

CATEDRA DE HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA
GENERAL Y DE ANATOMIA PATOLOGICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA CITODIFERENCIACION
DEL MIOCARDIO DE EMBRION DE POLLO
" IN VIVO " E " IN VITRO "

Memoria presentada para la obtención del
Grado de Doctor en Medicina y Cirugía
por

José Antonio Bombí Latorre

Barcelona, 1973



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

CÁTEDRA DE HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

PROF. DR. DIEGO RIBAS



Casanova, 143
Tel. 2543847
BARCELONA-11

Barcelona, 20 de Agosto de 1973

Don DIEGO RIBAS MUJAL, Catedrático de Histología y Embriología General y de Anatomía Patológica, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral " Estudio ultraestructural de la citodiferenciación del miocardio de embrión de pollo "in vivo" e "in vitro" ", realizada por Don JOSE ANTONIO BOMBI LATORRE bajo mi dirección está en condiciones de ser presentada en la convocatoria de Septiembre del presente año.

Diego Ribas Mujal

A mi esposa,
cuyo estímulo y colaboración han sido
indispensables para la realización de
esta Tesis Doctoral.

A mis padres.



AGRADECIMIENTOS

Al Prof.Dr. Diego Ribas Mujal, prototipo de Profesor universitario, cuyo profundo interés por la enseñanza e investigación me ha sido demostrado a lo largo de los tres años que llevo a su lado, y fundamentalmente durante la dirección de esta Tesis.

Al Prof.Dr. Pedro Mestres Ventura, amigo entrañable, a cuyo lado aprendí los primeros conocimientos en el campo de la Microscopía Electrónica, y que me inició en el estudio de la ultraestructura celular.

Al Prof.Dr. K.Meller, y al Dr. W. Breipohl, de la Lehrstuhl für Anatomie I, de la Ruhr-Universität, Bochum, por sus facilidades y consejos en la preparación del material.

Al Prof.Dr. K.Hinrichsen, director del Institut für Anatomie , de la Ruhr-Universität, Bochum, por su hospitalidad durante gran parte del tiempo que ha durado la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. José E. Esquerda, por su colaboración en el manejo del microscopio electrónico.

Al Dr. Antonio Palacín y demás compañeros de la Cátedra de Histología y Embriología General y de Anatomía Patológica, y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, que con tanto desinterés me han ayudado en mi trabajo.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de una Beca para la Formación de Personal Investigador por un período de tres años.

A todos cuantos me han ayudado.

INDICE

Introducción	1
- Origen y formación del corazón	5
- Histofisiología de la fibra muscular	
- Ultraestructura y bioquímica de la miofibrilla	12
- Cambios estructurales y mecanismo de la contracción muscular	28
Material y Métodos	33
Resultados obtenidos en el material embrionario	46
Resultados obtenidos en el material "in vitro"	113
Discusión de los resultados obtenidos en el material embrionario	162
Discusión de los resultados obtenidos en el material "in vitro"	186
Conclusiones	200
Bibliografía	208

INTRODUCCION



Muchos autores han estudiado la estructura y el desarrollo embriológico y ultraestructural del músculo cardíaco. Siendo el corazón el primer órgano interno que manifiesta una actividad visible al presentar un movimiento autónomo, es lógico que atrayese la curiosidad científica y se aplicaran sucesivamente todos los adelantos técnicos para el estudio de su estructura, y ultraestructura, especialmente el microscopio óptico, el microscopio de contraste de fase, la histoquímica, el microscopio electrónico, la microscopia con inmunofluorescencia y la autorradiografía.

El desarrollo del músculo miocárdico ha sido estudiado ampliamente con el microscopio óptico por varios autores (PATEN y KRAMER, 1933; RAWLES, 1943; ROMANOFF, 1960; ORTS LLORCA y cols. 1963, 1967, 1968, 1970; De HAAN, 1965; entre otros).

La puesta a punto del microscopio electrónico, permitió a diversos investigadores el estudio de

la citodiferenciación del miocardio a nivel ultraestructural (HIBBS, 1956; MUIR, 1957; WAINRACH y SOTELO, 1961; CARAVITA y GIBERTINI, 1966; MANASEK, 1968, 1969, 1970; ORTS LLORCA y GONZALEZ DE SANTANDER, 1969; entre otros).

A pesar de todos estos estudios, y de otros paralelos en el músculo esquelético (DESSOUKI y HIBBS, 1965; ALLEN y PEPE, 1965; HEUSON-STIENNON, 1964, 1965, 1967; AUBER, 1969; y ISHIKAWA, BISCHOFF y HOLTZER, 1969), quedan aún muchos interrogantes en la diferenciación de estas células musculares, tales como la aparición y significado de los gránulos densos, la miofibrillogénesis, la asociación complejos de unión y bandas Z, etc.

También el miocardio, fue uno de los primeros tejidos en ser cultivados fuera del organismo (BURROWS 1910; CARREL, 1914). Los primeros investigadores ya observaron que al cabo de un cierto tiempo de cultivo el miocardio perdía su aspecto sincitial, y las células del cultivo adoptan formas alargadas, similares a fibroblastos; se pensó que este fenómeno era debido a una desaparición de los miocitos por degeneración, quedando únicamente las células acompañantes del tejido conectivo

tivo. (CARREL y EBELING, 1924). Otros autores creyeron que las células finales podrían ser miocitos transformados que hubieran regresado a una célula más primitiva, por lo que a este proceso se le denominó desdiferenciación (OLIVO, 1928).

Estas modificaciones celulares fueron vistas posteriormente con el microscopio electrónico. (WEISSENFELS, 1962; FIRKET, 1967); pero no hemos encontrado ningún estudio detenido que demuestre de forma clara y secuencial el origen de estas células finales.

Nosotros, hemos estudiado la diferenciación de los miocitos del miocardio del embrión de pollo, a lo largo de su evolución, desde los estadíos iniciales hasta algunos días después del nacimiento.

Posteriormente, hemos realizado dos series de cultivos, de corazón de embrión de pollo, una a partir de un embrión de 4 días y la otra a partir de uno de 7 días, pues entre ambos estadíos las células presentan distinto grado de madurez.

Los resultados obtenidos con el material

cultivado, los hemos comparado entre sí y con los obtenidos en el material embrionario; al mismo tiempo hemos estudiado el origen de las células "desdiferenciadas" y sus transformaciones progresivas.

ORIGEN Y FORMACION DEL CORAZON

Luego de formarse el epiblasto y el hipoblasto primitivos, aparece entre ambas hojas blastodérmicas el mesodermo. El mesodermo lateral, es decir su porción lateral, se divide en dos capas epiteliales, los mesodermos somático y esplácnico. El primero de ellos dará lugar a los músculos de las extremidades, transformándose previamente en células mesenquimáticas. El mesodermo esplácnico, por el contrario, conservará su naturaleza epitelial y dará lugar a la formación del tubo cardíaco.

Por medio de injertos de pequeños fragmentos blastodérmicos en la membrana corioalantoidea, en algunos animales, entre los cuales está el pollo, se han logrado diferenciar al inicio de la gastrulación, dos áreas ovoides, derecha e izquierda, situadas a ambos lados de la línea media, con capacidad prospectiva cardiogénica, ya que posteriormente estos injertos producen tejido contráctil de estructura cardíaca (218).

ORTS LLORCA y JIMENEZ COLLADO (192) observa-

ron que el área prospectiva cardíaca en el estadio de prolongación cefálica es más estrecha y alargada que los límites señalados primitivamente.

En las aves, se ha podido demostrar que dichos territorios adquieren pronto una diferenciación con aparición de moléculas específicas de miosina y actina, detectables por inmunofluorescencia, (42, 43) ya en la fase de prolongación cefálica.

Antes de que se inicie la gastrulación, e incluso al principio de la misma, ya se pueden localizar las áreas cardiogénicas primitivas, que se encuentran en el epiblasto (30). Posteriormente estas células, de una forma ordenada se invaginan a nivel de la línea primitiva formando el mesodermo precardiaco.

A finales del siglo XIX ya se observó que el material cardiogénico se encuentra dividido en dos zonas a ambos lados de la línea media, siendo claramente diferenciable (99).

Actualmente con ayuda de isotopos radioactivos, se ha visto que estas áreas estan fusionadas por una porción media más estrecha que se situa por delante

de la prolongación cefálica, adoptando así forma de herradura (32).

La primera aparición de la formación del corazón en el embrión de pollo, se encuentra hacia el estadio de 2 somitos (71) comp un engrosamiento del mesodermo esplácnico en la zona media del suelo de cada vesícula amniocárdica o porción cefálica del celoma. Cuando esta zona se explanta y se cultiva "in vitro" se diferencia casi exclusivamente en tejido cardíaco (185).

El desplazamiento de estas células mesodérmicas presuntivas cardíacas desde la región en forma de herradura, hasta su fusión en la línea media para formar el tubo cardíaco, ha sido analizado directamente con cinematografía por De HAAN (30, 32).

Posteriormente, en el seno de esta masa de células presuntivamente miocárdicas (esbozo cardíaco) aparecen unas cavidades producidas por el endocardio, que se denominan plexo endocárdico.

A los 4-5 somitos los dos esbozos plexiformes laterales entran en contacto en la línea media, em-



pezando a fusionarse sus componentes endodérmicos (224).

Hacia el estadio de 7-8 somitos ya se observa casi la formación de un solo tubo, el tubo cardíaco (63), se va estrechando ligeramente y simultáneamente con la desaparición del mesocardio ventral, se realiza la total fusión de los dos tubos endocárdicos, proceso que dura desde los 9 somitos (71) a los 10-11 somitos (63).

La fusión de ambos esbozos cardíacos es una consecuencia directa de los procesos morfogenéticos que conducen a la formación de la faringe (8,30,174,189).

En el tubo cardíaco el endocardio y miocardio están separados por un espacio relleno de una sustancia clara, homogénea y de aspecto gelatinoso denominada por DAVIS (29) "jalea ó gelatina cardíaca" (1924) (cardiac jelly), muy rico en mucopolisacáridos ácidos. Este componente parece ser muy importante durante este tiempo en que se van a iniciar los primeros latidos cardíacos, y el desarrollo de las válvulas, ya que sin él el corazón es incapaz de variar suficientemente sus diámetros, sirviendo así de transmisor entre las contracciones inicia-

das en el miocardio y la superficie endocárdica (5).

La mayor parte de autores (70, 199, 231) están de acuerdo en que las primeras contracciones cardíacas aparecen de una forma incoordinada en el borde convexo derecho, al comienzo del segundo día de incubación del embrión de pollo, hacia los 8-9 somitos, y se hacen rítmicas hacia las 36 horas, al tener 9-10 somitos (7).

El tubo cardíaco de los 9-12 somitos sólo corresponde a los futuros ventrículos y bulbo; el material que dará lugar al resto del corazón se encuentra a lo largo de la raíz de las venas onfalomesentéricas (199), y se incorpora para formar el atrium hacia el estadio de 16 somitos.

En el estadio de 19 somitos, se fusiona la vena onfalomesentérica que formará el seno venoso. (224).

Hacia el estadio 10, una vez que ambos esbozos cardíacos se han fusionado para formar un tubo único, éste deja de ser recto, formándose una ligera curva de convexidad derecha a nivel de la región correspondiente

al ventrículo. Posteriormente se forma un profundo surco en el lado izquierdo, el surco bulboventricular izquierdo, que divide al asa cardíaca en dos segmentos, uno caudal que pertenecerá al ventrículo izquierdo, y otro craneal del que derivará el ventrículo derecho y el cono ó bulbo arterial. Más tarde, el asa del cono ventricular crece y se desplaza caudalmente y hacia la izquierda.

Parece ser que estas incurvaciones no son debidas a distintos factores externos, sino a una propiedad intrínseca del mismo miocardio que en zonas determinadas produce mayor número de mitosis, por lo que al crecer más rápidamente se incurvaría (237) junto con un aumento del tamaño celular (156), como ha sido también demostrado experimentalmente por ORTS LLORCA y RUANO (193) al incurvarse un homoinjerto de tubos cardíacos en la cavidad celómica de un embrión huésped de pollo.

Posteriormente a la incurvación y rotación del tubo cardíaco tiene lugar la tabicación del corazón, proceso que tiene lugar en el embrión de pollo a partir del 5º día de incubación (190). En virtud de dicho proceso la cavidad cardíaca quedará dividida en cuatro ca-

vidades, dos aurículas y dos ventrículos.

Con los datos experimentales obtenidos parece ser que los factores hemodinámicos desempeñan un importante papel causal en la septación cardíaca, siendo su origen la existencia de dos corrientes sanguíneas que atravesarían el tubo cardíaco sin mezclarse (15, 32); según esto, en la zona de contacto de ambas corrientes sanguíneas se originaría una disminución de presión que conduciría a la aparición de un relieve, cuyo crecimiento formaría los distintos tabiques cardíacos.

HISTOFISIOLOGIA DE LA FIBRA MUSCULAR

ULTRAESTRUCTURA Y BIOQUIMICA DE LA MIOFIBRILLA

Desde antiguo se creía que el músculo cardíaco estaba formado por fibras y éstas a su vez formadas por una red protoplasmática gigante con numerosos núcleos, en forma de sincitio (87).

Sólo al introducir el microscopio electrónico y aplicarlo al estudio morfológico, se comprobó que los miocitos cardíacos eran células generalmente con un solo núcleo. Dicho núcleo es de cromatina laxa y forma ovoide y normalmente se encuentra en el centro de la célula.

Las fibras ó células musculares cardíacas del pollo adulto son de pequeño diámetro, midiendo normalmente de 2 a 5 micras.

El citoplasma de estas células se denomina sarcoplasma, siendo muy abundante.

Dicho sarcoplasma, observándolo en un microscopio óptico, se encuentra ocupado por unas estriaciones periódicas transversales al eje mayor celular (88);



si empleamos el microscopio de luz polarizada observamos que las bandas oscuras son anisótropas (birrefringentes) por lo que se las denomina bandas A, (ó también bandas Q, del alemán QUERSCHEIBE = disco transverso). Las bandas claras son isótropas, por lo que se denominan bandas I ó bandas J. A su vez, cada banda I, se observa surcada por otra banda oscura, más delgada que la banda A, que se denomina línea Z (del alemán ZWISCHENSCHIEBE = disco intermedio) ó membrana fundamental de KRAUSE ó Telofragma.

Estas miofibrillas no son únicas para una misma célula, sino que se encuentran en nº variable, pero parecen una única, ya que generalmente se encuentran las estriaciones al mismo nivel, lo que es patente observando estas células al microscopio electrónico. Cada miofibrilla adulta, mide aproximadamente 1 micra de diámetro.

A la distancia entre dos líneas ó bandas Z, se la denomina Sarcómero, que es la unidad contráctil del m. estriado en general, ya sea cardíaco ó esquelético.

co, siendo variable su longitud dependiente del grado de contracción ó relajación de la fibra muscular. (107, 115).

Con preparaciones teñidas y observadas al microscopio óptico, en medio de la banda A, se observa una línea muy delgada clara, que se denomina banda M ó mesofragma.

Esta estructura miofibrilar descrita anteriormente, es común para ambos tipos de m. estriado. En el músculo estriado cardíaco, nos encontramos con otra estriación colocada a nivel de una línea Z, pero más densa y común para todas las miofibrillas de una misma célula; esta estriación se denomina Disco intercalar ó banda escaloriforme, (fig.33), ya que adopta esta forma en escalera en relación con los de las fibras vecinas. Aunque inicialmente, su naturaleza y función estuvo sometida a numerosas discusiones, ha quedado netamente definida con la ayuda del microscopio electrónico que corresponde a la membrana celular ó sarcolema, con unas características especiales que luego veremos.



Ya en 1888, KOLLIKER, (133) describió las miofibrillas, insinuando que estarían compuestas por filamentos más delgados.

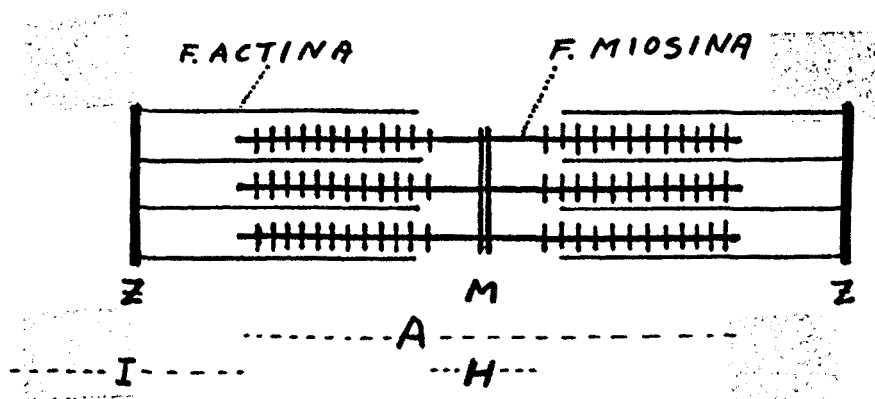
Al poderse estudiar el músculo estriado con microscopio electrónico, pudo demostrarse dicha teoría, observándose que las miofibrillas estaban formadas por dos tipos de miofilamentos. Estos dos tipos de filamentos difieren por su diámetro, su longitud, su posición y su composición por lo que se les distingue según su diámetro en filamentos gruesos y en filamentos finos.

Los filamentos gruesos y los filamentos finos, se encuentran dispuestos de una forma paralela y regular en los músculos de los vertebrados. Los filamentos gruesos se agrupan hexagonalmente, centrados por uno de ellos, y además cada filamento grueso está rodeado por 6 filamentos finos y a su vez éstos se disponen simétricamente entre cada tres filamentos gruesos (Fig.31).

El filamento grueso tiene unos $1,6 \mu$ de longitud y unos $100 \overset{0}{\text{Å}}$ de diámetro. Los filamentos finos según HUYLEY (110) en el músculo psoas del conejo, tienen

entre 50 y 70 \AA de diámetro y alrededor de 1 μ de longitud.

La superposición entre las hileras de filamentos gruesos y filamentos finos da origen a las estriaciones que se observan al microscopio óptico. (Esq.1)



Esquema 1: Dibujo esquemático de la disposición de los miofilamentos en el sarcómero, y la formación de las distintas bandas. (Modificado de LOWEY. 1972)

En las bandas A, los filamentos gruesos se encuentran en disposición hexagonal, y son los responsables de su elevada densidad. Los filamentos finos aparecen unidos a ambos lados de las líneas Z (112,131) en

medio de las bandas I, penetrando entre los filamentos gruesos también de forma hexagonal, alrededor de cada filamento de miosina. En el músculo relajado la longitud de un sarcómero es tal que los filamentos finos se superponen con los gruesos en sus extremos, demarcando de esta forma en el centro de la banda A una zona de menor densidad que es la banda H.

En el centro de dicha banda H, se nos aparece una banda aún de menor densidad, de longitud siempre constante, que se denomina Pseudobanda H, en cuyo centro hay una línea oscura y delgada, denominada banda M, y que hoy día se considera debida a un ligero abultamiento en el centro de cada filamento grueso (113), quizás producido por un sistema de uniones entre los filamentos gruesos adyacentes que estabilizarían de esta forma su estructura hexagonal (206).

Ambos filamentos, en la zona de contacto se encuentran unidos entre sí (110) por un sistema de puentes transversales (Fig. 1), a intervalos bastante regulares, que son los responsables de la continuidad estruc-

tural y mecánica a lo largo de toda la longitud de la fibra muscular.

Los filamentos gruesos están formados casi exclusivamente por moléculas de miosina. La molécula de miosina es una estructura alargada de unos 1500 Å de longitud y de 20 a 40 Å de diámetro. Enzimáticamente (con tripsina) dicha molécula puede romperse en dos fragmentos llamados Meromiosina ligera (LMM-light Meromyosin) y Meromiosina Pesada (HMM-heavy Meromyosin), de 130-150.000 y 350.000 respectivamente de peso molecular (254). La meromiosina ligera se encuentra casi toda ella en forma alfa-helicoidal.

Por ulterior digestión enzimática, la meromiosina pesada se divide en fragmentos más pequeños, la HMM-S-I de 110.000 de PM (171), que tiene actividad ATP-ásica, hidrolizando el fosfato terminal del ATP y produciendo ADP y fosfato inorgánico, siendo esta reacción estimulada por los iones de Ca^{++} e inhibida por los de Mg^{++} (253,254). Esta porción sería también la que se uniría a la actina.



Fig. 1 : Corte longitudinal de una miofibrilla perteneciente a un miocito cardíaco de un embrión de pollo de 4 días de incubación. En el centro, dispuesta transversalmente, se observa una línea Z (Z), de la que parten filamentos de actina (A), que a cierta distancia se imbrican con los de miosina (M), por medio de puentes de unión. (flechas). 120.000 X.

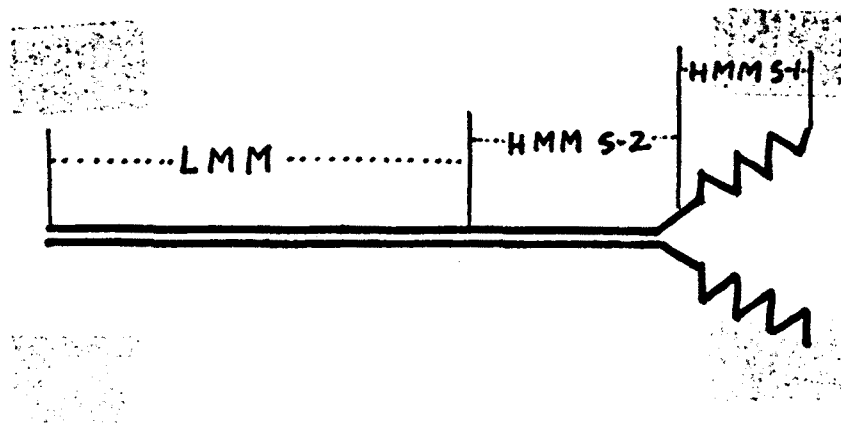
Posteriormente por disociación de la HMM con urea y/o pH alto, se han encontrado pequeños fragmentos de 20.000 de Pm (61), pero cuyas propiedades físicas aún no están claras.

La meromiosina ligera es la que regula la solubilidad de la miosina. Dichos componentes de la miosina son variables según el tipo de músculo y de animal (147,265).

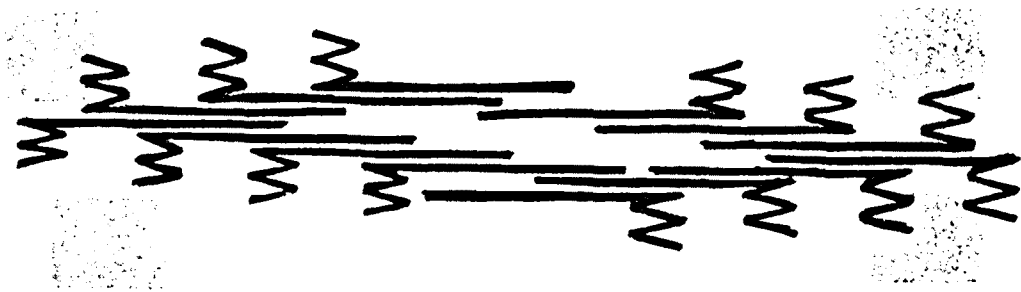
Las moléculas de miosina, aisladas y observadas al microscopio electrónico mediante la técnica del sombreado (221) aparecen como estructuras lineales con una región globular en uno de sus extremos; a su vez la meromiosina pesada consta de una cabeza globular y una corta cola y la meromiosina ligera de una sola porción rectilínea, por lo que queda claro que la molécula de miosina es asimétrica, con una cabeza (HMM) y una cola (LMM).(esq.2)

Así la cabeza de la miosina tiene las propiedades enzimáticas y de unión que antes se habían atribuido a los puentes transversales.

Las moléculas de miosina se agregan pa-



Esquema 2: representación esquemática de la estructura de la molécula de miosina según SLAYTER y LOWEY (1967)



Esquema 3: representación de la disposición que adoptan las moléculas de miosina dentro del filamento. (según HUXLEY. 1965).

ralelamente con sus cabezas mirando hacia el mismo sentido a lo largo de la mitad del filamento y en sentido contrario en la mitad opuesta. (Esq.3)

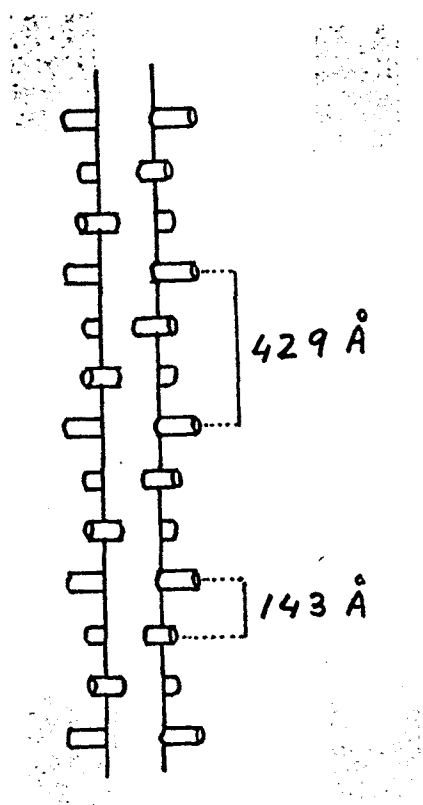
LOWEY (143) considera que la molécula de miosina está formada por dos mitades, cada una de las cuales posee una Meromiosina pesada, siendo la de la porción recta la subunidad HMM S-2 y la otra la HMM S-1 de 60.000 y 120.000 de Pm. La porción insoluble de la porción recta correspondería a la meromiosina ligera de 150.000 de Pm. (238).

Los agregados de moléculas de miosina dentro de los filamentos gruesos no son arbitrarios, sino que tienen una simetría helicoidal en la porción de los puentes transversales, como se ha observado con difracción por R.X. (114), estando agrupados por pares, cada uno de los cuales se encuentra rotado 120° y a 143° de distancia del anterior, lo que significa que describen un helix cada $429 \frac{0}{\text{Å}}$. (esq.4)

En algunos animales invertebrados, en los filamentos gruesos se encuentra otra proteína, la paramiosina, que probablemente se localizaría en el centro del filamento (128,148).

Los filamentos finos aparecen formados

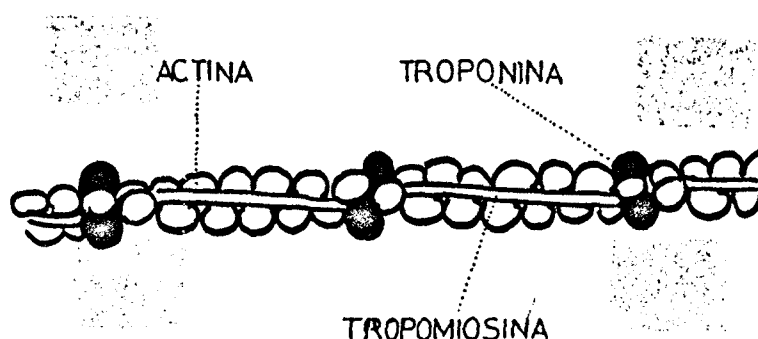




Esquema 4: Diagrama esquemático del filamento de miosina, mostrando las proyecciones de la meromiosina pesada en forma de puentes de unión. Según HUXLEY y BROWN. (1967).

por una doble hélice de subunidades de G-actina, globulares, parecidas a los polímeros de F-actina, de 46.000 de peso molecular (81,112) pero no exactos del todo (39).

Por microscopía electrónica y difracción por R.X. (114), se ha visto que los filamentos finos están formados por monómeros de actina de forma globular de 55 Å de diámetro, formando una doble cadena helicoidal a la derecha con 13 unidades en cada vuelta de la he-



Esquema 5: modelo hipotético de filamento fino propuesto por EBASHI y cols. (1969).

lice (81,112,113).(Esq.5)

También forma parte del filamento fino otra proteína, la tropomiosina, que al parecer se encuentra en dos muescas que hay en la hélice de actina (40). En la miopatía nemalínica se ha observado al microscopio electrónico un exceso de producción de material de la línea Z (207) y bioquímicamente se ha comprobado en este caso un exceso casi exclusivamente de tropomiosina (38).

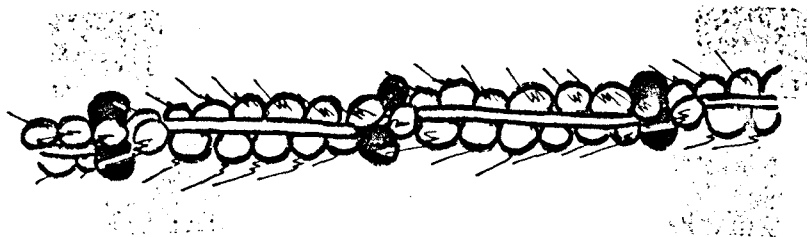
Periodicamente hay una molécula de otra proteína, la troponina, aproximadamente cada $400 \overset{\circ}{\text{A}}$, que recordemos que es la distancia que hay entre dos moléculas de meromiosina HMM S-2 igualmente orientadas (114). La existencia de tropomiosina se ha demostrado por inmunofluorescencia (181). La molécula de troponina, parece ser

que no estaría unida a la de actina, sino solo indirectamente a través de una unión con la troponina (39).

La función de la troponina sería la de regular las interacciones de la actina con la miosina, por unión con el calcio a través de un grupo SH, que producen unos cambios en la molécula de troponina, que de algún modo se transmiten a 7 u 8 unidades de actina que se encuentran bajo su control y este mediador quizás podría ser la tropomiosina (143).

En el filamento fino e incluso en el polimero de actina, las moléculas no están desorientadas, sino que tienen todas ellas una polaridad direccional, lo que se manifiesta evidentemente marcando las moléculas de actina con un marcador natural cual es la meromiosina pesada, con la que al unirse y observarlo con tinción negativa al microscopio electrónico se forman los típicos "complejos en punta de flecha" en donde las flechas apuntan siempre en la misma dirección en toda la longitud de un determinado filamento (168). (Esq.6)

Ya hemos dicho anteriormente que los filamentos finos se encuentran adosados a ambos lados de



Esquema 6: dibujo esquemático que muestra la polaridad unidireccional de las moléculas de actina, al marcarlas con meromiosina pesada y formar los típicos complejos "en punta de flecha". (modificado de HUXLEY. 1965).

la línea Z. Marcando ahora los filamentos finos adosados a las líneas Z, también con meromiosina pesada, observamos que las flechas adosadas a los filamentos apuntan siempre en sentido opuesto hacia donde se encuentra la línea Z, es decir que está invertida a ambos lados de dicha línea, por lo que las fuerzas se desarrollan en la misma dirección, pero en sentidos contrarios, moviéndose así los filamentos de actina en sentido opuesto, hacia el centro del sarcómero, con lo que así se realiza la contracción acortándose la sarcomera (113,168).

En cuanto a la composición de la línea Z, aún no está esclarecida totalmente; en ella se ha aisla-

do la alfa-actinina (39,68,69,157) que recientemente ha sido demostrado por inmunofluorescencia (145); también es posible que la línea Z contenga tropomiosina (39,112), lípidos (62,261) y carbohidratos (59), lo que estaría de acuerdo con un posible origen a partir de la membrana sarcolémica (76,90).

Otras proteínas que se han aislado también del músculo son la M-band protein ó proteína de la banda M, que estaría localizada en ella (37,144,162) y la Beta-actinina que ha sido aislada de preparados de filamentos finos (161), y que quizás se encontraría sólo en el material "in vivo", pues hasta el momento no se ha conseguido reproducir en el laboratorio.

PROTEINA	% EN PROTEINA MIOFIBRILAR TOTAL	Pm	SUBUNIDADES	LOCALIZACION
Miosina	50-60	470.000	150.000 120.000 60.000 20.000	Filamentos gruesos
Actina	20-25	46.000		Filamentos finos
Tropomiosina	7-10	64.000	32.000	Filamentos finos Líneas Z ?
Troponina	2-5	80.000	35.000 24.000 21.000	Filamentos finos
Alfa-actinina	2-10	180.000	90.000	Línea Z Filamentos finos ?
Beta-actinina	1-2	130.000 ?	65.000	Filamentos finos ?
Proteínas de la banda M -		180.000	90.000	Banda M

Proteínas musculares: su importancia cuantitativa, su peso molecular y su localización. (Modificado de FISCHMAN. 1970).

CAMBIOS ESTRUCTURALES Y MECANISMO DE LA CONTRACCION MUSCULAR

En 1954, A.F.HUXLEY y NIEDERGERKE (107) e independientemente H.E.HUXLEY y HANSON (115) observaron que durante la contracción y extensión pasiva de una fibra muscular, permanecían constantes la longitud de la banda A y la distancia de la línea Z al borde de la banda H, y en cambio aumentaban o disminuían respectivamente la longitud de la banda H y la de la banda I, lo que les llevó a suponer que dichos cambios fueran debidos probablemente a un desplazamiento de los filamentos, unos entre los otros, cuyas longitudes permanecerían así constantes. Así pues, según la teoría del mecanismo de deslizamiento de la contracción de H.E.HUXLEY, durante ésta los filamentos finos opuestos de un sarcómero se deslizan uno hacia el otro entre los filamentos gruesos de la banda A, en sentidos distintos, debido a la polaridad que ya hemos dicho antes que tienen las moléculas de actina. Este movimiento de deslizamiento, se cree que sería el resultado de una secuencia repetida, en la que un puente transversal dado unido a un sitio específico de la mo-

lécua de actina (probablemente la troponina), empujaría el filamento fino una corta distancia, se separarían, retrocedería, y se volvería a unir en otro sitio específico del filamento fino (143). Se cree que en cada puente de unión hay el sitio donde la molécula de miosina (HMM S-1) se unirá a la de actina, así como una ATPasa capaz de romper el ATP necesario como fuente de energía, la denominada ATPasa miosínica. (28,106,114).

Muchas teorías se han emitido sobre la naturaleza de las fuerzas fisicoquímicas que darían el empuje a los puentes de unión, entre las que cabe destacar la de ELLIOT y colaboradores (45,46) que sugieren un mecanismo electrostático-hidráulico que generaría una fuerza de repulsión entre los filamentos.

El mecanismo seriado de la contracción se admite hoy que podría ser el siguiente:

El sarcolema está polarizado electricamente (su interior generalmente es una décima de voltio negativo con respecto al exterior.(113); la llegada del impulso desporaliza la membrana y de una forma u otra este



impulso es transmitido al resto de la fibra, posiblemente a través de los sistemas T y tríadas y del Retículo Sarcoplasmático (109,205,240). Este impulso llegaría a nivel de las vesículas del Retículo Sarcoplasmático donde se han encontrado iones calcio, magnesio, ATP y oxalatos (24,41,82,161), y posiblemente un factor relajante; a este nivel se produciría una liberación de iones Ca^{++} , que difundirían por el sarcoplasma activando la defosforilación del ATP y formándose así uniones de actina y miosina en forma de Actomiosina, verificándose la contracción. Inicialmente, DAVIES (28) creía que el papel del calcio era formar uniones de actina y de miosina, pero hoy se ha visto que su función es unirse al complejo troponina-tropomiosina.

La movilización del calcio, en el mecanismo de la contracción-relajación, ha sido demostrada autorradiográficamente por WINEGRAD (269,270); mostrando el movimiento de los iones de calcio de los sacos terminales del Retículo Sarcoplasmático hacia la zona que se desplaza de la actina-miosina, durante la contracción y en dirección opuesta durante la relajación.

Posteriormente habría una reincorporación activa de iones Ca^{++} en las cisternas terminales del Retículo Sarcoplasmático inactivando a la ATPasa miofibrilar y disociándose así la actomiosina, dando lugar a la relajación. Se supone que la fuente de energía para este transporte activo de los iones Ca^{++} , hacia el interior de las vesículas terminales del Retículo Sarcoplasmático, sería por hidrólisis del ATP, producida por una ATPasa que se encontraría en el interior del Retículo Sarcoplasmático (57). Al parecer es posible como máximo el transporte de 3 iones de calcio por cada molécula de ATP hidrolizada aunque generalmente serían solamente dos iones de calcio por cada ATP los transportados.(263).

Ultimamente se ha descubierto la existencia de un calcio-dependiente-fosforilizado-intermedio que estaría implicado en el cambio ADP-ATP (273).

La relajación no sería un mecanismo exclusivamente pasivo sino que estaría dirigida por un denominado factor de relajación. Ya en 1951 y 1952 MARSH (159) y BENDALL (9) observaron que en algunas condiciones especiales las miofibrillas frescas no se contraían en presencia

de ATP. Posteriormente se ha observado que este factor reside en los fragmentos del Retículo Sarcoplasmático denominados microsomas o grana (116,195). En 1963 BRIGGS (16) describió la existencia de una sustancia de naturaleza fosfolipídica con capacidad relajante.

En el músculo cardíaco los iones de calcio necesarios para su activación deberían entrar a través de la membrana, pues no hay liberación de iones calcio en depósitos intracelulares (117,178), aunque si hay acúmulo de calcio y otros iones en las mitocondrias, y así podría ser que éstas además de suministrar la energía necesaria, podrían jugar un papel en la regulación de la contracción y relajación.

MATERIAL Y METODOS

El material inicial lo hemos obtenido de huevos de pollo fecundados, de la raza Leghorn blanca que habíamos incubado a 39º C de temperatura y 69% de humedad constantes.

OBTENCION DEL MATERIAL "IN VIVO"

Para el estudio del miocardio en los embriones, en los estadios iniciales hasta el 6º día de incubación hemos seguido el siguiente método.

Tomamos huevos periódicamente y los observamos a contraluz, distinguiéndose una zona opaca que corresponde al polo embrionario. Este polo embrionario, se mantiene siempre en la porción superior del huevo. Se dibuja una cruz en uno de los polos axiales del huevo, con una sierra de marquetería, con el fin de disminuir la resistencia de la cáscara; en el punto de cruce se introduce una jeringa con la que se extraen unos 10 c.c. de la clara, descomprimiéndose de esta forma la presión y disminuyendo el volumen en el interior de la cáscara, para poder pasar a la siguiente operación sin

dañar al embrión. Seguidamente, con la misma sierra, se delimita una ventana de unos 2 - 3 cm. de lado en la zona de la cáscara donde hemos localizado al embrión. Una vez serrado este cuadrado, se quita la porción de cáscara con unas pinzas. A continuación, se separan también, la porción correspondiente a las dos membranas testáceas ó cascarógenas que estaban unidas a la cara interna de la cáscara, apareciendo entonces el "área vasculosa", inmediatamente por debajo, en la superficie de la yema. Seguidamente, con unas pinzas y muy cuidadosamente se incinden las dos membranas translúcidas (corion y amnios) que recubren al embrión. Luego con una jeringa que contenga líquido fijador, se inyecta éste en la cavidad amniótica por encima y por debajo del embrión, dejando actuar el fijador durante unos 10 minutos, con el fin de endurecer algo el material. Posteriormente, con unas tijeras de microdisección, se recorta siguiendo la zona opaca que bordea al embrión y se extrae conjuntamente con éste sumergiéndolo directamente en la solución fijadora si el tamaño no excede de 4 mm., o bien seccio-

nándolo previamente en bloques de 2 - 3 mm. si es mayor.

En los embriones de mayor edad (6-7 días) el método que hemos seguido es distinto, consistiendo en romper cuidadosamente la cáscara con un material duro, por ejemplo con el dorso de un bisturí ó tijeras, y una vez abierta así la cáscara se extrae el embrión que colocamos en solución de HANKS. Seguidamente, con un microscopio estereoscópico de disección, localizamos el corazón por sección previa de la pared torácica y lo aislamos con un bisturí o simplemente con hojas de afeitar. El corazón así aislado, lo sumergimos en solución de HANKS nueva, seccionando la porción inferior de los ventrículos cerca del vértice. Posteriormente, este fragmento así obtenido, lo dividimos en bloques más pequeños de unos 0,5 mm. de lado, y lo sumergimos a continuación en solución fijadora.

De la primera forma hemos obtenido embriones de pollo de 12 - , 12 y 15 estadíos según HAMILTON y HAMBURGER (78) y de 3, 4 y 5 días.

De la segunda forma hemos obtenido embrio-

nes de pollo de 6,7,8,9,10,11,12,13 y 14 días.

También hemos estudiado corazón de pollo recién nacido y de 3 días que han sido obtenidos por simple disección del corazón y posterior fragmentación de la porción del vértice cardíaco, siendo fijados a continuación.

OBTENCION DEL MATERIAL "IN VITRO"

El método para conseguir el embrión ha sido el mismo que el descrito anteriormente, salvo que el material usado había sido esterilizado previamente y una vez obtenido no lo hemos sumergido en solución fijadora, sino en solución de HANKS. Una vez obtenidos así los fragmentos de corazón se hacen secciones de 0,5 mm. de lado, que se explantan en el medio de cultivo preparado al efecto.

Los cultivos han sido realizados según la técnica descrita por MAXIMOW, de gota pendiente en doble cubreobjetos, con un cubreobjetos redondo, sobre la excavación de un portaobjetos excavado, colocándose por encima del anterior cubreobjetos otro cuadrado, mayor,

que es el que sellará adecuadamente la cámara de cultivos. La finalidad de usar este método es para facilitar la limpieza del cultivo, el cambio del medio, y al mismo tiempo el utilizar muy pequeña cantidad de medio.

Cada uno de los fragmentos de corazón obtenidos, los hemos colocado en uno de los cubreobjetos redondos en los que teníamos una pequeña cantidad (1 c.c.) de plasma de pollo (Difco) diluido a 1/3 con solución de HANKS. El tejido lo colocamos en el centro de la gota de plasma, donde queda fijado por tensión superficial. Después de orientar bien el explante, añadimos una cantidad igual a la de plasma, de extracto embrionario no desnaturalizado por el calor (Difco) diluido a 1/3 con solución de HANKS y con una mínima dosis de antibióticos (100 u. de penicilina G y 0,1 mg. de estreptomycin por c.c.), y rápidamente, antes de que empiece a coagular los mezclamos bien.

A continuación se fija el cubreobjetos redondo mediante una gota de agua destilada estéril en el centro, en la parte central del cubreobjetos cuadrado.



Se coloca encima el portaobjetos excavado invertido, y se da la vuelta a todo el conjunto, soldándose el cubreobjetos externo al portaobjetos con parafina fundida, que al solidificarse nos cerrara la cámara de cultivo.

Luego se coloca en la estufa a 37° C.

En nuestro caso hemos lavado el cultivo y cambiado el medio cada tres días, simplemente cortando la capa de parafina, y sumergiendo el cubreobjetos redondo con el cultivo en solución de HANKS, añadiendo nuevo medio y volviendo a cerrar otra vez la cámara con parafina.

Periódicamente uno de los cultivos lo hemos sumergido en solución fijadora para su estudio.

Los cultivos los hemos controlado con un microscopio de contraste de fase.

De esta forma hemos obtenido material de explante de corazón de embrión de pollo de 7 días a los 5,6,10,12,14,17,18 y 20 días de cultivo y de corazón de embrión de pollo de 4 días a los 2,4,6,8,10,15 y 17 días.

FIJACION

Todo el material "in vitro" y la mayor parte del material "in vivo" han sido fijados en ácido ósmico según DALTON (27) ajustado a pH de 7,4, durante 2-4 horas a 4^o C de temperatura.

Seguidamente hemos lavado el material en solución de HANKS y luego el material ha sido deshidratado progresivamente en acetonas de concentración creciente de 30%, 50%, 70% (con acetato de uranilo al 1% y ácido fosfotunstico al 1%), 80%, 90%, 95% y dos pasos de acetona pura anhidra durante 30 minutos en cada caso.

El material ha sido incluido en su totalidad en VESTOPAL W (de J.Jaeger), según la pauta descrita al final de este capítulo.

El material ha sido cortado en un ultramicrotomo LKB y en un Reichert OM 3, obteniendo cortes semifinos de 1 μ y cortes finos plateados.

Los cortes finos han sido montados en redes de cobre.

Los cortes semifinos han sido teñidos con

azul de metileno según la técnica de RICHARDSON-JARETT (222) FINKE descrita al final del capítulo.

Los cortes finos han sido doblemente contrastados según el método de VENABLE y COGESHALL (258) en acetato de uranilo y citrato de plomo.

Los cortes semifinos han sido estudiados en un microscopio óptico de luz transmitida.

Los cortes finos han sido estudiados con un microscopio electrónico Siemens, Elmiskop IA y con un microscopio electrónico Hitachi HU-12.

SOLUCION DE HANKS

Es una solución salina con propiedades conservadoras. Es una solución salina con glucosa del tipo Tyrode, pero con niveles de fosfato más fisiológicos.

La composición es:

Cl Na	8,00	grs/l.
Cl K	0,40	
Cl ₂ Ca	0,14	
Cl ₂ Mg6H ₂ O	-	
SO ₄ Mg7H ₂ O	0,20	
PO ₄ HNa ₂ 12H ₂ O	0,12	
PO ₄ H ₂ K	0,06	
CO ₃ HNa	0,35	
Glucosa	1,00	

Para hacerla es mejor partir de tres soluciones:

- Sol. A- formada por 40 gr. de Cl Na, 2 gr. de Cl K, 0,7 gr. de Cl_2Ca , 1 gr. de $SO_4Mg \cdot 7H_2O$, disueltos en 250 cc. de agua bidestilada.
- Sol. B- formada por 0,6 gr. de $PO_4HNa_2 \cdot 12H_2O$, 0,3 gr. de PO_4H_2K , 5 gr. de glucosa, disuelto en 250 c.c. de agua bidestilada.
- Sol. C- formada por 1,75 gr. de CO_3HNa en 250 c.c. de agua bidestilada.

La solución de trabajo se forma de la siguiente manera:

solución	A	25 c.c.
solución	B	25 c.c.
solución	C	25 c.c.
agua destilada		425 c.c.
Rojo fenol al 1%		2 c.c.
Penicilina		50.000 u.i.

INCLUSION EN VESTOPAL W

Deshidratación:

acetona	30%	30 min.
acetona	50%	30 min.

acetona 70% 30 min. (con acetato de ura-
nilo y Ac. fosfotungstico
acetona 80% 30 min.
acetona 90% 30 min.
acetona 95% 30 min.
acetona 100% (2 veces) 30 min. (anhidra con Cl_2Ca)

Inclusión:

- 3 p. acetona anhidra / 1 p. Vestopal 1 + 2 h.
- 1 " " / 1 " 1 - 2 h.
- 1 " " / 3 " 1 - 2 h.
- una noche en la nevera en: Vestopal 100 c.c.
iniciador 1 c.c.
activador 1 c.c.
acetona anh. 25 c.c.
- tres veces y 12 h. cada vez en la mezcla
Vestopal 100 c.c.
iniciador 1 c.c.
activador 1 c.c. a temperatura amb.
- a continuación poner la misma mezcla anterior
en las capsulas, introducir los bloques y dejarlo en la
estufa a 60°, como mínimo 48 h., para polimerizar.

ACIDO OSMICO SEGUN DALTON

Para su composición partimos de una serie
de soluciones stock.

- Sol stock de buffer: compuesta por dicromato potásico

al 5% tamponado a pH 7,2-7,5 con una solución 2,5 Normal de KOH.

- Sol. stock de sal: compuesta de cloruro sódico al 3,4% en agua.

- Sol. de tetróxido de osmio al 2% en agua.

A partir de estas soluciones se formará el fijador en la siguiente proporción:

- sol. de buffer 1p.
- sol. de sal 1p.
- sol. de osmio 2p.

quedándonos de esta forma una solución de tetróxido de osmio al 1% en total.

METODO DEL DOBLE CONTRASTE según VENABLE y COGESHALL (258)

Primero se realiza el contraste con una solución de acetato de uranilo al 2% en agua bidestilada. Dicho paso lo hacíamos colocando una gota de la solución en un portaobjetos parafinado, situando la red encima, con el corte invertido durante unos 2 a 3 minutos.

A continuación se lava con agua destilada.

Seguidamente se contrasta de nuevo con una solución de citrato de plomo, que se prepara como sigue: se disuelven 0,01 - 0,04 gr. de citrato de plomo en 10 c.c. de agua destilada en un tubo de centrífuga. Se añaden

0,1 c.c. de Na OH 10 N, y se cierra el tubo con un tapón de goma, agitando vigorosamente hasta que el citrato se haya disuelto, operación que dura unos 5 minutos. Luego es conveniente centrifugarlo para que los precipitados y otras sustancias insolubles se depositan en el fondo del tubo. Dicha solución debe aislarse del contacto con el aire, pues precipita por el CO_2 atmosférico; por ello, al contrastar es conveniente hacerlo en una superficie parafinada que esté en un desecador conteniendo unas lentejas de Na OH, evitándose así la producción de precipitados de carbonatos. El tiempo de contraste con esta solución es de 5 a 7 minutos.

A continuación las redes deben lavarse suficientemente, lo cual nosotros hemos hecho en 20 movimientos rápidos de la red en tres recipientes sucesivos de agua bidestilada, secando a continuación las redes, con papel de filtro.

TINCION CON AZUL DE METILENO PARA CORTES SEMIFINOS

Según la técnica de RICHARDSON, JARETT y FINKE (222).

Se hace la siguiente solución:

- | | |
|----------------------|----------|
| - Agua destilada | 100 c.c. |
| - tetraborato sódico | 1 gr. |
| - Azur II | 1 gr. |
| - Azul de metileno | 1 gr. |



Los colorantes deben disolverse en este orden. Seguidamente se agita y se deja madurar un día, teniendo la precaución de guardarlo en un frasco oscuro y al abrigo de la luz.

Para teñir los cortes, una vez secos, y adheridos al portaobjetos, se cubren con la solución colorante y se colocan en una estufa o una platina, durante 1 - 2 minutos, a 70-80°C.

Se puede decolorar ligeramente con agua acética al 1%, ó simplemente con alcohol de 70° ó alcohol clorhídrico al 3%.

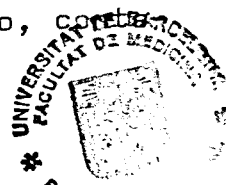
RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MATERIAL EMBRIONARIO

ESTADIOS 12 - , 12 y 15

Al microscopio óptico observamos la pared del tubo cardíaco, que está recubierta por su cara interna por el endocardio, que adopta forma festoneada, posiblemente por un artefacto de retracción de la fijación. (fig.2). El endocardio está formado por una capa delgada de células fusiformes muy alargadas y aplanadas, con un núcleo prominente de cromatina laxa y a veces con un nucleolo; el citoplasma de dichas células es algo basófilo y en él aparecen algunos pequeños gránulos tingibles, que corresponden a las mitocondrias.

La capa celular que recubre al miocardio por su superficie externa, es en este estadio muy parecida al endocardio.

La capa celular media, corresponde al miocardio y está formada por dos filas de células netamente diferenciables entre sí. Las células de la zona externa de la pared son de contornos más o menos redondeados, con un núcleo, que es redondo y central, de cromatina laxa y conteniendo en la mayoría de los casos un nucleolo; el citoplasma es poco abundante y basófilo, con



niendo algunos corpúsculos pequeños y oscuros, en ocasiones con forma de bastoncillo, que son las mitocondrias y las miofibrillas cortadas transversalmente. Entre sí estas células dejan unos pequeños espacios, que son mayores en la zona de contacto con la capa más interna de células.

Las células de la zona interna tienen unos contornos celulares algo más alargados; a veces son estrelladas con tres ó más prolongaciones, que dejan entre sí unos pequeños espacios intercelulares. Su núcleo es ovalado, de cromatina laxa, de menor tamaño que el de las células externas y con uno o más nucleolos. El citoplasma es más abundante que en las células externas y con mayor cantidad de corpúsculos oscuros que se encuentran difusamente por todo su citoplasma.

Al microscopio electrónico, solamente vamos a describir la morfología del miocardio, que es el motivo de nuestro trabajo, no mencionando la ultraestructura de las otras capas celulares cardíacas.

Ultraestructuralmente las células de la zona externa del miocardio ya no son tan diferenciables de las de la zona interna, si bien su forma es algo dis-

tinta y parecen que estén algo más diferenciadas.

El sarcoplasma está surcado irregularmente por multitud de filamentos de diámetros y longitudes variables. Los filamentos más gruesos son rectos, y creemos que corresponden a los filamentos de miosina; generalmente estos filamentos se encuentran agrupados en haces de cuatro ó más, paralelos entre sí, y con uno de sus extremos en la vecindad de una masa redondeada a veces, otras algo alargada, electrodensa, que creemos corresponde a un cuerpo Z que posteriormente se transformará en una línea Z; entre estos dos elementos parecen encontrarse unos filamentos más finos. (Fig.4, 5, 6, 7 y 9). Muchas veces esta asociación entre haces de filamentos y cuerpos Z, formando una miofibrilla inicial, se localiza en áreas por debajo del sarcolema, pudiéndose encontrar varios haces en una misma célula. Algunos filamentos gruesos se encuentran agrupados y desorganizados, y en ocasiones aislados.

Extendidos difusamente por todo el sarcoplasma se observan unos filamentos más delgados, en ocasiones más cortos, de diámetros variables, que están for-

mando un enrejado,. Estos filamentos creemos que corresponden a algunos filamentos de actina y a los filamentos Intermedios de ISHIKAWA, BISCHOFF y HOLTZER (119).

En muchas células, principalmente en las más internas y con menor cantidad de miofilamentos, se observa gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso. (Fig.4, 5).

En el citoplasma se encuentran gran cantidad de ribosomas libres predominando por debajo del sarcolema y en la vecindad de las zonas filamentosas, algunos de ellos formando polirribosomas de disposición helicoidal. (Fig.4, 5, 6).

En el citoplasma se encuentran extensas zonas de depósito de glucógeno, así como de lípidos que generalmente se encuentran asociadas. (Fig.4). Estos depósitos de lípidos son más abundantes en las células más diferenciadas.

El aparato de Golgi es prominente con gran cantidad de cisternas, siempre de situación perinuclear. (Fig. 4, 6, 9).

Aparecen muchas mitocondrias, generalmente

alargadas, a veces de formas irregulares, y de matriz clara, distribuidas difusamente en el citoplasma.

En algunas células se observa muy claramente el centriolo.

En algunos casos se encuentran en el citoplasma gran cantidad de vacuolas de paredes lisas, pequeñas, que creemos corresponde al retículo sarcoplasmático.

En algunas pocas células se encuentran ya algunas miofibrillas formadas por algunos filamentos gruesos y delgados, pero de amplitud de una decena o menos de filamentos gruesos, con cuerpos densos alargados y gruesos correspondientes a los cuerpos Z; (Fig.4, 6) de longitud estas miofibrillas pueden alcanzar 4 o 5 sarcómeras, que se pueden encontrar en número de tres a cuatro en la misma célula, sin estar orientadas paralelamente al eje mayor citoplasmático. En estos casos es raro observar retículo endoplasmático rugoso.

El núcleo es grande, ovalado con escasa cromatina y con un nucleolo, en el que a veces se distinguen las dos partes granulosa y filamentosa. (Fig. 5). En algunas células hay gran cantidad de poros nucleares (Fig.8),

que en ocasiones están centrados por una partícula electrodensa correspondiente a ARN-mensajero ó ARN-ribosómico.

Entre las células se distinguen espacios intersticiales de tamaños variables, más grandes a nivel de la zona de contacto entre las dos filas celulares del miocardio. En los puntos de contacto intercelulares se pueden observar densificaciones de la membrana con una separación constante, tipo desmosoma, y otras zonas sinuosas de sarcolema densificado y de espacio intersticial constante, del tipo "fascia adherens". (Fig.3, 5, 7). En algunas ocasiones en estas condensaciones del sarcolema convergen algunas haces de filamentos gruesos.

También se observa una célula en mitosis, en cuyo citoplasma se distinguen miofibrillas bien estructuradas, desplazadas hacia la periferia.

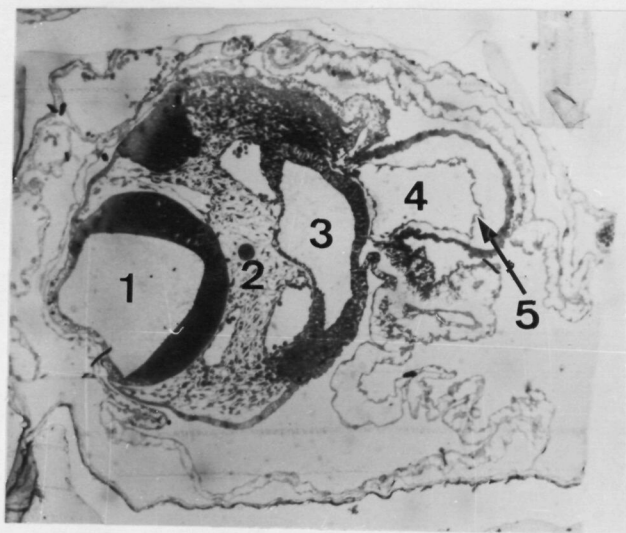


Fig. 2 : Estadío 12 - . Microscopio óptico.

Corte transversal del embrión que muestra la localización del corazón.

1- tubo neural ; 2- notocorda ; 3- intestino anterior.

4 tubo cardíaco en cuyo interior se observa claramente el endocardio (5).

160 X.

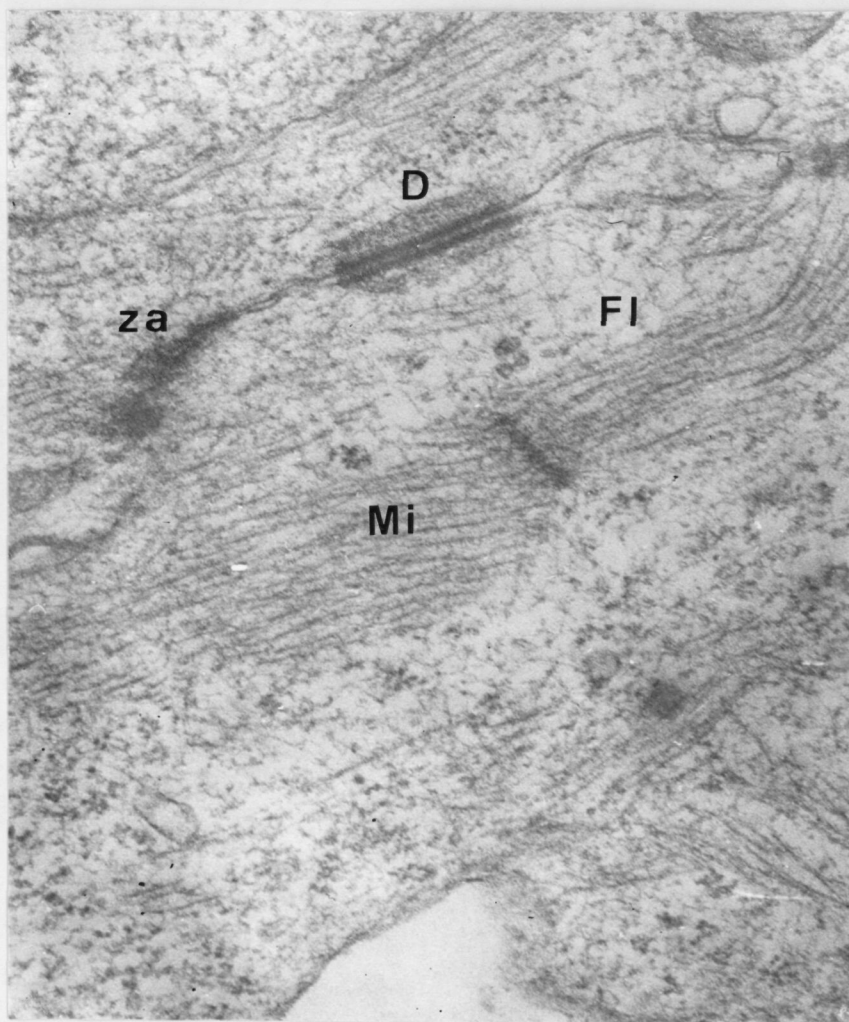


Fig. 3 : Estadío 12 - . Zona de contacto entre los sarcolemas de dos miocitos adyacentes, en la que se distinguen un desmosoma (D) y una "zónula adherens" (za). En el miocito inferior hay una miofibrilla (Mi) con una línea Z; también se observan filamentos de miosina entrecruzados ó formando haces paralelos entre sí. Nótense múltiples filamentos Intermedios (FI) distribuídos al azar, cuyo diámetro está comprendido entre el de los filamentos de actina y de miosina. 57.750 X.

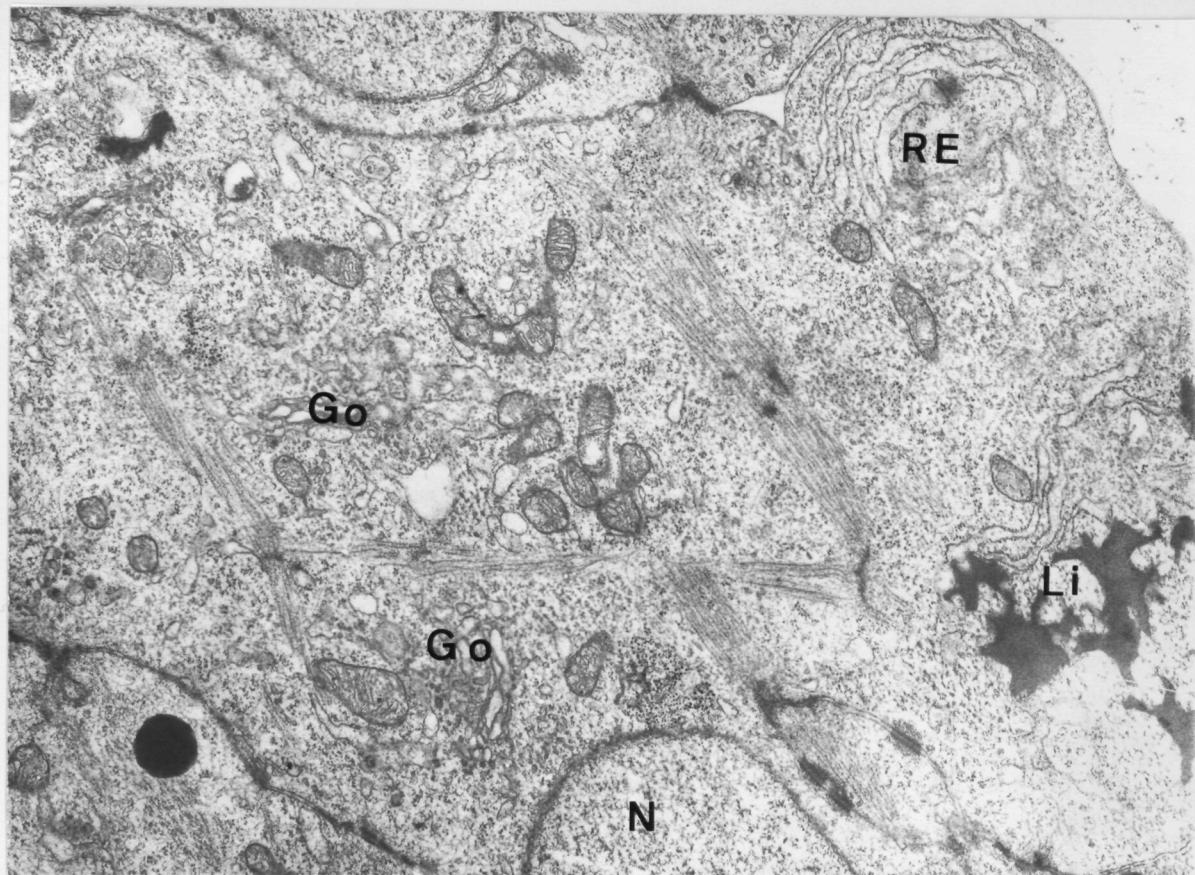


Fig. 4 : Estadío 12 - . Miocito con varias miofibrillas iniciales, algunas de ellas ramificadas, Obsérvese el abundante retículo endoplasmático rugoso (RE) que posee, así como el prominente Aparato de Golgi (Go).

N- núcleo ; Li- lípidos ; 19.500 X.

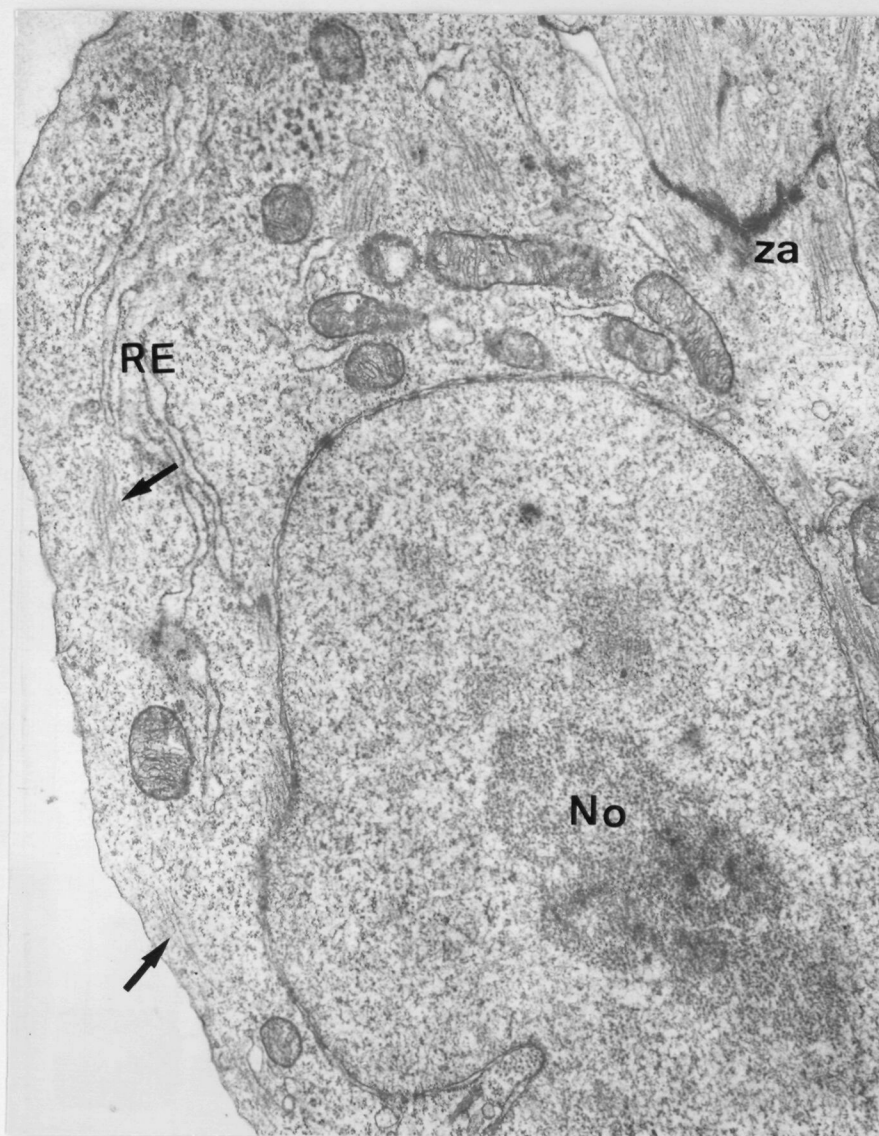


Fig. 5 : Estadío 12 - . Núcleo de un miocito con un nucléolo muy desarrollado (No). En el sarcoplasma se distinguen abundantes ribosomas y filamentos de miosina agrupados en haces paralelos (flechas), algunos de los cuales convergen hacia una "zónula adherens" (za).

RE- Retículo Endoplasmático Rugoso. 19.500 X.

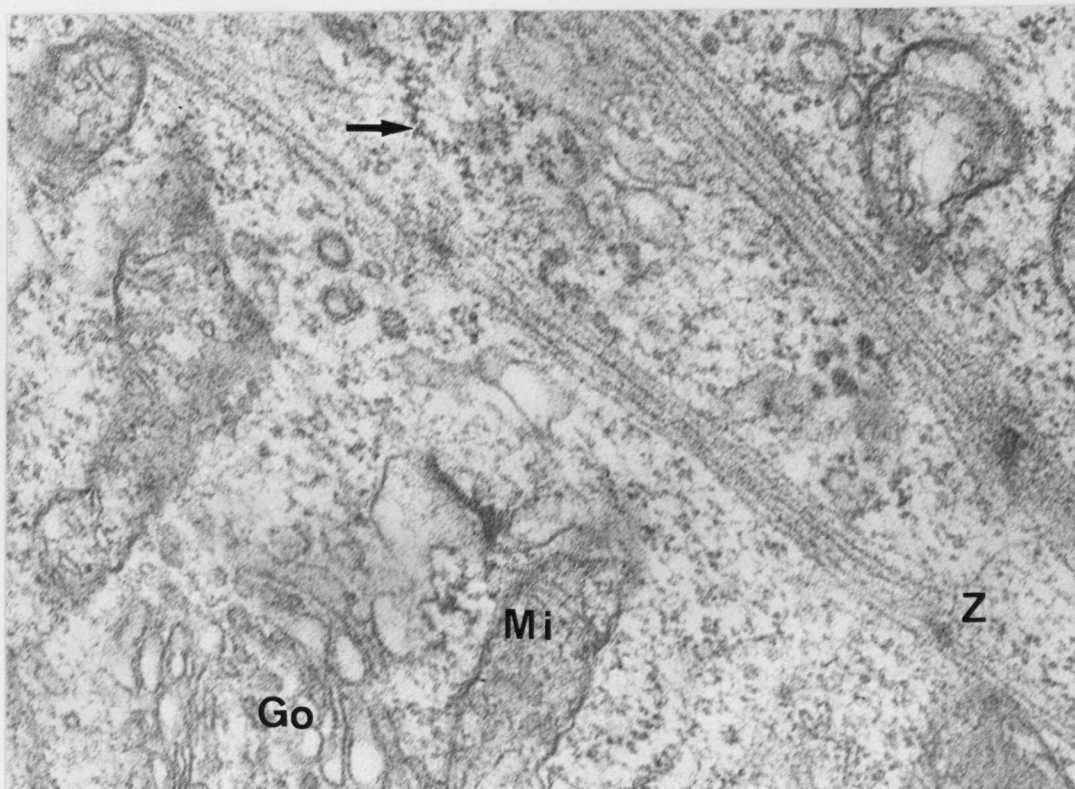


Fig. 6 : Estadío 12 - . Miocito con dos miofibrillas iniciales, que poseen dos cuerpos Z (Z), en cuya vecindad se hallan numerosos ribosomas, algunos de ellos formando polisomas helicoidales (flecha).

Mi- mitocondria ; Go- Aparato de Golgi . 66.000 X.

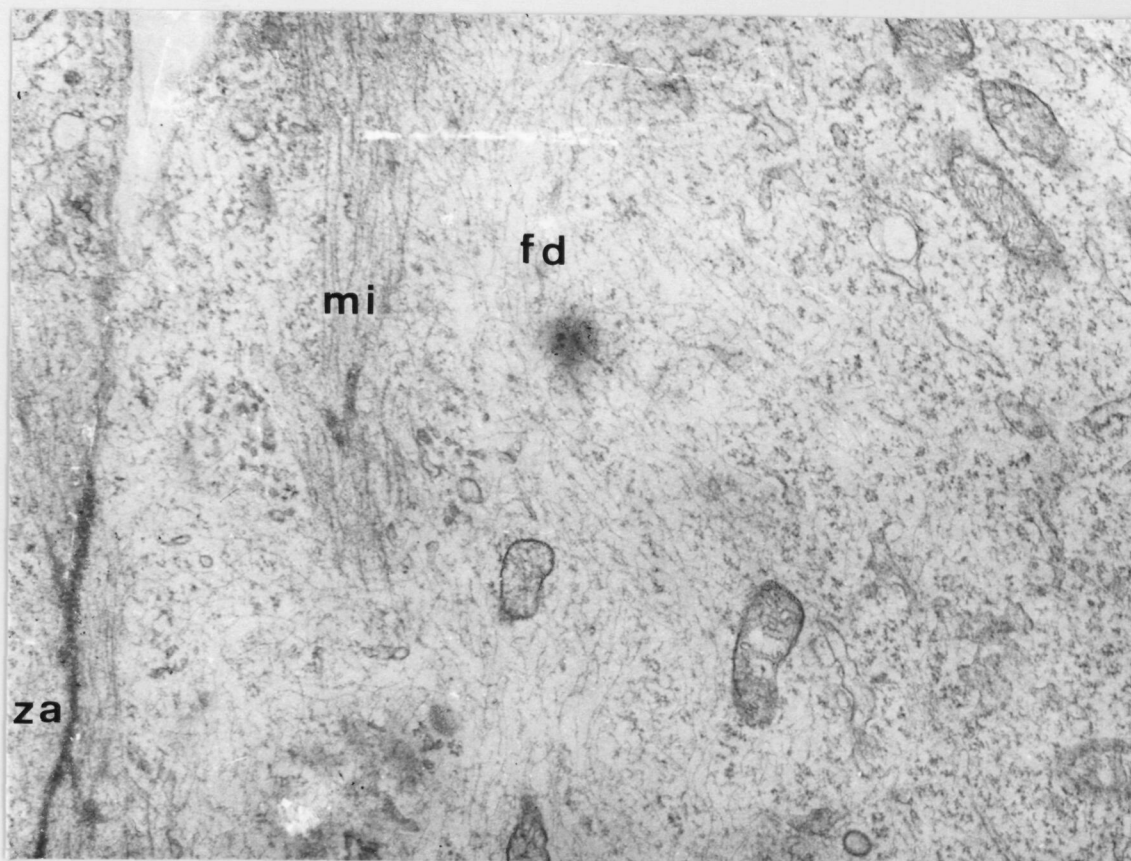


Fig. 7 : Estadío 12 - . Miocito que muestra una miofibrilla (mi) muy inicial. En el sarcoplasma se observan abundantes ribosomas y una extensa red de filamentos delgados (fd). En el sarcolema se distingue una "zónula adherens" (za), por debajo de la cual aparece una malla tupida de filamentos finos. La zona oscura central es un artefacto. 27.500 X.

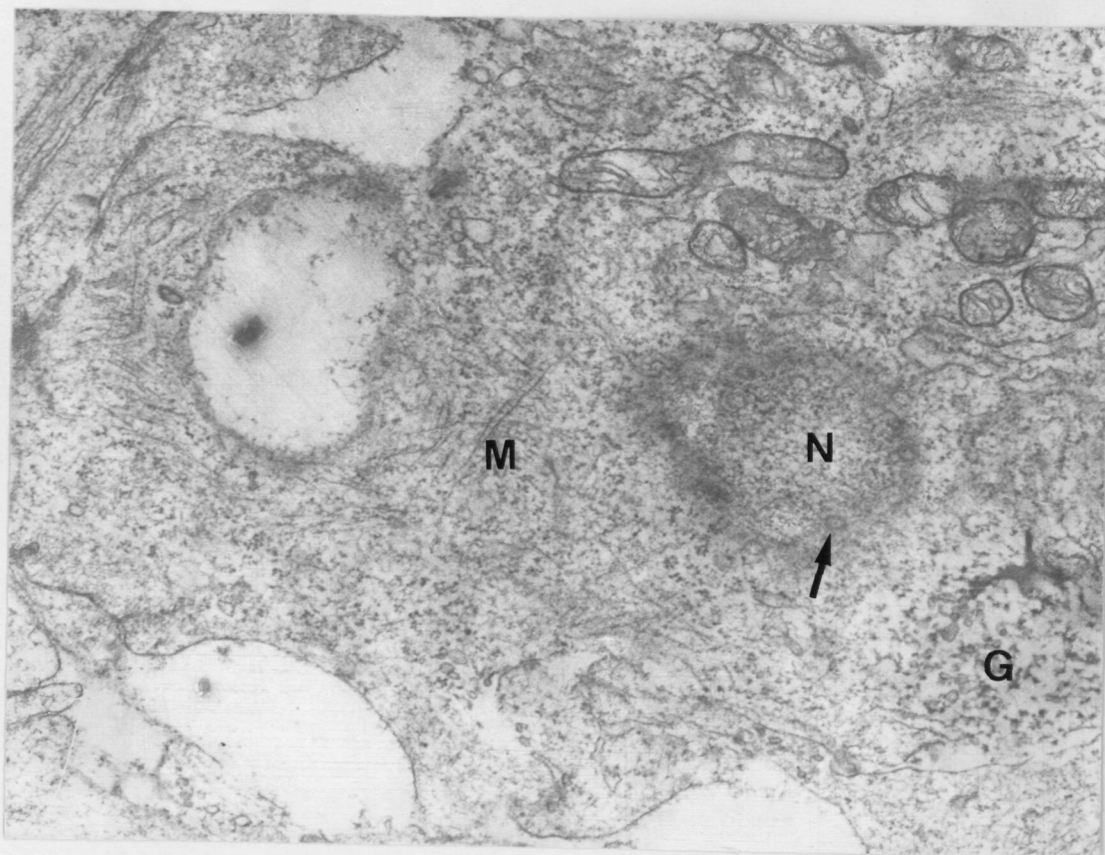


Fig. 8 : Estadío 12 . Miocito en un estadío inicial de diferenciación, que presenta numerosos filamentos de miosina (M) dispersos desordenadamente por el sarcoplasma. En el núcleo (N) se evidencian múltiples poros nucleares, que en alguna ocasión están centrados por una partícula electrodensa (flecha) presumiblemente de ARN-mensajero ó ARN- ribosómico. G- glucógeno. 27.500 X.

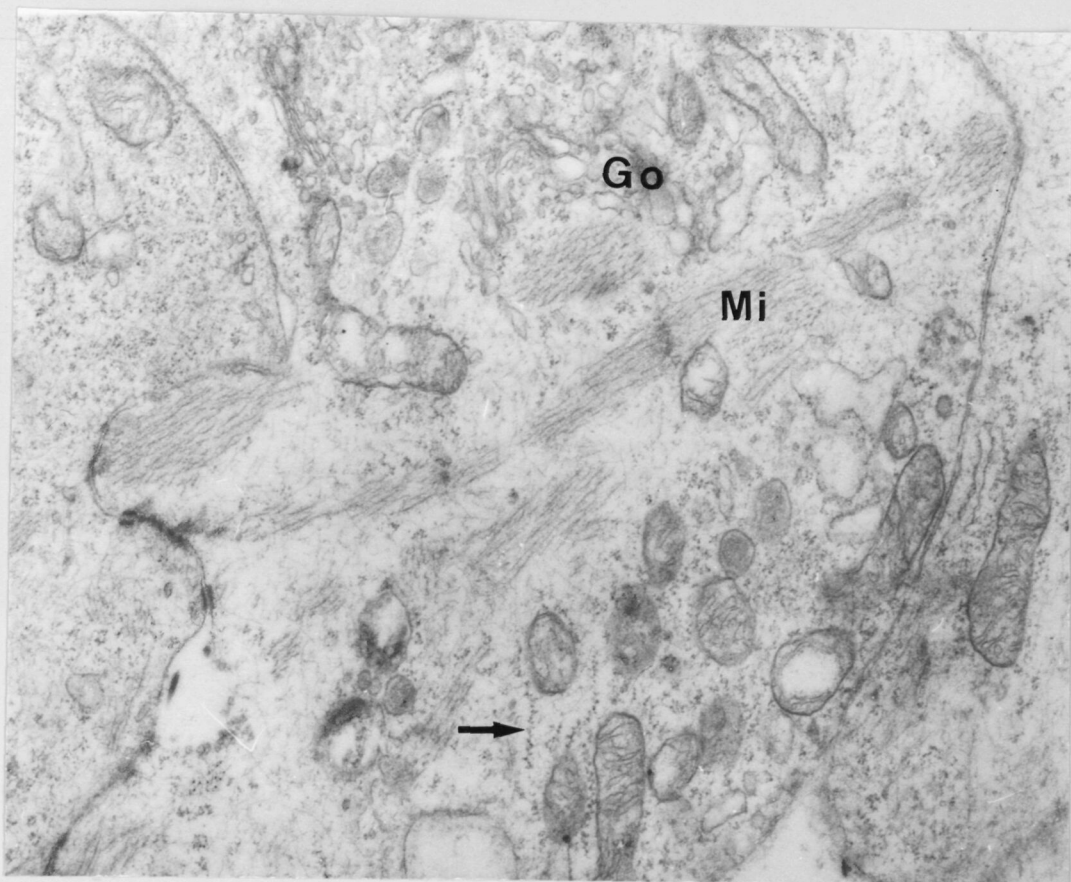


Fig. 9 : Estadío 15 . Miocito que ya presenta una diferenciación bastante marcada, con varias miofibrillas (Mi) bien estructuradas, y muchos polisomas helicoidales (flecha). En el sarcoplasma se observan muchos filamentos delgados formando una malla, y un Aparato de Golgi (Go) prominente. 27.500 X.

EMBRION DE 3 DIAS

En este estadio, en la zona correspondiente al ventrículo, observamos que está recubierto en su superficie interna por una capa de células fusiformes muy alargadas y aplanadas correspondientes al endocardio.

En su superficie externa el miocardio está recubierto por una capa celular muy parecida a la endocárdica.

En el miocardio podemos distinguir tres zonas distintas. La zona externa de la pared está formada por una o dos células de grosor; éstas son de contornos citoplasmáticos más ó menos redondeados, con un núcleo grande ovalado, generalmente con un solo nucleolo. El citoplasma es poco abundante, basófilo y contiene algunos corpúsculos pequeños, algunos de ellos alargados, que corresponden a las mitocondrias y a las miofibrillas cortadas transversalmente.

En la zona media, las células son generalmente más alargadas, a veces estrelladas con tres o más prolongaciones. En esta zona hay varias capas celulares, que dejan entre sí amplios espacios intersticiales. El

núcleo es redondeado con uno o más nucleolos, y de menor tamaño que las células de la zona externa. El citoplasma es abundante observándose que en él se encuentran unos cuerpos oscuros, a veces muy alargados ocupando gran parte de la longitud celular, y otras veces puntiformes ordenados formando como cadenas; en el primer caso suponemos que corresponden a miofibrillas en formación y en el segundo a las mitocondrias, y a miofibrillas cortadas transversalmente a su eje.

En la zona interna aparecen unas digitaciones procedentes de la zona media, de dos o más células de grosor, morfológicamente parecidas a las de la zona media pero con citoplasma más abundante y más alargado, y con mayor cantidad de corpúsculos oscuros generalmente alargados, que en algunos casos muestran unas estriaciones claras transversalmente, que son miofibrillas de longitudes variables entre 6 y 10 sarcómeras. Estas digitaciones celulares están recubiertas por una capa de células de aspecto endotelial.

Observando dicho material al microscopio electrónico no son tan apreciables las diferencias entre los distintos tipos celulares como al microscopio óptico.

Las células son de contornos más o menos fusiformes desde la zona más interna a la más externa progresivamente.

Los núcleos son claros con poca cromatina y a veces se observa un gran nucleolo.

En el citoplasma se observan algunas miofibrillas, algunas de grosor casi adulto con abundantes filamentos, y en longitudes de 10 ó más sarcómeras, perfectamente ordenadas, con las bandas A e I bien estructuradas y visualizándose en ocasiones la banda H. (Fig.10, 11). En el resto del citoplasma también es posible observar filamentos gruesos paralelos o entrecruzados en haces y a veces en la vecindad de un cuerpo denso que será una futura banda Z. En otras zonas se observan acúmulos de filamentos más delgados entrecruzados como un retículo, de diámetros variables, algunos como el de los filamentos de actina, y otros algo mayores.

Hay grandes acúmulos de glucógeno, y también depósitos de lípidos, que generalmente se encuentran en relación, y en áreas periféricas, encontrándose en mayor cantidad que en el estadio precedente.

El Aparato de Golgi es muy aparente con abundantes cisternas y siempre en situación perinuclear.

En algún caso cerca del Aparato de Golgi se observa una vacuola o cisterna redondeada con material denso en su interior, que denominamos "gránulo denso" según MANASEK. (151). (Fig.10)

Difusamente distribuídos en el citoplasma se encuentran gran cantidad de ribosomas libres, predominando en la vecindad de los filamentos, donde a veces se encuentran formando polisomas de estructura helicoidal, y también en forma de rosetas.

Esparcidos en el citoplasma se encuentran algunas pequeñas vacuolas con una membrana simple, redondeadas que creemos corresponde al retículo endoplasmático, que se sitúan preferentemente por debajo del sarcolema y alrededor de las miofibrillas, con cierta constancia a nivel de la línea Z.(Fig.11, 12).En ninguna célula con filamentos hemos observado restos de retículo endoplasmático rugoso.

En alguna célula se encuentra el centriolo en zonas alrededor del núcleo.

Hay abundantes mitocondrias, algunas de ellas muy alargadas y otras de formas irregulares.

En las zonas de contacto entre las células se observan desmosomas y también uniones del tipo de "fascia adherens". En algunas ocasiones en estas condensaciones de la membrana parecen confluir los miofilamentos, en ambas células vecinas. En el caso de que los filamentos confluentes corresponden a una miofibrilla adulta, las dos miofibrillas de ambas células adoptan una orientación siguiendo una misma dirección. (Fig. 11)

Si las miofibrillas están cortadas transversalmente observamos un punteado grueso en forma hexagonal, con uno de estos puntos en situación central, y entre ellos aparecen unos puntos más finos que se sitúan en el espacio triangular entre cada tres puntos gruesos, adoptando de esta manera también una disposición hexagonal centrada por cada filamento grueso.

En una célula hemos visto una estructura del tipo "annulate lamellae", correspondiente a una serie paralela de varias vesículas contiguas de retículo endoplasmático.

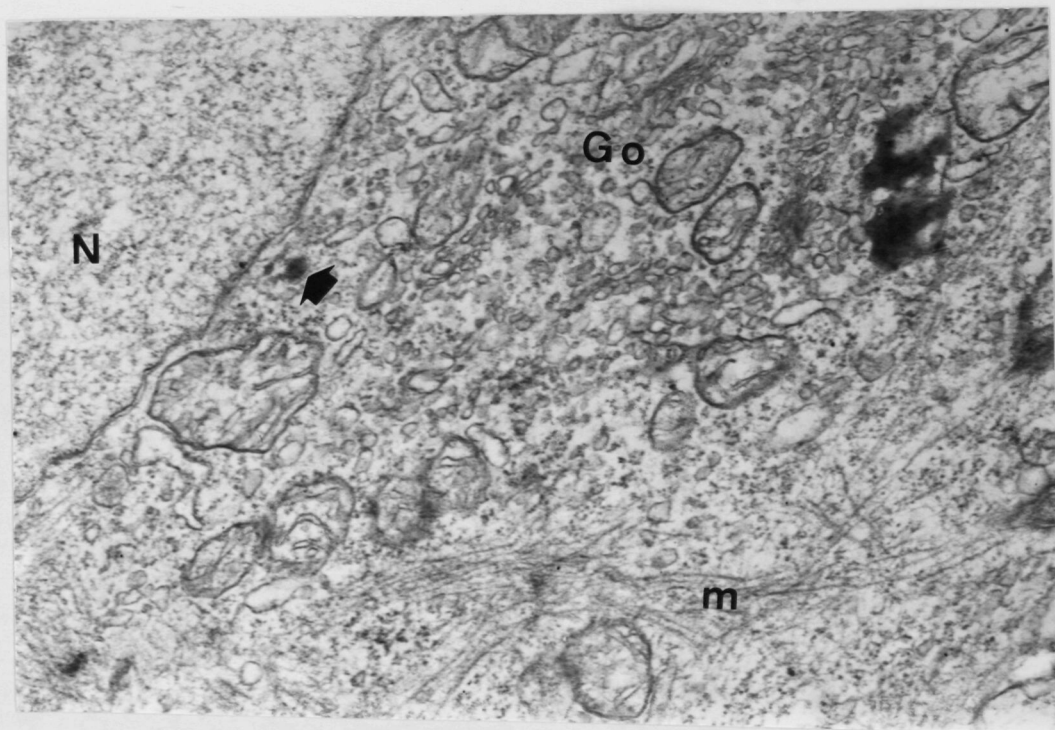


Fig. 10 : Embrión de 3 días . Miocito con una miofibrilla inicial y filamentos de miosina (m) entrecruzados y agrupados en haces. Se distingue un gránulo denso (flecha) en la vecindad del núcleo (N). Go- Aparato de Golgi
30.000 X.

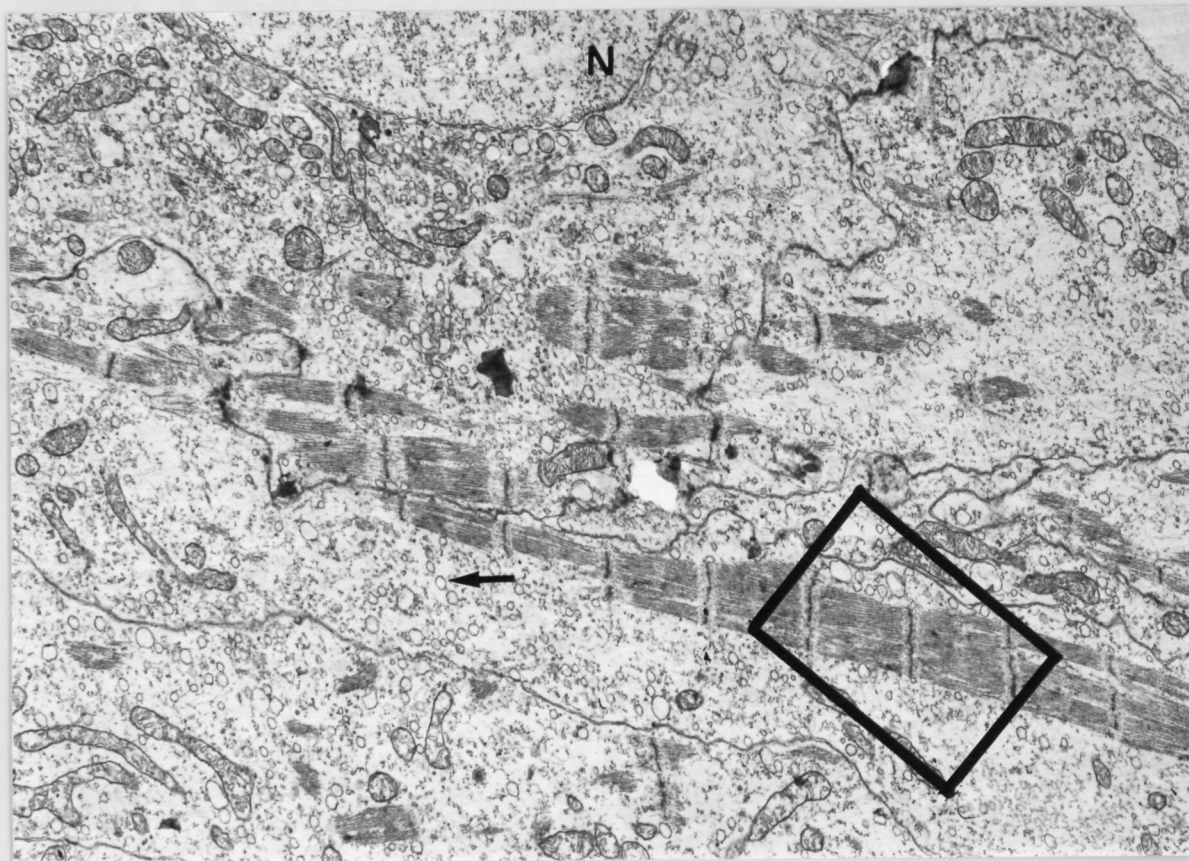


Fig. 11 : Embrión de 3 días. Miocitos con varias miofibrillas formadas por muchas sarcómeras. En la periferia celular las miofibrillas parecen continuarse entre las células vecinas a través de los sarcolemas. Observéese en los sarcoplasmas una gran cantidad de vesículas de retículo sarcoplasmático (flecha) especialmente por debajo del sarcolema y en la periferia de las miofibrillas.

N- núcleo.

10.500 X.

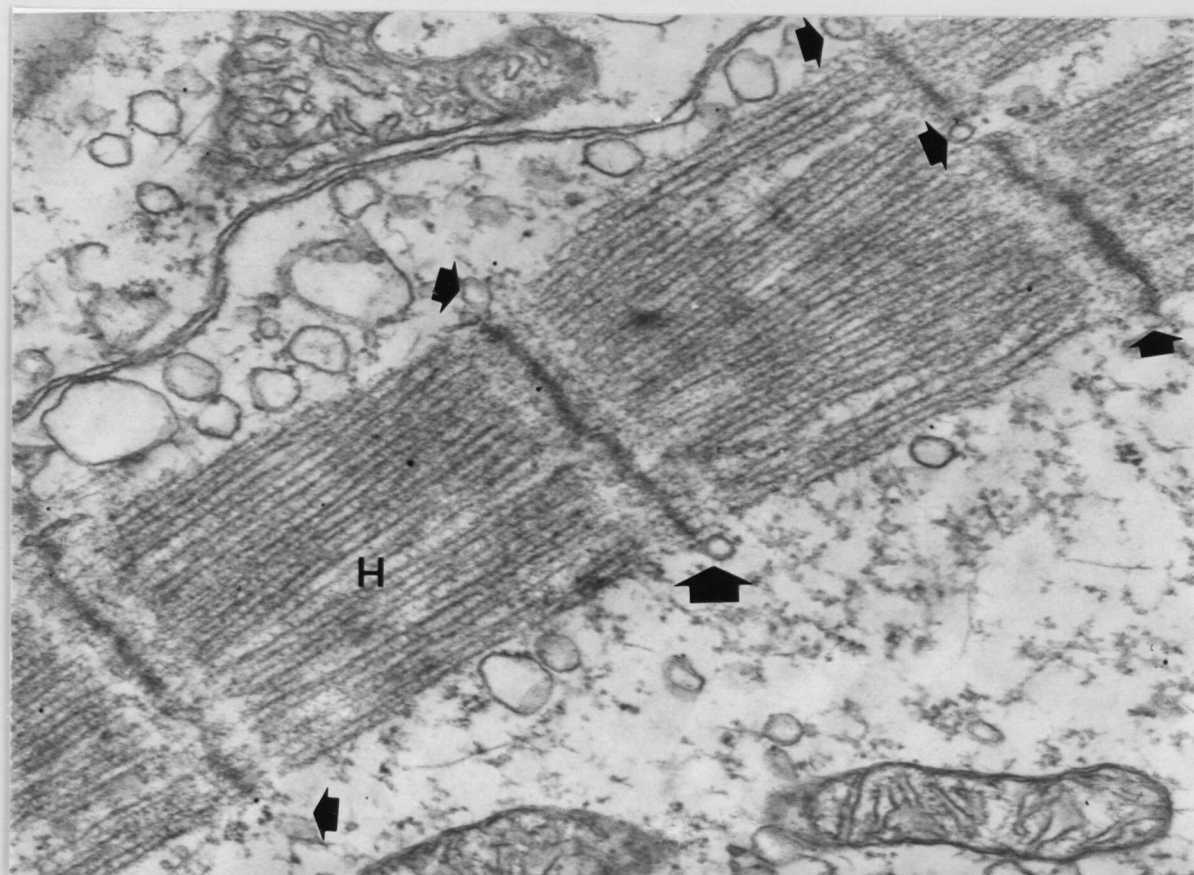


Fig. 12 : Embrión de 3 días. Fragmento de la figura anterior a mayor aumento, en el que se observan perfectamente la localización del retículo sarcoplasmático en la periferia de las miofibrillas y con cierta regularidad a nivel de la línea Z (flechas). En el centro de cada sarcómera se visualizan unas zonas más claras, correspondientes a las bandas H (H).

46.750 X.