



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de dos sustratos celulares sobre la actividad
espontánea de cardiomiocitos en cultivo**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA :

CARLOS JESÚS TERRÓN DE ALBA



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.

1. Datos del alumno

Terrón

de Alba

Carlos Jesús

53-68-11-31

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304168167

2. Datos del Tutor

Dra.

Gertrudis Hortensia

González

Gómez

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Tatiana

Fiordelisis

Coll

4. Datos del sinodal 2

M. En. C.

Daniel

Díaz

Espinosa de los Monteros

5. Datos del sinodal 3

Biol.

Pedro David

Segura

Chama

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Laura Adriana

Oropeza

Ramos

ÍNDICE	Página
➤ I. ABREVIATURAS.....	3
➤ II. RESUMEN.....	4
➤ III. INTRODUCCIÓN.....	6
• 1. El sistema cardiovascular y el corazón.....	6
• 2. Estructura del corazón y del ventrículo.....	9
• 3. Desarrollo embrionario del corazón.....	17
• 4. Miocitos y cardiomiocitos.....	20
• 5. Acoplamiento y excitación de cardiomiocitos ventriculares.....	25
• 6. El Ca^{2+} importancia y dinámica en cardiomiocitos ventriculares...	29
• 7. Matriz extracelular y cardiomiocitos.....	33
➤ IV. HIPÓTESIS.....	36
➤ V. OBJETIVOS.....	37
➤ VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
• 1. Obtención y disección del corazón.....	38
• 2. Disociación enzimática.....	38
• 3. Elaboración de plataformas de PDMS.....	40
• 4. Registro óptico con microscopía de fluorescencia.....	41
• 5. Análisis de resultados.....	42
• 6. Tinción de Accusant.....	42
➤ VII. RESULTADOS.....	44
• Viabilidad y caracterización de los cultivos sobre micro plataformas PDMS.....	44
• Tinción de Accusant y micro plataformas de PDMS.....	49
• Cultivos desarrollados sobre adherente celular BSA.....	48
• Cultivos desarrollados sobre adherente celular Poly-L-lisina.....	48
• Comparación del efecto de los adherentes celulares sobre la actividad de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ del cultivo de cardiomiocitos.....	52
• Análisis estadístico de los patrones de actividad del cultivo.....	57
➤ VIII. DISCUSIÓN.....	64
• Inter-relación MEC-Cardiomiocito.....	64
• Estructura de los adherentes celulares: BSA y Poly-L-lisina.....	67
• Caracterización del número de picos y área bajo la curva en los diferentes adherentes celulares.....	70
➤ IX. CONCLUSIONES.....	75
➤ X. PERSPECTIVAS.	76
➤ XI. REFERENCIAS.	77

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo.
• SA	Nodo sinusal.
• AV	Nodo Auriculoventricular.
• AD	Aurícula derecha.
• VI	Ventrículo izquierdo.
• VD	Ventrículo derecho.
• EC	Excitación contracción
• ECG	Electro cardiograma.
• HH	Guía Hamburger & Hammlton.
• MEC	Matriz extracelular.
• SR	Retículo Sarcoplasmico.
• RyR	Receptores de ryanodina.
• LCIC	Liberación de Calcio inducida por Calcio.
• SERCA	Calcio ATPasa.
• NCX	Intercambiador sodio/calcio.
• CaM	Calmodulina.
• PKA	Proteína cinasa.
• $[Ca^{2+}]_i$	Calcio intracelular.
• BSA	Albúmina de suero bovino.
• PDMS	Polidimetilsiloxano.
• ROI	Región de interés .
• UA	Unidades arbitrarias.
• IP ₃	Inositol trifosfato.

Resumen

Efecto de dos sustratos celulares sobre la actividad espontánea de cardiomiocitos en cultivo.

La frecuencia de contracción cardíaca no es estrictamente periódica, puesto que presenta variaciones que responden a diferentes estadios de desarrollo embrionario y estímulos fisiológicos. Muchos de estos estímulos son mediados por el sistema nervioso autónomo y otros por el sistema endócrino. Sin embargo, se ha demostrado que en cardiomiocitos aislados, existe una variabilidad intrínseca de la actividad excitable. Se ha propuesto que la interacción entre célula y Matriz extracelular (MEC) está involucrada directamente con la variabilidad de la actividad fisiológica de la célula por señales mecano-eléctricas relacionadas con: elasticidad, actividad excitable, forma, disposición y estructuras intracelulares que influyen sobre las interacciones químicas. En este trabajo, se realizó un análisis comparativo entre dos adherentes celulares (BSA y Poly-L-lisina) con el fin de contribuir al entendimiento de la relación célula-MEC, y las repercusiones sobre los patrones de actividad espontánea de cardiomiocitos ventriculares de pollo con siete días de desarrollo "in ovo".

A los embriones de pollo se les extrajo el corazón para obtener células sólo del tercio apical inferior (ventrículo), para desarrollar cultivos primarios. Las células ventriculares se disociaron enzimáticamente con la finalidad de realizar monocapas tisulares, las células fueron cultivadas sobre dos diferentes adherentes celulares en dispositivos de PDMS generando patrones intrincados y/o contracciones simultáneas. Los registros de las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia e imagenología del indicador sensible a Ca^{2+} Fluo-4 AM con una cámara digital CCD (Princeton instrument Inc.) y en un microscopio de fluorescencia invertido Leica (DM-IRB), posteriormente se eligieron las regiones de interés (ROI) y se graficaron para analizar los patrones de respuesta a través de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ a nivel individual, regional y global.

Con este protocolo y bajo las condiciones experimentales expuestas, se encontró que los cardiomiocitos reorganizados "*in-vitro*" adquieren diversos patrones de actividad espontánea, diferenciables espacialmente. Patrones vinculados con los diferentes adherentes celulares.

Nuestros resultados son una primera aproximación para caracterizar el efecto de los componentes de la MEC sobre los patrones intrincados de actividad espontánea, observados en cultivo primario de cardiomiocitos embrionarios.

Introducción

1. El sistema cardiovascular y el corazón

El sistema cardiovascular es uno de los sistemas más importantes para el organismo, su principal función es aportar sangre enriquecida con O₂, glucosa y otras sustancias (aminoácidos, hormonas y lípidos) requeridas, a concentraciones fisiológicas apropiadas para células, tejidos y órganos. Así como remover el CO₂ y otros desechos metabólicos. Sin este recambio no se pueden cumplir las actividades fisiológicas de manera adecuada. El sistema cardiovascular está compuesto por corazón, vasos sanguíneos y sangre. Formando así un sistema cerrado (tanto en aves como en mamíferos), puesto que la sangre viaja únicamente a través de venas, vénulas, arterias, arteriolas y capilares sin salir del sistema: las venas se encargan de colectar sangre desoxigenada y transportarla de vuelta al corazón para ser enviada a una red de capilares ubicada en los pulmones, donde se oxigena la sangre. Mientras que las arterias se encargan de transportar sangre oxigenada (Tortora & Derrickson, 2010).

El corazón es el órgano central del sistema cardiovascular y el primer órgano funcional durante el desarrollo embrionario encargado de impulsar sangre oxigenada a todas las partes del cuerpo mediante una secuencia de contracciones musculares ordenadas (Fig. 1). En aves, el corazón presenta una masa proporcional a su masa corporal, dada por la relación $M_h = 0.014M_b^{0.91}$ donde M_h es la masa del corazón y M_b es la masa corporal (Causey Whittow, 2000). El corazón de aves y mamíferos es un órgano hueco y dividido internamente en cuatro cavidades, dos aurículas y dos ventrículos, cavidades en las que se sucede un ciclo cardíaco constituido por dos eventos; un periodo de relajación (diástole) y uno de contracción (sístole). Brevemente el ciclo cardíaco es iniciado por un periodo sistólico originado por un cambio espontáneo en el potencial eléctrico proveniente de un marcapaso ubicado en la pared superior lateral de la aurícula derecha, bajo la vena aorta, región

conocida como Nodo Sinusal (SA) o marcapaso (Guyton, 2006; Tortora & Derrickson, 2010).

La despolarización producida en el SA (Fig. 1), se propaga rápidamente por ambas aurículas, cruza a través del nodo auriculoventricular (AV), enseguida llega al “haz de His” alcanzando finalmente a los ventrículos mediante las fibras de Purkinje que inducen la contracción ventricular. Durante el periodo diastólico que completa el ciclo cardiaco hay una relajación isométrica propiciando el incremento de volumen sanguíneo (llenado de sangre del corazón), que durante el siguiente periodo sistólico se impulsará esta sangre al resto del organismo (Fig. 1) (Guyton, 2006; Tortora & Derrickson, 2010).

En aves, el corazón se ubica en la parte ventral de la cavidad torácico-abdominal entre los sacos aéreos sobre el hígado, cerca de la línea media de la caja torácica, ligeramente orientado a la derecha y envuelto por una membrana delgada y fibrosa llamada pericardio. El pericardio se encuentra sujeto al esternón, hígado y sacos aéreos (Causey Whittow, 2000). Dos terceras partes del corazón se encuentran dispuestas del lado izquierdo del esternón y la parte restante se ubica del lado derecho, cuenta con una forma más o menos cuneiforme y la disposición de su ápice (vértice) es hacia delante, abajo y a la izquierda. El extremo superior se dirige hacia atrás, arriba y a la derecha. (Sundberg-cohon, n d).

El corazón se compone por tres capas de tejido: 1) Epicardio, 2) Miocardio y 3) Endocardio (Fig. 2) (Tortora & Derrickson, 2010).

1) Epicardio, capa externa formada por mesotelio y un delicado tejido conectivo. 2) Miocardio, capa intermedia compuesta a su vez por tres capas de músculo, cual contiene estructuras importantes incluidas como lo son el sistema de conducción y nodos. 3) Endocardio, capa interna de tejido conectivo que cubre las cámaras cardiacas y se encuentra en contacto directo con la sangre (Fig. 2) (Tortora & Derrickson, 2010).

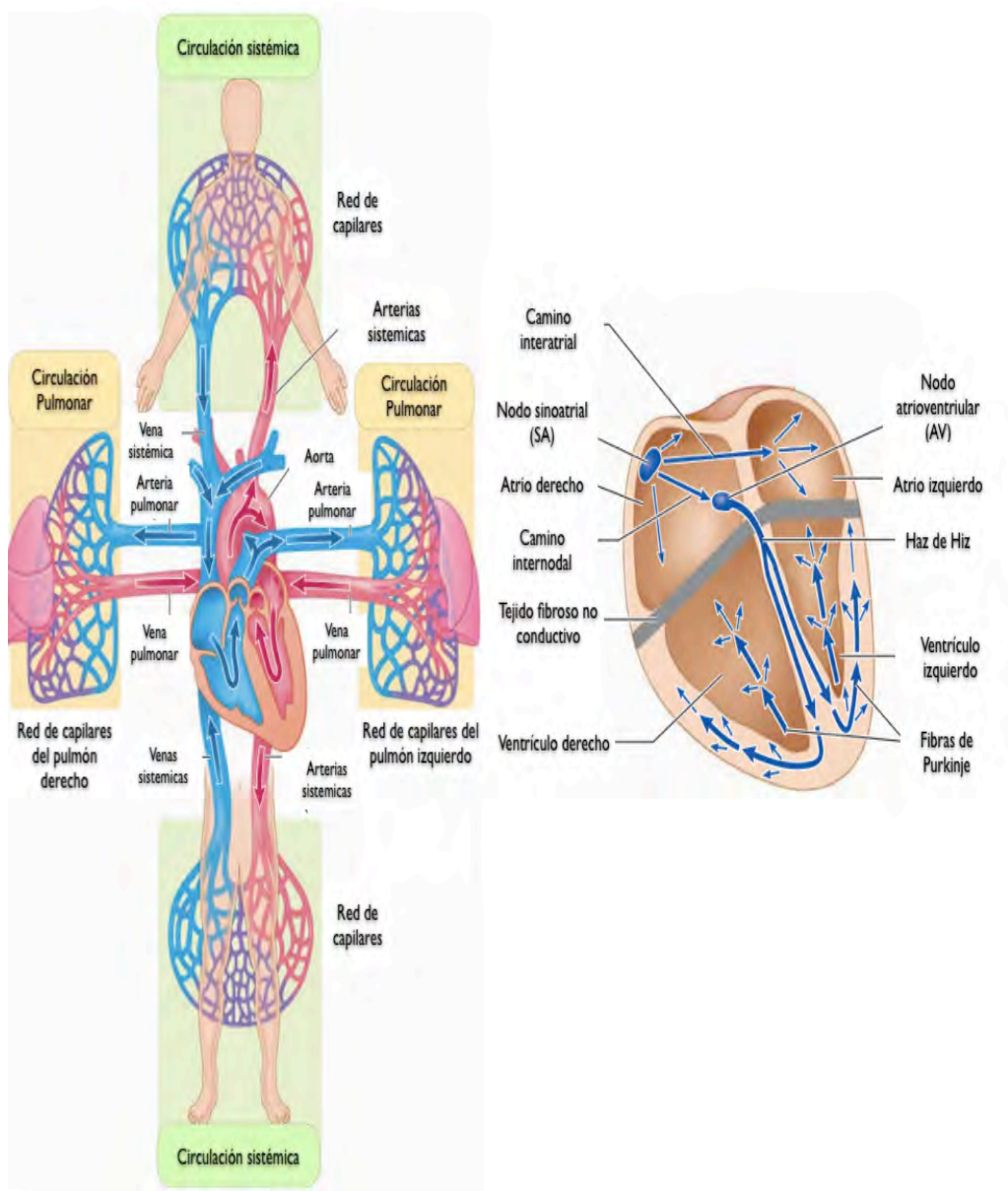


Fig 1. A la izquierda se muestra un esquema del corazón, órgano central del sistema circulatorio, con sus dos circuitos sanguíneos: el de circulación pulmonar y de circulación sistémica; los vasos se pueden diferenciar en dos tipos las arterias (rojo) encargadas de transportar sangre con niveles fisiológicos de oxígeno a todo el cuerpo, y venas (azul) encargadas de transportar la sangre con niveles bajos de oxígeno hacia el corazón, para que ésta sea oxigenada en la red de capilares que atraviesan los pulmones. En el esquema del lado derecho se muestra un corazón con sus cuatro cavidades y los puntos por donde cruza el sistema de conducción (azul), que propaga los potenciales de acción hacia todo el corazón, generando los periodos de sístole y diástole ordenadamente.

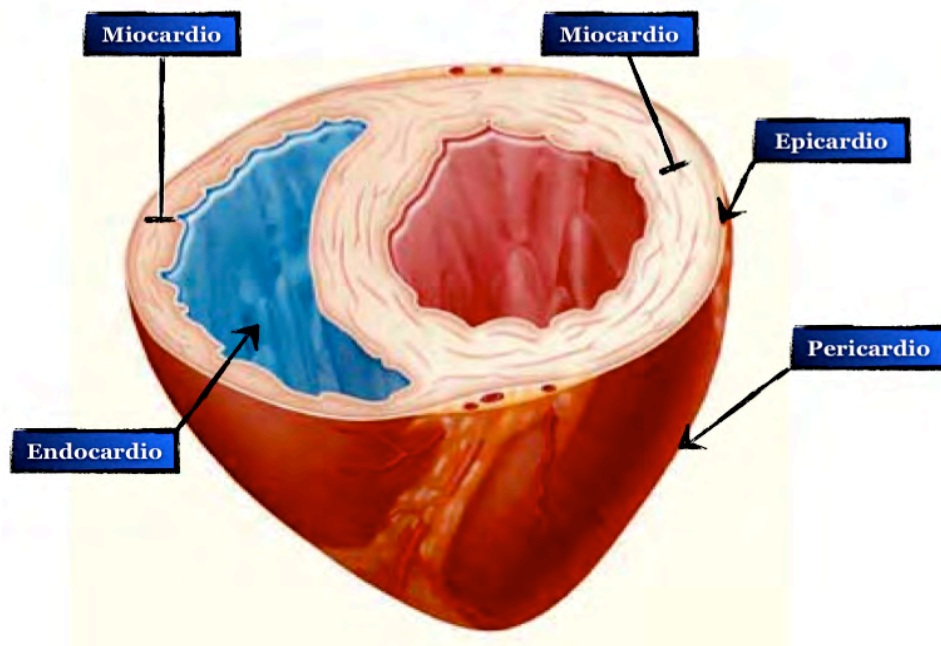


Fig 2. Corte transversal del corazón, se muestran las capas de tejido que lo integran; el epicardio, miocardio, capa intermedia y más abundante del corazón, endocardio, que recubre las cámaras cardíacas y el pericardio, capa serosa externa encargada de recubrir el corazón.

2. Estructura del corazón y ventrículo

En aves y mamíferos, el corazón está dividido en cuatro cámaras completamente separadas; dos aurículas ubicadas en la parte superior y dos ventrículos (Fig. 3) ubicados en la porción inferior, que a su vez se subdividen en: Aurícula izquierda (AI), Aurícula derecha (AD), Ventrículo izquierdo (VI) y Ventrículo derecho (VD) (Sundberg-cohon, n.d.). Cámaras que permiten su funcionamiento como bomba dual, en el AD se recibe la sangre con niveles bajos de O_2 (venosa), que es enviada hacia el VD para pasar a la red de capilares pulmonares, en donde se oxigenará la sangre y regresará a la AI para ser enviada al VI y pasar al sistema de sangre con niveles fisiológicos de O_2 (arterial) hacia los tejidos y órganos con gran fuerza (Sherwood, 2007).

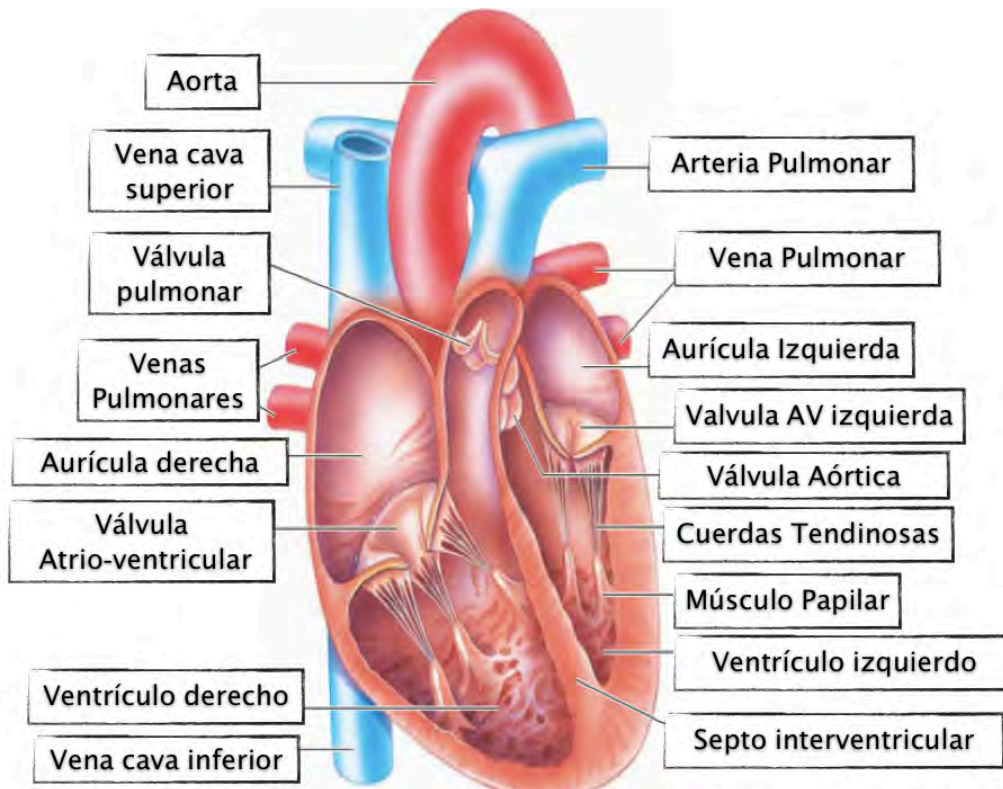


Fig 3. En la figura se observa la localización esquemática de las cámaras cardíacas; Aurícula derecha (AD), Aurícula izquierdo (AI), Ventriculo derecho (VD) y Ventriculo izquierdo (VI). Válvulas, Venas y Arterias .

Las aurículas y ventrículos presentan diferencias anatómicas entre ellas. La AD, tiende a ser más grande que la AI, los ventrículos con respecto a las aurículas presentan paredes cardíacas más gruesas, aun así las aurículas presentan un empaquetamiento muscular grueso en forma de arcos, cuya contracción permite el paso de sangre hacia los ventrículos (Causey Whittow, 2000). La estructura ventricular por el contrario es más compleja que la auricular. Los ventrículos presentan paredes musculares muy gruesas, puesto que es donde se genera la mayor parte del trabajo de contracción cardíaca, con esta contracción la sangre es enviada al resto del organismo. También hay grandes diferencias anatómicas entre los ventrículos, el VI es el de mayor tamaño es de dos a tres veces mayor que el VD, se extiende al ápice del corazón y su pared derecha forma el septo interventricular. Las paredes de los ventrículos están desarrolladas con geometrías diferentes, el

radio de la curvatura del VI es mucho menor que el derecho (Causey Whittow, 2000; Tortora & Derrickson, 2010).

El tejido cardiaco está compuesto por fibras musculares que presentan algunas variantes según la zona, las fibras musculares cardiacas comúnmente son mucho más cortas en comparación a las fibras musculares esqueléticas. Las medidas de estas fibras musculares cardiacas van de 50-100 μm de largo con un diámetro de 14 μm , en los extremos éstas se unen a con ayuda de los discos intercalares (engrosamientos transversales del sarcolema), desmosomas y uniones eléctricas ("gap") que permiten la unión de las fibras musculares cardiacas con otras al encontrarse en contacto. El contacto adecuado de las fibras favorece a una conducción apropiada de los potenciales de acción (PA) entre las fibras cardiacas (C. A. Smith & Wood, 1998; Tortora & Derrickson, 2010). El tejido del miocardio difiere un poco entre aves y mamíferos. Las fibras musculares cardiacas en aves tienen menor diámetro que las del mamífero, las células del miocardio en aves presentan una medida de 2-7 μm de diámetro mientras que en mamíferos van de 10-15 μm y los túbulos-T en aves son escasos en comparación a los mamíferos. (Causey Whittow, 2000).

El corazón cuenta con una red de fibras auto-excitables (Fig. 4), encargadas de efectuar y propagar la actividad eléctrica intrínseca y rítmica en todo el órgano, PA que generan el latido del corazón. Estas fibras envían potenciales de acción de manera continua induciendo contracciones musculares periódicas y coordinadas. Las fibras nodales auto-excitables (Fig 4) presentan tres funciones importantes: 1) actúan como marcapasos, determinando el ritmo de la excitación que origina la contracción, 2) forman parte del sistema de conducción, red que asegura que las cámaras cardiacas tengan una contracción coordinada y 3) presentan una propiedad de auto-excitabilidad, que permite generar PA de manera continua y rítmica aún fuera del sistema; es decir, su actividad es miogénica (Tortora & Derrickson, 2010). Existen dos tipos de células cardiacas especializadas que permiten el trabajo ordenado del corazón; "células contráctiles" o excitables encargadas del trabajo mecánico,

pero no de la activación de PA y “células autorritmicas” o autoexcitables encargadas de iniciar los PA marcapaso o potenciales marcapaso. (Grunow, Wenzel, Terlau, Gebert, & Kruse, 2011; Sherwood, 2007).

Los PA en células auto-excitables en el corazón (Fig. 8) se deben a una interacción compleja de diferentes mecanismos iónicos, producidos por cambios en el gradiente de concentración iónica a ambos lados del sarcolema, particularmente de los iones K^+ , Na^+ y Ca^{2+} . Este tema se abordará con mayor detalle en la sección 5. “Acoplamiento y excitación de cardiomiocitos ventriculares”.

Los PA en cardiomiocitos auto-excitables son enviados con cierto orden a través del sistema de conducción para su propagación. A lo largo del órgano cruzan por cuatro sitios específicos (Fig. 4 y Tabla 1); (1) los PA que se originan en el SA y se propagan a las aurículas, (2) los PA originados en el SA que son dirigidos al nodo AV, (3) para dirigirse al Haz de His y (4) finalmente arribar a las fibras de Purkinje (Sherwood, 2007; Tortora & Derrickson, 2010).

Recapitulando, la excitación cardíaca inicia en el nodo SA, ubicado en la AD, justo debajo de la desembocadura de la vena cava superior. Los PA generados por el nodo SA viajan a través de ambas aurículas produciendo las contracciones (Pennisi, Rentschler, Gourdie, Fishman, & Mikawa, 2002; Tortora & Derrickson, 2010). Mientras tanto los PA procedentes del nodo SA, llegan al nodo AV situado en el tabique inter-auricular (Fig. 4), espacio único por donde estos potenciales pueden pasar hacia los ventrículos, puesto que el tabique AV es aislante eléctrico. En seguida del nodo AV se encuentra la red de fibras de conducción especializadas. La baja velocidad de conducción de las células del nodo AV permite el llenado de las cámaras y asegura la repolarización de las aurículas para su adecuada contracción (Tabla 1). El nodo AV filtra la cantidad de PA a los ventrículos. Además, si el nodo SA llegara a fallar, el nodo AV puede actuar como un marcapaso secundario (Pennisi et al., 2002; Sherwood, 2007).

Los PA procedentes del nodo AV llegan al haz de His el cual es una red especializada en la conducción rápida de potenciales de acción hacia el tejido ventricular (Fig. 4 y Tabla 1) (Sherwood, 2007; Tortora & Derrickson, 2010; Walker, 1999).

Los PA que se han propagado en el haz de His llegan a las fibras de Purkinje (Tabla 1) y son conducidos rápidamente hasta el vértice del corazón y desde ahí hacia el resto del miocardio ventricular, promoviendo la contracción ventricular hacia el centro del corazón. Las fibras del haz de His están ampliamente distribuidas en los ventrículos izquierdo y derecho mediante ramificaciones de estas fibras especializadas (Tortora & Derrickson, 2010).

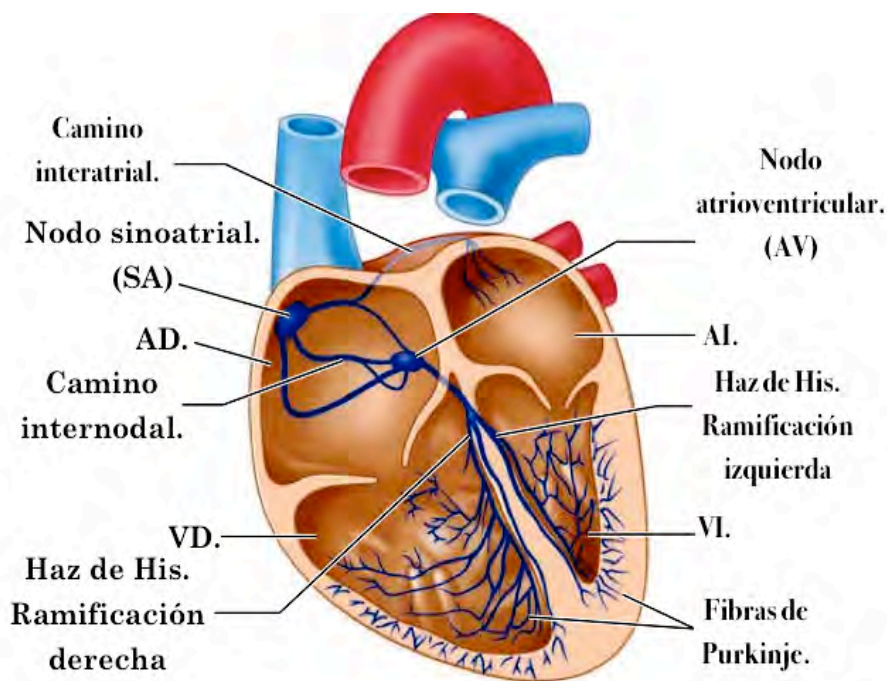


Fig. 4 Sistema de conducción del tejido cardíaco (azul). En la figura se muestran los puntos por donde corren los potenciales marcapaso del corazón; dirigiéndose del Nodo sinusal (SA), para dar paso al nodo auriculoventricular (AV), donde se genera un retraso para dirigirse a las ramificaciones del Haz de His y finalmente alcanzar a las fibras de Purkinje que transmitirán el potencial de acción por todo el ventrículo.

Tabla 1: sistema de conducción del corazón

Estructura	Localización	Función	PA / minuto	Velocidades de conducción
Nodo sinoatrial (SA).	Aurícula derecha, debajo de la vena cava.	Inicia la excitación cardíaca por oscilaciones del potencial de membrana (marcapaso)	70-80.	0.5 cm/seg.
Nodo atrioventricular (AV).	Tabique interauricular, delante de la desembocadura del seno coronario.	Arribo de PA auriculares y marcapaso, conducción lenta y retardo	40-60.	0.5 cm/seg.
Haz de His.	Se origina del AV, extendiéndose por el septo interventricular.	Conduce los PA provenientes del nodo AV a fibras de Purkinje y hacia los ventrículos	20-40.	10 cm/seg.
Fibras de purkije.	Se extienden del haz de His, hacia el miocardio ventricular mediante ramificaciones.	Conduce los PA hacia el vértice cardíaco y desde ahí hacia el resto del miocardio ventricular, inicia la contracción ventricular.	20-40.	40 cm/seg.

Tabla 1. Se describe la propagación de la actividad eléctrica normal a través del corazón, así como sus velocidades de conducción y sitios donde se generan los potenciales de acción (PA).

En cardiomiocitos, el potencial de reposo de membrana es aproximadamente de -90mV . Como se mencionó para que las células contráctiles alcancen el umbral de excitación existen una serie de mecanismos complejos que involucran la participación de diferentes canales iónicos activados por voltaje, principalmente de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} (L, T y P/Q), que participan en el proceso de excitación-contracción (EC). El perfil de los potenciales de acción de los cardiomiocitos típicamente presentan tres fases: despolarización, meseta y re-polarización (Fig 8.) (Sherwood, 2007; Tortora & Derrickson, 2010; Walker, 1999).

A medida que los PA se propagan, se generan corrientes eléctricas y cambios de potencial, que pueden ser registrados mediante un electrocardiograma (ECG). El ECG es una composición vectorial del promedio de todos los PA producidos por las diferentes regiones del corazón. Es un trazo continuo que se divide artificialmente en segmentos: “onda P” corresponde a la despolarización auricular propagada del SA a través de las fibras contráctiles a ambas aurículas hacia el nodo AV en aproximadamente 0.03 s , el “complejo QRS” representa la despolarización rápida de los ventrículos a medida que avanzan los potenciales de acción en el sistema de conducción, la “onda T”, representa la repolarización ventricular durante el proceso de repolarización sostenida (el ECG permanece plano). Finalmente durante el “intervalo P-Q”, representa el tiempo entre el comienzo de la onda P y el segmento QRS. Por lo que el ECG representa el tiempo de conducción desde el comienzo de la excitación auricular hasta la despolarización ventricular (tiempo requerido para que el potencial de acción proveniente del nodo AV viaje de la aurícula hacia las fibras de Purkinje) (Fig 5.) (Sherwood, 2007; Tortora & Derrickson, 2010; Walker, 1999).

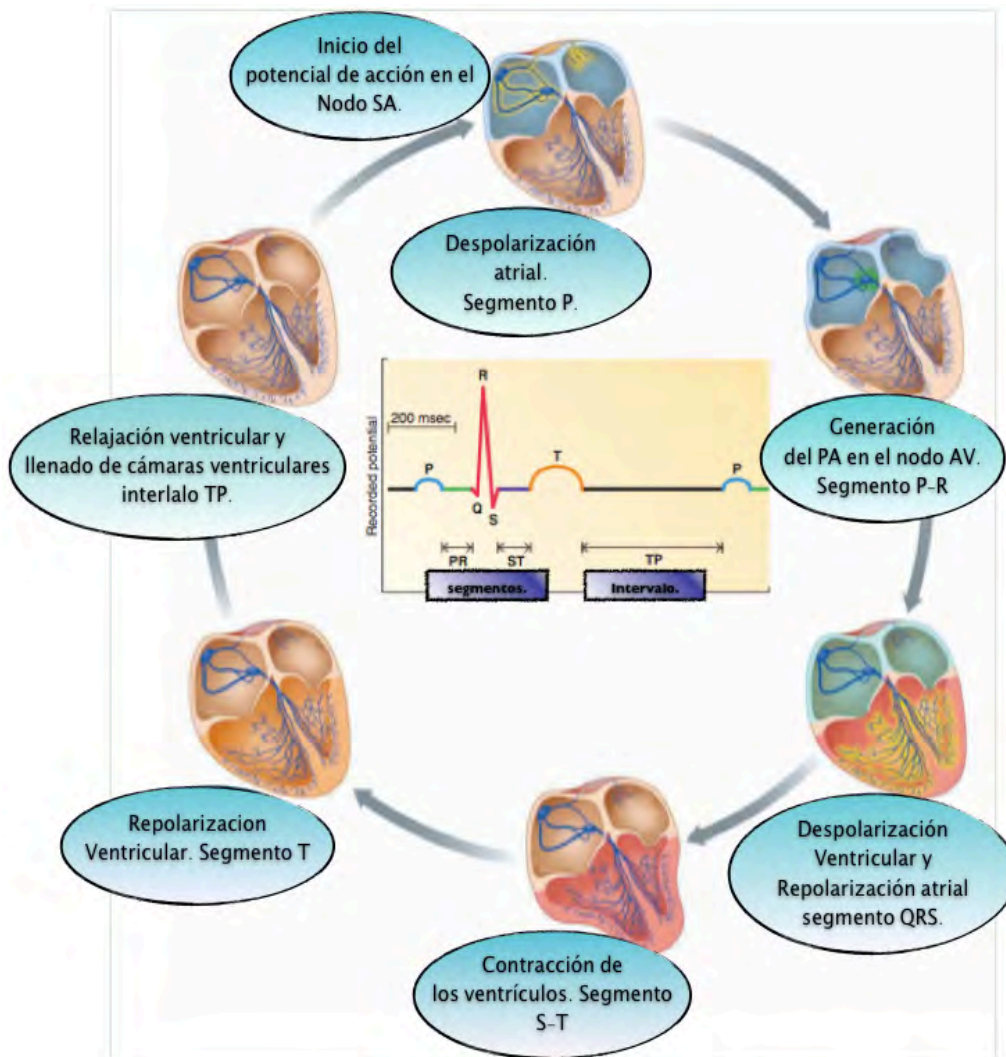


Fig 5. Ciclo cardíaco y el ECG, se presenta la propagación de los PA a través del sistema de conducción especializado del corazón. La contracción inicia con un PA en el nodo SA, que se propaga hacia el nodo AV, después de un retraso continúa hacia los ventrículos por el haz de His y fibras de Purkinje, lo que resulta en la contracción cardíaca. A medida que viaja el PA ocurre la repolarización. En el centro se observa un electrocardiograma (ECG), destacando los segmentos (P, Q, R, S y T), segmento "P" marcado de azul -depolarización del SA, segmento "PR"- PA del nodo AV, propagación hacia el haz de His - segmento QRS marcado de rojo, el segmento S-T, contracción de los ventrículos y el segmento T repolarización ventricular. El intervalo T-P muestra el periodo refractario (relajación ventricular) para iniciar un nuevo ciclo cardíaco.

3. Desarrollo Embrionario del Corazón

Durante el desarrollo embrionario, el primer órgano funcional es el corazón, este se desarrolla a partir del mesodermo esplácnico (Fig. 6), en respuesta a señales químicas provenientes del endodermo. Inicialmente el corazón es un sistema tubular muy rudimentario en comparación a un corazón totalmente desarrollado. El sistema tubular inicial dará origen en un futuro a un corazón tetracavitario, por una serie de señalizaciones químicas entre células y tejidos que propician los cambios morfológicos del corazón. Durante el desarrollo embrionario se mantiene una coordinación de espacio y tiempo permitiendo cumplir con las funciones vitales a pesar del constante remodelado y plegamiento del corazón primigenio (Gilbert, 2003; Tortora & Derrickson, 2010; Wagner & Siddiqui, 2007).

El mesodermo cardiogénico o esplácnico, se diferencia en distintos tipos celulares (miocitos auriculares y ventriculares, células endoteliales, fibroblastos, células endocárdicas y fibras de purkinje) durante el plegamiento asa. La posición anterior del mesodermo visceral experimenta gradualmente una neurulación que da como resultado una cavidad pericárdica (Fig 6. A-C); Las células ventriculares se diferencian antes que las auriculares. Se sabe que la diferenciación celular del corazón ocurre de manera independiente por fusión pareada del primordio, es decir, todos los procesos se realizan de manera simétrica (Gilbert, 2003).

Las células cardiacas migran de la porción lateral del mesodermo (Fig. 5 B)) para quedar entre el ectodermo y endodermo en la línea media del embrión, manteniendo contacto con las dos capas germinales. En embrión de pollo estas migraciones se generan durante las primeras 18-20 horas. Durante las migraciones celulares aumenta la expresión de N-cadherinas en las células, mientras que en otra pequeña población se reduce la expresión, esta última origina el endocardio, venas y secreta proteínas que regulan el crecimiento de las paredes del mismo, mientras que la otra porción de células dan origen

a las paredes del miocardio (musculatura del corazón), parte fundamental para la propulsión de la sangre del corazón hacia el organismo.

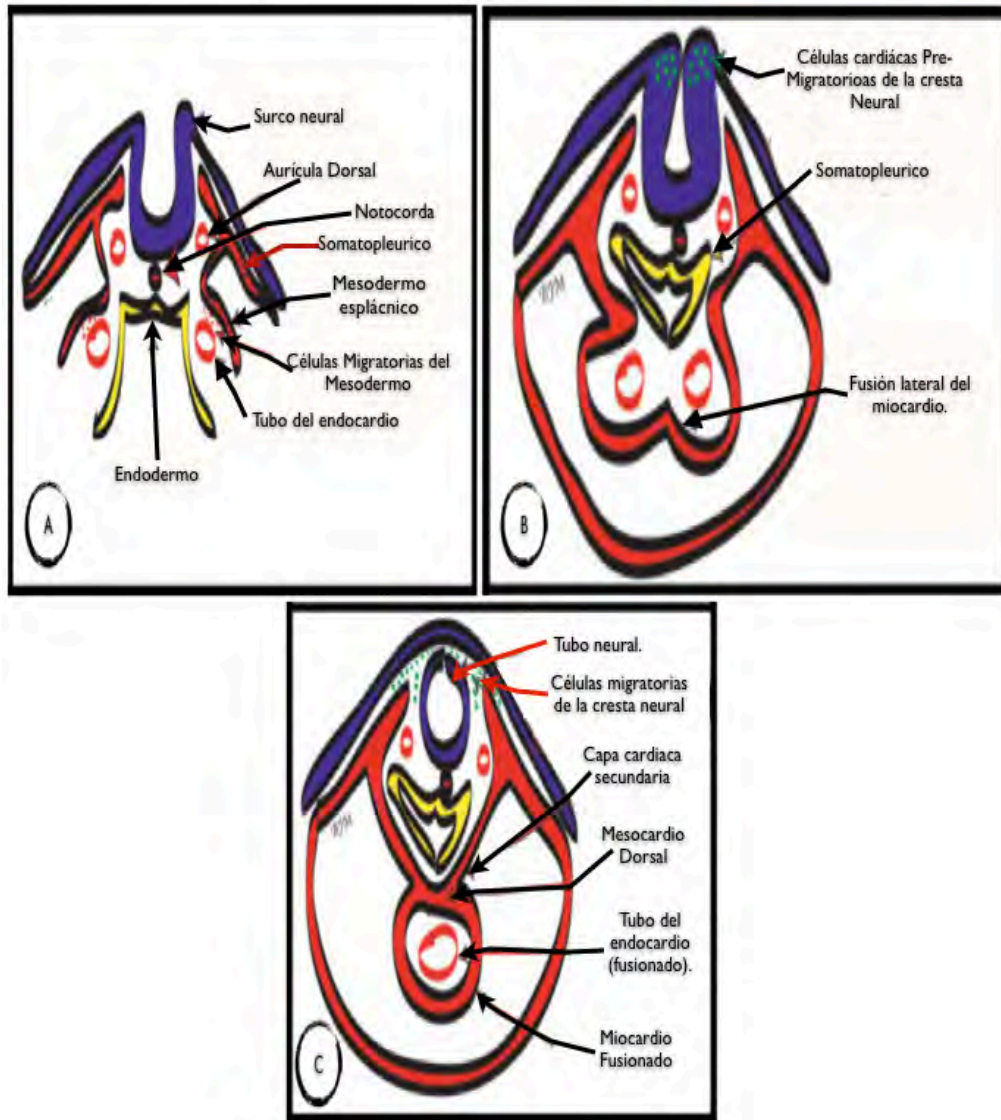


Fig 6. Capas embrionarias, en las cuales se observa una secuencia de la formación del tubo cardíaco el cual da origen al corazón. A) se muestran principalmente las capas embrionarias y células migratorias antes de la formación del tubo cardíaco, el mesodermo esplácnico (Rojo) es el que da origen al tejido cardíaco. B) se observa el inicio de la fusión del mesodermo que origina la pared del miocardio. C) se representa la fusión del mesodermo esplácnico, en el cual se observa el tubo endocárdico fusionado y el miocardio fusionado.

Mientras avanza la neurulación se produce una serie de plegamientos del mesodermo esplácnico, movimientos que permiten que los dos tubos cardíacos se unan (Fig 5. B y C), con lo que eventualmente el miocardio se

fusionará para originar un tubo simple (Fig 6. c) (origen bilateral del corazón) dando como resultado una condición llamada “*cardia bifida*”. Cavidad tubular que contiene una pared doble compuesta por endocardio, miocardio. Con el paso del tiempo ésta se fusiona formando un tubo único; el endocardio también se encuentra dentro de este tubo (pared interna) y se fusiona eventualmente. Esta fusión ocurre aproximadamente a las 29 horas de desarrollo del pollo, y originará un tubo único que sufrirá una serie de plegamientos conocidos como “plegamiento en asa” con lo que se originarán las diferentes cavidades cardiacas (Gilbert, 2003; Wagner & Siddiqui, 2007).

La porción restante del endocardio sin fusionar, abre camino a las venas vitelinas del corazón, permitiendo el transporte de sangre y nutrientes mediante contracciones hacia el “*seno venoso*” por un sistema tubular con contracciones llamado “*truncus arteriosos*”. Este sistema tubular tiene la capacidad de bombear sangre aun antes de que se vuelva un corazón totalmente desarrollado, por ello en cultivo celular primario de siete días las células tienen capacidad inherente de contracción y facilidad para formar uniones capaces de soportar el fenómeno de excitación-contracción (*in vitro*) (Gilbert, 2003; Martinsen, 2005a). En el embrión, estas contracciones son reguladas por PA, que en el caso del embrión de pollo de siete días de desarrollo puede registrarse como un electrocardiograma aproximado al de un pollo adulto (Bub, 2004; Gilbert, 2003; Wagner & Siddiqui, 2007).

En el tercer día de desarrollo *in ovo*, el corazón es un sistema tubular dividido en dos cámaras (aurícula y ventrículo), con un ciclo cardiaco bien definido, donde la sangre entra por una cámara cardiaca y es bombeada a través de la aorta; la separación de aurícula y ventrículo es dirigida por factores de transcripción específicos (Nkx2-5 y MEF2C). El corazón evoluciona de una posición inicial antero-posterior, a una posición izquierda-derecha. La porción que originará el ventrículo derecho queda delante de la que se convertirá en ventrículo izquierdo, estos plegamientos depende de señales proteicas específicas (Nodal y Lefty-2) (Gilbert, 2003; Männer, 2000).

En general el desarrollo del corazón en pollo es similar al de los humanos; sin embargo el tiempo de gestación en pollo tiene una duración de 21 días, divididos en 46 estadios de desarrollo del corazón de acuerdo a la guía Hamburger y Hamilton (HH). En el día 7 de desarrollo "*in-ovo*" el corazón embrionario de pollo se encuentra en un estadio 31-32 HH, el cual se caracteriza por tener poca diferenciación en los sistemas de conducción, debido a que en esta fase se inicia la diferenciación de las células marcapasos de los nodos AV y SA. Sin embargo, morfológicamente ya se encuentran divididas las cámaras cardíacas (Bub, 2004; Gilbert, 2003; Wagner & Siddiqui, 2007).

El sistema de conducción en siete días de desarrollo, es sistemáticamente funcional pero con poca diferenciación; la cresta neural no está totalmente desarrollada, los capilares coronarios se encuentran distribuidos con una forma regular en el miocardio, la diferenciación de fibroblastos, capilares y fibras de Purkinje es reducida. Los cardiomiocitos pueden ser disociados y cultivados a los 7 días de desarrollo "*in-ovo*", puesto que presentan actividad intrínseca y espontánea continua, haciéndolas un modelo ideal para la elaboración de cultivos primarios, debido a su gran similitud a un corazón adulto. (Martinsen, 2005b; Männer, 2000).

4. Miocitos y Cardiomiocitos

El miocardio es un tejido altamente organizado, compuesto por diferentes tipos celulares como: células de músculo liso, músculo estriado, fibroblastos y cardiomiocitos (en mayor proporción). El mecanismo de contracción en cardiomiocitos, es similar al que presenta el músculo esquelético (C. A. Smith & Wood, 1998). El sarcómero o aparato contráctil de los cardiomiocitos, es la unidad contráctil integrada por filamentos de miosina, actina, tropomiosina y un complejo troponina. El sarcómero se contrae aproximadamente de 2.4-1.8µm, ocasionando tensión en toda la célula. Las contracciones se generan por la interacción entre filamentos de actina y miosina, causada por el incremento de Ca²⁺ intracelular.

Durante la contracción del cardiomiocito ocurren una serie de cambios químicos y mecano-eléctricos resultado del proceso de tensión celular. Los organelos celulares también actúan como fuerzas opositoras en respuesta a la contracción de la célula, con lo cual podemos decir que existe un fenómeno compresión-resistencia definido como un cambio mecano-eléctrico, es decir cambios electroquímicos generan cambios de resistencia, reducción y deformación de la célula (Walker, 1999; White, 2011).

Los filamentos de miosina presentan un arreglo tal que cientos de moléculas de miosina se encuentran empaquetadas una a un lado de la otra a manera de largas cadenas. Las moléculas de miosina presentan dos cadenas proteicas pesadas (≈ 230 KDa) unidas a dos cadenas proteicas livianas (≈ 20 KDa). Tienen una forma ovoide con una región globular de doble cabeza, cada región globular interactúa con filamentos de actina que se unen fuertemente. La porción globular de la miosina se une a los filamentos de actina en un reacción catalizada por ATPasas; mientras que la actina se presenta de dos formas (Globular y Filamentosa) la F-actina actúa como soporte de los filamentos y la G-actina estabiliza los filamentos. La actina cuenta con dos sitios de unión, cuando hay un entrecruzamiento entre los filamentos de actina y miosina promovido por Ca^{2+} , produciendo un acortamiento de los sarcómeros. La tropomiosina es otra proteína presente en los sarcómeros, se caracteriza por ser rígida e intervenir en el entrecruzamiento de actina y miosina (Snopko et al., 2007; Walker, 1999).

Los cardiomiocitos, especializaciones en la membrana celular (sarcolema), túbulos T, citoplasma (sarcoplasma) y en organelos celulares. Los sarcómeros presentan complejos proteicos (actina/miosina) los cuales generan tensión mediante estímulos electro-químicos traducidos a respuestas mecánicas (C. A. Smith & Wood, 1998; Tortora & Derrickson, 2010).

El sarcolema presenta invaginaciones en mamíferos conocidas como túbulos-T (Fig. 7), mientras que en aves son escasos. Los PA viajan a lo largo del

sarcolema y se extienden a través de los túbulos-T, asegurando la excitación sincrónica del miocito; El sarcoplasma presenta una proteína exclusiva de células musculares llamada mioglobina que facilita el paso de O₂ para la síntesis de ATP en las mitocondrias. El RS está presente en forma de sacos lo que favorece que se genere la contracción mediante la liberación de Ca²⁺ que se encuentra almacenado en ellos (Williams, G. D. Smith, Sobie, & Jafri, 2010).

Los cardiomiocitos (Fig. 7) presentan diferentes especializaciones con respecto a un miocito no cardíaco. A diferencia de los miocitos, los cardiomiocitos son células uni-nucleadas, presentan discos intercalares para unirse entre ellos, favoreciendo la conducción eléctrica. El arreglo tridimensional difiere al de las fibras musculares estriadas “no cardíacas”. Existen tres tipos de cardiomiocitos en el corazón; auriculares, ventriculares y de conducción-excitación (Jaimes-méndez, Zulma, Delsy, Melisa, & Virginia, 2010; Sherwood, 2007).

Los cardiomiocitos se encuentran interconectados por tres tipos de uniones: 1) comunicantes, 2) adherentes y 3) desmosomas (Uniones encontradas en el sarcolema). Cada cardiomiocito presenta un paquete de miofibrillas divididas en subunidades contráctiles (sarcómero), complejos proteicos donde interaccionan los filamentos de miosina y actina. La interacción de estas proteínas contráctiles es expresada morfológicamente por estriaciones transversales formando discos Z (los discos Z son la división entre sarcómeros a lo largo del sarcolema) y bandas (I, H y M), (Jaimes-méndez et al., 2010; Sherwood, 2007).

El sarcolema presenta especializaciones importantes para la interacción tanto con el medio extracelular como con el medio intracelular, siendo una barrera impermeable y/o permeable a diferentes tipos de moléculas. En el sarcolema se encuentran integrinas, receptores, proteínas transmembranales canales y bombas iónicas, uniones con las cuales permite interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular (MEC). Las integrinas también pueden formar interacciones MEC-integrinas-citoesqueleto (Jaimes-méndez et al., 2010; Walker, 1999). Los discos intercalares son uniones mecánicas especializadas que facilitan la

interacción célula-célula. Los túbulos-T son invaginaciones del sarcolema que permiten a los canales de Ca^{2+} tipo-L y el Retículo sarcoplásmico (RS) tengan una relación estrecha, para la coordinación de la excitación-contracción, puesto que permite la cercanía entre ellos. En células cardiacas de pollo, al presentar una escasa población de túbulos-T estos mecanismos moleculares se encuentran en el sarcolema y son adyacentes al RS (Walker, 1999).

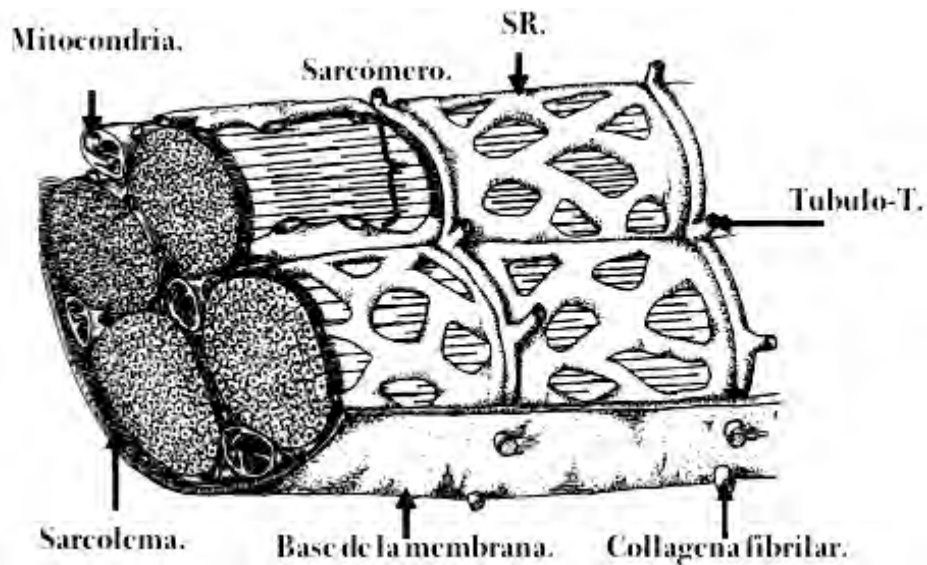


Fig 7. Corte longitudinal de un cardiomiocito típico de mamífero, se muestra el aparato contráctil organizado por filamentos (miosina y actina), un gran número de mitocondrias, retículo sarcoplásmico (SR), túbulos-T y sarcolema.

Los cardiomiocitos presentan una citoarquitectura extremadamente regular, la estructura del citoesqueleto es compleja, está formada por diferentes proteínas: Talina, α -actina, α -tubulina, β -tubulina y desmina, proteínas que convergen con integrinas y compartimentos citosólico. Las proteínas del citoesqueleto cuando son fosforiladas inducen cambios conformacionales alterando la geometría del cardiomiocito, sin embargo aún no se sabe con claridad cómo es el embalaje y la regulación de estas proteínas. Por otra parte queda claro que estos cambios isométricos y mecano-eléctricos pueden alterar la dinámica de la célula (Iorga et al., 2011; Iskratsch & Ehler, 2011; Walker, 1999).

La troponina es un filamento compuesto por tres proteínas T, I y C, que contribuye a la integridad estructural del sarcómero. La troponina T interviene en el sarcómero como un complejo de unión de los filamentos, mientras que la troponina I (inhibidora) se encarga de reducir la afinidad a la unión de Ca^{2+} que tiene la troponina C (calcio), puesto que la unión de estos filamentos resulta en un cambio conformacional del sarcómero estimulando el entrecruzamiento de actina-miosina (Snopko et al., 2007; Walker, 1999).

Las mitocondrias son numerosas en el tejido cardíaco, llegan a ocupar el 25% del espacio citosólico. Estos organelos intervienen en dos funciones importantes de la contracción de células cardíacas; (1) La síntesis de ATP y (2) la contribución al mantenimiento de homeostasis de Ca^{2+} intracelular. Las fibras cardíacas presentan la misma disposición que los filamentos de actina, miosina, discos intercalares y bandas Z del músculo esquelético, mientras que las mitocondrias y el RS son más pequeños (Tortora & Derrickson, 2010).

El RS es un reservorio intracelular de Ca^{2+} altamente eficiente, conformado por una red de membranas especializadas para regular la movilización de Ca^{2+} (liberación y almacenamiento de Ca^{2+}). En pollo este reservorio intracelular se encuentra adyacente al sarcolema y en mamíferos a los túbulos-T, la posición facilita que el Ca^{2+} tenga una difusión rápida hacia este reservorio. El RS tiene un aporte mayor de iones Ca^{2+} ($\approx 70-80\%$) intracelular en comparación al aporte de Ca^{2+} proveniente del exterior. El receptor de rianodina (RyR) se localiza en la parte externa del RS, y al interactuar con los iones Ca^{2+} provenientes del exterior permite la activación que origina la liberación de iones Ca^{2+} almacenados en él. El fenómeno se conoce como "liberación de calcio inducida por calcio" (CICR en inglés). El RS tiene tres importantes componentes proteicos que participan durante la movilización de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Fig. 9); 1) Calcio ATPasa (SERCA-2), 2) Phosfolamban y 3) Canales liberadores de Ca^{2+} (Reuter et al., 2005; Tortora & Derrickson, 2010; Walker, 1999).

El sarcolema interactúa en el espacio extracelular principalmente con proteínas de colágena (Tipo I, III y IV), glicoproteínas, laminina, fibronectina y proteoglicanos, estas proteínas forman una red de anclaje e interacción conocida como “matriz extracelular” (MEC). A su vez la MEC genera un anclaje con el sarcolema es decir una interacción célula-MEC, en que existe una regulación en el intercambio de algunas moléculas y almacén de desechos generados por las células. La MEC es de suma importancia puesto que contribuye a definir la geometría estructural, dinámica, interacción entre células o incluso modificar el microambiente de la célula (Tortora & Derrickson, 2010; Walker, 1999).

5. Acoplamiento y excitación de cardiomiocitos ventriculares

El acoplamiento excitación-contracción (EC) en células cardiacas se inicia por una serie de eventos electro-químicos sincronizados que involucran diferentes mecanismos que coordinan los cambios de voltaje en el sarcolema, para generar el fenómeno de EC adecuadamente en los cardiomiocitos ventriculares (Fig 5). Los cardiomiocitos ventriculares mantienen un potencial de reposo cercano a los -90mV (Fig 8), el balance de los diferentes iones encontrados dentro y fuera de la sarcolema, se debe a los sistemas moleculares involucrados, algunos regulados por ATP como la ATP-asa de Na^+/K^+ . Cuando un cardiomiocito ventricular se despolariza (fase inicial del potencial de acción) (Fig 8). Los canales de Na^+ activados por voltaje, presentan una apertura rápida (canales iónicos Na^+ rápidos) facilitando el influjo de iones Na^+ (fig 9) y volviendo a la célula más positiva en su interior (-40mV) ocasionando una despolarización rápida (1-2 ms). Esta fase está acompañada por una apertura de canales de Ca^{2+} tipo-T y L por cambios de voltaje en el sarcolema lo que aumenta la velocidad y prolonga duración del PA de la célula (Fig. 8). De la misma manera en que los canales de Na^+ son activados por cambios de voltaje también son inactivados, limitando la entrada de iones Na^+ al citosol, de la misma manera al alcanzarse el máximo de repolarización ($+30\text{mV}$), los canales de K^+ son activados para inducir la repolarización de los cardiomiocitos. Durante la

segunda fase del potencial de acción se produce un periodo de despolarización sostenida (meseta) debida a la apertura de canales de Ca^{2+} tipo-L localizados en el sarcolema (Fig. 9) (Sherwood, 2007; Tortora & Derrickson, 2010).

Los canales de Ca^{2+} tipo-L permiten el influjo de iones Ca^{2+} al citoplasma del cardiomiocito produciendo una liberación de Ca^{2+} proveniente del RS debida a la activación de los receptores rianodina (RyR) localizados en la membrana del RS. A este fenómeno se le conoce como liberación de calcio inducida por calcio (CICR). El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la contracción de los sarcómeros, durante la contracción son activados diferentes mecanismos de compensación como: la Ca^{2+} ATP-asa (SERCA-2) encargada de movilizar iones Ca^{2+} hacia el interior del RS (Fig 9). Acompañada por la activación del intercambiador del sarcolema $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (cambia tres iones Na^+ por un Ca^{2+}) el cual aumenta la cantidad de iones Na^+ en el citoplasma debida la entrada masiva de estos iones al citoplasma (Tortora & Derrickson, 2010; Walker, 1999).

Simultáneamente a la activación de estos mecanismo que movilizan iones Ca^{2+} del citoplasma. Actúan los intercambiadores Na^+/K^+ el cual intercambia tres iones Na^+ por dos iones K^+ este mecanismo restablece el balance entre los iones Na^+ y K^+ y funciona de manera simultánea al NCX y SERCA-2 (Sherwood, 2007; Walker, 1999).

Durante el periodo de repolarización del cardiomiocito ventricular, el PA se mantiene cercano a los 0mV, mientras que el máximo de despolarización se acerca a los +30mV (Snopko et al., 2007; Tortora & Derrickson, 2010; Walker, 1999), por lo que el proceso de EC cuenta con tres mecanismos básicos para que el PA se genere adecuadamente: 1) la SERCA-2, 2) NCX y 3) el intercambiador Na^+/K^+ (ATP-asa ubicada en el sarcolema) (Fig. 9) (Chase & Orchard, 2011; Tortora & Derrickson, 2010; Youm et al., 2011).

Cabe mencionar que existen dos elementos directamente involucrados con el ciclo de EC en cardiomiocitos ventriculares. El primero es el ciclo del Ca^{2+}

intracelular puesto que la entrada de Ca^{2+} activa la contracción de los sarcómeros (cambios característicos de voltaje (PA) en el sarcolema) previamente descrito, y la segunda es la síntesis de ATP en las mitocondrias, puesto que hay una fosforilación en los filamentos de actina y miosina para separar a estos filamentos con lo cual induce la relajación de los sarcómeros. (Sherwood, 2007; Tortora & Derrickson, 2010; Youm et al., 2011).

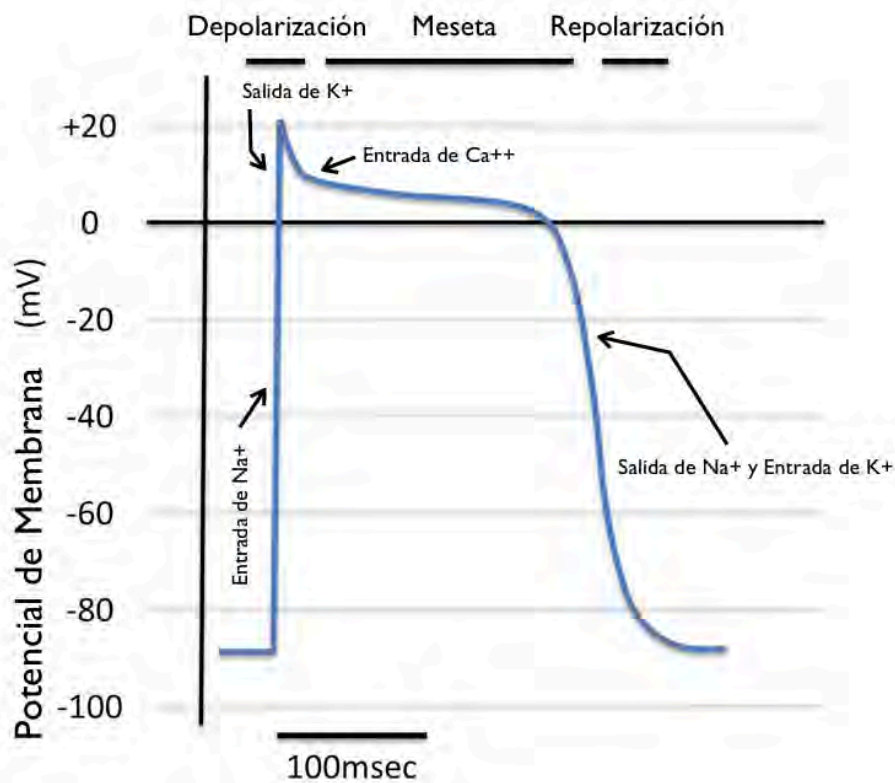


Fig 8. Potencial de acción de un cardiomiocito, cuenta con una duración de 250 ms. aprox. El potencial de reposo en cardiomiocitos es de -90 mV. Se observa la entrada de iones Na^+ acompañada de la salida de iones K^+ evento que inicia la despolarización rápida. Al llegar al umbral de excitación hay una apertura de canales de Ca^{2+} tipo-L lo que permite la prolongación del potencial de acción (meseta) por la entrada de iones Ca^{2+} al citoplasma. Durante la repolarización hay una movilización e inactivación de canales de iones de Na^+ y Ca^{2+} impidiendo su entrada y facilitando la movilización de estos iones del citoplasma hacia el exterior o a reservorios como el RS. Para alcanzar el potencial de reposo en la célula (-90mV.) hay un balance en la entrada al citoplasma de iones K^+ , Na^+ , y Ca^{2+} principalmente, mediante intercambiadores, ATP-etas y Canales iónicos.

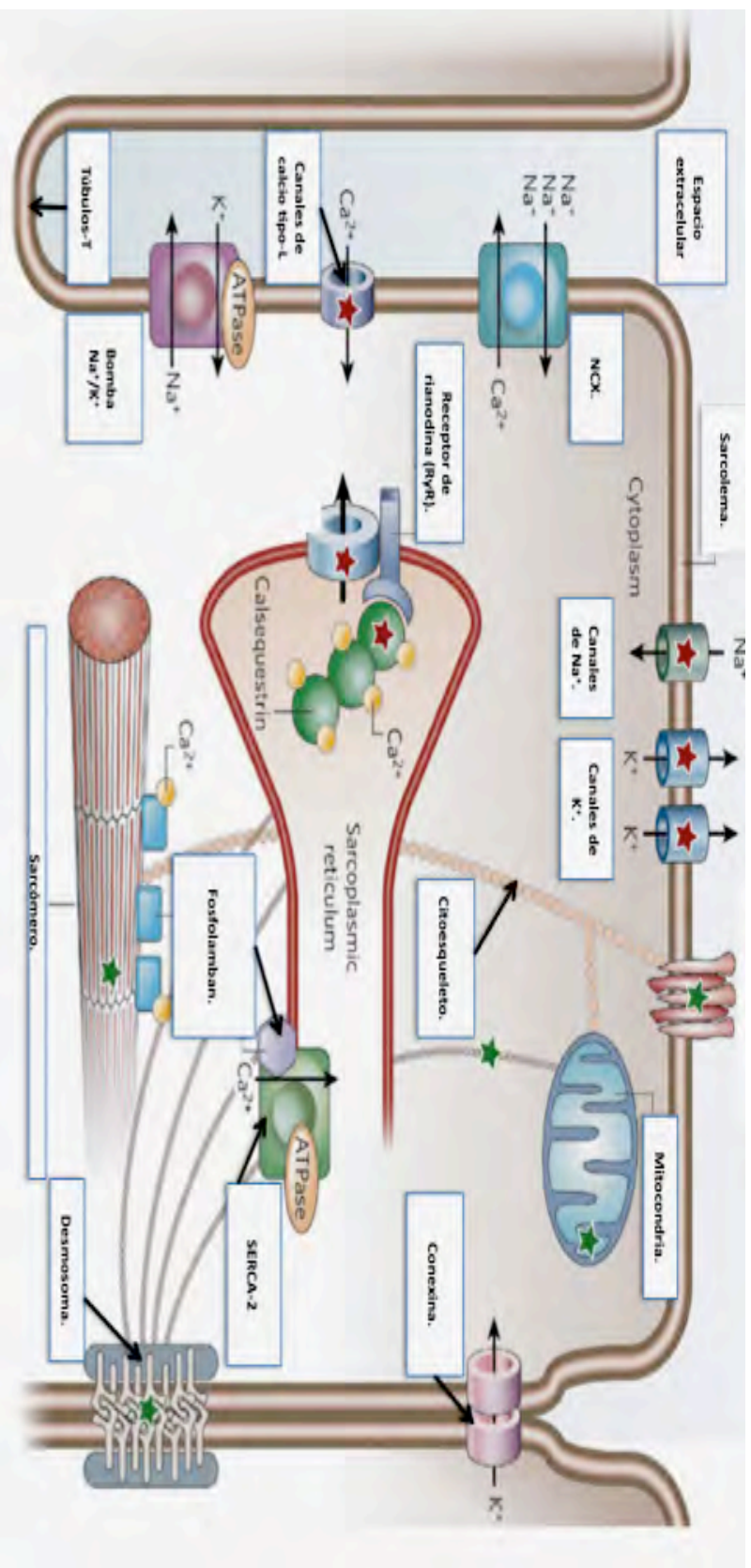


Fig 9. Imagen representativa de los mecanismos moleculares involucrados en el acople de excitación-contracción en un miocito ventricular. Se muestra el sarcómero, en el cual se encuentran integrados los canales de Na^+ , canales K^+ y tubulos-T. Dentro del tubo-T se encuentran los canales de calcio tipo-L, el intercambiador $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y la bomba Na^+K^+ . En el citosol se observa el aparato contráctil del cardiomiocito (Sarcómero), retículo sarcoplásmico con sus receptores de rianodina (RyR) y una calcio ATP-asa (SERCA-2). En el citosol también se observa una mitocondria, conexinas y desmosomas que permiten la unión a otros cardiomiocitos y el citoesqueleto que proporciona soporte al cardiomiocito.

6. El Ca^{2+} importancia y dinámica en cardiomiocitos ventriculares

El calcio es un mensajero secundario importante, realiza una amplia variedad de funciones fisiológicas en diferentes tipos celulares, funciones que van desde el acoplamiento de la excitación-contracción (E-C) en fibras musculares, comunicación entre células, exocitosis, crecimiento y apoptosis (muerte celular programada). Cada tipo celular expresa un conjunto de componentes únicos que responden a señales de Ca^{2+} y sus respuestas pueden variar incluso en función a concentraciones intracelulares de este ión. Se ha descrito que las señalizaciones del ión Ca^{2+} comparten un factor común en todos los mecanismos que lo involucran. Básicamente actúa por tiempos breves como un interruptor (switch) que enciende o apaga respuestas (Alberts et al., 2004; Berridge, Bootman, & Roderick, 2003; Ter Keurs, 2011).

El incremento de iones Ca^{2+} a la célula depende mucho de su fuente, puede encontrarse dentro de la célula en reservorios o provenir del medio extracelular. Hemos comentado que la entrada de Ca^{2+} del exterior es controlada por diferentes tipos de proteínas transmembranales, canales (R, T, N, L y P/Q) e intercambiadores iónicos, mientras que la liberación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ usualmente procede de reservorios intracelulares. Esta liberación es regulada por receptores sensibles a Ca^{2+} como IP3 y/o RyR (Fig 9.) (Alberts et al., 2004; Bonazzola & Takara, 2010).

Se sabe que el influjo de iones Ca^{2+} a la células musculares es la fuente principal de señalización para iniciar reacciones químicas. El ión Ca^{2+} comúnmente activa diferentes mecanismos moleculares para dar inicio a la excitación-contracción de miocitos. La liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares (RS y/o RE) es una fuente de señalización regulada por receptores (RyR y/o IP3) sensibles a iones Ca^{2+} donde se genera una elevación (amplificación) rápida en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Las concentraciones citoplasmáticas de iones Ca^{2+} van de ≈ 0.5 a 2mM . El RS y los RyR presentes en cardiomiocitos particularmente la isoforma RyR-2, responden a diferentes concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que al aumentar o

disminuir genera una serie de cambios electroquímicos en la célula, los cambios de concentraciones iónicas de Ca^{2+} más representativos durante un proceso de señalización intracelular provienen principalmente de los reservorios intracelulares, para que estos cambios se generen es necesario un cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular iniciado desde el medio externo. Estos receptores se encuentran inactivados a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bajas (≈ 20 nM), se activan por un cambio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (≈ 1 μM) y se inactivan a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (≈ 0.5 mM). Como se menciona previamente en cardiomiocitos el Ca^{2+} , la entrada principalmente del medio extracelular es a través de canales de Ca^{2+} tipo-L dependientes de voltaje, mientras que en el interior de la célula las principales proteínas que regulan la entrada y salida del Ca^{2+} intracelular son SERCA y RyR (Fig. 10). La E-C inicia cuando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ubicados en el sarcolema son activados, permitiendo la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular al citoplasma activando a los RyR para la liberación de Ca^{2+} y elevar las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Berridge et al., 2003; Bonazzola & Takara, 2010; Keizer, Li, Stojilkovic, & Rinzl, 1995).

Durante el periodo de relajación del cardiomiocito, el Ca^{2+} es transportado al RS en mayor proporción por SERCA ($\approx 60-70\%$) y transportado al exterior por el NCX ($\approx 30-40\%$) y mecanismos descritos con anterioridad (Fig. 10), que mantienen la homeostasis en la célula en respuesta a los cambios de Ca^{2+} intracelulares y extracelulares. Diferentes estudios proponen que el canal de liberación de Ca^{2+} de RyR es uno de los componentes centrales durante el acoplamiento de la E-C de cardiomiocitos, por lo que su estructura y función ha sido descrita ampliamente en diferentes estudios. Cada una de sus subunidades cuenta con sitios de unión a Calmodulina (CaM), Calbastina-2 (anteriormente conocida como FK-506), proteína cinasa (PKA) fosfatasa 1 y 2 y sorcina. La calsecuestrina es la principal proteína que une al Ca^{2+} y es capaz de almacenar calcio en cantidades suficientes, para permitir contracciones repetidas, la isoforma encontrada en el corazón es la calsecuestrina-2. (Berridge et al., 2003; Bonazzola & Takara, 2010; Tanaka et al., 2009).

El acoplamiento de E-C en la célula es generado mediante diferentes mecanismos moleculares los cuales concilian despolarización del sarcolema con liberación de Ca^{2+} del RS al medio intracelular. Las contracciones de la célula se describen como un proceso dinámico que acopla principalmente canales de Ca^{2+} tipo-L y RyR permitiendo el aumento de Ca^{2+} en el citoplasma de la célula y generando así potenciales de acción continuos, lo que activa el aparato contráctil del cardiomiocito. Sin embargo se han descrito otros mecanismos que pueden inducir a la liberación de Ca^{2+} del RS los cuales son: 1) el NCX mediante la inversión del flujo y 2) canales de Ca^{2+} tipo-T (Fig. 10), sin embargo estos últimos son menos eficientes para producir una elevación de Ca^{2+} en el citoplasma (Berridge et al., 2003; Keizer et al., 1995; Mackenzie, Roderick, Berridge, Conway, & Bootman, 2004).

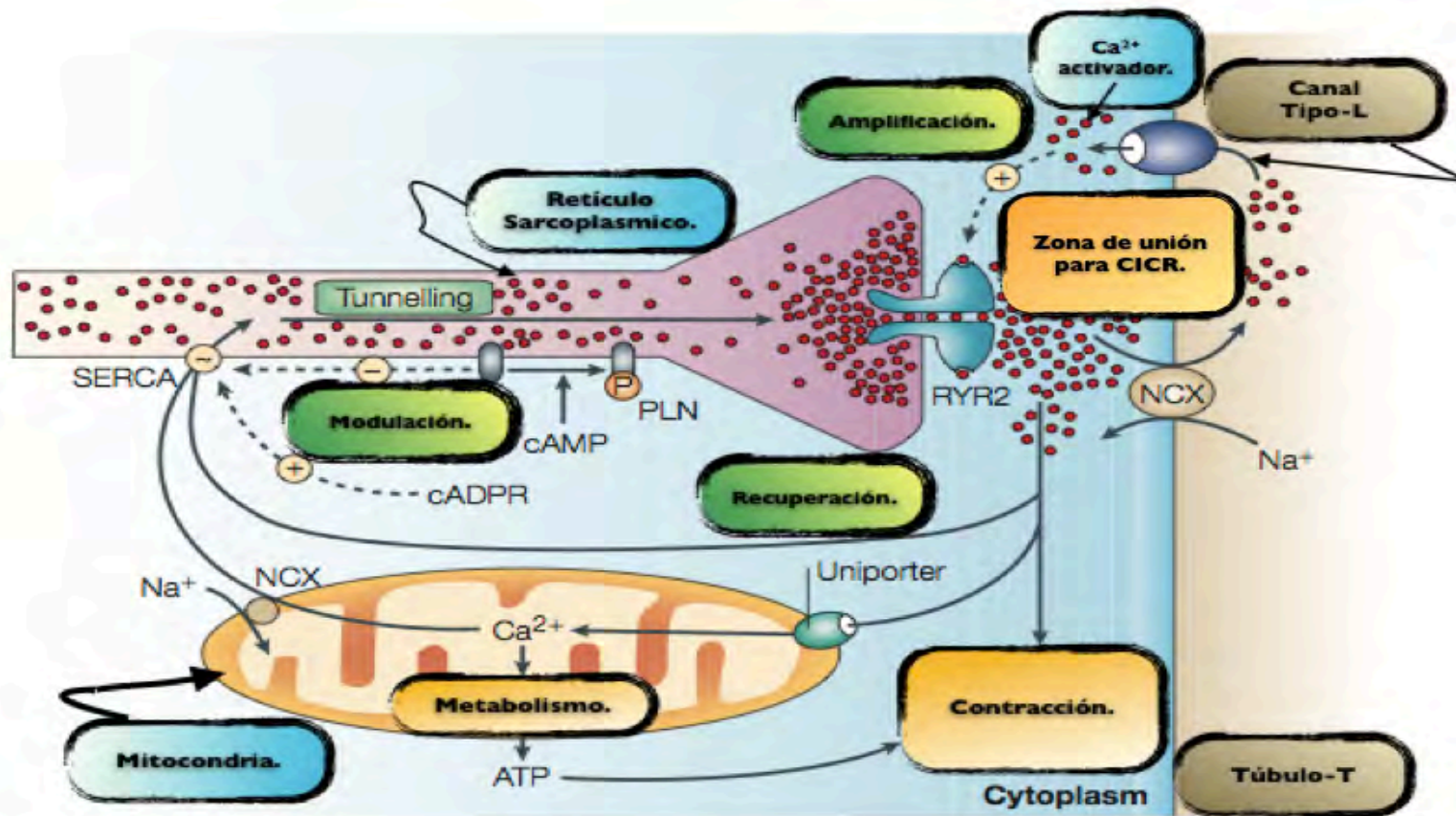


Fig 10. Dinámica del calcio en un cardiomiocito. Se muestra la entrada de calcio por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo-L, ubicados en el Túbulo-T del sarcolema, induciendo a una activación de los receptores de rianodina (RYR-2) para la amplificación de $[Ca^{2+}]_i$ mediante el fenómeno liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , para posteriormente movilizar el $[Ca^{2+}]_i$ fuera del citoplasma mediante intercambiadores Na^+/Ca^{2+} , SERCA y Mitochondria.

7. Matriz extracelular y cardiomiocitos

La matriz extracelular (MEC) forma parte del tejido conectivo. Interviene parcialmente en el aporte de nutrientes y O₂ requerido por la célula, debido a que se encuentra involucrada con funciones de soporte y andamiaje de las células. Constituye un espacio ideal para el almacenamiento de desechos de las células, debido a la presencia de proteoglicanos que pueden interactuar fácilmente con una gran variedad de toxinas que posteriormente son enviadas al sistema linfático (Alberts et al., 2004; Donald E. Ingber, 2010; White, 2011).

La MEC es una estructura (líquida, semilíquida, gelatinosa o calcificada) compuesta por macromoléculas secretadas por las células al medio extracelular, constituyen el principal elemento de soporte para las células que forman un tejido facilitando la asociación célula-célula o célula-MEC. Su papel en procesos de organización, orientación y adhesión celular es dada por su compleja mezcla de macromoléculas (glucosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas fibrosas) confiriendo propiedades estructurales a las células. Cada red de MEC (láminas o largas fibrillas de proteínas y polisacáridos asociadas con la superficie de la célula) muestra un perfil propio que constituye la interfaz de comunicación con el microambiente que le rodea, su perfil y/o composición va en función del producto de la morfogénesis tisular y procesos celulares que requiere el tipo celular al que rodea (Alberts et al., 2004; Naranjo, Noguera-Salvá, & Guerrero, 2009; Tortora & Derrickson, 2010).

Años atrás se creía que la MEC tenía una función exclusiva de andamiaje y estabilizador de tejidos, sin embargo su elevada complejidad y especialización permite que desempeñe un papel activo que influye mecánicamente la contractilidad y actividad mecano-eléctrica. Estudios recientes muestran que las variaciones en los componentes de la MEC tienen diferentes implicaciones en los patrones de organización tisular, regulación del comportamiento, estructura y movilidad de las células, estas variaciones en la MEC alteran procesos fisiológicos, proliferación y forma de las células.

La MEC es producida por células (fibroblastos) que se encuentran asociadas a esta. También se sabe que la orientación del citoesqueleto en condiciones “*in-vivo*” puede controlar la disposición de la MEC, los componentes de la MEC confieren diferentes propiedades a las células por ejemplo los glucosaminoglicanos oponen resistencia a las fuerzas de compresión, facilitando la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas. Mientras que las proteínas fibrosas, particularmente la colágena refuerzan la matriz colaborando con la organización y facilitando el anclaje de las células. Los elementos de la MEC crean un filtro biofísico de adhesión e influencia sobre el intercambio de materiales vitales para una célula (Alberts et al., 2004; Donald E. Ingber, 2010; White, 2011).

La MEC, como se menciona, es un mediador importante para la señalización bioquímica involucrada en la densidad, rigidez y geometría de la célula. La propiedad hidrófila de la MEC se debe a la presencia de dominios rígidos a manera de red que llega a ser selectiva por lo que estos dominios son llamados poros de gel de MEC los cuales permiten una difusión selectiva de moléculas. Las proteínas fibrosas junto con el líquido intersticial son el resto de los componentes de la MEC.

Estudios recientes enfocados en la manipulación del sustrato en cultivos celulares y la influencia sobre la arquitectura en miocitos, muestran que la rigidez de la MEC puede controlar procesos mecano-eléctricos, movilidad e incluso la geometría de la célula, siendo un factor trascendental en el cambio de tensión en células cardíacas que repercute en el control fisiológico como la excitación y factores involucrados con la propagación de corrientes iónicas y eléctricas por el aumento de estrés en las fuerzas de tensión generadas por la interacción MEC-célula (resistencia entre microtúbulos y MEC)(Donald E. Ingber, 2010; Naranjo et al., 2009).

La dinámica de los componentes citoplasmáticos, cambios de forma y materiales extracelulares asociados a todo el tejido, resultan en una alteración de la organización del organismo entero (cambios en la fisiología

del cardiomiocito) por la interacción célula-MEC. Por ejemplo, el citoesqueleto al ser una estructura dinámica que ocupa parte del citoplasma formado por microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, puede causar una modificación en la arquitectura de la célula por interacción con la MEC, cambios en la conformación o ser un detonante de cambios fisiológicos, interconexiones e impulsos externos de la célula (Donald E. Ingber, 2010; Espira & Czubyrt, 2005; White, 2011).

El sistema de tensión que los cardiomiocitos presentan al mantener una estructura, forma y función integral ante las fuerzas opositoras del medio es llamado "Tensegridad", aporta estabilidad ante estímulos extracelulares como los de la MEC (zona de transición involucrada con la transmisión de materia, potenciales electroquímicos y andamiaje de células). En el exterior los cardiomiocitos se encuentran anclados a proteínas transmembranales, desmosomas e integrinas, estas últimas además de ser uniones comunicantes tiene un papel como puentes moleculares de anclaje a la MEC, mientras que en el interior se encuentran los microtúbulos, filamentos de actina y miosina. Estos sistemas de compresión, movilidad y anclaje actúan en conjunto para generar una distribución de tensión en la célula, por lo que al aplanarse, estirarse o redondearse, las propiedades mecano-eléctricas y de coordinación de cardiomiocitos se ven afectadas. También existen otros mecanismos sensibles al cambio de densidad de MEC como transcripción, factores de crecimiento, desarrollo e incluso la muerte celular, la aplicación de estrés mecánico a la célula es una influencia bioquímica que altera directamente en múltiples procesos biológicos (Alberts et al., 2004; Donald E. Ingber, 2010; White, 2011).

El incremento en la densidad de MEC promueve una distorsión en la forma del cardiomiocito, se ha reportado que en cultivo el tener una concentración elevada de MEC, puede generar fuerzas opositoras a las fuerzas de tracción ejercidas por cardiomiocitos e incluso servir como un anti-adherente (Donald E. Ingber, 2010; Naranjo et al., 2009). por ello el siguiente estudio se enfoca en ampliar el conocimiento del comportamiento de los cardiomiocitos en diferentes MEC.

Hipótesis

Se ha demostrado que los componentes de la MEC intervienen de manera activa en el crecimiento, morfología y desarrollo de la actividad contráctil y espontánea de cardiomiocitos.

Por lo tanto en el presente trabajo nos preguntamos si el empleo de dos substratos celulares. modificará la actividad espontánea de los cardiomiocitos ventriculares de pollo con siete días de desarrollo in ovo.

Objetivos

Objetivos Generales

- 1) Establecer una geometría definida en el cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de embrión de pollo, utilizando micro-plataformas de polímero PDMS.
- 2) Caracterizar y comparar la actividad espontánea de los cardiomiocitos ventriculares en cultivo primario, registrada por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, con dos diferentes adherentes celulares: Poly-L-lisina y BSA.

Objetivos Particulares

- 1.- Establecer protocolos para obtener sistemáticamente réplicas de cultivos primarios de cardiomiocitos con actividad espontánea, desarrollados sobre adherentes específicos.
- 2.- Establecer protocolos para obtener micro-plataformas rectangulares para el desarrollo de los cultivos primarios de cardiomiocitos mediante la técnica de micro-moldeo del polímero de PDMS.
- 3.- Registrar mediante técnicas de fluorescencia los patrones de actividad espontánea a través de las $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ observadas.
- 4.- Establecer los criterios para analizar los registros de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Materiales y Métodos

Cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares

1. Obtención y disección de corazón

Obtención de células ventriculares embrionarias de pollo con siete días de desarrollo *“in-ovo”*. Se trabaja en una campana estéril. Para ello, se rompen los cascarones y los embriones se extraen uno por uno, posteriormente se colocan en una caja de Petri conteniendo un poco de líquido amniótico.

Los embriones se decapitan y con un par de pinzas de punta fina se ubica el corazón en la parte media de la caja torácica, el cual es fácil reconocer por su actividad contráctil. Se desprende y traslada a la solución fisiológica Hank's; NaCl (125 mM), KCl (0.9), NaHCO₃ (3.6 mM), Na₂HPO₄ (0.3 mM), KH₂PO₄ (0.4 mM), MgCl (0.5 mM), MgSO₄ (0.4 mM), Glucosa (10 mM), Sucrosa (2.9 mM) HEPES (9.9 mM) y CaCl₂ (2.2 mM) pH 7.2). Para asegurar que las células sean exclusivamente ventriculares, una vez obtenidos los corazones se toma la porción inferior (ápice) con unas tijeras oftálmicas de muelle. La disección debe durar alrededor de 20 min, con lo cual se trata de evitar daños en las células y asegurar la viabilidad de cardiomiocitos.

Los huevos utilizados de los cuales se obtuvieron los embriones fueron obtenidos de la granja: Aves libres de patógenos Específicos S.A. de C.V. (ALPES), que provienen de parvadas monitoreadas, que cumplen los lineamientos de calidad (USDA Memo 800.65).

2. Disociación enzimática

Una vez obtenidos los ventrículos se disocia el tejido ventricular mediante digestión enzimática, los ventrículos se toman con una pipeta pasteur y se llevan a las soluciones enzimáticas (DMI y DMII). El “DMI”

DMS₈ 10X (NaCl (349.076mM), KCl (16.097mM), NaH₂PO₄·H₂O (180mM), NaHPO₄ (3.396mM) y D-Glucosa (16.652mM) pH7.33) y tripsina (Worthington biochemical corporation.) encargada de disociar los tejidos mediante hidrólisis y el “DMII” (DNasa (SIGMA) y DMS₈) encargada de catalizar la ruptura de enlaces fosfodiéster por hidrólisis.

Las dos enzimas se mezclan en un tubo falcon de 50 ml. para obtener un volumen de 20 ml y realizar cuatro lavados enzimáticos, cada lavado se realiza por agitación con un volumen de 5 ml a una temperatura de 37°C durante 7 min. Con el fin de eliminar residuos tisulares más grandes del primer lavado, se extrae el sobrenadante y se desecha; de los lavados restantes se retira el sobrenadante, al terminar se agrega solución inhibidora de la acción proteolítica de tripsina (Ti); DBSK (10X) [NaCl (1.45M), MgSO₄ 7H₂O (0.010M), Na₂HPO₄ 7H₂O (0.0115M), CaCl₂ H₂O (0.0304M) y Glucosa (0.0304M)], NaHCO₃ (1.19M), M199 (1X), HS, DBSK (100X) [KCl (0.10M), DBSK (10X) y H₂O] y Gentamicina. Esta solución detiene la reacción proteolítica de las enzimas DMI y DMII con el fin de evitar daño a los cardiomiocitos.

Al término de los cuatro lavados la solución Ti fue filtrada (el filtro cuenta con un poro de 15 µm) y centrifugada a 70G's durante 15 min. Al término de la centrifugación se desecha el sobrenadante y la pastilla sedimentada se resuspende con 500µl de medio de cultivo para células cardíacas M-199 (Gibco). Para realizar un conteo con el hemocitómetro se toman 10µl del medio con células y se siembra una densidad de 5x10⁵ cel/ml en cada plato para cultivo (35mm x 10mm), esta densidad es ideal para la obtención de monocapas de células cardíacas.

Las células fueron colocadas con una micropipeta de 100 µl sobre microplataformas de PDMS diseñadas ad-hoc empleando técnicas de micromoldeo y un elastómero de silicón (sylgard 184 Down corning). Estas microplataformas fueron elaboradas por estudiantes de la facultad de ingeniería de la UNAM asociados al laboratorio. Las plataformas se activan (cambio de la polaridad de la superficie) en una cámara de plasma de O₂

durante 20 seg. La superficie del polímero presenta características hidrofóbicas que repelen a las células y mediante la activación se logra que las superficies sean hidrofílicas con ello se logra una mayor afinidad a las células. Para lograr la adhesión total de las células se recubre la superficie de los diferentes dispositivos con dos diferentes adherentes: Poly-L-lysina al 25% (Sigma Aldrich) y BSA al 5% disuelto en PBS; NaCl (136.89 mM), KCl (2.683 mM), KH_2PO_4 (12 mM) y Na_2HPO_4 (1.763 mM) pH 7.4.

Los dispositivos de PDMS empleados presentaron una geometría rectangular para restringir y simplificar el patrón de crecimiento que adoptan los miocitos sobre la superficie del plato para cultivo. Con el fin de asegurar la adhesión de las células y respetar los límites establecidos por el dispositivo, una vez depositadas las células sobre la plataforma se dejan precipitar durante 15 min. antes de colocar M-199 a todo el plato para cultivo. Posteriormente se incuban durante 24 horas con CO_2 al 1.5% y 37°C , para realizar un registro de epifluorescencia.

3. Elaboración de plataformas de PDMS

Para la elaboración de los dispositivos de Polydimetilsiloaxeno (PDMS) sobre los cuales fueron cultivadas las células cardíacas, se utilizó la técnica conocida como litografía suave. Primero se elaboró un diseño del molde con la geometría que se deseaba utilizar. Este molde fue elaborado mediante el software computacional "CorelDRAW", se imprimió el diseño con una impresora de láser (HP color láser Jet 2500) sobre un acetato termo-plástico (Shrinky Dinks) 3-5 veces sobre el mismo dibujo respetando los márgenes establecidos, para lograr un depósito de tinta suficiente.

Una vez obtenidas las plantillas, con los diseños predeterminados, con la finalidad de retirar los excedentes de tinta fueron recortados y limpiados con isopropanol y acetona (con ayuda de cotonetes de algodón).

Posteriormente estos moldes se colocan sobre un vidrio en un horno eléctrico a una temperatura de 163 °C durante un lapso aproximado de 10 min. El acetato se encoge y así se obtiene el molde con relieve suficiente para elaborar las plataformas de PDMS. Para ello se prepara una mezcla de 1:10 de agente curador y elastómero de Silicón respectivamente (Sylgard 184 (Down corning)), una vez obtenida esta mezcla se vierte sobre el molde de acetato en una caja Petri, cuidando que el diseño impreso y encogido se orienten hacia arriba, hasta cubrir la casi totalidad de la caja. La caja Petri fue colocada en una cámara de vacío, para remover las burbujas del elastómero y facilitar su solidificación.

La solidificación del elastómero dura alrededor de 30 min. en un termo plate, entonces se extrae, se recorta y limpia con etanol al 70% para su uso en cultivos celulares.

4. Registro óptico con microscopía de fluorescencia

Una vez obtenido el cultivo primario de cardiomiocitos, se realizan registros de fluorescencia incubando las células con el sensor intensiométrico de Ca^{2+} Fluo-4 AM (invitrogen) a una concentración 22 μM con 0.5% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St Louis MO, USA) en solución salina Hank's. Se incubó durante 30 min. A 37 °C, humedad, CO_2 (1.5%) y O_2 (98.5%) controlados.

Una vez incorporado el Fluo-4 los cultivos se lavan con solución Hank's y se colocan sobre una platina térmica a una temperatura de 37°C para iniciar el registro óptico en un microscopio invertido (Leica DM IRB). Durante el registro se mantienen con perfusión constante de solución Hank's burbujeada con gas carbógeno (Infra: CO_2 5% y O_2 95%).

Para el registro óptico de los cambios de intensidad del indicador de calcio Fluo-4 AM, este indicador se une a iones Ca^{2+} en una estequiometría 1:4 (1 ion Ca^{2+} y 4 de Fluo-4 AM). Como resultado a esta interacción, se obtiene

una fluorescencia resultante que se puede detectar mediante microscopia de epifluorescencia empleando una lámpara de mercurio. Para la excitación del sensor se utiliza una longitud de onda de 480 nm y la emisión de 510 nm. La adquisición se realiza con una cámara digital enfriada CCD (Princeton Instrument Inc.) enfriada a -20°C y el software WinView 32. Las secuencias obtenidas constan de 500 imágenes, cada foto se obtuvo con un tiempo de exposición de 100 ms.

5. Análisis de resultados

El análisis de las variaciones de calcio intracelular se realizó procesando las secuencias de imágenes (películas) con el programa Image J (NIH, USA). Con este software computacional analizamos las células marcando regiones de interés de 3x3 píxeles área equivalente a 21µm. Se seleccionaron las células que presentaban cambios de fluorescencia evidentes, los cuales son proporcionales al cambio de calcio intracelular, los registros seleccionados se visualizaron en el software computacional "Igor Pro" (WaveMetrics 2006) con él se aplicó a los datos una normalización del tipo F-Fmin (se resta el valor mínimo obtenido a cada imagen de un registro óptico). Los resultados fueron visualizados en "Igor Pro" mediante gráficas de rastreo de la actividad de calcio, y gráficas de las series de tiempo que muestran los cambios de fluorescencia de toda la serie de imágenes superpuestas.

Para observar la amplitud de la respuesta de cada célula se utilizó el programa "Igor Pro", con el cual se determinó la actividad célula por célula y la variación de intensidad de fluorescencia. Algunas rutinas en "Igor" fueron escritas por el Dr. León Islas.

6. Tinción Acussant

Para la elaboración de la tinción de Acussant se utilizan los reactivos de sigma Aldrich "Tinción tricrómica Accusaint HT-15". Los cultivos a los que

se les aplicó la técnica de la tinción tricrómica, se les retiró el medio de cultivo y fueron fijados con la solución "Bouin's" durante 24 horas a temperatura ambiente.

24 horas después, se retiró la solución "Bouin's" y realizó una serie de lavados con agua desionizada hasta quitar el sobrante de la solución. Posteriormente el cultivo fue Teñido con la solución de hematoxilina férrica de Weigert (dilución con agua desionizada al 70%) durante 5 min. Se retiró y se lavó con agua desionizada para retirar el excedente. Enseguida se le colocó la solución fucsina acida escarlata de Biebrich (dilución con agua desionizada al 60%) durante 5 min. se retiró y se lavó con agua desionizada para quitar el excedente. Seguido a este paso los cultivos se colocaron en la solución de acido fosfotungstico/fosfolibdico durante 5 min. Enseguida se colocaron los cultivos en la solución de azul de anilina (dilución con agua desionizada al 60%) durante 5 min. se retiro y se lavó con agua desionizada.

Los cultivos fueron lavados y deshidratados con una serie de alcoholes del 50%, 70%, 80%, 90% y 95%. Posteriormente a la deshidratación fueron montados en portaobjetos y sellados con esmalte para uñas, para su registro posterior.

RESULTADOS

Viabilidad y caracterización de los cultivos sobre micro plataformas PDMS

Mediante la tinción de Accusant se verificó la presencia de cardiomiocitos ventriculares y de otros tipos celulares en el cultivo (Figura 11 A). La evaluación de la tinción indica la presencia de una gran cantidad de células musculares (90%); cardiomiocitos, teñidos en rojo. En comparación con una cantidad mínima de fibroblastos teñidos en azul. Este resultado es importante dado que los fibroblastos pueden modificar la propagación de PA a células vecinas, ya que presentan resistencia a la propagación de la activación eléctrica de los cardiomiocitos. No obstante, la existencia de una mayor cantidad de cardiomiocitos (células excitables), adyacentes a los fibroblastos, puede restablecer la propagación del impulso eléctrico.

En la Figura 12 B) se muestra una microfotografía en contraste de fases de un cultivo primario de cardiomiocitos realizado sobre las micro plataformas de PDMS. En la figura se indican los microcanales que delimitaron al cultivo primario y con los cuales se obtuvo una geometría rectangular definida. Los puntos en color gris son cardiomiocitos que incorporaron el fluorocromo sensible a $\Delta[Ca^{2+}]_i$, esta micrografía fue tomada después de la elaboración de un registro típico de fluorescencia. Las micro plataformas de PDMS fueron reutilizadas en múltiples cultivos primarios de cardiomiocitos, cabe destacar que las réplicas siempre fueron viables y presentaron actividad en todos los registros realizados sobre cada micro plataforma.

En la Figura 12 A) se presenta una microfotografía de un cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de pollo embrionario de siete días (E7) de desarrollo *in ovo*. El cultivo se realizó sobre Poly-L-lisina y se incubó con el indicador intensiométrico Fluo-4 AM. Una vez obtenido cada registro de actividad por $\Delta[Ca^{2+}]_i$, fue definido el criterio para establecer las ROI, fue aplicado diferente criterio en réplicas, puesto que existían diferencias en cuanto a la disposición y forma de las monocapas registradas por $\Delta[Ca^{2+}]_i$.

En la figura 12 panel B) se presenta una serie de tiempo de las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ extraída de la ROI marcada en el panel A (rectángulo amarillo). Se aprecian variaciones periódicas en la intensidad de la fluorescencia registradas a lo largo de las 500 imágenes registradas por $\Delta[Ca^{2+}]_i$.

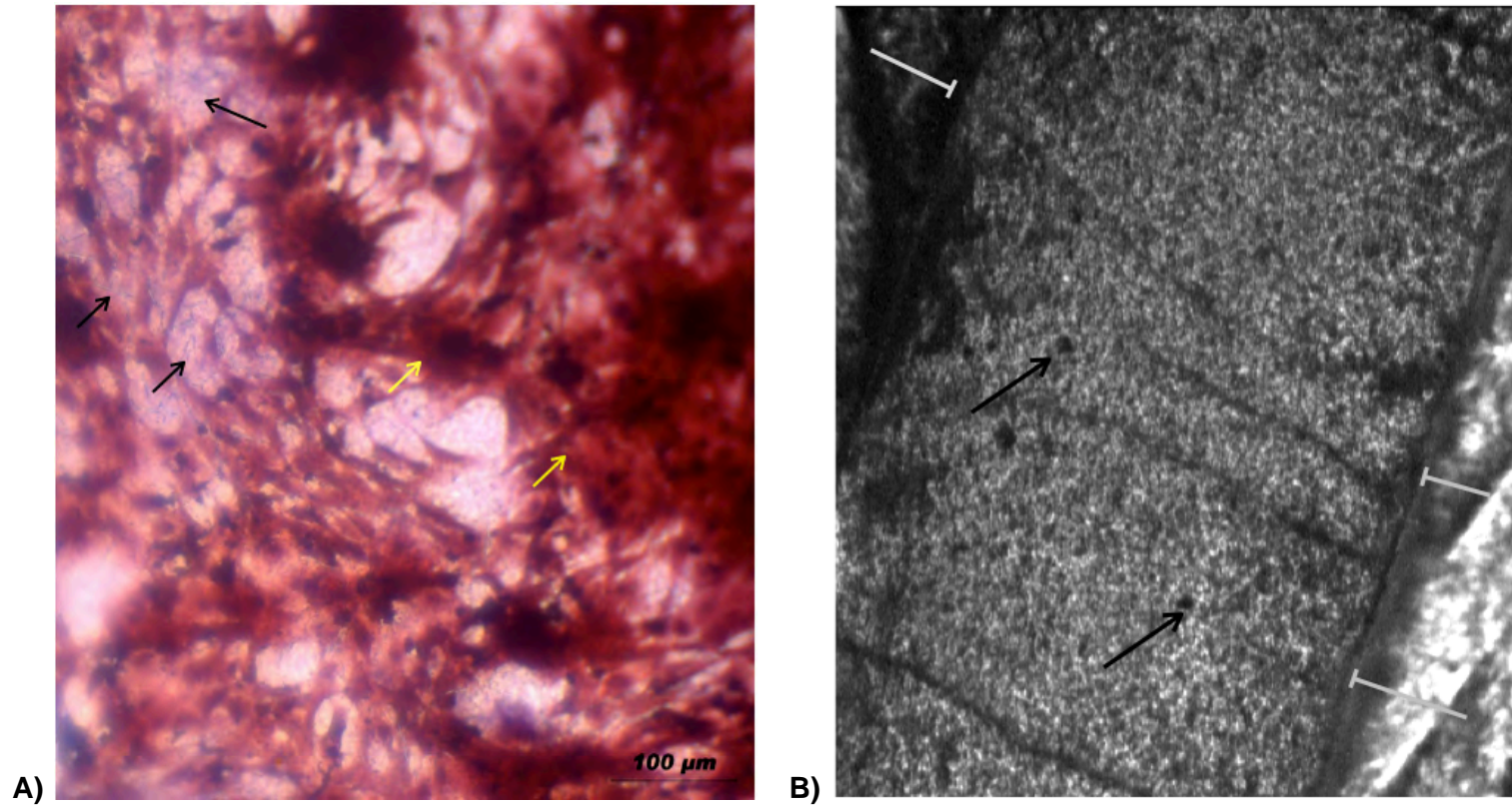
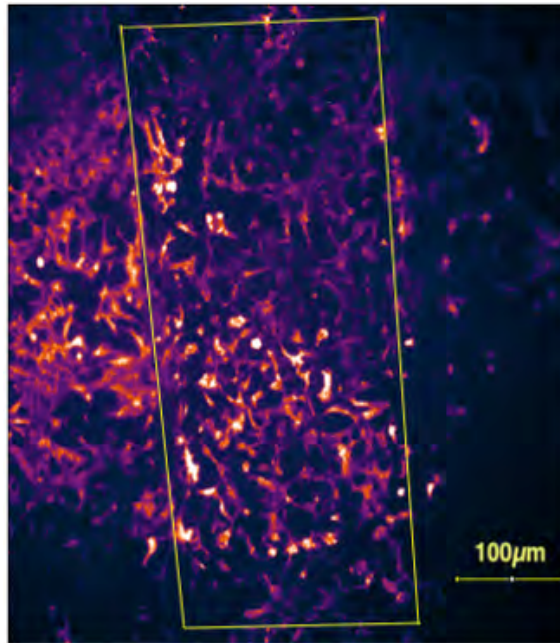


Fig.11 En el panel A), fotografía del cultivo primario teñido con la técnica de Accusant, donde se muestra que el 90 % del área se encuentra teñida en rojo (flechas amarillas), los gradientes de color rojo varían en función a los agregados o cantidad de células agrupadas en las diferentes regiones, células musculares; mientras que áreas pequeñas y localizadas se encuentran teñidas en azul marino (flechas negras), son fibroblastos. En el panel B) Se muestra una fotografía realizada con contraste de fases para ilustrar los microcanales (flechas grises) que fueron diseñados sobre poliestireno termosensible y luego PDMS, ahí fueron cultivados los cardiomiocitos (flechas negras) con una geometría rectangular (flechas grises).

A)



B)

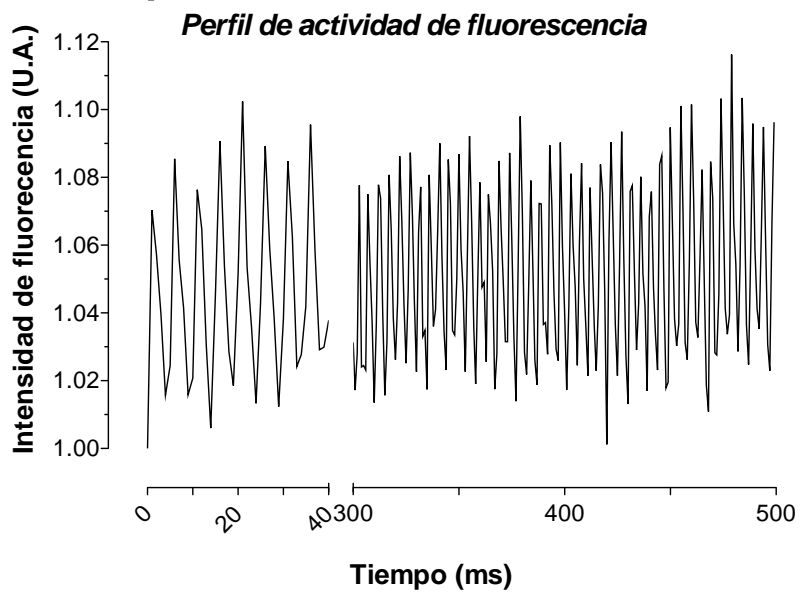


Figura 12. Panel A) Imagen representativa de cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares sobre Poly-L-lisina. Panel B) se presenta una serie de tiempo de la intensidad de fluorescencia. La imagen en A) muestra un cultivo primario con el colorante Fluo-4 AM incorporado, el rectángulo de amarillo muestra una geometría de interés, la cual fue diseñada con la técnica de litografía suave en PDMS. La imagen B) muestra las variaciones en la actividad del cultivo mediante picos de intensidad de fluorescencia en U.A., las cuales están asociadas a cambios en la movilización de $\Delta[Ca^{2+}]_i$.

Cultivos desarrollados sobre adherente celular BSA

En la Figura 13 se presentan registros representativos de la actividad de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, obtenidos del cultivo de cardiomiocitos empleado BSA como adherente celular. En el panel A se superpusieron 500 series de tiempo de las 2,150 ROI seleccionadas, con estos trazos sobre puestos se observa un patrón de actividad global y la existencia de variaciones regionales. El patrón global presenta ventanas sin actividad, alternadas a episodios de actividad intensa; es decir ráfagas. A lo largo del registro se presentan cuatro períodos de actividad episódica, los cuales se identifican fácilmente cuando se utiliza la gráfica de rastreo o matriz de actividad asociada a fluorescencia (*Fig. 13 B*). Asimismo, la selección de una sola ROI (ROI 1) muestra la correspondencia entre los períodos de actividad y la gráfica de rastreo de la fluorescencia (*Fig. 13 C*). La baja actividad en puntos específicos a lo largo de las series de tiempo sugiere que ciertas regiones dentro del cultivo presentan grupos de células con actividad localizada y, ciertamente, desfasada de la actividad global, sin que se pierda el patrón general en forma caídas o espacios silentes en la actividad. El cual se observó en todos los cultivos con BSA.

Cultivos desarrollados sobre adherente celular Poly-L-lisina

En la Figura 14 se presentan registros representativos de la actividad de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, obtenidos del cultivo de cardiomiocitos empleado Poly-L-lisina como adherente celular. La superposición de las series de las 500 series tiempo de la selección de las 1400 ROI seleccionadas, con estos trazos superpuestos se muestra el patrón global de actividad de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (*panel A*). En este caso se observa un registro de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ continuo y sincrónico entre las ROI seleccionadas. No se presentan intermitencias, ni decrementos o cambios en la actividad, a juzgar por la información de la gráfica de rastreo o matriz de actividad asociada a fluorescencia (*panel B*). Información que se corroboró con la elevada correspondencia entre los picos de actividad registrados en la serie de tiempo de una ROI (ROI 1) individual (*panel C*) y el registro continuo de fluorescencia presentado en el panel B para el patrón

global obtenido en los cultivos con Poly-L-lisina. Con este tipo de sustrato los cardiomiocitos presentan un patrón de actividad global sincrónico, de periodicidad continua y sin decrementos agudos en la frecuencia o número de espigas, características observadas en todos los cultivos que utilizaron dicho adherente.

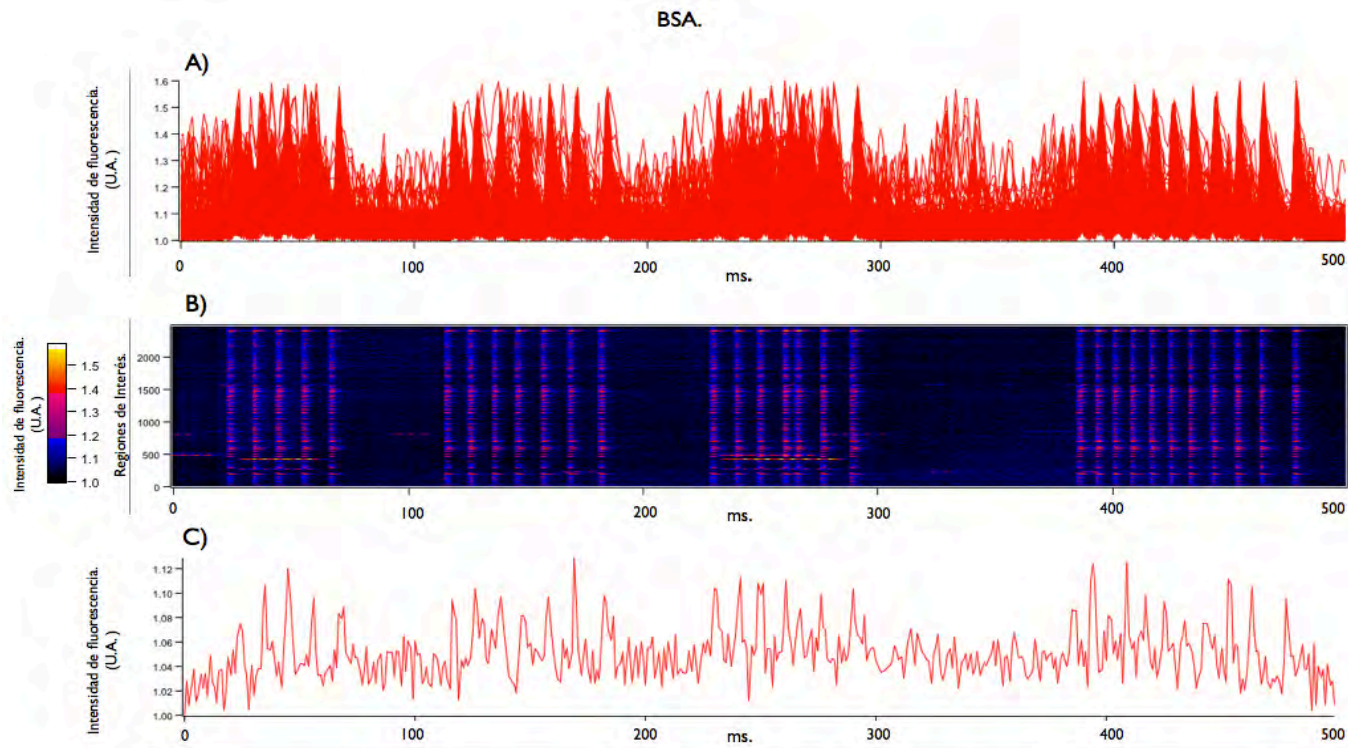


Figura 13. Registro de las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en un cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares empleando como adherente BSA. En la gráfica A) El eje de las abscisas muestra la intensidad de fluorescencia (U.A.) de 2000 regiones de interés seleccionadas a lo largo del tiempo de registro. B) Se presenta una matriz con el índice de similitud de fluorescencia de todas las regiones de interés seleccionadas de acuerdo a una escala de color, la barra a la izquierda. Las abscisas indican la región de interés, mientras que las ordenadas el tiempo en segundos. C) Se grafica un trazo extraído de A, la ROI 1, nuevamente las abscisas indican la intensidad de fluorescencia (U.A.) y las ordenadas el tiempo en ms.

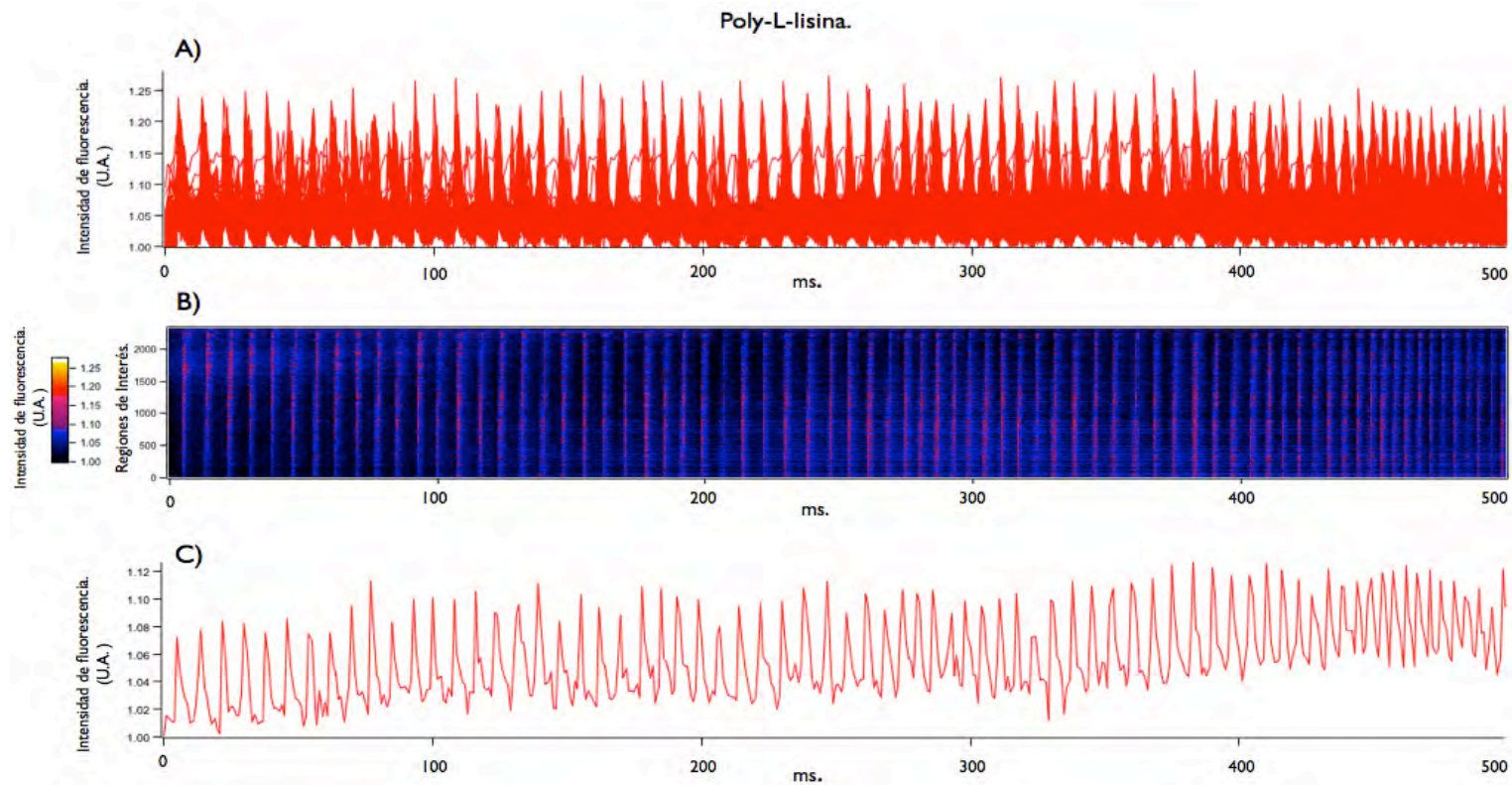


Figura 14. Variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en un registro típico de cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares sobre Poly-L-lisina. En la gráfica A) El eje de las abscisas muestra la intensidad de fluorescencia (U.A.) de 1500 regiones de interés seleccionadas de un cultivo, a lo largo de 500 ms. B) Se presenta una matriz con el índice de similitud de fluorescencia de todas las regiones de interés seleccionadas de acuerdo a una escala de color, la barra a la izquierda. Las ordenadas indican la región de interés, mientras que las abscisas el tiempo en segundos. C) Se grafica un trazo extraído de A, la ROI 1, nuevamente las ordenadas indican la intensidad de fluorescencia (U.A.) y las abscisas el tiempo (ms).

Comparación del efecto de los adherentes celulares sobre la actividad de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ del cultivo de cardiomiocitos

En la Figura 15 se presenta la comparación del perfil de actividad entre las réplicas de los cultivos realizados sobre Poly-L-lisina como adherente celular. Con la finalidad de hacer más clara la comparación los trazos fueron desfasados en el eje Y dentro de la figura. Los patrones de actividad obtenidos con la fluorescencia de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, muestran una actividad homogénea, sincrónica y periódica, es decir; sin intervalos con decrementos. Sin embargo, al comparar los trazos se puede observar una ligera variación en la frecuencia de la actividad espontánea entre las diferentes réplicas, lo cual nos sugiere variación en la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A pesar de estas variaciones en el número total de espigas, las réplicas presentan perfiles globales muy homogéneos.

En contraste, en la Figura 16 se muestran trazos representativos de tres réplicas de cultivo primario en los que se utilizó BSA como adherente celular. En los tres registros se observa un comportamiento heterogéneo entre las réplicas, tanto en el cambio de intensidad de fluorescencia por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, así como en la amplitud de las espigas y en la duración de los ciclos de actividad espontánea. El comportamiento por réplica resultó muy variado, ya que se presentaron caídas intermitentes en la actividad de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, a diferencia de los registros de actividad continua sobre Poly-L-lisina.

Un contraste más claro del efecto provocado por los adherentes celulares sobre la actividad por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ del cultivo de cardiomiocitos se presenta en la Figura 17. El curso temporal de los trazos representativos de BSA y Poly-L-lisina sugieren diferencias importantes entre ambos adherentes. Para el caso de BSA se presentaron intermitencias entre series de ráfagas de actividad, mientras que para Poly-L-lisina el perfil de los registros es de actividad periódica regular y siempre constante. Los resultados sugieren que posiblemente el adherente celular BSA genera un microambiente que facilita variaciones intermitentes de alguno de los factores que regulan la movilización de Ca^{2+} , en cambio el adherente celular Poly-L-

lisina mantiene un régimen constante a lo largo de los registros, sugiriendo con ello la carencia de acumulación de factores que modulen la respuesta.

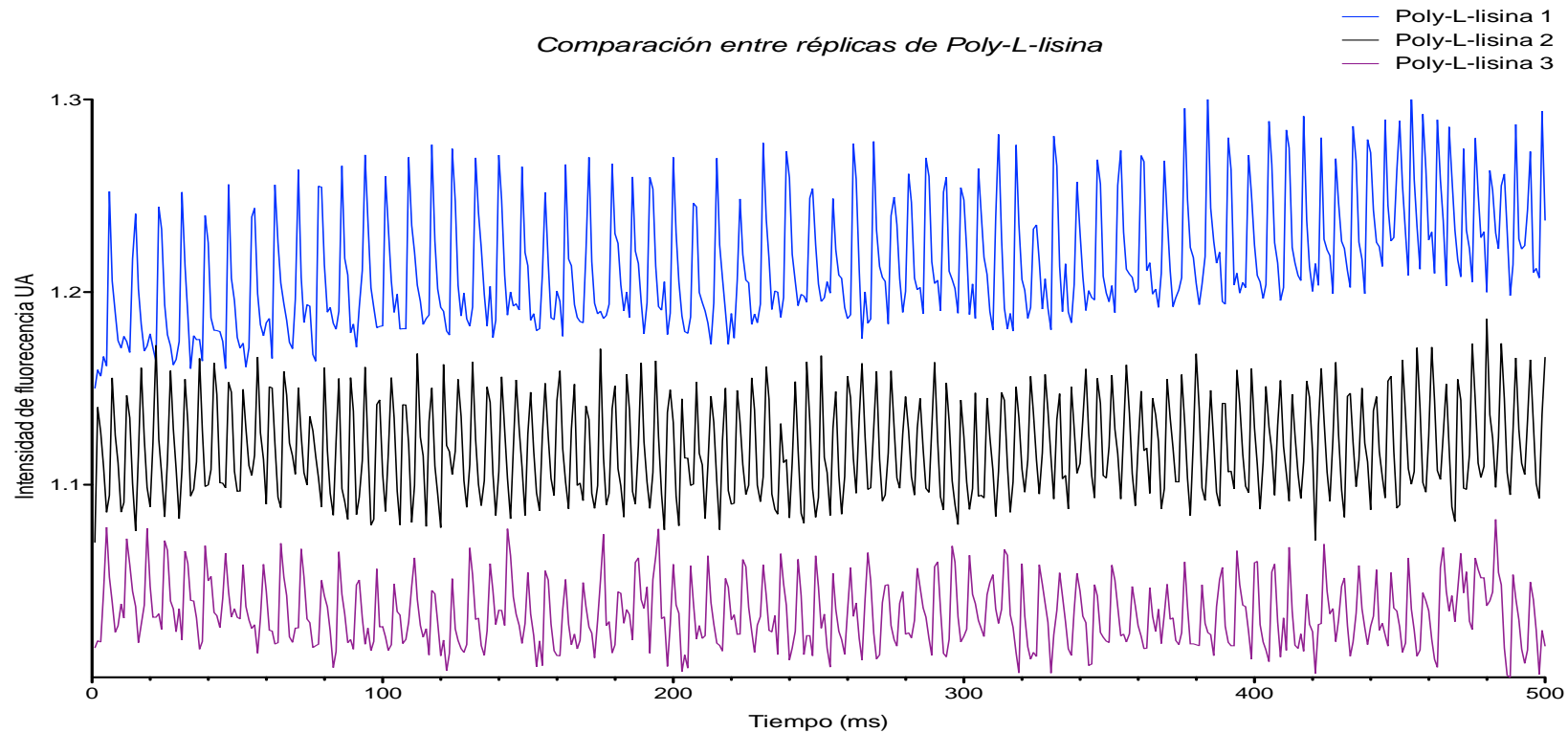


Figura 15. Comparación de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ de tres réplicas de cultivo primario realizado sobre superficie de Poly-L-lisina. Se observa un comportamiento homogéneo y sin cambios súbitos o caídas en la intensidad de fluorescencia, los trazos fueron desplazados con el fin de evitar superposiciones, y para facilitar la comparación de las réplicas. Al trazo de **Poly-L-lisina 1** le fue aumentado 0.15 U.A., al trazo de **Poly-L-lisina 2** le fue aumentado 0.07 U.A., mientras que al trazo de **Poly-L-lisina 3** no se le realizó cambio alguno. Como bien se puede apreciar, aunque no existen cambios marcados en el perfil de intensidad de fluorescencia por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, si existen diferencias en la amplitud de las espigas entre las distintas réplicas, lo cual nos habla de una diferente movilización de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ entre réplicas, ante el mismo tratamiento.

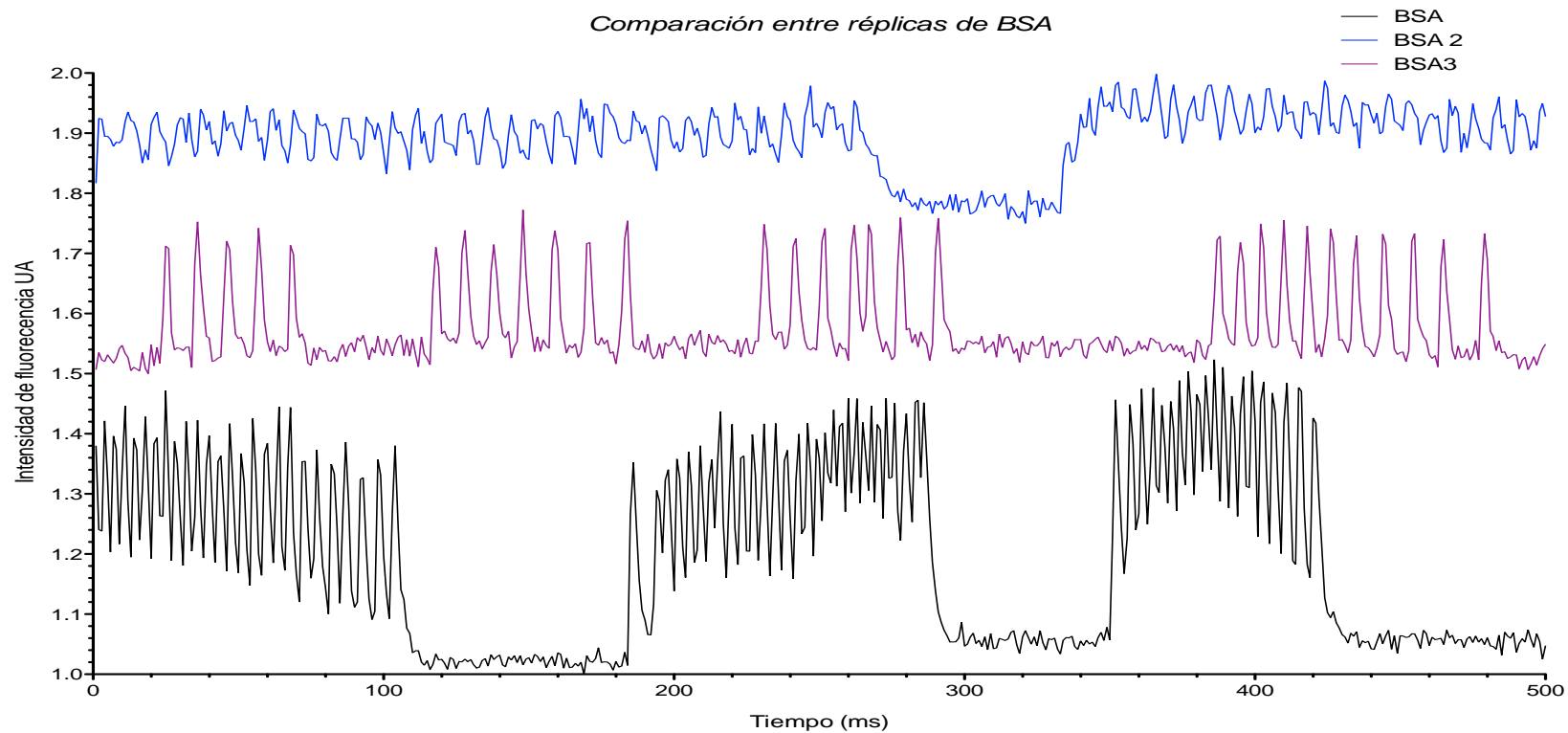


Fig 16. Comparación de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ de tres réplicas de cultivo primario realizado sobre superficie de BSA. En la gráfica se observa un comportamiento variado entre las réplicas, tanto en el cambio de intensidad de fluorescencia por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ como en la amplitud de las espigas. Sin embargo en todos los casos puede reconocerse un patrón de actividad intermitente. Los datos fueron desplazados con el fin de evitar la superposición y lograr una clara apreciación de ellos. Al trazo de **BSA 2** le fueron aumentadas 0.75 U.A., al trazo de **BSA 3** 0.5 U.A., mientras que a la réplica de **BSA 1** no se le realizó cambio alguno. Como bien se puede apreciar, el tratamiento de las células con BSA modifica considerablemente los perfiles de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$.

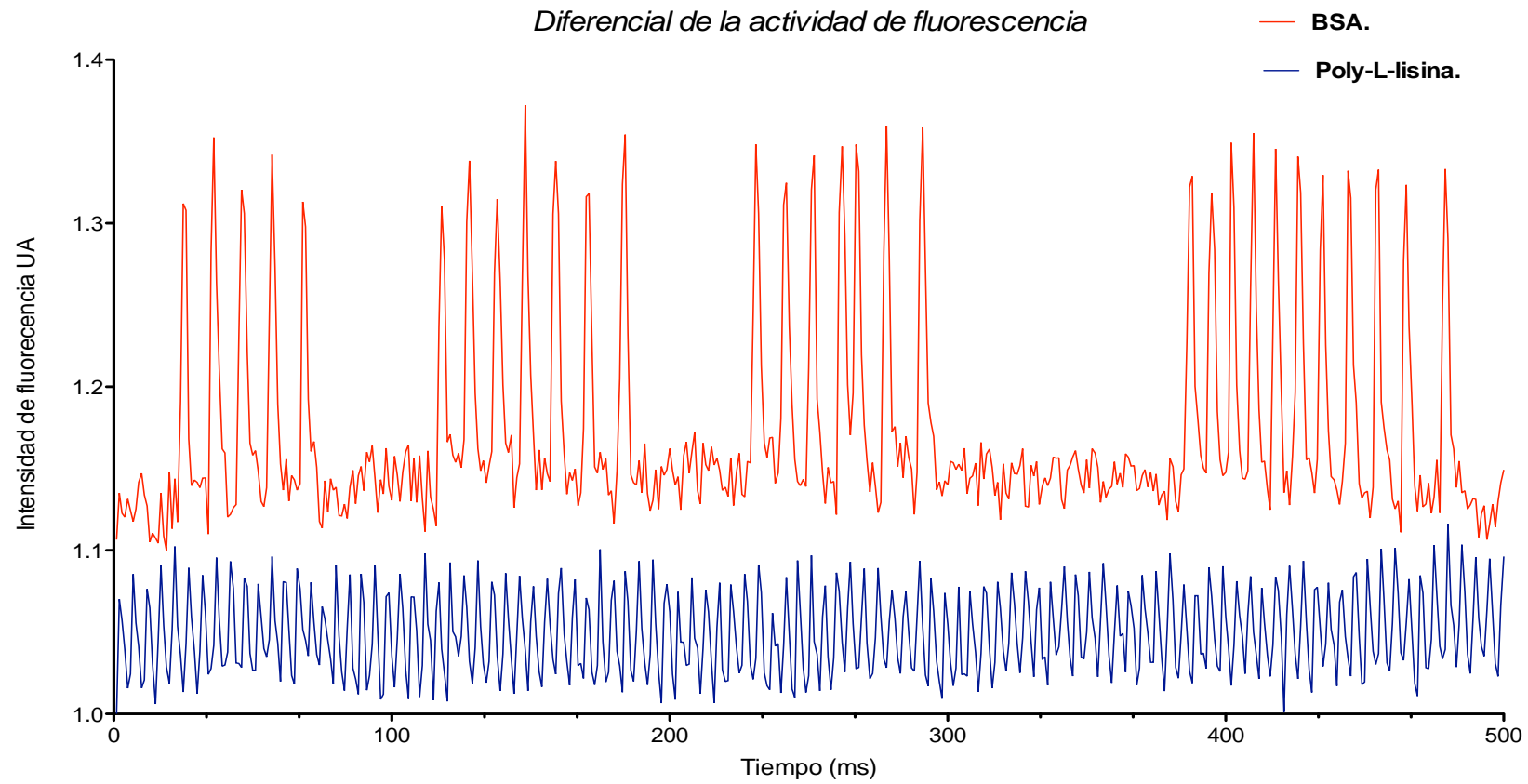


Fig 17. Comparación de las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ registradas mediante microscopía de fluorescencia, entre los registros típicos de cultivo primario realizados sobre **BSA** y **Poly-L-lisina**. Ambos registros fueron realizados en las mismas condiciones de tiempo y con la misma escala de intensidad de fluorescencia. Para evitar la superposición de los trazos individuales, al trazo de BSA se adicionó 0.1 U.A. Pueden reconocerse claramente dos diferentes perfiles de actividad de $[Ca^{2+}]_i$: uno intermitente y otro periódico.

Análisis de los patrones de actividad del cultivo

En la Figura 18 se muestra el análisis del número de picos de las seis repeticiones realizadas por cada adherente celular: BSA (*panel A*) o Poly-L-lisina (*panel B*). Para éste análisis se seleccionaron de forma aleatoria de 11 a 20 muestras de tamaño similar dentro de la ROI marcada para las repeticiones de los cultivos evaluados. Dentro de la figura las líneas punteadas indican la media general del conjunto de muestreos analizados en cada sustrato. En ambos casos, las medias de cada repetición exhiben variación con respecto a la media general. No obstante, es mayor la variación de actividad de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ para el caso de BSA, ya que las medias tienden a alejarse más de la línea punteada. Por otra parte, el análisis de varianza indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las repeticiones de cada adherente. Resultado que una vez más muestra mayor variación para BSA. Sin embargo, dichos resultados no son sorprendidos dada la poca heterogeneidad de la actividad registrada en las células cultivadas sobre BSA. Por ejemplo, en los muestreos analizados se encontraron grupos de células con un intervalo de picos de entre 4 y 54 revelada por fluorescencia de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, dando como resultado una gran variabilidad en las series de tiempo.

Por otra parte, la comparación de cada repetición entre los adherentes muestra que existe un número significativamente mayor ($p < 0.05$) de picos en cinco experimentos realizados con Poly-L-lisina (Figura 19 *panel A*). En general, los perfiles de Poly-L-lisina se ubican entre 40 y 90 picos, a diferencia de BSA que presenta una variación más amplia, con perfiles de entre 4 y 54 picos en cada repetición. A excepción de la última repetición en donde no se presentan ráfagas, sino una mayor amplitud y duración de los picos que se ubican entre 45 y 70. En consecuencia, el coeficiente de variación de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultó mucho mayor para el adherente BSA que para Poly-L-lisina (37.2 vs. 22.2 %, respectivamente). Finalmente, se encontró una diferencia significativa entre el valor promedio de los picos para cada adherente (Figura 19 *panel B*; $p < 0.001$). Así, en el sustrato de Poly-L-lisina

se presenta de forma consistente una mayor cantidad de picos a lo largo del experimento.

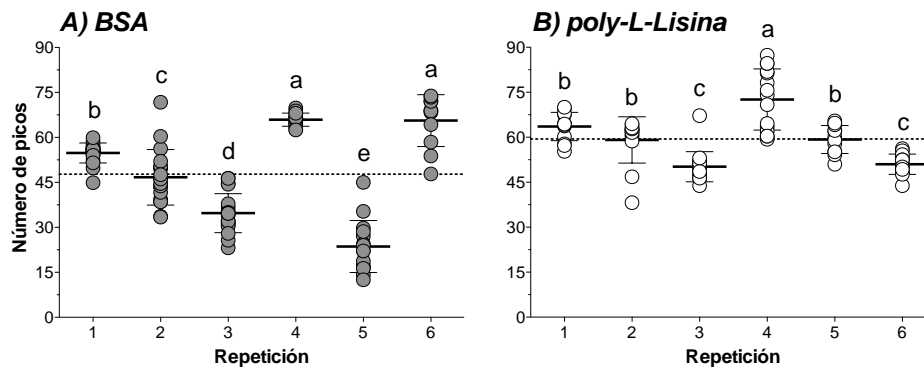


Figura 18. Gráficas de dispersión del número de picos obtenidos en los muestreos aleatorios realizados ($n = 11-20$) en cada repetición utilizando los adherentes celulares BSA (panel A) y Poly-L-Lisina (panel B). Las seis repeticiones por adherente celular se compararon mediante análisis de varianza seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. "a,b,c" las diferentes literales entre las repeticiones indican diferencias significativas al nivel $p < 0.05$. La línea punteada indica el número de picos promedio para cada sustrato.

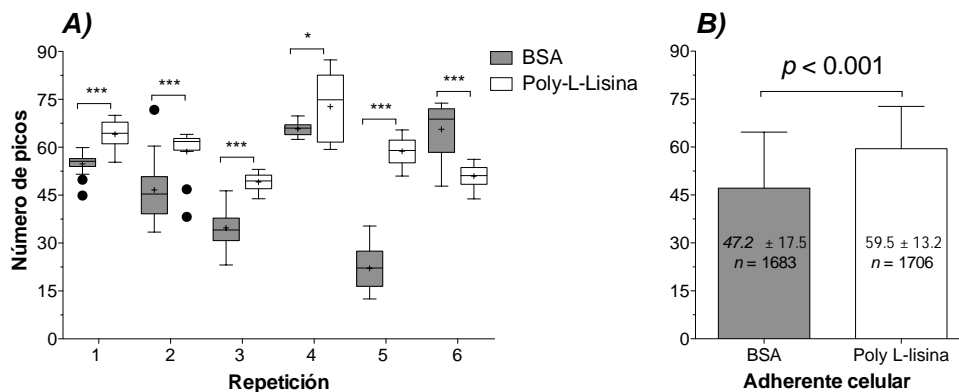


Figura 19. Gráficas de caja y bigote del número de picos obtenidos a través de las repeticiones entre los adherentes celulares BSA y Poly-L-Lisina (panel A). Gráficas de barras del valor promedio (\pm DE) del número de total de picos muestreados en cada sustrato (panel B). La comparación de las repeticiones por adherente celular se realizó mediante análisis de varianza de dos vías: sustrato y repetición. Las diferencias entre los promedios de réplicas se evaluaron con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. La comparación del promedio total de picos por sustrato se realizó con la prueba t de Student para dos medias independientes. *, ** y *** indican un nivel de $p < 0.05$, $p < 0.1$ y $p < 0.001$, respectivamente.

Como parte del análisis cuantitativo de las diferencias que genera el uso de cada tipo de adherente celular, se comparó el área bajo la curva generada por cada pico de actividad por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. De esta forma se ofrece una comparación de tipo funcional entre los cultivos crecidos en los dos adherentes, esto debido a que el área que se integra bajo la curva de los picos de actividad es un reflejo directo del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ movilizado por la célula. De esta forma, los cambios ligeros en la movilización de Ca^{2+} posiblemente modifiquen las funciones celulares.

En la Figura 20 se resume la comparación de los valores de área bajo la curva para las repeticiones de cada adherente celular: BSA (*panel A*) o Poly-L-lisina (*panel B*). Dentro de la figura las líneas punteadas indican la media general del conjunto de muestreos analizados en cada sustrato. Resulta notable que para BSA se presenta una tendencia a valores más elevados de área bajo la curva, así como una mayor variación entre las muestras con respecto a su media general (*panel A*), a diferencia de Poly-L-lisina que muestra una mayor consistencia de los datos de cada repetición (*panel B*) y evidentemente valores más pequeños de área bajo la curva. Los valores de área bajo la curva para BSA se ubican entre 625 y 775 U.A.

La comparación de los dos adherentes para cada repetición indicó que BSA presentó un área bajo la curva mayor en 4/6 repeticiones (Figura 21 *panel A*; $p < 0.05$). Por último, de forma contraria a lo que ocurrió con el número de picos, el adherente celular BSA presentó valores de área bajo mayores que Poly-L-lisina (Figura 21 *panel B*; $p < 0.001$). Esto a pesar de un coeficiente de variación mayor de BSA (5.1 %) con respecto a Poly-L-lisina (1.94 %). En resumen esta información implica una mayor movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por los compartimientos celulares en los cardiomiocitos cultivados sobre BSA como sustrato.

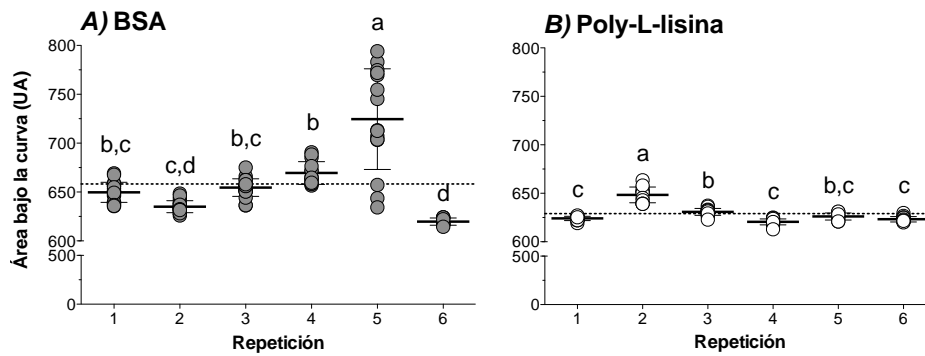


Figura 20. Gráficas de dispersión del valor de área bajo la curva obtenido en los muestreos aleatorios realizados ($n = 12-20$) en cada repetición, utilizando los sustratos BSA (panel A) y Poly-L-Lisina (panel B). Las seis repeticiones para cada sustrato se compararon mediante análisis de varianza seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. "a,b,c" las diferentes literales entre las repeticiones para cada sustrato indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$. El valor de área promedio para cada sustrato.

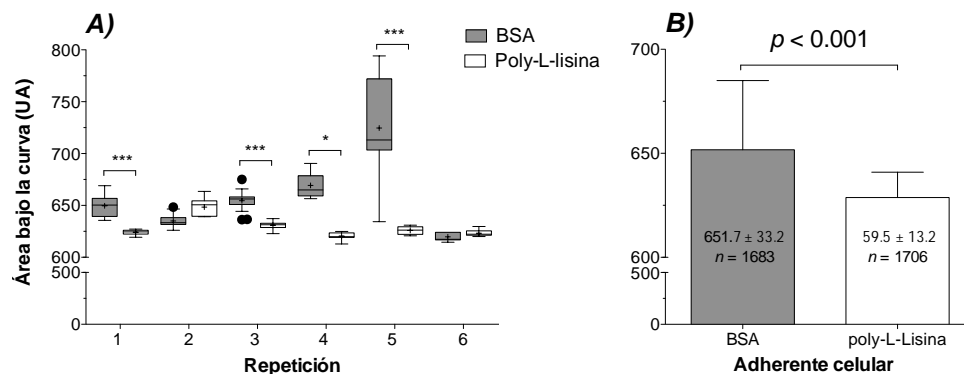


Figura 21. Gráficas de caja y bigote del valor de área bajo la curva obtenido a través de las repeticiones entre los sustratos BSA y Poly-L-Lisina (panel A). Gráficas de barras del valor promedio (\pm DE) del total de área bajo la curva muestreada en cada sustrato (panel B). La comparación de las repeticiones por sustrato se realizó mediante análisis de varianza de dos vías: sustrato y repetición. Las diferencias en las medias se evaluaron con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. La comparación del promedio total área bajo la curva por sustrato se realizó con la prueba t de Student para dos medias independientes. *, ** y *** indican un nivel de $p < 0.05$, $p < 0.1$ y $p < 0.001$, respectivamente.

En la Figura 22 se muestra el análisis de regresión lineal del área bajo la curva con respecto al número de picos registrados a través de las repeticiones. La intención del análisis consistió en determinar una relación funcional entre el número de picos y la $[Ca^{2+}]_i$ movilizado por la célula, esto medido a través del área bajo la curva. En ningún caso se obtuvo una regresión significativa entre las variables. Sin embargo, para el adherente BSA se presentó una tendencia, la cual se aprecia en la relación negativa entre el número de picos y su área bajo la curva; a menor cantidad de picos se incrementó el área bajo la curva (*panel A*). Efecto posiblemente asociado con una mayor amplitud de los picos. De igual forma, no se detectó una correlación significativa ($p > 0.05$) entre las variables, no obstante la tendencia previamente mencionada se mantuvo.

En el caso de Poly-L-lisina la regresión lineal no presentó ninguna significancia (Figura 22 *panel B*; $p > 0.05$), esto debido a dos factores: a) no se presentó una variación tan alta en el número de picos, con lo cual el área bajo la curva fue similar entre las repeticiones y b) los picos de actividad registrados fueron de similar amplitud, generando con ello poca variabilidad en la cantidad de $[Ca^{2+}]_i$ movilizado por la célula. Tampoco se obtuvo una correlación positiva entre las variables, y de hecho ni siquiera se presentó alguna tendencia. El análisis nos indica que a pesar de que los modelos no resultaron significativos, la tendencia mostrada con BSA sugiere diferencias importantes en la función y actividad de los cardiomiocitos cultivados.

En la figura 23 se presenta una comparación diferencial del pico máximo y mínimo de cada una de las ROI seleccionadas por adherente celular. Dicho diferencial se obtuvo con la función ($f_x = \text{Max}(x) - \text{Min}(x)$), que implica que se restó el punto máximo del punto mínimo de cada ROI. Se presentan dos trazos característicos para cada sustrato, cada uno con el área bajo la curva rellena para comparar cualitativamente las diferencias entre dichas áreas (*panel A*). Adicionalmente la comparación del diferencial de los picos máximo y mínimo resultó significativamente diferente entre los sustratos (Figura 23 *panel B*; $p < 0.05$).

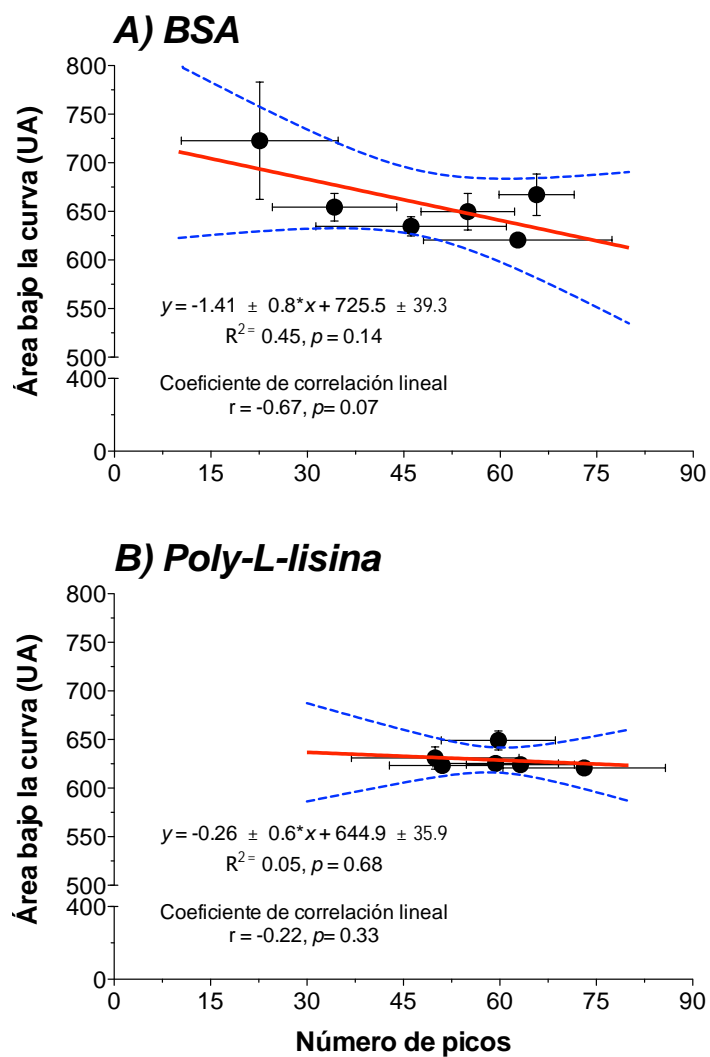


Figura 22. Análisis de regresión lineal del número de picos y su correspondiente área bajo la curva. La gráfica de dispersión muestra los valores promedio (\pm DE) del número de picos y del área bajo la curva correspondientes a BSA (panel A) y poli-L-Lisina (panel B). En los insertos se muestra la ecuación de regresión (R^2), así como el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r). La línea sólida roja representa la recta de regresión, mientras que las líneas punteadas azules ilustran los intervalos de confianza al 95%.

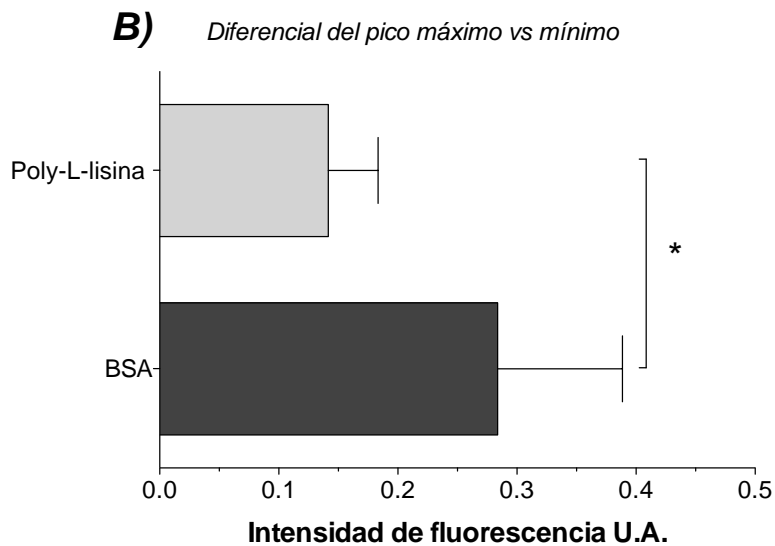
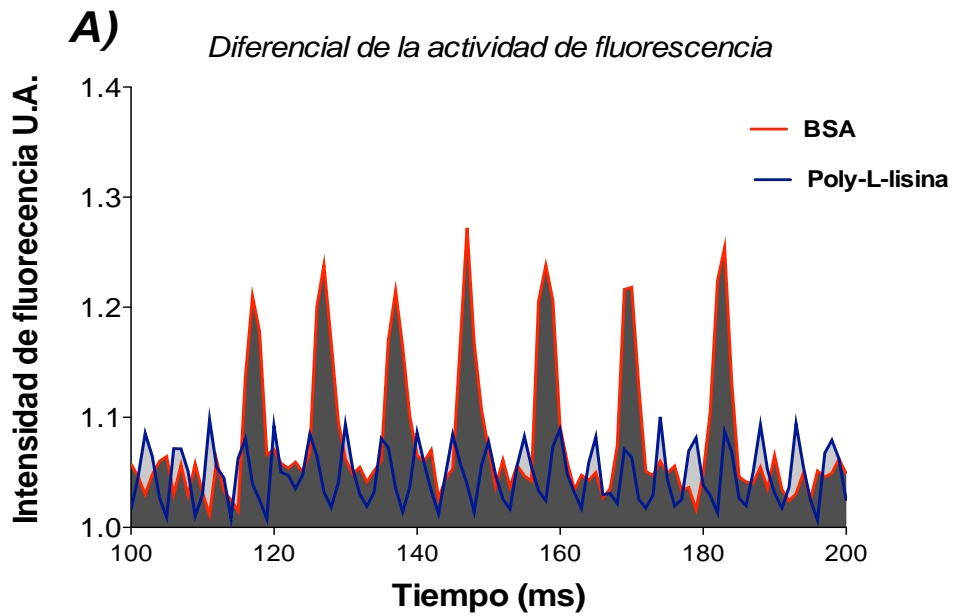


Figura 23. Análisis comparativo del rango de amplitudes de picos entre los dos adherentes celulares. En el panel A) se sobrelapan dos trazos con la finalidad de comparar la diferencia de la amplitud entre los picos de BSA n(rojo) y Poly-L-lisina n(azul), los trazos fueron rellenados para apreciar claramente las diferencias. En el panel B) se muestra un grafico de barras con desviación estándar, los datos graficados muestran el diferencial promedio del pico máximo menos el pico mínimo de cada uno de las ROI seleccionadas de todas la réplicas para cada adherente celular.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran la existencia de dos respuestas intrínsecas de los cardiomiocitos ventriculares al ser cultivados sobre dos adherentes celulares: BSA y Poli-L-lisina, sugiriendo que los patrones de actividad observados están definidos por el microambiente generado entre la MEC elegida y los cardiomiocitos.

Inter -Relación MEC-Cardiomiocito

Estudios previos realizados en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata y ratón, muestran que la adhesión celular a una MEC es una variable importante para la organización, diferenciación y determinación estructural de la célula, debido a que se establece un microambiente entre la célula y la MEC que puede modular la dinámica de las células (Engler et al., 2008, 2004; Kidoaki, Kawano, Yoshikawa, & Ho, 2012). En años recientes se ha postulado que el grado de rigidez del sustrato o adherente celular juega un papel importante en experimentos *"in-vitro"*, puesto que llega a ser una variable limitante en la elaboración de modelos realistas. La rigidez del sustrato puede modular de manera directa o indirecta las interacciones célula-célula y célula-MEC, repercutiendo en la sincronización y morfología de los cardiomiocitos (Engler et al., 2004; Piazzesi, Lucii, & Lombardi, 2002). Este hecho tiene gran relevancia, si pensamos que una aplicación y área de interés de los estudios in vitro es la bioingeniería de tejidos.

En nuestra investigación, realizada con la técnica de cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares, se tiene la ventaja de aislar a las células de cualquier estímulo sistémico, y contar con poblaciones muy homogéneas es decir sin fibroblastos u otro tipo celular que altere nuestros resultados. Como lo hemos visto mediante la tinción de Accusant, en donde encontramos una proporción de células musculares mayor al 80%. Con la ayuda de esta técnica nos planteamos el objetivo de estudiar la influencia ejercida por dos adherentes celulares sobre los cardiomiocitos ventriculares.

Los registros temporales de la actividad por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, mediante técnicas de fluorescencia, muestran diferencias significativas entre los patrones de actividad obtenidos en cada substrato o adherente celular (Figuras 14, 15 y 16). Estas diferencias pueden reconocerse a pesar de la variabilidad propia de las diferentes réplicas o regiones locales de un mismo experimento.

Si bien encontramos variaciones locales al patrón global de actividad, encontramos que no interferían, o no eran lo suficientemente extendidas como para alterar el régimen de actividad global.

En los cultivos realizados sobre superficies con BSA, se observan periodos de actividad en espigas que se presentan como ráfagas, seguidas de caídas o intermitencias momentáneas en la actividad detectada por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, para reiniciar un nuevo episodio de actividad en ráfaga. Estas intermitencias se presentan a lo largo de los registros en todas las réplicas, a pesar de la variabilidad entre ellas.

Durante los registros de actividad realizados sobre BSA, se muestran intermitencias, sin embargo se puede observar que en algunas regiones localizadas permanece la actividad de manera constante, lo cual podría llevar a pensar que las intermitencias son debidas a una pérdida en la sincronía del cultivo por la influencia ejercida por el adherente celular, y no a un descenso o baja de actividad generalizada. Es decir que las posibles fuerzas de tensión ejercidas, el microambiente modificado por el adherente o la configuración de la molécula de BSA, modulan la actividad del cultivo de manera diferente en diversas regiones del cultivo primario. Otra posibilidad para explicar intermitencias, por ejemplo, podría pensarse en la acumulación extracelular de algún metabolito durante el desarrollo de una ráfaga, que determina o inhibe la actividad, el cual al irse lavando durante la fase sin actividad, conduce a un nuevo episodio de actividad, etc.

En los cultivos realizados sobre superficies con adherente celular "Poly-L-lisina", se observan patrones de actividad detectada por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, homogéneos y continuos en las espigas emitidas, es decir, no hay cambios o intermitencias en la intensidad de fluorescencia (no presentan decrementos o intermitencias) a lo largo del registro, este patrón regular se observa incluso después de terminar los registros. Si se comparan réplicas de diferentes días, existe variaciones perceptibles (figura 14) entre ellas, variaciones en amplitud y frecuencia de las espigas emitidas y detectadas por $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. Con estos resultados proponemos que la Poly-L-lisina genera un microambiente favorable para el desarrollo de una actividad contráctil continua y un microambiente posiblemente mas favorable para estudios farmacológicos, mientras que en el microambiente generado por el adherente BSA puede ocasionar ruido o inestabilidad para realizar registros donde existe la aplicación fármacos debido a la irregularidad en la actividad de movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Nuestros resultados también proporcionan información complementaria a estudios realizados previamente por el grupo de investigación de Engler (Engler et al., 2008, 2004) . En los cuales muestran que la posible influencia de los elementos de la MEC se debe en gran parte a la forma y función que adquieren las células. Nuestros análisis estadísticos confirman que las células al encontrarse en contacto con distintos adherentes celulares modifican y regular diferencialmente sus perfiles de actividad; como son la frecuencia, número de picos y área bajo la curva. Por ejemplo el microambiente generado por Poly-L-lisina propicia un comportamiento más homogéneo en cuanto al número de picos promedio (\bar{X} en Poly-L-lisina 59). Es decir, los patrones de actividad espontánea observados en los cultivos que realizamos, se deben en gran parte al adherente celular utilizado, por lo que al realizar estudios en cultivos primarios hay que tomar en cuenta esta variable que modifica la excitabilidad celular.

El análisis de áreas bajo la curva muestra claramente, que una mayor amplitud de los picos corresponde a la movilización de una mayor cantidad

de $[Ca^{2+}]_i$ que modula la excitabilidad de la célula. En el caso de BSA el área es mayor, y además se presenta en un patrón que no puede sostenerse mucho tiempo, sino como ráfagas intermitentes.

Por el contrario, en los cultivos sobre Poly-L-lisina se observa variabilidad en el número de picos, variación en la amplitud y frecuencia (Figura 13 y 14) entre réplicas de diferentes experimentos, e incluso en un mismo cultivo existen diferencias notables en cuanto la capacidad de movilizar $[Ca^{2+}]_i$. Todo ello confirma la hipótesis sobre la modificación y modulación del microambiente generado por los adherentes celulares, estos resultados también concuerdan con los obtenidos por los grupos de trabajo de Engler y Kidoaki (Engler et al., 2008; Kidoaki et al., 2012), los cuales postulan que: las diferentes mezclas de proteínas de MEC ocasionan cambios en los patrones de crecimiento, morfología y actividad en las células expuestas, sus datos fueron obtenidos mediante pruebas electrofisiológicas y de fluorescencia.

Estructura de los adherentes celulares: BSA y Poly-L-lisina

Hemos señalado que en nuestro trabajo también se observan patrones de actividad celular espontánea asociados típicamente a cada tipo de sustrato utilizado. Sin embargo, durante el análisis de los resultados encontramos subpoblaciones de cardiomiocitos, con un patrón local diferente al patrón de actividad global, que no parecen influenciados o muy poco por el microambiente establecido por los adherentes celulares respectivos. De ahí que se recurriera al muestreo aleatorio de diferentes áreas en las réplicas de los cultivos ante los diferentes tratamientos, para comparar las diferentes poblaciones y subpoblaciones. Se puede observar que entre las réplicas con el adherente BSA hay mayor variabilidad entre los patrones en ráfagas, pero son siempre en ráfagas (excepto un único caso) . En cambio con Poly-L-lisina el comportamiento fue más homogéneo, como se ha revisado previamente. Qué propiedades de las proteínas empleadas pueden ayudar a explicar los diferentes patrones de actividad observados, vamos a revisar la posibilidad de que estos cambios se deban a las configuraciones químicas y la atracción iónica que ejercen sobre el microambiente y las células.

Estudios previos realizados usando BSA (Figura 21) por los grupos de trabajo de George y Krag-Hansen. (George, 1962; Krag-hansen, 1993), describen la gran afinidad que presenta esta molécula a iones divalentes, especialmente a: $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+}$ y $> Ba^{2+}$. La molécula de BSA suele encontrarse en el plasma sanguíneo interaccionando frecuentemente con iones Ca^{2+} . Esto nos ha llevado a pensar que al emplear BSA como adherente de un cultivo celular de cardiomiocitos, pueda estar generando un microambiente atractor de iones Ca^{2+} por la afinidad tan fuerte que la molécula tiene a este ion divalente (George, 1962; Park, 2005); tomando en cuenta que los cardiomiocitos requieren calcio para llevar a cabo funciones vitales como la contracción muscular, y en específico por ser células cardiacas embrionarias que presentan autoexcitabilidad y se encuentran trabajando constantemente.

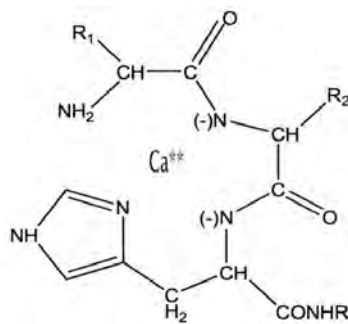


Figura 24. Se muestra una molécula típica de “BSA” en la cual se muestra al centro un Ion Ca^{2+} (divalente), con este esquema se pretende ejemplificar la forma de la molécula y la atracción que ejerce esta sobre los iones divalentes.

De manera que el entramado de BSA estaría formando pozas donde se retienen iones, probablemente con preferencia al calcio, y este almacenamiento propiciaría una activación episódica de las células.

Considerando las características de la BSA surge otra posible explicación al patrón observado, debido al ordenamiento tridimensional de las moléculas de BSA en una superficie plana (Figura 21), se formarían irregularidades o relieves entre ella y el sarcolema u otras estructuras de la célula, a manera de surcos que podrían funcionar también como depósitos locales y modular los cambios en la disponibilidad de calcio y por tanto en intensidad de

fluorescencia de los registros obtenidos. Estas dos posibles influencias, retención iónica y tracción mecánica, podrían modular el comportamiento excitable de las células e incluso la organización y ordenamiento de todo el cultivo. Todo lo cual puede ocasionar alteraciones en el perfil de las espigas obtenidas por fluorescencia y debidas a movilización de $[Ca^{2+}]_i$, no olvidemos que la contracción misma representa una fuerza opositora ejercida por la célula sobre la MEC en la que se encuentra.

Se ha reportado en diferentes estudios que la Poly-L-lisina (figura 22), es un adherente celular no específico muy común y estable, utilizado en: inmunofluorescencia, microscopía electrónica, registros *in-vitro* e *in-vivo* de cultivos celulares, ingeniería de tejidos y proliferación celular (Mazia, 1975; Spoerke & Stupp, 2005; Youm et al., 2011). Posee un peso que va de 80 kDa-100 kDa y funciona como un adherente celular con gran estabilidad para el anclaje de los tejidos en diferentes tipos celulares. Entre ellos cardiomiocitos de mamífero los cuales no muestran modificaciones post-cultivo (Mazia, 1975; Vornanen & Isen-, 1990).

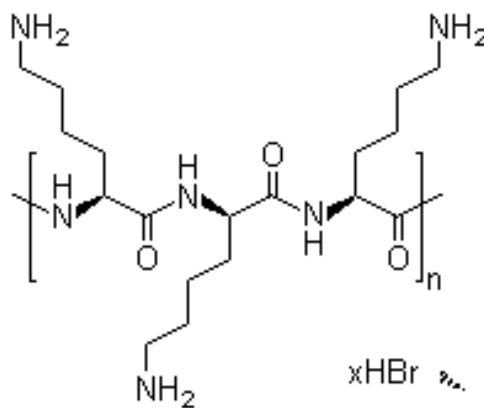


Figura 25. Se muestra la estructura de la molécula de Poly-L-lisina, la estructura presenta una forma lineal.

Los registros obtenidos de nuestros experimentos de fluorescencia, muestran que los cultivos desarrollados en Poly-L-lisina presentan actividad continua más homogénea y periódica. Resultados que nos llevan a pensar que el ordenamiento de estas moléculas no forma surcos o microcanales atrayentes

en las superficie, lo que permitiría una adherencia muy homogénea y sin tantas irregularidades en el contacto entre el sarcolema y la superficie del adherente celular, con ello se lograría una estabilidad mecánica mayor y en otros de los mecanismos involucrados en la movilización de $[Ca^{2+}]_i$, cuestión que no ocurriría en cultivos realizados sobre BSA.

Caracterización del número de picos y área bajo la curva en los diferentes adherentes celulares

Durante el análisis se observó que en los cultivos de cardiomiocitos existían cambios en los perfiles de emisión de fluorescencia por $\Delta[Ca^{2+}]_i$, ligados a los adherentes celulares, como se ha mencionado previamente. Por lo tanto fueron realizadas mediciones en el número de picos, el área bajo la curva y la comparación del rango entre pico máximo y mínimo de fluorescencia del $[Ca^{2+}]_i$ movilizado en las células, estos resultados se muestran en las figuras 16, 18 y 20 respectivamente.

El conteo de número de picos en los cultivos realizados el adherente Poly-L-lisina, revela un mayor número de espigas respecto a los cultivos realizados con el adherente BSA (\bar{X} global de espigas: Poly-L-lisina 59.7 y BSA 47.2). Como se muestra en la figura 16 B).

Por otra parte el adherente celular Poly-L-lisina conduce a una actividad muy homogénea y coordinada, tal resultado se muestra en la figura 13 con una matriz de variaciones de fluorescencia donde se aprecia que todo el cultivo presenta un patrón muy coordinado y continuo, por lo cual pensamos que el número mayor de espigas se debe en gran medida a la sincronía sostenida entre todos los elementos del cultivo, sin embargo al no ser selectivo para cationes divalentes como el Ca^{2+} , como sí lo es la BSA, si bien da pauta a que la movilización de los iones sea homogénea, no alcanza flujos importantes, por lo que las amplitudes y áreas bajo la curva son menores comparativamente.

De igual manera, la forma de la célula no sufre deformaciones y puede facilitar el tránsito (la molécula Poly-L-lisina es lineal), reduciendo deformaciones en el sarcolema. Estos factores permitirían mayor homogeneidad en los patrones de espigas.

Una vez mostrados los patrones intermitentes en las espigas de las células mediante fluorescencia, a pesar de las irregularidades, se vuelven parcialmente constantes y sincrónicos, en cuanto a la periodicidad y aparición de los decrementos en la actividad y las ráfagas. Esta actividad intermitente la interpretamos como una deficiencia de la célula (sarcolema y organelos celulares) para movilizar de iones Ca^{2+} , la cual está estrechamente relacionada de alguna manera con el microambiente ocasionado por la BSA.

Cuando comparamos el número de picos promedio de cada réplica (figura 16 A)) y no de manera global, cinco de seis experimentos corroboran que los cultivos realizados sobre el adherente celular Poly-L-lisina presentan un número mayor de picos. En el caso particular de las dos réplicas número 6, aquella con el tratamiento de "BSA" muestra un número mayor de picos cada uno de mayor duración. En este caso claramente el patrón observado en BSA sugiere una tendencia a "tener un menor número de picos, pero con mayor movilización de calcio".

En los cultivos realizados sobre Poly-L-lisina, de actividad continua, se muestra típicamente un mayor número de picos. El análisis comparativo entre réplicas realizadas sobre BSA muestra dispersión estadística.

El área bajo la curva analizada en los registros de las réplicas del cultivo, muestra mayor proporción por parte de los cultivos realizados sobre el adherente BSA, respecto a los cultivos realizados sobre Poly-L-lisina (Figura 18). La medición de el área bajo la curva se realizó con la finalidad de obtener la información (indirecta) sobre la cantidad de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ movilizada por las células durante los periodos de EC. Las espigas o ráfagas, presentan mayor duración y amplitud en cultivos realizados sobre la "BSA" ($\text{BSA} \pm 651.7$ U.A.), contrariamente en Poly-L-lisina es menor pese a que presenta mayor

número de espigas. Éstas al tener una corta duración y amplitud menor (Poly-L-lisina ± 6298.7 U.A.) presentan menor movilización de iones Ca^{2+} , diferencias que fueron significativa respecto a una $p < 0.001$.

Los resultados muestran claramente que en cultivos realizados sobre BSA se moviliza una mayor cantidad de iones Ca^{2+} durante el proceso de EC, con esto se ve altera la excitabilidad y propagación eléctrica del cultivo, puesto que el microambiente generado por la BSA opone resistencia (eléctrica y mecánica) y modula el microambiente. También sospechamos que los cultivos realizados sobre BSA movilizan grandes cantidades de Ca^{2+} a manera de grandes olas, debida a una administración distinta de calcio relacionada fuertemente con el microambiente, mientras que los cultivos sobre Poly-L-lisina movilizan cantidades pequeñas más regularmente, relacionadas íntimamente con el adherente celular, el cual es “no específico”.

Los resultados muestran la íntima relación de la intervención del micro-arreglo (configuración y ordenamiento) de las moléculas, las cuales están involucradas con la función global, particular o incluso la manera de adhesión de cardiomiocitos a la superficie, la cual podría deformar el sarcolema, en el caso de las moléculas de BSA debido a su gran tamaño (≈ 66.5 KDa), pensamos que se generan irregularidades en la superficies de las células (lo cual se puede demostrar con microscopía de fuerza atómica), relacionada con el ordenamiento de molecular de la BSA lo cual genera puntos o áreas atractoras de iones y otras moléculas, que modulen el comportamiento de los cultivos.

La diferencia significativa en el análisis de regresión lineal para BSA (Figura 19 A) del área bajo la curva y número de picos, muestra una correlación que al aumentar el número de picos se ve disminuida. Posiblemente los cambios en la amplitud de las espigas entre tratamientos (Figura 20 A)), se deban a la activación de otros mecanismos de compensación que movilicen iones Ca^{2+} de manera poco eficaz. Otra explicación posible mencionada previamente, es que las células presenten ciertas irregularidades en la membrana pero que éstas sean debidas a la relación MEC-Celular por “fuerzas mecánicas”

opositoras, ocasionado que los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ se mantengan altos o bajos durante ciertos intervalos de tiempo.

Los cultivos realizados sobre el adherente Poly-L-lisina, movilizan menores cantidades de iones Ca^{2+} por espiga y presentan mayor número de espigas, con este perfil se moviliza una gran cantidad de Ca^{2+} , resultado de la sumatoria de todas las espigas cortas y continuas, sin embargo no se moviliza tanto Ca^{2+} como las células cultivadas sobre BSA.

Los análisis de regresión lineal (Figura 20 B)) muestran correlación entre el número de picos y el área bajo la curva para un pequeño rango de aumento en el número de picos; por arriba de este valor la movilización de iones Ca^{2+} se vuelve constante en BSA. Es decir, un número elevado de picos satura los sistemas de movilización de calcio, posiblemente como consecuencia de un microambiente con gran capacidad de almacenamiento, relacionada con el ordenamiento molecular (Figura 20.).

Las implicaciones de nuestro estudio comparativo de los dos adherentes celulares, tiene una repercusión directa en los modelos experimental de cultivo celular primario, debido a que se muestra una variable mas que altera el comportamiento de las células por influencia directa de los adherentes celulares utilizados comúnmente en laboratorio y también el microambiente que generan. Mientras que con el adherente Poly-L-lisina se muestran patrones de fluorescencia homogéneos en la actividad espontánea (ideales para el estudio de los efectos de distintos fármacos), en el adherente BSA, los patrones de fluorescencia son irregulares (intermitencias en la fluorescencia) y pueden llegar a alterar los resultados de estudios farmacológicos, esto no significa que sea un mal modelo para otros estudios, puesto que de cierta manera el BSA pueda estar generando un perfil similar a un comportamiento celular similar al de un adulto o al de afecciones patológicas, puesto que se ha reportado que las propiedades fisiológicas de la MEC cambian durante los diferentes estadios de desarrollo *in-vivo*. La BSA como sustrato podría ajustarse a otros estudios con finalidades diferentes al que es utilizado el adherente celular Poly-L-lisina.

Una vez concluido el análisis estadístico y comparativo de los resultados, podemos señalar que las μ -plataformas de PDMS son un sistema adecuado para restringir la geometría y crecimiento de los cardiomiocitos en cultivo primario. Lo que contribuye a distinguir más claramente el efecto de los adherentes celulares. Asimismo, pudimos comprobar que estas plataformas no obstruyen ni interfieren con la medición con fluorescencia (no hay interferencia de autofluorescencia por parte de las micro plataformas de PDMS) variaciones de calcio intracelular.

Conclusiones

- 1.- Hay una relación directa entre el patrón de excitabilidad celular, y las propiedades bioquímicas de los adherentes celulares empleados en cultivos primarios de cardiomiocitos ventriculares de pollo de 7 días de desarrollo “*in-ovo*”.
- 2.- Se encontró que las monocapas de cardiomiocitos cultivadas sobre BSA muestra actividad espontánea intermitente o en ráfagas con una importante variación entre réplicas.
- 3.- El patrón de actividad espontánea de las células desarrolladas sobre Poly-L-lisina fue regular y periódico, y mucho menos disperso en las diferentes réplicas.
- 4.- Los resultados sugieren que el adherente celular “BSA” genera un microambiente variable, que favorece la movilización de calcio intracelular, lo que se reconoce por la mayor amplitud y área bajo la curva
- 5.- Los cultivos realizados sobre el adherente celular Poly-L-lisina, muestran mayor homogeneidad en el total de las espigas y área bajo la curva reveladas por fluorescencia de $\Delta[Ca^{2+}]_i$, así como un mayor número de picos y menor en el área bajo la curva en comparación al BSA. Es decir, una mayor estabilidad en los perfiles de las espigas y excitabilidad de la célula.
- 6.- La diferencia de la actividad y excitabilidad del cultivo de cardiomiocitos ventriculares entre tratamientos, revelada por fluorescencia de $\Delta[Ca^{2+}]_i$, es estadísticamente significativa.
- 7.- La construcción de μ -plataformas de PDMS simplifica el análisis de los efectos de sustratos celular, pues reduce el número de variables a considerar.

Perspectivas

- Estudiar en cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de mamífero, si también existe una variación significativa de la excitabilidad ejercida por los adherentes celulares Poly-L-lisina y BSA.
- Caracterizar la topografía de cada uno de los adherentes celulares Poly-L-lisina y BSA mediante microscopia de fuerza atómica.
- Realizar mediciones de impedancia de los adherentes celulares Poly-L-lisina y BSA, para una mayor caracterización sobre las cargas que tienen los adherentes celulares.
- Aislar cardiomiocitos ventriculares individuales para realizar registros de morfología, diferenciación, desarrollo y adherencia, sobre los adherentes celulares BSA y Poly-L-lisina.
- Aplicar una variación en las geometrías de las plataformas, para aclarar la contribución de la geometría tisular y su reorganización en cultivo primario.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2004). *Biología Molecular de la Célula* (Omega S.A., p. 1463).
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), 517-29. doi:10.1038/nrm1155
- Bonazzola, P., & Takara, D. (2010). Cardiac basal metabolism: energetic cost of calcium withdrawal in the adult rat heart. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 199(3), 293-304. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02094.x
- Bub, G. (2004). Monolayer cell cultures as model systems for studying paroxysmal atrial fibrillation. *Journal of Electrocardiology*, 37, 44-46. doi:10.1016/j.jelectrocard.2004.08.014
- Causey Whittow, G. (2000). *Avian Physiology*. (G. Causey Whittow, Ed.) *Chemical Senses* (Fifth edit., p. 685). USA: Elsevier Inc.
- Chase, A., & Orchard, C. H. (2011). Ca efflux via the sarcolemmal Ca ATPase occurs only in the t-tubules of rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 50(1), 187-93. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.10.012
- Donald E. Ingber. (2010). From Cellular Mechanotransduction to biologically inspired Engineering. *National Institute of Heart (NIH)*., 38(3), 1148-1161. doi:10.1007/s10439-010-9946-0.From
- Engler, A. J., Carag-krieger, C., Johnson, C. P., Raab, M., Tang, H.-yao, Speicher, D. W., Sanger, J. W., et al. (2008). Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity : scar-like rigidity inhibits beating. *Journal of Cell Science*, 3794-3802. doi:10.1242/jcs.029678
- Engler, A. J., Griffin, M. A., Sen, S., Bönnemann, C. G., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2004). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness : pathological implications for soft or stiff microenvironments. *Cell*, 166(6), 877-887. doi:10.1083/jcb.200405004
- Espira, L., & Czubryt, M. P. (2005). REVIEW / SYNTHESIS Emerging concepts in cardiac matrix biology 1, 996-1008. doi:10.1139/Y09-105
- George, S. (1962). the Interaction of Magnesium, Calcium and Strontium. *interactions*, 152-156.
- Gilbert, S. F. (2003). *Developmental Biology*. (Seventh Ed., p. 723.). Sunderland, Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates, Inc.
- Grunow, B., Wenzel, J., Terlau, H., Gebert, M., & Kruse, C. (2011). Cellular Physiology Biochemistry and Biochemistry In vitro Developed Spontaneously

- Contracting Cardiomyocytes from Rainbow Trout as a Model System for Human Heart Research. *Digestion*, 1-12.
- Guyton, A. C. (M D.). (2006). *TRATADO DE FISILOGIA MEDICA*. (J. E. (Ph D.) Hall, Ed.) (ELSEVIER S., p. 1115). United States of America. Mississipi.: ELSEVIER SCIENCE.
- Iorga, B., Neacsu, C. D., Neiss, W. F., Wagener, R., Paulsson, M., Stehle, R., & Pfitzer, G. (2011). Micromechanical function of myofibrils isolated from skeletal and cardiac muscles of the zebrafish. *The Journal of general physiology*, *137*(3), 255-70. doi:10.1085/jgp.201010568
- Iskratsch, T., & Ehler, E. (2011). Formin-g muscle cytoarchitecture. *Bioarchitecture*, *1*(2), 66-68. doi:10.4161/bioa.1.2.15467
- Jaimes-méndez, N., Zulma, P.-contreras, Delsy, D.-vera, Melisa, C.-sulbarán, & Virginia, B. R. (2010). ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE CARDIOMIOCITOS EMBRIONARIOS Y. *Heart*, *19*(3), 232-241.
- Keizer, J., Li, Y.-xian, Stojilkovic, S., & Rinzel, J. (1995). Essay InsP3-induced Ca²⁺ + Excitability of the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, *6*(August), 945-951.
- Kidoaki, S., Kawano, T., Yoshikawa, K., & Ho, M. (2012). Rigidity Matching between Cells and the Extracellular Matrix Leads to the Stabilization of Cardiac Conduction. *Biophysical Journal*, *102*(February), 379-387. doi:10.1016/j.bpj.2011.12.018
- Kragh-hansen, U. (1993). Quantitative Analyses of the Interaction between Calcium Ions and Human Serum Albumin, *39*(2), 202-208.
- Mackenzie, L., Roderick, H. L., Berridge, M. J., Conway, S. J., & Bootman, M. D. (2004). The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction. *Journal of cell science*, *117*(Pt 26), 6327-37. doi:10.1242/jcs.01559
- Martinsen, B. J. (2005a). Reference guide to the stages of chick heart embryology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *233*(4), 1217-37. doi:10.1002/dvdy.20468
- Martinsen, B. J. (2005b). Reference guide to the stages of chick heart embryology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *233*(4), 1217-37. doi:10.1002/dvdy.20468
- Mazia, D. (1975). ADESION OF CELLS TO SURFACES COATED WITH POLYLYSINE. *Journal Of Cell Biology*, *66*(3), 198-200.
- Männer, J. (2000). Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping

- process. *The Anatomical record*, 259(3), 248-62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861359>
- Naranjo, T. Á., Noguera-Salvá, R., & Guerrero, F. F. (2009). La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). *Revista Española de Patología*, 42(4), 249-261. doi:10.1016/S1699-8855(09)70192-8
- Park, J., Chilcott, T. C., Coster, H. G. L., & Moon, S. (2005). Characterization of BSA-fouling of ion-exchange membrane systems using a subtraction technique for lumped data. *Cell Research*, 246, 137-144. doi:10.1016/j.memsci.2004.07.022
- Pennisi, D. J., Rentschler, S., Gourdie, R. G., Fishman, G. I., & Mikawa, T. (2002). Induction and patterning of the cardiac conduction system. *The International journal of developmental biology*, 46(6), 765-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12382942>
- Piazzesi, G., Lucii, L., & Lombardi, V. (2002). The size and the speed of the working stroke of muscle myosin and its dependence on the force. *Leonardo*, 145-151. doi:10.1113/jphysiol.2002.028969
- Reuter, H., Pott, C., Goldhaber, J. I., Henderson, S. a, Philipson, K. D., & Schwinger, R. H. G. (2005). Na(+)-Ca²⁺ exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Cardiovascular research*, 67(2), 198-207. doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.031
- Sherwood, L. (2007). *Human Physiology - From cells to systems. Human Physiology* (Seventh edi., p. 973.). West Virginia USA: Brooks/Cole.
- Smith, C. A., & Wood, E. J. (1998). *Biología Celular*. (M. Bonfil Olivera, Ed.) (Addison-We., p. 367.). México D.F.
- Snopko, R. M., Aromolaran, A. S., Karko, K. L., Ramos-Franco, J., Blatter, L. a, & Mejía-Alvarez, R. (2007). Cell culture modifies Ca²⁺ signaling during excitation-contraction coupling in neonate cardiac myocytes. *Cell calcium*, 41(1), 13-25. doi:10.1016/j.ceca.2006.04.033
- Spoerke, E. D., & Stupp, S. I. (2005). Synthesis of a poly (L -lysine) -calcium phosphate hybrid on titanium surfaces for enhanced bioactivity, 26, 5120-5129. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.039
- Sundberg-cohon, J. (n.d.). *The Heart: Anatomy, Physiology and Exercise Physiology. Physiology*.
- Tanaka, H., Namekata, I., Nouchi, H., Shigenobu, K., Kawanishi, T., & Takahara, A. (2009). New Aspects for the Treatment of Cardiac Diseases Based on the Diversity of Functional Controls on Cardiac Muscles: Diversity in the Excitation–Contraction Mechanisms of the Heart. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109(3), 327-333. doi:10.1254/jphs.08R22FM

- Ter Keurs, H. E. D. J. (2011). Electromechanical coupling in the cardiac myocyte; stretch-arrhythmia feedback. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 462(1), 165-75. doi:10.1007/s00424-011-0944-3
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2010). *Principios de Anatomía y Fisiología Información de Novedades*. (G. J. Tortora & B. Derrickson, Eds.) (11th ed., p. 1154). México D.F.: EDITORIAL MEDICA Panamericana.
- Vornanen, M., & Isen-, G. (1990). Force measurements from voltage-clamped ventricular myocytes guinea pig 5000 Cologne, (8), 452-459.
- Wagner, M., & Siddiqui, M. a Q. (2007). Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 232(7), 852-65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609501>
- Walker, C. A. (1999). THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE CARDIAC MYOCYTE: A REVIEW OF FUNDAMENTAL CONCEPTS. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 375-382.
- White, E. (2011). Mechanical modulation of cardiac microtubules. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 462(1), 177-84. doi:10.1007/s00424-011-0963-0
- Williams, G. S. B., Smith, G. D., Sobie, E. a, & Jafri, M. S. (2010). Models of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. *Mathematical biosciences*, 226(1), 1-15. doi:10.1016/j.mbs.2010.03.005
- Youm, J. B., Choi, S. W., Jang, C. H., Kim, H. K., Leem, C. H., Kim, N., & Han, J. (2011). A computational model of cytosolic and mitochondrial [ca] in paced rat ventricular myocytes. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 15(4), 217-39. doi:10.4196/kjpp.2011.15.4.217