



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Patrones de actividad contráctil en rebanadas de corazón
embrionario de pollo.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JOSÉ ALFREDO JIMÉNEZ MEDINA



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ
GÓMEZ**

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicada a mis padres y hermanos que son mi pilar y siempre me alientan a seguir adelante.

LOS AMO, GRACIAS POR TODO.

Agradecimientos

A mi mamá por ser tan cariñosa y cuidarme en todo momento y a mi papá que siempre me ha ayudado y me ha guiado con su ejemplo, gracias por todo.

A mis hermanos, siempre dispuestos a escuchar y darme consejos. A Carlos, por escucharme y ayuda incondicional cuando tengo algún problema. A Bety por preocuparse a su manera de mí y ser tan sincera. A Paola, que aunque estando tan lejos siempre se preocupa por como estamos.

A Erandi por todo ese cariño y amor que siento de tu parte, gracias por todo tu apoyo y porras para seguir siempre hacia adelante. Tu presencia a mi lado es esencial para mí. TE AMO.

A la Dra Tatiana Fiordelisio por su manera de ver la ciencia y la vida, todas tus enseñanzas han sido invaluable, gracias por tu amistad.

A la Dra. Hortensia González, por todas tus enseñanzas, paciencia, la gran guía y apoyo que me ha brindado para culminar este trabajo.

A mi segunda familia, con la que compartí toda esta aventura: Nallely, Erendira, Sacbel, Pável, Víctor, Ramiro, Rubens, Itzi, Pablo, Claudia, Areli, Martha, Vero, Gerardo, Diana, Yoali, Joselin, gracias por brindarme su amistad y su tiempo, los quiero mucho.

A mis amigos y compañeros del cubil, Luis, Avelino, Carlos, Diana, por hacer del cubil un lugar de trabajo al que no te cuesta ir, por brindarme su amistad y siempre estar dispuestos a compartir sus conocimientos. VAMOS POR BUEN CAMINO.

A Jaime, Alicia y Araceli, que gracias a su apoyo técnico esta tesis ha podido ser posible, muchas gracias

A mis sinodales: Dra. María Luisa Fanjul, Claudia Lerma, Julio Prieto, por brindarme su tiempo y sus correcciones. Muchas gracias.

1. Datos del alumno

Jiménez

Medina

José Alfredo

57 57 48 68

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

2. Datos del Tutor

Dra.

Gertrudis Hortensia

González

Gómez

3. Datos del sinodal 1

Dra.

María Luisa

Fanjul

Peña

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Claudia

Lerma

González

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Tatiana

Fiordelisio

Coll

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Julio Alejandro

Prieto

Sagredo

7. Datos del trabajo escrito

Patrones de actividad contráctil en rebanadas de corazón embrionario de pollo.

66 p

2012

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
Corazón: localización y estructura	10
Circulación pulmonar y sistémica.....	12
Vascularización del corazón.....	14
Tejido muscular y composición celular	15
Aparato contráctil del corazón.....	16
Sarcolema y túbulos T.....	17
Canales de Ca^{2+}	17
Retículo sarcoplásmico	20
Receptor de rianodina y ATPasa de Ca^{2+} del RS	20
Uniones comunicantes (uniones gap).....	22
Conexinas y distribución.....	23
Potencial de acción	25
Sistema de conducción cardiaco	28
NSA y arquitectura	29
Nodo atrioventricular y fibras de Purkinje	30
Transmisión del impulso eléctrico	32
Desarrollo del sistema de excitación contracción	32
Desarrollo embrionario	34
Inervación simpática y catecolaminas	37
Los patrones de actividad periódica	39

Rebanadas de corazón embrionario como modelo de estudio.	40
HIPÓTESIS	42
OBJETIVO	42
MATERIAL Y MÉTODOS	43
Obtención de rebanada de corazón.....	43
Selección de rebanadas y viabilidad.....	43
Imageneología de calcio en rebanadas de corazón.....	44
Estimulación adrenérgica.....	44
Análisis de resultados	44
RESULTADOS	46
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura del corazón. Modificado de Netter ¹⁰	11
Figura 2 Diferencia entre los ventrículos y diferentes capas de la pared celular cardiaca. Modificado de Netter ¹⁰	12
Figura 3 Diagrama del flujo sanguíneo y los componentes del aparato circulatorio. Basado en Peterson	13
Figura 4 Comparacion de celulas miocardiacas de mamifero (izquierda) y de aves (derecha). Modificada de Sperelankis ¹³	16
Figura 5. Receptor de rianodina. Modificado de Laver ²⁶	21
Figura 6. Regulación de SERCA. Modificado de Periasamy	22
Figura 7. Uniones Gap y diferentes ensamblajes. Tomada de Alberts ³⁴	23
Figura 8. Uniones comunicante en el corazón. Modificado de Jalife ³²	24
Figura 9. Potenciales de acción cardiacos. Basado de Sperelakis ¹³	28
Figura 10. Sistema de conducción cardiaco. Modificado de Gourdie ⁴⁵	31
Figura 11. Acople excitación contracción. Modificado de Knollmann ⁵⁷	33
Figura 12. Etapas de la cardiogénesis. Modificado de Zaffran ⁵⁹	35
Figura 13. Formación de las cámaras del corazón y los cambios en la propagación eléctrica y el flujo sanguíneo Modificada de Mikawa ⁴⁴	36
Figura 14. Cascada de señalización β adrenérgica. Modificado de An ⁶⁴	38
Figura 15. Secuencia de activación revelada por fluorescencia al cambio de la $[Ca^{2+}]$ intracelular.	46
Figura 16. Se ilustran los métodos de análisis utilizados.	48
Figura 17. Patrón normal de actividad “Típico”	49
Figura 18. Patrón de actividad 2:1.	50
Figura 19. Patrón de actividad en “ráfagas”	51
Figura 20 Patrón de actividad irregular.	52
Figura 21. Grafica de la frecuencia absoluta de los distintos patrones de activación.	53
Figura 22. Rastros temporal y grafica representativa de la actividad celular de los $\Delta[Ca^{2+}]_i$	54
Figura 23. Periodograma mostrando los efectos de la aplicación de $1\mu\text{m}$ de Iso.....	55

ABREVIATURAS

Ph	Potencial de hidrógeno
SCC	Sistema de conducción cardiaco
TT	Túbulos T
RS	Retículo sarcoplásmico
MIT	Mitocondria
AP	Acople periférico
NCX	Intercambiador Na/Ca
LVA	Activados a bajos voltajes
HVA	Activados a altos voltajes
DHP	Dihidropiridinas
NSA	Nodo sinoatrial
NAV	Nodo atrioventricular
SHP	Sistema His-Purkinje
SERCA	ATPasa de Ca del retículo sarcoplásmico
RyR	Receptor de rianodina
PKA	Proteína cinasa A
PA	Potencial de acción
V_m	Voltaje de membrana
VCS	Vena cava superior
VCI	Vena cava inferior
Cx	Conexina
Ao	Aorta
SI	Septo interatrial
AD	Atrio derecho
AI	Atrio izquierda
VD	Ventrículo derecho
VI	Ventrículo izquierdo
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
Δ[Ca²⁺]_i	Cambios en la concentración de calcio intracelular
ISO	Isoproterenol
E-C	Excitación-contracción
AMPc	Adenosil monofosfato cíclico

Patrones de actividad contráctil en rebanadas de corazón embrionario de pollo

La actividad contráctil del corazón se ha abordado con distintas metodologías, desde estudios electromecánicos en ventrículos¹, cultivos ventriculares usando indicadores sensibles a Ca^{2+} ³ hasta estudios de electrofisiológicos en células ventriculares aisladas². Sin embargo la gran complejidad que presenta el corazón y las influencias que puede surgir desde sus distintas regiones, me llevó a desarrollar una preparación que conjuntara tanto la función atrial como la ventricular, que consistió en rebanadas sagitales de corazón embrionario de pollo de 300 μm de grosor en embriones de 7 días *in ovo*, dicha edad embrionaria es crucial en el establecimiento de un comportamiento de etapa adulta, por la septación ventricular y la ontogénesis de las fibras de Purkinje, provocando una reorganización funcional durante este periodo ontogenético.

Se caracterizaron los patrones de actividad contráctil mediante el seguimiento de los flujos de Ca^{2+} visualizados gracias a la incubación del sensor sensible a Ca^{2+} Fluo 4AM. Con esta técnica pudimos distinguir cinco distintos patrones de actividad (patrón típico (1:1), acoplamiento 2:1, 2:2 discordante, irregular y ráfagas).

Una vez demostrada la viabilidad y variabilidad de las rebanadas se evaluó la respuesta adrenérgica. Comprobé que existe una respuesta positiva a los 7 días de desarrollo *in ovo* revelada como un incremento en la frecuencia de actividad, posiblemente debido al sistema intrínseco de secreción de catecolaminas cardíaco⁵.

INTRODUCCIÓN

Corazón: localización y estructura

El corazón es el órgano central del aparato circulatorio, esta presente en los organismos de la mayoría de los taxones del reino animal (insectos, cordados hasta los tunicados y mamíferos), desde el corazón más simple en forma tubular casi en línea recta hasta la forma más compleja; un corazón de doble circulación y cuatro cámaras en aves y mamíferos adultos, con un doble circuito circulatorio: pulmonar y sistémico ⁶. En aves el corazón se encuentra en la parte craneal de la cavidad toracoabdominal común, con su eje longitudinal ligeramente a la derecha de la línea media, dorsal y lateralmente está parcialmente envuelto por los lóbulos del hígado ⁸.

El corazón maduro de aves y mamíferos, es un órgano hueco dividido en cuatro cámaras, dos en la parte superior (atrios) y dos en la inferior (ventrículos). Los atrios o atrios son estructuras de paredes celulares delgadas que actúan primeramente como reservorios para la sangre, se encuentran separados uno del otro por una capa delgada, conocida como septo interatrial⁷.(Figura 1). Los ventrículos o cámaras inferiores son estructuras de paredes celulares gruesas, tienen la función de bombear la sangre, están separados entre sí por el septo interventricular, que es de mayor grosor que el encontrado en los atrios ^{7, 9} (Figura 2A). En el ventrículo derecho, cada valva de la válvula tricúspide está sujeta por las cuerdas tendinosas, que a su vez están conectadas por los músculos papilares. El extremo superior del ventrículo se va reduciendo hasta que toma la forma de cono llamado cono arterioso que termina en la válvula semilunar pulmonar, por esta válvula fluye la sangre del ventrículo derecho del tronco pulmonar (Figura 1).

La pared del corazón está formado por tres capas: interna o endocardio, media o miocardio y externa o pericardio. El endocardio tapiza todo el interior del corazón, tanto las cavidades como las válvulas, se continúa con el endotelio de revestimiento de los vasos. Por su parte el miocardio es la capa principal de la pared cardiaca y está formado por células musculares cardiacas y tejido conjuntivo. El grosor del miocardio varía acorde con la fuerza necesaria para bombear desde cada cámara en particular. La capa externa llamada pericardio, está formado por dos capas, una capa visceral (también llamada epicardio), formada por una capa de células mesoteliales,

adherida a la grasa epicárdica y por otro lado, en contacto con el líquido pericárdico ⁹. La capa del pericardio parietal es una es un saco fibroso que encierra el corazón, contribuye a la posición del corazón y permite las contracciones de sus cavidades en una superficie libre de fricciones ¹¹, ¹² (Figura 2B).

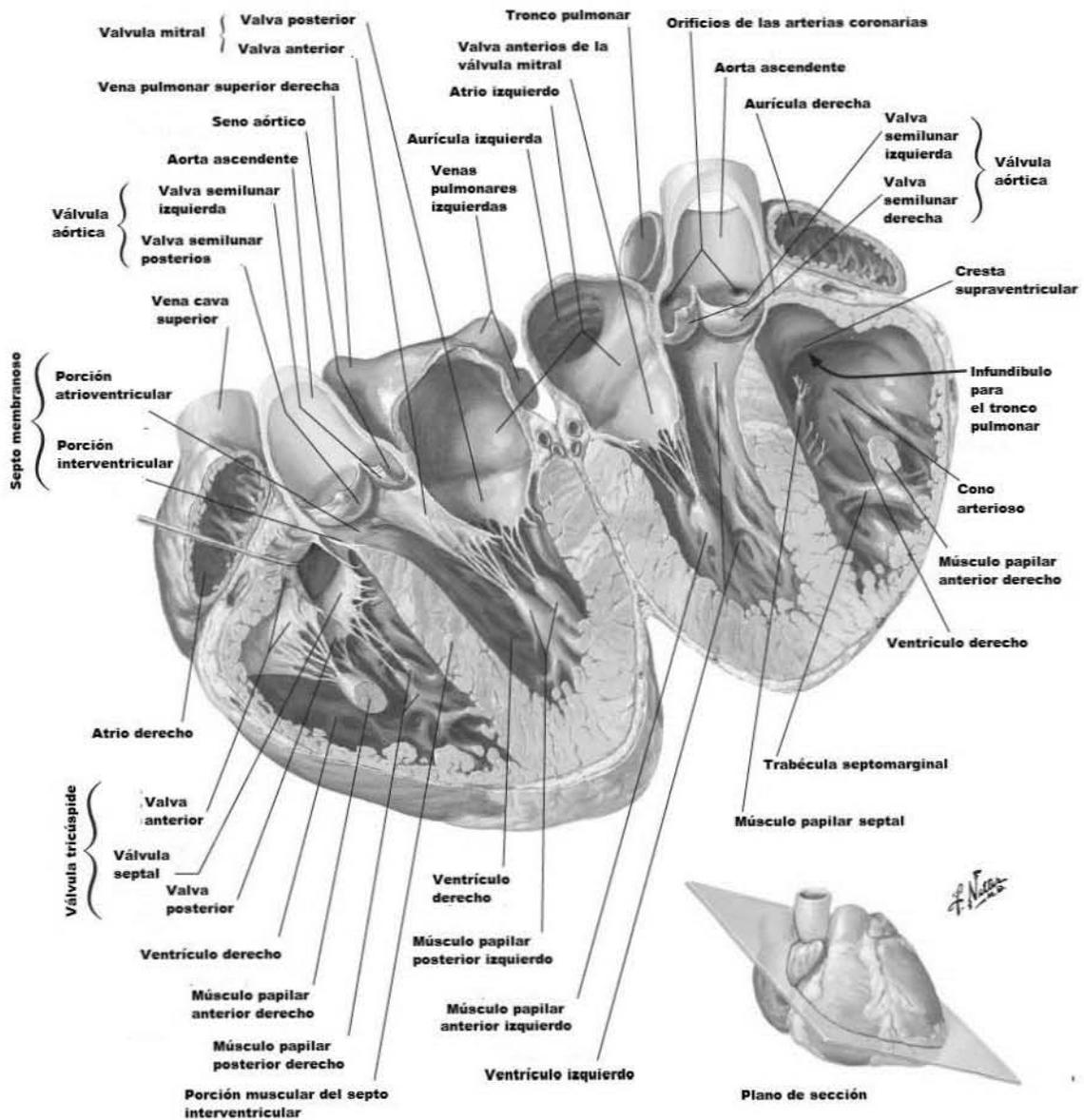


Figura 1 Estructura del corazón. Se aprecian las diferentes cámaras del corazón, destaca el grosor de la pared celular del ventrículo izquierdo, se aprecia la división del lado derecho e izquierdo que corresponde a la circulación pulmonar y sistémica respectivamente. Modificado de Netter ¹⁰.

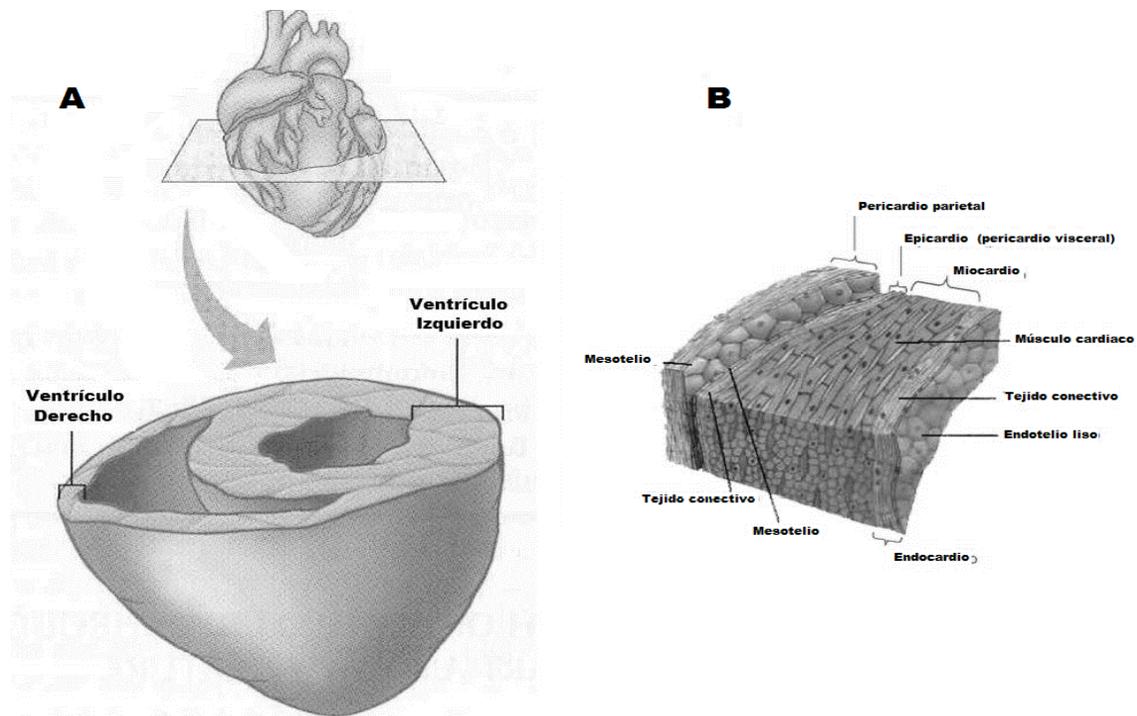


Figura 2 Diferencia entre los ventrículos y diferentes capas de la pared celular cardiaca. (A) La diferencia de grosor entre el ventrículo izquierdo y derecho es debido a la fuerza que deben ejercer para expulsar la sangre a la circulación sistémica y pulmonar respectivamente. (B) diferentes capas que conforman la pared celular cardiaca, se puede observar que el miocardio es la capa que predomina. Modificado de Netter¹⁰

Circulación pulmonar y sistémica

El lado izquierdo del corazón es la bomba de circulación sistémica: recibe la sangre desde los pulmones rica en oxígeno, la cual es proyectada por el ventrículo izquierdo hacia la aorta que es la arteria principal del aparato circulatorio. La sangre va dividiéndose en diferentes flujos, pasa por las arterias sistémicas, donde se originan las arteriolas, vasos de menor diámetro que finalmente se ramifican en una red de capilares sistémicos dentro de los tejidos sistémicos, donde se realiza el intercambio de nutrientes y gases. La sangre entra en una vénula sistémica (pequeñas venas que conducen la sangre desde los capilares hacia las venas), las cuales se unen formando venas sistémicas de mayor tamaño, la sangre con menor presión parcial de oxígeno (desoxigenada) retorna al corazón, al atrio derecho ¹². (Figura 3).

El lado derecho del corazón es la bomba del circuito pulmonar; recibe la sangre desoxigenada, que retoma de la sangre sistémica. Esta sangre es proyectada por el ventrículo derecho y se dirige al tronco pulmonar, el cual se divide en arterias pulmonares, las que transportan sangre a ambos pulmones. En los capilares pulmonares, la sangre libera CO_2 y capta O_2 . La sangre oxigenada fluye hacia las venas pulmonares y regresa al atrio izquierdo, completando el circuito^{12 8}. (Figura 3)

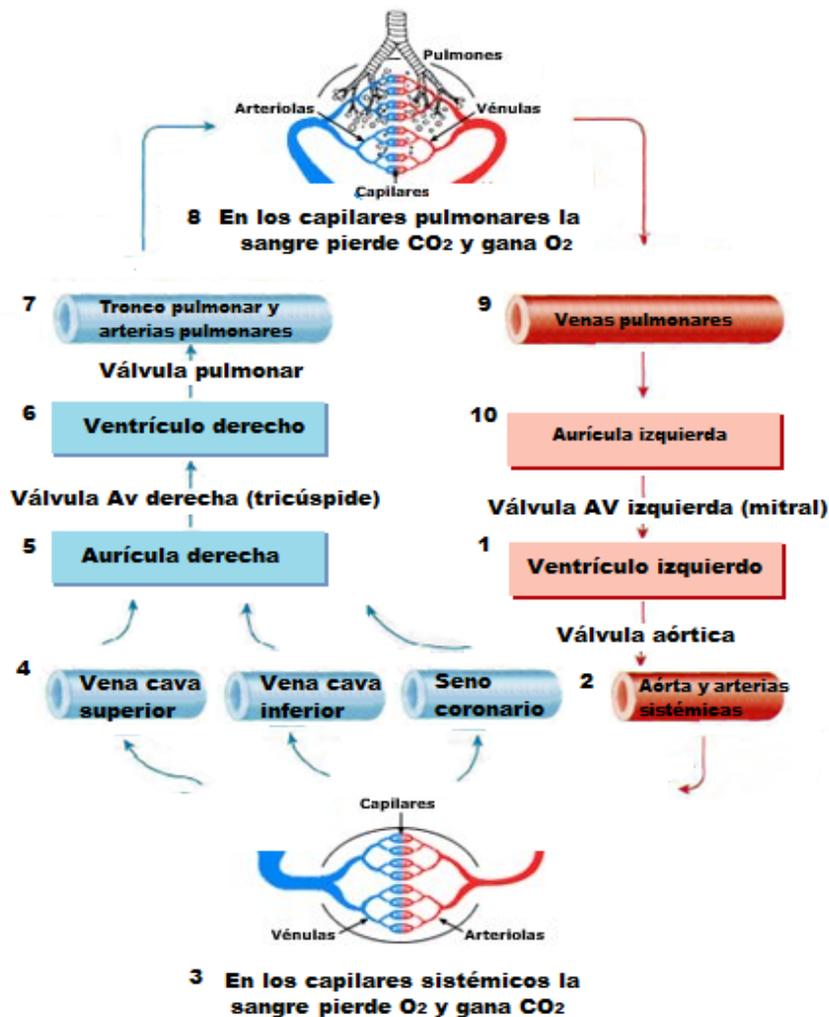


Figura 3 Diagrama del flujo sanguíneo y los componentes del aparato circulatorio. En azul se muestra el flujo de sangre a través del circuito pulmonar (sangre desoxigenada), en rojo se presenta el flujo la sangre por la circulación sistémica (sangre oxigenada). Basado en Peterson

Para que la sangre puede ser proyectada del corazón a ambos circuitos se presenta un gradiente de presiones conocido como ciclo cardíaco, el cual consiste en sístole (contracción) y diástole (relajación) ventricular y atrial. En cada ciclo cardíaco los atrios y los ventrículos se contraen y

se relajan alternadamente, trasladando la sangre desde las áreas de menor presión hacia las de mayor presión. A medida que una cámara del corazón se contrae la presión de la sangre que contiene aumenta ¹².

Durante la sístole atrial que dura aproximadamente 0.1 los atrios se contraen, en este momento los ventrículos están relajados, la sangre que contiene los atrios mientras avanza la sístole pasa a los ventrículos, el final de la sístole auricular también es el final de la diástole ventricular. La sístole ventricular se extiende 0.3 s durante la cual los ventrículos se están contrayendo, al mismo tiempo las atrios están relajadas, al alcanzar una presión de 120 mm Hg la sangre es expulsada del corazón a los dos circuitos circulatorio. El ciclo se completa con un periodo de relajación de 0.4s donde tanto los ventrículos como las atrios se encuentran relajados ¹².

Vascularización del corazón

Los nutrientes no pueden difundir lo suficientemente rápido desde la sangre de las cámaras cardíacas hasta todas las capas de la pared cardíaca. Por esta razón, el miocardio posee su propia red de vasos sanguíneos: la circulación coronaria o cardíaca. La irrigación del corazón procede de las arterias coronarias derecha e izquierda, y su drenaje lo realizan las venas cardíacas. Las arterias coronarias nacen de la aorta ascendente, rodea al corazón y proveen sangre oxigenada al corazón¹². La arteria coronaria izquierda se divide en la rama interventricular anterior y circunfleja, proveen sangre oxigenada a las paredes de ambos ventrículos y a las paredes del ventrículo y el atrio izquierdo respectivamente. La arteria coronaria derecha da pequeñas ramas al atrio derecho, se ramifica y forma la rama interventricular posterior que provee sangre a las paredes de ambos ventrículos y la rama marginal que transporta sangre oxigenada al miocardio del ventrículo derecho ¹².

La sangre llega a los capilares, donde entrega el oxígeno, los nutrientes y recoge el dióxido de carbono y productos de desecho del miocardio, desde allí es transportada a las venas coronarias y se drena en el seno coronario (un seno vascular es una vena con una pared delgada y que carece de músculo liso que le permita variar de diámetro). La sangre del seno coronario desemboca en el atrio derecho ¹².

Tejido muscular y composición celular

El tejido muscular cardiaco está constituido por fibras musculares, las cuales son cortas y relativamente circulares, presentan ramificaciones escaleriformes. Una fibra muscular cardiaca típica de mamíferos de 50 a 100 μm , con un diámetro de 10 a 15 μm , en aves típicamente está en rangos de 2 a 7 μm ⁸ de diámetro. En general presentan un solo núcleo de localización central aunque pueden presentar dos. Los extremos de las fibras se pueden conectar a las fibras vecinas a través de engrosamientos transversales del sarcolema (membrana citoplasmática de las fibras musculares), denominados discos intercalares^{12, 13}.

Existen varios tipos de fibras musculares cardiacas, se pueden clasificar como: fibras contráctiles, fibras marcapasos y fibras de conducción. Las fibras contráctiles son las células de miocardio de trabajo y constituyen la mayoría de las células musculares que componen el atrio y los ventrículos, son responsables de la actividad contráctil del músculo cardiaco^{11, 13}.

Las fibras conductoras son células musculares especializadas, están involucradas en la propagación de la onda de excitación desde el nodo sinoatrial (NSA) hacia ambos atrios y hacia el nodo atrioventricular (NAV), son una mezcla de fibras contráctiles y fibras de Purkinje (Figura 10.). Las fibras marcapasos generan potenciales de acción de manera rítmica y espontánea, son las responsables de que el corazón tenga la propiedad de contraerse sin ninguna señal externa, están localizadas preferentemente en el NSA, el NAV y el sistema His-Purkinje.¹³ (Figura 10).

Las células ventriculares de trabajo, tienen un patrón de miofibrillas bien definido, con gran cantidad de invaginaciones y son las células más grandes de miocardio, superando con creces a sus homólogas atriales, tanto en longitud y anchura. A su vez, las células auriculares de trabajo son más grandes y estructuralmente más complejas que las células conductoras. Sin embargo en ratón las células conductoras son distinguibles marginalmente de fibras de miocardio adyacentes por detalles finos tales como: diámetro más pequeño, la ausencia de gránulos atriales y pocas o nulas invaginaciones de la membrana (túbulos-T)¹³.

Aparato contráctil del corazón

El conjunto de proteínas contráctiles de las células miocárdicas son conocidas como miofibrillas, son estructuras filamentosas que se extienden en forma longitudinal dentro de una fibra (célula) muscular, están formadas principalmente por filamentos gruesos de miosina y filamentos finos de actina, troponina y tropomiosina. Las miofibrillas son las subunidades estructurales y funcionales de las fibras cardiacas ¹³.

La interposición geométrica de estas proteínas contráctiles (actina, miosina, troponina, tropomiosina y α -actina) da a las miofibrillas una característica de repetición de un patrón de rayas o estrías, la cual es la unidad básica y es conocida como sarcómero, mide de 2 a 3 μm en el músculo relajado de mamíferos, puede estirarse hasta 4 μm y en contracción máxima llega a medir 1 μm ¹³.

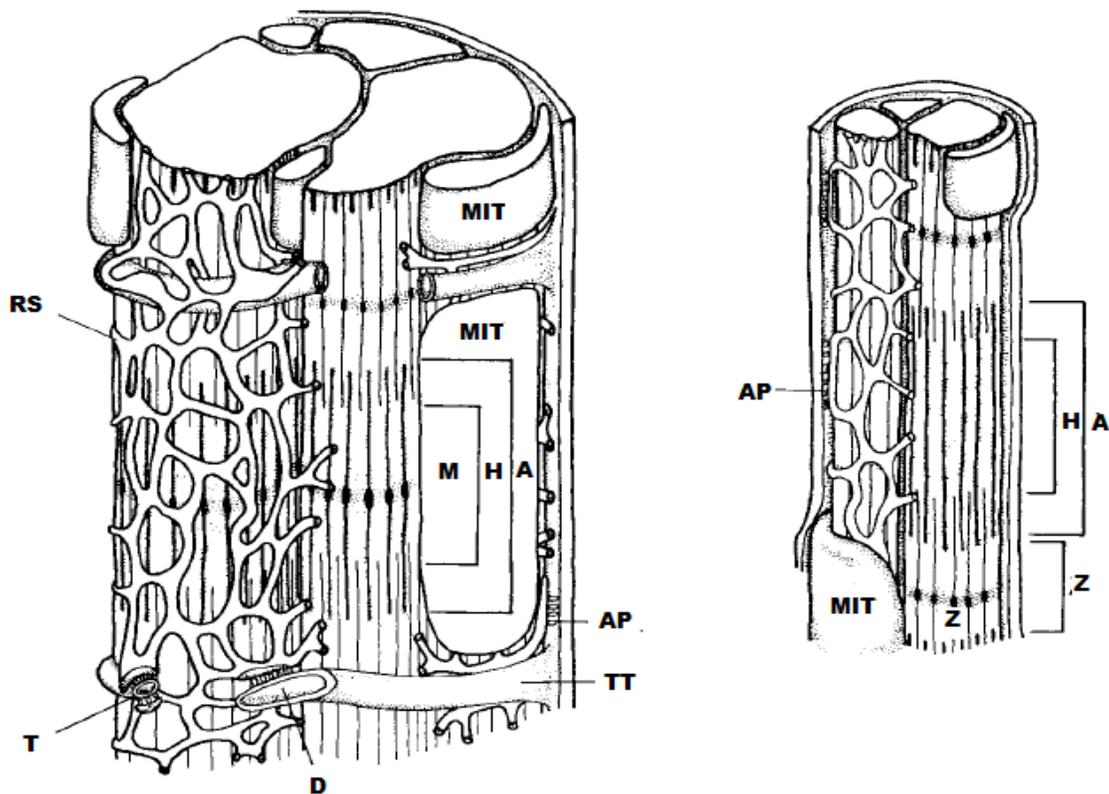


Figura 4 Comparación de células miocárdicas de mamífero (izquierda) y de aves (derecha). Las principales características distinguibles de las fibras aviares son el pequeño diámetro y la ausencia de la banda M y tubulos-T. RS, Reticulo sarcoplásmico; T, uniones en triada; D, uniones en diada; AP, sitios de acople periféricos, TT, tubulos-T; MIT, mitocondria; bandas de músculo estriado M, H, A, I, Z. Modificada de Sperelankis¹³.

Los componentes más evidentes de un sarcómero de mamífero son; la banda Z (línea Z, disco Z) compuesta en gran medida por α -actina y actúa como pieza clave en la estabilización de la estructura del sarcómero por el anclaje de la actina con el material de la banda Z; la banda A (anisotrópica), es la zona en la cual los filamentos de actina y miosina se sobrelapan, y la banda I (isotrópica), representa la zona de los sarcómeros en la cual los filamentos de actina se encuentran solos; y menos notable la zona pseudo-H (psH) o M. Cada sarcómero estrictamente cuenta con dos “mitades” de banda I, una banda A y transversalmente dividiendo a la banda I dos bandas Z¹³. Las bandas de músculo estriado las cuales son prominentes en mamíferos también están presentes en las aves con excepción de la banda M (Figura 4), sin embargo el efecto de la ausencia de la banda M sobre la propiedades contráctiles de miocitos de aves es desconocida.⁸

Sarcolema y túbulos T

La membrana plasmática de los miocitos se denomina sarcolema y el citoplasma se llama sarcoplasma. En mamíferos el sarcolema presenta invaginaciones hacia el sarcoplasma, que reciben el nombre de túbulos T o túbulos transversos. Los túbulos-T se encuentran localizados en la línea Z y tienen tanto elementos transversales como longitudinales, muchas proteínas que están involucradas en el acople excitación-contracción parecen estar concentradas en los túbulos-T, sin embargo en el tejido cardiaco de aves, reptiles y anfibios parecen estar ausentes sin embargo presentan acoples periféricos entre los canales en membrana y el retículo sarcoplásmico.¹⁴ Los túbulos-T se encuentran predominantemente en los miocitos ventriculares y están ausentes o mucho menos desarrollados en los atrios y células de conducción. El 60% de los túbulos-T se encuentran cerca de la línea-Z, entre las proteínas que se encuentran en los túbulos T son los canales de Ca^{2+} tipo L, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), canales de Na^+ y canales de K^+ .

Canales de Ca^{2+}

La concentración de Ca^{2+} dentro de los miocitos es sumamente importante en la relajación y contracción miocárdica¹⁵, es esencial en la actividad eléctrica cardiaca y es la activadora directa de los miofilamentos, la cual finalmente causa la contracción¹⁶. Los canales de Ca^{2+} son

proteínas transmembranales que regulan la $[Ca^{2+}]_i$, se activan por cambios en el voltaje y son esenciales en la generación del ritmo cardiaco normal, la propagación de la excitación a través del nodo atrioventricular y para la contracción de los miocitos atriales y ventriculares¹³.

En los miocitos dos tipos de canales de Ca^{2+} activados por voltaje se han identificado, los canales activado a bajo voltaje (LVA) y los activados a alto voltaje (HVA)^{13, 17}. El canal de Ca^{2+} más abundante activado por voltaje en el corazón y en el musculo liso vascular es el canal de Ca^{2+} tipo L. El potencial de membrana umbral para la activación se encuentra alrededor de los -40 mV con el máximo de corriente a los 10 mV presenta una conductancia unitaria alta (25 pS) y una larga duración de corriente. Aportando aproximadamente el 70% de Ca^{2+} que pasa a través de la membrana, incrementando el Ca^{2+} subsarcolemal desde concentraciones submicromolares hasta concentraciones micromolares, las cuales son necesarias para desencadenar la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico¹³.

Los canales Ca^{2+} , presentan dos tipos de inactivación; lenta y rápida. La inactivación lenta es dependiente de voltaje, por la despolarización de la membrana y la inactivación rápida se da por el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, farmacológicamente la corriente de Ca^{2+} tipo L es bloqueada por tres clases de compuestos orgánicos: dihidropiridinas (DHP), fenilalcalínicos (PAAs) y benzodiazepinas (BTZs)¹³.

El canal de Ca^{2+} tipo-L en aves se encuentra en mayor densidad en los acoples periféricos que genera con el retículo sarcoplásmico. En mamíferos generalmente se encuentra localizado adyacente al retículo sarcoplásmico de unión, donde los receptores de rianodina (receptor intracelular de Ca^{2+}) están presentes. La eliminación de este canal en ratones *knock-out* es letal y sigue una perturbación selectiva de la morfogénesis cardiaca y función en el desarrollo temprano embrionario¹⁶.

Por otro lado el canal Ca^{2+} activado a voltajes bajos se expresa predominantemente en los atrios y fibras de Purkinje, acarrea una pequeña y transitoria corriente (tipo-T). La conductancia unitaria (8ps). El potencial de membrana umbral es de -60 mV y la amplitud máxima de corriente se presenta a los -20mV^{13, 18}. La inactivación es rápida y no es intrínsecamente dependiente de

voltaje ¹⁶. Farmacológicamente se puede bloquear su actividad con compuestos como la curtoxina, mibefradil, amlodipina ¹⁹.

El influjo de Ca^{2+} a través de los canales tipo-T es insignificante en la mayoría de los miocitos ventriculares sin embargo en los atrios contribuye en la generación del potencial de acción del nodo sinoatrial, la despolarización de la célula y el soporte y propagación del potencial de acción de Ca^{2+} atrioventricular ^{17, 19}. La eliminación del canal de Ca^{2+} tipo-T en el NSA provoca irregularidades en el ritmo cardiaco, como bradicardia y arritmias, indicando un rol funcional de este canal en la ritmogénesis ¹⁶.

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) transporta tres iones de Na^+ al interior de la célula y libera un ion Ca^{2+} intracelular al espacio extracelular ^{20, 21}. El NCX también puede trabajar en dirección reversa, transportando iones de Ca^{2+} dentro de los cardiomiocitos en ciertas circunstancias. La importancia de este llamado “intercambio reverso” es controversial pero puede presentarse durante la falla cardiaca y durante el desarrollo temprano cardiaco. Tanto en los corazones fetales como neonatos, la actividad del NCX es sobrerregulado he incrementa el flujo de Ca^{2+} sarcolemal ²². Se expresa homogéneamente en corazones embrionarios tempranos, pero decrementa postnatalmente. La densidad de corriente declina también rápidamente después del nacimiento²¹. Por lo que un incremento del NCX media el flujo de Ca^{2+} y la extrusión de Ca^{2+} , por lo tanto se piensa que sirve potencialmente como un mecanismo alternativo de mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en el desarrollo cardiaco ²¹.

Estudios con embriones de ratón en el que no posee el NCX, carecen de un latido normal, tienen una organización miofibrilar anormal y mueren en estadios tempranos del desarrollo. Mostrando su importancia y un pronunciado rol en la manutención de una baja $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el desarrollo de los cardiomiocitos ²³. Es muy probable que la abundancia del NCX en células inmaduras compense el subdesarrollo del RS dada su importancia para la contracción, y que sea menor con la maduración del RS ²¹.

Retículo sarcoplásmico

El retículo sarcoplásmico (RS) es una elaborada red de membrana continua con la envoltura nuclear, es el principal organelo para el almacenamiento y liberación de Ca^{2+} , está estrechamente asociada con todos los organelos esenciales en la célula, incluyendo la membrana plasmática, mitocondria, Golgi, peroxisomas, endosomas tardíos y lisosomas. El RS es un modulador de la contracción cardíaca y posee una compleja colección de proteínas reguladoras de Ca^{2+} que apoyan el rápido movimiento de este ión ²⁴.

El RS está compuesto por dos regiones; la morfológica y la funcional, también llamadas RS longitudinal y el RS de unión. Los receptores de rianodina (RyR), canales de Ca^{2+} , calsecuestrina, juntina, sarcolemina (proteínas amortiguadoras de Ca^{2+}), están en su mayoría concentrados en el RS de unión, el cual tiene un papel más importante en el almacenamiento de Ca^{2+} y en la liberación de Ca^{2+} para desencadenar la contracción muscular. El RS longitudinal está compuesto principalmente por la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA) y fosfolamba, que es el regulador de la actividad de SERCA. En el corazón SERCA representa >50% de proteína del RS, lo que nos da una idea de la capacidad de captura de Ca^{2+} por parte del RS ²⁵.

En aves la conexiones entre el sarcolema y el RS ocurren en la superficie de la células ya que carecen de un sistema de túbulos-T. Los acoples son efectuados por procesos de unión que se extienden desde la cara citoplasmática del RS de unión que se encuentran adosados estrechamente a la superficie interna del sarcolema⁸ (Figura 4).

Receptor de rianodina y ATPasa de Ca^{2+} del RS

El receptor de rianodina (RyR) es el mayor canal liberador de Ca^{2+} del RS. La [Ca^{2+}] libre en el RS y en el citosol, regula la excitabilidad de este reservorio por la estimulación de los RyR que son regulados mayoritariamente por el Ca^{2+} . Este proceso de regulación involucra mecanismos sensibles a Ca^{2+} tanto en el lado luminal como citoplasmático del RyR; En la cara luminal se encuentran un sitio de activación (sitio-L; afinidad a 60 μM), mientras en la región

citoplasmática se encuentra el sitio de activación (sitio-A; afinidad a 1.2 μM) y dos sitios de inactivación (sitio I₂; afinidad 1.2 μM) (sitio I₁; afinidad a 10 mM) ²⁶ (Figura 5)

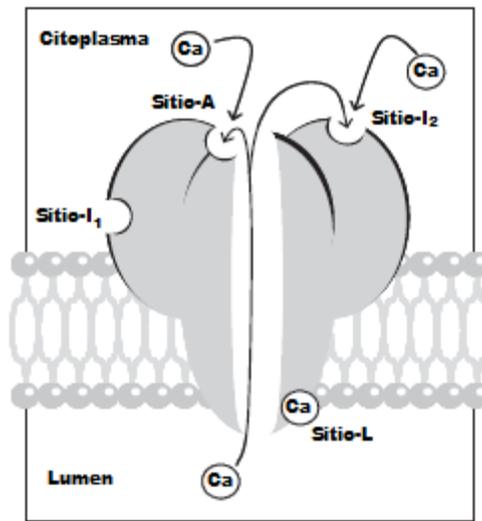


Figura 5. Receptor de rianodina. Se observa los distintos sitios de inactivación tanto en la cara luminal como en la citoplasmática, así como su sitio de activación luminal, todos con distinta afinidad a diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$. Modificado de Laver ²⁶.

La activación de los RyRs genera una liberación de Ca^{2+} de RS conocida como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , esta liberación de Ca^{2+} aumenta la concentración de Ca^{2+} en el citosol de la célula de 10-20 nM a 100 μM , el 80 % del Ca^{2+} es aportado por el RS, el 20% restante es aportado por flujos de Ca^{2+} a través del sarcolema ^{26, 27}.

La remoción del Ca^{2+} citosólico es fundamental en la relajación de las células cardiacas. El bombeo de Ca^{2+} citoplasmático al RS es principalmente por ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA), catalizando el gradiente electrogénico de dos iones de Ca^{2+} por una molécula de ATP hidrolizada, manteniendo la concentración citosólica en reposo de 10-20 nM. SERCA remueve cerca de 70 % de Ca^{2+} citosólico ²⁷ y mantiene la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en el lumen del RS (0.3-1.0 mM) que es 1000 veces mayor que el citoplasma ²⁶.

En cardiomiocitos la isoforma que se presenta es SERCA2a y es regulada por fosfolamban (PLB), cuando hay condiciones de bajo Ca^{2+} PLB se encuentra desfosforilado e inactivando la función de SERCA, cuando es fosforilado por PKA y por la cinasa Ca/CaM, sufre un cambio de conformación y permite la acción de SERCA, en condiciones de alto Ca^{2+} la interacción de PLB con SERCA es interrumpida activando a SERCA ²⁷⁻²⁹ (Figura 6).

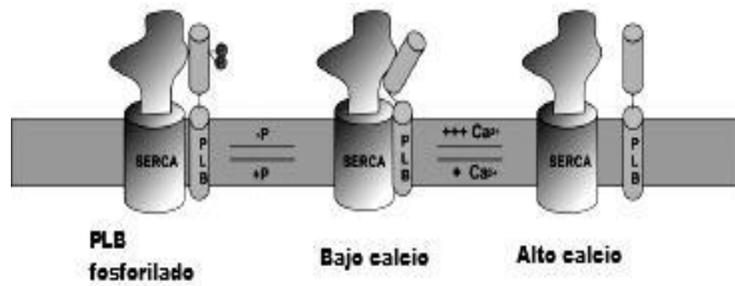


Figura 6. Regulación de SERCA. La inactivación o la parcial activación es dada por PLB y es dependiente de la $[Ca^{2+}]_i$. Modificado de Periasamy .

Uniones comunicantes (uniones gap)

Las uniones comunicantes en cardiomiocitos son esenciales para la propagación del impulso cardíaco, además permiten el intercambio de nutrientes, metabolitos, iones y moléculas de ~1000 daltones ³². Esta comunicación se da entre dos células adyacentes en rangos de 2-4 nm de distancia de membrana a membrana ³³ (Figura 7A). Están compuestas por dos hemicanales (conexones), proporcionados por un par de células adyacentes, formando un canal funcional que conecta el citoplasma de ambas células, los conexones a su vez están compuestos por seis subunidades de proteínas llamadas conexinas (Cx). La unión comunicante puede presentarse como: canales homotípicos (misma isotipo de Cx en ambos hemicanales), heterotípico (los hemicanales difieren de isotipos de Cx) y/o heteroméricos (diferente tipo de Cx en al menos un hemicanal) (Figura. 7B), estas combinaciones pueden afectar altamente la conductancia, la permeabilidad selectiva y propiedades de apertura ^{32, 35}.

Durante el desarrollo de pollo las uniones comunicantes están presentes durante etapas muy tempranas del desarrollo y están bien establecidas en el corazón pre contráctil ³⁶, pequeñas y numerosas uniones gap se distribuyen uniformemente por toda la superficie celular. En el corazón adulto las uniones gap son relativamente grandes y principalmente localizadas en los discos intercalares ³².

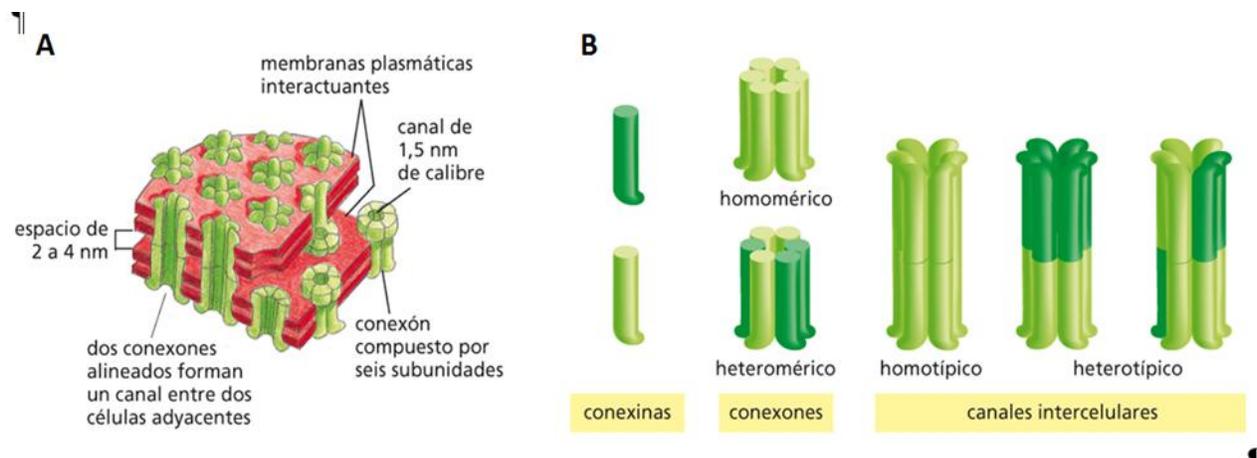


Figura 7. Uniones Gap y diferentes ensamblajes. (A) Interacción entre la membrana de dos células para la formación de una unión gap. (B) Se presentan los componentes de un canal intercelular y las posibles conformaciones que puede presentar. Tomada de Alberts³⁴

Conexinas y distribución

Las propiedades biofísicas de los canales formados por diferentes Cx son muy diferentes, dependen en gran medida de su combinación³³. Sin embargo no está bien establecida la incompatibilidad de determinadas isoformas de Cx para formar uniones heterotípicas, pero la formación de este tipo de canales podría afectar no sólo la comunicación eléctrica y metabólica en el tejido cardíaco adulto, sino también la diferenciación celular durante el desarrollo³⁷.

Al estudiar el desarrollo de corazón de pollo Beyer identifica la expresión de Cx43, Cx42 y Cx45. Determinó que la expresión de la Cx42 y Cx43 es persistente a niveles significativos en todo el desarrollo y en el corazón maduro de aves⁴⁰. Homólogos de Cx42 y Cx45 de pollo se reportan ahora en miocitos aislados de caninos, Cx40 y Cx45 respectivamente tienen una identidad de amino ácidos de 70% y 85% respecto a las Cx42 y Cx45 de aves. Recientemente se ha sugerido que la distribución de la Cx42 en el corazón de las aves es similar a las Cx40 en la rata⁴¹ (Figura 8).

En el corazón de mamíferos se expresan la Cx40, Cx43 y Cx45. La Cx40 se expresa sobre todo en los miocitos atriales, el NAV, en el haz de His y en las fibras de Purkinje. La Cx43 es por mucho la expresada mayormente entre los miocitos atriales, ventriculares y las partes distales de

las fibras de Purkinje. La expresión de la Cx45 se localiza principalmente en el NSA, el NAV, haz de His y las ramas del haz; bajos niveles de Cx45 pueden detectarse en los atrios y miocitos ventriculares^{33, 38, 39} (Figura 8)

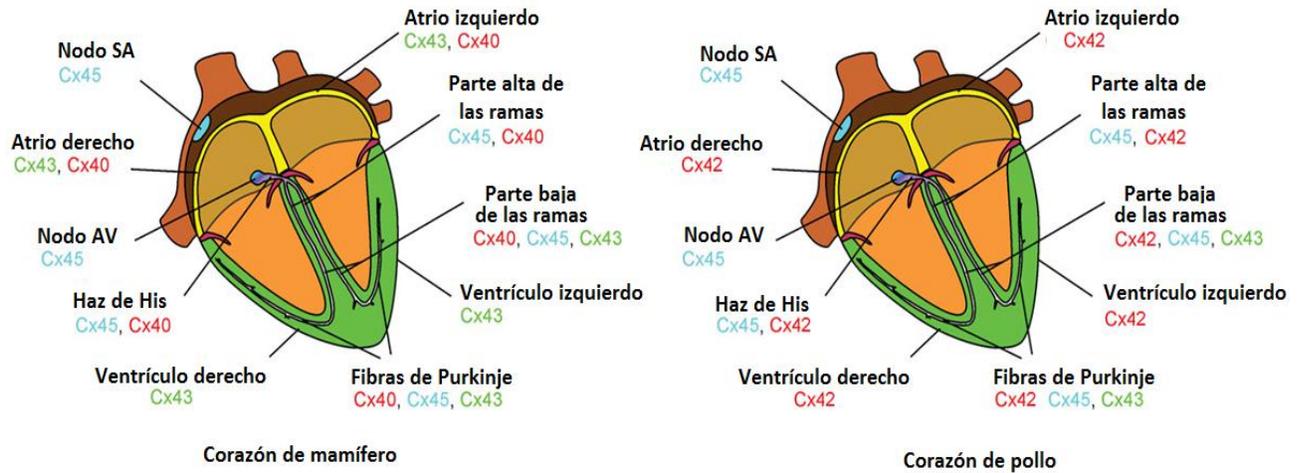


Figura 8. Uniones comunicante en el corazón. Comparación de la distribución de las distintas conexinas en el corazón de mamífero y de pollo. Modificado de Jalife³²

Dado los patrones de expresión específica de las Cx, su capacidad de formar uniones homotípicas y heterotípicas puede influenciar significativamente la naturaleza de la comunicación y la propagación de la excitación en las diferentes regiones del corazón, además de proveer un mecanismo simple para limitar o segregar la comunicación,^{32, 35}. La distribución de las distintas conexinas en el corazón genera una modulación de los canales de unión gap y es más prominente en los borde del tejido entre el tejido cardiaco como el músculo atrial-NSA, NAV-haz de His, Haz de His-ramas del His y las fibras de Purkinje-músculo ventricular⁴².

Excitabilidad cardiaca

Todas las células de nuestro organismo presentan una diferencia de potencial, esto es, existe un mayor número de cargas eléctricas negativas en su interior que en el exterior, de manera que surge un ‘polo positivo’ (el exterior) y un polo negativo (el interior). Dado por la diferente distribución de iones, la permeabilidad selectiva a los mismos y la constante acción de la bomba ATPasa 3(sodio)/2(potasio). La diferencia de potencial eléctrico entre uno y otro lado de la

membrana celular es de alrededor de -70 mV y se denomina potencial de reposo, en las células cardíacas el potencial de reposo en general se encuentra en -90 mV⁴³.

La inversión transitoria de la polaridad en regiones localizadas de la célula ante estímulos de distinta índole se conoce como excitabilidad, mientras que la respuesta activa es el Potencial de Acción (PA), se presenta cuando una corriente despolarizante produce un decremento considerable en el V_m (siendo menos negativo), más allá de un punto llamado umbral (determinado por las propiedades de los canales iónicos de membrana), la resistencia de la membrana puede disminuir notablemente, permitiendo que la corriente transmembranal aumente, generando un PA. La excitabilidad cardíaca es el resultado del flujo iónico a través de varias vías que involucran el sarcolema, el mioplasma, uniones comunicantes y el espacio extracelular. Por convención el espacio extracelular es considerado con un potencial de cero, y los iones positivos que fluyen dentro de la célula son llamados corriente entrante y tiende a despolarizar la célula, los iones positivos que fluyen al exterior de la célula transportan la corriente saliente y repolarizan a la célula ¹³.

Las células cardíacas, al igual que las células musculares y las neuronas, tienen la capacidad de propagar la actividad eléctrica. Sin embargo la automaticidad y la ritmicidad son características intrínsecas del tejido cardíaco. La automaticidad es la propiedad que tiene un grupo de células cardíacas de despolarizarse de manera espontánea sin necesidad de estímulo externo. La ritmicidad es la regularidad de la frecuencia de las despolarizaciones.

Potencial de acción

Dos principales tipos de células cardíacas se encuentran con respecto a su PA: Células de respuesta rápida, que se encuentran en las células de trabajo de atrios y ventrículos, y en las células especializadas de conducción de la red de His-Purkinje. Estas células tienen una alta permeabilidad al K^+ en reposo. Los PA's son generados en estas células por una corriente entrante rápida de Na^+ y son conocidos como potenciales de acción rápidos. El umbral de activación del PA se encuentra entre -60 y -75 mV. (Figura 9).

El segundo tipo de células cardiacas (de respuesta lenta) se localizan en el nodo sinoatrial y atrioventricular. Estas células tienen baja permeabilidad al K^+ entre PAs sucesivos, y son automáticas (actividad espontánea), el umbral para la activación del PA se encuentra entre -40 a -60 mV. La pendiente del PA es generado por una corriente de Ca^{2+} , la cual es más pequeña y lenta que la corriente rápida de Na^+ . Hay comparativamente una baja densidad de canales Ca^{2+} . La amplitud en células nodales es mucho menor (30 a 70 mV) que en regiones con PA dependientes de Na^+ (90 a 135 mV) (Figura 9).

La forma de onda de los PA rápidos cardiacos puede dividirse en varias fases; fase 0 es la subida del PA, fase 1 es la fase temprana de repolarización, fase 2 es la fase de meseta, y la fase 4 es la fase de potencial de reposo, enseguida se describe con más detalle las corrientes iónicas involucradas en cada fase.

Fase 0- corriente de sodio: El inicio de esta respuesta es por una rápida corriente entrante de Na^+ , ya que presenta una muy rápida cinética de activación e inactivación, generando una despolarización grande, la corriente de Na^+ (I_{Na}) alcanza su pico en menos de 1ms, siguiendo a este pico la inactivación de I_{Na} ; la amplitud de esta corriente disminuye espontáneamente (inactivación de canales) (figura 9)

Fase 1- Corriente saliente transitoria: Es la fase que sigue inmediatamente de la subida del PA, presenta una pequeña repolarización la cual varía entre especies y también en las diferentes regiones del corazón. La fase 1 se debe a un corriente de saliente de K^+ (I_{to} , transitory outward), esta corriente se activa rápidamente con la despolarización (durante la parte final de la subida del PA). I_{to} es inactivada durante la fase de meseta del PA, debido a la dependencia de voltaje y la evolución del tiempo, I_{to} se sobrelapa con la corriente entrante de Ca^{2+} .

Fase 2- Corriente de calcio: Esta fase comúnmente es llamada fase de meseta, es un periodo de tiempo en el cual el potencial de membrana se mantiene relativamente constante. La meseta es causada por un balance de la corriente entrante de Ca^{2+} y de la corriente saliente de K^+ (I_K), esta I_K se activa lentamente y se conoce como rectificadora retrasada, se presenta particularmente en la última parte de la meseta. La corriente entrante de Ca^{2+} (I_{Ca}) llega a su pico en pocos

milisegundos, pero requiere de algunos cientos de milisegundos para ser completamente inactivada. El umbral de activación de I_{Ca} es aproximadamente de -40 mV y la corriente máxima esta cerca de los 0 mV-, I_{Ca} está dada por los canales de Ca^{2+} tipo-L. La fase de meseta del PA es el vínculo entre los eventos eléctricos del PA y los eventos contráctiles, llamados contracción (para mejor entendimiento ver sección acople excitación- contracción)

Fase 3- Corriente rectificadora retrasada: Es la fase final de la repolarización es seguido de la meseta del PA. Es principalmente causada por un desbalance de las corrientes que estaban en balance en la fase 2. La corriente de calcio, I_{Ca} , decrece con el tiempo (debido a su inactivación) y la corriente rectificadora retrasada (I_K) se incrementa debido a su lenta activación. I_K es un conjunto de corrientes: un componente de muy lenta activación (I_{Ks}), un componente activado más rápido (I_{Kr}), y un componente de activación ultra rápida en los miocitos atriales. El potencial de membrana continúa repolarizándose y se aproxima al potencial de reposo de la membrana.

Fase 4- Corriente rectificadora entrante: Es la fase del potencial de reposo, en el cuál existe un flujo de iones a través de la membrana que no provoca cambios significativos en las concentraciones iónicas de ambos lados de esta, es mantenido por la bomba Na^+/K^+ y está determinado sobre todo por la corriente de K^+ conocida como corriente rectificadora entrante (I_{K1}) y mantiene el potencial de reposo entre -80 a -95 mV dependiendo de la zona del corazón.

Las células con un PA lento, no tienen un potencial de reposo real (causada por la falta de I_{K1} en estas células), el potencial de membrana entre PA y el siguiente no es estable, y en el NSA presenta despolarizaciones espontáneas lentas, conocidas como fase 4 de despolarización o potencial de marcapasos, este potencial está dado por una corriente entrante de Na^+ también conocida como *funny* (I_f), activada cuando el potencial es menor a -50 mV durante la fase 3, una corriente entrante de Ca^{2+} que fluye por canales tipo-T activada en la fase 4 a -55 mV, y una corriente saliente de K^+ .

El potencial más negativo que pueda alcanzar estas células es conocido como potencial diastólico máximo y es de -55 mV para las células marcapasos, se va aproxima a -70 mV conforme se da la transición celular entre el borde del NSA y el atrio propiamente, el umbral

para generar un PA en células nodales es aproximadamente -40 mV. Una vez que la fase 4 de despolarización lleva a la célula al umbral y la generación de un PA como en las células ventriculares. Sin embargo en células nodales, la subida del PA (fase 0) es muy diferentes que la subida de las células ventriculares, ya que es mucho más lenta y no es dependiente de Na^+ , sino de una corriente de Ca^{2+} , la I_{Na} es insignificante en células nodales. Generalmente no hay fase 1 y una breve meseta (fase 2) en células nodales. La fase 3 de repolarización retorna a la célula a su despolarización diastólica máxima.

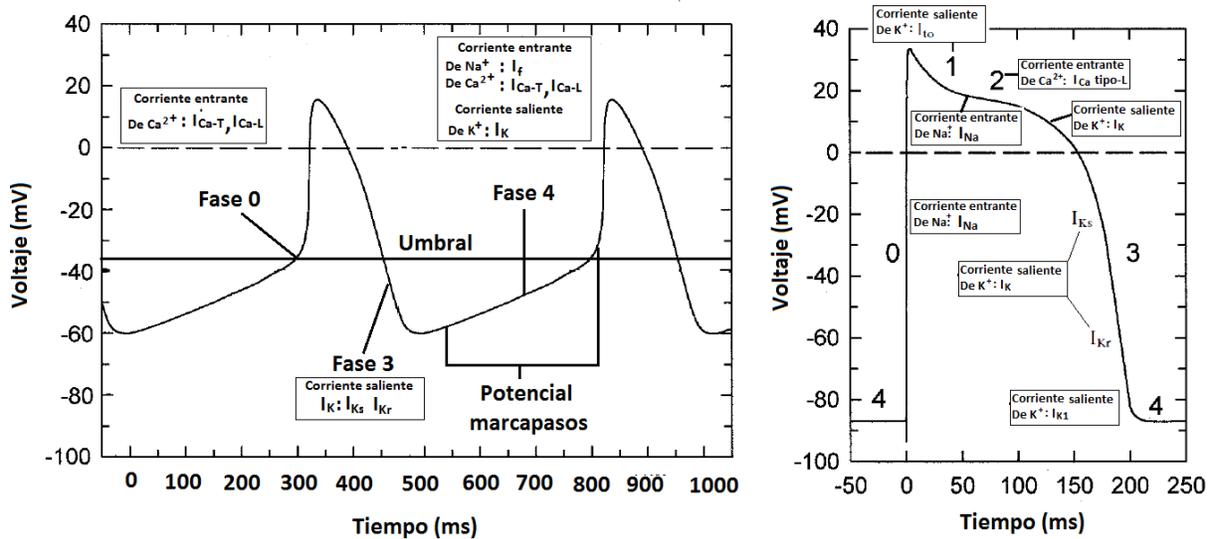


Figura 9. Potenciales de acción cardiacos. Se ejemplifican los dos distintos potenciales de acción cardiaco, los de respuesta lenta, que se generan por la apertura de canales de Ca^{2+} y los de respuesta rápida que es mediada por canales rápidos de Na^+ . Basado de Sperelakis ¹³

Sistema de conducción cardiaco

El sistema de conducción cardiaco (SCC), se encarga de iniciar, coordinar y mantener un latido rítmico gracias a la generación de un impulso marcapaso y la distribución de los potenciales de acción a través del corazón ^{44 45}. Los componentes del SCC incluyen: El NSA, también conocido como marcapaso, que genera el impulso eléctrico marcapaso, el cual se propaga en ambas atrios a una velocidad de 1 m/seg hasta llegar al NAV ahí se retrasa el impulso, pues presenta una velocidad de conducción de 0.05 m/seg, separando la contracción de los atrios y de las cámaras ventriculares cardiacas; como ultimo componente presenta el sistema His-Purkinje el cual

transmite rápidamente el impulso con una velocidad de 4 m/seg hasta el ápice de los ventrículos donde se propaga de 0.3 a 0.4 m/seg⁴⁴ (Figura 10). Este gradiente de velocidades de conducción contribuye a la coordinación necesaria para que las cámaras se llenen de sangre, y luego ésta sea impulsada hacia los pulmones o el sistema vascular.

El NSA sirve como un marcapasos primario, mientras que el NAV y el sistema de conducción ventricular actúan como marcapasos secundarios (accesorios), que representan un mecanismo de seguridad para la contracción ventricular repetitiva en condiciones de falla del NSA o de bloqueo del NAV^{44,46}.

NSA y arquitectura

El NSA en un corazón maduro se localiza en la región intercaval en la entrada del atrio derecho, tiene una estructura elongada descrita como “forma de coma (’)” con una “cabeza” en el borde superior de la vena cava-auricular y la “cola” a lo largo de la cresta terminal. El núcleo del NSA está rodeado por un área que muestra fenotipo de miocardio con un perfil de expresión aproximadamente intermedio entre las atrios de trabajo y el NSA, y un anillo externo de tejido conectivo y arterias⁴⁶.

Dos hipótesis sobre la organización celular del NSA han sido propuestas. El modelo de gradiente, postula una transición progresiva en el tamaño y de las propiedades eléctricas de las células del marcapasos desde el centro y hacia la periferia. Las células en el centro son más pequeñas y tienen una tasa de actividad intrínseca más baja. El segundo modelo llamado de mosaico, sugiere una mezcla de células atriales y del NSA desde la periferia al centro⁴. Boyett concluye que en el conejo el modelo que más representa la organización del NSA es el modelo de gradiente⁴⁷

El sitio exacto de inicio de la secuencia de propagación en el NSA puede cambiar dinámicamente en respuesta a varios factores externos que pueden afectar el ritmo cardiaco, como la innervación nerviosa autonómica, pero también por procesos locales^{7, 48}. El NSA ha sido identificado usando propiedades histológicas, incluyendo células ricas en glicógeno, escaso

desarrollo de miofibrillas, tejido conectivo, actividad de acetilcolina esterasa y expresión de HNK-1 ⁴⁶.

Nodo atrioventricular y fibras de Purkinje

El NAV está localizado en la base del septo interatrial (Fig. 7). Las células del NAV están intercaladas con tejido conectivo y una amplia vasculatura. Algunas especies de aves desarrollan un anillo atrioventricular, el cual juega un rol similar al NAV de los mamíferos. El retraso en la propagación del impulso asegura una expulsión efectiva de la sangre de las cámaras atriales antes de la iniciación de la contracción ventricular ⁴⁴.

La lenta velocidad de conducción puede ser debido a la nula expresión de canales de uniones “gap” de conducción rápida como son CX40 y 43, aunque expresan Cx45. La expresión diferencial de los miembros de la familia de Cx en el NAV puede estar directamente relacionada con las velocidades de conducción, la Cx45 es conocida como un canal sensible a voltajes altos y de baja conductancia⁴⁴.

Se han encontrado similitudes entre la células nodales (NAV) y las células “primarias” embrionarias de músculo cardíaco, incluyendo el tamaño pequeño de las células, su forma irregular, el pobre desarrollo de las miofibrillas, la expresión de miocitos de tipo embrionarios contráctiles, proteínas del citoesqueleto, la forma del potencial de acción, las velocidades de conducción bajas y menores densidades de uniones eléctricas “gap. Sin embargo otros fenotipos característicos del NAV no son completamente reminiscencias de estos miocitos “primarios” embrionarios. Esto es evidencia que las células nodales maduras tienen un fenotipo funcional distinto, por lo que la formación del NAV puede estar regulada por múltiples pasos y mecanismos diferentes a los previamente considerados⁴⁴.

El siguiente componente del sistema de conducción cardíaco es el sistema His-Purkinje (SHP), en él se acelera nuevamente la propagación del impulso eléctrico a lo largo de un haz de fibras que finalmente activan al músculo ventricular, el sistema de fibras de Purkinje. En el pollo esta red comienza su formación en una etapa temprana del desarrollo, las fibras periféricas inician su desarrollo después de la septación y finaliza un momento cercano a la eclosión⁴⁴.

El sistema de conducción ventricular comprende las ramas derecha e izquierda del haz y la periferia del subendocardio del sistema ventricular de conducción (Fig. 10). En pollo además se encuentra un sistema de Purkinje adicional periarterial y bien desarrollado. Las células de Purkinje están clonalmente relacionadas con el miocardio de trabajo que las rodea, estas células se desarrollan en estrecha colaboración, su diferenciación es inducida por el desarrollo de las arterias coronarias y su formación puede ser estimulada por endotelina-1 in vitro e in vivo. El sistema de Purkinje periarterial se desarrolla en etapas tardías (segunda mitad del tiempo de incubación) expresa un tono bajo de miosina, Cx42 y muestra un perfil de expresión de factores de transcripción único^{44, 50}.

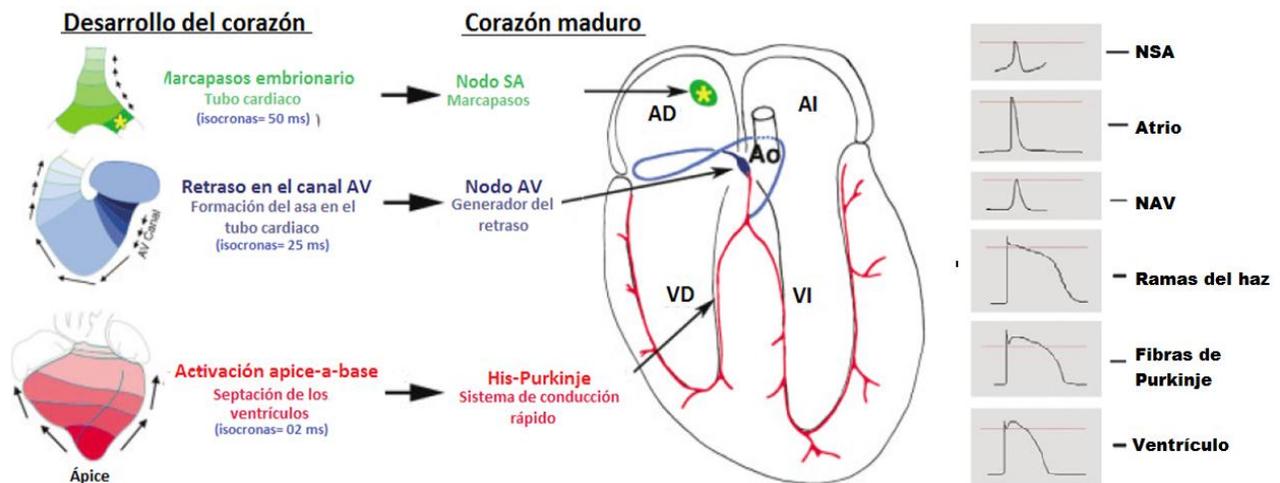


Figura 10. Sistema de conducción cardíaco. Componentes del SCC en el desarrollo y en corazón adulto de pollo. La estrella amarilla indica el lugar de actividad del marcapasos. Se muestra la Dirección y velocidad de propagación de los PA en diferentes etapas del desarrollo. AV, atrioventricular; Ao, aorta; SA, sinoatrial; AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo. Modificado de Gourdie⁴⁵.

Las células de conducción rápida se encuentran dispersas en el miocardio, exhiben una rápida subida del potencial de acción, una duración del PA prolongada (Figuras 9 y 10). Varios genes específicos para musculo no se expresan en las células de este sistema, o se hallan en niveles considerablemente bajos. La Cx40 una proteína de uniones gap de rápida conductancia intercelular, fue identificada como la Cx predominante en el SHP en todos los vertebrados superiores⁵⁰.

El SHP es necesario para la contracción coordinada del corazón maduro. La propagación del impulso cardíaco a través de SHP resulta en una activación ordenada desde el ápice hacia el tracto de salida en la base del corazón, teniendo una eficiente expulsión de la sangre de los ventrículos hacia el sistema vascular. Sin embargo la función del SHP no es necesaria en el corazón durante el desarrollo embrionario temprano. El corazón late desde etapas muy tempranas y carece entonces de vías de conducción especializadas reconocibles⁵¹.

Transmisión del impulso eléctrico

El proceso de conducción del impulso es gobernado por tres factores: (1) la excitabilidad individual de los cardiomiocitos, (2) el acople eléctrico entre los cardiomiocitos y (3) las propiedades de la red tejido cardíaco⁵². Entre los parámetros morfológicos, la geometría del tejido en la vía de conducción es críticamente importante para la propagación de la excitación eléctrica a través del corazón. También puede estar influenciada por el tamaño, la forma de los miocitos y la curvatura de onda de excitación eléctrica; la presencia y distribución de elementos no excitables, incluyendo septos de tejido fibrótico, arterias, venas; el tamaño y la forma del espacio extracelular y la organización espacial de los miocitos dentro del miocardio atrial o ventricular o dentro del NSA, NAV y SHP^{41, 52, 53}.

La propagación de la onda de excitación ocurre de forma de circuito de corriente local (electrotónico). La densidad de corriente de circuito local determina la efectividad de la propagación con la que cada célula contribuye para la excitación de sus vecinas y por lo tanto a la velocidad de propagación del frente de onda⁵⁴. El grado de comunicación entre célula-célula contribuye importantemente a la velocidad de propagación. Por lo tanto el tamaño de la unión gap, su distribución y las propiedades de cada canal formado, influirán en lograr una coordinada y rítmica generación del impulso por el múltiple marcapasos del nodo sinoatrial⁴¹.

Desarrollo del sistema de excitación contracción

El latido regular del corazón ya es observado en un periodo muy temprano del desarrollo del corazón. Lo que indica que un sistema intracelular de contracción es establecido en un periodo

temprano, mejor conocida como automatismo cardíaco. La función de los cardiomiocitos es marcadamente alterada durante el desarrollo del corazón como se revela por los dramáticos cambios de morfología. Estos cambios en el desarrollo han sido reportados y relacionados con la alteración de la expresión y las características de los canales iónicos en la superficie membranosa⁵⁵.

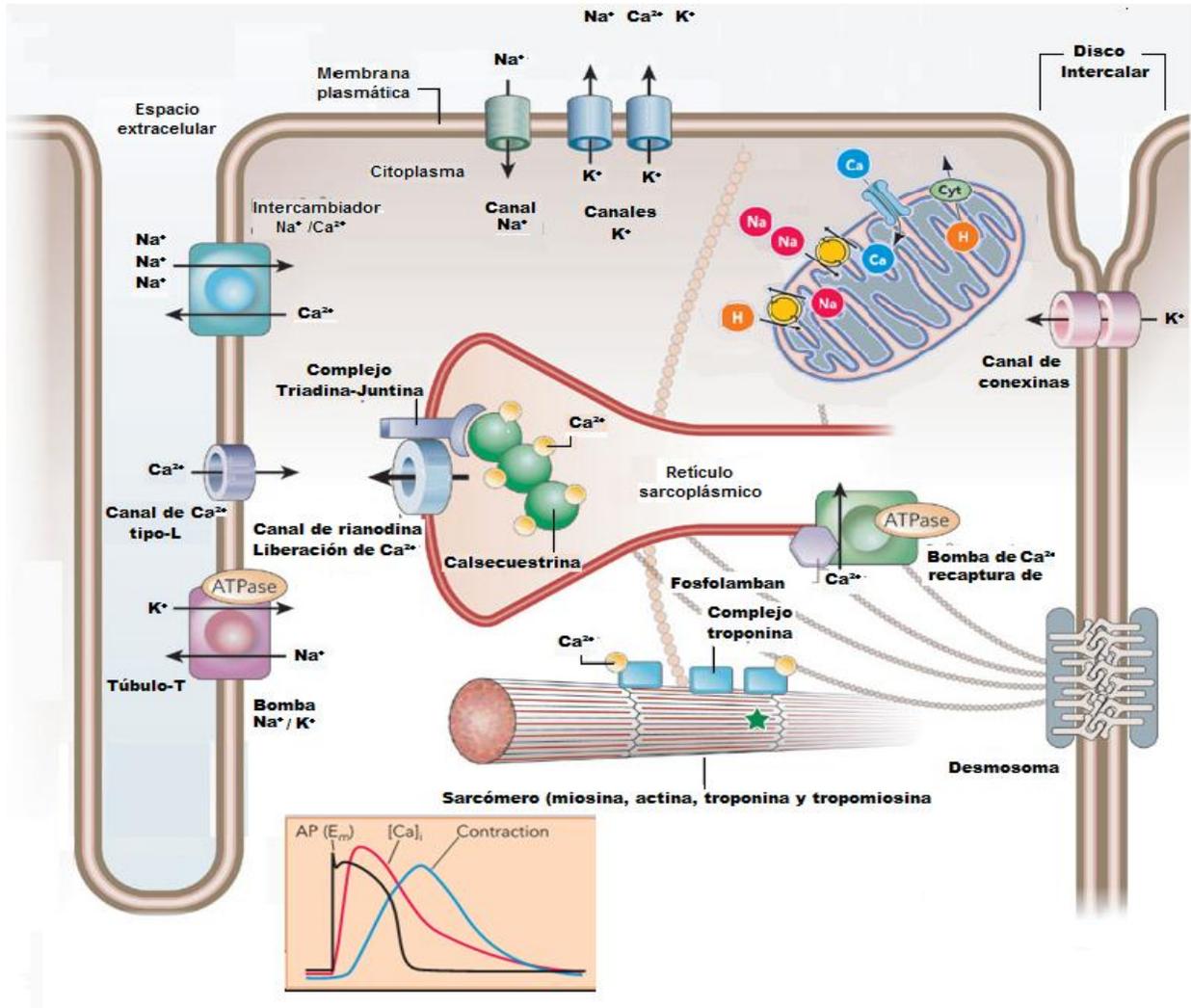


Figura 11 Acople excitación contracción. Este proceso involucra un gran número de canales, sin embargo la acción directa del ion calcio permite que los sarcómero se corte permitiendo una contracción. Por lo cual hay un desfase desde un PA hasta la contracción. Modificado de Knollmann⁵⁷

En el corazón adulto el ciclo de incremento del ion Ca²⁺ libre intracelular en células de músculo cardíaco es regulado por el acople del influjo de Ca²⁺ y la liberación de Ca²⁺ desde el RS. La entrada de Ca²⁺ extracelular dentro del citoplasma es a través de los receptores de dihidropiridinas en la membrana plasmática. Un incremento local en [Ca²⁺]_i dispara la apertura del receptor de rianodina en la membrana del RS. La apertura de los RyRs libera una gran

cantidad de Ca^{2+} de los depósitos del RS, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el Ca^{2+} en el espacio intracelular se asocia con la calmodulina, y la fosforilación de la miosina se activa por aumento de la actividad de una cinasa específica. Como consecuencia de esta fosforilación, la miosina se desliza sobre la actina, con la consiguiente contracción muscular cardíaca⁵⁶ (Figura 11). Durante el periodo de desarrollo, el influjo de Ca^{2+} que media el acople E-C es fundamentalmente a través de los canales de Ca^{2+} tipo-L. En periodos fetales los canales de Ca^{2+} tipo-T y el modo reverso del intercambiador Na^+ - Ca^{2+} también contribuyen al influjo de Ca^{2+} , estas contribuciones se reducen gradualmente hasta la edad adulta⁵⁵.

Desarrollo embrionario

En los embriones de vertebrados, el corazón se forma a partir de células en la placa del mesodermo anterior lateral, donde se organizan en campos bilaterales sobre ambos lados de las láminas precordal y notocordal rostral. Estos campos incluyen los precursores tanto de las células del miocardio como del endocardio⁵⁸.

Las células del mesodermo cardiogénico se van posicionando por movimientos de gastrulación que ocurren en estrecha asociación con el ingreso de células del endodermo rostral. En mamíferos y en aves, los campos bilaterales del mesodermo cardiogénico se fusionan en los bordes anteriores, para formar la llamada “media luna cardíaca”⁵⁹ (Figura 12). Durante esta fusión, las células en el miocardio epitelial comienzan a expresar genes y proteínas específicos para músculo, mucho antes de la iniciación de los latidos del corazón⁵⁸.

Los primeros pasos del ensamblaje del tubo cardíaco son iniciados por la convergencia y fusión del primordio bilateral del corazón a lo largo de la línea media. El resultado es un corazón tubular que late, compuesto de una capa miocárdica externa y una capa endocárdica interna, también posee una polaridad a lo largo del eje anterior-posterior, en el cual los tejidos prospectivos del saco aórtico, tracto de salida, ventrículo derecho, ventrículo izquierdo y atrios están presentes en un orden anterior a posterior a lo largo del tubo⁵⁹.

Este tubo de miocardio de corazón embrionario posee un fenotipo que es similar al del tejido nodal el cual muestra automatismo, una transmisión lenta del impulso despolarizante. Los sarcómeros y el retículo sarcoplásmico no están bien desarrollados en este miocardio primario. En conjunto en etapas tempranas del embrión de pollo todas las regiones de corazón tubular lineal poseen automatismo intrínseco y ondas de contracciones peristálticas a través del tubo con bajas velocidades de conducción. Esta condición es una reminiscencia del corazón de los cordados primitivos, en los cuales la polaridad depende del marcapaso dominante en la entrada del corazón ⁵⁰.

En todos los vertebrados el corazón tubular pasa por una etapa conocida como plegamiento en asa hacia la derecha. El plegamiento comienza en la etapa en la que solamente se encuentran el componente ventricular y parte del canal atrioventricular. El tubo cardiaco lineal crece a ambos polos, se curva hacia el lado derecho del lado ventral y subsecuentemente gira hacia la derecha ⁵⁹.

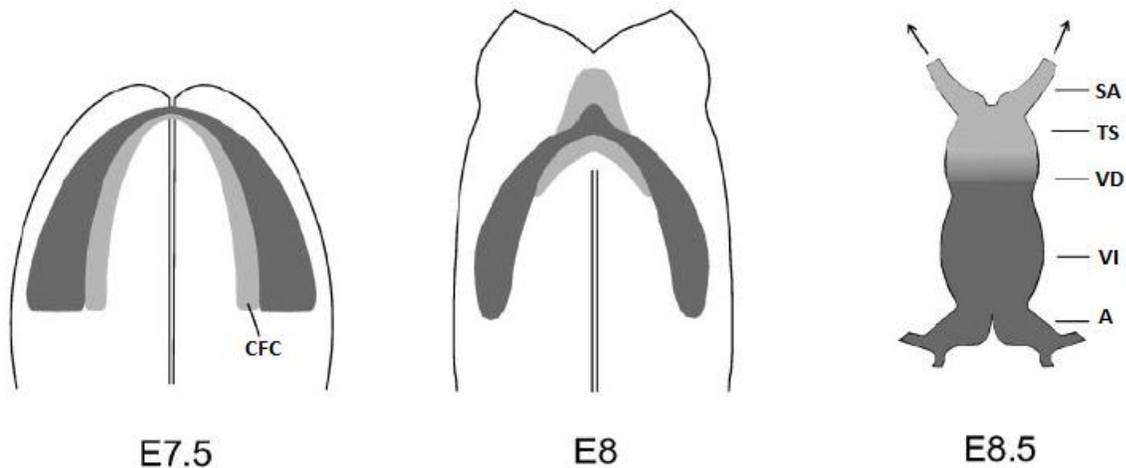


Figura 12. Etapas de la cardiogénesis. El campo principal formador de corazón se muestra en negro y el campo anterior formador de corazón (secundario) (CFC) en gris. SA indica el saco aórtico; VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo y A, atrio. Modificado de Zaffran ⁵⁹

Por este proceso, la pared lateral izquierda original se convierte en la pared ventral del ventrículo, el lado dorsal de la curvatura interior y el lado ventral de la curvatura exterior. Toda la región dorsal, incluyendo la izquierda y porciones derechas del conducto del corazón lineal termina en el interior de la curvatura del corazón. Esto indica que el lado ventral original del tubo cardiaco se expande y se curva hacia la derecha, formando las cámaras ventriculares, así el flujo de sangre llega a su patrón adulto ⁴⁶(Figura 13).

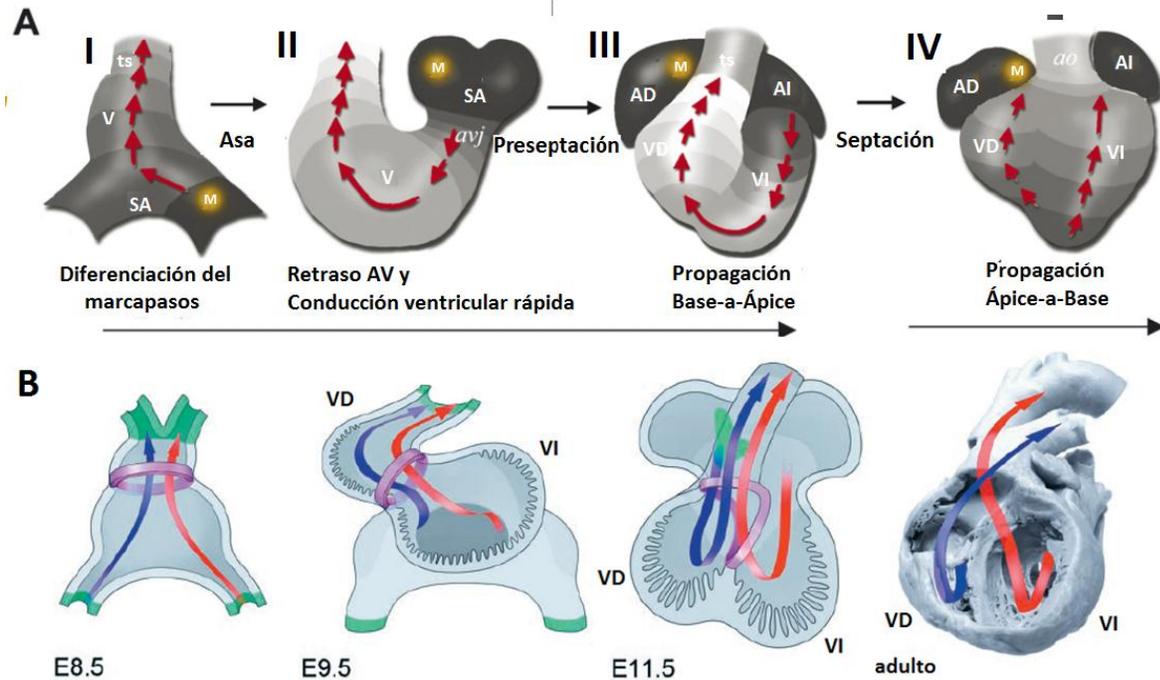


Figura 13. Formación de las cámaras del corazón y los cambios en la propagación eléctrica y el flujo sanguíneo. (A) Vías de conducción del impulso durante el plegamiento en asa hasta la septación. El lugar del marcapasos se muestra en amarillo; las flechas de color rojo muestran la dirección de la propagación de la onda de excitación. (B) Se muestra la formación de los ventrículos del corazón por el plegamiento en asa. Se nota que el flujo de sangre derecho e izquierdo se presenta en forma paralela en etapas embrionarias, en comparación del corazón adulto. VR, ventrículo izquierdo; VI, ventrículo derecho; M, marcapasos; AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; Ao, aorta; ts, tracto de salida; SA, región sinoatrial; avj, unión atrioventricular. Modificada de Mikawa⁴⁴

Durante el desarrollo el flujo de sangre cambia de presentarse el flujo derecho e izquierdo en forma paralela, hasta el patrón en un corazón adulto que se presenta en forma cruzada. No sólo el flujo de sangre cambia, sino también la dirección de la onda eléctrica; originalmente en el tubo cardiaco ocurre en sentido posterior a anterior, produciendo una onda contráctil de la región caudal a rostral. Esta propagación unidireccional del potencial de acción y de la onda contráctil se mantiene durante el plegamiento hasta que se completa la septación interventricular (Figura 15)⁵⁰.

La septación de los ventrículos para formar las cámaras izquierda y derecha en pollo se presenta en los estadios 32-33 según la guía de Hamburger-Hamilton (HH) (7.5-8 días), se observa que la onda del impulso eléctrico que emana desde los atrios es transmitida al ápice del corazón directamente, sin la activación de los miocitos ventriculares (Figura 13). Este dramático cambio

en la vía de conducción del impulso depende de la septación, la diferenciación coordinada del SCC, los cambios morfológicos y la expresión de ciertas proteínas⁴.

Inervación simpática y catecolaminas

El ritmo cardiaco y la contractilidad son regulados por la señalización autónoma a través de una compleja red que incluye nervios eferentes postganglionares parasimpáticos y simpáticos en el corazón desarrollado a término. Estos nervios tienen como blanco receptores β adrenérgicos y muscarínicos en la membrana sarcolemal cardiaca, modulando el ritmo cardiaco, la contractilidad y la velocidad de conducción⁶⁰.

La estimulación β adrenérgica se presenta por una cascada de señalización, gracias a la unión de un agonista al receptor β adrenérgico, el cual está acoplado a una proteína G estimuladora (Gs), la cual activa la adenilato ciclasa elevando la concentración de AMPc, que a su vez activa a PKA y esta tiene una regulación positiva en primera instancia al fosforilar los canales de Ca^{2+} tipo-L, incrementando la corriente transitoria de Ca^{2+} , y una regulación negativa al fosforilar PLB activando a SERCA, capturando así el Ca^{2+} intracelular y reservándolo en el RS, además de que fosforila a la troponina I originando una disminución de la afinidad de la troponina C por el ion calcio, provocando con esto la relajación muscular (Figura 14).⁶¹

Sin embargo, en el desarrollo embrionario de múridos o pollos la capacidad de respuesta parasimpática, identificada como una desaceleración del corazón, se observa ya en el día 11 o 12, mientras que la capacidad de respuesta simpática, manifiesta como una aceleración del ritmo cardiaco, se observa mucho después en el desarrollo, alrededor del día embrionario 16⁶⁰.

También se ha demostrado la presencia de receptores muscarínicos y adrenérgicos antes de que ocurra la inervación, están presentes en embriones de pollo durante el primer cuarto de incubación⁶²; Higgins en 1981 reporta que en fragmentos de ventrículos aislados de corazones de pollo desde 4 días, tenían respuesta a la estimulación β -adrenérgica, probada con dosis de $1\mu\text{M}$ De Iso, evaluada mediante un transductor de fuerza se reveló como un aumento en la frecuencia de actividad¹.

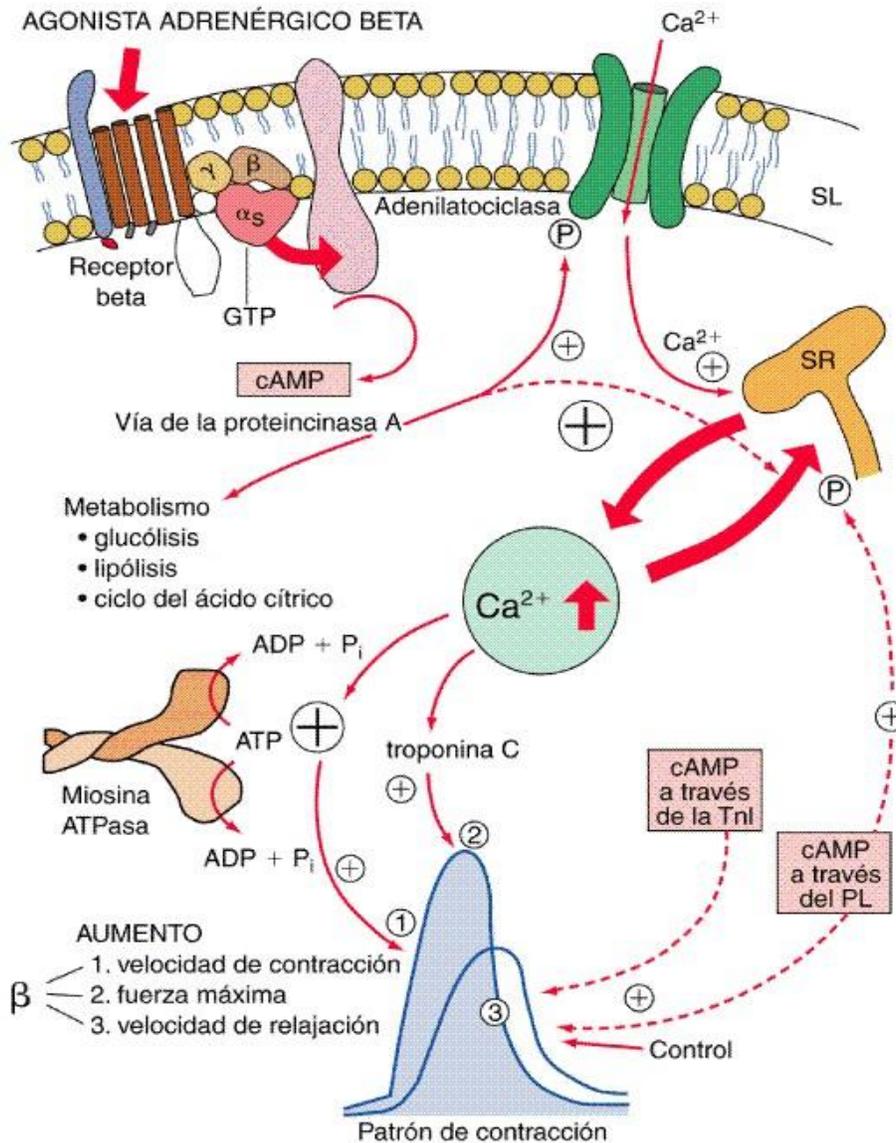


Figura14. Cascada de señalización β adrenérgica. La unión de un agonista al receptor β adrenérgico puede regular la velocidad de contracción, la fuerza máxima y la velocidad de relajación, por la fosforilación por PKA de los canales de calcio tipo-L, PLB y troponina I Modificado de An⁶⁴.

En adición las enzimas catabólicas y anabólicas de los neurotransmisores de SNA principales (acetilcolina y norepinefrina) están presentes también durante el desarrollo temprano. En embriones de pollo, el tono funcional colinérgico en el sistema cardiovascular puede requerir de la maduración tanto de elementos centrales y eferentes del sistema simpático⁶². Se ha demostrado que las catecolaminas son necesarias para el desarrollo cardiaco, ya que animales con interrupción de genes que sintetizan catecolaminas mueren in útero por falla cardiaca en una etapa embrionaria antes de la invasión simpática⁶³.

Se sabe de la presencia de cardiomiocitos no neuronales especializados llamados células adrenérgicas cardíaca intrínsecas (ICA), que poseen enzimas biosintéticas de catecolaminas. Las ICA han sido ligadas en el desarrollo fetal del marcapasos cardíaco y sistema de conducción. Huang et al. proponen que las células ICA pueden generar aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular regulando los transientes necesarios para la liberación de neurotransmisores ⁶³.

Furness et al. (1970) reportan axones que contienen catecolaminas en el conducto deferente en el ratón en el día de nacimiento ⁶⁵, sin embargo, los potenciales excitatorios adrenérgicos no se presentan hasta el día 18 después del parto. En estudios posteriores, se encontró un retraso de 9 días o más entre el momento en que los axones son capaces de acumular catecolaminas y el tiempo que la liberación de catecolaminas puede ser detectado ha sido reportado en el atrio derecho del embrión de pollo ⁶⁶.

Los patrones de actividad periódica

Comprender los factores que conducen a un tipo particular de organización espacio-temporal, es de gran relevancia para la cardiofisiología, entre otras razones porque el surgimiento de patrones de actividad anómalos se asocia con la aparición de arritmias peligrosas o incluso fatales. De tal manera que poder estudiar los comportamientos dinámicos del tejido cardíaco en preparaciones reducidas o simplificadas, ha resultado de gran ayuda para comprender los procesos arritmogénicos. En cultivos reorganizados de células cardíacas aisladas ha sido posible estudiar fenómenos de propagación de ondas planas; ondas reentrantes ^{3,67-69}; la génesis de sitios marcapasos, el surgimiento de ondas espirales con diversos atributos: ondas estables y viajeras, patrones de actividad intermitente y en ráfagas. Todos estos patrones pueden ocurrir en un organismo completo, sin embargo los factores y parámetros que los originan no están comprendidos del todo. Una limitante de los modelos de estudio en cultivos primarios puede reconocerse porque los arreglos espaciales que adoptan las células de manera espontánea, no corresponden a la estructura ordenada que tienen los cardiomiocitos *in situ*, y como mencionamos antes, la disposición espacial y el grado de conectividad, son de gran influencia en los patrones de actividad que puede adoptar el tejido cardíaco, por ello se han seguido explorando otros modelos de estudio. Asimismo, poder obtener modelos dinámicos durante el

desarrollo ontogénico, debe contribuir significativamente a la comprensión de los factores más relevantes en la organización de la actividad periódica del corazón.

Rebanadas de corazón embrionario como modelo de estudio.

La función cardíaca es estudiada usando modelos experimentales y teóricos, desde niveles celulares hasta en un paciente. Cada nivel de complejidad estructural ofrece una visión única. Como regla general, el modelo "más reducido" tiende a beneficiarse de un mejor control sobre las intervenciones y la observación más directa de las respuestas, que permite la identificación de las cadenas causales de los acontecimientos ⁷⁰.

Sin embargo el medio ambiente cada vez más artificial en el que los mecanismos se estudian, puede ocasionar que las cadenas de observación de acontecimientos no representen la conducta a niveles más integrados de la complejidad estructural, dando lugar a interpretaciones erróneas y u observaciones aparentemente contradictorias, que necesitan ser explicadas desde otras perspectivas sin perder de vista los conocimientos a niveles tan básicos como la traducción de los mecanismos de reducidos a las respuestas integrales ⁷⁰.

Los sistemas *in vitro* se han convertido en una herramienta estándar para los investigadores y la más empleada frecuentemente son los cultivos celulares. No obstante Parrish (1995) menciona que las rebanadas de tejido cardíaco vital pueden ser muy interesantes por varias razones. Las interacciones normales célula-célula se mantiene y el procedimiento de aislamiento no selecciona una determinada población de células ⁷¹. Así como también, las rebanadas representan un interesante balance entre la complejidad estructural y la fácil interpretación de datos. Después de más de tres décadas un pequeño grupo de investigadores han desarrollado y validado este modelo organotípico semi-intacto de ventrículo de miocardio ⁷⁰.

En las rebanadas las células están expuestas a una distribución más realista de las relaciones electrofisiológicas que en los modelos en cultivo y experimentan más un microambiente mecánico fisiológico. Al mismo tiempo este tipo de preparación permite un seguimiento de las propiedades características estructurales y funcionales del tejido ⁷⁰.

Las rebanadas de tejido ventricular cardiaco se han empleado exitosamente para evaluar el daño inducido por toxinas⁷², así como se ha probado la síntesis de DNA en corazones de ratas neonatales⁷³, y para investigar el preconditionamiento isquémico⁷⁴.

En cuanto a las investigaciones electrofisiológicas en células cardiacas, Burnashev *et al* en 1990 fue el primero en demostrar que las rebanadas ventriculares de ratas recién nacidas de 1 a 14 días son funcionales⁷⁵. En 2003, se retomó el modelo de rebanadas de corazón, en el que se concluyó que las rebanadas poseen características electrofisiológicas más representativas que en monocapas de cultivo o en construcciones miocardiales con ingeniería de tejidos⁷⁶.

En 2007 Pillekamp y colegas demuestran que no solamente se pueden obtener rebanadas de rata, sino también de murinos embrionarios, neonatales y adultos^{77,78}. Registros con microelectródos confirman la conservación de la viabilidad y el fenotipo electrofisiológico de los cardiomiocitos en los cortes, y demostró que el modelo puede ser utilizado para probar los efectos de las drogas en el potencial de acción cardíaco. En corazones enteros o en animales, es difícil observar directamente este tipo de interacciones, mientras que en las rebanadas es posible registrarlas y seguirlas visualmente.

HIPÓTESIS

Dado que en el embrión de pollo entre el séptimo y octavo día de desarrollo *in ovo* ocurren los mayores cambios en la reorganización anatómica y funcional del corazón (septación, desarrollo de fibras de Purkinje y establecimiento del patrón adulto de comportamiento). La reorganización de los patrones de actividad será registrada por fluorocromos sensibles a las fluctuaciones de Ca^{2+} intracelular y que permitirán el estudio en preparaciones *ex vivo* de cambios funcionales relevantes. También se encontrará una respuesta positiva al agonista adrenérgico en esta edad del desarrollo.

OBJETIVO

Esta tesis tiene como objetivo el estudio de la dinámica global de la actividad contráctil de los miocitos cardiacos de rebanadas de corazón embrionario *ex vivo*, mediante el registro de los cambios en la concentración de calcio intracelular ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$).

Objetivos particulares

1. Establecer y adecuar la técnica de obtención de rebanadas de corazón embrionario de pollo (7 días) *ex vivo* en las condiciones de laboratorio de Biofísica de Sistemas Excitables.
2. Caracterizar los patrones espontáneos de señalización de calcio intracelular en rebanadas de corazón embrionario (7 días) *ex vivo*.
3. Caracterizar la respuesta de Ca^{2+} en rebanadas de corazón embrionario de pollo *ex vivo* ante la aplicación de un agonista adrenérgico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los estudios con animales fueron llevados a cabo bajo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Obtención de rebanada de corazón

Se emplearon embriones de pollo de 7 días *in ovo* para la obtención de rebanadas de corazón embrionario. Los animales fueron decapitados, los corazones fueron disectados y reservados en una solución salina Hank's libre de Ca^{2+} y fría que contiene en relación mM: 1.25 NaCl, 0.9 KCl, 3.6 NaHCO_3 , 0.3 Na_2HPO_4 , 0.4 KH_2PO_4 , 0.5 MgCl, 0.4 MgSO_4 , 9.9 Hepes, 2.9 Sacarosa, 10 Glucosa. Los corazones fueron embebidos en agar de alto punto de fusión al 3% (Invitrogen; Carl. Lab. Cal, EUA). Una vez enfriado el agar se obtuvieron las rebanadas con ayuda de un vibratomo (WPI NVSLM1). Los cortes fueron longitudinales y con un grosor de 300 μm , fueron colocados en la solución Hank's libre de Ca^{2+} e incubados una hora a 37° C en una atmósfera 5% CO_2 y 95% O_2 , antes del registro de fluorescencia.

Selección de rebanadas y viabilidad

Observando al microscopio la estructura, se realizó una primera selección de aquellas rebanadas que presentaran tanto los atrios como los ventrículos. Después de transcurrida la incubación de una hora a 37° C en la solución salina libre de Ca^{2+} , se sustituyó esta por una solución Hank's con 2.2 μM de Ca^{2+} se incubó durante aproximadamente 15 minutos a 37° C, después de transcurrido este tiempo se observó al microscopio, se seleccionaron las rebanadas que presentaban actividad contráctil, estas rebanadas fueron incubadas con el sensor sensible a Ca^{2+} y se tomaron como viables aquellas que presentaban variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

Imageneología de calcio en rebanadas de corazón

Para realizar los registros de ΔCa^{2+} , las rebanadas fueron incubadas en la oscuridad a 37 °C con una atmósfera saturada de 5 % CO_2 y 95 % O_2 inmersas en solución Hank's libre de Ca^{2+} con 22 μM del sensor intensiométrico de Ca^{2+} , acetoximetil de Fluo-4 (Fluo-4 AM) (Teflabs; Austin, EUA) en 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St Louis MO, EUA) con 0.5 % de ácido plurónico F-127 (Sigma, St Louis MO, EUA) durante 30 minutos.

Una vez terminada la incubación las rebanadas se lavaron con solución salina y fueron colocadas en la cámara de registro de plexiglás montada directamente sobre la platina del microscopio estereoscópico de epifluorescencia (Leica MZ75). La excitación del indicador sensible a Ca^{2+} se realizó a una longitud de onda de 488 nm mediante una lámpara de mercurio, acoplada a un obturador mecánico (Sutter Instrument Company; Lambda SC). La adquisición de las imágenes de fluorescencia se obtuvo a 510 nm con la ayuda de una cámara CCD (cooled digitad camera) intensificada y enfriada (Princeton Instruments; I-PentaMAX System) y software de adquisición winview. Las secuencias obtenidas constan de 500 imágenes, cada una con 50 ms de exposición y 70 ms de retraso (120 ms/imagen)

Estimulación adrenérgica

Para la caracterización de la respuesta de Ca^{2+} ante la aplicación de un agonista adrenérgico en rebanadas de corazón embrionario se empleó Isoproterenol (ISO);(Sigma, St Louis MO, EUA). Para dicho experimento se tomó un registro basal, posteriormente se aplicó una dosis de 1 μM ISO a través de la perfusión a lo largo de todo el registro (~aprox 1 min), se hizo un lavado con solución Hank's durante 15 minutos para eliminar todo efecto del agonista y se tomó un registro de un minuto después del lavado.

Análisis de resultados

El procesamiento de las secuencias de imágenes para el análisis del cambio de intensidad de fluorescencia se realizó con el programa ImageJ v 1.6.0_20 (National Institute of Health). Se

seleccionaron con ayuda la herramienta Time Series Analyzer V3.2, las regiones de interés (RDI) de las distintas áreas que conforman el corazón; atrio derecho (AD), atrio izquierdo (AI) y ventrículo (V), las RDI independientemente de la zona de selección tuvieron una medida de 10X10 pixeles, una vez seleccionadas las RDI se obtuvieron las variaciones de la intensidad de fluorescencia de cada RDI por cada una de las 500 imágenes con las que cuenta un registro, los datos numéricos generados fueron plasmados en una tabla.

La matriz de datos fue trasladada al programa Igor Pro v6.12 (WaveMetrics) donde se corrigió algebraicamente el ruido generado durante el registro en cada RDI, con la función $F_i - F_0$, donde F_i es la intensidad de fluorescencia en cualquier cuadro de la película y F_0 es la fluorescencia basal (valor más bajo de fluorescencia en un cuadro de toda la película).

Una vez teniendo los datos corregidos se realizaron seguimientos temporales de los $\Delta[Ca^{2+}]_i$ de cada RDI, también se realizó la visualización de todas las RDI del registro y la selección de los trazos representativos. Las rutinas de Igor fueron escritas por el Dr. León Islas y por el ingeniero Pierre Fontaneu. Las gráficas representativas fueron realizadas con el programa Origin 8 (Microcal Software).

Se realizaron periodogramas con ayuda del programa MATLAB v7.5.0.342 R2007b (The MathWorks, Inc., Natick, MA), las rutinas fueron escritas por la Dra. Hortensia González Gómez, dicha rutina permite seleccionar los picos dependiendo del umbral de la derivada de la señal, dicha selección es semiautomática.

RESULTADOS

Se obtuvieron series de 500 imágenes para cada registro de los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ en rebanadas de $300\ \mu\text{m}$ de grosor de corazón embrionario. En la figura 15 se ejemplifica los resultados de un experimento donde se incubó la preparación con el sensor intensiométrico de Ca^{2+} Fluo-4AM, se observa que el indicador de Ca^{2+} logra ser incorporado por toda la rebanada de corazón embrionario de pollo de 7 días *in ovo*. Se muestra también la propagación de la onda de Ca^{2+} a través de cada una de las regiones que conforman el corazón, desde el sitio de inicio en la AD (panel B, AD), hasta completar un ciclo de activación (panel E) y el inicio del siguiente ciclo de activación de nuevo desde la AD (panel H). Esto muestra que logramos obtener rebanadas viables con un registro exitoso de los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ asociados a un ciclo de actividad contráctil del tejido cardiaco.

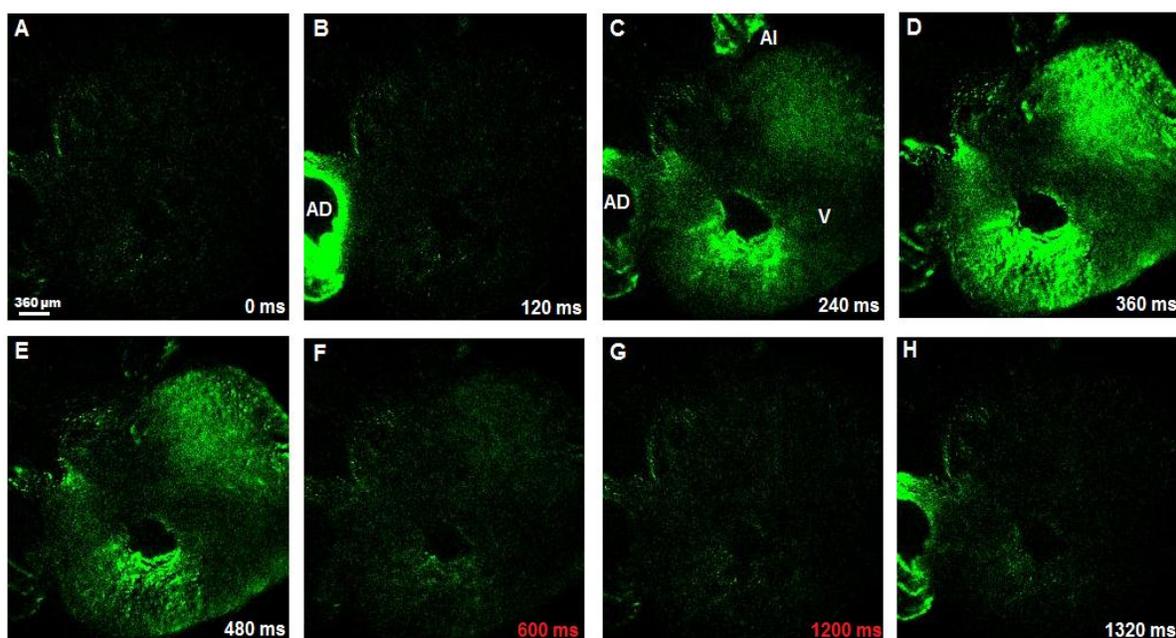


Figura 15. Secuencia de activación revelada por fluorescencia al cambio de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular. Las imágenes corresponden a un corte de $300\ \mu\text{m}$ de espesor de corazón embrionario de pollo con 7 días de desarrollo *in ovo*, cada imagen corresponde a un tiempo de exposición de 50 ms y 70 ms de captura empleando un obturador mecánico sincronizado. A-D Período de activación, (B) la propagación comienza en el atrio derecho (AD), propagándose al atrio izquierdo (AI) y al ventrículo (V). (E) Finalización de un ciclo de activación, (F-G) Tiempo de descanso entre un ciclo de activación y el siguiente ciclo, corresponde a 600 ms, H Inicio del subsecuente ciclo de activación.

Se registraron aproximadamente 48 rebanadas de las cuales 15 no fueron viables (31.3%) y las restantes 33 eran viables (68.7 %). Una vez comprobada la viabilidad de las rebanadas de corazón embrionario se emplearon varios programas para el procesamiento de los registros de los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, así como para su análisis, en la figura 16 se muestran los diferentes tratamientos realizados para el procesamiento de los datos. En 16A se muestra la forma de seleccionar las regiones de interés (RDI), en donde puede verse que se seleccionaron RDI de los distintos componentes del corazón, atrio derecho (AD), atrio izquierdo (AI) y ventrículo (V) siguiendo la propagación de las ondas de fluorescencia.

Las RDI en cada región anatómica son normalizadas respecto al área total de dicha región. En la figura 16B se presenta el rastreo temporal de la actividad de cada RDI: en el eje de las ordenadas se grafican todas las RDI seleccionadas, la gama de colores en la barra al lado de este eje corresponde a la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a), en el eje de las abscisas se presentan los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través del tiempo de cada RDI. En 16C se muestra la gráfica de intervalos inter-espigas o Periodograma, donde en el eje de las ordenadas se grafica el periodo, que corresponde al tiempo que transcurre entre una espiga y la siguiente, siendo el periodo una medida inversa a la frecuencia y en el eje de las abscisas el número de evento que corresponde en el registro. Por último en 16D se puede observar un trazo representativo de la actividad de una RDI, que se encuentra resaltado en (B) por la línea amarilla; se grafica la función $F-F_0$ en función del tiempo.

Este análisis se repitió para las 33 rebanadas que resultaron viables, y se pudo establecer que existen patrones de actividad característicos que pueden ser reflejados diferencialmente por los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ en cada zona. La ocurrencia de los distintos patrones que se encontraron y caracterizaron puede observarse en la figura 21. El de mayor ocurrencia fue un patrón de actividad normal, pues corresponde a la activación descrita para un corazón adulto intacto, esto es un patrón con un ritmo regular, en donde por cada respuesta auricular - región donde se ubica el nodo sinoatrial, y por tanto de iniciación de un ciclo de activación cardiaco-, sigue una activación del ventrículo, con un acoplamiento 1:1, un latido auricular: un latido ventricular. A este tipo de respuesta le nombramos como “patrón típico de activación”, ya que fue el que se encontró en la mayoría de los experimentos realizados (66%).

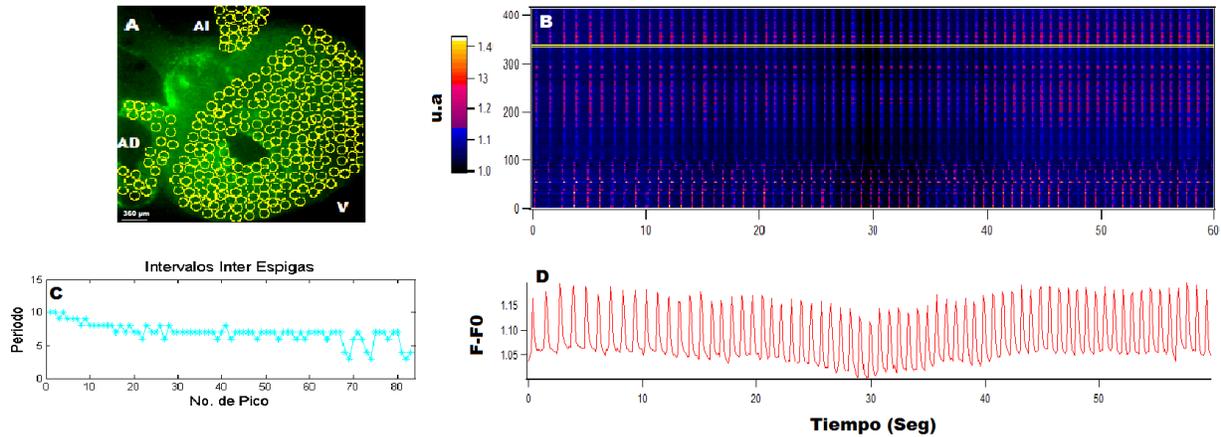


Figura 16. Se ilustran los métodos de análisis utilizados. (A) Las regiones de interés (RDI) son seleccionadas con la ayuda del programa ImageJ, pasando de formato de imagen a numérico estos datos se trasladan al programa IgorPro, (B) donde son normalizados respecto a $(F-F_0)$, generando y superponiendo las series de tiempo de la actividad de cada RDI. (C) Con una rutina de Matlab ad-hoc se generan periodogramas. (D) Se muestra una serie de tiempo representativo, de la actividad de una RDI.

En la figura 17A se observa en otra rebanada el rastreo temporal de los cambios en la fluorescencia debido a los $\Delta[Ca^{2+}]_i$, mostrando claramente que una activación de la zona atrial (At) es seguida por una activación de la zona ventricular, patrón 1:1; también es distinguible una señal de fluorescencia más alta en At, pero sin ser constante esta actividad para una determinada RDI a lo largo del tiempo. Observamos variaciones de esta actividad por zonas y en intensidad, este patrón contrastaba con la zona ventricular, en donde había zonas con una actividad constante y zonas con el mismo comportamiento intermitente de la zona atrial.

En 17B se muestra un trazo representativo de la actividad de dos RDI, una de la zona At y otra de la zona V, en donde se ve claramente el acoplamiento 1:1, pero con diferencias en cuanto a la intensidad de la señal, observamos variaciones de la amplitud, pero no de fase. En C se presenta un periodograma de un patrón típico, en el cual se ejemplifica que el número de eventos durante el registro es el mismo en la zona ventricular y en la zona atrial (aproximadamente 70), mostrando una coherencia 1:1, sin embargo aunque el periodo entre ambas zonas sigue un patrón global similar, este tiene algunas variaciones entre las distintas zonas, mostrando zonas de variabilidad entre atrios y ventrículo, y zonas con un periodo idéntico.

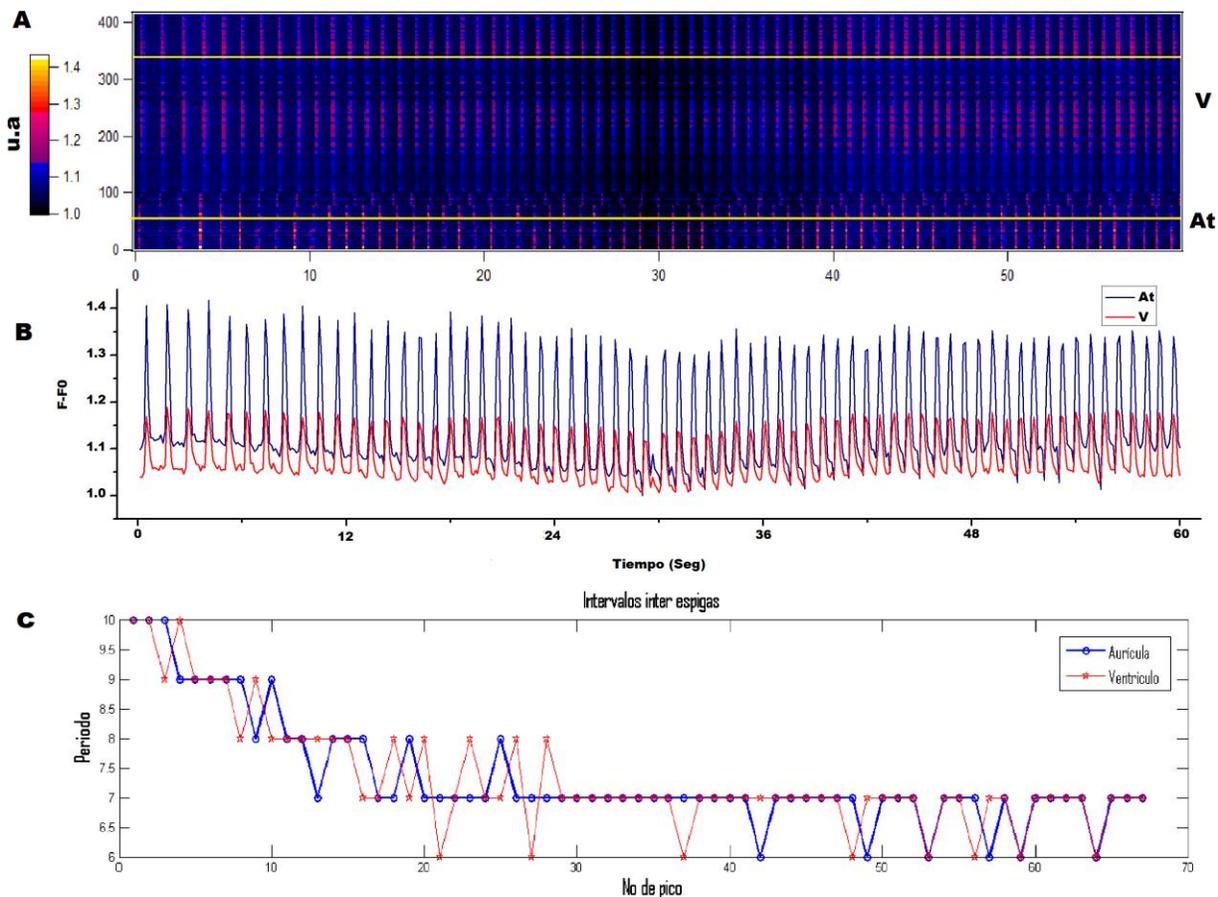


Figura 17. Patrón normal de actividad “típico”. (A) Rastreo ejemplificando un patrón típico; se muestra el atrio (At) con un pequeño desfase con respecto del ventrículo (V). (B) Trazo representativo de la actividad de una RDI en la región atrial a través del tiempo, se observa la relación con respecto de frecuencia con el V. (C) Periodograma en la cual se muestra el mismo número de espigas entre las dos zonas (At y V), con una variabilidad entre algunas zonas y otras con el mismo periodo.

Otro de los patrones encontrados fue un ritmo 2:1, en donde por dos activaciones de la zona atrial, distinguimos una activación ventricular, esta respuesta se puede ver ejemplificada claramente en la figura 20, la cual es una reducción de un registro original, con el motivo de ejemplificar claramente el ritmo 2:1, esta figura corresponde a 200 imágenes o 24 segundos de registro, cabe mencionar que el patrón a lo largo del experimento es el mismo. Este patrón con respecto al patrón “Típico” fue de menor ocurrencia.

En 18A se observa el rastreo temporal de los $\Delta[Ca^{2+}]_i$, donde se ilustra visiblemente que por dos activaciones atriales, son seguidas por una activación ventricular, también es evidente que la duración del evento en cada zona es diferentes, siendo en la zona ventricular la que se presenta

una mayor duración, distinguible por el tiempo de respuesta en la zona ventricular, con respecto a la respuesta en la zona atrial. Se muestra que la zona ventricular presenta una activación justo en el momento en el un flujo de Ca^{2+} en la zona atrial alcanza su nivel mas bajo.

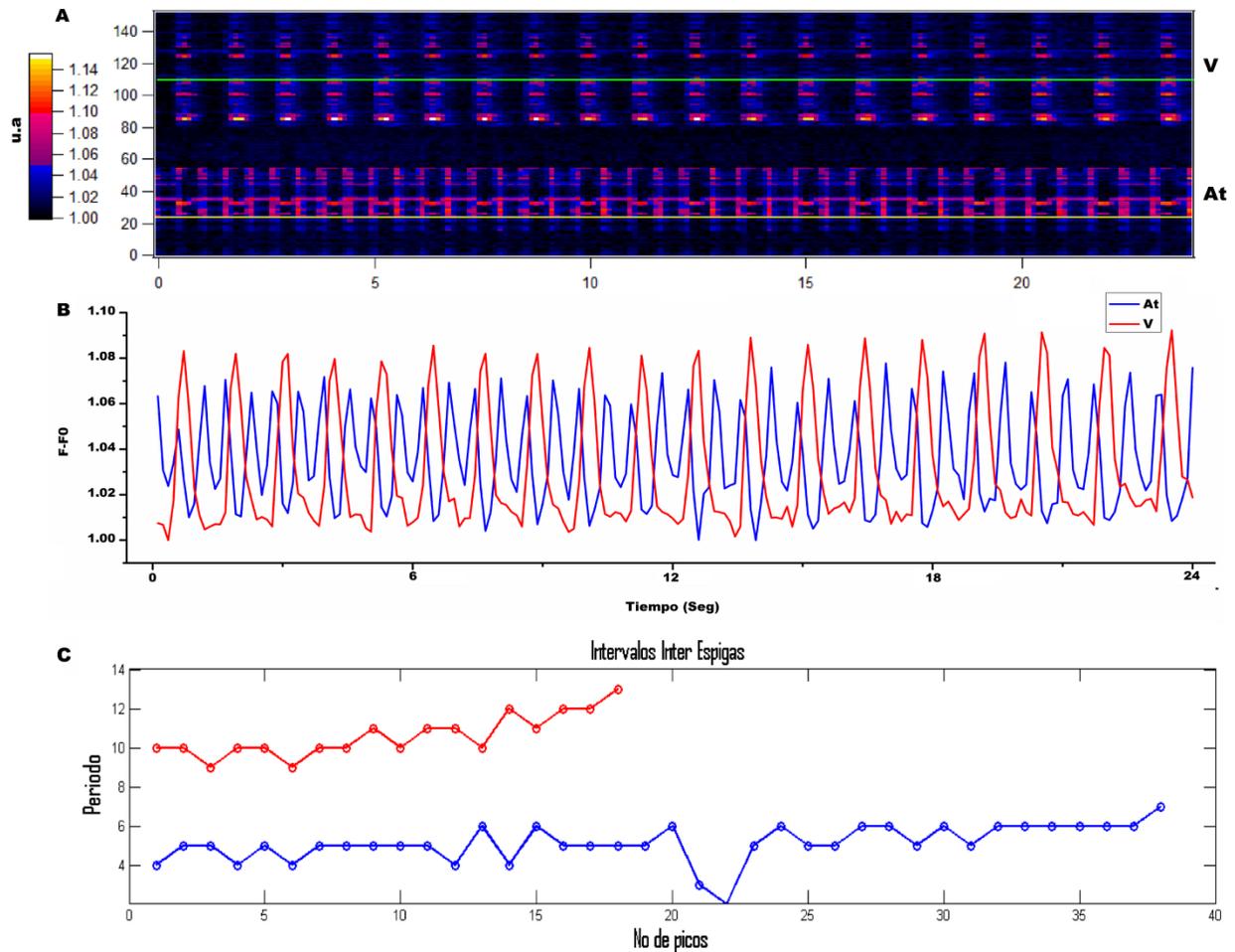


Figura18. Patrón de actividad 2:1. (A) Rastreo temporal ejemplificando un patrón de acoplamiento 2:1; se muestra la actividad atrial (At) con una frecuencia dos veces mayor que la ventricular (V). (B) Serie temporal representativa de la actividad de una RDI en la región atrial (trazo azul) a través del tiempo, se observa claramente la relación 2:1 con respecto al V. (C) Periodograma mostrando la diferencia en el periodo y el número de eventos en cada zona.

En 18B se presenta con mayor claridad el patrón de activación de la zona ventricular con respecto a la respuesta atrial. Para la activación de los atrios se puede observar tanto en A como en B que esta zona presenta sus dos activaciones durante el periodo en el que los ventrículos presentan su nivel más bajo respecto a la movilización de Ca^{2+} . También podemos vislumbrar que las respuestas atriales no siempre son idénticas (trazo azul en B), observemos que las dos activaciones consecutivas del atrio tienen amplitud diferentes, y puesto que la señal de Ca^{2+} varía

en amplitud, puede reflejar diferente contribución de la actividad de las células en cada ciclo. A este patrón intrauricular le llamamos alternancia 2:2. En contraste vemos que en el ventrículo cada pico de Ca^{2+} es acompañado por un descenso de la misma respuesta hasta un nivel mínimo constante antes de la siguiente activación. De manera que tenemos un patrón intratrial y otro atrio-ventricular.

En C se ejemplifican con ayuda de un periodograma las diferencias en cuanto al número de picos que presentan ambas zonas: los atrios presentan 38 picos mientras que los ventrículos presentan 16, y se confirma la existencia del patrón de activación A-V 2:1.

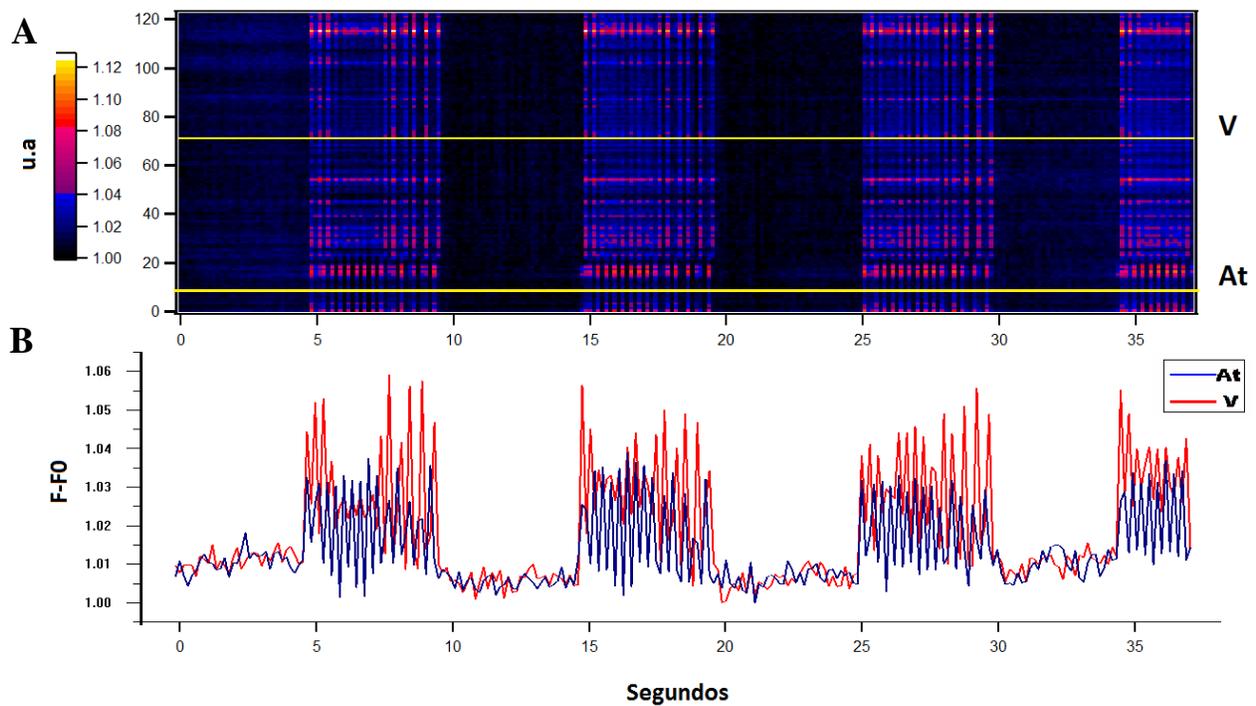


Figura19. Patrón de actividad en “ráfagas”. En (A) Rastreo temporal ejemplificando un patrón de acoplamiento en ráfagas, se percibe una sincronización en la activación de los atrios (At) y de los ventrículos (V), con marcados tiempo de inactividad. (B) Serie temporal representativa de la actividad de una RDI en la región de los At (trazo azul) y de los V (trazo rojo) a través del tiempo.

Encontramos dos patrones más: ráfagas e irregular, pero estos tuvieron una proporción reducida entre todas las rebanadas estudiadas. Con respecto al patrón de ráfagas, fueron sólo 3 los experimentos que presentaron este patrón (Figura 20), ilustramos este patrón en la figura 19. En A se ejemplifica dicho patrón, en él podemos percatarnos de que no obstante la sincronización de

los ventrículos con los atrios: por una activación atrial podemos ver una activación ventricular (acoplamiento 1:1), se presentan episodios intermitente en los que no hay actividad en ninguna de las dos regiones, se mantienen silentes; el tiempo que se mantuvieron sin actividad en los tres registros obtenidos fueron variable, en el ejemplo ilustrado el periodo silente osciló entre 4 a 6 segundos, mientras que las ráfagas tienen una duración cercana a los 5 segundos. En 19B se observa las series de tiempo representativas de una RDI tanto de ventrículos como de atrios, en la cual revelamos la coordinación antes mencionada entre ráfagas y periodos silentes.

El último patrón encontrado fue un patrón irregular, es decir en los tres experimentos encontrados no se podría reconocer un patrón definido como los anteriores, es decir que aunque presentaban actividad, esta no era la misma para los tres casos, en la figura 20 presentamos un ejemplo de dicho patrón, en el cual vemos un desacople de los ventrículos con los atrios, se muestra una diferencia notable en el numero de picos.

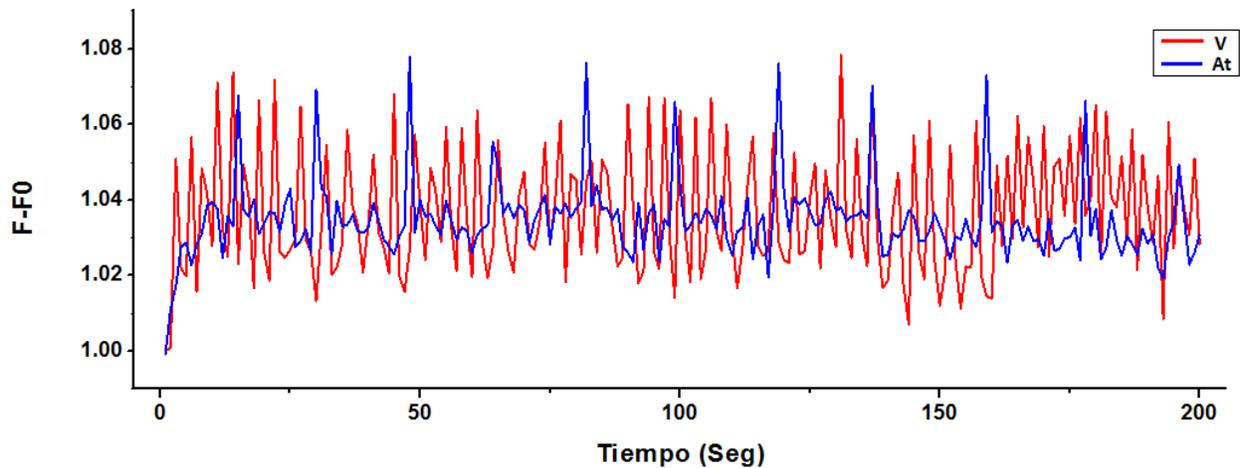


Figura 20 Patrón de actividad irregular. Se puede observa un desacople entre ventrículos y atrios y una marcada diferencias en los picos en amabas zonas.

Resumiendo encontramos una mayor frecuencia del patrón “típico”, 22 rebanadas, contrastando con los 5 casos del ritmo 2:1 y en menor medida los patrones en ráfagas o irregulares, con 3 casos de cada uno, mostrados en la figura 23.

Una vez que se había comprobada que la preparación en la mayoría de los casos presentaba una activación “típica” se probó la respuesta a la estimulación adrenérgica con la aplicación de una dosis de isoproterenol (ISO), a una dosis de $1\mu\text{M}$. En la figura 22 se muestran los resultado

obtenidos. En (A) se muestra el seguimiento de los cambios de intensidad de fluorescencia a lo largo de todo el registro en condiciones basales, esta rebanada presentaba un ritmo intermitente antes de la aplicación del agonista como se puede observar en la figura (B) donde el trazo corresponde a la región ventricular, y muestra un ritmo intermitente, en (C) se observa la aplicación de la dosis de 1 μM de ISO, esta dosis tuvo como efecto la activación clara que se ve en la zona ventricular, así como también el aumento en la frecuencia de esta región. En (D) se presenta el trazo de la misma RDI marcada en (A). Una vez terminada la estimulación y con el lavado de 15 minutos, el registro post-lavado arrojó una disminución del ritmo cardiaco así como el mantenimiento de la activación de la zona ventricular, como se observa en (E y

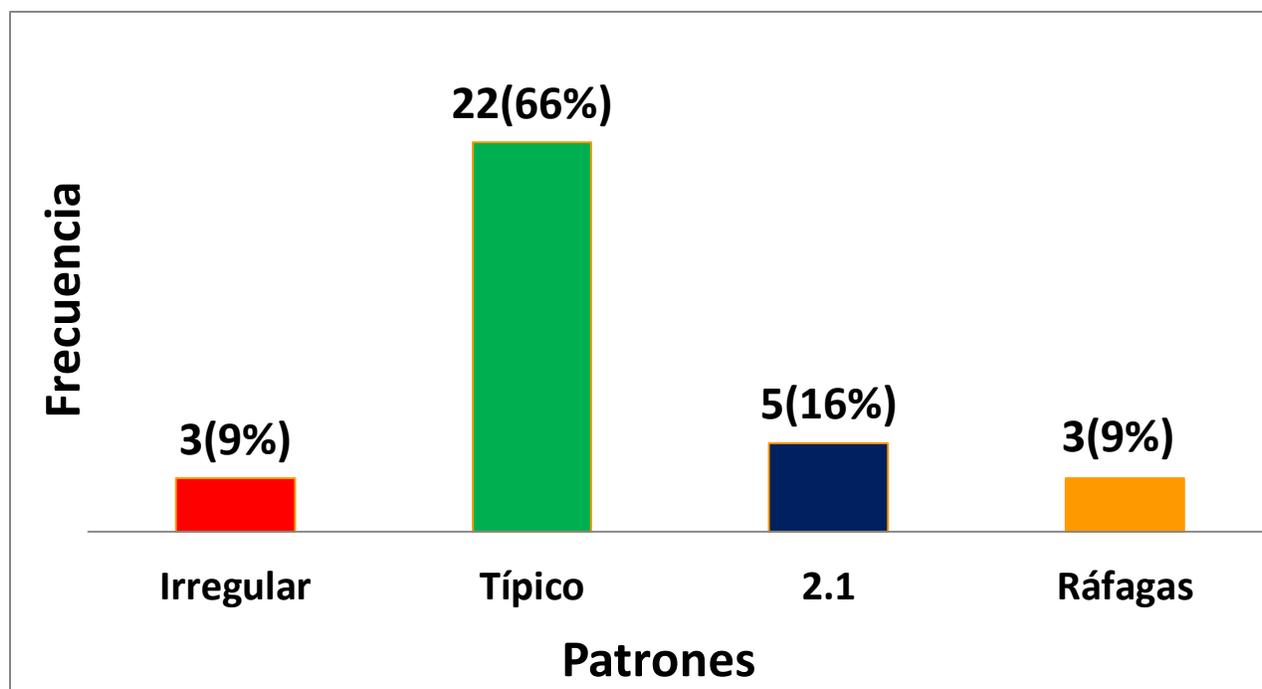


Figura 21. Grafica de la frecuencia absoluta de los distintos patrones de activación. Se muestra la mayor ocurrencia del patrón “típico” sobre el resto de los patrones de activación encontrados

F).

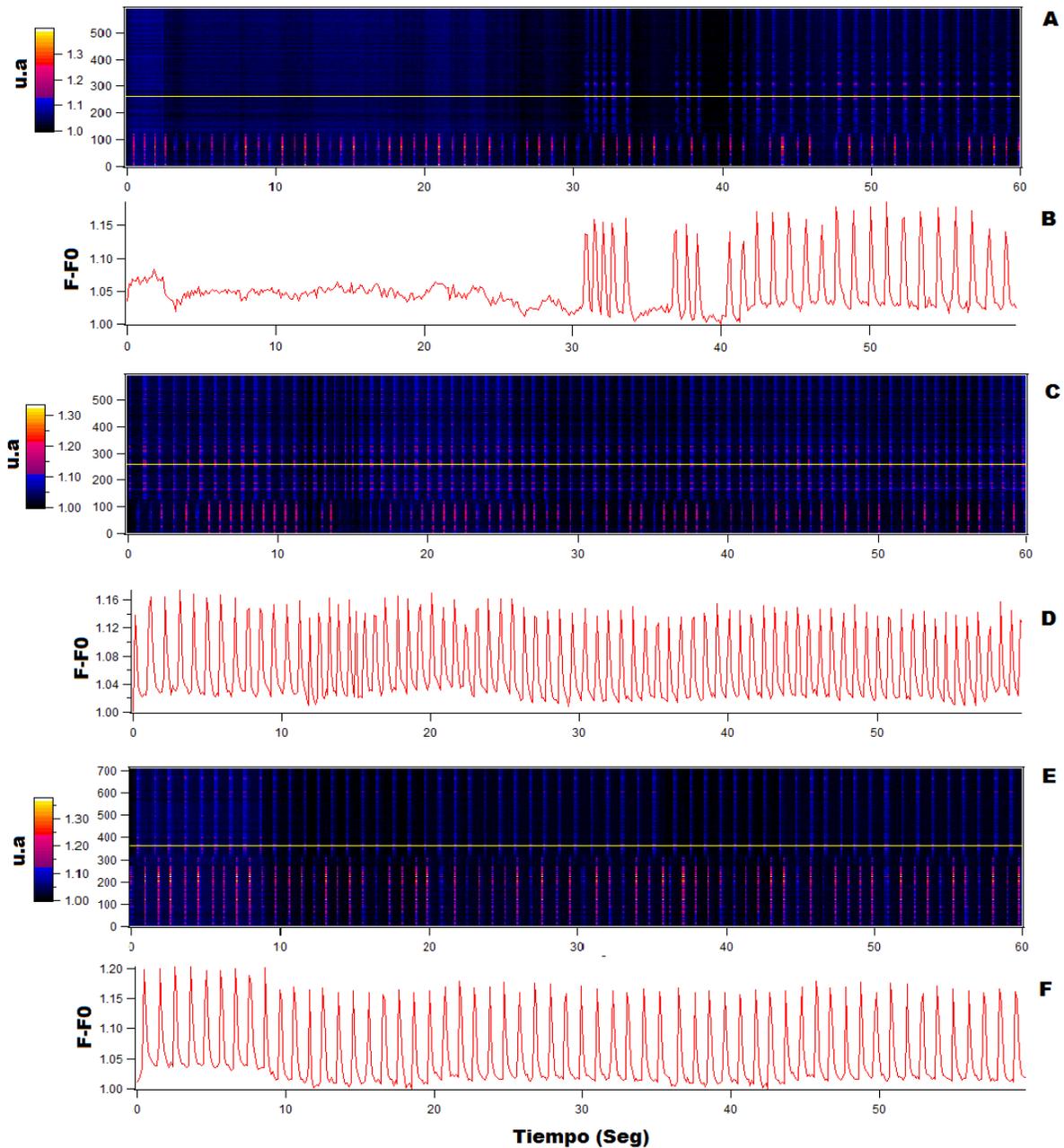


Figura 22. Rastros temporal y grafica representativa de la actividad celular de los $\Delta[Ca^{2+}]_i$, (A,B) Actividad basal; (C,D) Isoproterenol; (E,F) lavado. Se observa un aumento en la frecuencia de los $\Delta[Ca^{2+}]_i$ con la aplicación de ISO.

Para ilustrar de otro modo el efecto del Iso, se realizó un periodograma mostrado en la figura 23, donde se analiza todo el ventrículo y se demuestran los cambios en el periodo y en el número de picos, se presentan 26 picos en el registro basal, contrastando con los 76 observados durante la estimulación adrenérgica y 58 después del lavado. La observación de periodos largos como el

que se muestra en el registro basal se debe a periodos de inactivación, por consiguiente un menor periodo como el mostrado en el trazo de ISO muestra una mayor actividad, es decir un mayor numero de picos.

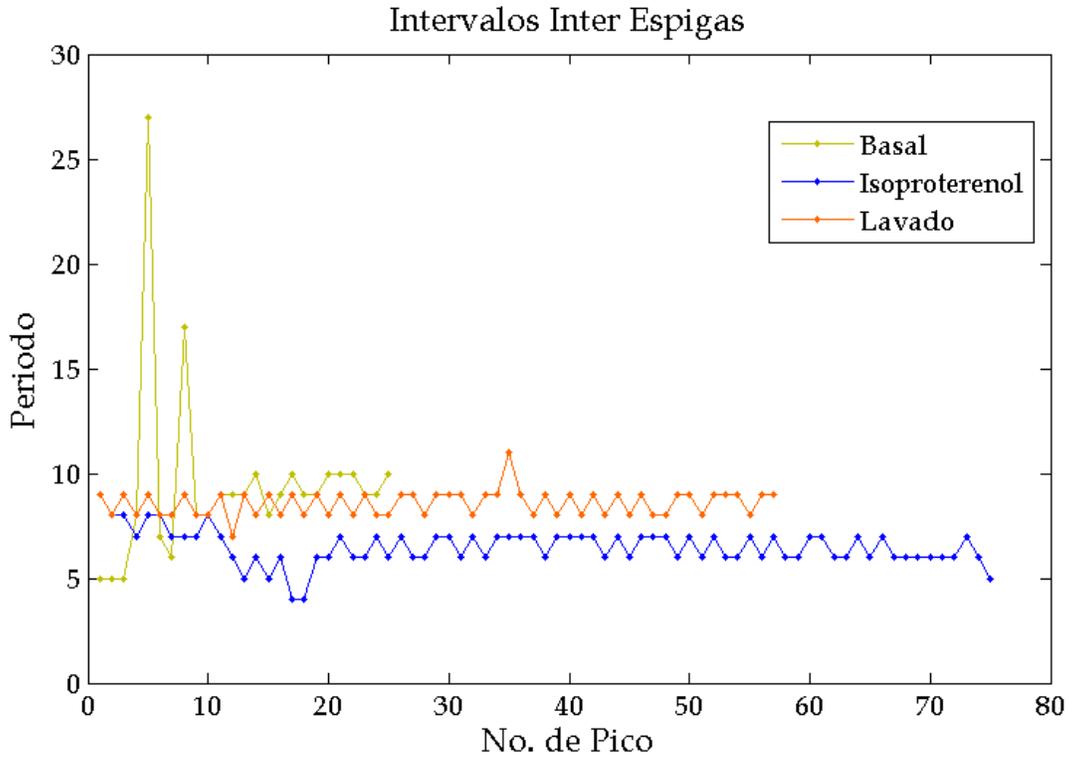


Figura 23. Periodograma mostrando los efectos de la aplicación de 1µm de Iso. Sobre el periodo y el número de picos de la actividad de los $\Delta[Ca^{2+}]_i$, produciendo una disminución del tiempo entre picos y un aumento en la frecuencia de picos en los cardiomiocitos embrionarios de pollo.

DISCUSIÓN

Rebanadas de corazón embrionario de pollo

Estudios previos sobre la viabilidad de las rebanadas de corazón como modelos de estudio de las propiedades, contráctiles y electrofisiológicas del corazón, se habían abordado sólo en rebanadas transversales de ventrículo de rata⁷⁵, más recientemente Pillekamp ha confirmado la viabilidad de la rebanadas transversales ventriculares en murinos embrionarios, neonatales y adultos⁷⁷. Es bien sabido que la fuerza contráctil para el bombeo de la sangre es llevada a cabo por la porción ventricular, sin embargo está influenciada por el ritmo cardiaco que es iniciado y propagado a través del NSA ubicado en la porción atrial. Con el objetivo de estudiar tanto la función atrial como ventricular desarrollamos una novedosa técnica de rebanadas longitudinales de corazón embrionario de pollo de 7 días de desarrollo *in ovo*, la cual nos permite mantener el entorno celular. Al utilizar esta técnica de rebanadas pudimos observar y registrar tanto la parte atrial como ventricular simultáneamente, mediante la movilización de Ca^{2+} .

Estudios de las fluctuaciones de Ca^{2+} por fluorescencia

El ion calcio es fundamental en el proceso del acoplamiento excitación-contracción del corazón, por tal motivo la investigación de los flujos de Ca^{2+} durante el desarrollo ha sido abordado de distintas maneras; sin embargo la dificultad del estudio durante el desarrollo del corazón embrionario a sido frenado tanto por el pequeño tamaño de las células como por el problema para el registro mecánico directo de la contracción por un microelectródos de empalamiento. En 1985 Hirota y colaboradores prueban la incubación de un indicador sensible a voltaje (merocianina-rodamina) en corazones embrionarios de pollo (8-9 somitas) para el análisis óptico de la excitabilidad eléctrica⁷⁹. Recientemente Seki y colaboradores, en cultivos celulares y cardiomiocitos ventriculares aislados fetales y posnatales de rata, utilizaron indicadores sensibles al ion calcio (Fluo 3) para el estudio del desarrollo de los transiente de Ca^{2+} ², validando el uso de este tipo de método para el estudio de las fluctuaciones de Ca^{2+} durante el desarrollo.

Nuestro método se basó en la incubación de rebanadas sagitales de 300 μm de grosor con el indicador sensible a calcio Fluo-4 AM, se comprobó que son capaces de incorporar el fluoróforo a una concentración de 22 μM tanto en atrios como en ventrículos, permitiéndonos observar los flujos de Ca^{2+} y la propagación a través de las distintas regiones de la rebanada (atrios y ventrículos) (Figura 16).

Gracias a este tipo de preparación pudimos registrar ciclos de activación completos como se muestra en la figura 16. Por lo que nuestros datos comprueban que las rebanadas de corazón embrionario además de ser una preparación más integral dado que se preserva su entorno celular, son una preparación viable, pues las fluctuaciones de Ca^{2+} pueden ser registradas en cada una de las regiones de la rebanada y nos dan un indicio de la actividad contráctil de la misma. Estos resultados muestran que la preparación de rebanadas sagitales de corazón embrionario de pollo a los 7 días *in ovo*, es un modelo funcional y viable para el seguimiento de la actividad contráctil por el método del análisis de las fluctuaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, este novedosa preparación con el uso de fluorescencia es presentada por primera vez.

Patrones de actividad contráctil

El método de análisis presentado en la figura 17 nos permitió diferenciar 5 distintos patrones de actividad en las rebanadas sagitales de corazón embrionario de pollo de 7 días de desarrollo *in ovo*.

1. Patrón Básico o típico 1:1, corresponde a una activación auricular asociada a un ventricular, se puede ver en la figura 17
2. Patrón 2:1, por cada dos activaciones auriculares, se produjo una ventricular, figura 18.
3. Patrón en ráfagas concordantes: se registro actividad episódica o intermitente en los atrios, con trenes de actividad rápida o ráfagas, siempre asociadas al mismo patrón en los ventrículos, figura 19.
4. Patrón irregular: encontramos en algunas preparaciones que no había asociación en la actividad de los atrios y de los ventrículos, y que localmente también tenían regímenes de actividad muy irregular.

5. Patrón 2:2. Observamos un patrón local o regional en las atrios, en el cual 2 espigas consecutivas de actividad fueron diferentes entre sí, pero repitiéndose cada 2 ciclos, de ahí su definición como patrones de actividad con ritmo 2:2. Resulta muy interesante que este patrón auricular se vio asociado al patrón global 2:1, reflejando un bloqueo de la propagación entre atrios y ventrículos.

Trabajos previos en cultivos celulares de cardiomiocitos embrionarios de pollo reorganizados, han analizado fenómenos de propagación, pudiendo estudiar la generación de ondas reentrantes y demostrando una variedad de diferentes ritmos pueden seguir de forma espontáneamente o por medio de la estimulación eléctrica ^{3, 68, 69}.

Dentro de los distintos ritmo observamos que la mayoría de las rebanadas analizadas presentaban un patrón típico de activación, esto es una sincronización 1:1, entre la región del marcapaso (atrios) y los ventrículos, este patrón es encontrado también por Yehia y colaboradores, donde han observado que cuando la habilidad de conducir un potencial de acción por parte del musculo ventricular de conejo adulto es suficientemente comprometida, este ritmo 1:1 es perdido y es remplazado por algún nuevo ritmo, como es el bloque wenckebach, bloqueo 2:1, ritmos alternantes, ráfagas o eventos de bloqueo completo ⁸⁰. Posiblemente los diferentes patrones que encontramos fuera del ritmo 1:1 puede estar influenciado por esta habilidad de conducir el potencial de acción.

Recientes estudios en cultivos celulares de cardiomiocitos han resaltado la importancia de las variaciones locales en la geometría del arreglo de las células, especialmente en condiciones de un pobre acople célula-célula. Variaciones en la geometría también pueden actuar para la formación de un evento de bloqueo, reentradas o actividad en ráfagas hasta mejorar la propagación y puede resultar en una dirección preferencial de propagación ⁸¹

También se ha estudiado la génesis y variación de sitios marcapasos, pudiendo ser la razón del patrón auricular 2:2 que nosotros encontramos, ya que la al parecer hay diferente grado de sincronización entre cada respuesta, posiblemente por la variación del sitio marcapasos.

Otra posible causa de la presencia de distintos patrones se puede deber a la edad embrionaria en la cual se trabajó, ya que entre 7-8 días el corazón embrionario sufre cambios estructurales (septación) que lo llevara al patrón adulto de conducción eléctrica⁸², como se muestra en la figura 15. En adición SHP comienza su desarrollo a los 7 días, las fibras de Purkinje periféricas se desarrollan a partir de los 10 días y esta completamente establecidas un día antes de la eclosión⁸², por lo que el sistema de conducción ventricular se encuentra en desarrollo, provocando un distinto patrón de conducción.

En adición, se entiende ahora que esta variabilidad de patrones está mediada por el substrato fisiológico, las condiciones precisas del tejido cardiaco trabajando y la interacción con estímulos o perturbaciones dada por la etapa del desarrollo en que se trabajó en este estudio. Nosotros podemos agregar que estos patrones se observan también durante el desarrollo embrionario y que puede ser explicados entre otros factores por el grado de conectividad alcanzados, el tipo de conexinas que se producen y recambian; así como por la regulación hormonal autócrina, sistemática y finalmente neuronal.

Caracterización de la respuesta de calcio intracelular a la estimulación adrenérgica

Se sabe que la estimulación adrenérgica incrementa el ritmo cardiaco y la fuerza de la contracción en el corazón adulto, por la fosforilación de los canales de calcio tipo-L por PKA, lo que conduce a un incremento en la corriente de Ca^{2+} ⁶¹. También se tiene conocimiento que en mamíferos y aves adultas, las catecolaminas periféricas son producidas primariamente en la medula de la glándula adrenal y ganglios sinápticos⁸³. Sin embargo durante el desarrollo, la modulación de la respuesta puede verse afectada por la presencia de los distintos componentes de la vía de señalización, como son los receptores, la inervación adrenérgica, su capacidad para secretar los agonistas y el desarrollo de glándula adrenal productora de adrenalina.

Se ha discutido sobre el desarrollo y el establecimiento de la inervación adrenérgica. En pollo la inervación adrenérgica de los órganos periféricos comienza durante la segunda semana *in ovo*. (11 a 14 días). Y se ha comprobado que se encuentra completamente establecida después de 7 días post eclosión y es probable que una vez las fibras adrenérgicas se pongan en contacto con el

corazón embrionario de pollo a la tercera semana *in ovo*, se presente un pequeño retraso entre la inervación morfológica y funcional⁸⁴

Nuestros resultados muestran que no obstante la falta de inervación, las rebanadas muestran una respuesta positiva a una concentración de 1 μ M de ISO, reflejada en un aumento del ritmo cardiaco (aproximadamente al doble) durante la exposición, y una vez aplicado el lavado con solución salina disminución de su actividad, indicando todo ello el efecto específico del agonista. Estos resultados son consistentes con los presentados por Higgins, en donde con estudios electromecánicos en ventrículo de pollo, comprueba una pequeña respuesta ISO desde los 4 días y va aumentando con el desarrollo¹. Esta respuesta es posible ya que en embriones de pollo los receptores muscarínicos y adrenérgicos están presentes durante el primer cuarto de la incubación⁶². Además se ha comprobado que la aplicación de ISO a corazones de 7 días de desarrollo *in ovo* intra-anualmente, provoca un incremento en las concentraciones de AMPc lo que conlleva a una activación de la PKA, la fosforilación de canales tipo-L de calcio y el aumento en la concentración de calcio intracelular⁸⁵, demostrando que la maquinaria para una respuesta adrenérgica esta lista antes de la inervación.

Recientes evidencias sugieren que el corazón embrionario de mamífero puede ser una fuente de catecolaminas en etapas tempranas del desarrollo. También, las enzimas biosintéticas de catecolaminas han sido detectadas en el corazón embrionario mucho antes de la inervación simpática o la producción de catecolaminas por parte de las células cromafines adrenales. Por ejemplo la enzima N-metiltransferasa feniletanolamina es expresada en el día embrionario 9.5, mientras que en la glándula adrenal expresa esta enzima en el día 15.5 A 16.5^{62, 83}.

Se sabe también que el corazón embrionario presenta células intrínsecas de catecolaminas (ICA) que están transientemente y progresivamente asociadas con el sistema de conducción cardiaco (NSA, NAV, SHP) del corazón embrionario de rata. En cultivos de cardiomiocitos se ha observado que estas células pueden ayudar a mantener el latido cardiaco y en el desarrollo del corazón embrionario podrían estar contribuyendo a la organización del sistema de conducción cardiaco y un sistema intrínseco de producción de catecolaminas⁵.

CONCLUSIONES

- Se logró montar la técnica de rebanadas de corazón embrionario de pollo de 7 días *in ovo*, así como el registro de la actividad de calcio mediante la incubación con un sensor sensible a calcio.
- Las rebanadas sagitales de corazón embrionario de 7 días de edad son un método viable para el estudio de la actividad contráctil de los miocitos cardiacos y sus patrones característicos, mediante la observación de flujos de calcio con microscopia de fluorescencia.
- La mayoría de las rebanadas presentan un patrón típico de activación es decir una activación atrial por una ventricular.
- Los distintos patrones obtenidos mediante la técnica antes expuesta pueden explicarse por la interacción con estímulos o perturbaciones debidas por la etapa del desarrollo en que se trabajó en este estudio, al grado de conectividad alcanzados, el tipo de conexinas que se producen y recambian; así como por la regulación hormonal autócrina, sistemática y finalmente neuronal.
- El patrón irregular puede deberse a perturbaciones dadas por la misma técnica, es decir, el tipo de corte logrado o por bloqueos en la conducción, y se presentan en menor ocurrencia.
- La respuesta positiva al agonista adrenérgico antes de la inervación posiblemente este relacionada con el sistema intrínseco de secreción de catecolaminas por las ICA, en adición a la presencia de receptores y enzimas capaces de sintetizar y degradar catecolaminas.

REFERENCIAS

1. Higgins, D. & Pappano, A.J. Developmental changes in the sensitivity of the chick embryo ventricle to beta-adrenergic agonist during adrenergic innervation. *Circ Res* **48**, 245-53 (1981).
2. Seki, S. et al. Fetal and postnatal development of Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **58**, 535-48 (2003).
3. Gonzalez, H., Nagai, Y., Bub, G., Glass, L. & Shrier, A. Reentrant waves in a ring of embryonic chick ventricular cells imaged with a Ca²⁺ sensitive dye. *Biosystems* **71**, 71-80 (2003).
4. Pennisi, D.J., Rentschler, S., Gourdie, R.G., Fishman, G.I. & Mikawa, T. Induction and patterning of the cardiac conduction system. *Int J Dev Biol* **46**, 765-75 (2002).
5. Natarajan, A.R., Rong, Q., Katchman, A.N. & Ebert, S.N. Intrinsic cardiac catecholamines help maintain beating activity in neonatal rat cardiomyocyte cultures. *Pediatr Res* **56**, 411-7 (2004).
6. Poelmann, R.E. & Gittenberger-de Groot, A.C. Cardiac development. *ScientificWorldJournal* **8**, 855-8 (2008).
7. Phibbs, B. in *Human Heart, The: A Basic Guide to Heart Disease* 1-6 (Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2007).
8. Causey, W.G. *Sturkie's Avian Physiology* (Academic Press, USA, 1999).
9. Van de Graff, K. *Human Anatomy* (McGraw.Hill, USA, 2001).
10. Netter, F., H. *Atlas of Human Anatomy* (Saunders, USA, 2010).
11. Tresguerres, A.F., Villanúa, B. A. & Barreda, L., A. . in *Anatomía y fisiología del cuerpo humano* (ed. Julia, C.G.A.V.L.) 112-141 (McGrawHill, USA, 2009).
12. Tortora, G.D.D., B. . *Principios de anatomía y fisiología*. (Medica Panamericana, 2006).
13. Sperelakis, N., kurachi, Y., Terzic, A. & Cohen, A. . *Heart Physiology and Pathophysiology*. (Academisc Press, USA, 2001).
14. Brette, F. & Orchard, C. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res* **92**, 1182-92 (2003).
15. Mahony, L. Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart. *Cardiovasc Res* **31 Spec No**, E61-7 (1996).
16. Klugbauer, N., Welling, A., Specht, V., Seisenberger, C. & Hofmann, F. L-type Ca²⁺ channels of the embryonic mouse heart. *Eur J Pharmacol* **447**, 279-84 (2002).
17. Bohn, G. et al. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* **481**, 73-6 (2000).
18. Ono, K. & Iijima, T. Cardiac T-type Ca(2+) channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 65-70 (2010).
19. Mangoni, M.E. & Nargeot, J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* **88**, 919-82 (2008).
20. Philipson, K.D. & Nicoll, D.A. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* **62**, 111-33 (2000).
21. Reppel, M., Reuter, H., Sasse, P., Hescheler, J. & Fleischmann, B.K. NCX current in the murine embryonic heart: development-dependent regulation by Na⁺. *Ann N Y Acad Sci* **1099**, 175-82 (2007).

22. Reuter, H. et al. Cardiac excitation-contraction coupling in the absence of Na⁽⁺⁾ - Ca²⁺ exchange. *Cell Calcium* **34**, 19-26 (2003).
23. Linask, K.K., Han, M.D., Artman, M. & Ludwig, C.A. Sodium-calcium exchanger (NCX-1) and calcium modulation: NCX protein expression patterns and regulation of early heart development. *Dev Dyn* **221**, 249-64 (2001).
24. Michalak, M. & Opas, M. Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends Cell Biol* **19**, 253-9 (2009).
25. Rossi, D., Barone, V., Giacomello, E., Cusimano, V. & Sorrentino, V. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic* **9**, 1044-9 (2008).
26. Laver, D.R. Ca²⁺ stores regulate ryanodine receptor Ca²⁺ release channels via luminal and cytosolic Ca²⁺ sites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 889-96 (2007).
27. MacLennan, D.H., Rice, W.J. & Green, N.M. The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* **272**, 28815-8 (1997).
28. Periasamy, M., Bhupathy, P. & Babu, G.J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* **77**, 265-73 (2008).
29. Eisner, D.A., Choi, H.S., Diaz, M.E., O'Neill, S.C. & Trafford, A.W. Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ Res* **87**, 1087-94 (2000).
30. Mese, G., Richard, G. & White, T.W. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* **127**, 2516-24 (2007).
31. Warner, A., Clements, D.K., Parikh, S., Evans, W.H. & DeHaan, R.L. Specific motifs in the external loops of connexin proteins can determine gap junction formation between chick heart myocytes. *J Physiol* **488** (Pt 3), 721-8 (1995).
32. Jalife, J., Morley, G.E. & Vaidya, D. Connexins and impulse propagation in the mouse heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* **10**, 1649-63 (1999).
33. Jansen, J.A., van Veen, T.A., de Bakker, J.M. & van Rijen, H.V. Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 76-82 (2010).
34. Alberts, B. et al. Biología molecular de la célula (Ediciones Omega, USA, 2010).
35. Rackauskas, M. et al. Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45. *Biophys J* **92**, 1952-65 (2007).
36. Veenstra, R.D. Developmental changes in regulation of embryonic chick heart gap junctions. *J Membr Biol* **119**, 253-65 (1991).
37. DeHaan, R.L. & Chen, Y.H. Development of gap junctions. *Ann N Y Acad Sci* **588**, 164-73 (1990).
38. van Veen, A.A., van Rijen, H.V. & Opthof, T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res* **51**, 217-29 (2001).
39. Gourdie, R.G., Green, C.R., Severs, N.J., Anderson, R.H. & Thompson, R.P. Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart. *Circ Res* **72**, 278-89 (1993).
40. Beyer, E.C. Molecular cloning and developmental expression of two chick embryo gap junction proteins. *J Biol Chem* **265**, 14439-43 (1990).
41. Gros, D. et al. Restricted distribution of connexin40, a gap junctional protein, in mammalian heart. *Circ Res* **74**, 839-51 (1994).
42. Desplantez, T., Dupont, E., Severs, N.J. & Weingart, R. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J Membr Biol* **218**, 13-28 (2007).
43. Gutiérrez Sotelo, O. & Araya Gómez, V. Manual de arritmias cardiacas (UCR, 2000).

44. Mikawa, T. & Hurtado, R. Development of the cardiac conduction system. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 90-100 (2007).
45. Gourdie, R.G. et al. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**, 46-57 (2003).
46. Christoffels, V.M., Smits, G.J., Kispert, A. & Moorman, A.F. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ Res* **106**, 240-54 (2010).
47. Boyett, M.R., Honjo, H. & Kodama, I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* **47**, 658-87 (2000).
48. Ponard, J.G., Kondratyev, A.A. & Kucera, J.P. Mechanisms of intrinsic beating variability in cardiac cell cultures and model pacemaker networks. *Biophys J* **92**, 3734-52 (2007).
49. Moorman, A.F., de Jong, F., Denyn, M.M. & Lamers, W.H. Development of the cardiac conduction system. *Circ Res* **82**, 629-44 (1998).
50. Moorman, A.F. & Christoffels, V.M. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev* **83**, 1223-67 (2003).
51. Chuck, E.T., Freeman, D.M., Watanabe, M. & Rosenbaum, D.S. Changing activation sequence in the embryonic chick heart. Implications for the development of the His-Purkinje system. *Circ Res* **81**, 470-6 (1997).
52. Kleber, A.G. & Rudy, Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev* **84**, 431-88 (2004).
53. de Paula Brotto, M.A. Temporal effects of stress by immobilization and sensitivity of the isolated rat pacemaker to isoproterenol: roles of corticosterone, neuronal uptake, and beta-adrenergic homogeneity. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 1152-8 (2003).
54. Veenstra, R.D. Voltage-dependent gating of gap junction channels in embryonic chick ventricular cell pairs. *Am J Physiol* **258**, C662-72 (1990).
55. Tohse, N. et al. Development of excitation-contraction coupling in cardiomyocytes. *Jpn J Physiol* **54**, 1-6 (2004).
56. Komazaki, S. & Hiruma, T. Development of mechanisms regulating intracellular Ca²⁺ concentration in cardiac muscle cells of early chick embryos. *Dev Biol* **186**, 177-84 (1997).
57. Knollmann, B.C. & Roden, D.M. A genetic framework for improving arrhythmia therapy. *Nature* **451**, 929-36 (2008).
58. Cohen-Gould, L. & Mikawa, T. The fate diversity of mesodermal cells within the heart field during chicken early embryogenesis. *Dev Biol* **177**, 265-73 (1996).
59. Zaffran, S. & Frasch, M. Early signals in cardiac development. *Circ Res* **91**, 457-69 (2002).
60. Jo, S.A., Higgins, D.M. & Berman, H.A. Regulation of acetylcholinesterase in avian heart. Studies on ontogeny and the influence of vagotomy. *Circ Res* **70**, 633-43 (1992).
61. An, R.H. et al. Developmental changes in beta-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺ channels in embryonic mouse heart. *Circ Res* **78**, 371-8 (1996).
62. Crossley, D., 2nd & Altimiras, J. Ontogeny of cholinergic and adrenergic cardiovascular regulation in the domestic chicken (*Gallus gallus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1091-8 (2000).
63. Huang, M.H. et al. Neuroendocrine properties of intrinsic cardiac adrenergic cells in fetal rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H497-503 (2005).
64. An, R. et al. Beta₂-adrenergic receptor overexpression in the developing mouse heart: evidence for targeted modulation of ion channels. *J Physiol* **516** (Pt 1), 19-30 (1999).

65. Furness, J.B., McLean, J.R. & Burnstock, G. Distribution of adrenergic nerves and changes in neuromuscular transmission in the mouse vas deferens during postnatal development. *Dev Biol* **21**, 491-505 (1970).
66. Pappano, A.J. & Loffelholz, K. Ontogenesis of adrenergic and cholinergic neuroeffector transmission in chick embryo heart. *J Pharmacol Exp Ther* **191**, 468-78 (1974).
67. González, H., Nagai, Y., Bub, G., Glass, L. & Shrier, A. Resetting and annihilating reentrant waves in a ring of cardiac tissue: Theory and experiment. *Prog. Theor. Phys. Suppl* **139** (2000).
68. Nagai, Y., Gonzalez, H., Shrier, A. & Glass, L. Paroxysmal starting and stopping of circulating waves in excitable media. *Phys Rev Lett* **84**, 4248-51 (2000).
69. González, H. et al. Actividad rítmica del músculo papilar inducida por estimulación de alta frecuencia: ritmos n:1, formas de transición e histéresis. *Archivos del Instituto de Cardiología*. **74**, 11-24 (2004).
70. de Boer, T.P., Camelliti, P., Ravens, U. & Kohl, P. Myocardial tissue slices: organotypic pseudo-2D models for cardiac research & development. *Future Cardiol* **5**, 425-30 (2009).
71. Parrish, A.R., Gandolfi, A.J. & Brendel, K. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* **57**, 1887-901 (1995).
72. Neri, B., Cini-Neri, G. & D'Alterio, M. Effect of anthracyclines and mitoxantrone on oxygen uptake and ATP intracellular concentration in rat heart slices. *Biochem Biophys Res Commun* **125**, 954-60 (1984).
73. Claycomb, W.C. Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase activity and nicotinamide adenine dinucleotide in differentiating cardiac muscle. *Biochem J* **154**, 387-93 (1976).
74. Han, J., Kim, N., Joo, H. & Kim, E. Ketamine abolishes ischemic preconditioning through inhibition of K(ATP) channels in rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H13-21 (2002).
75. Burnashev, N.A., Edwards, F.A. & Verkhatsky, A.N. Patch-clamp recordings on rat cardiac muscle slices. *Pflugers Arch* **417**, 123-5 (1990).
76. Bursac, N. et al. Cultivation in rotating bioreactors promotes maintenance of cardiac myocyte electrophysiology and molecular properties. *Tissue Eng* **9**, 1243-53 (2003).
77. Pillekamp, F. et al. Neonatal murine heart slices. A robust model to study ventricular isometric contractions. *Cell Physiol Biochem* **20**, 837-46 (2007).
78. Pillekamp, F. et al. Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation. *Cell Physiol Biochem* **16**, 127-32 (2005).
79. Hirota, A., Kamino, K., Komuro, H., Sakai, T. & Yada, T. Optical studies of excitation-contraction coupling in the early embryonic chick heart. *J Physiol* **366**, 89-106 (1985).
80. Yehia, A.R., Jeandupeux, D., Alonso, F. & Guevara, M.R. Hysteresis and bistability in the direct transition from 1:1 to 2:1 rhythm in periodically driven single ventricular cells. *Chaos* **9**, 916-931 (1999).
81. Bub, G., Tateno, K., Shrier, A. & Glass, L. Spontaneous initiation and termination of complex rhythms in cardiac cell culture. *J Cardiovasc Electrophysiol* **14**, S229-36 (2003).
82. Martinsen, B.J. Reference guide to the stages of chick heart embryology. *Dev Dyn* **233**, 1217-37 (2005).
83. Ebert, S.N. & Thompson, R.P. Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res* **88**, 117-24 (2001).

84. Higgins, D. & Pappano, A.J. A histochemical study of the ontogeny of catecholamine-containing axons in the chick embryo heart. *J Mol Cell Cardiol* **11**, 661-8 (1979).
85. Ostadal, B., Krause, E.G., Beyerdorfer, I., Pelouch, V. & Wollenberger, A. Effect of intra-amnial administration of a cardiotoxic dose of isoproterenol on cyclic AMP levels in the chick embryo heart. *J Mol Cell Cardiol* **11**, 1183-7 (1979).