción para el estudio de la apoptosis en diferentes condiciones experimentales.

Por otro lado, hay una alta población de cardiomiocitos en fase estacionaria del ciclo celular (G0/G1) o próximos a entrar en la fase de síntesis (S) tanto en Cultivos Histotípicos Rotatorios como en los cardiomiocitos E21 y P5 *in situ* (45,0; 32,8; 37,3 %, respectivamente), promedios en los cuales estadísticamente no hay diferencias significativas. Estos resultados pueden estar relacionados con la característica de los cardiomiocitos de ser células terminalmente diferenciadas y de permanecer realizando sus funciones en fase G0; además los cardiomiocitos tienden a disminuir su capacidad de proliferación a medida que avanza el desarrollo embrionario y la mantienen en menor proporción en los primeros días postnatales.

El modelo de Cultivo Histotípico Rotatorio de cardiomiocitos propuesto en este trabajo, es un sistema estable y reproducible para el estudio del proceso de apoptosis y síntesis de ADN pero no para el proceso de proliferación que termina en la división celular, ya que estadísticamente hay diferencias significativas en la fase del ciclo celular G2/M entre los cardiomiocitos del modelo de Cultivos Histotípicos Rotatorios E21 y los cardiomiocitos E21 y P5 *in situ*, pero no hay diferencias significativas en el proceso de apoptosis entre los cardiomiocitos en cultivo y los *in situ* .

Por otra parte, la metodología para Cultivos Histotípicos Rotatorios de cardiomiocitos es un modelo que no se encuentra referenciado en la literatura del área de cultivo de tejidos, por lo tanto es una técnica que permite estudiar a nivel ultraestructural la influencia de factores biológicos, químicos y físicos sobre la célula cardíaca, así como también estudiar otros eventos biológicos como son la síntesis de ADN y la apoptosis en los cardiomiocitos; siendo importante destacar que la edad más recomendada para estudios *in vitro* de la célula cardíaca es la edad correspondiente a su Período Crítico que en el ratón corresponde a la edad embrionaria E21, en la cual expresa tanto su citología característica como su fisiología básica.

5. RECOMENDACIONES

1. Para estudios de apoptosis en cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios se recomienda incluir técnicas para la detección de marcadores tempranos como es la externalización de la fosfatidil-serina por la Anexina V o de caspasas por Western blot.
2. Para el análisis de la apoptosis por microscopía electrónica se recomienda utilizar una concentración celular más concentrada que la usada en este trabajo, lo cual garantizará una mejor observación ultraestructural.
3. En cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios se recomienda la evaluación terapéutica de antagonistas de la apoptosis por causas patológicas o por tratamientos farmacológicos ya que es uno de los procesos de mayor interés en los últimos tiempos en el campo cardiovascular.
4. Incluir variantes como factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular en los Cultivos Histotípicos Rotatorio para evaluar el comportamiento de los cardiomiocitos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi S., Ito H., Tamamori-Adachi M., Ono Y., Nozato T., Abe S., Ikeda Ma., Marumo F., Hiroe M. (2001). Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res* 88: 408-414.
- Ahuja P., Sdek P., MacLellan W.R. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease and regeneration. *Physiol Rev* 87: 521-544.
- Anversa P., Kajstura J. (1998). Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83:1-14.
- Anversa P., Olivetti G., Bracchi P.G., Loud, A.V. (1981). Postnatal development of the M-band in rat cardiac myofibrils. *Circ Res* 48:561-568.
- Anversa P., Olivetti G., Loud A.V. (1980). Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia, and binucleation of myocytes. *Circ Res* 46: 495-502.
- Apoptosis Info. (2006). Cardiomyocyte Apoptosis. Disponible en URL: <http://www.apoptosisinfo.com/cardiomyocyte-apoptosis/>. [Consulta 20 de julio de 2012].
- Aprigliano O., Masuda M.O., Meirelles M.N., Pereira M.C., Barbosa H.S., Barbosa J.C. (1993). Heart muscle cells acutely infected with *Trypanosoma cruzi*: Characterization of electrophysiology and neurotransmitter responses. *J Mol Cell Cardiol* 25: 1265-1274.
- Atherton B.T., Behnke M.M. (1988). Structures of myofibrils at extra-junctional membrane attachment sites in cultured cardiac muscle cells. *J Cell Sci* 89: 97-106.
- Atherton B.T., Meyer D.M., Simpson D.G. (1986). Assembly and remodeling of myofibrils and intercalated discs in cultured neonatal rat heart cells. *J Cell Sci* 86: 233-248.
- Banyasz T., Lozinskiy I., Payne C.E., Edelmann S., Norton B., Chen B., Chen-Izu Y., Izu L.T., Balke C.W. (2008). Transformation of adult rat cardiac myocytes in primary culture. *Exp Physiol* 93: 370-382.
- Bergdolt B.A., Tanowitz H.B., Wittner M., Morris S.A., Bilezikian J.P., Moreno A.P., Spray D.C. (1994). *Trypanosoma cruzi*: Effects of infection on receptor-mediated chronotropy and Ca²⁺ mobilization in rat cardiac myocytes. *Exp Parasitol* 78: 149-160.
- Bird S.D., Doevendans P.A., van Rooijen M.A., Brutel de la Riviere A., Hassink R.J., Passier R., Mummery C.L. (2003). The human adult cardiomyocyte phenotype. *Cardiovasc Res* 58: 423-434.

- Brette F., Orchard C. (2003). T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res* 92: 1182-1192.
- Bromodeoxyuridine (BrdU) staining protocol. (2004). Disponible en URL: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/protocols/cellcycle/bicmsbrdu.html> [Consulta 06 de junio de 2011].
- Brook W.H., Connell S., Cannata J., Maloney J.E., Walker A.M. (1983). Ultrastructure of the myocardium during development from early fetal life to adult life in sheep. *J Anat* 137: 729-741.
- Bugaisky L.B., Zak R. (1989). Differentiation of adult rat cardiac myocytes in cell culture. *Circ Res* 64: 493-500.
- Burrows M.T. (1912). Rhythmical activity of isolated heart muscle cells *in vitro*. *Science* 3: 90-92.
- Bustamante J.M., Rivarola H.W., Fernández A.R., Enders J.E., Fretes R., Palma J.A., Paglini-Oliva P.A. (2002). Trypanosoma cruzi reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. *Int J Parasitol* 32: 889-896.
- Cavanough M.W. (1955). Pulsation, migration and division in dissociated chick heart cells *in vitro*. *J Exp Zool* 128: 573-589.
- Chacko K.J. (1976). Observation on the ultrastructure of developing myocardium of rat embryos. *J Morphol* 150: 681-709.
- Chan J.Y., Takeda M., Briggs L.E., Graham M.L., Lu J.T., Horikoshi N., Weinberg E.O., Aoki H., Sato N., Chien K.R., Kasahara H. (2008). Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ Res* 102: 571-580.
- Chlopčiková S., Psotová J., Miketová P. (2001). Neonatal rat cardiomyocytes: A model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed Papers* 145: 49-55.
- Código de Bioética y Bioseguridad. (2002). 2ª Edición. Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Caracas, Venezuela.
- Cook S.A., Poole-Wilson P.A. (1999). Cardiac myocyte apoptosis. *Eur Heart J* 20: 1619-1629.
- Cooper G.M., Hausman R.E. (2010). *La Célula*. pp. 489. 5ª Edición. Editorial Marban. Madrid, España.
- Dabiri G.A., Turnacioglu K.K., Sanger J.M., Sanger J.W. (1997). Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci* 94: 9493-9498.

- Decker M.L., Behnke-Barclay M., Cook M.G., Lesch M., Decker R.S. (1991). Morphometric evaluation of the contractile apparatus in primary cultures of rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 69: 86-94.
- DeHann R.L. (1967). Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. *Dev Biol* 16: 216-249.
- Diez C., Simm A. (1998). Gene expression in rod shaped cardiac myocytes, sorted by flow cytometry. *Cardiovasc Res* 40: 530-537.
- Dorn G.W. (2009). Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 81: 465-473.
- Dube D.K. (2002). *Myofibrillogenesis*. Series: Cardiovascular Molecular Morphogenesis. pp. 288. New York: Springer. New York, USA.
- Ehler E., Perriard J.C. (2002). *Emergence of the first myofibrils and targeting mechanisms directing sarcomere assembly in developing cardiomyocytes*. En: *Myofibrillogenesis*, Capítulo 3. pp. 41-58. (Ed. Dube D. K.). New York: Springer. New York, USA.
- Engel F.B., Hauck L., Cardoso M.C., Leonhardt H., Dietz R., von Harsdorf R. (1999). A mammalian myocardial cell-free system to study cell cycle reentry in terminally differentiated cardiomyocytes. *Circ Res* 85: 294-301.
- Eppenberger H.M., Zuppinger C. (1999). *In vitro* reestablishment of cell-cell contacts in adult rat cardiomyocytes. Functional role of transmembrane components in the formation of new intercalated disk-like cell contacts. *FASEB J* 13: 83-89.
- Eschenhagen T., Fink C., Remmers U., Scholz H., Wattchow J., Weil J., Zimmermann W., Dohmen H.H., Schäfer H., Bishopric N., Wakatsuki T., Elson E.L. (1997). Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: A new heart muscle model system. *FASEB J* 11: 683-694.
- Evans H.J., Sweet J.K., Price R.L., Yost M., Goodwin R.L. (2003). Novel 3D culture system for study of cardiac myocyte development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: 570-578.
- Freshney R.I. (2000). *Culture of animal cell: A manual of basic technique*. Capítulo 8: pp. 177-180. Capítulo 9: pp. 395-406. 4ª Edición. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA.
- Garber B.B. (1963). Inhibition by glucosamine of aggregation of dissociated embryonic cells. *Dev Biol* 7: 630-641.
- Garber B.B., Moscona A.A. (1972). Reconstruction of brain tissue from cell suspensions. *Dev Biol* 27: 217-234.

- Gherghiceanu M., Barad L., Novak A., Reiter I., Itskovitz-Eldor J., Binah O., Popescu L.M. (2011). Cardiomyocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells: Comparative ultrastructure. *J Cell Mol Med* 15: 2539-2551.
- Gherghiceanu M., Popescu L.M. (2011). Heterocellular communication in the heart: Electron tomography of telocyte-myocyte junctions. *J Cell Mol Med* 15: 1005-1011.
- Gorczyca W., Melamed M.R., Darzynkiewicz Z. (1998). Analysis of apoptosis by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 91: 217-238.
- Gregorio C.C., Antin P.B. (2001). *Myofibrillogenesis in the heart*. En: Formation of the Heart and its Regulation. Capítulo 2. pp. 23-43. (Ed. R.J. Tomanek y R.B. Runyan). Springer-Verlag New York Inc., New York, USA.
- Grimley P.M., Edwards G.A. (1960). The ultrastructure of cardiac desmosomes in the toad and their relationship to the intercalated disc. *J Biophys Biochem Cytol* 8: 305-318.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (1996). National Academy Press. Washington, DC, USA.
- Harary I., Farley B. (1960). *In vitro* studies of isolated beating heart cells. *Science* 131: 1674-1675.
- Haunstetter A., Izumo S. (2000a). Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis. *Cardiovasc Res* 45: 795-801.
- Haunstetter A., Izumo S. (2000b). Toward antiapoptosis as a new treatment modality. *Circ Res* 86: 371-376.
- Hirschy A., Schatzmann F., Ehler E., Perriard J.C. (2006). Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev Biol* 289: 430-441.
- Huxley H., Hanson J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173: 973-976.
- Jongsma H.J., van Rijn H.E. (1972). Electrotonic spread of current in monolayer cultures of neonatal rat heart cells. *J Membr Biol* 9: 341-360.
- Kang P.M., Izumo S. (2003). Apoptosis in heart: Basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol Med* 9: 4: 177-182.
- Kostin S., Hein S., Bauer E.P., Schaper J. (1999). Spatiotemporal development and distribution of intercellular junctions in adult rat cardiomyocytes in culture. *Circ Res* 85: 154-167.
- Li J., Radice G.L. (2010). A new perspective on intercalated disc organization: Implications for heart disease. *Dermatol Res Pract* Publicación en línea: doi:10.1155/2010/207835. (Consulta 22 de septiembre de 2012).

- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Lawrence-Zipursky S. (2005). *Biología Celular y Molecular*. pp. 853. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Long X., Boluyt M.O, Hipolito M.L., Lundberg M.S., Zheng J.S., O'Neill L., Cirielli C., Lakatta E.G., Crow M.T. (1997). p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 99: 2635-2643.
- Lozyk M.D., Papp S., Zhang X., Nakamura K., Michalak M., Opas M. (2006). Ultrastructural analysis of development of myocardium in calreticulin-deficient mice. *BMC Dev Biol* 6: 54. Published online 2006 November 19. doi: 10.1186/1471-213X-6-54. PMID: PMC1660575. (Consulta 16 de octubre de 2012).
- Lu S., Horowitz R. (2008). Role of nonmuscle myosin IIB and N-RAP in cell spreading and myofibril assembly in primary mouse cardiomyocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 747-761.
- Maruyama R., Takemura G., Aoyama T., Hayakawa K., Koda M., Kawase Y., Qiu X., Ohn, Y., Minatoguchi S., Miyata K., Fujiwara T., Fujiwara H. (2001). Dynamic process of apoptosis in adult rat cardiomyocytes analyzed using 48-hour videomicroscopy and electron microscopy. *Am J Pathol* 159: 683-691.
- Maximow A. (1925). Tissue culture of young mammalian embryos. *Carnegie Inst Contr Embryol* 16: 47-113.
- McMullen J.R., Izumo S. (2004). *Mechanisms controlling heart growth in mammals*. En: Cell Growth: Control of Cell Size. Capítulo 18. pp 549-604. (Ed. M.N. Hall. M Raff y G. Thomas). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- McNutt N.S. (1975). Ultrastructure of the myocardial sarcolemma. *Circ Res* 37: 1-13.
- Melo T.G., Almeida D.S., de Meirelles M.N., Pereira M.C. (2004). Trypanosoma cruzi infection disrupts vinculin costameres in cardiomyocytes. *Eur J Cell Biol* 83: 531-540.
- Mitcheson J.S., Hancox J.C., Levi A.J. (1998). Cultured adult myocytes: Future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res* 39: 280-300.
- Moscona A.A. (1952). Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Exp Cell Res* 3: 535-539.
- Moscona A.A. (1961a). Effect of temperature on adhesion to glass and histogenetic cohesion of dissociated cells. *Nature* 190: 408-409.
- Moscona A.A. (1961b). Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. *Exp Cell Res* 22: 455-75.
- Moscona A.A. (1962). Analysis of cell recombinations in experimental synthesis of tissues *in vitro*. *J Cell Comp Physiol* 60: 65-80.

- Moscona A.A. (1964). *Studies on stability of phenotypic traits in embryonic integumental tissues and cells*. En: *The Epidermis*. pp. 83-104. (Ed. W. Montagna). Academic Press. New York, USA.
- Moscona A.A. (1973) *Cell aggregation*. En: *Cell Biology in Medicine*. pp. 571-591. (Ed. Bitter E.E.), John Wiley y Sons Inc. New York, USA.
- Moscona M.H., Moscona A.A. (1963). Inhibition of adhesiveness and aggregation of dissociated cells by inhibitors of protein and RNA synthesis. *Science* 142: 1070-1071.
- Moses R.L., Claycomb W.C. (1984). Ultrastructure of cultured atrial cardiac muscle cells from adult rats. *Am J Anat* 171: 191-206.
- Mudry R.E., Perry C.N., Richards M., Fowler V.M., Gregorio C.C. (2003). The interaction of tropomodulin with tropomyosin stabilizes thin filaments in cardiac myocytes. *J Cell Biol* 162: 1057-1068.
- Muir A.R. (1957). An electron microscope study of the embryology of the intercalated disc in the heart of the rabbit. *J Biophys and Biochem Cytol* 3: 193-202.
- Nadal-Ginard B. (2001). Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: Futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev Esp Cardiol* 54: 543-550.
- Nag A.C., Cheng M. (1987). Isolation, long-term culture, and ultrastructural characterization of adult cardiomyopathic cardiac muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 23: 261-266.
- Navaratnam V., Kaufman M.H., Skepper J., Barton S., Guttridge K.M. (1986). Differentiation of the myocardial rudiment of mouse embryos: An ultrastructural study including freeze-fracture replication. *J Anat* 146: 65-85.
- Olivetti G., Anversa P., Loud A. (1980). Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. *Circ Res* 46: 503-512.
- Palacios-Prü E.L., Mendoza-Briceño R.V. (1972). An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Res* 36: 404-408.
- Palacios-Prü E.L., Mendoza R.V., Palacios L. (1982). *In vitro* development of chick hypothalamic neurosecretory cell. *Dev Brain Res* 4: 79-90.
- Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza-Briceño R.V. (1976a). Formación de circuitos neuronales *in vitro*. I. Análisis con el método de Golgi de cultivos rotatorios íntegros de cerebelo. *Acta Cient Venezolana* 27: 301-308.

- Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza-Briceño R.V. (1976b). Formación de circuitos neuronales *in vitro*. II. Análisis con el método de Golgi de cultivos rotatorios íntegros de médula espinal. *Acta Cient Venezolana* 27: 309-312.
- Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza-Briceño R.V. (1976c). *In vitro* vs *in situ* development of Purkinje cells. *J Neurosci Res* 2: 357-362.
- Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza-Briceño R.V. (1977). Formación de circuitos neuronales *in vitro*. III. Análisis ultraestructural de cultivos histotípicos de cerebelo y médula espinal. *Acta Cient Venezolana* 28: 19-29.
- Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza-Briceño R.V. (1978). Cultivos neuronales histotípicos: Significación y perspectivas. *Acta Cient Venezolana* 29: 295-308.
- Palacios-Prü E.L., Peña-Contreras Z., Mendoza-Briceño R.V., Miranda-Contreras L. (1995). Intradermal implants of histotypic adrenal gland rotary cultures. *Dev Neurosci* 17: 118-126.
- Parra V., Eisner V., Chiong M., Criollo A., Moraga F., Garcia A., Härtel S., Jaimovich E., Zorzano A., Hidalgo C., Lavandero S. (2008). Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc Res* 77: 387-397.
- Pasumarthi K.B., Field L.J. (2002). Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res* 90: 1044-1054.
- Pasumarthi K.B., Nakajima H., Nakajima H.O., Soonpaa M.H., Field L.J. (2005). Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocytes DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res* 96: 110-118.
- Prabhakar R., Pieples K., Jagatheesan G, Burge S., Wieczorek D. (2002). *The function of normal and familial hypertrophic cardiomyopathy-associated tropomyosin*. En: *Myofibrillogenesis*, Capítulo 33. pp. 225-235. (Ed. Dube D. K.). New York: Springer. New York, USA.
- Reyes-Juárez J.L., Zarain-Herzberg A. (2006). Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Arch Cardiol Mex* 76: 18-32.
- Reynolds E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212.
- Risebro C.A., Searles R.G., Melville A.A., Ehler E., Jina N., Shah S., Pallas J., Hubank M., Dillard M., Harvey N.L., Schwartz R.J., Chien K.R., Oliver G., Riley P.R. (2009). Prox 1 maintains muscle structure and growth in the developing heart. *Development* 136: 495-505.
- Rohr S., Schölly D.M., Kléber A.G. (1991). Patterned growth of neonatal rat heart cells in culture. Morphological and electrophysiological characterization. *Circ Res* 68:114-130.

- Sanger J.W., Sanger J.M. (2002). *Myofibrillogenesis in cardiac muscle*. En: Myofibrillogenesis, Capítulo 1. pp. 3-20. (Ed. Dube D. K.). New York: Springer. New York, USA.
- Schaper J., Meiser E., Stämmler G. (1985). Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circ Res* 56: 377-391.
- Sedmera D., Pexieder T., Vuillemin M., Thompson R.P., Anderson R.H. (2000). Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec* 258: 319-337.
- Shimada Y., New T.M., Hsebe-Kishi F., Suzuki H. (2002). *Dynamics of contractile proteins constituting myofibrils in living muscle cells*. En: Myofibrillogenesis. Capítulo 2. pp. 21-37. (Ed. Dube D. K.). New York: Springer. New York, USA.
- Siedner S., Krüger M., Schroeter M., Metzler D., Roell W., Fleischmann B.K., Hescheler J., Pfitzer G., Stehle P. (2003). Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol* 548: 493-505.
- Simpson D.G., Decker M.L., Clark W.A., Decker R.S. (1993). Contractile activity and cell-cell contact regulate miofibrillar organization in cultured cardiac myocytes. *J Cell Biol* 123: 323-336.
- Soeller C., Cannell M.B. (1999). Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing technique. *Circ Res* 84: 266-275.
- Sommer J.R., Waugh R.A. (1978). Ultrastructure of heart muscle. *Environ Health Perspect* 26: 159-167.
- Soonpaa M.H., Field L.J. (1998). Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 83: 15-26.
- Tan X., Peng X., Wang Y., Wang F., Joyeux M., Hartemann P. (2003). Carbon disulfide cytotoxicity on cultured cardiac myocyte cell of rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 55: 168-172.
- Tobita K., Liu L.J., Janczewski A.M., Tinney J.P., Nonemaker J.M., Augustine S., Stolz D.B., Shroff S.G., Keller B.B. (2006). Engineered early embryonic cardiac tissue retains proliferative and contractile properties of developing embryonic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: 1829-1837.
- Tresguerres, J.A.F. (1992). *Fisiología Humana*. Interamericana. pp. 1216. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid, España.
- Vidal-Xavier R. (1997). Quantitative study using semithin section of the rat fetal myocardium. *Rev Chil Anat* 15: 209-216.

- Wang G.W., Zhou Z., Klein J.B., Kang Y.J. (2001). Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in metallothionein-overexpressing cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: 2292-2299.
- Watson M.L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 475-478.
- Webster K.A., Discher D.J., Kaiser S., Hernández O., Sato B., Bishopric N.H. (1999). Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J Clin Invest* 104: 239-252.
- Welikson R.D, Mikawa T. (2002). *Cytoskeletal gene expression in the developing cardiac conduction system*. En: Myofibrillogenesis. Capítulo 10. pp. 163-173. (Ed. Dube D. K.). New York: Springer. New York, USA.
- Yuan Ye K., Sullivan, K.E., Black, L.D. (2011). Encapsulation of cardiomyocytes in a fibrin hydrogel for cardiac tissue engineering. *J Vis Exp* 55: doi: 10. 3791/3251.
- Zhong W., Mao S., Tobis S., Angelis E., Jordan M.C., Roos K.P., Fishbein M.C., de Alborán I.M., MacLellan W.R. (2006). Hypertrophic growth in cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway. *EMBO J* 25: 3869-3879.

www.apoptosisinfo.com/cardiomyocyte-apoptosis/

www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/protocols/cellcycle/bicmsbrdu.html

www.bdigital.ula.ve