

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE CARDIOMIOCITOS EMBRIONARIOS Y POSTNATALES DE RATÓN EN CULTIVOS HISTOTÍPICOS.

Jaimes-Méndez Nancy^{1*}, Peña-Contreras Zulma², Dávila-Vera Delsy², Colmenares-Sulbarán Melisa², Mendoza-Briceño Rosa Virginia².

¹Departamento de Biología-Química, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia.

¹Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

²Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios Priú”, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

*Autor de Correspondencia: njaimés@unipamplona.edu.co, nancyjaimés@ula.ve, teléfonos 57-313-8395931, 58-274 2403160 Fax 57-7- 5682750, 58-274-2403156.

Recibido: Mayo 2010. Aprobado: Agosto 2010.

Publicado: Noviembre 2010.

RESUMEN

Los cultivos histotípicos constituyen un modelo de cultivo de tejidos que permite obtener datos fiables porque en estos cultivos, se conserva el fenotipo del tejido, por esta razón, el objetivo principal de este estudio fue determinar *in vitro*, el comportamiento fenotípico de los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo, durante la etapa embrionaria y postnatal temprana del desarrollo del corazón en el ratón, basado en el análisis ultraestructural del tejido de músculo cardíaco. Este modelo de cultivo permite al tejido muscular cardíaco embrionario de 21 días, incubado durante 6 días de cultivo, obtener las características fenotípicas de su homólogo *in vivo*. En estos cultivos encontramos una citoarquitectura organizada típica de células cardíacas; como se pudo observar la distribución de las miofibrillas ramificadas y dispuestas siguiendo al eje longitudinal de la célula e intercaladas con mitocondrias, así como las estriaciones transversales de los sarcómeros, formando las bandas Z, A, I y H, incluyendo la banda pseudo M, indicando que el tejido se ha adaptado a las condiciones de cultivo y ha logrado reestablecer una ultraestructura miotípica. Con base en estas características ultraestructurales, que son propias del tejido cardíaco *in vivo*, determinamos que el período crítico para obtener cultivos histotípicos de cardiomiocitos coincidió a los 21 días de desarrollo embrionario y 6 días de cultivo.

Palabras claves: Cultivos histotípicos, cardiomiocitos, ultraestructura, período crítico.

ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF EMBRYONIC AND EARLY POSTNATAL OF MOUSE CARDIOMYOCYTES IN HISTOTYPIC CULTURES

ABSTRACT

Histotypic cultures constitute a tissue culture model for obtaining reliable data because in these cultures, the tissue phenotype is highly conserved, therefore, the main objective of this study was to determine the phenotypic behavior of left ventricular cardiomyocytes, during embryonic and early postnatal stages of mouse heart development, based on ultrastructural analysis of cardiac muscle tissue. This culture model allows the embryonic cardiac muscle tissue 21 days, incubated during six days to obtain phenotypic characteristics of its counterpart *in vivo*. In these cultures, we found an organized cytoarchitecture typical of cardiac cells, as could be observed from the distribution of branched myofibrils, arranged along the longitudinal axis of the cell and intercalated with mitochondria, as well as transversal striations of the sarcomeres, forming the Z, A, I and H bands, including the pseudo M band, indicating that the tissue has adapted to culture conditions and has achieved to re-establish a myotypic ultrastructure. Based on these ultrastructural features, characteristic of *in vivo* cardiac tissue, we have determined that the critical period to obtain histotypic cultures of cardiomyocytes coincided at 21 days of mouse embryonic development and cultured for six days.

Keywords: Histotypic cultures, cardiomyocytes, ultrastructure, critical period.

INTRODUCCIÓN

El tejido muscular cardíaco adulto se caracteriza por tener una disposición muy particular de los cardiomiocitos, los cuales al unirse tridimensionalmente a otros miocitos

forman las denominadas miofibras, adyacentes a fibroblastos intersticiales, vasos sanguíneos y matriz extracelular e inmersos todos en un gel de proteoglicanos [1]. Estos elementos celulares acompañados, aunque en

menor proporción, de células endoteliales y células de músculo liso vasculares son los componentes principales del corazón, siendo conocido que entre especies, así como en diversas regiones del corazón pueden existir diferencias en la distribución proporcional de la población celular [2]. La célula muscular cardíaca está interconectada a través de tres tipos diferentes de uniones intercelulares: las uniones comunicantes, la fascia adherente y los desmosomas, localizadas en una porción especializada de la membrana plasmática, llamada disco intercalar [3]. Cada cardiomiocito tiene un paquete de miofibrillas divididas en unidades contráctiles o sarcómeros que son complejos multiproteicos donde interaccionan filamentos de miosina y de actina [1,4], estando la miosina organizada en filamentos gruesos, mientras que los monómeros de actina se ensamblan en filamentos delgados [4]. Además, el sarcómero consiste de un número mayor y menor de proteínas organizadas en filamentos gruesos, incluyendo las cadenas pesada y liviana de la miosina; y en filamentos delgados, incluyendo la actina, tropomiosina, troponina C, troponina T, troponina I y filamentos de titina y nebulina [5]. La interacción de estas proteínas contráctiles se expresa morfológicamente por la presencia en los cardiomiocitos de estriaciones transversales [6], formando lo que ultraestructuralmente se conocen como disco Z, bandas A, I, H y M.

Un aspecto importante para el estudio del comportamiento funcional de la fibrilla muscular cardíaca es el conocimiento del desarrollo y maduración ontogénico del cardiomiocito. Existe una amplia literatura al respecto, destacando los aportes de Sanger y Sanger, quienes plantean el modelo de la premiofibrilla para el ensamblado de la miofibrilla, proponiendo que la premiofibrilla está formada por unidades repetitivas de minisarcómeros separados por cuerpos Z ricos en α -actinina. Las premiofibrillas se forman a lo largo de la membrana celular junto a bandas de miosina no muscular

IIB, que en el minisarcómero se extienden entre la α -actinina; además, se encuentran intercalados los filamentos de actina a lo largo de la premiofibrilla. Inmediatamente, se inicia el proceso de formación de miofibrillas para lo cual los cuerpos Z se asocian lateralmente y aparecen la proteína titina y una segunda isoforma de la miosina, la miosina II muscular que se intercala a lo largo de las fibrillas y presumiblemente se une a la titina. Posteriormente, se forman las miofibrillas maduras cuando los cuerpos Z de las premiofibrillas se alinean y se fusionan para formar las bandas Z maduras, mientras que los filamentos de miosina muscular están alineados en la banda A, entre las bandas Z. Las miofibrillas presentan las proteínas talina y vinculina, mientras que la miosina IIB no muscular está ausente [7].

Entre los estudios concernientes a los cambios ultraestructurales que ocurren durante la diferenciación del rudimento miocárdico temprano en mamíferos, está el realizado por Challice y Viragh en 1973, reportado por Navaratnam y col. quienes utilizaron embriones de ratón de 9 días de gestación para estudiar la fibrillogénesis, los aspectos de la diferenciación de los miocitos y el desarrollo de los complejos de uniones en el miocardio [8]; Brook y col. estudiaron en ovejas la ultraestructura del miocardio desde la vida fetal temprana hasta la vida adulta [9] y Navaratnam y col. reportaron las características ultraestructurales de la diferenciación de la célula miocárdica en embriones de ratón [8]. Por otra parte, Chacko reportó los cambios ultraestructurales del miocardio durante el desarrollo en embriones de rata del día 10 al 14 de gestación e hizo un análisis comparativo con el miocardio del ratón recién nacido [10].

El cultivo de tejidos es una metodología muy versátil que permite estudiar el crecimiento *in vitro* de conjuntos celulares que desarrollan una organización semejante a la del órgano (organotípica) o tejido (histotípica) homólogos *in situ* [11]. La importancia de utilizar cultivos histotípicos

se atribuye a la fiabilidad de los datos obtenidos, ya que con esta técnica se conserva el fenotipo del tejido *in vivo*.

De acuerdo a lo reportado por Mitcheson y col. los cultivos de tejido cardíaco se realizan desde 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, Horany y Forley cultivaron miocitos de mamíferos [12].

El objetivo de este estudio fue determinar *in vitro*, el comportamiento fenotípico de cardiomiocitos provenientes del ventrículo izquierdo del corazón, durante la etapa embrionaria y postnatal temprana del ratón, basado en el análisis ultraestructural de la citotípica, lo cual nos permite establecer el período crítico del tejido muscular cardíaco en cultivos íntegros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Las muestras de tejido se obtuvieron de ratones 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. Los ratones hembras en gestación y los de edad postnatal se anestesiaron con Ketamina[®] a una dosis de 240 mg/Kg-peso. A los ratones hembra gestadas se les hizo una incisión abdominal para extraer los embriones de cada edad. 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 los Protocolos de Investigación y Docencia del Bioterio de la Universidad de Los Andes, Mérida- Venezuela y en

conformidad con las normas establecidas por el NIH (National Institute of Health-USA) para el tratamiento ético de los animales.

Cultivo de Tejidos

Los fragmentos de tejido se colocaron en frascos Erlenmeyer conteniendo medio basal de Eagle con L-glutamina (79,5%), suero de caballo (10%), penicilina 5.000 U/mL más estreptomycinina 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 a 37°C y 70 rpm; durante el tiempo de cultivo el medio se cambió cada 48 horas y se oxigenó cada 24 horas [13].

Microscopia 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), 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, seguido de varios lavados con tampón. Los tejidos se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol etílico seguido de óxido de propileno, finalmente los fragmentos de tejido fueron infiltrados e incluidos en resina epoxídica [14]. De los tejidos incluidos se hicieron secciones de 1 micra de espesor, las cuales fueron coloreadas con p-fenilendiamina en solución acuosa al 1% (p/v) y las secciones ultrafinas de 90 nanómetros de espesor, se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para el análisis ultraestructural [15, 16].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ultraestructura del miocardio embrionario

El estudio ultraestructural del miocardio en cultivos histotípicos, por períodos cortos de tiempo, indica que el cambio más importante se observa en la estructura y

desarrollo del complejo multiproteico: las miofibrillas, estructuras fundamentales para la funcionalidad de los cardiomiocitos. En los primeros días del cultivo de los cardiomiocitos en edades embrionarias, los miofilamentos están dispersos en el citoplasma y orientados en diferentes direcciones (Figura 1).

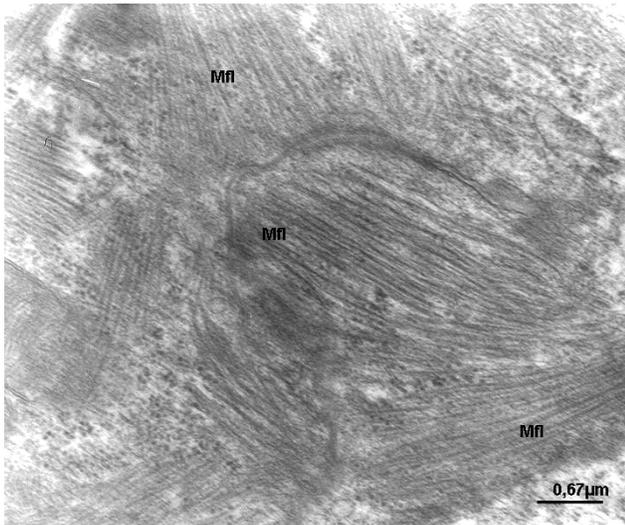


Fig. 1. Miofilamentos (Mfl) dispersos y en diferentes direcciones en el citoplasma de cardiomiocitos de 17 días de edad embrionaria y 1 día de incubación.

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 desarrollo en la organización de los miofilamentos se presenta en algunos cardiomiocitos, ya que en otros segmentos de la misma célula se mantiene la disposición irregular de los miofilamentos (Figura 2). A medida que avanza la edad embrionaria (E-21) se observan miofibrillas ramificadas a partir de la línea Z y con mayor número de unidades sarcoméricas. Cracko 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 que en algunos casos muestran una configuración en forma de Y o X, con puntos de inserción en el disco Z [10].

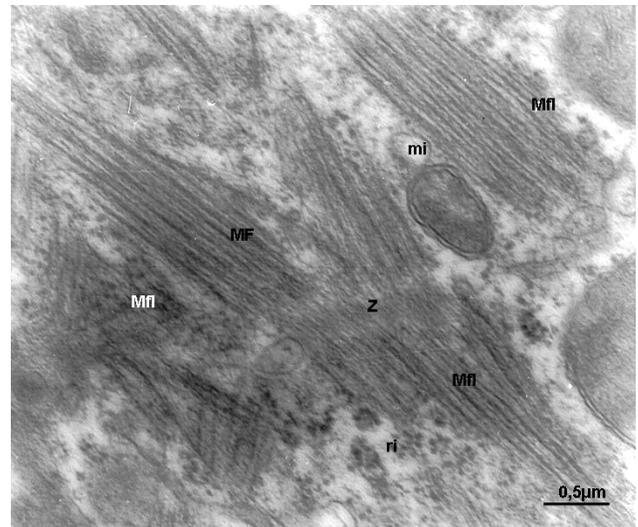


Fig. 2. Miofilamentos (Mfl), algunos alineados por un disco Z (Z) en cardiomiocitos de tejido de 19 días de edad embrionaria y 4 días de cultivo histotípico. Miofibrillas (MF). Mitocondrias (mi). Ribosomas (ri).

En la presente investigación, en las miofibrillas de los cardiomiocitos se pueden identificar las estriaciones transversales de los sarcómeros, formando lo que ultraestructuralmente se conoce como bandas Z, A, I, H y una banda pseudo M. Además, en los cardiomiocitos en cultivos histotípicos de miocardio de 21 días de desarrollo embrionario, se evidencia el inicio de la organización sarcomérica a partir del día 3 de cultivo (Figura 3), hasta formar, a los 6 días de cultivo, una estructura del sarcómero bien definida. También se observan características fenotípicas de sus homólogas *in vivo*, 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 4).

Estos resultados indican que el período crítico para las células del tejido cardíaco en ratón, es a una edad embrionaria de 21 días, a un tiempo de 6 días en cultivos histotípicos, que es cuando adquieren las características miotípicas específicas descritas anteriormente. Una vez determinado este período crítico se pueden estandarizar

dos parámetros (edad óptima del material biológico y tiempo de cultivo) que son indispensables determinar en este modelo de cultivo, debido a que se pueden utilizar en ensayos posteriores en diferentes campos de la biología con la seguridad que es el momento crucial para el desarrollo de las características propias de cada tejido.

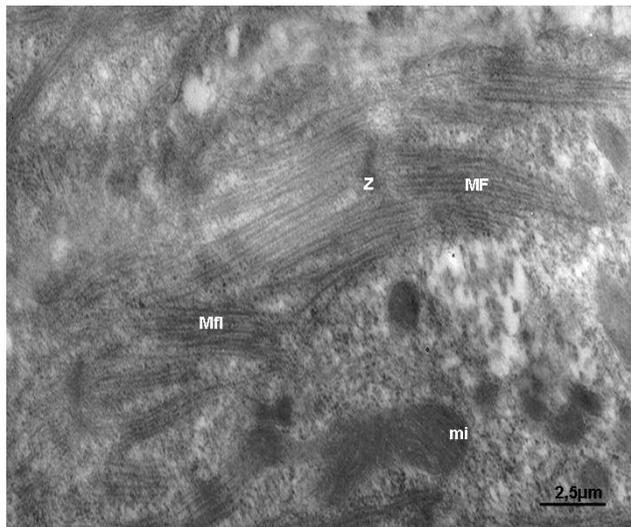


Fig. 3. Cardiomiocito de tejido cardíaco de 21 días de desarrollo embrionario y 3 días en cultivo histotípico, en el cual se observa el inicio de la organización sarcomérica. Miofibrillas (MF). Miofilamentos (Mfl). Mitochondrias (mi). Banda Z (Z).

En esta investigación la primera estriación transversal que se observa en los cardiomiocitos es la banda Z. Sanger y Sanger describen que 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 [7]. 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 [8]. Así mismo, en las células cardíacas de embriones de ratón de 13 días de edad, se observa el disco Z [4]. Inicialmente, la banda Z tiene una amplitud irregular y variable, a medida que se alcanza un mayor desarrollo, estas bandas Z

estrecan su amplitud, se alargan y se vuelven más prominentes [17].

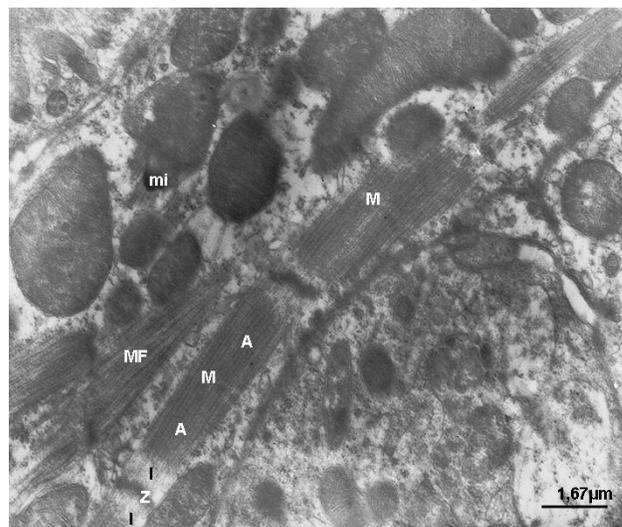


Fig. 4. Miofibrillas (MF) intercaladas con mitocondrias (mi) en cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario y 6 días en cultivo histotípico. En la miofibrilla central se observa la estructura sarcomérica definida. Banda Z (Z). Banda A (A). Banda I (I). Banda M (M).

Una de las principales características morfológicas de los cardiomiocitos adultos *in vivo*, es la estriación transversal de las miofibrillas, la cual es el resultado de la interacción de varias proteínas contráctiles, particularmente actina y miosina. En estudios de cultivo tridimensional (3D) de miocitos embrionarios de rata por un periodo de incubación de 21 días, se reporta una estructura sarcomérica bien organizada, con un disco Z y con conexiones célula-célula; características propias de los cardiomiocitos *in vivo* con un buen desarrollo [18]. En tejido cardíaco embrionario temprano de pollo en cultivo 3D, incubado por un periodo de aproximadamente 14 días, los cardiomiocitos presentan sarcómeros organizados a lo largo del eje longitudinal de la célula, bandas A, I y Z, así como mitocondrias y desmosomas [19].

En contraste, se ha propuesto que los cultivos de miocitos cardíacos adultos durante tiempos prolongados permiten a la célula adaptarse a las condiciones de cultivo, pero el fenotipo puede alterarse experimentando profundas

transformaciones funcionales y morfológicas [20]. Por esta razón, se deben proponer metodologías que permitan mantener la morfología y función de los miocitos del corazón en cultivo primario. Una alternativa es la utilización de cultivos histotípicos por rotación, en los que las células de miocardio de 21 días de desarrollo embrionario adquieren las características fenotípicas a los 6 días de cultivo, alcanzando una citotípica similar a la del tejido *in vivo*, lo cual resulta importante para diversos estudios estructurales y funcionales, así como en aplicaciones en áreas de la medicina, farmacología y biología.

Por otra parte, las características ultraestructurales del miocardio embrionario de rata han sido reportadas desde hace algunos años. Uno de los primeros estudios fue el realizado por Chacko en 1976, quien describe en los miocitos de rata de 11 días de desarrollo embrionario una organización de las fibrillas estriadas con bandas I y Z. Así mismo, describe que en las miofibrillas de los cardiomiocitos de ratas perinatales se encuentran todas las bandas con excepción de la banda M [10]; mientras que Anversa y col. reportan en el estudio de músculo cardíaco de ratas de 1 a 5 días de edad postnatal poca evidencia de la banda M, pero empiezan a aumentar en número después del 5 día de vida postnatal y están presentes en el 60% de todos los sarcómeros a los 11 días de edad postnatal; demostrando que la banda M de músculo cardíaco de rata sufre un desarrollo significativo en el periodo postnatal temprano, del día 1 al 11 después del nacimiento [21]. En contraste, en otro reporte que utiliza como control miocardio de embriones de ratones de 13 días de edad ya se evidencia la banda M en los sarcómeros de los cardiomiocitos [4].

Posteriormente, Navaratnam y col. reportan que en las células del miocardio de embriones de ratón de 8 días de gestación, se observan finas estructuras filamentosas dispersas en forma irregular y ocasionalmente, dispuestas

en fascículos cortos de filamentos paralelos, ubicados cerca de los bordes laterales de la célula. A medida que avanza el desarrollo gestacional hay un aumento considerable en el contenido de miofibrillas y a lo largo de los fascículos hay evidencias de estrias transversales, distribuidas a intervalos regulares en forma de “parches” de material electrón denso, constituyendo los precursores de la banda Z [8].

En nuestro estudio, como se observa en la figura 4, en cardiomiocitos embrionarios de 21 días de gestación se detecta ya una tenue banda M en el centro de cada sarcómero, indicando que a esta edad se logra obtener miofibrillas con sus sarcómeros bien desarrollados. Según Chacko la banda M es una característica estructural distintiva de la miofibrilla madura, caracterizada por microscopía electrónica como una línea densa en el centro de cada sarcómero [10]. Hirschy y col. reportan 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 ensamblado de los filamentos gruesos y finos [22].

Ultraestructura del miocardio postnatal

En este estudio se demuestra que en edades postnatales los cardiomiocitos se caracterizan porque las miofibrillas aumentan en grosor y longitud, al igual que en la ramificación; aunque todavía se observan miofibrillas onduladas. Las miofibrillas onduladas son características de etapas embrionarias tempranas; posteriormente estas ondulaciones desaparecen y las miofibrillas adoptan una orientación recta, alineadas paralelamente entre sí y con sus características bandas Z, como ha sido reportado en miocitos del miocardio tipo silvestres de 18,5 días de gestación [17]. En algunas células aún se presenta un mínimo desarreglo en la orientación de los miofilamentos, mientras que en otras hay una alta definición de los sarcómeros en las miofibrillas. Al igual que en los cultivos de tejido miocárdico embrionario descritos anteriormente,

en los primeros días de cultivo se presenta mayor cantidad de miofibrillas orientadas al azar, pero a medida que avanza el tiempo de cultivo las miofibrillas se van organizando orientadas según el eje longitudinal de la célula haciéndose evidente las características de estriación transversal de los sarcómeros. El aumento aparente en el grosor y en la longitud de las miofibrillas es propio del tejido postnatal al estar sometido a mayor carga de presión, así como por el normal crecimiento hipertrófico.

Olivetti y col. y Anversa y col. describen que los cambios del tejido muscular y subcelular se producen en el primer periodo de desarrollo postnatal del corazón de rata. La maduración de los miocitos cardíacos de 1 a 11 días de edad postnatal se caracteriza por un aumento en los porcentajes de volumen de las miofibrillas, mitocondrias, retículo endoplasmático liso así como por un incremento en el promedio del tamaño y número de mitocondrias por célula y por una disminución del compartimiento de la matriz citoplasmática [21, 23]. El rápido crecimiento de los cardiomiocitos en ratas durante este periodo postnatal, con mayor crecimiento en el ventrículo izquierdo, es visto como una consecuencia de los profundos cambios circulatorios que ocurren en el periodo neonatal [23].

Otros componentes ultraestructurales del cardiomiocito

En el periodo de desarrollo evaluado se observan estructuras de uniones celulares poco desarrolladas hasta estructuras con un grado de desarrollo mayor, como 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, la fascia adherente y los desmosomas [8]. 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 [10]. Así mismo, Lozyk y col. describen en el desarrollo temprano embrionario de ratón (12,5-13,5 días postcoito) 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 [17].

En las etapas embrionaria y postnatal evaluadas, las mitocondrias están presentes en gran número y en 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 miofibrillas, de manera semejante a la descripción hecha por Navaratman y col. en los cardiomiocitos de embriones de ratón 9 de días de edad, quienes refieren que aumenta el número de mitocondrias y estas tienden a estar concentradas entre las miofibrillas [8].

Generalmente, el núcleo de los cardiomiocitos se muestra ultraestructuralmente sin cambios en todo el periodo de desarrollo embrionario y postnatal temprano, presentando una forma redonda a elongada, en ocasiones con bordes irregulares. En edades embrionarias algunas células son binucleadas, pero en edades postnatales más avanzadas incrementa la frecuencia de células binucleadas (Figura 5) coincidiendo con lo reportado por algunos autores quienes señalan que en la etapa postnatal aumenta la frecuencia de binucleación; característica también observada *in vivo*, donde con la edad, los cardiomiocitos tienden a ser binucleados [24] y según algunos investigadores la mayoría de los miocitos adultos son binucleados [25, 26, 27]. 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 [25]. Finalmente, es de

hacer notar que tanto en el desarrollo embrionario como en el postnatal es frecuente observar núcleos con dos o más nucléolos, lo cual parece estar relacionado con el momento celular de la actividad de síntesis proteica.

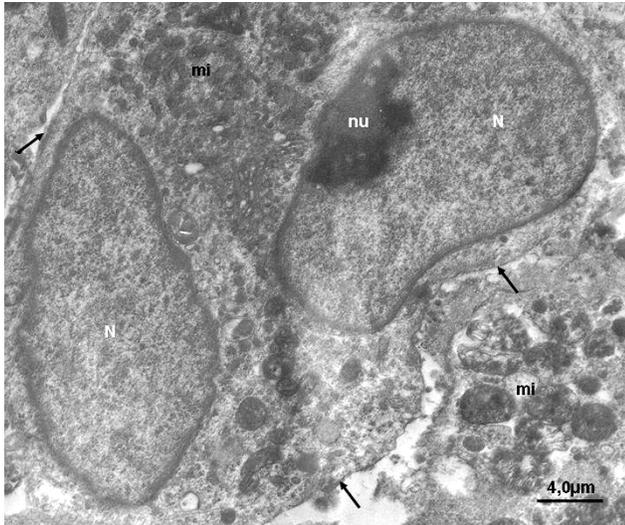


Fig. 5. Cardiomiocitos binucleados de tejido cardíaco de 19 días de desarrollo embrionario y 5 días en cultivo histotípico. Las flechas señalan la membrana celular. Núcleo (N). Nucléolo (nu). Mitochondrias (mi).

Los ribosomas se observan durante todo el periodo estudiado, aunque 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 col. 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 granular en etapas posteriores del desarrollo [8]. 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 [10].

CONCLUSIONES

El modelo de cultivo histotípico permite al tejido cardíaco embrionario de 21 días alcanzar a los 6 días de cultivo, las características fenotípicas de su homólogo *in vivo*. En

estos cultivos se evidencia una citoarquitectura organizada propia de dichas células, como lo es la distribución de las miofibrillas ramificadas y dispuestas siguiendo al eje longitudinal de la célula e intercaladas con mitocondrias, así como las estriaciones transversales de los sarcómeros, formando lo que ultraestructuralmente se conoce como bandas Z, A, I, H y una banda pseudo M, indicando que el tejido se ha adaptado a las condiciones de cultivo y ha logrado reestablecer una ultraestructura miotípica. En todo el periodo evaluado, la primera estriación observada en los cardiomiocitos es la banda Z, mientras que las demás estriaciones transversales aparecen en los cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario en cultivo, aunque con poca evidencia de la banda M, que se observa tenue en el centro de cada sarcómero. Así mismo, se observan uniones celulares en diferentes grados de desarrollo, que son posiblemente las precursoras de los complejos discos intercalares. Estas características miotípicas no están sincronizadas en todas las células, ya que algunos cardiomiocitos pueden mostrar una mínima desorganización en sus miofibrillas. Con base en la observación de las características ultraestructurales descritas anteriormente, que son propias del tejido cardíaco *in vivo*, se ha determinado para los cardiomiocitos un periodo crítico a los 21 días de desarrollo embrionario en cultivo histotípico por un tiempo de 6 días. Por otro lado, en cardiomiocitos de edades postnatales se evidenció aumento en grosor, longitud y ramificación de las miofibrillas, como también binucleación en algunos cardiomiocitos, debido en parte y posiblemente, al proceso de hipertrofia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a todos los miembros del Centro de Microscopía “Dr. Ernesto Palacios Prú” de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, por su apoyo y colaboración en el desarrollo de la investigación, en especial al técnico José Sánchez por el trabajo en la preparación del material de tejido cardíaco para

microscopía electrónica, así mismo al Ingeniero Alirio Balza y a la TSU Leisalba Zavala y al técnico José Ramírez en el registro ultraestructural de los cardiomiocitos por microscopía electrónica y a la TSU Emilitza Labarca Villasmil por su ayuda en la optimización de las imágenes y diagramación del manuscrito.

REFERENCIAS

- [1] 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.
- [2] Banerjee I., Fuseler J.W., Price R.L., Borg T.K., Baudino T.A. (2007) "Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: 1883-1891.
- [3] 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.
- [4] Risebro C., Searles R., Melville A., Ehler E., Jina N., Shah S., Pallas J., Hubank M., Dillard M., Schwartz R., Chien K., Oliver G., Riley P. (2009) "Prox 1 maintains muscle structure and growth in the developing heart" *Dev* 136: 495-505.
- [5] McMullen J. R.; Izumo S. (2004) "Mechanisms controlling heart growth in mammals" en Cell growth control of cell size, (Eds. Hall M., Raff M., Thomas G). Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 554-603.
- [6] Bugaisky L., Zak R. (1989) "Differentiation of adult rat cardiac myocytes in cell culture" *Circ Res* 64: 493-500.
- [7] Sanger J.W., Sanger J.M. (2002) "Myofibrillogenesis in Cardiac Muscle" en: Myofibrillogenesis, (ed. Dube, Dipak K.). Birkhäuser. pp. 3-20.
- [8] Navaratman V., Kaufman H., Skepper J., Barton S., Guttridge K. (1986) "Differentiation of the myocardial rudiment of mouse embryos: an ultrastructural study including freeze-fracture replication" *J Anat* 146: 65-85.
- [9] Brook W., Connell S., Cannata J., Maloney J., Walker A. (1983) "Ultrastructure of the myocardium during development from early fetal life to adult life in sheep" *J Anat* 137: 729-741.
- [10] Chacko K.J. (1976) "Observation on the ultrastructure of developing myocardium of rat embryos" *J Morphol* 150: 681-709.
- [11] Palacios-Prü E., Palacios de L., Mendoza R.V. (1978) "Cultivos neuronales histotípicos: Significación y perspectivas" *Acta Cient Venez* 29: 295-308.
- [12] 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.
- [13] Palacios-Prü E., Mendoza R.V., Palacios de L. (1982) "In vitro development of chick hypothalamic neurosecretory cell" *Dev Brain Res* 4:79-90.
- [14] Palacios-Prü E., Palacios L., Mendoza R.V (1981) "Synaptogenetic mechanisms during chick cerebellar cortex development" *J Submicrosc Cytol* 13: 145-167.
- [15] 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.
- [16] Watson M.L. (1958) "Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals" *J Biophys Biochem Cytol* 4: 475-478.
- [17] Lozyk M., 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.
- [18] 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.

- [19] 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.
- [20] 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* 29: 370-382.
- [21] Anversa P., Olivetti G., Bracchi P.G., Loud A.V. (1981) "Postnatal development of the M band in rat cardiac myofibrils" *Circ Res* 48:5, 561-568.
- [22] Hirschy A., Schatzmann F., Ehler E., Perriard J.C. (2006) "Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart" *Dev Biol* 289: 430-441.
- [23] 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.
- [24] Rohr S., Schölly D.M., Kléber A.G. (1991) "Patterned growth of neonatal rat heart cells in culture" *Circ Res* 68:114-130.
- [25] Ahuja, P., Sdek, P., Maclellan, R. (2007) "Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease and regeneration" *Physiol Rev* 87: 521-544.
- [26] Pasumarthi, B., Fiel L. (2002) "Cardiomyocyte cell cycle regulation" *Circ Res* 90: 1044-1054.
- [27] Diez, C., Simm, A. (1998) "Gene expression in rod shaped cardiac myocytes, sorted by flow cytometry". *Cardiovasc Res* 40: 530-537.