



Ultraestructura de las miofibrillas en cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario tardío y postnatal temprano de ratón.

Ultrastructure of myofibrils in cardiomyocytes during late embryonic and early postnatal mouse.

Nancy Jaimes-Méndez¹, Zulma Peña-Contreras², Delsy Dávila-Vera², Melisa Colmenares-Sulbarán², Rosa Virginia Mendoza-Briceño².

¹Departamento de Biología-Química, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia; Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

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

RESUMEN

En este estudio se describen por medio del análisis ultraestructural los cambios en la citodiferenciación de las miofibrillas en los cardiomiocitos del tejido cardíaco en desarrollo embrionario tardío y postnatal temprano de ratón. El proceso de diferenciación progresiva en diferentes espacios celulares de las miofibrillas, es una manifestación propia de las etapas estudiadas. En algunas células se observa la ultraestructura propia de las sarcómeras, con sus respectivas bandas Z, I, A y H, en contraste con otras miofibrillas que no se evidencian éstas estriaciones, posiblemente porque están en proceso de formación. En edades embrionarias las miofibrillas están separadas unas de otras por un espacio interfibrilar irregular; mientras que en edades postnatales, tienen una mejor organización y muchas de ellas están empaquetadas en masas confluentes y compactas que se fusionan para formar fibras largas, ramificadas y se disponen siguiendo el eje longitudinal de la célula, intercaladas con filas de mitocondrias. Esta conformación se relaciona con la forma alargada de los cardiomiocitos y con el aumento de la longitud de las miofibrillas; mientras que la presencia en el sarcoplasma de grandes áreas electrón- translúcidas se reducen a medida que aumenta la maduración, producto de la diferenciación estructural de la síntesis, organización de las miofibrillas y otras organelas. Estos cambios morfológicos en la citoarquitectura son consecuencia de la adaptación del miocardio postnatal a las exigencias de trabajo poco después del nacimiento y además, están relacionados con los cambios circulatorios que ocurren en el periodo neonatal.

Palabras clave: cardiomiocitos, miofibrillas, sarcómeras.

ABSTRACT

This study describes ultrastructural analysis through changes in the cytodifferentiation of myofibrils in cardiomyocytes of cardiac tissue in late embryonic development and early postnatal mouse. The process of progressive differentiation in different cellular spaces of the myofibrils, is a manifestation of the periods studied. In some cells were observed ultrastructure of sarcomeres own, with their respective bands Z, I, A and H, in contrast to other myofibrils that these striations are not observed, possibly because they are in formation process. Myofibrils in embryonic ages are separated from each other by an irregular interfibrillar space; whereas in postnatal ages, have a better organization and many of them are packed in compact confluent masses that fuse to form long fibers branched and arranged following the longitudinal axis of the cell, interspersed with rows of mitochondria. This conformation is related to the elongated shape of cardiomyocytes and increasing the length of the myofibrils; while the presence in the sarcoplasm of large electron-translucent areas are reduced with increasing maturity, due to the structural differentiation synthesis, organization of myofibrils and other organelles. These morphological changes in cytoarchitecture are the result of postnatal myocardial adaptation to the demands of work shortly after birth and also are related to the circulatory changes that occur in the neonatal period.

Key words: cardiomyocyte, myofibrils, sarcomeres.

*Para citar este artículo: Jaimes-Méndez N, Peña-Contreras Z, Dávila-Vera D, Colmenares-Sulbarán Melisa, Mendoza-Briceño RV. Ultraestructura de las miofibrillas en cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario tardío y postnatal temprano de ratón. Bistua. 2011;9(2):21-xx

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Departamento de Biología-Química, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia. njaimes@unipamplona.edu.co

Recibido: Febrero 18 de 2010

Aceptado: Diciembre 14 de 2010

22

INTRODUCCIÓN

Los cardiomiocitos son células musculares especializadas capaces de convertir energía química en energía mecánica y su trabajo es esencial para el movimiento de líquidos corporales en el embrión. Durante el desarrollo cardíaco, las células acumulan en su citoplasma proteínas sarcoméricas en una proporción característica, lo cual le permite desarrollar su citoarquitectura en paquetes de miofibrillas que contienen miofilamentos. Es decir, las miofibrillas tienen repetidas unidades micro-anatómicas, llamadas sarcómeras, que son sus unidades funcionales básicas y estas se ensamblan con sorprendente precisión para constituir la unidad contráctil básica del tejido cardíaco (Ehler E., et al, 2002). En la estructura de los miofilamentos, la sarcómera corresponde a la región entre dos discos Z y consiste en un número variable de proteínas organizadas en filamentos gruesos, incluyendo las cadenas pesada y liviana de la miosina y filamentos delgados, conteniendo la actina, tropomiosina, troponina C, troponina T, troponina I, filamentos de titina y nebulina. Aproximadamente 50 sarcómeras componen una miofibrilla de extremo a extremo y un paquete de 50-100 miofibrillas constituyen una célula muscular (McMullen J. R., et al, 2004). En la actualidad se conoce que la estructura de la sarcómera es dinámica; nuevas proteínas son sintetizadas e incorporadas para reemplazar las proteínas contráctiles viejas o dañadas, manteniendo así la estructura funcional del músculo cardíaco. Las miofibrillas son el aparato contráctil de las células de músculo estriado, incluyendo músculo esquelético y cardíaco. En los vertebrados, la ultraestructura y composición molecular de las sarcómeras es marcadamente similar en los diferentes tipos de músculos. En el músculo estriado, las proteínas contráctiles se disponen en un enrejado tridimensional altamente ordenado formando la sarcómera. Por lo tanto, el ensamble de una miofibrilla implica el orden preciso de varias proteínas dentro de la formación lineal de las sarcómeras. En el músculo cardíaco y esquelético las estrías dispuestas en ángulo recto al eje longitudinal de las células, se logran mediante la organización propia del material contráctil en sarcómeras; el material contráctil y las mitocondrias ocupan aproximadamente el 50%

Bistua 2011 Vol 9(2):21-30. Jaimes-Méndez N et al. Ultraestructura de las miofibrillas en cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario

y el 35% del volumen celular (Sommer, J. R., et al, 1978).

La miofibrillogénesis es el proceso en el cual las células adquieren y ensamblan su aparato contráctil altamente estructurado, en el caso del desarrollo del miocardio su importancia radica en que el corazón es el primer órgano funcional en los embriones de vertebrados (Dube, D. K., 2002), encontrándose así los cardiomiocitos entre las primeras células embrionarias que se organizan en un órgano de funcionamiento (Sanger, J. W., et al 2002). En las células del miocardio de embriones de ratón de 8 días de gestación, se observan filamentos finos dispersos en forma irregular y algunos filamentos en fascículos cortos paralelos, próximos a los bordes laterales de la célula (Navaratnam, V., et al, 1986). Las miofibrillas ventriculares en el miocardio de ratones tipo silvestre de 12,5 a 13,5 días de desarrollo embrionario, se ubican generalmente en la periferia de las células, poseen pocas sarcómeras y grandes áreas electrón-traslucidas en el citosol (Lozyk, M., et al, 2006) y es posible ya observar el disco Z y la banda M (Risebro, C., et al, 2009). A medida que avanza el desarrollo embrionario hay un aumento considerable en el contenido de miofibrillas, e inicialmente los filamentos, tanto gruesos como delgados, se orientan longitudinalmente en la periferia de la célula, para posteriormente ocupar una mayor área del citoplasma (Navaratnam, V., et al, 1986). A los 14,5 días de desarrollo embrionario las miofibrillas aumentan en número, se extienden hacia el interior de la célula, observándose miofibrillas menos desorganizadas, se inicia la alineación en paralelo al eje longitudinal del cardiomiocito y también hay un aumento en el número de sarcómeras por miofibrilla, que pueden tener una apariencia ondulada que eventualmente desaparece en el día 18,5 de desarrollo embrionario (Lozyk, M., et al, 2006).

Es conocido que los discos intercalares se caracterizan por la presencia de fascia adherente, desmosomas y uniones comunicantes, éstas son regiones de adhesión célula-célula en el músculo cardíaco (McNutt, N. S., et al, 1975, Hirschy, A., et al, 2006), y están localizadas en una porción especializada de la membrana plasmática (Lu, S., et al, 2008). La fascia adherente y los desmosomas

proporcionan el acoplamiento mecánico y las uniones comunicantes el acoplamiento eléctrico entre las células adyacentes (Hirschy, A., et al, 2006). Evidencias observadas en el músculo cardíaco de rata sugieren que los discos

23

intercalares logran estabilizar la organización sarcomérica de las miofibrillas, ya que las uniones de fascia adherente pueden tener una marcada influencia sobre la estructura de las miofibrillas, el arreglo de la sarcómera se mantiene donde las miofibrillas se fijan al sarcolema a través de las fascias adherentes, mientras que en el extremo opuesto no hay uniones, careciendo las miofibrillas terminales de una disposición sarcomérica típica (Atherton, B. T., et al, 1988), siendo una región donde se unen los filamentos de actina a la membrana plasmática (McNutt, N. S., et al, 1975).

Algunos autores proponen que la etapa temprana de desarrollo embrionario en el ratón, se refiere a la etapa hasta 12,5 días, la etapa media entre los 14,5 a 15,5 días y la etapa tardía de 16,5 a 18,5 días (Lozyk, M., et al, 2006); formando así el periodo embrionario; mientras que el periodo fetal es más corto, de 3 a 4 días hasta llegar al nacimiento. En el presente trabajo se emplea el término embrionario para referirnos a la totalidad de la etapa prenatal. Aunque el corazón de ratón está bien conformado a los 12,5 días de desarrollo, no es sino entre los 16,5 y 17 días cuando alcanza su diferenciación, desarrollo y configuración completa (Lozyk, M., et al, 2006; Nadal, G. B., 2001).

En esta investigación se examina la citodiferenciación de los cardiomiocitos en el ratón por medio del análisis ultraestructural de las miofibrillas en tejido cardíaco de desarrollo embrionario a partir del día 17 y se compara con la etapa postnatal hasta el 5 día, relacionando los cambios estructurales que ocurren en los cardiomiocitos en estas dos etapas del desarrollo del corazón, tratando además, de darle una interpretación funcional a dichos cambios.

METODOLOGÍA

Tejido Cardíaco

Las muestras de tejido se obtuvieron de ratones NMRI de edades embrionarias entre 17 a 21 días (E17 a E21) y de 0 a 5 días de edad postnatal (P0 a P5), proporcionados por el Bioterio Central de la

Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. Los ratones hembras en gestación y los de edad postnatal se anestesiaron con Ketamina[®] a una dosis de 240 mg/Kg-peso. A los ratones hembra en gestación, después de exponer la cavidad abdominal, se les extrajeron los embriones. A cada ratón se le hizo una incisión a nivel del tórax para extraer el corazón, el cual fue colocado inmediatamente en solución Tyrode estéril. Bajo observación con lupa estereoscópica se realizó la disección del ventrículo izquierdo y se procedió a obtener muestras del músculo cardíaco. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a los Protocolos de Investigación y Docencia del Bioterio de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela y en conformidad con las normas establecidas por el NIH (National Institute of Health-USA) para el tratamiento ético de los animales (Jaimes, M. N., et al, 2010).

Microscopía Electrónica

Los fragmentos de tejido cardíaco fueron fijados por un período de 1 a 2 horas en mezcla 3:3 (glutaraldehído 3%, formaldehído 3% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3), después fueron lavados con tampón cacodilato y post-fijados por 3 a 12 horas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% preparado en el mismo tampón cacodilato, seguido de varios lavados con tampón. El tejido se deshidrató con alcohol etílico en concentraciones ascendentes y con óxido de propileno. Finalmente, los fragmentos de tejido fueron infiltrados e incluidos en resina epoxídica. De los tejidos incluidos se hicieron secciones de 1 micra de espesor, las cuales fueron coloreadas con p-fenil-endiamina en solución acuosa al 1% (p/v) y secciones ultrafinas, de 90 nanómetros de espesor, contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo (Reynolds, E. S., 1963, Watson, M. L., 1958) para el análisis ultraestructural.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las características ultraestructurales principales de las células musculares es la presencia de estriaciones transversales orientadas en ángulo recto al eje longitudinal de las fibras musculares y que son el producto de la interacción de un complejo material contráctil multiproteico, que determina la formación de una particular estructura morfológica conocida como sarcómera; reportada por Bugaisky desde 1989.

Durante el desarrollo embrionario final (E17 a E21) el cambio más significativo en el miocito es

un aumento progresivo en la cantidad y en la organización del material contráctil representado en las miofibrillas por su unidad estructural y funcional, la sarcómera. A nivel ultraestructural, en una misma célula se pueden observar

24

miofibrillas en diversas etapas de desarrollo (Figura 1a, b, c). Cuando los miofilamentos están dispersos, se orientan en diferentes direcciones (longitudinal, transversal y oblicuo), (Figura 1a); sin embargo, en la mayoría de los cardiomiocitos se observan miofibrillas estriadas organizadas a lo largo del eje longitudinal de la célula y presentan varias unidades sarcoméricas en las que se pueden observar sus componentes ultraestructurales como son las bandas Z, A, I, H (Figura 1 c, d, e); así mismo se pueden visualizar miofibrillas en formación con la estructura de la banda Z irregular (Figura 1 a, b, c). A medida que avanza el desarrollo embrionario, progresivamente aumenta la producción del material contráctil de las miofibrillas alineadas regularmente, como se observa en secciones longitudinales de tejido cardíaco de 21 días de desarrollo embrionario. Algunas miofibrillas rodean el núcleo y otras están dispersas en todo el citoplasma y contribuyen a incrementar la electrón-densidad del citoplasma, conjuntamente con el aumento de otras estructuras celulares, el núcleo es grande, alargado y en muchos casos presenta varios nucléolos prominentes, lo cual parece estar relacionado con el momento celular de la actividad de síntesis proteica en los cardiomiocitos. También se observa la presencia de cardiomiocitos binucleados. Las mitocondrias de diferentes tamaños y formas se pueden observar muy cerca de las miofibrillas y dispersas en todo el citoplasma, pero a medida que aumenta la densidad de las miofibrillas se van ubicando en un arreglo longitudinal a las mismas (Figura 1 c, e).

La disposición de las miofibrillas siguiendo el eje longitudinal de la célula, está relacionada con el cambio de la forma de los cardiomiocitos, ya que los cardiomiocitos en ratones de 9,5-12,5 días de desarrollo embrionario tienen una forma poligonal y las miofibrillas se orientan al azar en el citoplasma; a los 16,5-18,5 días de desarrollo embrionario los cardiomiocitos se hacen alargados y por lo tanto las miofibrillas se alinean. Este

crecimiento longitudinal puede estar relacionado con el aumento de la longitud de las miofibrillas y orientación paralela, indicando que la alineación de las miofibrillas sucede de forma secuencial (Hirschy, A., et al, 2006).

En esta etapa del desarrollo ya es posible observar en algunos sitios la presencia de un material electrón-denso localizado a ambos lados de las membranas celulares y que corresponden a uno de los componentes de los discos intercalares, como son los desmosomas (Figura 1 a).

Algunas de las principales estructuras celulares de los cardiomiocitos, como son las miofibrillas, uniones celulares y mitocondrias van cambiando su conformación progresivamente durante el desarrollo embrionario, observándose en grados diferentes de desarrollo al compararlas con el cardiomiocito adulto. De igual forma, se nota que las miofibrillas no están reunidas en masas confluentes, por el contrario, en la mayoría de los casos están separadas por un espacio citoplasmático o un espacio interfibrilar irregular. En edades postnatales (P0 a P5), la microscopía electrónica permite revelar una citoarquitectura de los cardiomiocitos más organizada y un mayor número de estructuras citoplasmáticas, entre ellas las miofibrillas con sus estrías transversales características que forman numerosas sarcómeras (Figura 2a, b, c). Las miofibrillas, paralelas entre sí, de modo que mantienen la disposición a lo largo del eje longitudinal de la célula, están intercaladas con un gran número de mitocondrias (Figura 2 b), muchas de las miofibrillas están empaquetadas en masas compactas y se fusionan para formar largas fibras ramificadas en las regiones del disco Z. Además se observa un incremento en la electrón-densidad en el citoplasma de los cardiomiocitos, con una reducción significativa del espacio interfibrilar, en parte debido a que las miofibrillas aumentan en cantidad, grosor, ramificación y se intercalan con numerosas mitocondrias orientadas en la misma dirección que las miofibrillas (Figura 2 c, d). A pesar que la mayoría de las células contienen pequeñas cantidades de diversas proteínas contráctiles la presencia del material contráctil organizado, distingue las células musculares de todas las otras células, (Sommer, J. R., et al, 1878).

Se han propuesto varios modelos para explicar el ensamblaje de las miofibrillas, debido a que su

formación implica el preciso orden de múltiples subunidades en un arreglo lineal sarcomérico. Uno de los modelos, comprobado experimentalmente en cardiomiocitos embrionarios de pollo en cultivo, propone tres etapas diferentes del

25
ensamblaje durante la Miofibrillogénesis: premiofibrillas, miofibrillas nacientes y miofibrillas maduras. Este modelo postula que las fibrillas que se forman *de novo* cerca de la membrana celular son premiofibrillas, que son las precursoras de las miofibrillas maduras. El aumento de la longitud no parece ocurrir por la adición secuencial de nuevos sarcómeros a los extremos de las miofibrillas, sino parece implicar una coalescencia lateral de las miofibrillas adyacentes más cortas (Dabiri G. A., et al, 1997, Sanger, J. W., et al, 2002). Las miofibrillas nacientes se pueden relacionar con la ultraestructura de las miofibrillas en formación que se observan en este estudio, en base a que sólo presentan miofilamentos en una organización ligeramente laxa con una banda Z evidente, las otras estriaciones como la banda I, A, H, no son discernibles en las miofibrillas de los cardiomiocitos tanto en la etapa embrionaria como en la postnatal.

En el período postnatal estudiado, se observa el proceso de maduración de la estructura de las uniones celulares como los desmosomas y fascia adherente, componentes de los discos intercalares que son de vital importancia para el funcionamiento del tejido cardíaco. La distribución de las uniones celulares en los cardiomiocitos inicialmente se concentran en la circunferencia de la membrana periférica, pero con el desarrollo, estos componentes de los discos intercalares se bipolarizan de forma secuencial, siendo un proceso lento que para las uniones adherentes y desmosomas es alcanzado sólo después del nacimiento y para las uniones comunicantes incluso más tarde (Hirschy, A., et al, 2006). En los cardiomiocitos de 17 días de desarrollo embrionario ya se pueden observar desmosomas (figura 1a), pero en edades más avanzadas del desarrollo el aumento más evidente es la fascia adherente (figura 2e). Algunos estudios reportan la importancia de la fascia adherente para la citoarquitectura cardíaca, porque estos complejos de proteínas de membrana enlazan el citoesqueleto de actina a la membrana,

es decir sirven de sitio de anclaje de las miofibrillas a través de los filamentos delgados y así se confirma la importancia de la fascia adherente en la miofibrillogénesis. Mientras que los desmosomas son proteínas transmembrana que enlazan el sistema de filamentos intermedios (desmina) a la membrana a través de la interacción de varias proteínas. La desmina rodea a los discos Z e integran el aparato contráctil con la membrana plasmática. Una posible explicación de la distribución embrionaria diferente de los desmosomas y la fascia adherente puede ser el modo distinto del ensamblaje de estas estructuras de contacto, existiendo en el mismo lapso de tiempo una restricción para la bipolaridad. Esto sugiere que los cambios que afectan la fascia adherente y los desmosomas durante el desarrollo son probablemente coordinados por ambas uniones, las cuales a su vez proporcionan el acoplamiento mecánico, que es esencial para la función de los cardiomiocitos, ya que tanto la fascia adherente como los desmosomas parecen desempeñar principalmente funciones mecánicas (Hirschy, A., et al, 2006).

Las células del miocardio a partir de P1 muestran un aumento en el volumen y número de miofibrillas en comparación con el miocardio PO y de las edades embrionarias estudiadas (E17 a E21). Las miofibrillas del miocardio ventricular izquierdo de ratón en edades postnatales se observan en diversas etapas de desarrollo en una misma célula y al igual que en las edades embrionarias, las miofibrillas presentan una ultraestructura sarcómerica con casi todas las bandas: la banda I (actina, titina), la banda A (miosina), la banda Z (α -actinina), y la banda H (miosina) con excepción de la banda M que no es discernible. Según Chacko en 1976, la banda M es una característica estructural distintiva de la miofibrilla madura. Por su parte, Hirschy et al en 2006, reportan que la formación de las miofibrillas es un proceso rápido y secuencial, en el cual primero se produce el disco Z, luego la banda M, seguido por el ensamblaje de los filamentos gruesos y delgados; mientras que Anversa et al 1981, en estudios en ratas de edad postnatal obtuvieron pocas evidencias de la banda M y afirman que es en el periodo postnatal temprano cuando la banda M experimenta un desarrollo significativo. En contraste, en otro reporte donde utilizan como control miocardio de embriones de

ratones de 13 días de edad, ya se evidencia la banda M en los sarcómeros de los cardiomiocitos (Risebro, C., et al, 2009). Sin embargo, es importante destacar que en un momento dado del desarrollo, algunas células están más diferenciadas

que otras, por lo tanto es evidente que la etapa de citodiferenciación no es constante en todo el órgano (Chacko, K. J., 1976), lo que se evidencia en los resultados reportados en el presente trabajo, ya que algunos cardiomiocitos prenatales y postnatales presentan miofibrillas con sus estriaciones transversales (Z, I, A, H) formando sarcómeros (Figura 1d, 2a), mientras que otras miofibrillas están en proceso de formación (Figura 1b,c y 2b,d), sin embargo, se puede concluir que la banda Z es la primera estriación que aparece en las miofibrillas en formación, lo cual coincide con lo expresado por Chacko en 1976, quien afirma que la condensación del material de la banda Z, es el primer patrón de banda observado en el miocardio 10 días prenatal en ratas.

Por otro lado, Navaratnam et al en 1986 reportan que el corazón de ratón a partir 9 días de desarrollo embrionario muestra contracciones peristálticas regulares y que por lo tanto los miocitos ya contienen miofibrillas estriadas, con segmentos electrón densos, que posteriormente se condensan en la línea Z y uniones celulares especializadas como desmosomas y fascia adherente. Risebro et al en 2009, también afirman que los componentes del sarcómero se expresan muy temprano en el desarrollo y están correctamente localizados en las miofibrillas en el momento cuando el tubo del corazón comienza a contraerse.

Al igual que en el músculo esquelético y en el liso, el arreglo de las células del miocardio no es aleatoria, sino que muestra ciertos patrones que cambian durante el desarrollo ontogénico, lo cual lleva a una organización que es importante para garantizar la eficiencia del bombeo miocárdial, de modo que el nivel de organización aumenta con el funcionamiento del corazón (Sedmera, D., et al, 2000). Esta afirmación se relaciona con los resultados aquí reportados en las células en desarrollo embrionario (E17 a E21), donde el corazón ya es funcional pero con circulación fetal y las células se caracterizan por tener una menor electrón-densidad citoplasmática y menos organelas; en contraste, en edades postnatales

tempranas (P1-P5) se evidencia mayor cantidad de organelas, es decir, se observa una progresiva maduración del citoplasma que involucra principalmente, el aumento en el volumen de las miofibrillas y mitocondrias. En la etapa postnatal el tamaño promedio de los miocitos también aumenta en paralelo con el crecimiento del cuerpo; además, los cardiomiocitos poseen la capacidad de la hipertrofia adicional en respuesta a una carga de trabajo añadida, dada por el cambio de la circulación fetal a la postnatal, lo cual resulta en una mayor carga de volumen con el cierre del foramen oval y del ductus arterioso después del nacimiento (Anversa, P., et al, 1979). Por otra parte, la resistencia pulmonar es menor que la resistencia periférica, por ende, la carga de presión en el ventrículo izquierdo es mayor que en el derecho, lo que trae como consecuencia una mayor masa muscular característica del ventrículo izquierdo en el corazón de animales adultos (Anversa, P., et al, 1979, McMullen, J. R., et al, 2004). Es decir que el aumento de la masa del corazón en el embrión no sólo es alcanzado por la hiperplasia, sino también por el aumento del volumen de los cardiomiocitos individuales (hipertrofia). Los resultados reportados indican que la hipertrofia observada en el corazón neonatal después del día 4 postnatal es en realidad la segunda fase de un proceso que se inicia en el embrión y que contribuye al aumento de la masa miocárdica junto con las divisiones mitóticas (Hirschy, A., et al, 2006). Es importante señalar que la morfogénesis cardíaca primaria (embrión) es seguida por más maduración y crecimiento miocárdial (feto) y que el miocardio continua la maduración en el periodo postnatal temprano (Tobita, K., et al, 2006).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los cardiomiocitos poseen una estructura compleja multiproteica, morfológicamente expresada por una estriación transversal debida a la interacción de varias proteínas contráctiles, especialmente actina y miosina, siendo esta una característica morfológica propia de estas células. El proceso de diferenciación progresiva de las miofibrillas en diferentes espacios celulares es una manifestación propia de las etapas embrionarias y postnatales analizadas en este estudio. En algunas células se observa la ultraestructura propia de los sarcómeros con sus respectivas estriaciones transversales (Bandas Z, I, A y H), en contraste

con otras miofibrillas, donde no se evidencian estas estriaciones, posiblemente porque están en proceso más inmaduro de formación. Así mismo, en edades embrionarias las miofibrillas no están organizadas en masas confluentes, sino que en la

mayoría de los casos están separadas unas de otras por un espacio interfibrilar irregular; mientras que en edades postnatales, las miofibrillas tienen una mejor organización y muchas de ellas están empaquetadas en masas compactas y se fusionan para formar fibras largas y ramificadas. La disposición de las miofibrillas siempre es a lo largo el eje longitudinal de la célula e intercaladas con filas de mitocondrias, esta conformación se relaciona con la forma alargada de los cardiomiocitos y con el aumento de la longitud de las miofibrillas. Otro hallazgo característico es la presencia en el sarcoplasma de grandes áreas electrón-translucidas y a medida que aumenta la maduración esta fracción citosólica clara disminuye, por lo tanto, hay una reducción del espacio citoplasmático, de modo que el sarcoplasma está lleno de orgánulos intracelulares, producto de la diferenciación estructural de la síntesis, organización de las miofibrillas y otras organelas. Estos cambios morfológicos son el producto de la adaptación del miocardio postnatal a las exigencias de trabajo poco después del nacimiento y además, están relacionados con los cambios circulatorios que ocurren en el periodo neonatal. Los cardiomiocitos durante el proceso de maduración presentan uniones celulares (uniones adherentes, desmosomas) que posteriormente forman parte de los discos intercalares, estas estructuras son de vital importancia porque contribuyen a la función mecánica de los cardiomiocitos. Teniendo presente la importancia de los cultivos de tejidos en la búsqueda de soluciones a problemas biomédicos consideramos que es de interés hacer una comparación de la estructura de las miofibrillas y de las uniones celulares en los cardiomiocitos en desarrollo con las obtenidas en los cardiomiocitos en cultivos histotípicos, para evaluar las similitudes presentes en ambos modelos, lo cual permitiría una mayor utilización de cultivo de tejidos en diferentes aplicaciones biológicas.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a todos los miembros del Centro de Microscopía “Dr. Ernesto Palacios Priú” de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, por su apoyo y colaboración en el desarrollo de la investigación, en especial al técnico José Sánchez por el trabajo en la preparación del material de tejido cardíaco para microscopía electrónica, así mismo al Ingeniero Alirio Balza a la TSU Leisalba Zavala, al técnico José Ramírez en el registro ultraestructural de los cardiomiocitos por microscopía electrónica, a la TSU Emilitza Labarca Villasmil por su ayuda en la optimización de las imágenes y diagramación del manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Anversa P., Olivetti G., Bracchi P.G., Loud A.V. (1981). “Postnatal development of the M band in rat cardiac myofibrils” *Circ Res* 48:5, 561-568.

Anversa P., Olivetti G., Loud A. V. (1979). Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. *Circ Res* 46:4: 495-502.

Atherton B. T., Behnke M. M. (1988). Structures of myofibrils at extra-junctional membrane attachment sites in cultured cardiac muscle cells. *J Cell Sci* 89:97-106.

Bugaisky L., Zak R. (1989). “Differentiation of adult rat cardiac myocytes in cell culture” *Circ Res* 64: 493-500.

Chacko K.J. (1976). “Observation on the ultrastructure of developing myocardium of rat embryos” *J Morphol* 150: 681-709.

Dabiri, G. A., Turnacioglu K. K., Sanger J. M., Sanger J. W. (1997). Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci* 94: 9493-9498.

Dube D.K. (2002). Myofibrillogenesis. Series:Cardiovascular molecular morphogenesis. Birkhäuser.

Ehler E., Perriard J-C. (2002). Emergence of the first myofibrils and targeting mechanisms directing sarcomere assembly in developing

cardiomyocytes, en: Myofibrillogenesis (ed. Dube D. K.). Birkhäuser. pp. 41-58.

Hirschy A., Schatzmann F., Ehler E., Perriard J.C. (2006). "Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart" *Dev Biol* 289: 430-441.

Jaimés M. N., Peña C. Z., Dávila V. D., Colmenares S.M., Mendoza B. R. (2010). Análisis ultraestructural de cardiomiocitos embrionarios y postnatales de ratón en cultivo histotípicos. *Acta Microsc* 19:3: 232-241.

Lozyk M., Papp S., Zhang X., Nakamura K., Michalak M., Opas M. (2006). "Ultrastructural analysis of development of myocardium in calreticulin-deficient mice" *BMC Dev Biol* 6: 54.

Lu S., Horowitz R. (2008). Role of nonmuscle myosin IIB and N-RAP in cell spreading and myofibril assembly in primary mouse cardiomyocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 9 :747-761.

McMullen J. R.; Izumo S. (2004). "Mechanisms controlling heart growth in mammals" en *Cell growth control of cell size*, (Eds. Hall M., Raff M., Thomas G). Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 554-603.

McNutt N. S. (1975). Ultrastructure of the myocardial sarcolemma. *Circ Res* 37:1-13.

Nadal G. B., (2001). Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: Futuro de la generación miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev. Esp Cardiol* 54:5:543-550.

Navaratnam V., Kaufman H., Skepper J., Barton S., Guttridge K. (1986). "Differentiation of the myocardial rudiment of mouse embryos: an ultrastructural study including freeze-fracture replication" *J Anat* 146: 65-85.

Reynolds E.S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy" *J Cell Biol* 17:208-212.

Risebro C., Searles R., Melville A., Ehler E., Jina N., Shah S., Pallas J., Hubank M., Dillard M., Schwartz R., Chien K., Oliver G., Riley P. (2009).

"Prox 1 maintains muscle structure and growth in the developing heart" *Dev* 136: 495-505.

Sanger J.W., Sanger J.M. (2002). "Myofibrillogenesis in Cardiac Muscle" en: Myofibrillogenesis, (ed. Dube, Dipak K.). Birkhäuser. pp. 3-20.

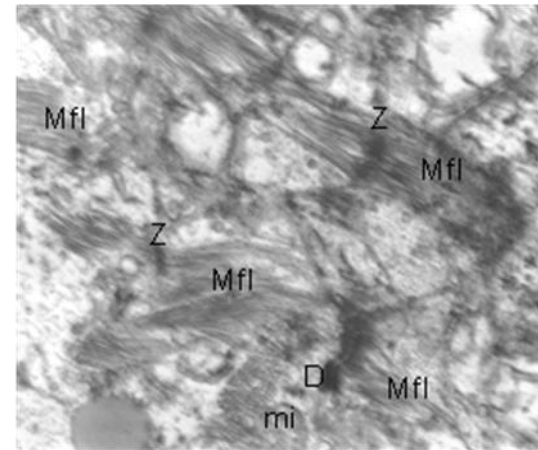
Sedmera D., Pexieder T., Vuillemin M., Thompson R., Anderson R. H. (2000). Developmental patterning of myocardium. *The anatomical record* 258:319-337.

Sommer J. R., Waugh R. A. (1978). Ultrastructure of heart muscle. *Environ Health Perspect* 26: 159-167.

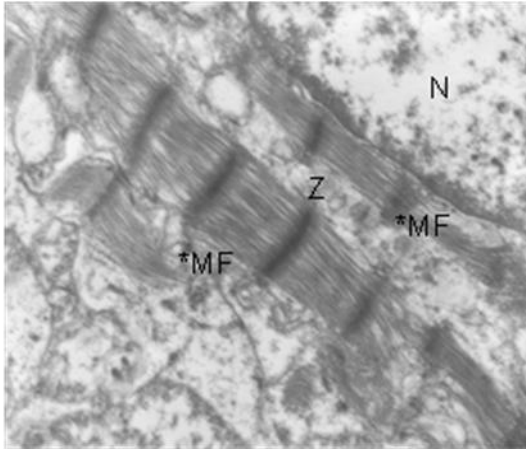
Tobita K., Liu L.J., Janczewski A.M., Tinney J.P., Nonemaker J.M., Augustine S., Stolz D.B., Shroff S.G., Keller B.B. (2006). "Engineered early embryonic cardiac tissue retains proliferative and contractile properties of developing embryonic myocardium" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: 1829-1837.

Watson M.L. (1958). "Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals" *J Biophys Biochem Cytol* 4: 475-478.

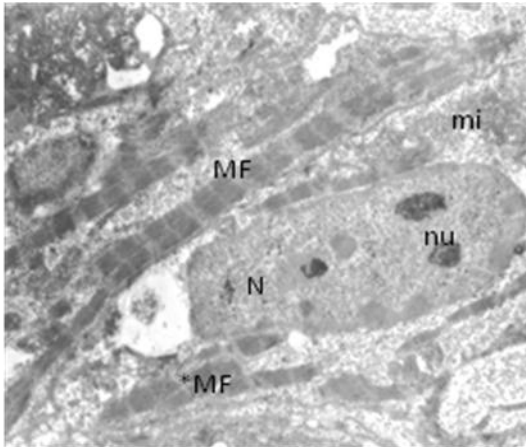
a



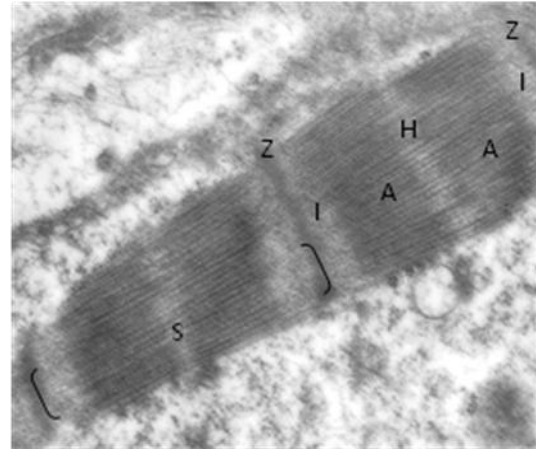
b



c



d



e

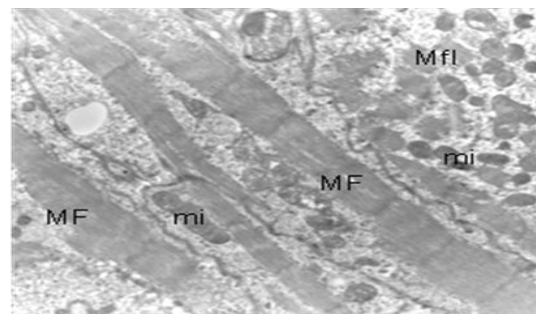
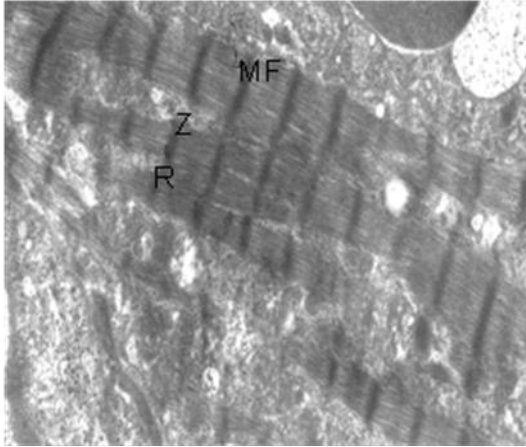
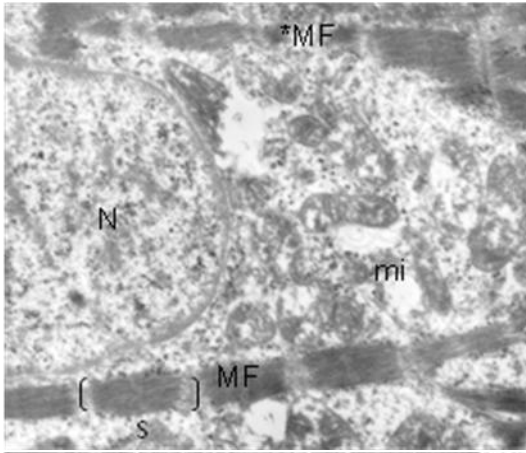


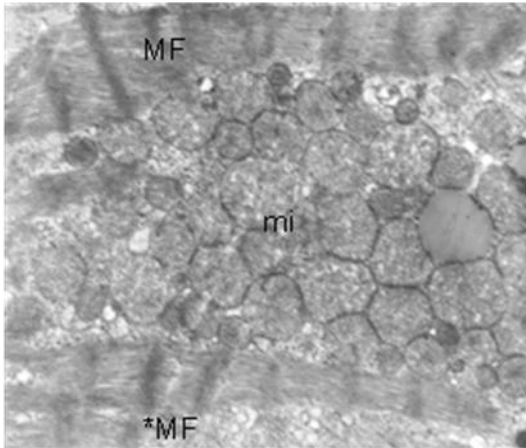
Figura 1. Desarrollo embrionario prenatal de cardiomiocitos de ratón. a y b, Cardiomiocitos de 17 días de desarrollo embrionario,15.000X. c, Cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario, 4.000X d, Miofibrilla con las estrías transversales que forman el sarcómero, 15.000X,. e, Cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario, 5.000X. Miofibrillas (MF), Miofibrillas en formación (*MF), Miofilamentos (Mfl), Mitocondrias (mi), Núcleo (N), Nucléolo (nu), Banda Z (Z), Banda I (I), Banda A (A), Banda H (H), Sarcómera (S).

30

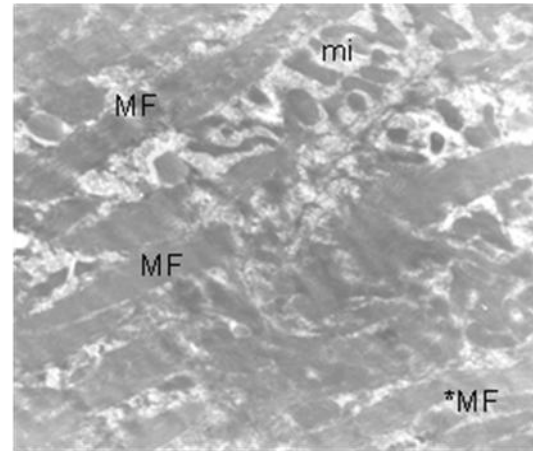
a



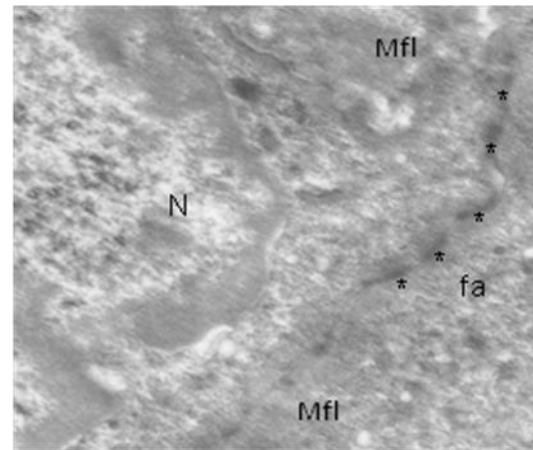
b



c



d



e

Figura 2. Desarrollo postnatal temprano en cardiomiocitos de ratón. a,Cardiomiocitos de 0 días de edad postnatal, 8.000X. b, Cardiomiocitos de 1 día de edad postnatal, 10.000X. c, Miofibrilla en formación con ramificaciones a partir de la banda Z, 3.000X. d, Cardiomiocitos de 3 días de edad postnatal, 3.000X. e, Fascia adherente en cardiomiocitos de 1 día de edad postnatal,10.000X. Miofibrillas (MF), Ramificación de las miofibrillas (R) Miofibrillas en formación (*MF), Miofilamentos (Mfl), Mitochondrias (mi), Banda Z (Z), Fascia adherente (*fa), Sarcómera (S).