

ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE APOPTOSIS EN CARDIOMIOCITOS MURINOS EN CULTIVOS HISTOTÍPICOS ROTATORIOS EN COMPARACIÓN CON CARDIOMIOCITOS *IN SITU*

N. Jaimes-Méndez ^{a*}, R.V. Mendoza-Briceño^b, S. Salmen^c, M. Colmenares-Sulbarán^b, Z. Peña-Contreras^b, D. Dávila-Vera^b

^aGrupo de Investigación en Biología Molecular y Genética, Universidad de Pamplona, Colombia,

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

^cInstituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

*Autor de Correspondencia, Email: najame3@hotmail.com Tlf: 5685303-5685304, ext. 243

Recibido: Marzo 2016. Aprobado: Noviembre 2016.

Publicado: Noviembre 2016.

RESUMEN

La apoptosis es un proceso biológico que se produce en el período embrionario como parte de la remodelación de tejidos. El objetivo del estudio fue determinar el porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos a los 21 días de desarrollo embrionario y 5 días a la edad postnatal, mediante el uso de cultivo histotípicos rotativo y compararla con tejido *in situ*, con el fin de proponer un cultivo histotípicos rotativo *in vitro*, como modelo para explorar el desarrollo del tejido cardíaco, así como la influencia de factores físicos, biológicos. Inicialmente, los fragmentos de tejido cardíaco se cultivaron durante 6 días a 70 rpm de rotación y bajo condiciones ambientales controladas. Seguidamente, se analizó la apoptosis por citometría de flujo y por microscopía electrónica de transmisión las características morfológicas como son encogimiento celular, desorganización de las miofibrillas y condensación nuclear en los cardiomiocitos. El porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos en cultivo histotípicos fue de 25,72% para E21 y de 14,5% para P5, porcentajes elevados en comparación con los obtenidos en el tejido *in situ* de cardiomiocitos E21 (5,7%). El aumento de la apoptosis de los cardiomiocitos en cultivo se puede atribuir a la ausencia de todas las condiciones fisiológicas presentes en el tejido *in situ*. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas entre ambas condiciones. Estos resultados sugieren que el cultivo histotípico rotativo podría ser una opción para el estudio de los cardiomiocitos y su apoptosis o crecimiento, y podría ser utilizado para explorar diferentes condiciones experimentales y efecto del ambiente sobre su desarrollo.

Palabras claves: Apoptosis, Cardiomiocitos, Cultivos Histotípicos

PERCENTAGE APPROXIMATION OF CARDIOMYOCYTES MURINE APOPTOSIS BY USING ROTARY HISTOTYPIC CULTURE COMPARED WITH CARDIOMYOCYTES *IN SITU*

ABSTRACT

Apoptosis is a biological process that occurs in the embryonic period as part of tissue remodeling. The aim of this study was to determine the percentage of apoptosis in cardiomyocytes after 21 days during the embryonic development and 5 days postnatal period, by using rotary histotypic culture and compare it with *in situ* tissue, in order to propose a rotary histotypic culture *in vitro* as model to explore the heart tissue development, and the influence of physical, biological events during their embryonic stage. Heart tissue fragments were cultured for 6 days in rotation at 70 rpm and under controlled environmental conditions. Flow cytometry analysis and morphological characterization by transmission electron microscopy, were performed and cell shrinkage, disorganization of myofibrils and, the nuclear condensation were explored. Our result shows, that the percentage of apoptotic cardiomyocytes in histotypic culture were 25.72% for E21 and 14.5% for P5, higher than those obtained in *in situ* cardiomyocyte E21 (5.7%) tissue. The apoptosis increase in cardiomyocyte culture could be attributed to the absence of all physiological conditions present in the *in situ* tissue. However, there was no statistical difference among both conditions. These results suggest that rotary histotypic culture could be an option for cardiomyocytes apoptosis and development studies, and could be used to explore several experimental conditions and the effect of the environment on its development.

Keywords: apoptosis, cardiomyocytes, rotary histotypic culture

INTRODUCCIÓN

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por observarse en células aisladas dispersas en el interior de un tejido y porque sigue procesos bien definidos, dependientes del tiempo, que dan lugar a cambios en la membrana plasmática, a la pérdida de la función mitocondrial, a la activación de proenzimas llamadas caspasas, que median la fragmentación del ADN, sin pérdida de la integridad de la membrana celular, los lisosomas permanecen intactos y no hay procesos inflamatorios o edematización, ya que las células apoptóticas son “fagocitadas” bien por las células vecinas o por macrófagos [1,2].

Las características mencionadas anteriormente se reflejan en cambios morfológicos generales que incluyen contracción o dilatación de la célula, pérdida de los contactos célula-célula, deformación y “emburbujamiento” de la membrana celular, condensación nuclear, fragmentación del ADN (escalera del ADN) y finalmente, ruptura de la célula en cuerpos apoptóticos que contienen tanto fragmentos nucleares como componentes citoplasmáticos, incluyendo organelas intactas. *In situ* los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células circundantes, sin involucrar una respuesta inflamatoria [1-3]. El rasgo más característico de las células apoptóticas es la condensación de la cromatina en forma de agregados ubicados periféricamente adosados a la parte interna de la membrana nuclear formando masas separadas de diversos tamaños y formas. A nivel bioquímico, la apoptosis se caracteriza por la degradación del ADN nuclear. El cual se escinde inicialmente en secciones de 50-300 kilobases de tamaño y posteriormente, se producen fragmentos nucleosomales y oligo-nucleosomales de bajo peso molecular de moléculas de ADN de aproximadamente 180 pares de bases o múltiplos de este, aunque el escalamiento del ADN no se produce en todos los casos de muerte celular por apoptosis [2,3].

El proceso de apoptosis en los miocitos cardíacos es de especial importancia en comparación con la apoptosis en otros tipos de células, debido a la especificidad estructural y funcional de la célula miocárdica, caracterizada por la particular distribución del núcleo, las miofibrillas y las mitocondrias en un alargado cuerpo celular. Mientras que los miocitos apoptóticos morfológicamente adquieren forma cuadrada, la cromatina se condensa y se distribuye en la periferia del núcleo y la estructura de las miofibrillas se altera parcialmente, perdiendo la banda Z. Posteriormente, la forma celular cambia a redonda con la superficie celular lisa y retraída al máximo, el núcleo se fragmenta, la cromatina se condensa, el citoplasma se retrae y las miofibrillas en él contenidas son difusas y con su estructura completamente modificada, las mitocondrias se retraen, se condensan y pueden contener en su interior cuerpos de aspecto rugoso. A partir de la membrana plasmática se producen evaginaciones con membranas lisas, a manera de exocitosis celular, que pueden contener fragmentos nucleares con cromatina condensada, mitocondrias y miofibrillas desorganizadas. Finalmente, se produce la fragmentación celular formando los cuerpos apoptóticos que al igual que las evaginaciones tienen membranas lisas, orgánulos subcelulares como mitocondrias condensadas y las miofibrillas desorganizadas [4].

Los reportes del porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos en cultivo referidos en diferentes estudios y con distintas metodologías son variables, por ejemplo en cultivos en placa de cardiomiocitos neonatales con máximo tiempo de cultivo de 5 días se reportan porcentajes de apoptosis de aproximadamente 4% por la técnica de TUNEL y entre 5 a 16 % por la técnica de IP, mientras que en cardiomiocitos adultos es de 15% por la técnica de TUNEL [4-7]. Esto puede ser debido a las diferentes condiciones del sistema de cultivo, o se puede

relacionar con la etapa de desarrollo de los cardiomiocitos, ya que se ha reportado que en corazón de rata la muerte por apoptosis aumenta en forma progresiva con la edad del animal y puede llegar a aumentar por diferentes condiciones patológicas [8]. Por ejemplo, en cardiomiocitos de rata neonatal expuestos a condiciones severas de hipoxia, por el método de TUNEL o marcado del extremo libre por dUTP por desoxi-transferasa terminal (por sus siglas en inglés *Terminal dUTP Nick End Labeling*), se determinó a las 24 horas un ~40% de células apoptóticas y de $12 \pm 3\%$ en los cardiomiocitos control [9]; mientras que con la misma metodología el porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos humanos *in situ* fue casi indetectable (~1%) [10].

Debido a que la apoptosis es un proceso biológico constante, que ocurre durante el desarrollo embrionario, su caracterización en los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios, es importante para utilizarlo como modelo *in vitro* de estudio del desarrollo del tejido cardíaco y además pudiera ayudar a establecer la influencia de factores biológicos, químicos o físicos sobre el tejido durante el desarrollo embrionario. Es así como el objetivo de este estudio fue determinar el porcentaje de apoptosis en cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario en Cultivos Histotípicos Rotatorios durante 6 días (*in vitro*) y compararlos con los porcentajes de apoptosis de los cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario (*in situ*) y de 5 días de desarrollo postnatal (*in situ*), esta última edad es equiparable a los 21 días de edad embrionaria más los 6 días de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tejido cardíaco

Las muestras de tejido se obtuvieron de ratones de cepas del Naval Medical Research Institute (NMRI), de edad embrionaria 21 días (E21) y 5 días de edad postnatal (P5), proporcionados por el Bioterio Central de la

Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Hembras de ratones con 21 días de gestación y ratones de 5 días de edad postnatal se anestesiaron con Ketamina® a una dosis de 240 mg/Kg-peso. A las hembras de ratones en gestación se les hizo una incisión abdominal para extraer los embriones. A cada ratón se le hizo una incisión a nivel del tórax para exponer y 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 [11]. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a lo establecido por el Comité de Bioética de la Universidad de Los Andes para el uso de animales en experimentación según las exigencias establecidas en las Normas para la Utilización de Animales en Investigación contenidas en el Código de Bioética y Seguridad del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONACIT, Caracas, Venezuela, 2002) [12] y en conformidad con las Normas establecidas por el NIH (National Institute of Health, USA) para el tratamiento ético de animales en laboratorios (1996) [13].

Cultivos Histotípicos Rotatorios (CHR)

Para la obtención de CHR se siguió el protocolo propuesto por Garber y Moscona [14], para ello los fragmentos de tejido cardíaco se colocaron en frascos Erlenmeyer conteniendo medio de incubación reconstituido con medio basal de Eagle con L- glutamina (79,5%), suero de caballo (10%), penicilina/estreptomicina, 5.000 U/mL/5.000 mg/mL (0,5%) y solución Tyrode (10%). El cultivo de los fragmentos íntegros se realizó por períodos de uno a seis días en incubación rotatoria a 70 rpm y en ambiente controlado con O₂ (95%) y CO₂ (5%), a 37°C. Durante el tiempo de incubación el medio se cambió cada 48 horas y se oxigenó cada 24 horas [15].

Microscopía Electrónica de Transmisión

Al finalizar cada período de incubación, los tejidos cultivados fueron fijados por un período de 1 a 2 horas en mezcla 3:3 (glutaraldehído 3% más formaldehído 3% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3) [16]. Después los fragmentos de tejido se lavaron con tampón cacodilato y se post-fijaron por 3 a 12 horas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% preparado en el mismo tampón cacodilato. Concluido este tiempo, fueron lavados con solución tampón y deshidratados en concentraciones ascendentes de alcohol etílico seguido de óxido de propileno, finalmente fueron infiltrados e incluidos en resina epoxídica. De los tejidos incluidos se hicieron secciones de 1 μm de espesor, las cuales fueron coloreadas con p-fenil-endiamina en solución acuosa al 1% (p/v). Secciones ultrafinas de 90 nm de espesor, fueron contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo para el análisis ultraestructural [17,18]. La microscopía electrónica también se utilizó para el análisis de la apoptosis en los cardiomiocitos *in vitro* e *in situ*. Las secciones fueron observadas en el microscopio electrónico Hitachi H-7000.

Obtención de Cardiomiocitos

Los cardiomiocitos citotípicos *in vitro* se obtuvieron a partir de cultivos primarios de cardiomiocitos de ratón E21 incubados durante 6 días [11]; mientras que para obtener los cardiomiocitos *in situ* de E21 y de P5 se extrajo el corazón, se hizo la disección del ventrículo izquierdo, se realizaron lavados con solución Tyrode libre de Ca^{++} y Mg^{++} , y se hicieron fragmentos de músculo cardíaco de aproximadamente 3mm^3 .

Posteriormente, para la obtención de las células se aplicó el protocolo propuesto por Chlopčiková y colaboradores [19]. Los fragmentos de tejido cardíaco se lavaron con solución Tyrode libre de Ca^{++} y Mg^{++} , se continuó con la disociación enzimática secuencial con tripsina al 0,2% en agitación a 37°C por 20 minutos, al finalizar el ciclo de incubación se realizó disociación mecánica, se tomó el

sobrenadante y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. El concentrado celular se transfirió a una placa de cultivo con medio de incubación reconstituido, se incubó a 37°C en ambiente controlado con O_2 (95%) y CO_2 (5%). Este procedimiento se repitió varias veces hasta disociar todo el tejido cardíaco [19].

Análisis de la Apoptosis por Citometría de Flujo

Para el análisis con citometría de flujo la suspensión celular se fijó con PAF al 0,3% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, las células se marcaron con 5 μl de anticuerpo monoclonal cadena pesada de la miosina cardíaca (abcam, ab15) durante 45 minutos a 4°C , se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 200 μl de PBS, BSA 0,1% y luego fueron teñidas con los anticuerpos secundarios, 2,5 μl de *donkey anti-mouse fluorescein* (FITC) durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad y 10 μl IP. La suspensión celular fue analizada en un citómetro de flujo FACSort mediante el programa CellQuest (Becton Dickinson). Fueron capturados 10.000 eventos y mediante un gráfico tipo “dot-plot”, se estableció la región donde se ubican los cardiomiocitos en un gráfico de FSC (*Forward scatter*) y las células positivas para la miosina-FITC. A partir de la población seleccionada se realizó un histograma donde fue determinada la distribución de las células en las diferentes etapas del ciclo celular.

Análisis Estadístico

Por citometría de flujo se calcularon los porcentajes de los cardiomiocitos en apoptosis y fases del ciclo celular (G0/G1, G2/M). Los resultados se examinaron aplicando el programa estadístico SPSS versión 15. Primero se realizó el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para valorar las diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de apoptosis y fases del ciclo celular en los cardiomiocitos *in vitro* y compararlas con los porcentajes de estos procesos biológicos presentes en los cardiomiocitos *in situ*. Posteriormente, se

hicieron comparaciones con la prueba de Dunnett. Los valores obtenidos se expresaron en promedio de media \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm DE$), tomando el 95% como índice de confiabilidad estadística ($p < 0,05$). Se compararon los resultados de los análisis estadísticos para determinar si existía o no diferencias significativas entre los porcentajes de apoptosis y fases del ciclo celular (G0/G1, G2/M) en los cardiomiocitos *in vitro* y los cardiomiocitos *in situ*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ultraestructura de los cardiomiocitos en cultivos histotípicos rotatorios (E21 *in vitro*)

Es de destacar que durante el desarrollo embrionario, en los cardiomiocitos las miofibrillas, las mitocondrias y las uniones celulares van cambiando su conformación progresivamente, observándose estructuras en diferentes grados de desarrollo al compararlas con la ultraestructura del cardiomiocito adulto. En la etapa embrionaria las miofibrillas no están concentradas en masas confluentes, sino que en la mayoría de los casos están separadas por el espacio citoplasmático definiendo en ocasiones un espacio interfibrilar irregular [20].

El estudio ultraestructural del miocardio de edades embrionarias en los primeros días de cultivo revela que el cambio más importante se observa en la estructura y desarrollo del complejo multiprotéico o miofibrillas, que son las estructuras fundamentales para la funcionalidad de los cardiomiocitos. Los miofilamentos están dispersos en el citoplasma y orientados en diferentes direcciones y a medida que aumenta el tiempo de cultivo, específicamente a partir del día 3, se presenta un avance en la organización de los miofilamentos, que están formados por aparentes filamentos de actina y miosina alineados por un disco Z; sin embargo, en algunos casos se mantiene la disposición irregular de los miofilamentos. Al transcurrir mayor tiempo de cultivo se nota un aumento en el número de las miofibrillas y se observan

miofibrillas ramificadas a partir de la banda Z y con mayor número de unidades sarcoméricas. Este progreso en la organización de los miofilamentos se muestra en las figuras 1 y 2. Chacko en 1976, describe que la ramificación de las miofibrillas ocurre en embriones de ratas de 13 días, iniciándose principalmente en las regiones del disco Z y en algunos casos muestran una configuración en forma de Y o X, con puntos de inserción en el disco Z. Cabe considerar, por otra parte, que en las miofibrillas de los cardiomiocitos de 21 días de desarrollo embrionario en Cultivos Histotípicos Rotatorios, se pueden identificar las estriaciones transversales de las sarcómeras, formando lo que ultraestructuralmente se conoce como bandas Z, A, I, H y una pseudobanda M [21]. El inicio de la organización sarcomérica se evidencia a partir del día 3 de cultivo hasta formar a los 6 días de cultivo, una estructura sarcomérica bien definida.

En los CHR de cardiomiocitos de ratón E21 también se observan las características fenotípicas de sus homólogas *in situ* (Figs. 1, 2), determinadas por una citoarquitectura organizada, con sus componentes principales, como es la presencia de miofibrillas intercaladas con líneas de mitocondrias siguiendo al eje longitudinal de la célula y uniones celulares que posiblemente son las precursoras de los complejos discos intercalares. Así mismo, en estos cardiomiocitos de E21 en cultivo se evidencian esbozos del sistema de los túbulos T. Chacko en 1976, reporta que en rata los túbulos T empiezan a aparecer en el miocardio de 11 días de desarrollo embrionario [21]. Estudios más recientes describen que algunas células cardíacas, en las cuales se incluyen miocitos ventriculares de animales embrionarios, no tienen sistema de túbulos T o tienen un sistema muy escaso que se desarrolla durante las primeras semanas de vida, así mismo, reportan que los miocitos que se mantienen en cultivo pierden la estructura de los túbulos T [22,23].

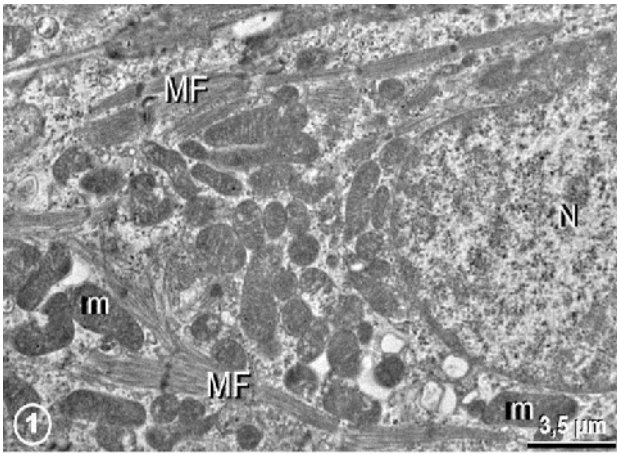


Fig. 1. Cardiomiocito de ratón E21 proveniente de un cultivo histotípico rotatorio incubado durante 6 días. Se observa una célula miocárdica elongada, con aspecto citológico dentro de los parámetros normales, con presencia de miofibrillas (MF) organizadas y abundantes mitocondrias (m). N, núcleo.

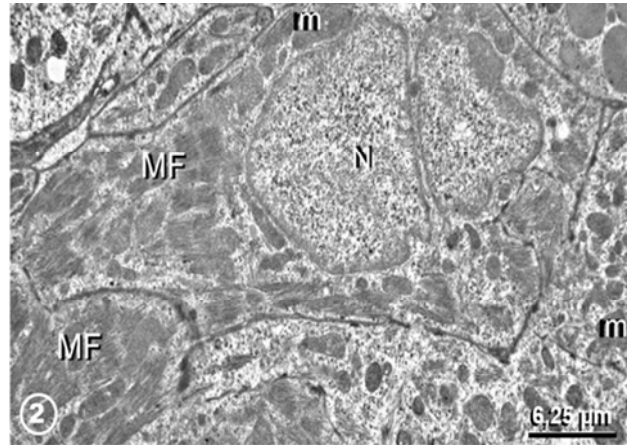


Fig. 2. Segmento de tejido miocárdico de ratón E21 cultivado durante 6 días, donde se observa la binucleación en un cardiomiocito con características fenotípicas. MF, miofibrillas; m, mitocondrias; N, núcleo.

Las mitocondrias en los cardiomiocitos en CHR están presentes en gran número, con formas y tamaños variados. En los primeros días de cultivo están dispersas en todo el citoplasma, pero a medida que avanza el tiempo de cultivo y las miofibrillas se disponen siguiendo al eje longitudinal de la célula, las mitocondrias se distribuyen de la misma forma y muy cerca de las sarcómeras, de manera semejante a la descripción hecha por Navaratnam y colaboradores [24] en los cardiomiocitos de embriones de ratón 9 de días de edad, quienes refieren que aumenta el número de mitocondrias y estas tienden a estar concentradas entre las miofibrillas.

In situ en edades embrionarias algunos cardiomiocitos son binucleados y en edades postnatales, según lo reportado [25], aumenta la frecuencia de binucleación, considerándose que la mayoría de los miocitos adultos son binucleados [26- 28]. En ratones y ratas, la presencia de los cardiomiocitos binucleados comienza alrededor del día 4 postnatal y a la tercera semana postnatal el 85-90% de los cardiomiocitos son binucleados [26]. *In vitro* generalmente, el núcleo de los cardiomiocitos se observa de forma redonda a elongada, en ocasiones con bordes irregulares; además, es posible observar algunas células

binucleadas así como núcleos con dos o más nucléolos, lo cual puede estar relacionado con el momento celular de la actividad de síntesis proteica.

Apoptosis en cardiomiocitos en cultivos histotípicos rotatorios

Al analizar por microscopía electrónica de transmisión el proceso de apoptosis en cardiomiocitos E21 en CHR, se observan células redondeadas, retraídas y con desorganización de la citoarquitectura, aunque no se logró visualizar condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, “emburbujamiento” del sarcolema, ni formación de cuerpos apoptóticos que aparecen posterior a la fragmentación celular, características apoptóticas descritas por algunos investigadores [1,3]. En las figuras 3 y 4 se muestran cardiomiocitos contraídos que han cambiado su forma alargada a un aspecto redondeado, el borde celular es liso, en el citoplasma se ven miofibrillas parcialmente desorganizadas, mitocondrias retraída el núcleo también muestra signos de condensación, características estas que se observan en la fase inicial del proceso de apoptosis, de acuerdo a lo descrito por Maruyama y colaboradores [4].

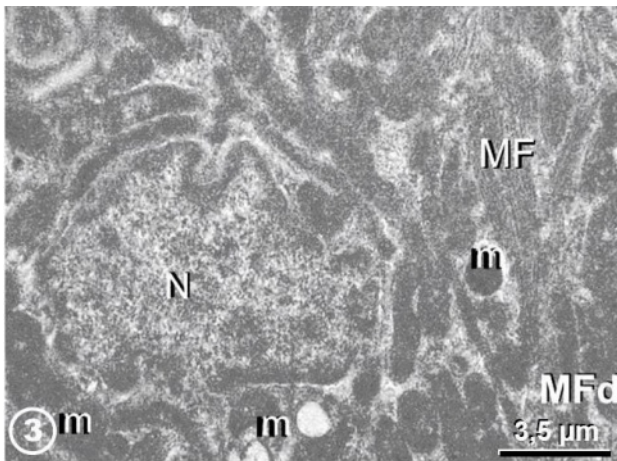


Fig. 3. Fase apoptótica inicial en cardiomiocito de ratón E21 después de 6 días de incubación *in vitro*. Se observa que la miocélula tiende a hacerse redondeada y con signos de retracción celular indicada por condensación nuclear, mitocondrias (m) contraídas y miofibrillas (MF) desorganizadas (MFd). N, núcleo.

El análisis del ciclo celular realizado con citometría de flujo revela que para los cardiomiocitos E21 *in situ* el 32,8% de la población celular se encuentra en fase G0/G, 26,51% en S y 34,3% en G2/M. Para los cardiomiocitos E21 *in vitro* 45,08% de la población celular se encuentra en fase G0/G, 19,34 % en S y 7,55% en G2/M y para P5 *in situ* el 37,3% de la población celular se encuentra en fase G0/G, 23,6 % en S y 22,4% en G2/M (Tabla 1, Figura. 5).

Los histogramas indican el número de células frente al contenido de ADN en células que están en apoptosis (Apo) y en fase G0/G1 (2n) o S/M (4n) del ciclo celular. Como se puede evidenciar, una alta población de cardiomiocitos se encuentra en G0/G1 tanto en condiciones *in situ* como *in vitro*, lo cual puede estar relacionado con la detención del ciclo celular de estas células diferenciadas, como ha sido planteado por varios autores, entre los que se pueden mencionar a Ahuja y colaboradores [26].

Por otra parte el porcentaje de células que se encuentran en fase S se puede relacionar con la particularidad que, aunque la población de cardiomiocitos en su mayoría está diferenciada aún mantiene un porcentaje de células

(≈12%) que están ingresando al ciclo celular, evento que puede ser observado durante los primeros 5 días postnatales, como lo refieren Soonpaa y Field [29]. En el caso particular de los cardiomiocitos en CHR (E21), se puede decir que presentan un menor porcentaje de síntesis de ADN (≈19,34%) si se comparan con los porcentajes de E21 y P5 *in situ*, a pesar que diversos autores reportan que a mayor desarrollo embrionario menor es el porcentaje de síntesis de ADN [27,29].

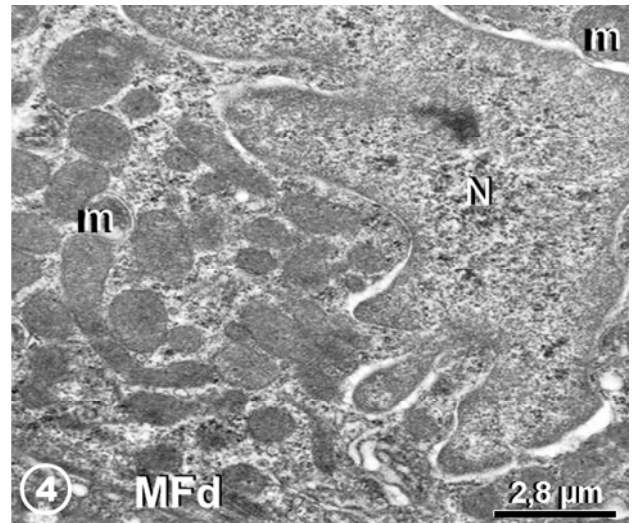


Fig. 4. Estadío más avanzado de apoptosis en cardiomiocitos de tejido miocárdico de ratón E21, cultivado por 6 días. Además de la desorganización de las miofibrillas (MFd) y de la condensación nuclear, es evidente la marcada presencia de invaginaciones y evaginaciones del contorno del núcleo (N) y el aumento del espacio perinuclear. m, mitocondrias.

Tabla 1. Porcentaje de apoptosis y fases del ciclo celular en cardiomiocitos *in situ* e *in vitro*.

Cardiomiocitos	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
P5 <i>in situ</i>	14,5	37,3	23,66	22,4
E21 <i>in situ</i>	5,7	32,8	26,51	34,3
E21 <i>in vitro</i>	25,72	45,08	19,34	7,55

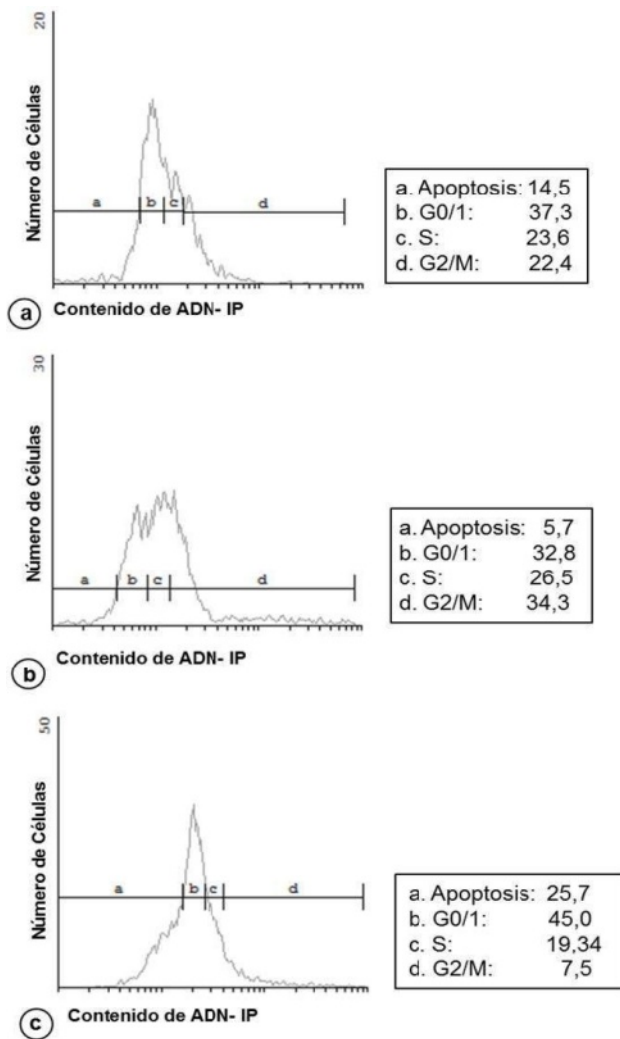


Fig. 5. Cuantificación de cardiomiocitos en las diferentes fases del ciclo celular. a, Porcentaje de cardiomiocitos P5 *in situ*. b, Porcentaje de cardiomiocitos E21 *in situ*. c, Porcentaje de cardiomiocitos E21 *in vitro*.

La disminución observada en el porcentaje de síntesis de ADN y el aumento en el porcentaje de la apoptosis en los cardiomiocitos E21 *in vitro* (Tabla 1) puede atribuirse a la influencia de las condiciones de cultivo, como es la interacción de otros grupos celulares donde intervienen importantes factores de señalización indispensables para mantener el funcionamiento celular, a pesar que muestran características fenotípicas propias del tejido, como se observó con el análisis ultraestructural.

El análisis del contenido de ADN de las células mediante la activación de la fluorescencia en el FACSort después de la tinción con IP, mostró tasas de apoptosis de 5,7%

en los cardiomiocitos E21 *in situ*, 25,72% en cardiomiocitos E21 *in vitro* y 14,5% en cardiomiocitos P5 *in situ* (Figura 3). Mientras que el porcentaje de la población de cardiomiocitos que se encuentran en la fase S es de 26,51% para los cardiomiocitos E21 *in situ*, 19,34% en cardiomiocitos E21 en cultivo y 23,6 % en cardiomiocitos P5 *in situ*, el porcentaje restante corresponde a las células en G0/G1 y G2/M.

En cuanto a los porcentajes de apoptosis en los cardiomiocitos en CHR E21 ($\approx 25,72\%$) y P5 ($\approx 14,5\%$) son relativamente altos en comparación con los obtenidos en los cardiomiocitos E21 *in situ* ($\approx 5,7\%$). Hay autores que aportan cifras hasta de 16% de apoptosis en cardiomiocitos de rata neonatal en cultivos en placa [30]. Sin embargo, este resultado y los nuestros contrastan con lo reportado por Wang y colaboradores en cultivos en placa de cardiomiocitos de ratón neonatal ($\approx 4\%$) y por Adachi y colaboradores ($\approx 12\%$) y por Long y colaboradores ($\approx 4,3\%$) en cultivos en placa de cardiomiocitos de rata neonatal [5,7,9].

La apoptosis es un proceso permanente en el ciclo de vida de los organismos, que se inicia durante el remodelado de estructuras embrionarias y que continúa como un proceso fisiológico y puede aumentar en condiciones patológicas en general [8] o inflamatorias en particular [1, 7, 10]. Los datos de apoptosis en los cardiomiocitos *in situ* expresan que a mayor desarrollo embrionario mayor es el porcentaje de apoptosis y la diversidad de los datos puede deberse a las condiciones de cada cultivo de referencia y a la especificidad y sensibilidad de la técnica empleada (IP o TUNEL).

Por otra parte, el incremento de la apoptosis en los cardiomiocitos E21 en cultivos puede atribuirse a la ausencia de algunas condiciones fisiológicas que se dan *in situ* (interacciones celulares, presión arterial, mecanismos de señalización intracelular, entre otros).

Para determinar si existía o no diferencias en los porcentajes de apoptosis y las fases del ciclo celular (G0/G1, G2/M) entre los cardiomiocitos en cultivo y los porcentajes presentes de éstos parámetros en los cardiomiocitos *in situ*, se utilizó ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los resultados muestran un $p(0,063)$ para la apoptosis y un $p(0,328)$ para la fase G0-G1, revelando que no existen diferencias significativas en los valores promedios (%) de apoptosis y fase G0-G1 en los cardiomiocitos en CHR en comparación con los cardiomiocitos de edad embrionaria E21 y postnatal P5, pero sí existen diferencias significativas $p(0,02)$ entre los valores promedio (%) de los cardiomiocitos en fase G2-M en Cultivos Histotípicos Rotatorios y los cardiomiocitos embrionarios y postnatales (Tabla 2). Posteriormente, se realizó la prueba de Dunnett en los valores promedio donde existen diferencias significativas, en este caso para la fase G2/M $p(0,01)$ en los cardiomiocitos E21 tanto *in vitro* como *in situ* (Tabla 3).

Tabla 2. Comparación de los promedios \pm DE de las etapas del ciclo celular en cardiomiocitos E21 *in vitro* y E21 y P5 *in situ*, utilizando ANOVA

Cardiomiocitos	Promedios \pm DE	p	
Apoptosis (%)	Cultivo Histotípico Rotatorio (E21)	25,72 \pm 0,00	
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (E21)	5,70 \pm 3,35	0,063
	Edad postnatal <i>in situ</i> (P5)	14,50 \pm 8,04	
G0-G1 (%)	Cultivo Histotípico Rotatorio (E21)	45,08 \pm 0,00	
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (E21)	32,83 \pm 0,24	0,328
	Edad postnatal <i>in situ</i> (P5)	37,34 \pm 11,80	
G2-M (%)	Cultivo Histotípico Rotatorio (E21)	7,55 \pm 0,00	
	Edad embrionaria <i>in situ</i> (E21)	34,30 \pm 0,76	0,02
	Edad postnatal <i>in situ</i> (P5)	22,43 \pm 3,21	

La lectura del análisis estadístico indica que el modelo de CHR no altera en los cardiomiocitos el proceso de apoptosis ni las fases del ciclo celular G0/G1 y S; además que, el comportamiento de estos parámetros biológicos es

muy similar al de los cardiomiocitos *in situ*, por lo tanto se puede decir que este modelo de cultivo es estable y reproducible para evaluar la influencia de diversos factores en el proceso de apoptosis, pero no lo es para evaluar el proceso de proliferación que culmina con la división celular, ya que los cardiomiocitos en CHR se detienen antes de la fase G2/M, o una escasa población alcanza esta fase; es decir que aunque los cardiomiocitos en los CHR son viables y expresan las características fenotípicas propias del tejido cardíaco, no culminan la proliferación celular, evento que sí se da en los cardiomiocitos *in situ*.

Tabla 3. Comparaciones múltiples de las etapas del ciclo celular utilizando la Prueba de Dunnett

Modelo de cultivo	G2-M (%)	Diferencia de Medias	p
Cultivo Rotatorio E21 (7,55)	Edad embrionaria <i>in situ</i> E21 (34,30)	26,7500*	0,01
	Edad postnatal <i>in situ</i> P5 (22,43)	14,8850*	0,07

*La diferencia de medias es significativa $< 0,05$

CONCLUSIONES

En los cardiomiocitos en Cultivos Histotípicos Rotatorios se evidenció una diferenciación progresiva de su citoarquitectura que se inicia a los 3 días de cultivo y finaliza a los 6 días de cultivo. Las miofibrillas presentaron las estriaciones transversales de las sarcómeras, formando lo que se conoce ultraestructuralmente como bandas Z, A, I, H y con menor evidencia la banda M (pseudobanda M), las miofibrillas se encontraron intercaladas con líneas de mitocondrias y además, se observaron uniones celulares, esbozos del sistema de túbulos T y binucleación, características fenotípicas de los cardiomiocitos *in situ*, mostrando mayor semejanza con los cardiomiocitos P5.

En los CHR de cardiomiocitos E21 se determina un mayor porcentaje de apoptosis (25,72%) comparado con los presentes en los cardiomiocitos E21 (5,7 %) y P5 *in situ* (14,5%); sin embargo, el análisis estadístico nos indica que no hay diferencias significativas entre las evidencias de este proceso biológico en cardiomiocitos en cultivo e *in situ*, por tal razón este sistema de cultivo se presenta como una opción para el estudio de la apoptosis en diferentes condiciones experimentales.

Por otro lado, hay una alta población de cardiomiocitos en fase estacionaria del ciclo celular (G0/G1) o próximos a entrar en la fase de síntesis (S) tanto en CHR como en los cardiomiocitos E21 y P5 *in situ* (45,0; 32,8; 37,3 %, respectivamente), promedios en los cuales estadísticamente no hay diferencias significativas. Estos resultados pueden estar relacionados con la característica de los cardiomiocitos de ser células terminalmente diferenciadas y de permanecer realizando sus funciones en fase G0; además los cardiomiocitos tienden a disminuir su capacidad de proliferación a medida que avanza el desarrollo embrionario y la mantienen en menor proporción en los primeros días postnatales.

El modelo de CHR de cardiomiocitos propuesto en este trabajo, es un sistema estable y reproducible para el estudio del proceso de apoptosis pero no para el proceso de proliferación que termina en la división celular, ya que estadísticamente hay diferencias significativas en la fase del ciclo celular G2/M entre los cardiomiocitos del modelo de CHR E21 y los cardiomiocitos E21 y P5 *in situ*, pero no hay diferencias significativas en el proceso de apoptosis entre los cardiomiocitos en cultivo y los *in situ*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por las siguientes instituciones: Universidad de Pamplona, Colombia y

Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela con el proyecto M-948-08-03 del CDCHTA.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cook S.A., Poole-Wilson P.A. (1999). Cardiac myocyte apoptosis. *Eur Heart J.* 20: 1619-1629.
- [2] Elliott MR, Ravichandran KS. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. (2016). *Dev Cell.* 25:147-60.
- [3] Xu XY, Nie XC, Ma HY, Song GQ, Zhang XT, Jin YN, Yu YQ. (2014). Flow Cytometry Method Analysis of Apoptosis: No Significant Difference Between EDTA and EDTA-free Trypsin Treatment Procedure. *Technol Cancer Res Treat.* 14: 237-41.
- [4] Maruyama R., Takemura G., Aoyama T., Hayakawa K., Koda M., Kawase Y., Qiu X., Ohn, Y., Minatoguchi S., Miyata K., Fujiwara T., Fujiwara H. (2001). Dynamic process of apoptosis in adult rat cardiomyocytes analyzed using 48-hour videomicroscopy and electron microscopy. *Am J Pathol.* 159: 683-691.
- [5] Mehta A.K., Gracias D.T., Croft M. (2016). TNF activity and T cells. *Cytokine.* S1043-4666:30450-1.
- [6] Webster K.A., Discher D.J., Kaiser S., Hernández O., Sato B., Bishopric N.H. (1999). Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J Clin Invest.* 104: 239-252.
- [7] Long X., Boluyt M.O, Hipolito M.L., Lundberg M.S., Zheng J.S., O'Neill L., Cirielli C., Lakatta E.G., Crow M.T. (1997). p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 99: 2635-2643.
- [8] Nadal-Ginard B. (2001). Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: Futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev Esp Cardiol.* 54: 543-550.

- [9] Adachi S., Ito H., Tamamori-Adachi M., Ono Y., Nozato T., Abe S., Ikeda Ma., Marumo F., Hiroe M. (2001). Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res.* 88: 408-414.
- [10] Dorn G.W. (2009). Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodeling. *Cardiovasc Res.* 81: 465-473.
- [11] Jaimes-Méndez N., Peña-Constreras Zulma., Dávila-Vera D., Colmenares-Sulbarán M., Mendoza-Briceño R. V. (2010). Análisis ultraestructural de cardiomiocitos embrionarios y postnatales de ratón en cultivos histotípicos. *Acta Microsc.* 19: 232-241.
- [12] *Código de Bioética y Bioseguridad.* (2002). 2ª Edición. Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Caracas, Venezuela.
- [13] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* (1996). National Academy Press. Washington, DC, USA.
- [14] Garber B.B, Moscona A. A. (1972). Reconstruction of brain tissue from cell suspensions. I. Aggregation patterns of cells dissociated from different regions of the developing. *Develop Biol.* 27: 217-234.
- [15] Palacios-Prü E.L., Mendoza R.V., Palacios L. (1982). *In vitro* development of chick hypothalamic neurosecretory cell. *Dev Brain. Res* 4: 79-90.
- [16] Palacios-Prü E.L., Mendoza-Briceño R.V. (1972). An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Res.* 36: 404-408.
- [17] 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.
- [18] Watson M.L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol.* 4: 475-478.
- [19] Chlopčiková S., Psotová J., Miketová P. (2001). Neonatal rat cardiomyocytes: A model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed Papers.* 145: 49-55.
- [20] Jaimes-Méndez N., Peña-Constreras Zulma., Dávila-Vera D., Colmenares-Sulbarán M., Mendoza-Briceño R. V. (2011). Ultraestructura de las miofibrillas en cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario tardío y postnatal temprano de ratón. *Bistua.* 9(2): 21-30.
- [21] Chacko K.J. (1976). Observation on the ultrastructure of developing myocardium of rat embryos. *J Morphol.* 150: 681-709.
- [22] Brette F., Orchard C. (2003). T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res.* 92: 1182-1192.
- [23] Guo A., Zhang C., Wei S., Chen B., Song L.S. (2013). Emerging mechanisms of T-tubule remodelling in heart failure. *Cardiovasc Res.* 98:204-15
- [24] Navaratnam V., Kaufman M.H., Skepper J., Barton S., Guttridge K.M. (1986). Differentiation of the myocardial rudiment of mouse embryos: An ultrastructural study including freeze-fracture replication. *J Anat.* 146: 65-85.
- [25] Rohr S., Schölly D.M., Kléber A.G. (1991). Patterned growth of neonatal rat heart cells in culture. Morphological and electrophysiological characterization. *Circ Res.* 68: 114-130.
- [26] Ahuja P., Sdek P., Maclellan W.R. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease and regeneration. *Physiol Rev.* 87: 521-544.
- [27] Raulf A., Horder H., Tarnawski L., Geisen C., Ottersbach A., Röhl W., Jovinge S., Fleischmann BK., Hesse M. (2015). Transgenic systems for unequivocal identification of cardiac myocyte nuclei and analysis of cardiomyocyte cell cycle status. *Basic Res Cardiol.* 110: 33.

- [28] Diez C., Simm A. (1998). Gene expression in rod shaped cardiac myocytes, sorted by flow cytometry. *Cardiovasc Res.* 40: 530-537.
- [29] Richardson GD. (2016). Simultaneous Assessment of Cardiomyocyte DNA Synthesis and Ploidy: A Method to Assist Quantification of Cardiomyocyte Regeneration and Turnover. *J Vis Exp.* 23; doi: 10.3791/53979.
- [30] Ichinose M., Yonemochi H., Sato T., Saikawa T. (2003). Diazoxide triggers cardioprotection against apoptosis induced by oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284: 2235-2241.