



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

---

**“IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE  
CARDIOMIOCITOS POR LANGENDORFF”**

---

**TESIS**

Para obtener el título de:

**LICENCIADA EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**BAUTISTA RUIZ ANDREA**

**ASESORES**

**L.F. RAÚL SAMPIERI CABRERA**

**DRA. LUISA MARTÍNEZ AGUILAR**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO**

**2017**



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.

**“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino, como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”**

**Albert Einstein.**



# ☀️ AGRADECIMIENTOS ☀️

## ◆ A MIS PADRES

A ustedes les debo más que a cualquier persona, les agradezco con todo mi corazón todo lo que han hecho por mí, en primera que me hayan ayudado, apoyado e impulsado a seguir adelante en cada etapa de mi vida, por no dejarme caer cuando sentía que no podía más, gracias porque siempre están a mi lado, en mis momentos de alegrías y tristezas.

Desde pequeña me han enseñado lo que son los valores y me han guiado por el mejor camino posible, y les estaré siempre agradecida por todas esas reglas y educación que nos han inculcado a mi hermana y a mí, papi nunca terminaré de agradecer todo el esfuerzo y dedicación que llevó y lleva a cabo para sacarnos adelante a ella y a mí, porque aún con ese cansancio que a veces llega a sentir después del trabajo, se toma un momento para sentarse a platicar con nosotras, sin olvidar las veces que se quedó desvelado junto a mí ayudándome en lo que podía, mamita, gracias por ese tremendo esfuerzo que hizo, por aguantar cada uno de mis momentos de mal humor por aquellas interminables desveladas, por aconsejarme, apoyarme y regañarme cuando era necesario, ambos han estado siempre ahí a mi lado, me cuidaban cuando me quedaba dormida en cualquier lado de la casa cuando me ganaba el cansancio, gracias porque ambos siempre estuvieron al pendiente de mí, jamás me faltó una palabra de aliento. Jamás olvidaré aquella vez que llorando les dije que ya no podía más con tanto cansancio y ustedes me impulsaron para que siguiera y hoy estoy aquí teniendo un triunfo más, subiendo un peldaño.

Hoy estoy aquí, gracias a ese esfuerzo que hicieron junto a mí, el cansancio fue compartido, porque cada mañana se levantaban temprano para no dejar a su nena sin su lunch para ir a la escuela, pequeños detalles como ese, son los que me llenan la vida. Este esfuerzo es de los 3, porque hicimos un equipo y hoy puedo decir que estoy muy agradecida y orgullosa de tener unos padres tan únicos y extraordinarios como ustedes, quienes siempre dan todo por mí, y hacen todo por

mantenerme de pie, son ese pilar que me sostiene y no me deja caer en ningún momento, éste es el comienzo de algo nuevo, que sin duda será igual o mejor, pero siempre de la mano de ustedes.

LOS AMO INFINITAMENTE <3

### ◆ A MI HERMANA

Hermana, la mejor de todas, nunca dejaré de decirlo, gracias por enseñarme o mejor dicho darme las bases de lo que es la responsabilidad, te admiro porque siempre estás luchando y saliendo adelante de cada momento. Gracias por los regaños y los consejos que me brindaste, cada uno de ellos los tomé de la mejor manera, de ti siempre eh aprendido que debo confiar en mí misma, y no dejar que nada ni nadie me haga sentir menos. Gracias por estar siempre pendiente de mí, por aquellos momentos de pláticas y risas, si bien hemos tenido algunas peleas o diferencias, pero siempre procurando arreglar las cosas de la mejor manera, y no por ello eh dejado de quererte ni de darte las gracias por el apoyo incondicional que me brindas. Estoy muy orgullosa de ti. Te quiero mucho.

### ◆ A MI ABUELITO "PAPITO"

Papito de mi vida, el mejor abuelito, gracias papito, porque desde pequeña ah estado conmigo compartiendo muchos momentos importantes, gracias por sus consejos y esas bonitas palabras que siempre me dice, por cada momento de alegría y risas interminables, es y siempre será uno de mis mayores motores para seguir adelante porque sé que confía en mí. Sin duda alguna es mi ejemplo a seguir para salir adelante ante cualquier circunstancia, me ah enseñado a ser una persona honesta y humilde con los demás. Ah sido parte importante en este camino, es por eso que ésta triunfo también es por usted y para usted. Lo amo papito.

## ◆ A MI CHAPARRITO (Juanito)

Existe una palabra en alemán “Lebenslangerschicksalsschatz” cuya traducción más aproximada sería “tesoro permanente del destino”, que es ese algo que no se desarrolla con el tiempo, es algo que ocurre instantáneamente, pasa a través de ti como el agua de un río después de una tormenta, te llena y vacía, todo al mismo tiempo, lo sientes por todo tu cuerpo, en tus manos, en tu corazón, en el estómago, en la piel.... Todo eso y más siento por ti, porque eres esa persona por la que vale la pena pelear muchas batallas. Estoy muy agradecida contigo y con la vida por permitirme estar a tu lado, simplemente llegaste a formar parte importante en mi vida, siempre me has impulsado a seguir adelante y apoyado incondicionalmente. Eres mi amigo, mi novio y compañero, quien estuvo para calmarme cuando sentía que ya no podía con tanto estrés. Gracias por estar conmigo en todo momento, por esas palabras tan exactas que necesitaba en determinados momentos, por esas risas incontables, la paciencia y comprensión que siempre me dedicaste y me sigues dedicando, que decir de tu hermosa compañía al volver a casa y que decir de las tantas veces que nos quedamos dormidos en el transporte, por esas veces que lloraste conmigo y sobre todo por cuidarme siempre. Te amo infinitamente corazón, eres una persona increíble, única, y maravillosa, sin duda alguna soy muy afortunada por tenerte a mi lado, eres ese feliz paréntesis de la aventura más asombrosa de mi vida.

<3 Je t'aime trop ma vie <3

## ◆ A MIS MEJOR AMIGA

Verito, amiga, en serio mil gracias por estar siempre ahí para mi, sin duda alguna has sido parte importante en este camino, has estado en las buenas y malas, apoyándome y brindándome tu valiosa amistad, después de más de 10 años sigues siendo esa amiga incondicional, porque a pesar de no vernos, sé que cuando te necesite estarás ahí sin pensarlo 2 veces, contigo eh pasado momentos increíbles, tenemos aventuras que contarnos, aprendimos, aprendemos y sé que seguiremos aprendiendo muchas cosas juntas. Gracias por apoyarme e

impulsarme a seguir adelante, ahora las 2 estamos empezando una nueva etapa, que estoy segura seguiremos compartiendo. Te quiero muchísimo.

◆ **A MIS AMIGUIS (VICKY, DANI, MIMI, MALU, JUANELO, BRENDITA, MARI Y LALITO)**

Amiguísimos, a cada uno de ustedes les agradezco muchas cosas, a su lado aprendí, y disfrute de varias momentos increíbles y únicos, hemos disfrutado de muchas aventuras juntos, tanto buenas como malas. Les agradezco esas palabras que siempre nos brindamos para seguir adelante, y cuando una se iba para abajo, estábamos las demás para levantarnos. Soy muy afortunada por haberlos encontrado en este largo camino, sin duda alguna no pude haber tenido mejores compañeros para esas noches interminables de desvelo de mil cosas por hacer y cómo olvidar aquellas pequeñas diferencias que llegamos a tener pero que al final nos llevaron a mejorar las cosas. En verdad amigos que les agradezco haber seguido conmigo cuando las cosas se veían difíciles, por darme la fuerza y llegar hasta aquí. Los quiero y espero que esta amistad dure muchos años más.

◆ **A LA DRA. LUIÑA**

Le agradezco su apoyo y su confianza, gracias por haberme brindado la oportunidad no solo en este proyecto, si no desde que comencé mi servicio social. Gracias por estar al pendiente de cómo iba en la escuela y animarme en los momentos indicados, por su paciencia y motivación para que sacara adelante la tesis. Gracias por transmitirme sus conocimientos, y por todos esos detalles que me brindó sin importar la fecha. Sin duda alguna es una persona llena de virtudes y sé que tendrá muchos más proyectos que tendrán los mejores reconocimientos. Muchas gracias Dra.

◆ **A RAULITO**

El mejo coasesor que pude tener, te debo muchas cosas, pero sobre todo la inmensa paciencia que tuviste conmigo, por esas palabras que me animaron siempre para no detenerme y lograr llegar hasta aquí, por tus asesorías y apoyo.

Gracias por compartir tus conocimientos y darme la oportunidad de conocerte un poco más, eres una persona excelente, lleno de muchas virtudes, te mereces lo mejor y sé que llegarás muy lejos.

### ◆ A LA PROFESORA MARU

A quien le debo muchísimas cosas, no me alcanzan las palabras para agradecer lo mucho que me apoyo en este trayecto, a usted le debo mucho de que ahora esté dando este último paso. En la vida hay momentos difíciles y gracias a sus bonitas palabras que siempre me brindó para no dejarme caer y animarme a seguir adelante es que pude culminar éste camino, usted siempre me ayudo a buscar alternativas para poder llegar. Gracias por brindarme sus conocimientos no solo como profesora si no como persona, sin duda alguna tiene un corazón enorme, de usted eh aprendido mucho, a ser una persona entregada y a amar lo que hago. Mi más grande admiración y estimación hacia usted. La quiero mucho.

### ◆ AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO A:

- PIAPIC – 1645 Fes Cuautitlán UNAM
- PIAPIME – 2.11.02.16
- PAPIIT 212213 – DGapa UNAM



# ÍNDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	1
<i>1. OBJETIVO GENERAL</i> .....	2
1.1 Objetivos particulares .....	2
<i>2. HIPÓTESIS</i> .....	2
<i>3. MARCO TEÓRICO</i> .....	2
3.1 El sistema cardiovascular .....	2
3.2 Anatomía del corazón .....	3
3.2.1. Localización .....	4
3.2.2 Cavidades internas .....	5
3.2.3 Venas y arterias .....	10
3.3 Histología del corazón .....	13
3.3.1 Pared cardíaca.....	13
3.3.2 Músculo cardíaco.....	14
3.4 Fisiología del corazón .....	15
3.4.1. Sistema de conducción cardíaco .....	16
3.4.2. Potencial de acción .....	17
3.4.3 Ciclo cardíaco .....	19
3.4.4 Gasto cardíaco .....	21
3.5 Aislamiento de células .....	22
3.5.1 Técnicas de aislamiento celular .....	22
3.5.2 Ventajas y desventajas del aislamiento celular vs cultivo celular .....	26
3.6. Técnica de Langendorff para el aislamiento de cardiomiocitos .....	29
3.6.1. Aparato de Langendorff .....	31
3.6.2. Usos del aparato de Langendorff.....	32
<i>4. DISEÑO EXPERIMENTAL</i> .....	33
4.1. Equipo y material .....	33
4.2. Preparación de las soluciones .....	34
4.3. Preparación del equipo de Langendorff.....	36
4.4. Aislamiento de cardiomiocitos por Langendorff .....	37

4.5. Conteo de % de cardiomiocitos .....	40
<b>5. RESULTADOS</b> .....	41
5.1. Densidad celular .....	41
5.2. Viabilidad celular .....	45
5.3 Descripción morfológica .....	46
<b>6. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	47
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1. Resultados del conteo de las células totales por cuadrante. Solución Tyrode.

Tabla No. 2. Resultados del conteo de las células totales por cuadrante. Solución Krebs

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema circulatorio completo

Figura 2. Esquema del corazón

Figura 3. Localización del corazón

Figura 4. Esquema de las cavidades del corazón

Figura 5. Aurícula derecha

Figura 6. Aurícula izquierda

Figura 7. Ventrículo derecho

Figura 8. Ventrículo izquierdo

Figura 9. Venas del corazón

Figura 10 Arterias del corazón

Figura 11. Esquema de la pared del corazón

Figura 12. Músculo cardíaco

Figura 13. Sistema de conducción eléctrico

Figura 14. Potencial de acción

Figura 15. Ciclo cardíaco

Figura 16. Centrifugación

Figura 17. Equipo de separación de células por fluorescencia

Figura 18. Técnica de microdisección para aislar células a partir de secciones o tejidos

Figura 19. Cultivo primario

Figura 20. Aparato de Langendorff

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de los tipos de células localizadas con solución Tyrode.

Gráfica 2. Porcentaje de los tipos de células localizadas con solución Krebs.

Gráfica 3. Porcentaje de efectividad de la obtención de miocitos con las diferentes soluciones.

## ABREVIATURAS

ECG.....Electrocardiograma

SA.....Sinoauricular

AV.....Auriculoventricular

NS.....Nódulo sinoauricular

NAV.....Nódulo auriculoventricular

HH.....Haz de His

## INTRODUCCIÓN

El infarto agudo de miocardio, conocido también como ataque al corazón, es la necrosis o muerte de una porción del músculo cardíaco que se produce cuando se obstruye completamente el flujo sanguíneo en una de las arterias coronarias<sup>[1]</sup> La enfermedad isquémica del miocardio y sus complicaciones causan el mayor número de muertes en México principalmente en mujeres esto según las estadísticas del INEGI <sup>[2]</sup>. Es un trastorno ocasionado por factores múltiples, y las investigaciones epidemiológicas han identificado siete causas principales: edad, sexo masculino, antecedentes familiares, tabaquismo, hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes mellitus. <sup>[3]</sup>.

Las complicaciones de la aterosclerosis son la primera causa de muerte en México y en el mundo en general. La cardiopatía aterosclerosa, en particular su manifestación en forma de infarto de miocardio, es la que tiene mayor relevancia por su impacto en la salud pública. México sufre también los cambios epidemiológicos actuales; las enfermedades cardiovasculares son, en su conjunto, la primera causa de muerte en nuestro país. <sup>[4]</sup>

Los sistemas de salud, al igual que el resto de la sociedad, actualmente se encuentran inmersos en la dinámica de la economía de la salud, por lo tanto la escasez de los recursos, el alto costo de la atención y el presupuesto asignado a la salud adquieren relevancia. <sup>[5]</sup>

Para poder confrontar de manera directa y eficaz este grave problema de salud pública, se requiere de la realización de trabajos de investigación con el fin de desarrollar nuevos y mejores medicamentos con menores reacciones adversas y cuyo efecto sea mayor. Para lograr estas metas es necesaria la implementación de estrategias experimentales que permitan el estudio de las propiedades biofísicas celulares, es por esto que se lleva a cabo la realización del aislamiento de miocitos por la técnica de Langendorff, al implementar esta técnica se lleva a cabo la experimentación con órganos aislados, obteniendo el aislamiento de miocitos.

Importantes ventajas se derivan de este modelo tales como su reproducibilidad y bajo costo, así como la posibilidad de estudiar el corazón en ausencia de factores reguladores extrínsecos y la facilidad para realizar estudios de isquemia y reperfusión. <sup>[6]</sup>

## OBJETIVO GENERAL

Realizar el aislamiento de cardiomiocitos en corazones sanos mediante el uso del aparato de Langendorff, para estandarizar la técnica en el laboratorio de Farmacología del Miocardio que servirá para el desarrollo de estudios celulares, moleculares y biofísicos de los cardiomiocitos.

### 1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar el montaje del corazón una vez que fue extraído de la rata, en el aparato de Langendorff y llevar a cabo la comparación de las soluciones fisiológicas Tyrode y Krebs.
2. Efectuar el aislamiento de cardiomiocitos del corazón para posteriormente efectuar el conteo de ellos, para conocer la eficacia de las soluciones fisiológicas.

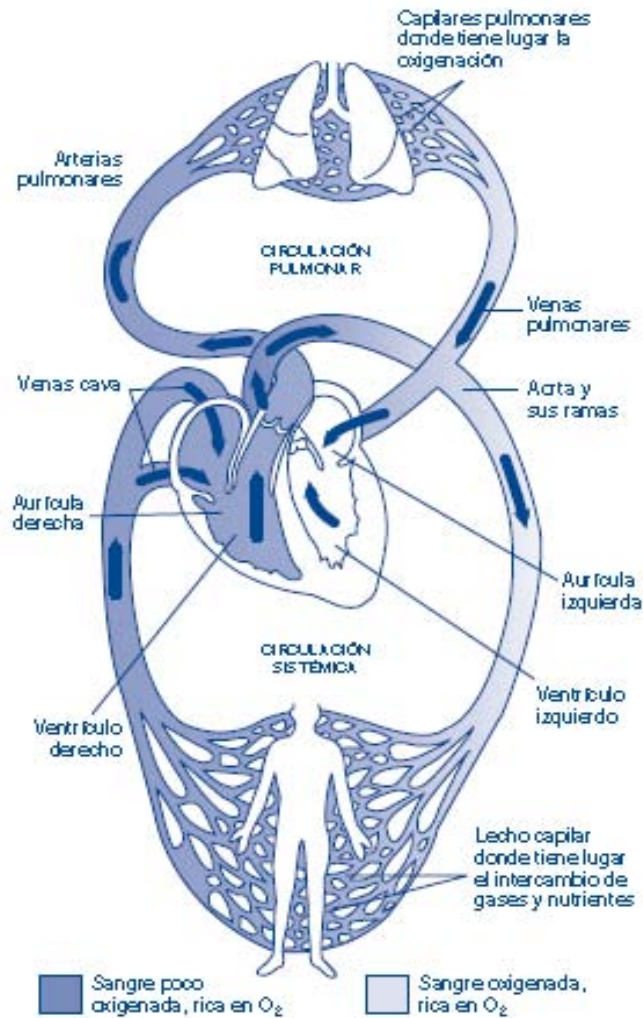
## 2. HIPÓTESIS

La solución Tyrode es la que permite el aislamiento de cardiomiocitos por el aparato de Langendorff, la cual nos permite obtener un porcentaje elevado de cardiomiocitos con aspecto morfológico adecuado para estudios posteriores.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

El sistema cardiovascular comprende el corazón y los vasos sanguíneos (arterias y venas) que conducen la sangre de ida y vuelta a los distintos tejidos y órganos del cuerpo. Aunque parezca un órgano único, el corazón es funcionalmente una bomba muscular donde cuyas dos partes se hayan vinculadas por la circulación pulmonar.<sup>[7]</sup> Está formado por un órgano central, el corazón, y un sistema de conductos vasculares de diferente estructura que se ramifican por todo el organismo: las arterias, venas, capilares y vasos linfáticos. Para realizar un circuito completo, la sangre pasa dos veces por el corazón, una por las cavidades derechas y otra por las cavidades izquierdas (Figura 1).<sup>[8]</sup>



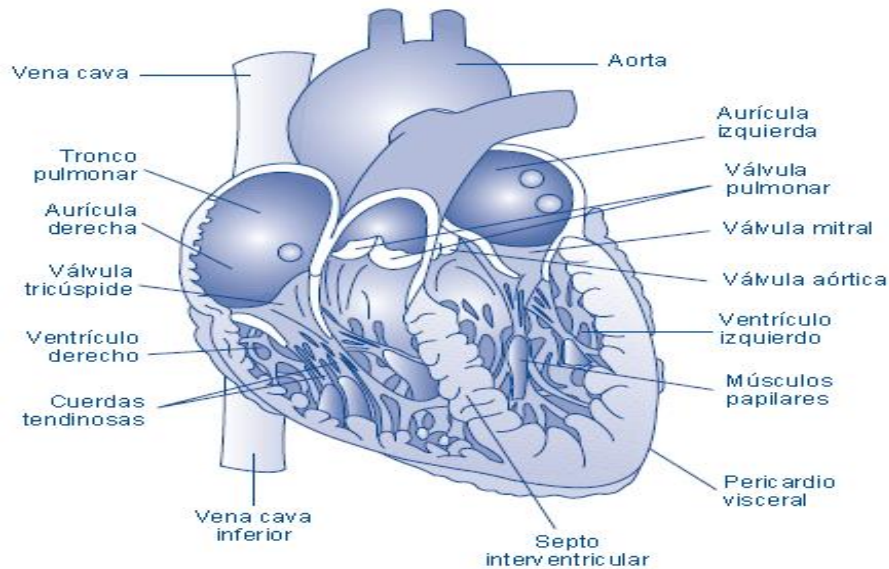
**Figura 1. Esquema del sistema circulatorio completo.** Representa las cavidades del corazón y circuitos vasculares, se puede observar la circulación pulmonar y la sistémica.

[TRESGUERRES, 2009]

### 3.2 ANATOMÍA DEL CORAZÓN

El corazón (término de un derivado popular del latín cor, cordis) en anatomía, es el órgano principal del sistema circulatorio. Es una estructura cónica relativamente pequeña, de tamaño casi igual a la de un puño de una persona: unos 12 cm de longitud, 9 cm de anchura y 6 cm de grosor. Su masa promedio 200 y 300 g en adultos. <sup>[9]</sup>

Pesa alrededor de 275 gramos en el hombre y algo menos en la mujer. Consta de cuatro cavidades, dos posterosuperiores, las aurículas o atrios, derecha e izquierda, y dos anteroinferiores, los ventrículos derechos e izquierdo (Figura. 2). [8]



**Figura 2. Anatomía del corazón.** Esquema donde pueden observarse sus cavidades así como las válvulas y venas más importantes de las que se compone. [TRESGUERRES, 2009]

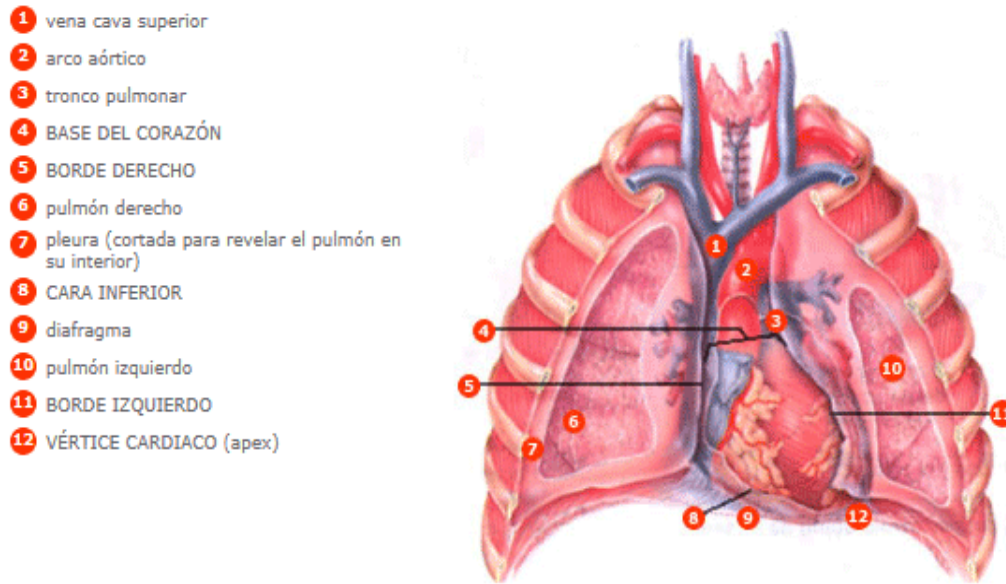
### 3.2.1 LOCALIZACIÓN DEL CORAZÓN

Se localiza en el plano superior intermedio al diafragma cerca de la línea media del tórax en el mediastino (masa de tejidos que se sitúa entre el esternón y la columna vertebral). [9]

El corazón descansa sobre el diafragma, músculo que separa las cavidades torácica y abdominal. Se encuentra dentro de una bolsa denominada pericardio. La bolsa pericárdica tiene dos hojas: una interna sobre la superficie cardiaca y otra externa que está fijada a los grandes vasos que salen del corazón. Entre ambas hojas existe una escasa cantidad de líquido para evitar su roce cuando late. [10]

La cara anterior está situada en plano apenas profunda al esternón y las costillas. La cara inferior es la porción de la víscera que se apoya en su mayor parte contra el diafragma, entre el vértice y el borde derecho. El borde derecho está frente al pulmón ipsolateral y se

extiende entre la cara inferior y la base, y el borde izquierdo o pulmonar mira hacia el pulmón izquierdo, entre la base y la vértice. (Figura 3). [9]

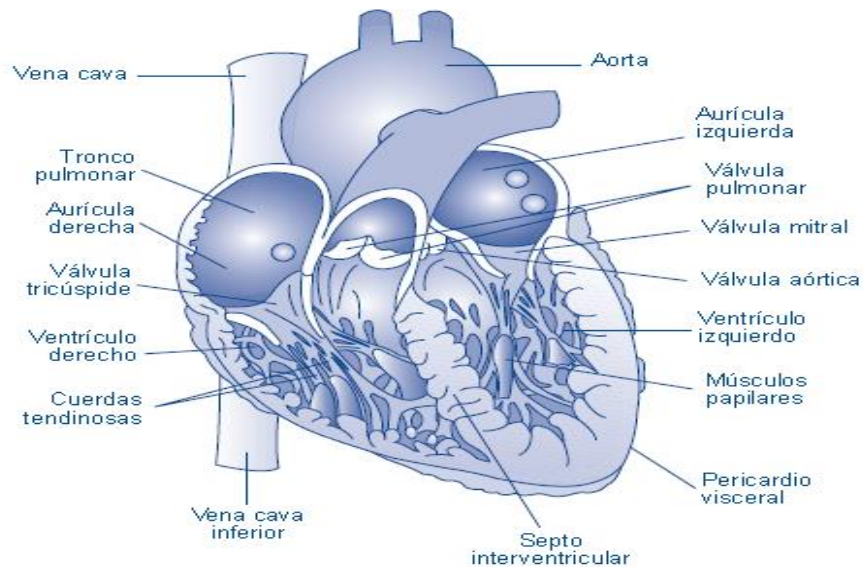


**Figura 3. Localización del corazón.** Esquema donde se aprecia el espacio o ubicación en el cuerpo humano en el que se encuentra el corazón. [TORTORA, 2006]

### 3.2.2 CAVIDADES

El corazón está dividido en mitades derecha e izquierda por una pared de tejido, o *tabique*, que recorre toda su longitud. Cada mitad se subdivide en dos cámaras. Las cámaras superiores de ambos lados reciben el nombre de *aurículas* o *astrios* (vestíbulo de entrada); y las cámaras inferiores, las mayores, se llaman *ventrículos* (vientre o cavidad). En la superficie anterior de cada aurícula se observa una estructura arrugada a manera de bolsa, la *orejuela*, llamada así por su parecido con la oreja de un perro (Figura 4). [9]





**Figura 4. Cavidades del corazón.** Se pueden apreciar las diferentes cavidades, tanto del lado derecho como del izquierdo. [TRESGUERRES, 2009]

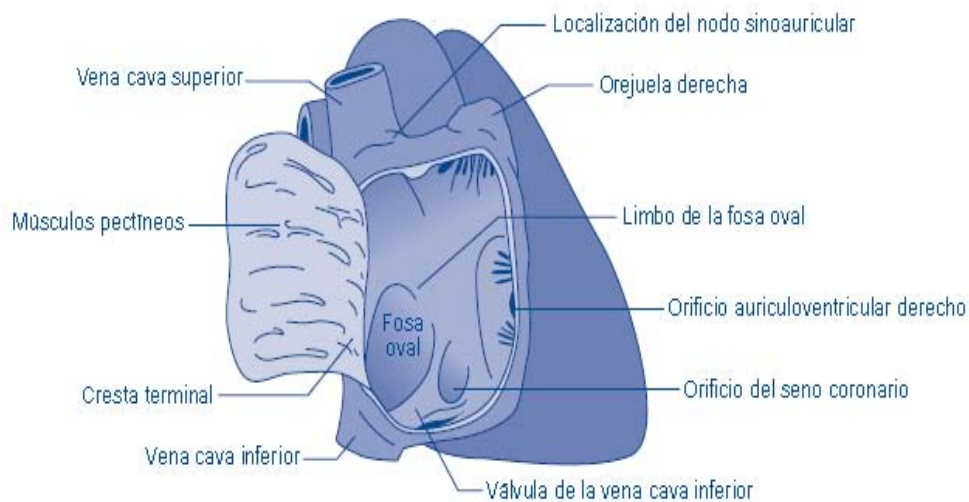
○ *Aurículas*

Son las cavidades que reciben la sangre que llega al corazón y la envían al ventrículo correspondiente a través de un orificio auriculoventricular. Sus paredes son delgadas y elásticas, su interior es liso salvo en algunas zonas que presentan pequeñas columnas musculares llamadas músculos pectíneos. El tabique interauricular separa ambas aurículas, se sitúa oblicuamente, de modo que la aurícula derecha ocupa una posición más anterior que la aurícula izquierda. [8]

- *Aurícula derecha*

Recibe la sangre venosa procedente de todo el cuerpo. Está formada por una cavidad principal y un divertículo, la orejuela, que se prolonga hacia delante. La pared interna de la aurícula es lisa en su parte posterior, el seno venoso, donde desembocan las venas cavas, y rugosa en su parte anterior debido a la presencia de músculos pectíneos. El límite entre ambas zonas lo marca un reborde muscular llamado cresta terminal (Figura 6). En la aurícula derecha se abren los orificios de las venas cavas superior e inferior, del seno coronario y de las venas cardiacas mínimas. [8]

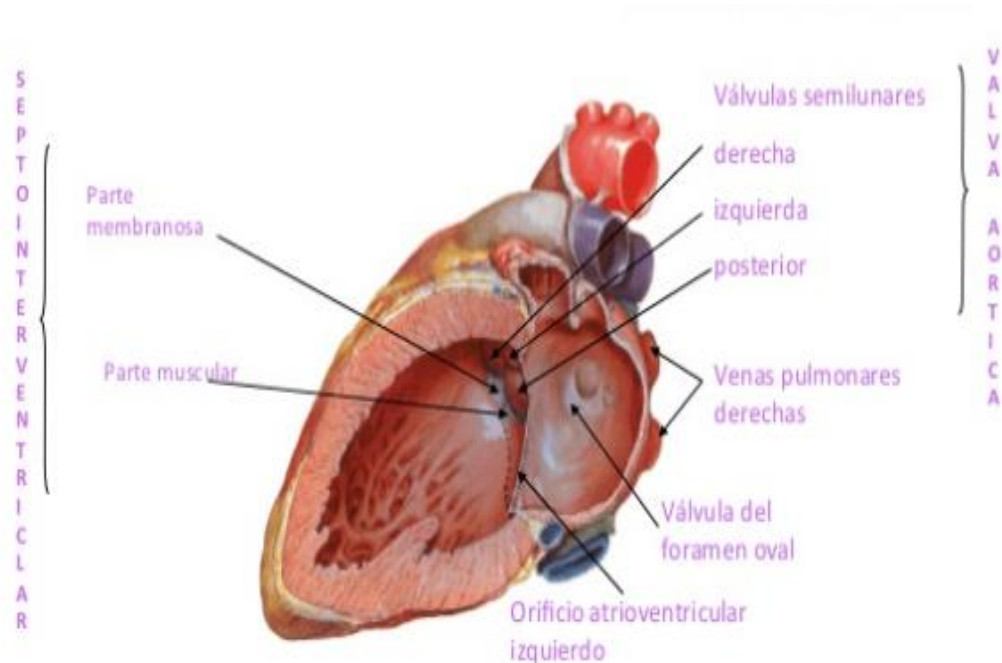
- La vena cava superior, desemboca en la parte superior de la aurícula, su agujero carece de válvula. Recoge la sangre de la mitad superior del cuerpo y gran parte del dorso. [8]
- La vena cava inferior, drena la sangre de la mitad inferior del cuerpo, desemboca en la parte inferior de la aurícula derecha, su orificio está provisto de un pliegue delgado, insuficiente para impedir el reflujo de sangre venosa, la válvula de la vena cava inferior (válvula de Eustaquio) que durante el periodo fetal dirige la sangre hacia el agujero oval.
- El seno coronario, vena que se sitúa en la parte posterior del surco coronario, vierte la mayor parte de la sangre venosa procedente del corazón, su orificio situado delante del orificio de la vena cava inferior, está protegido por una válvula rudimentaria sin función, la válvula del seno coronario (válvula de Tebesio). [8]
- Las venas cardiacas mínimas llevan sangre de la pared cardiaca, vierten mediante pequeños orificios dispersos. Desde la aurícula derecha la sangre pasa al ventrículo derecho a través del orificio auriculoventricular derecho ocupado por la válvula tricúspide. [8]



**Figura 5. Aurícula derecha.** Esquema en el cual se puede apreciar la aurícula derecha y las partes que la componen. [TRESGUERRES, 2009]

### - Aurícula izquierda

Es la cavidad cardiaca más posterior, forma la mayor parte de la base del corazón, por detrás se relaciona con el esófago. Tiene una forma irregularmente redondeada, se continua hacia fuera con la orejuela izquierda, única zona de la aurícula que tiene músculos pectíneos. En su cara posterior desembocan sin válvulas cuatro venas pulmonares, dos procedentes de cada pulmón. El tabique interauricular muestra una depresión ovalada que se corresponde por su posición con la fosa oval de la aurícula derecha. Comunica con el ventrículo izquierdo por el agujero aurículo ventricular izquierdo protegido por la válvula mitral o bicúspide (Figura 7). [8]



**Figura 6. Aurícula izquierda.** En la imagen se puede apreciar la aurícula izquierda, así como las partes que la componen. [GONZÁLEZ, 2013]

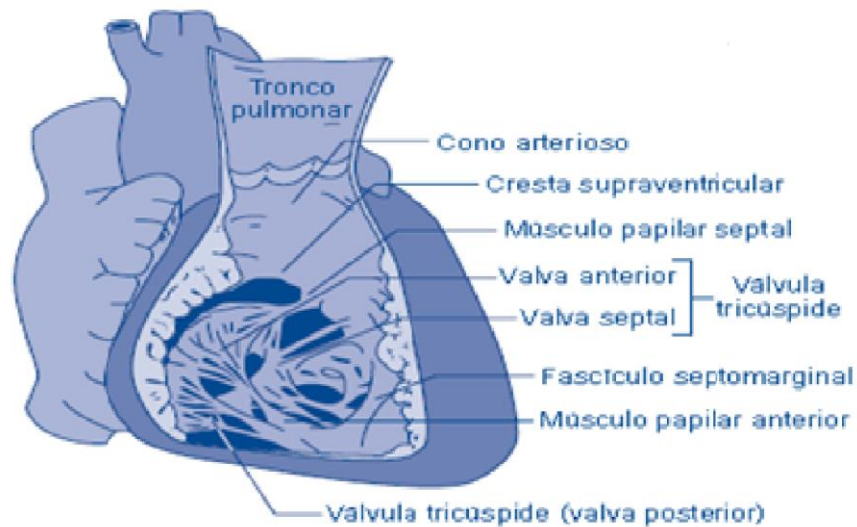
### o Ventriculos

Los ventrículos se sitúan delante de las aurículas, tienen forma piramidal con el vértice orientado hacia la punta del corazón. El tabique interventricular separa ambos ventrículos. La parte superior del tabique, porción membranosa, está formada por tejido conjuntivo; la parte inferior, porción muscular, es musculo cardiaco, representa las nueve decimas partes del tabique y su espesor aumenta de arriba hacia abajo. La base de cada ventrículo presenta

dos orificios provistos de válvulas, un orificio de entrada, el auriculoventricular, a través del cual el ventrículo recibe la sangre desde la aurícula correspondiente y un orificio de salida, el orificio arterial, que comunicación el tronco pulmonar en el ventrículo derecho y con la arteria aorta en el izquierdo. [8]

#### - *Ventrículo derecho*

En su base se encuentran los orificios atrio ventricular derecho, ocupado por la válvula tricúspide, que comunica con la aurícula derecha y el orificio del tronco pulmonar. El interior del ventrículo (Figura 8) tiene en su tracto de entrada numerosas trabéculas carnosas y tres músculos papilares, anterior, posterior y setal. La trabécula septo marginal es una cresta muscular que marca el límite inferior de la cámara de entrada y contiene una rama del sistema de conducción del corazón. La cámara de salida, infundíbulo o cono arterial, que conduce hacia el orificio del tronco pulmonar es de paredes lisas, lo que facilita la eyección sistólica. [8]

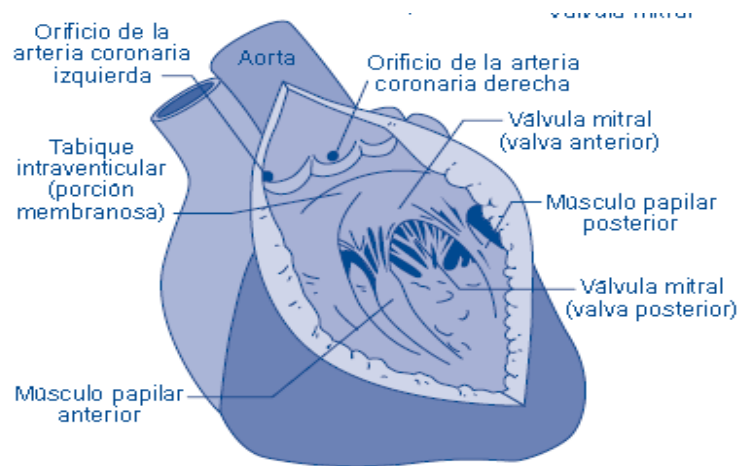


**Figura 7. Ventrículo derecho.** La imagen nos permite observar las distintas partes que lo conforman [TRESGUERRES, 2009]

#### - *Ventrículo izquierdo*

Las paredes del ventrículo izquierdo son las más gruesas del corazón debido a que impulsa la sangre a las arterias sistémicas depresión elevada. Presenta dos músculos papilares, anterior y posterior (Figura 9). Es una estructura cónica, con su vértice hacia abajo, la base

está formada por el orificio auriculoventricular y aórtico, ambos provistos de sus correspondientes válvulas. Al igual que en el ventrículo derecho, en el izquierdo consideramos una cámara de entrada trabeculada que recibe sangre de la aurícula izquierda y una cámara de salida o vestíbulo aórtico, de paredes lisas, situada entre el tabique y la valva anterior de la válvula mitral que dirige la sangre hacia el orificio aórtico. [8]



**Figura 8. Ventrículo izquierdo.** La imagen nos permite apreciar las partes que conforman el ventrículo izquierdo. [TRESGUERRES, 2009]

### 3.2.3 VENAS Y ARTERIAS

#### ○ VENAS

Las venas son estructuralmente muy similares a las arterias aunque sus capas interna y media son más delgadas. La capa muscular y elástica es mucho más fina que en las arterias porque presentan una menor cantidad de fibras tanto elásticas como musculares.. La función de estas válvulas es impedir el reflujo de sangre y ayudar a dirigir la sangre hacia el corazón. [11]

La mayor parte de venas que drenan la sangre del corazón van a confluir al seno coronario. El seno coronario es una estructura que se encuentra en el surco auriculoventricular por su cara posterior y que desemboca en la aurícula derecha. A él drenan las siguientes venas:

Por la cara posterior (Figura 9):

- Vena Coronaria Mayor: discurre por el surco interventricular anterior, bordea el margen izquierdo.

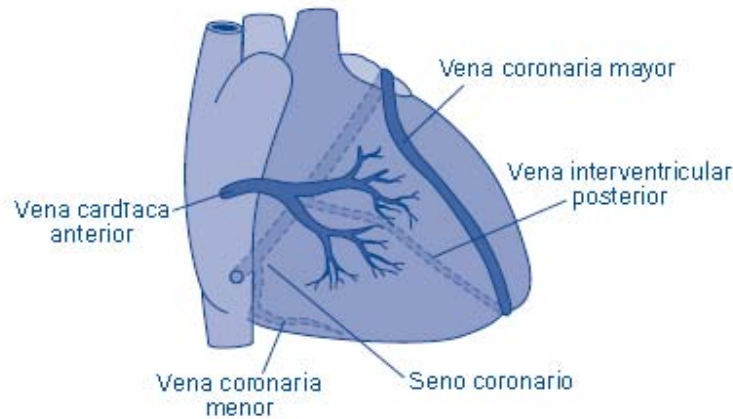
- Vena oblicua de la aurícula izquierda o vena de Marshall: procede de la parte posterior de la aurícula izquierda, y realiza un recorrido diagonal que acaba en el seno coronario.
- Vena posterior del ventrículo izquierdo: desde la parte media de la cara posterior del mismo va a desembocar en el seno coronario también por su lado izquierdo.
- Vena Coronaria menor: se origina en la region del borde derecho del corazón, y al llega al surco auriculoventricular lo recorre hasta desembocar en el seno coronario por la derecha.
- Vena interventricular posterior: desemboca en el lado derecho del seno coronario junto con la coronaria menor.

Por la cara anterior:

- Vena interventricular anterior: recorre el surco interventricular por la cara anterior y acaba drenando en la vena coronaria mayor, y de ahí al seno venoso.
- Vena marginal izquierda: va a drenar también en la vena coronaria mayor, e igualmente, al seno venoso.

Sin embargo, existe otro sistema de drenaje venoso más pequeño, que no va a parar al seno coronario. Está constituido por:

- Venas coronarias anteriores, que desembocan directamente en la aurícula derecha, sin pasar por el seno coronario. Sólo drenan la sangre de la cara anterior del ventrículo derecho.
- Venas mínimas o de Tebesio. Son vasos venosos muy cortos que se originan en el espesor del miocardio y que desembocan directamente en las cámaras cardiacas. <sup>[12]</sup>



**Figura 9. Venas del corazón.** En el esquema se pueden apreciar las diferentes venas que irrigan el corazón así como la ubicación del seno coronario. [TRESGUERRES, 2009]

### ○ *ARTERIAS*

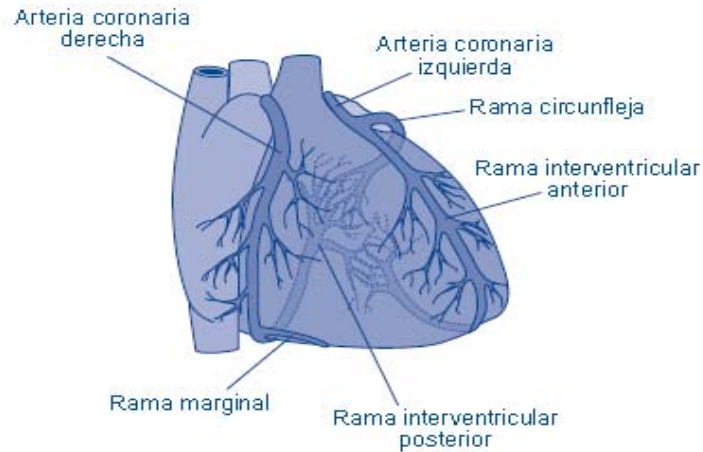
Dos vasos arteriales suministran la sangre a todo el corazón. Ellos son las arterias coronarias, izquierda y derecha, ramas de la aorta ascendente (Figura 10).

- La arteria coronaria izquierda rodea parcialmente a la arteria pulmonar, se introduce en el surco interventricular por su parte anterior y se prolonga por la arteria descendente anterior a la rama inter ventricular que corre hacia el ápex o vértice del corazón. Esta arteria aporta sangre a la superficie anterior de los ventrículos.
- La arteria coronaria derecha se origina en la aorta y siguiendo la parte anterior del surco aurículo ventricular derecho alcanza al surco interventricular posterior, donde la rama descendente posterior continúa en dirección al vértice. Esta arteria aporta sangre a toda la superficie posterior de los ventrículos.

El nódulo S-A recibe irrigación solamente de una de las arterias auriculares; naturalmente, esto puede ser variable en dependencia de que sea una rama de la circunfleja derecha o de la izquierda. Esta arteria da origen a un anillo vascular que rodea al orificio de la vena cava superior. Además del tipo convencional de irrigación sanguínea, el miocardio puede estar irrigado:

1. Por las anastomosis extra cardíacas.
2. Por los vasos de Tebesio.
3. A través de una inversión de la circulación de las venas coronarias.<sup>[13]</sup>





**Figura 10. Arterias del corazón.** Se pueden observar las principales arterias que conforman al corazón. [TRESGUERRES, 2009]

### 3.3 HISTOLOGÍA DEL CORAZÓN

La histología es la ciencia que va a estudiar la estructura, la organización del cuerpo, en este caso del ser humano. Es una ciencia, una parte del saber médico que va a estar intrincado entre la bioquímica, fisiología, biología y que va a ser imprescindible para la patología, ya que para estudiar las enfermedades necesitamos conocer las estructuras en condiciones de la salud. [14]

#### 3.3.1 PARED CARDÍACA

La pared del corazón se forma de tres capas (Figura 11):

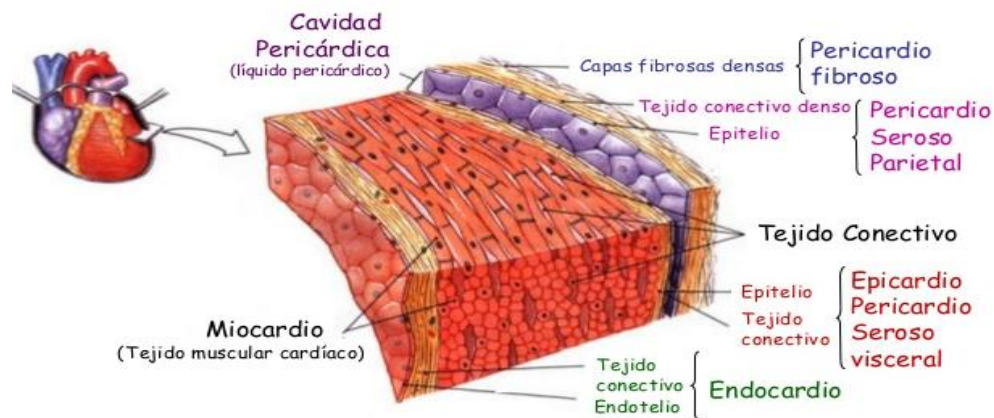
- Pericardio: Está formado por un saco pericárdico externo, fibroso, que encierra a todo el corazón y una doble capa interna de células mesoteliales planas, denominada pericardio seroso. Las dos capas del pericardio seroso son: El pericardio parietal, que está unido al saco fibroso y el pericardio visceral o epicardio, que recubre la superficie externa del corazón. La capa interna del tejido conjuntivo, fina, del epicardio contiene tejido adiposo, nervioso y las arterias y venas coronarias. [15]
- Miocardio: El miocardio es la capa más gruesa del corazón y está formada por células musculare cardíacas. El espesor y el diámetro de las células son máximos en



el ventrículo izquierdo y mínimos en las aurículas. Todas las capas musculares se unen al esqueleto del corazón, que proporciona una base para su contracción. [15]

El miocardio comprende tres tipos celulares:

1. Cardiomiocitos contráctiles, que se contraen para bombear la sangre hacia la circulación.
  2. Cardiomiocitos mioendocrinos, que producen péptido natriurético atrial.
  3. Cardiomiocitos nodulares, especializados en el control de la contracción rítmica cardíaca. [16]
- Endocardio: Tiene 3 capas: una más externa de tejido conectivo (que contiene nervios, venas y fibras de Purkinje), una capa media de tejido conectivo y un endotelio interno de las células endoteliales planas. [15]



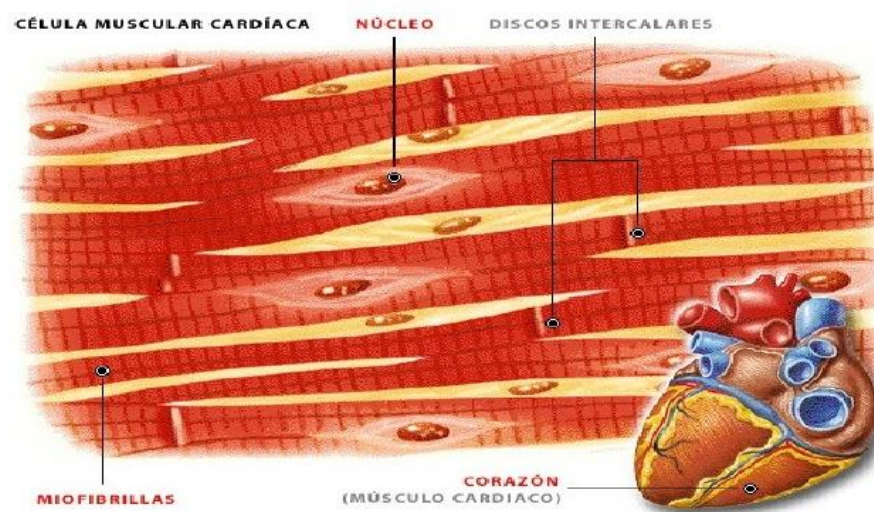
**Figura 11. Pared del corazón.** En la imagen se aprecian las diferentes capas fibrosas que conforman la pared del corazón [De Nisco, 2014].

### 3.3.2 MÚSCULO CARDÍACO

El músculo cardíaco es estriado de la misma manera que el músculo esquelético típico. Además, el músculo cardíaco tiene miofibrillas típicas que contienen filamentos de actina y miosina casi idénticas a los que se descubren en el músculo esquelético, y estos filamentos se intercalan y deslizan unos sobre otros durante la contracción, de la misma manera que el músculo esquelético. (Figura 12)

Propiedades que presenta este el músculo cardíaco:

- a) automatismo o propiedad cronotrópica (célula P del nódulo sinusal, por la fase 4): Es la propiedad de producir estímulos rítmicos.
- b) conductibilidad o propiedad dromotrópica: Es la capacidad de recibir y transmitir estímulos.
- c) excitabilidad o propiedad batmotrópica: Es la capacidad de reaccionar frente a estímulos determinados.
- d) contractilidad o propiedad inotrópica: Es la propiedad del músculo de acortarse, la cual es común a todos los músculos: lisos y estriados. <sup>[11]</sup>



**Figura 12. Músculo cardíaco.** Se pueden apreciar lo que compone el músculo, así como la forma en que están diseñadas. [GÓMEZ, 2015]

### 3.4 FISIOLÓGÍA DEL CORAZÓN

En cada latido, el corazón bombea sangre a dos circuitos cerrados, la circulación general o mayor y la pulmonar o menor. La sangre no oxigenada llega a la aurícula derecha a través de las venas cavas superior e inferior, y el seno coronario. Esta sangre no oxigenada es transferida al ventrículo derecho pasando a través de la válvula tricúspide y posteriormente fluye hacia el tronco pulmonar, el cual se divide en arteria pulmonar derecha e izquierda. La sangre no oxigenada se oxigena en los pulmones y regresa a la aurícula izquierda a través de las venas pulmonares (circulación pulmonar). La sangre oxigenada pasa al ventrículo izquierdo donde se bombea a la aorta ascendente. A este nivel, la sangre fluye

hacia las arterias coronarias, el cayado aórtico, y la aorta descendente (porción torácica y abdominal). Estos vasos y sus ramas transportan la sangre oxigenada hacia todas las regiones del organismo (circulación general).<sup>[11]</sup>

### **3.4.1 SISTEMA DE CONDUCCIÓN CARDÍACA**

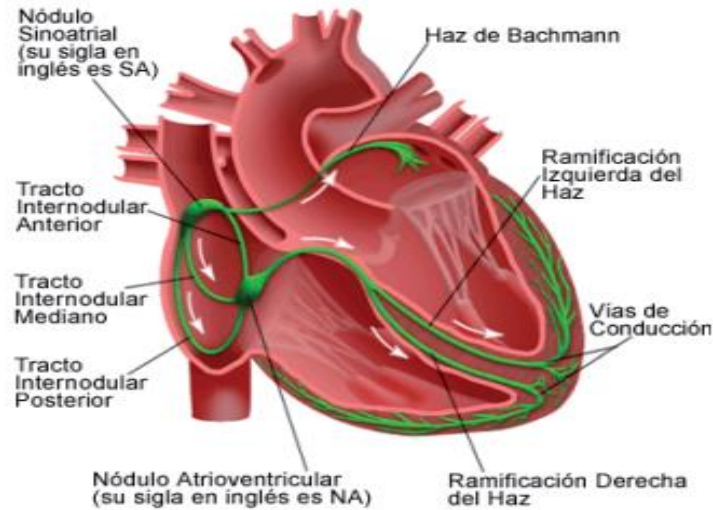
El sistema de conducción eléctrica del corazón se podría describirse como la interconexión de células especializadas en generar impulsos eléctricos que se disponen de manera estratégica y siguiendo un orden preestablecido para lograr una contracción armónica de todas las cavidades cardíacas.<sup>[17]</sup>

#### *o Fisiopatología del sistema de conducción*

El corazón básicamente es un músculo que al contraerse bombea sangre hacia la circulación general y pulmonar. En el corazón hay 2 tipos de células: las que son propiamente musculares, con capacidad contráctil y que se encargan de realizar la contracción cardíaca, y por otro lado las células del sistema excitoconductor, que se encarga de iniciar el estímulo eléctrico y propagarlo por todo el corazón. Las células del sistema excitoconductor se distribuyen en una serie de estructuras que son las siguientes (Figura 13)<sup>[18]</sup>:

1. Nódulo sinoauricular (NS): Es una estructura de 10x5x5 mm de diámetro y que se encuentra en la porción lateral – superior de la aurícula derecha. Es la estructura encargada, en condiciones normales de iniciar el estímulo cardíaco que es propagado a la aurícula adyacente y que posteriormente se extenderá a todo el corazón.<sup>[18]</sup>
2. Nódulo auriculoventricular (NAV): Se encuentra situado en la base del tabique interauricular inmediatamente por encima de la separación entre las aurículas y los ventrículos; su tamaño es de 5x3x1.5 mm. También juega un papel de la transmisión del estímulo desde la aurícula al ventrículo.<sup>[18]</sup>
3. Haz de His (H.H): Es un pequeño fascículo que viene a ser la propagación del nodo AV, y que se extiende hacia los ventrículos por el tabique interventricular, dividiéndose posteriormente en ramas, la rama derecha y la izquierda, cada una de las cuales propagará el estímulo a cada uno de los ventrículos.<sup>[18]</sup>

4. El sistema Purkinje: Está constituido por un conjunto de pequeños fascículos que propagan el estímulo eléctrico desde las ramas del haz de His hasta las propias células musculares de los ventrículos. [18]



**Figura 13. Sistema de conducción cardíaco.** Se muestra en color verde el sistema de conducción eléctrica del corazón, las flechas en blanco indican el sentido en que viajan los impulsos. [RAMÍREZ, 2009]

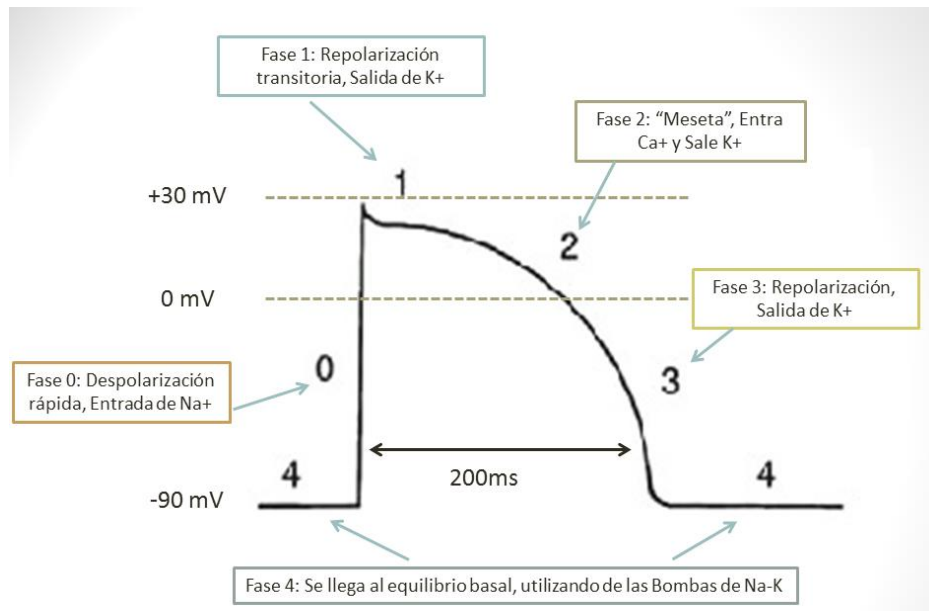
### 3.4.2 POTENCIAL DE ACCIÓN

La llegada de un impulso a una fibra miocárdica normal genera un potencial de acción (cambios en la permeabilidad de la membrana celular a determinados iones), el cual ocasiona la contracción de la fibra muscular del miocardio (Figura 14). El potencial de acción de las fibras miocárdicas contráctiles auriculares y ventriculares comprende tres fases: [11]

1. Despolarización (fase 0): Las fibras contráctiles tienen potencial de membrana en reposo cercano a  $-90$  mV. Cuando la excitación de fibras cercanas las lleva al valor del umbral, se abren muy rápidamente ciertos canales de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ), los llamados canales de sodio rápidos controlados por voltaje. Ello aumenta la permeabilidad del sarcolema (membrana plasmática) a los iones de sodio. El medio intracelular es más negativo que el líquido extracelular y en éste son mayores las

concentraciones del  $\text{Na}^+$ , de modo que ocurre un flujo de entrada de  $\text{Na}^+$  conforme a su gradiente electroquímico que produce la despolarización rápida. [19]

2. Meseta (Fase 2): En la fase siguiente llamada meseta, se abren los canales de calcio lentos controlados por voltaje en el sarcolema y la membrana del retículo sarcoplásmico. Ello incrementa la permeabilidad a los iones calcio y permite que ocurra lo mismo con los valores de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular. Algunos  $\text{Ca}^{2+}$  cruzan el sarcolema desde el líquido extracelular, mientras que otros salen del retículo sarcoplásmico de las fibras. Al mismo tiempo, se reduce la permeabilidad de la membrana a los iones potasio como efecto del cierre de los canales de  $\text{K}^+$ . [19]
3. Repolarización (Fase 3): La recuperación del potencial de membrana en reposo durante la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco se asemeja a la de otros tejidos excitables. Luego de una demora (que es especialmente prolongado en el miocardio), se abren los canales de potasio controlados por voltaje, lo cual aumenta la permeabilidad de la membrana a los  $\text{K}^+$ , que difunden más rápidamente al medio extracelular por efecto de la diferencia de concentraciones. Al mismo tiempo se cierran los canales de calcio. La salida de más  $\text{K}^+$  de las fibras y la entrada de menos  $\text{Ca}^{2+}$  en ellas hace que se restaure el potencial de membrana en reposo negativo. [19]
4. El intervalo isoelectrico comprendido hasta el siguiente potencial de acción se denomina fase 4. [19]



**Figura 14. Potencial de acción cardíaco.** Se muestran los elementos o fases de los cuales consta un potencial de acción, así como lo más importante que sucede dentro de cada fase.

[MENESES, 2013]

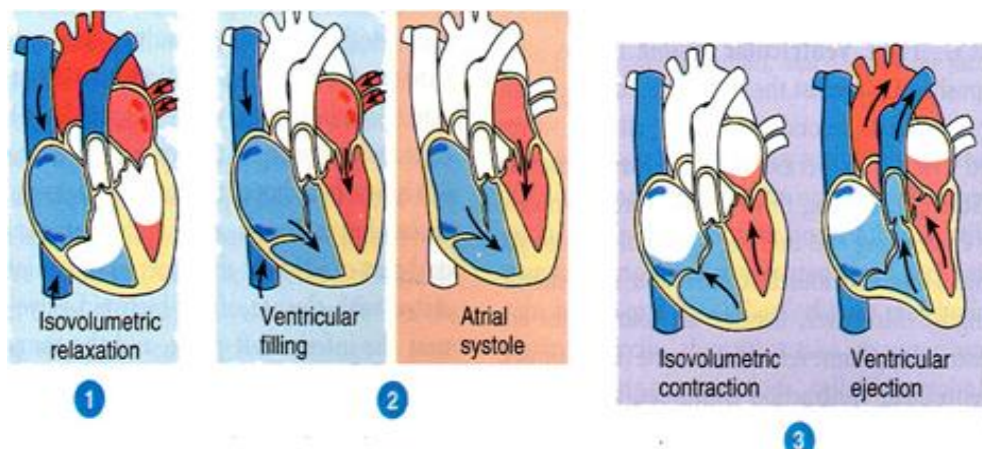
### 3.4.3 CICLO CARDÍACO

Un ciclo cardíaco incluye todos los fenómenos eléctricos (potencial de acción y su propagación) y mecánicos (sístole: contracción; diástole: relajación) que tienen lugar durante cada latido cardíaco. El término sístole hace referencia a la fase de contracción y el término diástole a la fase de relajación. Cada ciclo cardíaco consta de una sístole y una diástole auricular, y una sístole y una diástole ventricular. Los fenómenos que tienen lugar durante cada ciclo cardíaco pueden esquematizarse de la siguiente forma (Figura 15) <sup>[11]</sup>:

1. Relajación isovolumétrica: La repolarización de las fibras miocárdicas ventriculares inicia la relajación ventricular. Al ocurrir ésta, disminuye la presión en las cavidades y la sangre empieza a refluir del tronco de la arteria pulmonar y aorta hacia los ventrículos. Sin embargo, tal reflujo queda atrapado en las cúspides de las válvulas semilunares y las cierra. Después de ocurrido el cierre de las válvulas semilunares, existe un breve intervalo de relajación isovolumétrica, en que no se modifica el volumen sanguíneo ventricular, ya que también están cerradas las válvulas auriculoventriculares. Al continuar la relajación de los ventrículos, se expande su espacio interior y la presión desciende rápidamente. <sup>[19]</sup>



2. Llenado ventricular: La parte principal de esta fase ocurre justo después de que se abren las válvulas auriculoventriculares. La sangre que había estado fluyendo a las aurículas y se había acumulado en ellas mientras los ventrículos se contraían, ahora fluye precipitadamente hacia éstos. Así pues, el primer tercio de la fase de llenado ventricular se denomina periodo de llenado ventricular rápido. En el tercio intermedio, llamado diástasis, fluye un volumen mucho menor a los ventrículos. <sup>[19]</sup>
3. Sístole ventricular: Durante los 300 ms (0.3 s) siguientes, las aurículas están relajadas y los ventrículos se contraen. Casi hacia el fin de la sístole auricular, el potencial de acción del NA se ha propagado por el NAV y los ventrículos, con lo que causa la despolarización de éstos. Las cuatro válvulas están cerradas de nuevo, por espacio de unos 50 ms (0.05 s), en lo que se denomina contracción isovolumétrica. Durante este intervalo, las fibras miocárdicas se contraen y ejercen fuerza, todavía sin acortarse. Así pues, se trata de una contracción isométrica, es decir, sin cambio de longitud. Además, las cuatro válvulas están cerradas, por lo que no ocurre cambio de volumen y la contracción es isovolumétrica. El periodo de abertura de las válvulas semilunares se denomina de expulsión ventricular y dura casi 250 ms (0.25 s) Cuando empieza la relajación de los ventrículos, desciende la presión en su interior, se abren las válvulas semilunares y se inicia un nuevo periodo de relajación. <sup>[10]</sup>



**Figura 15. Ciclo cardíaco.** Se describen los fenómenos que ocurren durante dicho proceso, las flechas indican el sentido que lleva la sangre [TORTORA, 2002].

### 3.4.4 GASTO CARDÍACO

Se define como el volumen de sangre bombeado por minuto a los ventrículos (su valor es similar en los dos ventrículos) por lo que también se denomina volumen minuto. Hay que destacar que el gasto cardiaco tiene como misión suministrar el caudal de sangre necesario para satisfacer las necesidades del cuerpo en cada situación, y por tanto aumentara o disminuirá a demanda de los requerimientos de éste. [8]

Equivale a la cantidad de sangre expulsada por el ventrículo durante la sístole (volumen sistólico) multiplicado por el número de latidos por minuto (frecuencia cardiaca), (Figura 17). [12]

La regulación del gasto cardiaco depende de factores que pueden modificar el volumen sistólico y de factores que pueden variar la frecuencia cardiaca. [11]

A) Factores que pueden modificar el volumen sistólico: Los factores importantes que regulan el volumen sistólico y garantizan que los dos ventrículos bombeen el mismo volumen de sangre son:

1. La precarga o grado de estiramiento de las fibras miocárdicas durante la diástole condiciona la fuerza de la contracción miocárdica. Dentro de unos límites, cuanto más se llene el corazón en la diástole, mayor será la fuerza de contracción durante la sístole, lo cual se conoce como Ley de Frank-Starling del corazón. Esta ley establece que al llegar más sangre a las cavidades cardiacas, se produce un mayor estiramiento de las fibras miocárdicas. [11]
2. La contractilidad miocárdica o fuerza de contracción de las fibras del miocardio con cualquier valor de precarga. [11]
3. La postcarga es la presión que debe superar el ventrículo durante la sístole para poder abrir las válvulas auriculoventriculares. [11]

B) Factores que pueden modificar la frecuencia cardíaca: La frecuencia que establece el nódulo sinusal puede alterarse por diversos factores, siendo los más importantes el sistema nervioso autónomo y mecanismos químicos.



### 3.5 AISLAMIENTO DE CÉLULAS

Es introducir una célula de un microorganismo en un medio, sólido o líquido esterilizado previamente. Un *clon* está sustituido por una población de células descendientes de un solo microorganismo. Una *colonia* es un clon lo suficientemente grande como para ser visible sobre la superficie de un medio sólido. [20]

Para aislar células individuales, los microorganismos han de ser *diluidos* debido al gran número en que normalmente están presentes. La dilución se realiza normalmente por uno de los siguientes sistemas: Siembra por estría en placa, vertido en la placa y extensión en placa. [20]

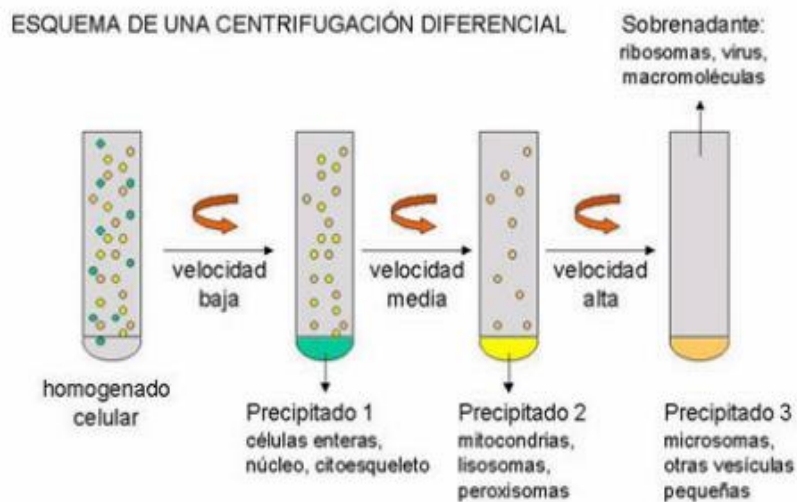
#### 3.5.1 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO CELULAR

Los científicos han desarrollado metodologías para aislar células y obtener poblaciones celulares homogéneas, que luego pueden ser incluso mantenidas y multiplicadas in vitro (–en vidrio” = en recipientes especiales, en el laboratorio). Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, ya que permiten estudiar los procesos que ocurren en las células, y en diversas aplicaciones de la biotecnología, como la producción de moléculas de interés industrial, ingeniería de tejidos, etc. [21]

El primer paso para aislar células de un mismo tipo a partir de un tejido (generalmente formado por células de diversos tipos) consiste en separar la matriz extracelular que las mantiene unidas. Para lograrlo, la muestra de tejido es tratada con diversas enzimas proteolíticas (como tripsina y colagenasas) que degradan las proteínas de la matriz; y también se utilizan agentes (como el EDTA - ácido etilendiaminotetraacético) que secuestran al ión calcio, del cual depende la adherencia celular. De esta forma, y mediante una suave agitación, se obtiene una suspensión celular que contiene a todas las células presentes en ese tejido. Para separar los diferentes tipos celulares se pueden utilizar varios métodos: [21]

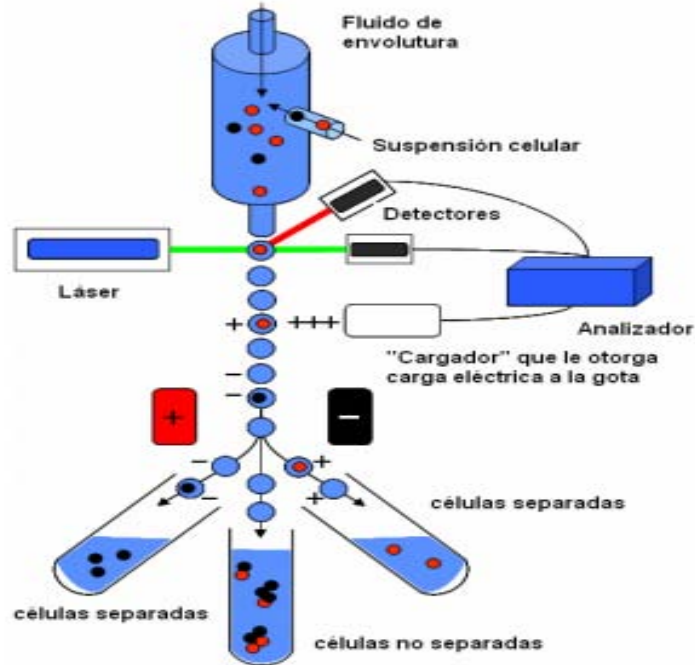
1. La centrifugación, que permite separar a las células por tamaño: Es el método más común de separación. El tubo se llena con una mezcla uniforme, tras la

centrifugación se obtienen dos fracciones, un tubo que contiene el material sedimentado y otro sobrenadante con el material no sedimentado. (Figura 16)



**Figura 16. Esquema de una centrifugación diferencial.** Nos muestra un ejemplo que nos permite observar las fases que se llevan a cabo durante una centrifugación y como se obtienen las células [MEDINA, 2008].

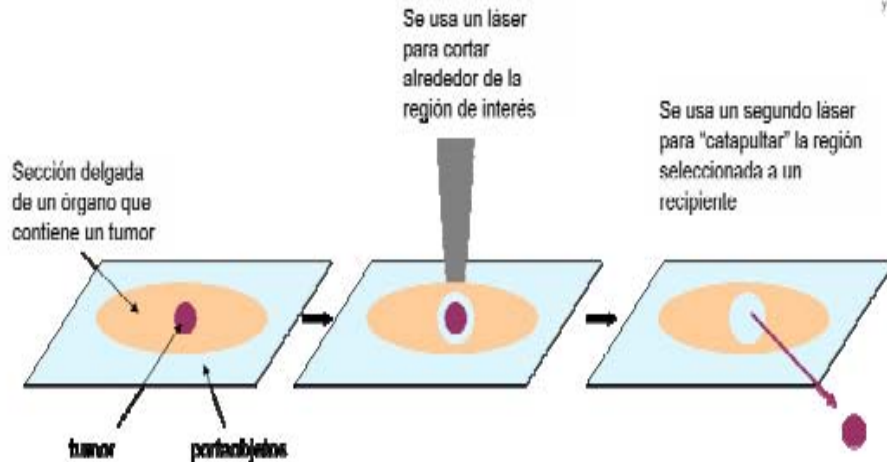
2. La capacidad de adherencia al vidrio o al plástico que tienen algunos tipos celulares.
3. La unión a ciertos anticuerpos específicos para determinados componentes celulares. Estos anticuerpos se usan unidos a diferentes matrices (colágeno, bolitas de polisacáridos, de látex o de plástico). Las células unidas a la matriz (a través de los anticuerpos) se recuperan por agitación, tratamiento con tripsina (digiere a las proteínas que median la adhesión) o, en el caso de una matriz digerible (como el colágeno), degradando la propia matriz con enzimas (como la colagenasa).
4. La unión a ciertos anticuerpos acoplados a colorantes fluorescentes. Las células que contienen un determinado componente son reconocidas y “marcadas” por los anticuerpos. Las células marcadas son separadas de las no marcadas en un separador de células activado por fluorescencia o cell sorter (Figura 17).



**Figura 17. Equipo para la separación de células por fluorescencia.** Las células individuales viajan a través de un conducto muy delgado y son iluminados por un láser.

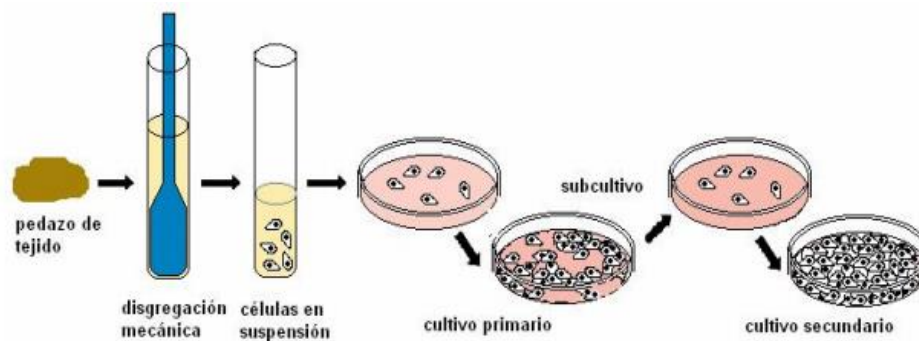
[SEGRETÍN, 2008]

5. La disección de un grupo de células a partir de una sección de tejido preparada para microscopía. La región que contiene las células de interés es irradiada con un láser, que funde un pequeño círculo con las células que están por debajo. Estas células capturadas son luego removidas para un posterior análisis. La técnica, denominada “microdisección de captura por láser”, puede utilizarse para aislar y estudiar diferentes partes de un tumor, por ejemplo. (Figura 18).<sup>[21]</sup>



**Figura 18. Técnica de microdissección para aislar células a partir de secciones o tejidos.** Éste método emplea un láser para escindir una región de interés y eyectarla a un contenedor. [SEGRETÍN, 2008]

- Cultivos primarios: Se denominan así a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios (Figura 19). [21]



**Figura 19. Cultivo primario a partir de un tejido.** Podemos apreciar el proceso que conlleva realizar éste tipo de cultivos, el cual comienza desde un tejido u órgano completo. [SEGRETÍN, 2008]

### 3.5.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL AISLAMIENTO CELULAR VS CULTIVO CELULAR

#### ○ *Ventajas y desventajas del cultivo celular*

Como ventajas podemos citar:

##### a) Permiten un control preciso y fino del medio ambiente

En un cultivo se pueden controlar las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, presión osmótica, presión parcial de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.). Para algunas líneas celulares se han establecido medios definidos. Un medio definido es aquél en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman y su concentración exacta. Para establecer un medio definido hay que conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo en el caso de muchas líneas celulares, estas necesidades no se conocen. En estos casos se utilizan medios que se suplementan con disoluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc.) que contienen factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el cultivo pero cuya naturaleza se desconoce. [22]

##### b) Caracterización y homogeneidad de la muestra

Una muestra de tejido es siempre heterogénea. Sin embargo, al cabo de uno o dos pases, las líneas celulares cultivadas son homogéneas, es decir, su morfología y su composición son uniformes. La presión selectiva de las condiciones de cultivo da lugar a un cultivo homogéneo del tipo celular más vigoroso. A partir de ese momento se pueden obtener réplicas idénticas en cada subcultivo y las características de la línea celular se conservan durante varias generaciones o de forma indefinida si la línea celular se conserva en nitrógeno líquido. [22]

##### c) Economía

En los cultivos celulares se emplean disoluciones con una concentración mucho menor que en el caso del animal completo. Además, se garantiza el acceso directo de la sustancia a las células sin que se diluya y sin que sufra ningún tipo de modificación metabólica. El coste de los ensayos clínicos se reduce considerablemente y se puede hacer un mayor número de

pruebas. También se reducen los costes relacionados con la fabricación del posible nuevo medicamento: en lugar de fabricar cantidades del orden del gramo (para el estudio en animales) basta con que se sinteticen unos pocos miligramos. [22]

#### d) Cuestiones éticas

La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo 'in vivo' pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Para obtener un cultivo celular primario es posible que haya que sacrificar algún animal, pero con ellos se pueden ensayar un elevado número de condiciones experimentales que, en otras circunstancias, supondrían el sacrificio de decenas o cientos de animales de experimentación. [22]

Los cultivos celulares también pueden suponer algunas desventajas:

#### a) Técnica sensible

El crecimiento de las células animales se tiene que realizar en estrictas condiciones de asepsia porque su crecimiento es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, mico plasmas, etc.). Además, las células animales son incapaces de mantenerse vivas en ausencia de la compleja mezcla de nutrientes presente en el plasma o en el fluido intersticial. [22]

#### b) Cantidad y coste

Producir 1 gramo de células en cultivo cuesta 10 veces menos que obtenerlas a partir del tejido de un animal. En un laboratorio normal se pueden conseguir hasta 10 gramos de células sin que se resienta mucho el presupuesto de investigación. Para producir hasta 100 gramos de células hay que incrementar tanto el instrumental como el personal. [16]

#### c) Inestabilidad

Muchas líneas celulares continuas son inestables y adoptan una dotación cromosómica aneuploide, lo que afecta tanto a su velocidad de crecimiento como a su capacidad para diferenciarse. Es posible, por tanto, encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que

se resiembran cada determinado tiempo o después de un determinado número de generaciones a partir de un stock congelado. [22]

d) Des diferenciación e identificación de las células

Al propagarse la línea celular, las células pierden las características fenotípicas propias del tejido de procedencia. Este fenómeno se denomina des diferenciación y, entre otras, cosas se hacen móviles e inician su proliferación. La relación entre las células cultivadas y las células originales del tejido puede perderse. En este caso se necesitan marcadores estables que permitan identificar la procedencia de las células. En algunos casos es posible revertir la des diferenciación, bien por medio de hormonas, bien mediante compuestos químicos (ésteres de forbol), pero no está claro si el estado re diferenciado es equivalente al estado de diferenciación “in vivo”. [22]

o *Ventajas y desventajas del aislamiento celular*

Importantes ventajas se derivan de este modelo tales como:

- a) Su reproducibilidad y bajo costo [6]
- b) La posibilidad de estudiar el corazón en ausencia de factores reguladores extrínsecos [6]
- c) La facilidad para realizar estudios de isquemia y reperfusión. [6]
- d) Facilidad técnica [24]
- e) Accesibilidad de las estructuras [24]
- f) Ausencia de interferencias Neurohumorales [24]
- g) Controles adecuados [24]

Es una preparación altamente reproducible que puede ser operado a un costo relativamente bajo y ofrece una gran cantidad de datos que describen la respuesta del miocardio a diversos estímulos. [23]

Su principal desventaja es.

- a) Es poco fisiológico desde el punto de vista de precarga y postcarga reales y por su alto flujo coronario. [6]
- b) No permite el estudio de respuestas integradas en el organismo completo [24]

c) Estabilidad de las preparaciones [24]

### 3.6 TÉCNICA DE LANGENDORFF PARA EL AISLAMIENTO DE CARDIOMIOCITOS

Oscar Langendorff describió la técnica en 1895. Antes que él, Carl Ludwig en 1846 y Elias Cyon en 1866 perfundieron corazones de rana. [6]

Entre los modelos y las preparaciones empleados en la investigación cardiovascular, se encuentran los basados en la utilización de células aisladas y tejidos y estructuras en baños de órganos. El sistema de Langendorff permite el estudio directo del corazón aislado y perfundido aplicando diversas técnicas tanto sin someter al corazón a un trabajo como con una carga controlada. [24]

El método de Langendorff para estudiar corazones aislados fue descrito a finales del siglo XIX. Permite el estudio de los fenómenos sin influencias Neurohumorales y en condiciones controladas, accediendo directamente a las zonas de interés. La perfusión miocárdica se efectúa a través de las arterias coronarias que se rellenan retrógradamente. [24]

La preparación de Langendorff es una técnica experimental de órgano aislado. Su principio básico consiste en perfundir las arterias coronarias a través de una cánula de perfusión retrógrada insertada en la aorta. Cuando se alcanza una presión adecuada del líquido nutriente se cierra la válvula aórtica y se desvía el flujo hacia los orificios de las coronarias, de modo que se perfunde la masa ventricular y el corazón late en vacío. Gracias a este tipo de preparación y sus predecesores en anfibios se han logrado importantes avances en la comprensión de la fisiología cardíaca, tales como la ley de Frank-Starling, el papel del calcio en la contracción cardíaca, la transmisión química del vago, el fenómeno escalera (*treppe*) y la cardioplejía inducida por potasio, entre otros. [6]

La isquemia miocárdica puede producirse tras la ligadura de una arteria coronaria o reduciendo la oxigenación del líquido nutricio. Se utilizan corazones de distintas especies que abarcan desde la rata hasta animales grandes. Tras la extracción del corazón, se cánula la aorta seccionada en su porción ascendente y por ella se suministra el líquido nutricio que, desde los senos de Válsala y por las coronarias, irriga el miocardio y es drenado al exterior



por el sistema venoso cardiaco. La presión de perfusión (entre 60 y 80 mmHg) o el flujo (entre 1,5 y 2,5 ml/g) se mantienen constantes y la oxigenación del líquido nutricio se efectúa con una mezcla de O<sub>2</sub> (95%) y CO<sub>2</sub> (5%). Este líquido contiene las proporciones adecuadas de electrolitos y glucosa (solución de Krebs-Henseleit, solución de Tyrode, etc.) y puede complementarse con albúmina o sangre, especialmente cuando se utilizan corazones de especies grandes. [24]

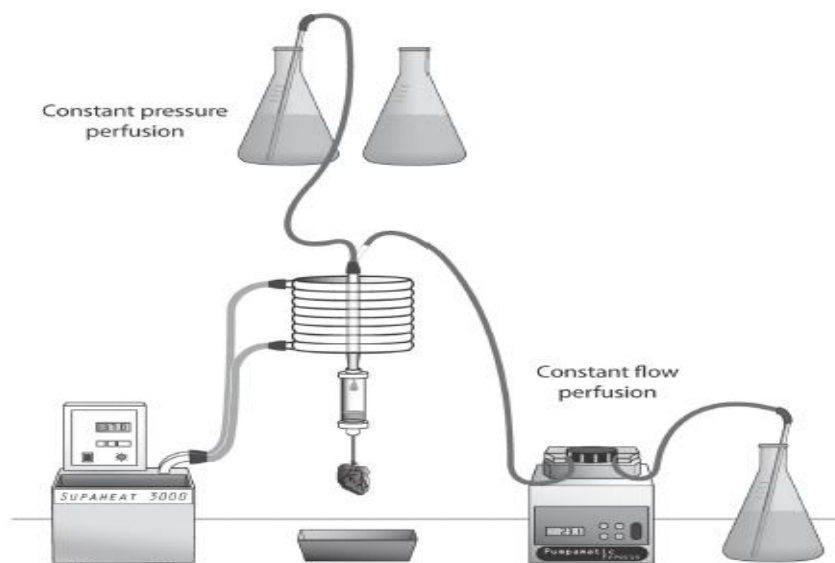
El pH se mantiene entre 7.35 y 7.4 y la temperatura, habitualmente, entre 36 y 37°C. En el corazón aislado y perfundido pueden emplearse electrodos múltiples extracelulares, tanto epicárdicos como endocárdicos o intramiocárdicos, para efectuar estudios cartográficos de la actividad eléctrica cardiaca y analizar las propiedades electrofisiológicas básicas (refractoriedad, conducción, automatismo), sus modificaciones mediante fármacos, agentes físicos, estímulos eléctricos u otros procedimientos, así como los mecanismos de inicio, perpetuación o cese de las arritmias cardiacas. [24]

Si el corazón aislado se encuentra sumergido en suero salino o en el propio líquido nutricio, puede registrarse el equivalente a las derivaciones electrocardiográficas y analizar sus variaciones ante distintas maniobras o fármacos. La utilización de electrodos de succión o de presión permite obtenerlos llamados potenciales de acción monofásicos, que guardan relación con las características del potencial de acción transmembrana. [24]

Aunque este sistema supuso un gran avance en el estudio de la fisiología cardiaca y sigue siendo ampliamente utilizado en la actualidad, tiene algunas limitaciones y desventajas. Dado que el corazón se contrae sin realizar trabajo y la presión aórtica se mantiene constante, se tiene un flujo coronario más alto de lo normal. No obstante, existen variantes en las que, mediante diversos dispositivos (balón intraventricular relleno de líquido, perfusión desde la aurícula izquierda con conexión de la aorta a un sistema que regula la resistencia al flujo, etc), el corazón se contrae con una determinada carga. Además, aunque el líquido nutricio utilizado en la perfusión intenta imitar al plasma sanguíneo, éste no contiene proteínas, iones naturales, hormonas y otras moléculas que se hallan en la sangre. Esto último hace que la estabilidad electrofisiológica y, por tanto, la vida del corazón, esté limitada a unas pocas horas. [25]

### 3.6.1. APARATO DE LANGENDORFF

Algunos laboratorios obtienen con éxito cardiomiocitos aislados por digestión enzimática sencilla del ventrículo izquierdo en una placa de Petri con cortes y la agitación del tejido. Sin embargo, la mayoría cree que la alta calidad cardiomiocitos puede ser más reproducible si son aislados por el método de Langendorff, utilizando perfusión retrógrada a través de la aorta con las soluciones que contienen enzimas (Figura 20). [23]



**Figura 20. Aparato de Langendorff.** El esquema nos indica las partes fundamentales que forman parte del aparato de Langendorff, así como la manera en que debe ser montado.

[LOUCH, 2011]

El aislamiento de cardiomiocitos de animales pequeños se puede llevar a cabo utilizando ya sea la presión de perfusión constante, donde las soluciones son suministradas por gravedad, o con perfusión de flujo constante mediante el bombeo de la perfusión. [23]

El tamaño de la cánula debe ser elegido cuidadosamente en función del tamaño de la aorta. El tamaño típico de la cánula utilizada para ratones es de entre 22 y 16 (0,6-1,3 mm) y para las ratas de 14 a 8 (1,6 -3,2 mm) en función de la edad y el sexo de los animales. Tanto las cánulas de vidrio y metal (disponibles o casera hecha de agujas) se pueden emplear. Una ranura cerca de la parte inferior de la cánula puede ayudar en la obtención de la aorta si una ligadura es usada. [23]

En muchos laboratorios, la temperatura de perfusión se regula a través de una bobina de calentamiento que rodea el tubo de perfusión (Figura 23). Si bien existe una considerable variabilidad en la temperatura que se utiliza durante el aislamiento de células, así como muchos otros utilizan una temperatura de 36 - 37°C. Sin embargo, algunos investigadores prefieren utilizar temperatura ambiente y un tiempo más largo de la perfusión (comunicación personal). La temperatura se obtiene ya sea en el extremo de la cánula o en la superficie del corazón. [23]

Antes de la disección y la canulación del corazón, el sistema de perfusión se debe llenar de solución y se eliminan las burbujas de aire, ya que es crítico para evitar que las burbujas entren en la aorta durante la perfusión. Una cámara de goteo también se puede incluir en el aparato de Langendorff para recoger las burbujas que aparecen cuando se cambia entre las soluciones. [12]

En el montaje original descrito por Langendorff, la cánula aórtica se encuentra conectada al corazón, el cual se aloja en un pequeño recipiente. La cánula está conectada a través de un tubo al reservorio donde se encuentra el fluido de perfusión (sangre en la preparación original). Este reservorio se llena desde un recipiente ubicado sobre él. Tanto el reservorio como el recipiente pequeño están dentro de un baño con agua a temperatura constante; la temperatura determinada se alcanza mediante un mechero de Bunsen. La presión de perfusión es regulada con precisión por un sistema compuesto por un manómetro conectado a una válvula. La presión de perfusión se genera desde una botella. [6]

### ***3.6.2 USOS DEL APARATO DE LANGENDORFF***

El sistema de Langendorff permite el estudio directo del corazón aislado y perfundido aplicando diversas técnicas tanto sin someter al corazón a un trabajo como con una carga controlada. [24]

Además de que también se puede usar para estudios fisiológicos o farmacológicos de órgano aislado

El aparato de perfusión aislada de Langendorff ha dado lugar a algunos de los descubrimientos más fundamentales de la fisiología cardíaca, patología y farmacología. La

versatilidad de este modelo permite su uso con una variedad de especies de bajo una variedad de condiciones normales y patológicas. [26]

## 4. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAL Y EQUIPO

#### ○ MATERIAL BIOLÓGICO

Ratas Wistar (Hembra/Macho) del bioterio de la FES-Cuautitlán.

1. Pentobarbital
2. Heparina
3. Solución Tyrode
  - NaCl [137 mM]
  - KCl [5.4 mM]
  - MgCl<sub>2</sub> [1 mM]
  - HEPES [10 mM]
  - Glucosa [10 mM]
4. Proteasa
5. Colagenasa
6. Albúmina
7. Solución de calcio
8. Agua destilada

## MATERIALES

1. Hilo quirúrgico (Para oclusión)
2. Material de vidrio
3. Cajas petri para aislar el corazón
4. Instrumental quirúrgico
5. Balanza granataria para animales
6. Espátulas

7. Tubos de centrifugación
8. Porta objetos

## **EQUIPO**

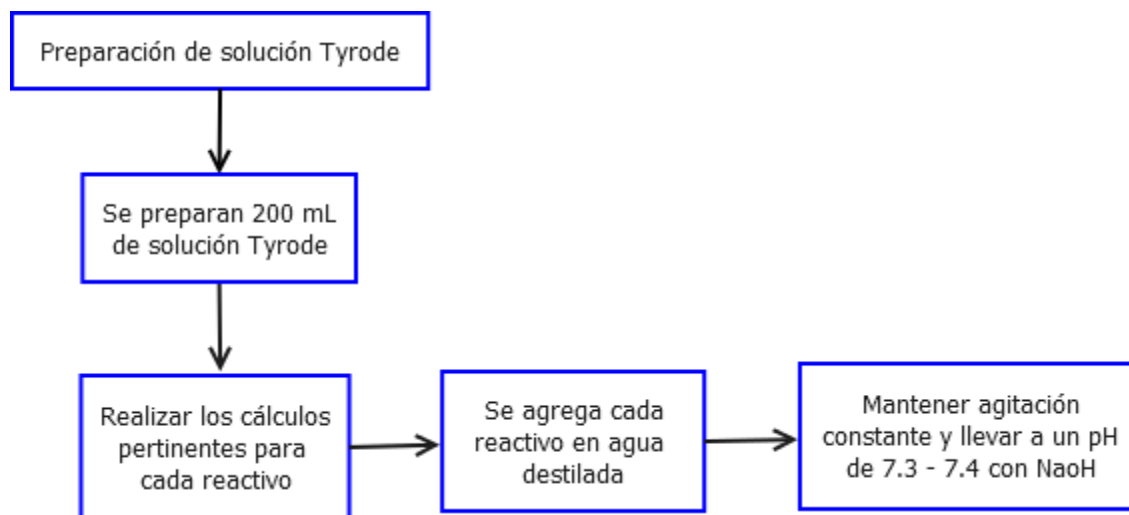
1. Aparato de Langendorff
2. Balanza analítica
3. Agitador magnético
4. pH-metro
5. Centrifuga
6. Microscopio

## **4.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA EL AISLAMIENTO DE MIOCITOS**

### **o Solución Tyrode**

Se llevan a cabo los cálculos pertinentes para obtener la cantidad de mg, g o mL necesarios para preparar 200 mL de solución Tyrode, una vez obtenidos, se procede a prepararla. Se agrega cada uno en agua destilada que está en agitación constante, posteriormente se lleva a un pH de 7.3 – 7.4, con NaOH.

### *Diagrama de flujo: Preparación de solución Tyrode*

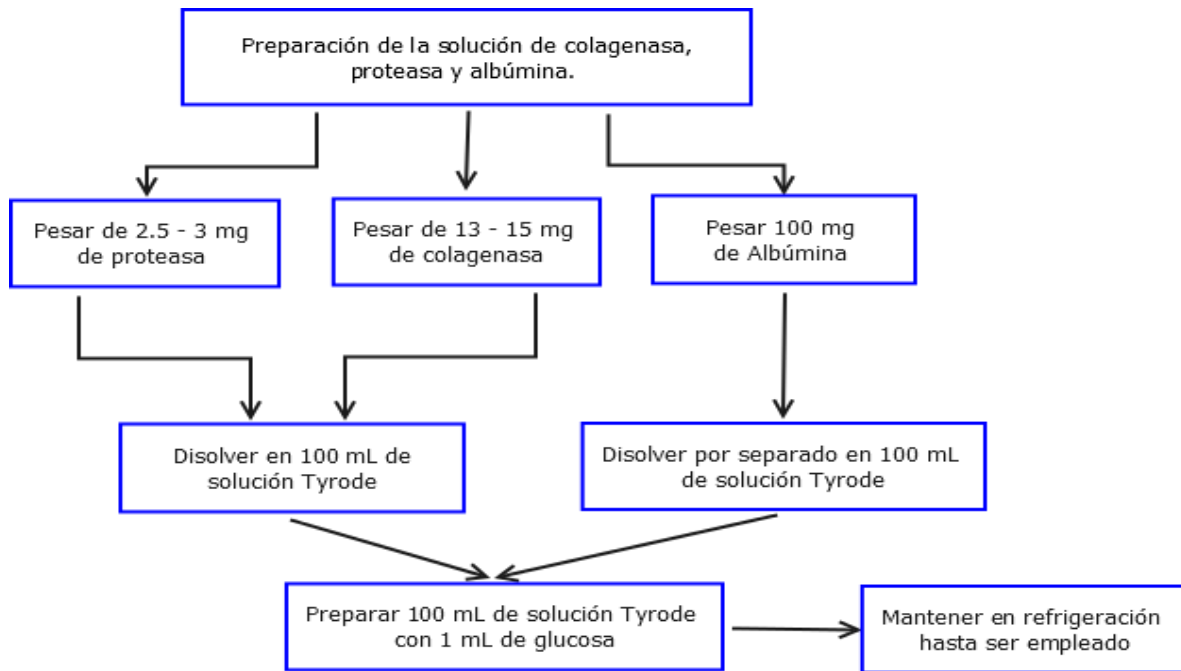


#### *○ Solución de colagenasa, proteasa y albúmina*

Se disuelven de 2.5 - 3 mg de Proteasa y de 13 - 15 mg de Colagenasa en 100 mL de solución Tyrode, de igual manera se pesan 100 mg de Albúmina y se disuelven en 100 mL de solución Tyrode.

Por otro lado se preparará una solución Tyrode con 1 mL de glucosa, el cual se mantendrá en refrigeración, hasta ser utilizado.

### Diagrama de flujo: Preparación de las soluciones de Proteasa, Colagenasa y Albúmina (Solución enzimática)



#### ○ Soluciones de Calcio a diferentes concentraciones

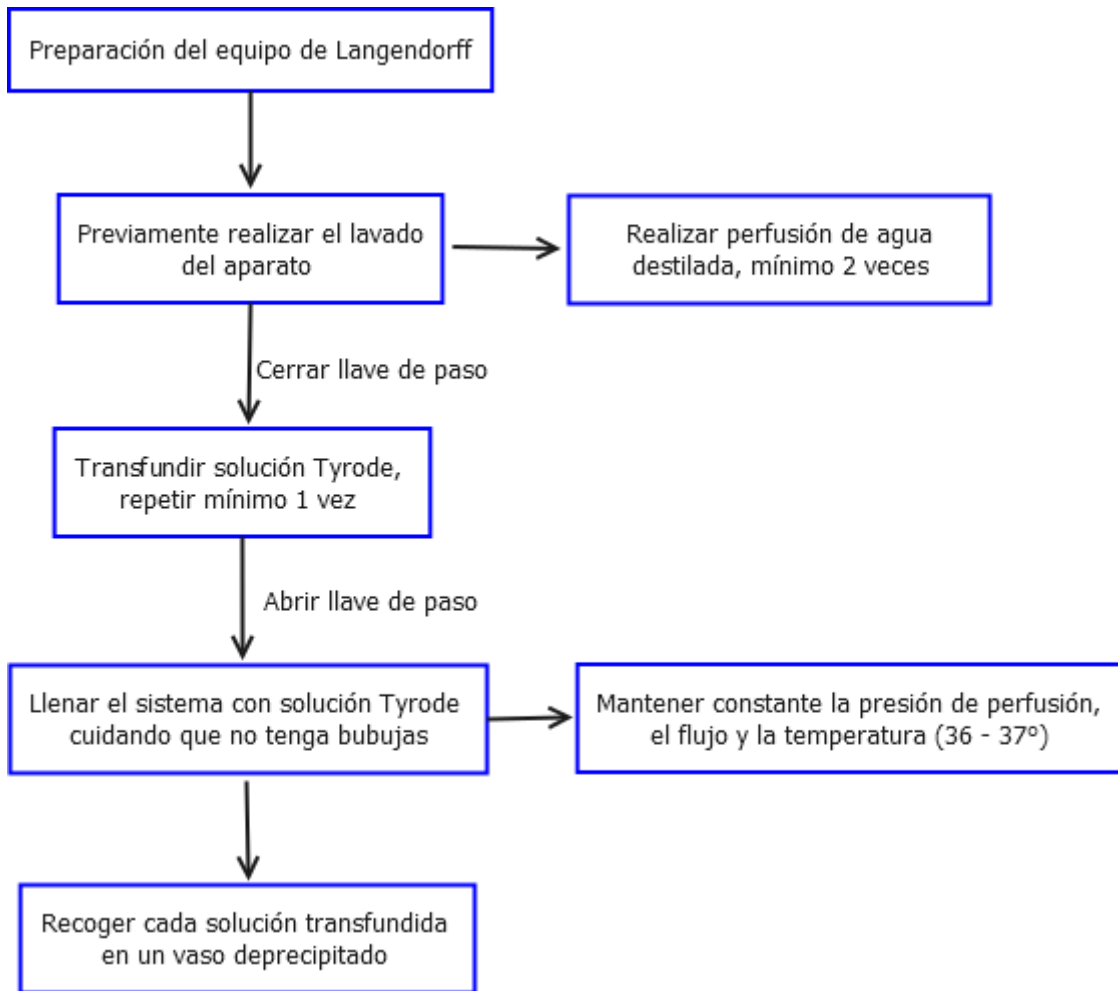
Previamente se prepara una solución de calcio al .5 M, a partir de ésta se preparan las soluciones de calcio requeridas a diferentes concentraciones, las cuales son: 0.1, 0.5, y 1 M de 50, 30 y 20 mL respectivamente, para lograrlo se realizan los cálculos pertinentes.

### 4.3 PREPARACIÓN DEL EQUIPO DE LANGENDORFF

Antes de utilizar el aparato, se debe llevar a cabo el lavado de éste, mediante la perfusión de agua destilada, por lo menos 2 veces, una vez terminada, se procede a transfundir solución Tyrode (recordar cerrar la llave de paso), se repite el proceso 1 vez más, posteriormente se abre la llave, regulando la corriente. Antes de montar el corazón se debe llenar el sistema de perfusión con solución Tyrode, cuidando que no tenga burbujas de aire. Se debe tener cuidado de mantener constante la presión de perfusión, y el flujo mediante el bombeo de perfusión, además de la temperatura, la cual debe estar entre 36 – 37°C, esto a través de un depósito de calentamiento. Cada solución transfundida debe pasar por la

tubería que conduce a la cánula, en el cual estará montado el corazón a través de la aorta y se recogen en un vaso precipitado. Una vez terminado el enjuague del aparato, se procede a llevar a cabo el montaje del corazón.

#### *Diagrama de flujo: Preparación del equipo de Langendorff*



#### **4.4 AISLAMIENTO DE CARDIOMIOCITOS POR LANGENDORFF**

Para la oclusión de la arteria coronaria se utilizarán las ratas Wistar, a las cuales se les administrará por vía intraperitoneal, 300 µg de Pentobarbital esto con el fin de anestesarla y 200 µg de Heparina, para evitar que la sangre se coagule. Al momento de alcanzar el estado de anestesia, se lleva a cabo la extracción del corazón.

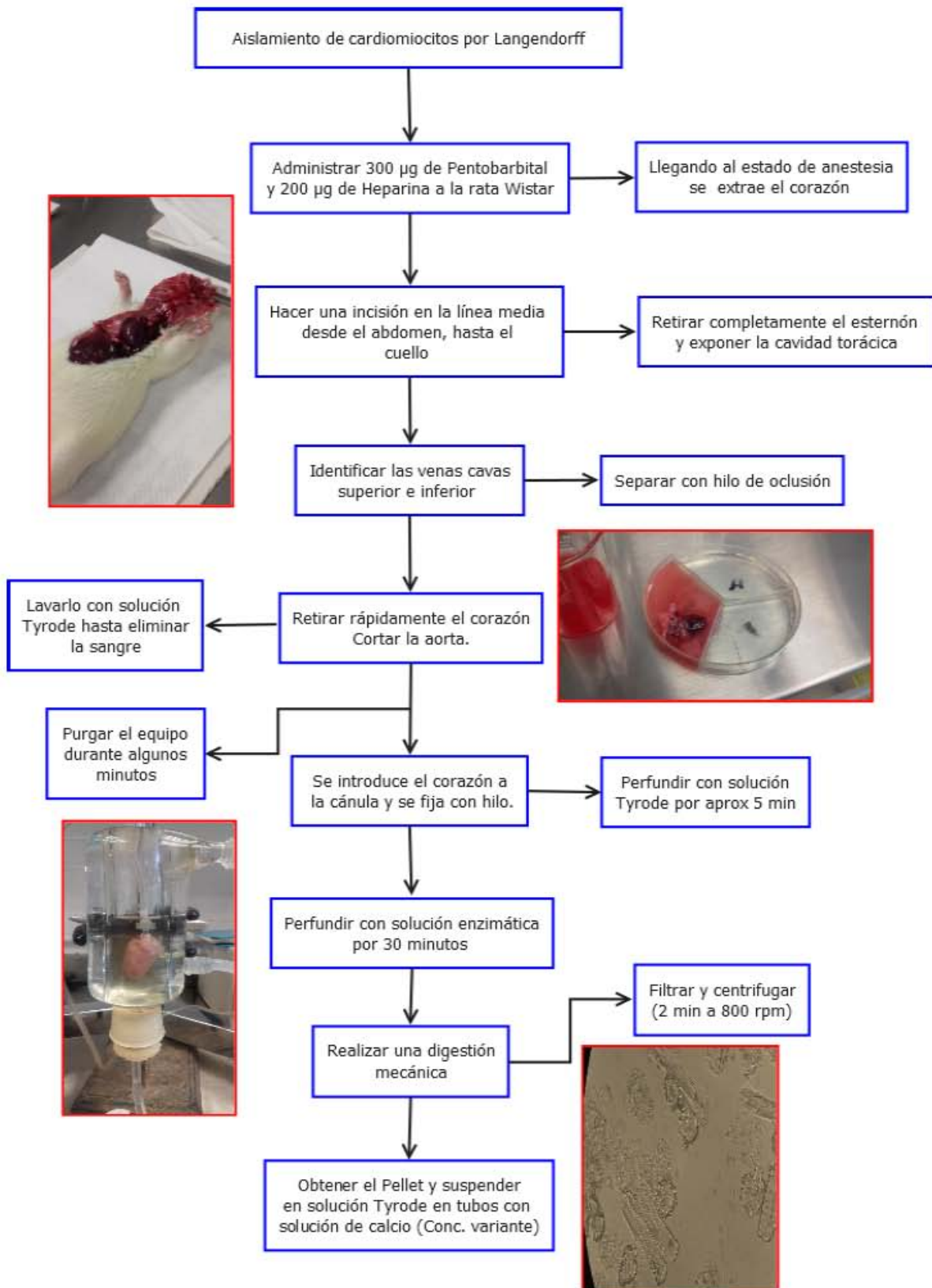


Se hace una incisión en la línea media desde el abdomen hasta el cuello, retirándose el esternón por completo y exponiendo toda la cavidad torácica. Se identifican las venas cavas superior e inferior y se separan con hilo de oclusión. Rápidamente se retira el corazón de la cavidad, teniendo especial cuidado de cortar la aorta de manera que se pueda introducir la cánula de perfusión sin riesgo de ocluir el orificio de las coronarias o atravesar la válvula aórtica.

Previo a la introducción de la cánula, ésta se purga durante algunos minutos para garantizar la ausencia de burbujas de aire en el sistema y la salida de líquido de perfusión a la temperatura adecuada. Después de haber retirado el corazón, se lava con solución Tyrode para eliminar la sangre que se tenga presente. Se introduce la cánula, se fija con un hilo para oclusión lo cual facilita la colocación definitiva del corazón. La actividad cardiaca se normaliza a los pocos segundos, se deja perfundir durante aproximadamente 5 min con solución Tyrode.

Posteriormente se perfunde durante 30 min aproximadamente en solución enzimática (que contiene colagenasa y proteasa). Seguidamente ya con el corazón perfundido se realiza una indigestión mecánica, la cual consiste en hacer una incisión, para fraccionar los ventrículos en pequeños fragmentos, los cuales se hacen pasar por una malla de filtración celular y se centrifuga durante aproximadamente 2 min a 800 rpm, de esto se obtiene el pellet y se suspende en solución Tyrode en una serie de tubos, los cuales tendrán una concentración variante de calcio (0.1 mM, 0.5 mM hasta 1.0 mM).

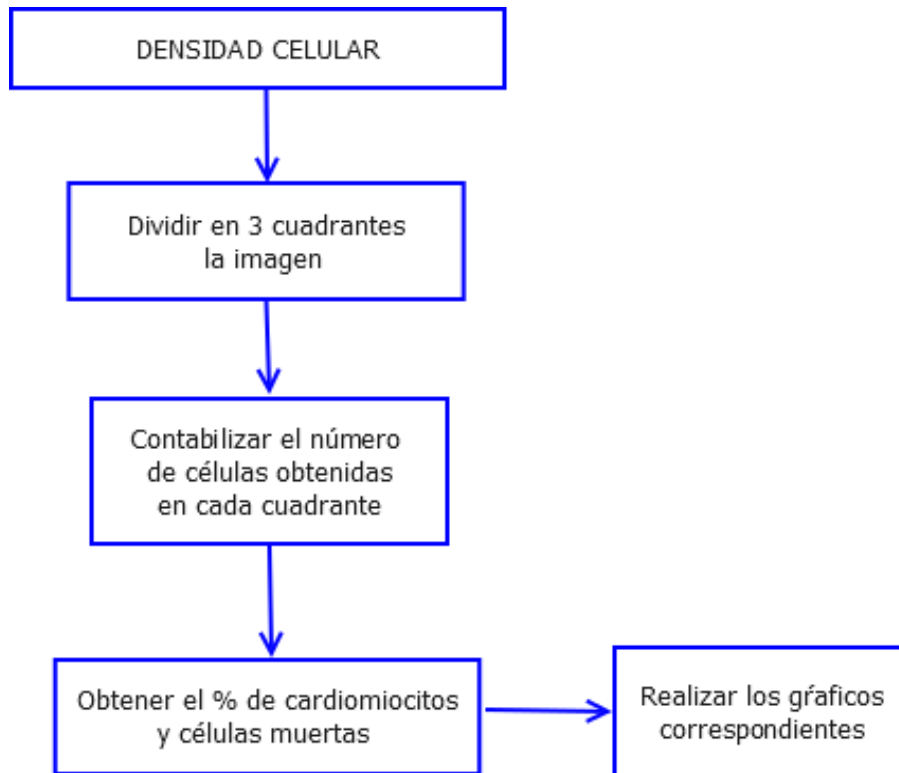
*Diagrama de flujo: Aislamiento de cardiomiocitos por Langendorff*



## 4.5 CONTEO DE % DE CARDIOMIOCITOS OBTENIDOS

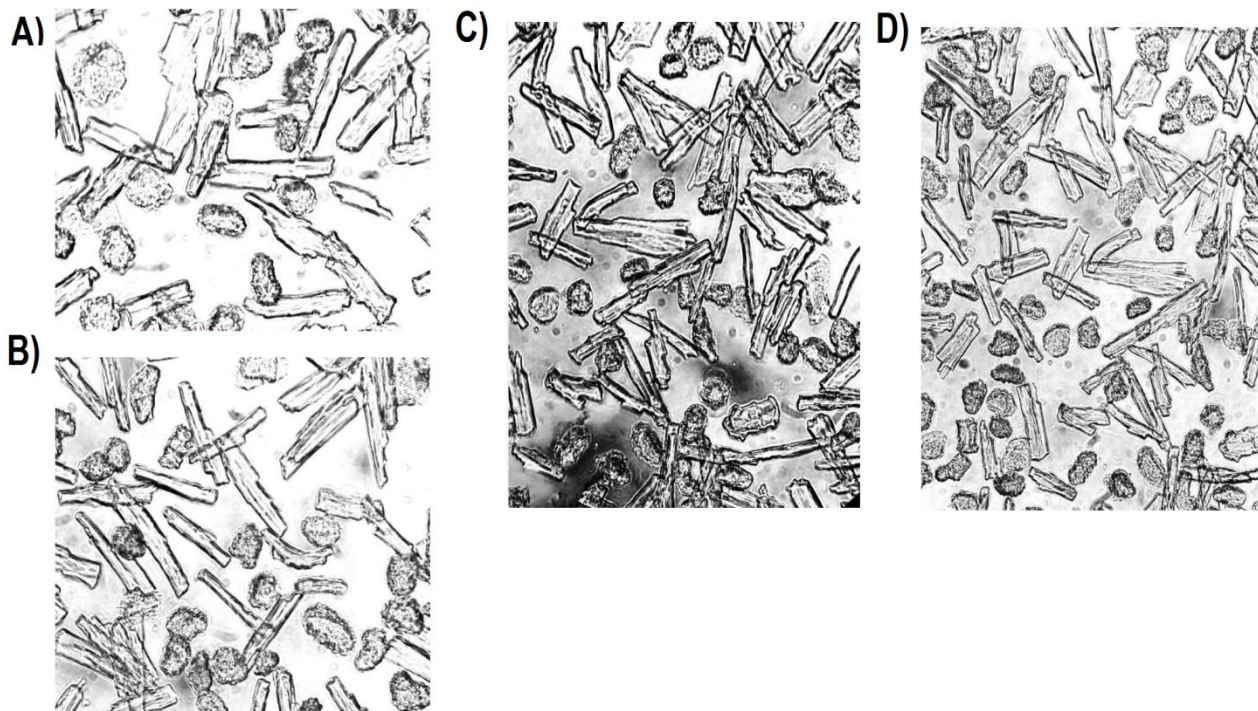
Después de realizar el aislamiento de miocitos, se llevará a cabo el análisis de densidad celular, éste se realiza dividiendo por 3 cuadrantes la imagen obtenida, contabilizando el total de células en cada uno, así como la cantidad de miocitos obtenidos. Una vez que se tiene el dato anterior, se obtiene el % de cardiomiocitos y células muertas obtenidas totalmente en los 3 cuadrantes.

### *Diagrama de flujo: Conteo de cardiomiocitos*



## 5. RESULTADOS

### 5.1 DENSIDAD CELULAR



**Figura 21. Imagen representativa de las células aisladas mediante la técnica de Langendorff.** Se pueden apreciar las células obtenidas al llevar a cabo el aislamiento de cardiomiocitos, con solución Tyrode.

Tabla 1. Resultados del conteo de las células totales por cuadrante. Solución Tyrode.

Cuadrante	Células totales	Miocitos	% Miocitos	% Células muertas
1	42	12	79.37	20.63
2	34	16	100	0
3	27	10	100	0

En la gráfica 1 se muestran los resultados del % de cardiomiocitos obtenidos, en función del tipo de células localizadas. Se observa que se tiene mayor efectividad en cuanto a la obtención de miocitos en comparación con el porcentaje obtenido de células muertas.



**Gráfica 1. Tipos de células localizadas.** Se expresan los resultados en % de cardiomiocitos vs cada tipo de células (Miocitos y Células muertas)

Figura 2. . **Imagen representativa de las células aisladas mediante la técnica de Langendorff.** En la siguiente imagen se pueden apreciar las células obtenidas al llevar a cabo el aislamiento de cardiomiocitos, con solución Krebs.

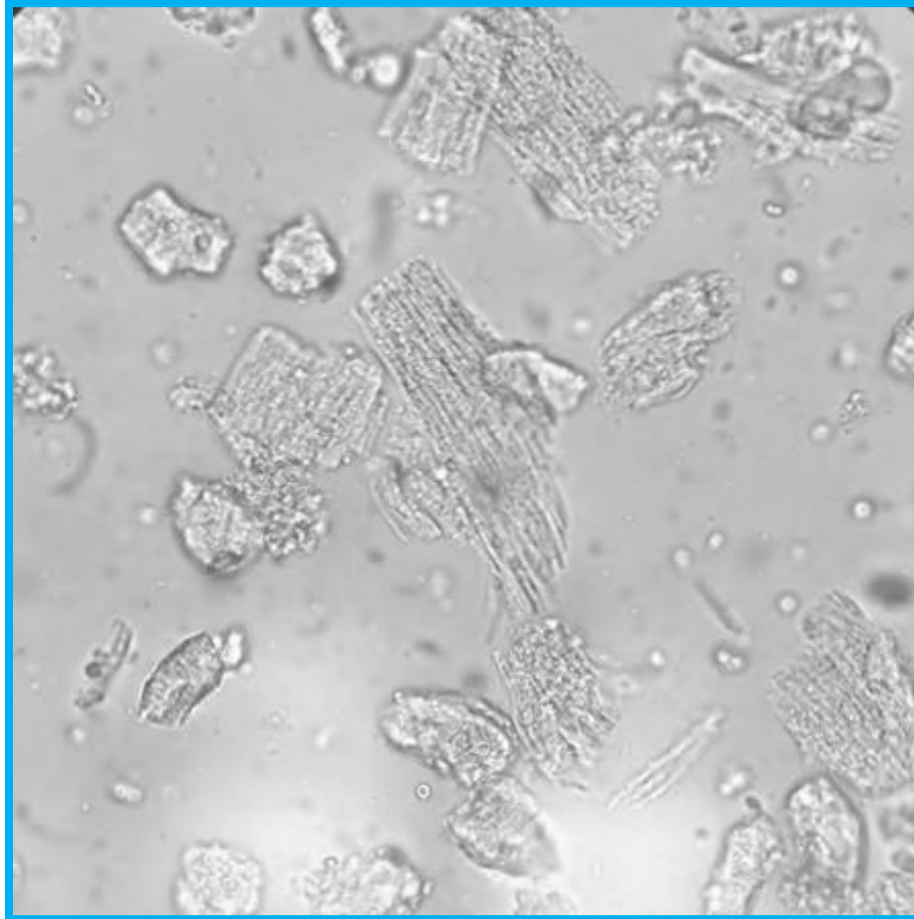
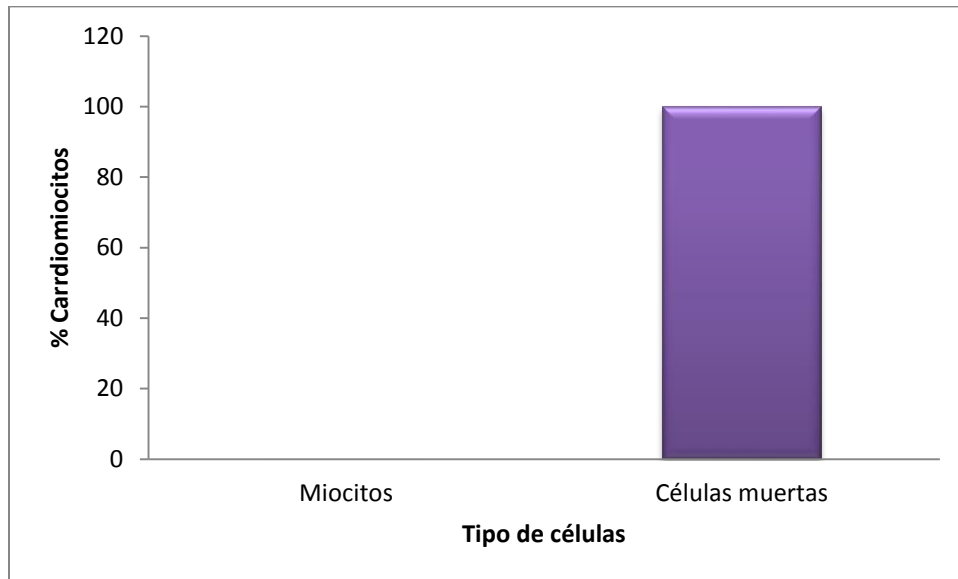


Tabla 2. Resultados del conteo de las células totales por cuadrante. Solución Krebs

Cuadrante	Células totales	Miocitos	% Miocitos	% Células muertas
1	7	0	0	100
2	5	0	0	100
3	5	0	0	0

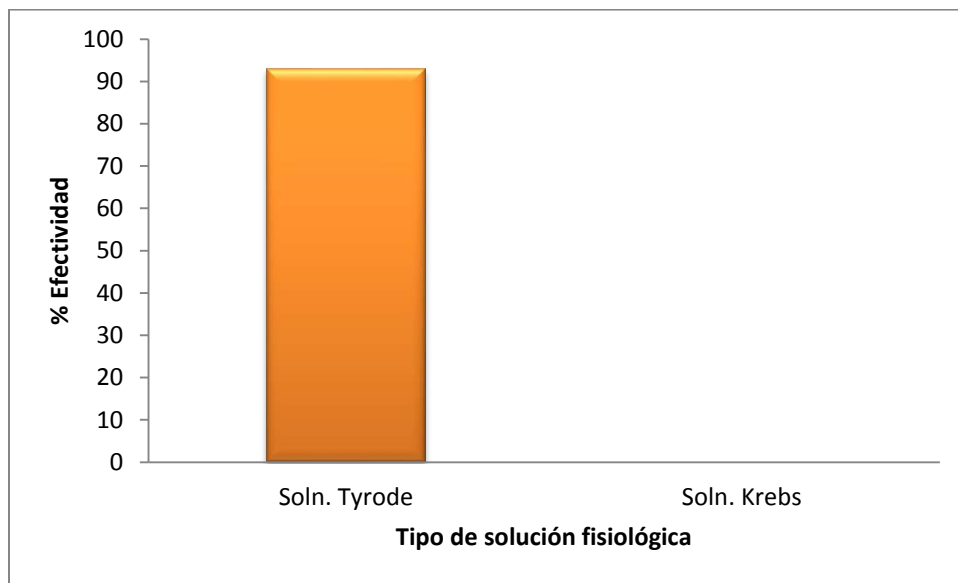
En la gráfica 2 se muestran los resultados del % de cardiomiocitos obtenidos, esto en cuanto a la imagen 2, en función del tipo de células localizadas. Se observa que se tiene nula efectividad en cuanto a la obtención de miocitos, mientras que la obtención de células muertas fue mayor.



**Gráfica 2. Tipos de células localizadas.** Se expresan los resultados en % de cardiomiocitos vs cada tipo de células (Miocitos y Células muertas)



En la gráfica 3 se muestran los resultados del % de efectividad de la obtención de cardiomiocitos, esto en cuanto a la comparación de las soluciones fisiológicas cardíacas utilizadas en el aislamiento de miocitos. Se observa que la solución Tyrode tiene mayor efectividad en cuanto a la obtención de miocitos, mientras que la obtención con solución Krebs, fue nula.

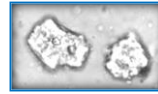
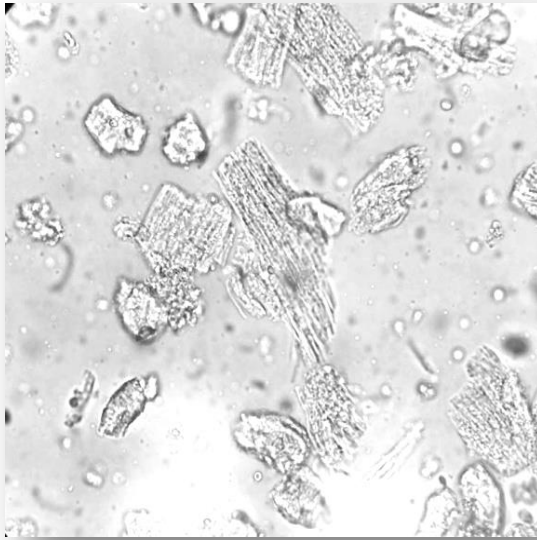


**Gráfica 3. Comparación de las soluciones fisiológicas.** Se expresan los resultados en % de efectividad en cuanto a la obtención de miocitos.

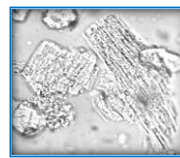


### 5.3 DESCRIPCIÓN MORFOLOGICA

Figura 4. Se observan cardiomiocitos sin vida, así como algunos cardiomiocitos, sin embargo estos no se encuentran con vida y presentan apoptosis, además de que no tienen la conformación típica. Resultados obtenidos con solución fisiológica cardíaca Krebs.

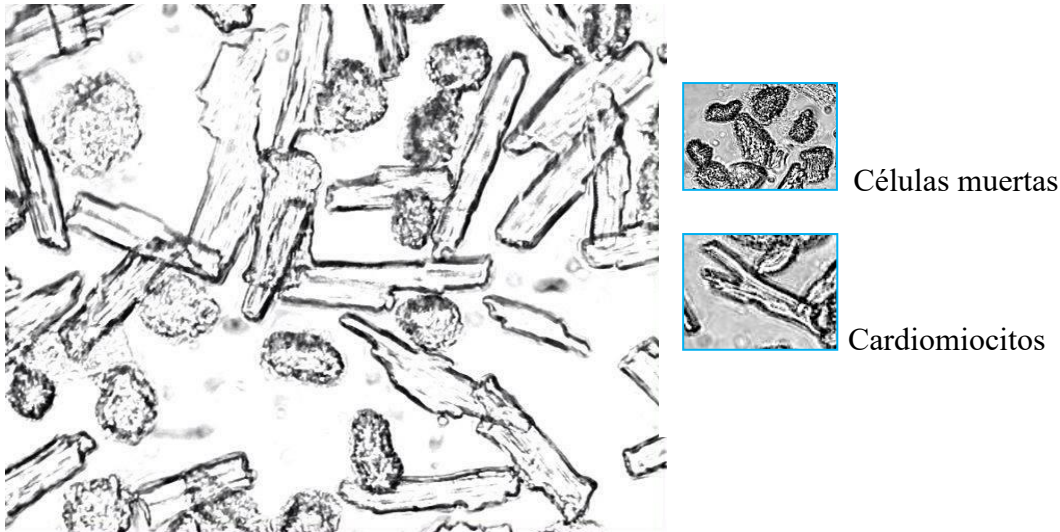


Células muertas



Células estriadas  
que presentan apoptosis

Figura 5. Se observan cardiomiocitos con conformación típica apantalonados y fragmentos celulares de fibroblastos y posiblemente miocitos. Resultados obtenidos con solución fisiológica cardíaca Tyrode.



## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los miocitos, son células terminales, es decir que no pueden proliferar en medios de cultivo y únicamente mantienen sus funciones vitales, por lo que se llevo a cabo el aislamiento de miocitos por la técnica de Langendorff, la cual se fundamenta, con la perfusión del corazón con una solución fisiológica cardíaca. Como se puede observar en la gráfica número 3 –Comparación de las soluciones fisiológicas– se quiso evaluar el efecto de 2 tipos de solución cardíacas, la solución Tyrode y solución de Krebs, para conocer cual de éstas obtiene el mayor rendimiento integrado de los miocitos cardiacos aislados. Observándose un % de 93.12 en solución Tyrode y de 0 en solución Krebs. Esto se puede deber a que la solución de Krebs, es utilizada para la perfusión en el estudio de órganos o tejidos in vitro en el llamado baño de órganos, ésta contiene componentes iónicos de un buffer de fosfatos, además de que necesita un balance de  $O_2$  y  $CO_2$  para mantener el pH. Ésta solución mantiene la presión osmótica del tejido, manteniendo con menores alteraciones biomecánicas, lo que permite que el corazón siga latiendo, cabe mencionar que la solución de Krebs contiene una concentración de calcio de 1 mM lo que favorece la contracción del miocardio.

Por otra parte la solución Tyrode que se oxigena con O<sub>2</sub>, contiene las proporciones adecuadas de electrolitos y glucosa, que puede complementarse con albúmina [25], sin embargo ésta solución contiene HEPES que es un buffer orgánico, utilizado en cultivos celulares, y que es bueno manteniendo el pH fisiológico aún con cambios en la concentración de dióxido de carbono, por lo tanto no requiere necesariamente del balance de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, sólo es necesario oxigenarla. Además de que dicha solución fisiológica está libre de calcio, lo que mantiene a la célula en un potencial de reposo e impide los latidos cardiacos y menores alteraciones biomecánicas lo que favorece a una mejor disgregación de las células.

Las técnicas de aislamiento implican tratamientos agresivos con enzimas proteolíticas como colagenasa, tripsina o proteasa, y esta última es extremadamente activa sobre los miocitos cardiacos. Hasta el momento, la disociación enzimática es la mejor aproximación para obtener miocitos aislados, pero no existe un protocolo único que permita obtener un rendimiento elevado de miocitos vivos (viables) que muestren respuestas fisiológicas estables. [27]

Las células mononucleares se pueden liberar de los tejidos blandos mediante hidrólisis enzimática con enzimas como la colagenasa, tripsina o pronasa, que degradan la matriz extracelular.

Durante la disgregación celular, se utilizaron diferentes enzimas, la colagenasa II y la proteasa IV, la cual no provoca una disgregación total pero es menos dañina para las células a comparación de la tripsina. La proteasa es una enzima proteolítica que actúa rompiendo los enlaces que unen a los aminoácidos de las proteínas facilitando su digestión. Debemos recordar que las proteínas son aquellas que ayudan a mantener y reparar los tejidos. Ésta enzima convierte una molécula de mayor tamaño a una de menor.

La matriz extracelular cardiaca está integrada principalmente por colágeno fibrilar y no fibrilar, así como por fibras de laminina y elastina, proteoglicanos e integrinas. El colágeno fibrilar sirve de andamiaje estructural para los cardiomiocitos y la vasculatura intra miocárdica, a la par que confiere al tejido miocárdico la rigidez que lo hace resistente a la deformación durante el ciclo cardiaco. Además, el colágeno fibrilar conecta los elementos contráctiles de los cardiomiocitos adyacentes, actuando así como un transductor de la

contracción del músculo cardiaco hacia la cámara ventricular [28], razón por la cual se utilizó la enzima colagenasa II, la cual se encarga de la degradación del colágeno tipo I, este tipo de colágeno está presente en los tendones y su principal función es dar estiramiento y resistencia al organismo.

Además de haberse utilizado enzimas para llevar a cabo el aislamiento de miocitos, se utilizó la albúmina, que tiene la capacidad de transportar agua, calcio, cobre y también sustancias no solubles en agua; así como ácidos biliares, AG, bilirrubina, fenoles, aminoácidos aromáticos y sus derivados. Su función en los miocitos aislados es formar una capa proteica entre ellos que impida la acción de las enzimas proteolíticas (esto es porque la albúmina se agrega cuando ya tenemos los miocitos aislados).

Existen biomarcadores que son considerados como moléculas, proteínas o enzimas medibles en plasma, que proporcionan un valor diagnóstico y pronóstico independiente que refleja un estado de enfermedad o trastorno subyacente, éste tipo de biomarcadores pueden ayudar a la determinación de miocitos [29], ya que cuando los miocitos se necrosan, o sufren daño celular importante, pierden la integridad de la membrana y permiten el paso de macromoléculas al tejido intersticial, desde donde son absorbidas por los capilares y el sistema linfático, alcanzando finalmente la circulación sistémica. Estas macromoléculas liberadas de los miocitos reciben el nombre de marcadores biológicos de daño miocárdico [30], esto puede ser utilizado en un futuro o bien se parte de otras investigaciones. Para corroborar que las células muertas corresponden a cardiomiocitos o a fibroblastos, es necesaria la evaluación inmunohistoquímica de un marcador membranal o celular.

## 7. CONCLUSIONES

- En base a los resultados obtenidos en cuanto a la comparación de soluciones fisiológicas, se determina que la solución Tyrode tiene mejor eficiencia en cuanto a la obtención de miocitos, por diferentes características.
- Otro de los objetivos de la investigación era determinar si el aislamiento es mejor que el cultivo de miocitos, lo cual es cierto ya que permite una mejores resultados, además de ser una técnica de menor costo y mejor reproducibilidad, además de que

los miocitos son células terminales, lo que indica que no se pueden proliferar por lo cual dificultaría llevar a cabo un cultivo.

- La técnica de Langendorff es un método que puede ser utilizado para varios fines, esto se puede lograr considerando los factores establecidos, por se llega a la conclusión de que en futuras experimentaciones pueda ser de mejor eficiencia, y permitiría el excluir el uso de animales de laboratorio.

## 8. REFERENCIAS

[1] FERNANDEZ, A. (2009). –Qué es el infarto agudo al miocardio”. Libro de la Salud Cardiovascular. Revisado el 21 de Mayo de 2016 de [http://www.fbbva.es/TLFU/microsites/salud\\_cardio/mult/fbbva\\_libroCorazon\\_cap28.pdf](http://www.fbbva.es/TLFU/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap28.pdf)

[2] INEGI (2013). –Causas de defunción. Defunciones generales de mujeres por principales causas de mortalidad”. Revisado el 27 de Febrero de 2016 de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est&c=23589>

[3] Medicina de Urgencias Primer Nivel de Atención. –Infarto Agudo del Miocardio” Revisado el 21 de Mayo de 2015 de [http://salud.edomexico.gob.mx/html/doctos/ueic/educacion/isque\\_inf\\_mioc.pdf](http://salud.edomexico.gob.mx/html/doctos/ueic/educacion/isque_inf_mioc.pdf)

[4] MARTÍNEZ, M. (2014) –Infarto Agudo al miocardio”. Primera edición. Intersistemas S.A de C.V México. D.F.

[5] VILLAREAL, R. (2002). –Costo de la atención de la hipertensión arterial y su impacto en el presupuesto destinado a la salud en México”. Salud Pública. México. Vol 44. Núm. 1. Revisado el 19 de Mayo de 2015 de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342002000100001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000100001)

[6] RASCOS D. (2004). –La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido”. Vol 45. Núm. 3. Universidad Médica.

- [7] NIGEL PALASTANGA, et. al. (2000). –Anatomía y movimiento Humano. Estructura y funcionamiento”. Barcelona, España. Editorial Paidotribo. Tercera edición. Pp 520
- [8] TRESGUERRES, JESÚS. (2009). –Anatomía y fisiología del cuerpo humano”. España Editorial McGraw-Hill. Primera edición. Pp. 111
- [9] DOMINGUEZ CARLOS. (2012). –Sistema cardiovascular”. Revisado el día 9 de Abril de 2016 de <http://www.uv.mx/personal/cblazquez/files/2012/01/Sistema-Cardiovascular.pdf>
- [10] LÓPEZ, ANTONIO, et. al. (2009). –Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la fundación BBVA”. España. Editorial Nerea. Primera edición. Pp. 35
- [11] SANTIAGO, SANDRA (2014). –Sistema cardiovascular. Anatomía”. Revisado el día 10 de Abril de 2016 de <https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/100/Sistema%20cardiovascular.pdf?1358605522>
- [12] MARIAN, (2006). –Vascularización del corazón. Arterias y venas coronarias. Territorios vasculares”. Revisado el 22 de Mayo de 2016 de <http://www.galeon.com/apuntesytal/coronarias.pdf>
- [13] NAVARRO R. (2005). –Propedéutica clínica y semiología Médica” La Habana Cuba. Editorial Ciencias Médicas. Tomo I.
- [14] NAVARRO, C. (2009). –Organización y diversidad de la biosfera. Desarrollo histórico de la histología”. Revisado el 13 de Julio de 2016 de <http://mural.uv.es/monavi/disco/segundo/histologia/Tema1.pdf>
- [15] FAGAN, SUNTHARESWARAN. (2004). –Lo esencial en sistema cardiovascular”. Madrid. España. Editorial El Sevier. Segunda edición. Pp 15
- [16] HENÁNDEZ, A. (2013). –Histología del corazón”. Cardiomed. Revisado el 13 de Julio de 2016 de <http://www.cardiomedica.es/ccbasicas/histo/index.php>

- [17] RAMÍREZ FRANCISCO. (2009). –Fisiología cardíaca”. Revista Médica MD. Número 3, Volumen I. Revisado el 13 de Julio de 2016 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2009/md093d.pdf>
- [18] DE LA TORRE, ESTEBAN. Et, al. (2000). –Manual de cuidados intensivos para enfermería”. España. Editorial Springer – Verlag Ibérica. Tercera Edición. Pp 75 – 76
- [19] TORTORA, G. (2002). –Principios de anatomía y fisiología”. México. Editorial Médica Panamericana. Novena edición. Pp 643
- [20] AGUILAR, J. (2013). –Aislamiento y crecimiento de células de cultivo”. BioFar. Revisado el 30 de Junio de 2016 de <http://es.slideshare.net/PauloGranda10/aislamiento-y-crecimiento-de-clulas-en-cultivo>
- [21] SEGRETÍN, Ma. Eugenia. (2008). –Los cultivos celulares y sus aplicaciones (Cultivos de células animales) Revisado el 30 de Junio de 2016 de <http://www.argenbio.org/ad/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>
- [22] GONZALEZ, Juan Manuel. (2015). –Introducción al cultivo celular”. Capítulo 1. Tesis. Revisado el 30 de Junio de 2016 de [http://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo\\_celular.pdf](http://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf)
- [23] LOUCH William et.al. (2011). –Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer”. Department of Medicine. Section of Cardiology, Center for Cardiovascular Research. Chigaco. Revisado el 2 de Julio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723873>
- [24] CHORRO J. Francisco. (2008). –Modelos animales de enfermería cardiovascular”. Medicina Cardiovascular traslacional. Servicio de cardiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia. España. Revisado el 1 de Julio de 2016 de <http://www.revespcardiol.org/es/modelos-animales-enfermedad-cardiovascular/articulo/13131362/>
- [25] IBAÑES, Xavier. (2010). –Cuantificación de la complejidad de la fibrilación mediante el aislamiento espacio – temporal de frentes de activación miocárdica”. Tesis. Revisada de

[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13812/tesina\\_xavier\\_%20iba%C3%B1ez.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13812/tesina_xavier_%20iba%C3%B1ez.pdf?sequence=1)

[26] SCHECHTER, MATTHEW. (2014). –An isolated working heart system for large animal models”. Department of Surgery, Duke University Medical Center. Revisado el 10 de Agosto de 2016 de <http://www.jove.com/video/51671/un-sistema-de-trabajo-del-corazon-aislada-por-grandes-modelos-animales?language=Spanish>

[27] ÁLVAREZ, JULIO. (2013). –Efectos de la disociación enzimática sobre las propiedades biofísicas de la corriente de calcio en miocitos ventriculares de rata”. RCCB. Vol. 2. No 1.

[28] BEGOÑA, LÓPEZ, et. al. (2006). –Alteraciones del metabolismo del colágeno fibrilar en la cardiopatía hipertensiva. Situación actual y perspectivas”. Revista Española de cardiología. Vol. 59. Num. 10. Revisado el 15 de Septiembre de 2016 de <http://www.revespcardiol.org/es/alteraciones-del-metabolismo-del-colageno/articulo/13093982/>

[29] FERNANDEZ, EDUARDO. Et. al. (2012). –Biomarcadores cardíacos: presente y futuro”. Revista Colombiana de cardiología. Vol. 19. Num. 6.

[30] LÓPEZ J. (2003). –Troponinas y otros marcadores de daño miocárdico. Mitos y realidades”. Revista Española de cardiología. Vol. 56. Núm. 01.

[31] DE NISCO M. (2014). –Anatomía cardiovascular” Revisado el 11 de Julio de 2016 de <http://es.slideshare.net/migdenisco/corazon-40897664>

[32] GONZÁLEZ, A. (2013). –Fisiología del sistema cardiovascular”. Revisado el 12 de Julio de 2016 de <http://es.slideshare.net/yulixita093/fisiologia-del-sistema-cardiovascular-1>

[33] MARQUEZ, F. (2006). –Infarto agudo al miocardio. Parte 1”. Revista electrónica. Revisado el 12 de Julio de 2016 de <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/294/1/Infarto-agudo-de-miocardio-Parte-1.html>



[34] GOMEZ, S. (2015). –El miocardio: el músculo del corazón” Revisado el 13 de Julio de 2016 de <https://mianatomia.wordpress.com/tag/celula-cardiaca/>

[35] RAMÍREZ F. (2009). –Fisiología cardiaca”. Revista Médica MD. Número 3, Volumen I.

[36] MENESES, A. (2013). –Potencial de acción del corazón”. Revisado el 13 de Julio de 2016 de <http://alanmeneses.blogspot.mx/2013/03/potencial-de-accion-del-corazon.html>

[37] MEDINA J. (2008). –Técnicas de estudio de la célula”. Revisado el 13 de Julio de 2016 de <http://es.slideshare.net/fmedin1/tcnicas-de-estudio-de-la-clula-presentation>