

IV.C.1.1.2. Composición proteica de las fracciones subcelulares tras el tratamiento

Las proteínas de las diferentes fracciones subcelulares una vez aisladas, fueron separadas electroforéticamente en alícuotas de 15 μg y se determinó la proporción de cada proteína que formaba parte de 15 μg de proteínas totales citoplasmáticas ó citoesqueléticas (Tabla XXXIII).

La desmina citoplasmática aumenta un 9% con respecto al control en los cultivos tratados con bezafibrato y un 13% en los tratados con fenofibrato y gemfibrozilo. La vimentina citoplasmática se observa disminuida en un 8% en los cultivos tratados con bezafibrato y gemfibrozilo, en cambio los cultivos tratados con fenofibrato se observa unos valores más cercanos al de los controles.

En lo referente a la fracción citoesquelética subcelular, se observa que en todos los cultivos tratados con fármacos la desmina citoesquelética se encuentra incrementada con respecto a los controles, éste incremento está comprendido entre el 81-87% en todos los fármacos ensayados. En el caso de la vimentina citoesquelética se observan valores similares a los controles en los cultivos tratados con bezafibrato, en los tratados con gemfibrozilo los valores disminuyen un 9% con respecto a los controles y éste descenso es del 16% en los cultivos tratados con fenofibrato.

Cuando observamos la influencia de los fármacos sobre el contenido de estas proteínas (desmina y vimentina) en la masa celular en cultivo (Tabla XXXIV), se observan valores muy similares de la desmina citoplasmática en los cultivos controles y en los cultivos tratados con fenofibrato y gemfibrozilo, en cambio en los que han sido tratados con

bezafibrato se observa un incremento del contenido citoplasmático de desmina de un 24%; el contenido de desmina citoplasmática por célula viva en cultivo es similar en el caso de los controles y de los cultivos tratados con fenofibrato y gemfibrozilo, los tratados con bezafibrato experimentan un incremento del 24% del contenido citoplasmático de desmina celular con respecto a los cultivos controles. En la vimentina citoplasmática se observan niveles similares en los controles y los cultivos tratados con bezafibrato (un 5% superior a los controles), los tratados con fenofibrato y gemfibrozilo experimenta un descenso con respecto a los controles de un 13% en su contenido de vimentina citoplasmática; con respecto al contenido de vimentina citoplasmática por célula viva en cultivo, se observa valores semejantes entre los controles y los cultivos tratados con bezafibrato, experimentando un descenso del 14% en el caso de las células tratadas con fenofibrato y gemfibrozilo.

Cuando observamos los resultados correspondiente al citoesqueleto de la masa celular en cultivo, encontramos un incremento de la desmina citoesqueletal de todos los cultivos tratados con fármacos con respecto a los cultivos controles, así este incremento es del 92% en los cultivos tratados con bezafibrato y del 109% en los que han sido tratados con fenofibrato, el incremento es menor (41%) en el caso de los cultivos tratados con gemfibrozilo; el contenido de desmina en el citoesqueleto por célula en cultivo se observa un incremento cercano al 130% en el caso de los cultivos tratados con bezafibrato y fenofibrato, siendo el incremento del 50% en las células tratadas con gemfibrozilo. En el contenido de vimentina citoesqueletal se observan valores semejantes en los controles y en los cultivos tratados con bezafibrato, los cultivos que han sido tratados con fenofibrato experimentan un leve descenso del 6%, en cambio en los cultivos que han sido tratados con gemfibrozilo este descenso es del 30%; en lo referente al contenido de vimentina citoesqueletal por célula en cultivo, los valores son similares en los controles en las células tratadas

con bezafibrato e inferiores en un 14% y 28% respectivamente para las células tratadas con fenofibrato y gemfibrozilo.

IV.C.1.2. Tratamiento durante 24 horas

IV.C.1.2.1. Concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo tras 24 horas de tratamiento

Tras 24 horas en contacto de los miocardiocitos en cultivo con los fármacos a una concentración en el medio de cultivo igual a la dosis terapéutica en el plasma sanguíneo, se recogen las células y después de la homogeneización, se realiza el fraccionamiento subcelular; a continuación se procedió a la determinación de la concentración proteica (mg/ml) de cada una de las muestras recogidas (Tabla XXXV).

Cuando se determina la concentración proteica del homogenado de cada uno de los cultivos, se observa un descenso en la concentración proteica de todos los cultivos tratados con fármacos con respecto a la concentración proteica obtenida en el cultivo control; la disminución es más significativa en los cultivos tratados con bezafibrato que disminuye un 23%, que la observada para el fenofibrato (16%) y para el gemfibrozilo (11%). El contenido proteico por célula viva en cultivo, se encuentra disminuido en todas las células tratadas con fármacos con respecto a los cultivos controles, dicha disminución es del 11% en las células tratadas con gemfibrozilo, del 16% para las tratadas con fenofibrato y aún mayor, del 23%, para las tratadas con bezafibrato.

La concentración proteica obtenida en las fracciones citoplasmáticas de los distintos cultivos tratados con fármacos es ligeramente inferior que la obtenida en el cultivo

control, siendo ésta disminución similar para los 3 fármacos ensayados y esta disminución sólo representa un valor del 5%. El contenido de proteínas citoplasmáticas por célula son similares en los controles y en las células tratadas con los fármacos.

La concentración proteica del citoesqueleto también se encuentra disminuida en un 20%, con respecto al valor del cultivo control en aquellos cultivos que han sido tratados con bezafibrato; en cambio se observa un aumento en la concentración proteica del citoesqueleto cuando los cultivos son tratados con fenofibrato (17%) o gemfibrozilo (8%). El contenido proteico del citoesqueleto celular se encuentra incrementado en un 7% y un 17% en las células tratadas con gemfibrozilo y fenofibrato respectivamente con respecto a las células controles, en cambio la cantidad observada en las células tratadas con bezafibrato se encuentra disminuidas un 21% con respecto a los controles.

IV.C.1.2.2. Composición proteica de las fracciones subcelulares tras el tratamiento

Una vez aisladas y separadas electroforéticamente las proteínas de las fracciones subcelulares, se determinó la proporción de proteínas de filamentos intermedios (desmina y vimentina) que forman parte de 15 µg de proteínas totales citoplasmáticas ó citoesqueléticas (Tabla XXXVI).

La desmina citoplasmática se encuentra en valores similares en los cultivos controles y en los cultivos tratados con gemfibrozilo, observándose una disminución del 8% en los cultivos tratados con fenofibrato y encontramos un aumento del 7% en las tratadas con bezafibrato. La vimentina citoplasmática se encuentra en valores similares en los cultivos controles y los tratados con gemfibrozilo, los cultivos tratados con fenofibrato

manifiestan un descenso del 13% y las que han estado en contacto con el bezafibrato manifiestan un aumento del 7% con respecto a los controles.

La fracción citoesquelética de desmina en los cultivos celulares es semejante en los cultivos controles y en los tratados con fenofibrato, los tratados con bezafibrato y gemfibrozilo manifiestan un incremento cercano al 10% con respecto a los cultivos controles. Los valores de vimentina del citoesqueleto se encuentran disminuidos en todos los cultivos tratados con fármacos con respecto a los cultivos controles, esta disminución es del 18% en el caso de los cultivos tratados con bezafibrato, del 27% para los tratados con gemfibrozilo y del 30% para los cultivos tratados con fenofibrato.

Cuando observamos la influencia de los fármacos en el contenido de desmina y vimentina de las fracciones subcelulares de la masa celular en cultivo (Tabla XXXVII), observamos que la desmina citoplasmática presentan valores muy semejantes en los controles y en los cultivos tratados con bezafibrato y gemfibrozilo y se encuentra disminuida un 13% en los cultivos tratados con fenofibrato; en lo referente al contenido de desmina citoplasmática por célula, son similares para las células controles y las tratadas con bezafibrato y gemfibrozilo (un 6% menor) y es un 13% inferior para las células tratadas con fenofibrato. El contenido de vimentina citoplasmática de la masa celular son similares en los controles y los cultivos tratados con bezafibrato y gemfibrozilo, siendo un 18% menor en los cultivos tratados con fenofibrato con que en los controles; el contenido de vimentina citoesquelética por célula son similares en los controles y las células tratadas con bezafibrato y gemfibrozilo, siendo un 18% inferior en las células tratadas con fenofibrato.

El contenido de la desmina citoesquelética de la masa celular es inferior en un 13% para los cultivos tratados con

bezafibrato con respecto a los cultivos controles y se encuentra aumentada en un 19% en el caso de los cultivos tratados con fenofibrato y gemfibrozilo; el contenido de desmina citoesquelética por célula se observa disminuido (14%) en las células tratadas con bezafibrato con respecto a las células controles y aumentado en un 21% en las células tratadas con fenofibrato y gemfibrozilo. La vimentina del citoesqueleto de la masa celular en cultivo se encuentra disminuido en todos los cultivos tratados con fármacos con respecto a los cultivos controles, siendo esta disminución del 18% en los cultivos tratados con fenofibrato, del 21% para los tratados con gemfibrozilo y del 35% para aquellos cultivos que han sido tratados con bezafibrato; la cantidad de vimentina por célula viva en cultivo también se observa disminuida en todas las células tratadas por fármacos, siendo esta disminución del 20% para las tratadas por fenofibrato y gemfibrozilo y del 40% para las tratadas con bezafibrato.

IV.C.2. Tratamiento de los cultivos con dosis tóxica del fármaco

IV.C.2.1. Concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo tras 24 horas de tratamiento

Cuando los ensayos de los fármacos con los cultivos de miocardiocitos los realizamos utilizando una dosis tóxica de dichos fármacos en el medio de cultivo, observamos diferencias con respecto al control en las concentraciones proteicas obtenidas en el homogenado, así como en las fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas celulares de los cultivos tratados con fármacos (Tabla XXXVIII); dichas diferencias de los valores de la concentración proteica con respecto al cultivo control, generalmente son más significativas que cuando hemos ensayado los fármacos a una dosis terapéutica.

En los valores de concentración proteica del homogenado obtenidos, solamente en los cultivos tratados con bezafibrato se observa un ligero aumento (5%) con respecto al control; cuando los cultivos son tratados con fenofibrato el descenso de la concentración proteica con respecto al cultivo control es del 32% y cuando dichos cultivos de miocardiocitos son tratados con gemfibrozilo la disminución de la concentración proteica alcanza un valor del 66%. El contenido proteico total por célula se encuentra levemente incrementado (5%) en los cultivos tratados con bezafibrato con respecto a los controles, pero son menores en las células tratadas con fenofibrato (32%) y gemfibrozilo (65%).

Cuando observamos los valores de concentración proteica obtenidos en la fracción citoplasmática celular, en todos los cultivos que han sido tratados con fármacos se observa un descenso de la concentración proteica con respecto al cultivo control; dicha disminución en el caso de los cultivos tratados con bezafibrato es del 20%, del 56% para el fenofibrato y dicha disminución alcanza un valor elevado del 84% cuando las células son tratadas con gemfibrozilo. El contenido proteico del citoplasma celular se encuentra disminuido en todas las células tratadas con fármacos con respecto a las células controles, así en las células tratadas con bezafibrato la disminución es del 20%, del 56% en el caso de tratamiento con fenofibrato y del 84% para las células tratadas con gemfibrozilo.

La concentración proteica del citoesqueleto, no se va encontrar muy alterada con respecto al control cuando los cultivos han sido tratados con fenofibrato o gemfibrozilo, con una disminución de los valores de concentración proteica disminuidos en un 15 y 17% respectivamente; por el contrario en los cultivos que han sido tratados con bezafibrato, se observa un aumento del 55% en la concentración proteica del citoesqueleto con respecto al control. En el caso del contenido proteico del citoesqueleto por célula viva se observa un ligero descenso del

14% para las células tratadas con fenofibrato y del 16% para las tratadas con gemfibrozilo, mientras que el contenido de proteína del citoesqueleto en la célula tratada con bezafibrato se encuentra incrementada un 55% con respecto a la célula control.

IV.C.2.2. Composición proteica de las fracciones subcelulares tras el tratamiento

Las proteínas de las fracciones subcelulares, se aislaron y separaron electroforéticamente en alícuotas de 15 µg, a continuación se determinó la proporción de proteínas de filamentos intermedios (desmina y vimentina) que forman parte de 15 µg de proteínas totales citoplasmáticas o citoesqueléticas (Tabla XXXIX).

La desmina citoplasmática se encuentra en valores inferiores al observado en el cultivo control en todos los cultivos que han sido tratados con fármacos, el descenso es del 18% en el caso de los cultivos tratados con fenofibrato, del 31% para los tratados con bezafibrato y del 61% para los tratados con gemfibrozilo. La vimentina citoplasmática la encontramos aumentada en todos los cultivos tratados con fármacos con respecto a los controles, éste incremento es del 20% para los cultivos tratados con bezafibrato, del 33% para las tratadas con gemfibrozilo y del 36% para aquellos cultivos que han sido tratados con fenofibrato.

La fracción citoesquelética de desmina en los cultivos celulares se encuentra incrementada con respecto a los controles en los cultivos donde se han ensayado fármacos, el incremento es del 165% en el caso del bezafibrato y fenofibrato, siendo del 193% para el gemfibrozilo. Los valores de vimentina citoesquelética también se encuentran incrementados con respecto al control, siendo dicho incremento del 62% para los cultivos

tratados con gemfibrozilo, del 93% para los tratados con fenofibrato y del 156% para los tratados con bezafibrato.

Cuando observamos la influencia de los fármacos en el contenido de desmina y vimentina de las distintas fracciones subcelulares de la masa celular en cultivo (Tabla XL), observamos que la desmina citoplasmática presenta una disminución en todos los cultivos tratados con fármacos, dicha disminución es del 45% para los cultivos tratados con bezafibrato, del 64% para los tratados con fenofibrato y del 94% para aquellos cultivos que han sido tratados con gemfibrozilo; el contenido de desmina citoplasmática por célula desciende un 45% en la célula tratada con bezafibrato, un 64% en la tratada con fenofibrato y un 94% en aquella que ha sido tratada con gemfibrozilo, con respecto a la célula cultivada en los frascos de cultivo control. La vimentina citoplasmática también se encuentra disminuida en todos los cultivos que han sido tratados con fármacos, los valores de los cultivos tratados con bezafibrato son similares a los del control (un 4% inferior), en los tratados con fenofibrato el descenso es del 40% y en aquellos que han sido tratados con gemfibrozilo la disminución es del 70%; el contenido de vimentina citoplasmática por célula es similar a los del control en la célula tratada con bezafibrato, en cambio es inferior en un 41% para la célula tratada con fenofibrato y en un 79% para aquella que ha sido tratada con gemfibrozilo.

El contenido de la desmina citoesqueletal de la masa celular en cultivo es superior en todos los cultivos tratados con fármacos que la observada en los cultivos controles, el incremento es del 126% para los cultivos tratados con fenofibrato, del 143% para los tratados con gemfibrozilo y del 310% para las que han sido tratadas con bezafibrato; el contenido por célula de desmina citoplasmática es superior en todas las células tratadas con los distintos fibratos que en las células control, este aumento es del 125% para la célula tratada con fenofibrato, del 168% para la tratada con gemfibrozilo y del 308%

para aquella célula que ha estado en contacto con el bezafibrato. La vimentina citoesquelética de la masa celular en cultivo se encuentra en valores superiores en los cultivos tratados que en los cultivos control, este aumento es del 34% en el caso de los tratados con gemfibrozilo, del 64% para los tratados con fenofibrato y del 298% para aquellos cultivos que han sido tratados con bezafibrato; en lo referente al contenido citoesquelético por célula, éste es superior en las células tratadas que en las células controles, siendo un 25% superior en las que han sido tratadas con gemfibrozilo, un 75% para las tratadas con fenofibrato y un 325% superior cuando las células han sido tratadas con bezafibrato.

IV.D. Inmunoblotting con los anticuerpos monoclonales antidesmina y antivimentina

Una vez realizado la separación electroforética de las proteínas citoplasmáticas y citoesqueléticas, en las diferentes muestras procedentes de los miocardiocitos, tanto de tejidos, como de los cultivos celulares, se procedió a su transferencia al papel de nitrocelulosa realizándose el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo con los diferentes anticuerpos monoclonales, observándose que en todas las muestras estudiadas el anticuerpo monoclonal antidesmina reconoce una banda proteica con un peso molecular aproximado de 54.000-55.000 daltons y el anticuerpo monoclonal antivimentina reconoce una banda proteica situada a una altura en el gel que corresponde con una molécula de peso molecular aproximado de 57.000-58.000 daltons (Figura 5).

TABLAS

TABLA I

Las biopsias de corazón humano adulto obtenidas mediante intervención quirúrgica, presentan una masa comprendida entre 0,240-0,933 g. Los resultados se expresan como la media de 5 pesadas, de los pesos en gramos de cada una de las biopsias utilizadas en las diversas experiencias realizadas, tanto de cultivos, como en las experiencias de subfraccionamiento y electroforesis proteica. El \pm representa el error estándar de la media.

Pesos (g) de cada biopsia cardíaca humana

0,240 \pm 0,002	0,323 \pm 0,009	0,420 \pm 0,009	0,513 \pm 0,013	0,640 \pm 0,011
0,243 \pm 0,003	0,333 \pm 0,003	0,420 \pm 0,011	0,520 \pm 0,012	0,643 \pm 0,015
0,244 \pm 0,003	0,360 \pm 0,007	0,433 \pm 0,013	0,520 \pm 0,009	0,697 \pm 0,014
0,255 \pm 0,002	0,362 \pm 0,006	0,440 \pm 0,010	0,532 \pm 0,011	0,722 \pm 0,018
0,258 \pm 0,003	0,362 \pm 0,006	0,441 \pm 0,007	0,550 \pm 0,011	0,748 \pm 0,017
0,270 \pm 0,004	0,365 \pm 0,004	0,445 \pm 0,013	0,551 \pm 0,014	0,785 \pm 0,015
0,270 \pm 0,001	0,371 \pm 0,008	0,445 \pm 0,010	0,580 \pm 0,007	0,830 \pm 0,020
0,289 \pm 0,002	0,380 \pm 0,006	0,450 \pm 0,010	0,585 \pm 0,012	0,862 \pm 0,023
0,292 \pm 0,004	0,388 \pm 0,008	0,485 \pm 0,012	0,590 \pm 0,008	0,870 \pm 0,020
0,300 \pm 0,005	0,390 \pm 0,010	0,488 \pm 0,015	0,620 \pm 0,016	0,933 \pm 0,023
0,320 \pm 0,005	0,414 \pm 0,005	0,500 \pm 0,008	0,620 \pm 0,015	
0,320 \pm 0,006	0,418 \pm 0,010	0,505 \pm 0,012	0,628 \pm 0,014	

TABLA II

Cambios en el número de células por corazón obtenidas por los diferentes procesos de disgregación tisular utilizados para el aislamiento celular a partir de embriones de pollo de diversas edades, representadas por su estadio H.H. de desarrollo embrionario. La primera columna representa la edad del embrión y las siguientes los diferentes métodos de disgregación experimentados (método físico, método enzimático con tripsina a 37°C y método enzimático con tripsina a 4°C).

Edad del embrión (Estadio H.H.)	<u>Número de células obtenidas por corazón</u>		
	Físico	Tripsina 37°C	Tripsina 4°C
XVIII H.H.	0,090 . 10 ⁶	0,115 . 10 ⁶	0,900 . 10 ⁶
XXV H.H.	0,120 . 10 ⁶	0,150 . 10 ⁶	1,200 . 10 ⁶
XXIX H.H.	0,128 . 10 ⁶	0,165 . 10 ⁶	1,250 . 10 ⁶
XXXVIII H.H.	1,700 . 10 ⁶	3,200 . 10 ⁶	26,785 . 10 ⁶

TABLA III

Evolución de la densidad celular (células/ml) de los cultivos de miocardiocitos procedentes de corazones embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H., en los diferentes medios de cultivo. La densidad inicial de siembra fue de $150 \cdot 10^3$ células/ml y se hizo recuento celular en cada uno de los pocillos a lo largo de los días 7, 14, 21 y 28 de cultivo; los medios de cultivo utilizados para la experiencia fueron el Hank's, MEM, DMEM y RPMI-1640. En la primera columna de la tabla se relaciona el medio de cultivo utilizados y en las siguientes columnas el número de células viables observadas a lo largo de los días de cultivo.

Medio de cultivo	<u>Densidad celular (células/ml)</u>			
	<u>Días de cultivo</u>			
	7	14	21	28
Hank's	$80 \cdot 10^3$	$40 \cdot 10^3$	$30 \cdot 10^3$	$10 \cdot 10^3$
MEM	$55 \cdot 10^3$	$40 \cdot 10^3$	$35 \cdot 10^3$	$20 \cdot 10^3$
DMEM	$80 \cdot 10^3$	$60 \cdot 10^3$	$70 \cdot 10^3$	$40 \cdot 10^3$
RPMI-1640	$80 \cdot 10^3$	$55 \cdot 10^3$	$50 \cdot 10^3$	$30 \cdot 10^3$

TABLA IV

Evolución de la densidad celular (células/ml) de los cultivos de miocardiocitos procedentes de corazones embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H., en los diferentes medios de cultivo suplementados con el 20% de suero fetal de ternera (SFT). La densidad inicial de siembra fue de $150 \cdot 10^3$ células/ml, haciéndose un recuento periódico cada 7 días de las células viables en cada pocillo. La primera columna representa a los medios de cultivo suplementados con el 20% de SFT utilizados, las siguientes columnas representa la densidad de células viables observadas a lo largo de los días en cultivo.

Medio de cultivo	<u>Densidad celular (células/ml)</u>			
	<u>Días de cultivo</u>	7	14	21
Hank's +20%SFT	105 . 10^3	35 . 10^3	20 . 10^3	15 . 10^3
MEM +20%SFT	70 . 10^3	60 . 10^3	40 . 10^3	35 . 10^3
DMEM +20%SFT	140 . 10^3	100 . 10^3	80 . 10^3	55 . 10^3
RPMI-1640 +20%SFT	110 . 10^3	90 . 10^3	40 . 10^3	20 . 10^3

TABLA V

Evolución de la densidad celular (células/ml) en los cultivos de miocardiocitos procedentes de corazones embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H. en medio de cultivo DMEM +20%SFT (control), suplementados con diferentes factores de crecimiento conocidos y a diferentes concentraciones en los medios de cultivo (Factor de crecimiento epidérmico (EGF "epidermal growth factor") a 10^{-8} y 10^{-7} , Transferrina humana (Tranf.) 10^{-7} y 10^{-6} , insulina 0,2 y 2 UI/ml, interferón 0,4 y 2 μ l/ml y Fitoheماغlutinina (Fitohema) 6 y 8 μ l/ml. La densidad de siembra fue de $150 \cdot 10^3$ células/ml y se hizo recuento celular periódicamente (cada 7 días) a lo largo del cultivo. En la primera columna se representan los factores de crecimiento y las concentraciones a la que se encuentran en el medio, las siguientes representan la densidad celular a lo largo del tiempo de cultivo.

Factor de crecimiento	<u>Días de cultivo</u>				
	7	14	21	28	
Control		$140 \cdot 10^3$	$100 \cdot 10^3$	$80 \cdot 10^3$	$55 \cdot 10^3$
EGF	10^{-8}	$120 \cdot 10^3$	$70 \cdot 10^3$	$35 \cdot 10^3$	$20 \cdot 10^3$
EGF	10^{-7}	$100 \cdot 10^3$	$55 \cdot 10^3$	$20 \cdot 10^3$	$15 \cdot 10^3$
Transf.	10^{-7}	$120 \cdot 10^3$	$110 \cdot 10^3$	$85 \cdot 10^3$	$45 \cdot 10^3$
Transf.	10^{-6}	$120 \cdot 10^3$	$115 \cdot 10^3$	$75 \cdot 10^3$	$40 \cdot 10^3$
Fitohema	6 μ l/ml	$110 \cdot 10^3$	$65 \cdot 10^3$	$60 \cdot 10^3$	15
Fitohema	8 μ l/ml	$110 \cdot 10^3$	$90 \cdot 10^3$	$40 \cdot 10^3$	$45 \cdot 10^3$
Insulina	0.2 UI/ml	$110 \cdot 10^3$	$105 \cdot 10^3$	$80 \cdot 10^3$	$70 \cdot 10^3$
Insulina	2 UI/ml	$100 \cdot 10^3$	$95 \cdot 10^3$	$115 \cdot 10^3$	$80 \cdot 10^3$
Interferón	0,4 μ l/ml	$85 \cdot 10^3$	$50 \cdot 10^3$	$40 \cdot 10^3$	$20 \cdot 10^3$
Interferón	2 μ l/ml	$110 \cdot 10^3$	$60 \cdot 10^3$	$55 \cdot 10^3$	$20 \cdot 10^3$

TABLA VI

Evolución de la densidad celular (células/ml) en los cultivos de células cardíacas procedentes de embriones del estadio XXIX H.H. en medio de cultivo DMEM +20%SFT (control), suplementado con medios de cultivo procedentes de cultivos celulares de líneas celulares establecidas (Hela-229, McCoy, Hela y Hep-2) y de cultivos de fibroblastos embrionarios de pulmón humano, a la dilución 1/2 con el medio de cultivo. La densidad utilizada para la siembra fue de $150 \cdot 10^3$ células/ml y el recuento celular se realizó cada 7 días durante un periodo de 28 días de cultivo. La primera columna representa las células cuyos medios de cultivo hemos utilizado y las siguientes columnas representan la densidad celular a lo largo de los días de cultivo.

Células	<u>Días de cultivo</u>			
	7	14	21	28
Control	$140 \cdot 10^3$	$100 \cdot 10^3$	$80 \cdot 10^3$	$55 \cdot 10^3$
Fibroblastos	$140 \cdot 10^3$	$85 \cdot 10^3$	$45 \cdot 10^3$	$25 \cdot 10^3$
Hela-229	$120 \cdot 10^3$	$90 \cdot 10^3$	$65 \cdot 10^3$	$40 \cdot 10^3$
McCoy	$140 \cdot 10^3$	$100 \cdot 10^3$	$80 \cdot 10^3$	$40 \cdot 10^3$
Hela	$140 \cdot 10^3$	$75 \cdot 10^3$	$70 \cdot 10^3$	$25 \cdot 10^3$
Hep-2	$130 \cdot 10^3$	$60 \cdot 10^3$	$60 \cdot 10^3$	$35 \cdot 10^3$

TABLA VII

Evolución de la densidad celular (células/ml) de los cultivos primarios de miocardiocitos embrionarios de pollo, que posteriormente serán utilizados para el establecimiento del cultivo secundario. Se aislarón las células correspondiente a un corazón de cada estadio del desarrollo y se sembró en medio de cultivo, haciendo un recuento celular cada 7 días. En los cultivos que manifestaron un aumento de la población celular, dicha proliferación se observa en el recuento celular realizado el día 14 del cultivo, siguiendo aumentando la población celular en el día 21 de cultivo cuando se realizó el pase para el establecimiento del cultivo secundario. La primera columna representa la edad del embrión utilizado y las siguientes la densidad celular para cada uno de los días de cultivo primario.

Evolución de la densidad celular (células/ml)

Edad del embrión	<u>Días de cultivo</u>			
	0	7	14	21
XVIII H.H.	90 . 10 ³	70 . 10 ³	130 . 10 ³	190 . 10 ³
XXVI H.H.	100 . 10 ³	90 . 10 ³	140 . 10 ³	200 . 10 ³
XXIX H.H.	125 . 10 ³	110 . 10 ³	150 . 10 ³	240 . 10 ³

TABLA VIII

La evolución de la densidad celular (células/ml) a lo largo del tiempo de cultivo secundario fue estudiada en diferentes medios de cultivo realizándose un recuento celular cada 7 días. La primera columna representa los medios de cultivo utilizados y las siguientes la densidad celular en los medios a lo largo de los días de cultivo.

Número de células/ml.10³ durante los cultivos secundarios

Medio de cultivo	<u>Días en cultivo</u>				
	0	7	14	21	28
Hank's	83,0	20,0	3,0	0	0
DMEM	83,0	2,5	1,2	2,5	0,5
MEM	83,0	10,0	5,0	7,5	2,0
MEM+2%SFT	83,0	10,0	2,5	10,0	3,5
RPMI-1640	83,0	5,0	10,0	2,5	1,5
RPMI-1640+10%SFT	83,0	20,0	12,0	7,5	5,0

TABLA IX

Evolución de la población celular (células/ml) a lo largo del cultivo primario de miocardiocitos humanos procedentes de biopsia quirúrgica de corazón adulto. El recuento celular se realizó cada 7 días, durante 28 días de cultivo; la primera línea representa la densidad de las células vivas, la segunda la densidad de las células muertas.

Evolución de la población miocardiocítica humana en cultivo (células/ml)

	<u>Días de cultivo</u>				
	0	7	14	21	28
<u>Vivas</u>	75 . 10 ³	53 . 10 ³	35 . 10 ³	23 . 10 ³	12 . 10 ³
<u>Muertas</u>	36 . 10 ³	17 . 10 ³	20 . 10 ³	18 . 10 ³	20 . 10 ³

TABLA X

El peso medio de cada corazón a lo largo del desarrollo embrionario fue estudiado mediante extracción de corazones de embriones de pollo de diferentes edades. La primera columna representa la edad del embrión (Estadio H.H.), la segunda el número de corazones extraídos, la tercera los mg que pesaron los corazones extraídos y la última columna representa el peso (mg) aproximado de cada corazón por estadio H.H. del desarrollo embrionario. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. EL \pm representa el error estándar de la media.

Masa cardíaca en el desarrollo embrionario

Edad del embrión	Número de corazones	Peso (mg) corazones	Peso (mg) corazón
XVIII	26	92,134 \pm 3,601	3,543 \pm 0,017
XX	23	113,900 \pm 4,020	4,950 \pm 0,475
XXII	19	92,614 \pm 4,123	4,874 \pm 0,034
XXV	19	106,233 \pm 2,891	5,591 \pm 0,112
XXVII	17	90,112 \pm 1,987	5,300 \pm 0,570
XXIX	15	119,005 \pm 3,771	7,930 \pm 0,523
XXXIII	15	250,654 \pm 18,199	16,710 \pm 0,540
XXXVI	4	94,235 \pm 5,125	23,558 \pm 1,208
XXXVII	3	130,896 \pm 7,801	43,632 \pm 3,118
XXXVIII	2	210,103 \pm 17,902	105,051 \pm 9,067
XXXIX	2	269,671 \pm 21,805	134,835 \pm 7,991
XL	2	270,007 \pm 18,956	135,000 \pm 10,085
XLII	2	309,532 \pm 22,009	154,766 \pm 12,341
XLIV	1	207,670 \pm 19,589	207,670 \pm 19,589
XLV	1	230,904 \pm 25,033	230,904 \pm 25,033

TABLA XI

Mediante homogeneización y posterior subfraccionamiento celular de los corazones embrionarios de pollo, se obtiene de cada corazón 2 fracciones proteicas subcelulares, una que corresponde a la fracción citoplasmática (soluble en tritón X-100) y otra fracción citoesquelética (soluble en SDS). Se han tomado muestras de cada una de las fracciones proteicas celulares, así como del homogenado obtenido tras la homogeneización tisular, determinandose la concentración proteica (mg/ml) de cada una de las muestras. La primera columna representa la edad de los embriones (Estadio H.H.) de los cuales se extraen los corazones, las siguientes representan la concentración proteica del homogenado tisular y las concentraciones proteicas de cada una de las subfracciones obtenidas a partir del homogenado tisular. Los resultados se expresan como la media de 3 medias. El \pm representa el error estándar de la medida.

Concentración proteica (mg/ml) del tejido cardíaco embrionario de pollo

Edad del embrión	Homogenado	Fracción citoplasmática	Fracción citoesquelética
XVIII	0,260 \pm 0,009	0,186 \pm 0,003	0,104 \pm 0,009
XX	0,269 \pm 0,001	0,260 \pm 0,004	0,085 \pm 0,005
XXII	0,769 \pm 0,013	0,586 \pm 0,007	0,139 \pm 0,000
XXV	0,930 \pm 0,012	0,534 \pm 0,005	0,458 \pm 0,004
XXVII	1,354 \pm 0,019	0,791 \pm 0,010	0,226 \pm 0,000
XXIX	2,277 \pm 0,070	1,686 \pm 0,134	0,921 \pm 0,009
XXXIII	2,305 \pm 0,091	1,236 \pm 0,112	0,744 \pm 0,011

Concentración proteica (mg/ml) del tejido cardíaco
embrionario de pollo (continuación)

Edad del embrión	Homogenado	Fracción citoplasmática	Fracción citoesquelética
XXXVI	1,621±0,031	1,208±0,201	0,595±0,013
XXXVII	1,900±0,113	1,610±0,047	0,721±0,009
XXXVIII	3,068±0,324	1,305±0,153	0,874±0,012
XXXIX	3,519±0,297	1,416±0,051	1,059±0,023
XL	5,098±0,453	2,322±0,086	1,511±0,042
XLII	6,023±0,367	3,002±0,091	1,931±0,063
XLIV	6,720±0,453	3,608±0,345	1,624±0,087
XLV	6,603±0,501	2,580±0,187	1,461±0,063

TABLA XII

La concentración proteica (mg/ml) obtenida en el homogenado del tejido cardíaco embrionario de pollo, se ha convertido en la concentración proteica que corresponde a 100 mg de tejido de cada estadio del desarrollo estudiado. La primera columna representa la edad del embrión (Estadio H.H.), las siguientes representan la concentración proteica (mg/ml) por cada 100 mg de tejido cardíaco del homogenado, fracción soluble en Tritón X-100 (fracción citoplasmática) y fracción soluble en SDS (fracción del citoesqueleto) respectivamente. Los resultados se expresan como la media de 3 medidas. El \pm representa el error estándar de la media.

Concentración proteica (mg/ml)/ 100 mg de tejido cardíaco embrionario de pollo

Edad del embrión	Homogenado	Fracción citoplasmática	Fracción citoesquelética
XVIII	0,282 \pm 0,010	0,202 \pm 0,003	0,113 \pm 0,009
XX	0,236 \pm 0,001	0,228 \pm 0,003	0,057 \pm 0,004
XXII	0,835 \pm 0,015	0,636 \pm 0,008	0,151 \pm 0,000
XXV	0,876 \pm 0,012	0,503 \pm 0,005	0,432 \pm 0,003
XXVII	1,504 \pm 0,021	0,878 \pm 0,012	0,251 \pm 0,000
XXIX	1,913 \pm 0,059	1,416 \pm 0,113	0,773 \pm 0,008
XXXIII	0,922 \pm 0,036	0,494 \pm 0,045	0,297 \pm 0,005
XXXVI	1,724 \pm 0,033	1,285 \pm 0,213	0,632 \pm 0,014
XXXVII	1,461 \pm 0,087	1,238 \pm 0,036	0,554 \pm 0,007

Concentración proteica (mg/ml)/ 100 mg de tejido cardíaco
embrionario de pollo (continuación)

Edad del embrión	Homogenado	Fracción citoplasmática	Fracción citoesquelética
XXXVIII	1,460±0,155	0,621±0,020	0,416±0,005
XXXIX	1,308±0,110	0,526±0,019	0,393±0,008
XL	1,888±0,167	0,860±0,031	0,559±0,015
XLII	1,946±0,147	0,970±0,036	0,623±0,021
XLIV	3,246±0,219	1,742±0,167	0,784±0,042
XLV	2,870±0,218	1,121±0,018	0,635±0,027

TABLA XIII

Las diferentes muestras proteicas del citoplasma de los diferentes estadios H.H. del embrión de pollo fueron separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE (gel 12%), depositándose en cada pocillo, correspondiente a cada carril, un volumen de 15 µl de muestra, a una concentración proteica de 1 µg/µl. Mediante estudio densitométrico de las diferentes bandas proteicas obtenidas, se determinó el contenido proteico de cada proteína en los 15 µg de proteína corrida en cada carril de electroforesis. La primera columna de la tabla representa la edad del embrión (estadio H.H.) del que se ha obtenido la fracción citoplasmática del embrión de pollo, las siguientes columnas representan la cantidad (µg) de proteínas desmina y vimentina en los diferentes carriles. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El ± representa el error estándar de la media.

Contenido en desmina y vimentina (µg/15 µg proteínas totales) citoplasmáticas, en el desarrollo embrionario del pollo

Edad del embrión	Desmina	Vimentina
XVIII	1,320±0,105	0,420±0,101
XX	1,510±0,180	0,555±0,080
XXII	1,790±0,270	0,705±0,060
XXV	1,755±0,095	0,720±0,056
XXVII	1,590±0,054	0,570±0,045
XXIX	1,725±0,015	0,960±0,092
XXXIII	1,815±0,230	0,870±0,065
XXXVI	1,650±0,170	0,810±0,110

Contenido en desmina y vimentina ($\mu\text{g}/15 \mu\text{g}$ proteínas totales)
citoplasmáticas, en el desarrollo embrionario del pollo
(continuación)

Edad del embrión	Desmina	Vimentina
XXXVII	1,635 \pm 0,120	0,855 \pm 0,070
XXXVIII	1,920 \pm 0,135	0,840 \pm 0,089
XXXIX	1,800 \pm 0,122	0,750 \pm 0,092
XL	1,455 \pm 0,090	0,756 \pm 0,075
XLII	1,467 \pm 0,075	0,690 \pm 0,044
XLIV	1,605 \pm 0,130	0,755 \pm 0,085
XLV	1,485 \pm 0,230	0,705 \pm 0,120

TABLA XIV

A partir de los datos obtenidos del estudio densitométrico de los geles y las concentraciones proteicas del citoplasma determinadas correspondientes a 100 mg de tejido cardiaco embrionario, se determinaron los μg de cada proteína (desmina y vimentina) que contienen 100 mg de tejido cardiaco a lo largo del desarrollo del embrión de pollo. La primera columna representa la edad del embrión (estadio H.H.) y las siguientes los μg de desmina y vimentina en 100 mg de tejido. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Contenido en desmina y vimentina ($\mu\text{g}/100$ mg tejido cardiaco) citoplasmáticas, en el desarrollo embrionario del pollo

Edad del embrión	Desmina	Vimentina
XVIII	17,776 \pm 1,726	5,656 \pm 1,464
XX	22,952 \pm 3,074	8,436 \pm 1,343
XXII	75,896 \pm 12,272	29,892 \pm 3,424
XXV	58,851 \pm 3,838	24,144 \pm 1,640
XXVII	93,068 \pm 3,160	33,364 \pm 3,126
XXIX	162,840 \pm 14,524	90,624 \pm 16,609
XXXIII	59,774 \pm 13,709	28,652 \pm 5,664
XXXVI	141,100 \pm 16,390	69,390 \pm 22,487
XXXVII	134,942 \pm 14,116	70,566 \pm 8,007
XXXVIII	79,488 \pm 8,329	34,776 \pm 4,923
XXXIX	63,120 \pm 6,712	26,300 \pm 4,292
XL	83,420 \pm 8,353	43,344 \pm 6,017
XLII	94,866 \pm 9,578	44,620 \pm 5,096
XLIV	186,394 \pm 34,413	87,680 \pm 19,112
XLV	110,979 \pm 19,246	81,874 \pm 19,229

TABLA XV

Las diferentes muestras proteicas del citoesqueleto obtenidas de los diferentes estadios H.H. del embrión de pollo fueron separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE (gel 12%), depositándose en cada pocillo correspondiente a cada carril un volumen de 15 μ l de muestra, a una concentración proteica de 1 μ g/ μ l. Mediante estudio densitométrico de las diferentes bandas proteicas obtenidas, se determinó el contenido proteico correspondiente a cada proteína en los 15 μ g de proteínas totales corridas en cada carril de electroforesis. La primera columna de la tabla representa la edad del embrión (estadio H.H.) del que se ha obtenido la fracción citoplasmática del embrión de pollo, las siguientes columnas representan la cantidad (μ g) de proteínas desmina y vimentina en los diferentes carriles. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Contenido en desmina y vimentina (μ g/15 μ g proteínas totales) citoesqueléticas, en el desarrollo embrionario del pollo

Edad del embrión	Desmina	Vimentina
XVIII	0,315 \pm 0,015	1,425 \pm 0,120
XX	0,765 \pm 0,135	1,320 \pm 0,145
XXII	1,005 \pm 0,205	0,570 \pm 0,035
XXV	0,690 \pm 0,099	0,345 \pm 0,015
XXVII	0,930 \pm 0,160	0,375 \pm 0,065
XXIX	1,320 \pm 0,185	0,360 \pm 0,092
XXXIII	0,930 \pm 0,087	0,330 \pm 0,055
XXXVI	1,335 \pm 0,140	0,210 \pm 0,050

Contenido en desmina y vimentina ($\mu\text{g}/15 \mu\text{g}$ proteínas totales)
citoesqueléticas, en el desarrollo embrionario del pollo
(continuación)

Edad del embrión	Desmina	Vimentina
XXXVII	1,425 \pm 0,125	0,225 \pm 0,030
XXXVIII	1,320 \pm 0,115	0,210 \pm 0,041
XXXIX	1,305 \pm 0,150	0,195 \pm 0,025
XL	1,455 \pm 0,192	0,180 \pm 0,018
XLII	1,260 \pm 0,110	0,210 \pm 0,032
XLIV	1,230 \pm 0,180	0,180 \pm 0,025
XLV	1,485 \pm 0,250	0,202 \pm 0,017

TABLA XVI

A partir de los datos obtenidos del estudio densitométrico de los geles y las concentraciones proteicas del citoesqueleto determinadas, correspondientes a 100 mg de tejido cardíaco embrionario, se determinaron los μg de cada proteína (desmina y vimentina) que contienen 100 mg de tejido cardíaco a lo largo del desarrollo del embrión de pollo. La primera columna representa la edad del embrión (estadio H.H.) y las siguientes los μg de desmina y vimentina en 100 mg de tejido. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Contenido en desmina y vimentina ($\mu\text{g}/100$ mg tejido cardíaco) citoesqueléticas, en el desarrollo embrionario del pollo

Edad del embrión	Desmina	Vimentina
XVIII	1,186 \pm 0,145	5,367 \pm 0,916
XX	1,887 \pm 0,453	3,256 \pm 0,553
XXII	5,058 \pm 1,032	2,869 \pm 0,176
XXV	9,936 \pm 1,425	4,968 \pm 0,216
XXVII	7,781 \pm 1,338	3,137 \pm 0,544
XXIX	34,012 \pm 5,168	9,276 \pm 2,491
XXXIII	9,207 \pm 1,950	3,267 \pm 0,621
XXXVI	28,124 \pm 3,637	4,522 \pm 1,076
XXXVII	26,315 \pm 0,960	4,155 \pm 0,613
XXXVIII	18,304 \pm 1,307	2,912 \pm 0,602
XXXIX	17,095 \pm 2,305	2,554 \pm 0,379
XL	27,111 \pm 4,401	3,354 \pm 0,434
XLII	26,166 \pm 3,243	4,361 \pm 0,817
XLIV	32,144 \pm 6,678	4,704 \pm 0,940
XLV	31,432 \pm 6,853	4,275 \pm 0,557

TABLA XVII

El miocardio de las biopsias quirúrgicas de corazón humano adulto, una vez aislada es homogeneizado (homogeneizador manual y polytrón) y posteriormente son separadas las subfracciones proteicas celulares correspondientes al citoplasma y citoesqueleto. La tabla representa el número de biopsias utilizadas, el peso total (g) de las biopsias utilizadas, el peso total (g) del miocardio obtenido, la concentración proteica (mg/ml) del homogenado, citoplasma y citoesqueleto, obtenidas para los dos métodos de homogeneización utilizados. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Concentración proteica (mg/ml) en el tejido miocardico humano de adulto

	Manual	Polytrón
<u>Número biopsias</u>	6	6
<u>Peso (g) biopsias</u>	2,964 \pm 0,541	3,105 \pm 0,610
<u>Peso (g) miocardio</u>	0,440 \pm 0,137	0,461 \pm 0,097
<u>Homogenado (mg/ml)</u>	3,618 \pm 0,387	4,791 \pm 0,410
<u>Citoplasma (mg/ml)</u>	0,972 \pm 0,017	1,058 \pm 0,045
<u>Citoesqueleto (mg/ml)</u>	1,020 \pm 0,037	1,150 \pm 0,023

TABLA XVIII

A partir de las concentraciones proteicas obtenidas del homogenado y de las fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas, partiendo de la masa de miocardio utilizada para la homogeneización (manual y polytrón), hemos obtenido los valores de las concentraciones proteicas (mg/ml) que corresponderían a 100 mg de tejido miocardico de humano adulto. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Concentración proteica (mg/ml) para 100 mg de miocardio adulto humano

Homogeneización	Homogenado	Citoplasma	Citoesqueleto
Manual	0,822 \pm 0,127	0,220 \pm 0,048	0,231 \pm 0,047
Polytrón	1,039 \pm 0,106	0,229 \pm 0,031	0,249 \pm 0,038

TABLA XIX

Las diferentes muestras proteicas procedentes de las biopsias humanas, homogeneizadas manualmente o mediante polytrón, fueron aisladas y separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE (gel 12%), depositándose en cada pocillo correspondiente a cada carril un volumen de 15 µl de muestra, a una concentración proteica de 1 µg/µl. Mediante estudio densitométrico de las diferentes bandas proteicas obtenidas, se determinó el contenido proteico (µg) de cada proteína en los 15 µg de proteínas corrida en cada carril de electroforesis. La primera columna de la tabla representa el método de homogeneización empleado, las siguientes columnas representan la cantidad (µg) de proteínas desmina y vimentina en los diferentes carriles. A continuación se representa la cantidad de desmina y vimentina presente en las fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas correspondientes a 100 mg de tejido miocárdico. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El ± representa el error estándar de la media.

Contenido (µg) en desmina y vimentina en tejido miocárdico humano adulto

Homogeneizador	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
<u>Manual</u>	0,735±0,023	0,360±0,013	0,630±0,049	0,600±0,053
<u>Polytrón</u>	0,990±0,078	0,345±0,051	0,705±0,056	0,660±0,061

Contenido en 100 mg de miocardio

<u>Manual</u>	10,780±2,923	5,280±1,384	4,851±1,441	4,620±1,431
<u>Polytrón</u>	15,114±3,398	5,267±1,597	5,851±1,429	5,478±1,419

TABLA XX

A partir de corazones del estadio XXV H.H. del desarrollo embrionario del pollo, hemos cultivado frascos de cultivo (1.000.000 células/ml) y extraído las células a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo. A continuación se ha realizado el subfraccionamiento celular y se ha determinado la concentración proteica (mg/ml) del homogenado, fracción citoplasmática (soluble en Tritón X-100) y la fracción correspondiente al citoesqueleto (soluble en SDS) a lo largo de los días de cultivo. Debajo de cada resultado, entre parentesis, se expresa el contenido proteico en μg correspondiente a cada célula viable en el cultivo. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Concentración proteica (mg/ml) en cultivos de miocardiocitos del estadio XXV H.H.

Días en cultivo	Homogenado	Fracción citoplasmática	Fracción citoesquelética
0	0,793 \pm 0,042 (79,3 x 10 ⁻⁶)	0,364 \pm 0,029 (36,4 x 10 ⁻⁶)	0,312 \pm 0,033 (15,6 X 10 ⁻⁶)
7	1,187 \pm 0,004 (131,8 x 10 ⁻⁶)	1,066 \pm 0,050 (118,4 x 10 ⁻⁶)	0,233 \pm 0,001 (12,9 x 10 ⁻⁶)
14	1,529 \pm 0,185 (203,8 x 10 ⁻⁶)	1,306 \pm 0,122 (174,1 x 10 ⁻⁶)	0,220 \pm 0,084 (14,6 x 10 ⁻⁶)

Concentración proteica (mg/ml) en cultivos de miocardiocitos del estadio XXV H.H. (continuación)

Días en cultivo	Homogenado	Fracción citoplasmática	Fracción citoesquelética
21	0,603±0,091 (115,9 x 10 ⁻⁶)	0,396±0,045 (76,1 x 10 ⁻⁶)	0,177±0,018 (17,0 x 10 ⁻⁶)
28	1,045±0,010 (190,0 x 10 ⁻⁶)	0,787±0,087 (143,0 x 10 ⁻⁶)	0,231±0,048 (21,0 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXI

A partir de corazones embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H., hemos cultivado frascos de cultivo (1.000.000 células/ml) y extraído las células a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo. A continuación se ha realizado el subfraccionamiento celular y se ha determinado la concentración proteica (mg/ml) del homogenado, fracción citoplasmática (soluble en Tritón X-100) y la fracción correspondiente al citoesqueleto (soluble en SDS) a lo largo de los días de cultivo. Debajo de cada resultado, entre paréntesis, se expresa el contenido proteico en μg correspondiente a cada célula viable en el cultivo. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Concentración proteica (mg/ml) en cultivos de miocardiocitos del estadio XXIX H.H.

Días en cultivo	Homogenado	Fracción citoplasmática	Fracción citoesquelética
0	1,129 \pm 0,099 (112,9 x 10 ⁻⁶)	0,794 \pm 0,034 (79,4 x 10 ⁻⁶)	0,214 \pm 0,011 (10,7 x 10 ⁻⁶)
7	1,167 \pm 0,113 (137,2 x 10 ⁻⁶)	0,810 \pm 0,056 (95,2 x 10 ⁻⁶)	0,285 \pm 0,018 (16,7 x 10 ⁻⁶)
14	0,574 \pm 0,042 (88,3 x 10 ⁻⁶)	0,437 \pm 0,038 (67,2 x 10 ⁻⁶)	0,133 \pm 0,002 (10,2 x 10 ⁻⁶)

Concentración proteica (mg/ml) en cultivos de miocardiocitos del estadio XXIX H.H. (continuación)

Días en cultivo	Homogenado	Fracción citoplasmática	Fracción citoesquelética
21	0,151±0,042 (34,3 x 10 ⁻⁶)	0,075±0,017 (17,0 x 10 ⁻⁶)	0,148±0,044 (16,8 x 10 ⁻⁶)
28	0,640±0,032 (139,1 x 10 ⁻⁶)	0,588±0,057 (127,8 x 10 ⁻⁶)	0,165±0,032 (17,6 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXII

A partir de corazones embrionarios de pollo del estadio XXXIX H.H., hemos cultivado frascos de cultivo (1.000.000 células/ml) y extraído las células a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo. A continuación se ha realizado el subfraccionamiento celular y se ha determinado la concentración proteica (mg/ml) del homogenado, fracción citoplasmática (soluble en Tritón X-100) y la fracción correspondiente al citoesqueleto (soluble en SDS) a lo largo de los días de cultivo. Debajo de cada resultado, entre parentesis, se expresa el contenido proteico en μg correspondiente a cada célula viable en el cultivo. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Concentración proteica (mg/ml) en cultivos de miocardiocitos del estadio XXXIX H.H.

Días en cultivo	Homogenado	Fracción Citoplasmática	Fracción Citoesquelética
0	0,922 \pm 0,091 (92,2 x 10 ⁻⁶)	0,537 \pm 0,087 (53,7 x 10 ⁻⁶)	0,294 \pm 0,031 (14,7 x 10 ⁻⁶)
7	1,183 \pm 0,042 (173,9 x 10 ⁻⁶)	0,970 \pm 0,071 (142,6 x 10 ⁻⁶)	0,245 \pm 0,005 (18,0 x 10 ⁻⁶)
14	1,146 \pm 0,114 (220,3 x 10 ⁻⁶)	0,974 \pm 0,076 (187,3 x 10 ⁻⁶)	0,254 \pm 0,071 (24,4 x 10 ⁻⁶)

Concentración proteica (mg/ml) en cultivos de miocardiocitos del estadio XXXIX I.H. (continuación)

Días en cultivo	Homogenado	Fracción Citoplasmática	Fracción Citoesquelética
21	0,396±0,014 (123,7 x 10 ⁻⁶)	0,233±0,026 (72,8 x 10 ⁻⁶)	0,155±0,030 (24,2 x 10 ⁻⁶)
28	1,102±0,173 (380,0 x 10 ⁻⁶)	0,780±0,023 (268,9 x 10 ⁻⁶)	0,208±0,048 (35,8 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXIII

Las proteínas componentes de las fracciones subcelulares de los miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXV H.H., son separadas electroforéticamente en SDS-PAGE (geles 12%) en muestras de 15 μ l (a una concentración proteica de 1 μ g/ μ l) por carril de electroforesis y la cantidad (μ g) de cada proteína es determinada mediante lectura densitométrica de los geles. La primera columna representa los días de cultivo de las células, la siguiente la cantidad de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas totales citoplasmáticas, y la tercera columna representa la cantidad de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas totales citoesqueléticas. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Cantidad (μ g) de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas citoplasmáticas o citoesqueléticas (Estadio XXV H.H.)

Días en cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
0	1,755 \pm 0,135	0,720 \pm 0,035	0,690 \pm 0,083	0,345 \pm 0,086
7	1,725 \pm 0,195	0,660 \pm 0,075	0,602 \pm 0,165	0,570 \pm 0,109
14	1,125 \pm 0,093	1,080 \pm 0,112	1,110 \pm 0,090	0,465 \pm 0,009
21	0,915 \pm 0,060	1,125 \pm 0,105	0,945 \pm 0,170	0,645 \pm 0,125
28	0,645 \pm 0,132	1,335 \pm 0,244	0,750 \pm 0,180	0,630 \pm 0,120

TABLA XXIV

Hemos determinado la cantidad (μg) de desmina y vimentina que contienen cada uno de los frascos de cultivo de miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXV H.H. a lo largo de los días de cultivo. La primera columna representa a los días de duración del cultivo, la segunda la cantidad en μg de desmina y vimentina citoplasmática, y la tercera la cantidad (μg) de dichas proteínas en el citoesqueleto; en la parte inferior de cada valor proteico, entre parentesis se representa la cantidad (μg) de dichas proteínas que corresponde a cada célula viva. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Contenido en desmina y vimentina de las células a lo largo del tiempo de cultivo (Estadio XXV H.H.)

Días de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
0	42,588 \pm 6,799 (4,2 x 10 ⁻⁶)	17,472 \pm 1,805 (1,7 x 10 ⁻⁶)	7,176 \pm 1,713 (0,7 x 10 ⁻⁶)	3,588 \pm 1,368 (0,3 x 10 ⁻⁶)
7	122,590 \pm 42,578 (13,6 x 10 ⁻⁶)	46,904 \pm 11,784 (5,2 x 10 ⁻⁶)	4,675 \pm 1,307 (0,5 x 10 ⁻⁶)	4,427 \pm 0,869 (0,4 x 10 ⁻⁶)
14	97,950 \pm 18,003 (13,0 x 10 ⁻⁶)	94,032 \pm 19,446 (12,5 x 10 ⁻⁶)	8,140 \pm 4,020 (1,0 x 10 ⁻⁶)	3,410 \pm 1,393 (0,4 x 10 ⁻⁶)

Contenido en desmina y vimentina de las células a lo largo del tiempo de cultivo (Estadio XXV H.H.) (continuación)

Dias de cultivo	Citoplasma		Citoesqueleto	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
21	24,156± 4,215 (4,6 x 10 ⁻⁶)	29,700± 6,462 (5,7 x 10 ⁻⁶)	5,575± 1,672 (1,0 x 10 ⁻⁶)	3,805± 1,200 (0,7 x 10 ⁻⁶)
28	33,841±11,484 (6,1 x 10 ⁻⁶)	70,043±22,275 (12,7 x 10 ⁻⁶)	5,775± 2,874 (1,0 x 10 ⁻⁶)	4,851± 2,124 (0,8 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXV

Las proteínas componentes de las subfracciones celulares de los miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H., son separadas electroforéticamente en SDS-PAGE (geles 12%) en muestras de 15 μ l (a una concentración proteica de 1 μ g/ μ l) por carril de electroforesis y la cantidad (μ g) de cada proteína es determinada mediante lectura densitométrica de los geles. La primera columna representa los días de cultivo de las células, la siguiente la cantidad de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas totales citoplasmáticas, y la tercera columna representa la cantidad de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas totales citoesqueléticas. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Cantidad (μ g) de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas citoplasmáticas o citoesqueléticas (Estadio XXIX H.H.)

Días en cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
0	1,725 \pm 0,297	0,970 \pm 0,123	1,260 \pm 0,134	0,360 \pm 0,082
7	1,185 \pm 0,128	1,410 \pm 0,191	1,185 \pm 0,163	0,840 \pm 0,114
14	1,110 \pm 0,129	1,830 \pm 0,203	1,215 \pm 0,157	1,020 \pm 0,144
21	0,930 \pm 0,088	1,635 \pm 0,214	1,020 \pm 0,123	0,660 \pm 0,079
28	0,870 \pm 0,097	1,985 \pm 0,295	0,810 \pm 0,096	0,705 \pm 0,082

TABLA XXVI

Hemos determinado la cantidad (μg) de desmina y vimentina que contienen cada uno de los frascos de cultivo de miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H. tras los diferentes días de cultivo. La primera columna representa a los días de duración del cultivo, la segunda la cantidad en μg de desmina y vimentina citoplasmática, y la tercera la cantidad (μg) de dichas proteínas en el citoesqueleto; en la parte inferior de cada valor proteico, entre paréntesis se representa la cantidad (μg) de dichas proteínas que corresponden a cada célula viva. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Contenido en desmina y vimentina de las células a lo largo del tiempo de cultivo (Estadio XXIX H.H.)

Días de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
0	91,310 \pm 19,310 (9,1 x 10 ⁻⁶)	51,345 \pm 8,697 (5,1 x 10 ⁻⁶)	8,988 \pm 1,467 (0,8 x 10 ⁻⁶)	2,568 \pm 0,747 (0,2 x 10 ⁻⁶)
7	63,990 \pm 11,929 (7,5 x 10 ⁻⁶)	76,140 \pm 16,291 (8,9 x 10 ⁻⁶)	11,257 \pm 2,357 (1,3 x 10 ⁻⁶)	7,980 \pm 1,687 (0,9 x 10 ⁻⁶)
14	32,338 \pm 6,897 (4,9 x 10 ⁻⁶)	53,314 \pm 11,064 (8,2 x 10 ⁻⁶)	5,386 \pm 0,788 (0,8 x 10 ⁻⁶)	4,590 \pm 0,648 (0,7 x 10 ⁻⁶)

Contenido en desmina y vimentina de las células a lo largo del tiempo de cultivo (Estadio XXIX H.H.) (continuación)

Días de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
21	4,650± 2,207 (1,0 x 10 ⁻⁶)	8,175± 1,938 (1,8 x 10 ⁻⁶)	5,032± 2,283 (1,1 x 10 ⁻⁶)	3,256± 1,473 (0,7 x 10 ⁻⁶)
28	34,104± 7,477 (7,4 x 10 ⁻⁶)	77,812±20,228 (16,9 x 10 ⁻⁶)	4,455± 1,494 (0,9 x 10 ⁻⁶)	3,877± 1,028 (0,8 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXVII

Las proteínas componentes de las subfracciones celulares de los miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXXIX H.H., son separadas electroforéticamente en SDS-PAGE (geles 12%) en muestras de 15 μ l (a una concentración proteica de 1 μ g/ μ l) por carril de electroforesis y la cantidad (μ g) de cada proteína es determinada mediante lectura densitométrica de los geles. La primera columna representa los días de cultivo de las células, la siguiente la cantidad de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas totales citoplasmáticas, y la tercera columna representa la cantidad de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas totales citoesqueléticas. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Cantidad (μ g) de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas citoplasmáticas o citoesqueléticas (Estadio XXXIX H.H.)

Días en cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
0	1,810 \pm 0,186	0,735 \pm 0,078	1,305 \pm 0,157	0,270 \pm 0,065
7	1,530 \pm 0,171	0,903 \pm 0,094	0,765 \pm 0,059	0,405 \pm 0,074
14	0,915 \pm 0,108	1,170 \pm 0,183	1,155 \pm 0,164	0,705 \pm 0,124
21	1,050 \pm 0,143	1,620 \pm 0,276	0,855 \pm 0,113	0,510 \pm 0,118
28	1,602 \pm 0,146	2,005 \pm 0,213	0,840 \pm 0,045	0,270 \pm 0,063

TABLA XXVIII

Hemos determinado la cantidad (μg) de desmina y vimentina que contienen cada uno de los frascos de cultivo de miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXXIX H.H. tras los diferentes días de cultivo. La primera columna representa a los días de duración del cultivo, la segunda la cantidad en μg de desmina y vimentina citoplasmática, y la tercera la cantidad (μg) de dichas proteínas en el citoesqueleto; en la parte inferior de cada valor proteico, entre parentesis se representa la cantidad (μg) de dichas proteínas que corresponde a cada célula viva. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Contenido en desmina y vimentina de las células a lo largo del tiempo de cultivo (Estadio XXXIX H.H.)

Días de cultivo	Citoplasma		Citoesqueleto	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
0	64,789 \pm 18,244 (6,4 x 10 ⁻⁶)	26,313 \pm 6,383 (2,6 x 10 ⁻⁶)	12,789 \pm 3,049 (1,2 x 10 ⁻⁶)	2,646 \pm 0,983 (0,2 x 10 ⁻⁶)
7	98,940 \pm 19,109 (14,5 x 10 ⁻⁶)	58,394 \pm 10,797 (8,5 x 10 ⁻⁶)	6,247 \pm 0,619 (0,9 x 10 ⁻⁶)	3,307 \pm 0,684 (0,4 x 10 ⁻⁶)
14	59,414 \pm 18,334 (11,4 x 10 ⁻⁶)	75,972 \pm 11,738 (14,6 x 10 ⁻⁶)	9,779 \pm 3,585 (1,8 x 10 ⁻⁶)	5,969 \pm 1,928 (1,1 x 10 ⁻⁶)

Contenido en desmina y vimentina de las células a lo largo del tiempo de cultivo (Estadio XXXIX H.H.) (continuación)

Días de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
21	16,310± 4,289 (5,0 x 10 ⁻⁶)	25,164± 7,573 (7,8 x 10 ⁻⁶)	4,417± 1,552 (1,3 x 10 ⁻⁶)	2,635± 1,237 (0,8 x 10 ⁻⁶)
28	83,304±10,272 (28,7 x 10 ⁻⁶)	104,426±12,832 (36,0 x 10 ⁻⁶)	5,824± 1,728 (2,0 x 10 ⁻⁶)	1,872± 0,969 (0,6 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXIX

Hemos aislado y cultivado miocardiocitos humanos adultos procedentes de biopsias quirúrgicas, extrayéndose posteriormente las células de los cultivos tras 7, 14, 21 y 28 días de cultivo. A continuación se procedió al subfraccionamiento celular y a la posterior determinación del contenido proteico (mg/ml) del homogenado, fracción citoplasmática (soluble en Tritón X-100) y la fracción correspondiente al citoesqueleto (soluble en SDS) a lo largo de los días de cultivo, así como del tejido miocárdico aislado a partir de 1 biopsia (día 0 de cultivo). Debajo de cada resultado, entre paréntesis, se expresan el contenido proteico en μg correspondiente a cada célula viable en el cultivo. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Concentración proteica (mg/ml) de miocardiocitos humanos adultos en cultivo

Días en cultivo	Homogenado	Fracción Citoplasmática	Fracción Citoesquelética
0	0,569 \pm 0,103 (227,6 x 10 ⁻⁶)	0,140 \pm 0,012 (56,0 x 10 ⁻⁶)	0,148 \pm 0,031 (29,6 x 10 ⁻⁶)
7	0,378 \pm 0,091 (280,0 x 10 ⁻⁶)	0,210 \pm 0,045 (155,5 x 10 ⁻⁶)	0,268 \pm 0,064 (99,2 x 10 ⁻⁶)

Concentración proteica (mg/ml) de miocardiocitos humanos adultos en cultivo (continuación)

Días en cultivo	Homogenado	Fracción Citoplasmática	Fracción Citoesquelética
14	0,143±0,005 (158,8 x 10 ⁻⁶)	0,98±0,024 (108,8 x 10 ⁻⁶)	0,159±0,021 (88,3 x 10 ⁻⁶)
21	0,352±0,051 (293,3 x 10 ⁻⁶)	0,252±0,031 (210,0 x 10 ⁻⁶)	0,196±0,037 (81,6 x 10 ⁻⁶)
28	0,355±0,011 (443,7 x 10 ⁻⁶)	0,288±0,034 (360,0 x 10 ⁻⁶)	0,151±0,026 (94,3 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXX

Las proteínas de las distintas subfracciones celulares de los miocardiocitos humanos adultos en cultivo son separadas electroforéticamente en SDS-PAGE (geles 12%) en muestras de 15 μ l (a una concentración proteica de 1 μ g/ μ l) por carril de electroforesis y la cantidad (μ g) de cada proteína es determinada mediante lectura densitométrica de los geles. La primera columna representa los días de cultivo de las células, la siguiente la cantidad de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas totales citoplasmáticas, y la tercera columna representa la cantidad de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas totales citoesqueléticas. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Cantidad (μ g) de desmina y vimentina que forma parte de 15 μ g de proteínas citoplasmáticas o citoesqueléticas (Miocardiocitos humanos adultos)

Días en cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
0	0,870 \pm 0,046	0,345 \pm 0,038	0,690 \pm 0,097	0,630 \pm 0,065
7	0,885 \pm 0,031	0,953 \pm 0,142	1,245 \pm 0,159	0,725 \pm 0,104
14	0,832 \pm 0,067	1,327 \pm 0,183	0,487 \pm 0,124	1,260 \pm 0,135
21	0,907 \pm 0,098	1,260 \pm 0,096	0,660 \pm 0,073	1,020 \pm 0,118
28	0,465 \pm 0,086	0,975 \pm 0,113	0,570 \pm 0,064	0,645 \pm 0,093

TABLA XXXI

Hemos determinado la cantidad (μg) de desmina y vimentina que contienen cada uno de los frascos de cultivo de miocardiocitos humanos adultos en los diferentes días de cultivo. La primera columna representa a los días de duración del cultivo, la segunda la cantidad en μg de desmina y vimentina citoplasmática, y la tercera la cantidad (μg) de dichas proteínas en el citoesqueleto; en la parte inferior de cada valor proteico, entre paréntesis, se representa la cantidad (μg) de dichas proteínas que corresponde a cada célula viva. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Contenido en desmina y vimentina de los miocardiocitos humano adulto durante el cultivo

Días de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
0	8,120 \pm 1,162 (3,2 x 10 ⁻⁶)	3,220 \pm 0,661 (1,2 x 10 ⁻⁶)	3,404 \pm 1,344 (1,3 x 10 ⁻⁶)	3,108 \pm 1,085 (1,2 x 10 ⁻⁶)
7	13,200 \pm 3,137 (9,7 x 10 ⁻⁶)	13,062 \pm 5,213 (9,6 x 10 ⁻⁶)	11,122 \pm 1,420 (8,4 x 10 ⁻⁶)	3,307 \pm 0,684 (2,4 x 10 ⁻⁶)
14	5,435 \pm 1,876 (6,0 x 10 ⁻⁶)	8,669 \pm 3,612 (9,6 x 10 ⁻⁶)	2,581 \pm 1,085 (2,8 x 10 ⁻⁶)	6,678 \pm 2,292 (7,4 x 10 ⁻⁶)

Contenido en desmina y vimentina de los miocardiocitos humano adulto durante el cultivo (continuación)

Días de cultivo	Citoplasma		Citoesqueleto	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
21	15,237± 3,724 (12,6 x 10 ⁻⁶)	21,168± 4,415 (17,6 x 10 ⁻⁶)	4,312± 1,380 (3,5 x 10 ⁻⁶)	6,664± 2,174 (5,5 x 10 ⁻⁶)
28	8,928± 0,753 (11,1 x 10 ⁻⁶)	18,720± 4,635 (23,4 x 10 ⁻⁶)	2,869± 0,871 (3,5 x 10 ⁻⁶)	3,246± 1,108 (4,0 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXXII

A partir de cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H., sembrados a una densidad de 1.000.000 células/ml, a los tres días de cultivo cuando la monocapa celular formada ha cubierto toda la superficie de cultivo, hemos añadido a los cultivos los diferentes fibratos a sus correspondientes dosis terapéuticas plasmáticas (bezafibrato 10 µg/ml, fenofibrato 30 µg/ml y gemfibrozilo 23 µg/ml), utilizándose un cuarto frasco de cultivo como control, al cual no se le añade ningún fármaco. Transcurrida 6 horas de contacto de los fármacos con las células, éstas fueron recogidas y homogeneizadas; después de realizado el subfraccionamiento celular, se determinó la concentración proteica (mg/ml) en los diversos homogenados, subfracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas obtenidas. Debajo de cada resultado, entre parentesis, se expresan el contenido proteico en µg correspondiente a cada célula viable en el cultivo. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El ± representa el error estándar de la media.

Influencia de la dosis terapéutica de fibratos sobre la concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo (a las 6 horas)

Frasco de cultivo	Homogenado	Fracción Citoplasmática	Fracción Citoesquelética
Control	1,280±0,042 (142,2 x 10 ⁻⁶)	0,929±0,021 (103,2 x 10 ⁻⁶)	0,247±0,009 (13,7 x 10 ⁻⁶)
Bezafibrato	1,338±0,042 (148,6 x 10 ⁻⁶)	1,070±0,004 (118,8 x 10 ⁻⁶)	0,255±0,009 (14,1 x 10 ⁻⁶)
Fenofibrato	1,037±0,004 (115,2 x 10 ⁻⁶)	0,834±0,008 (92,6 x 10 ⁻⁶)	0,276±0,013 (15,3 x 10 ⁻⁶)
Gemfibrozilo	0,978±0,014 (108,6 x 10 ⁻⁶)	0,854±0,013 (94,8 x 10 ⁻⁶)	0,189±0,017 (10,5 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXXIII

Una vez aisladas las proteínas de las fracciones citoesqueléticas y citoplasmáticas de los miocardiocitos tratados durante 6 horas con los diferentes fármacos a la dosis terapéutica (bezafibrato 10 µg/ml, fenofibrato 30 µg/ml y gemfibrozilo 23 µg/ml), y la correspondientes al frasco de cultivo control, éstas son disueltas en el tampón de muestra y separadas electroforéticamente mediante SDS-PAGE (geles 12%). Las bandas proteicas de los geles son leídas mediante densitómetro, determinandose la cantidad (µg) de cada proteína que forma parte de los 15 µg de proteínas totales corrida en cada carril. La primera columna representa los fármacos añadidos al cultivo, la segunda la cantidad de desmina y vimentina citoplasmática y la tercera columna representa la cantidad de dichas proteínas en 15 µg de proteínas del citoesqueleto. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El ± representa el error estándar de la media.

Influencia de los fibratos en la cantidad de desmina y vimentina, tras 6 horas de tratamiento del cultivo con dosis terapéutica

Frasco de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
Control	1,140±0,145	1,095±0,118	0,975±0,086	0,795±0,082
Bezafibrato	1,230±0,137	1,005±0,103	1,815±0,201	0,780±0,077
Fenofibrato	1,290±0,144	1,050±0,125	1,830±0,195	0,665±0,103
Gemfibrozilo	1,290±0,163	1,005±0,107	1,770±0,179	0,720±0,107

TABLA XXXIV

Hemos determinado la cantidad (μg) de desmina y vimentina que contienen cada uno de los frascos de cultivo tras el tratamiento con los distintos fibratos (bezafibrato, fenofibrato y gemfibrozilo) a la dosis terapéutica plasmática durante 6 horas. La primera columna representa a los distintos fármacos ensayados, la segunda la desmina y vimentina citoplasmática y la tercera la cantidad de dichas proteínas en el citoesqueleto; debajo de cada valor proteico, entre paréntesis, se representa la cantidad (μg) de dicha proteína que corresponde a cada célula viva. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Influencia de los fibratos en la cantidad (μg) de desmina y vimentina de los cultivos, tras 6 horas de tratamiento con dosis terapéutica

Frasco de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
Control	70,604 \pm 10,779 (7,8 x 10 ⁻⁶)	67,817 \pm 9,006 (7,5 x 10 ⁻⁶)	8,027 \pm 1,026 (0,8 x 10 ⁻⁶)	6,545 \pm 0,938 (0,7 x 10 ⁻⁶)
Bezafib.	87,740 \pm 10,781 (9,7 x 10 ⁻⁶)	71,690 \pm 7,642 (7,9 x 10 ⁻⁶)	15,427 \pm 2,313 (1,7 x 10 ⁻⁶)	6,630 \pm 0,911 (0,7 x 10 ⁻⁶)
Fenofib.	71,724 \pm 9,276 (7,9 x.10 ⁻⁶)	58,380 \pm 7,576 (6,4 x 10 ⁻⁶)	16,836 \pm 2,671 (1,8 x 10 ⁻⁶)	6,127 \pm 1,271 (0,6 x 10 ⁻⁶)
Gemfib.	73,444 \pm 10,539 (8,1 x 10 ⁻⁶)	57,218 \pm 7,055 (6,3 x 10 ⁻⁶)	11,329 \pm 2,054 (1,2 x 10 ⁻⁶)	4,536 \pm 1,142 (0,5 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXXV

A partir de cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H., sembrados a una densidad de 1.000.000 células/ml, a los tres días de cultivo cuando la monocapa celular formada ha cubierto toda la superficie de cultivo, hemos añadido a los cultivos los diferentes fibratos a sus correspondientes dosis terapéuticas plasmáticas (bezafibrato 10 $\mu\text{g/ml}$, fenofibrato 30 $\mu\text{g/ml}$ y gemfibrozilo 23 $\mu\text{g/ml}$), utilizándose un cuarto frasco de cultivo como control, al cual no se le añade ningún fármaco. Tras 24 horas de interacción de los fármacos con los miocardiocitos en cultivo, éstos fueron recogidas y homogeneizadas; después de realizado el subfraccionamiento celular, se determinó la concentración proteica (mg/ml) en los diversos homogenados, subfracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas obtenidas. Debajo de cada resultado, entre parentesis, se expresan el contenido proteico en μg correspondiente a cada célula viable en el cultivo. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Influencia de la dosis terapéutica de fibratos sobre la concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo (a las 24 horas)

Frasco de cultivo	Homogenado	Fracción Citoplasmática	Fracción Citoesquelética
Control	1,400±0,046 (155,5 x 10 ⁻⁶)	1,115±0,025 (123,8 x 10 ⁻⁶)	0,297±0,008 (16,5 x 10 ⁻⁶)
Bezafibrato	1,073±0,017 (119,2 x 10 ⁻⁶)	1,061±0,013 (117,8 x 10 ⁻⁶)	0,235±0,012 (13,0 x 10 ⁻⁶)
Fenofibrato	1,173±0,017 (130,3 x 10 ⁻⁶)	1,057±0,009 (117,4 x 10 ⁻⁶)	0,350±0,020 (19,4 x 10 ⁻⁶)
Gemfibrozilo	1,243±0,013 (138,1 x 10 ⁻⁶)	1,057±0,001 (117,4 x 10 ⁻⁶)	0,322±0,008 (17,8 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXXVI

Una vez aisladas las proteínas de las fracciones citoesqueléticas y citoplasmáticas de los miocardiocitos tratados durante 24 horas con los diferentes fármacos a la dosis terapéutica (bezafibrato 10 µg/ml, fenofibrato 30 µg/ml y gemfibrozilo 23 µg/ml), y la correspondientes al frasco de cultivo control, éstas son disueltas en el tampón de muestra y separadas electroforéticamente mediante SDS-PAGE (geles 12%). Las bandas proteicas de los geles son leídas mediante densitómetro, determinándose la cantidad (µg) de cada proteína que forma parte de los 15 µg de proteínas totales corrida en cada carril. La primera columna representa los fármacos añadidos al cultivo, la segunda la cantidad de desmina y vimentina citoplasmática y la tercera columna representa la cantidad de dichas proteínas en 15 µg de proteínas del citoesqueleto. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El ± representa el error estándar de la media.

Influencia de los fibratos en la cantidad de desmina y vimentina, tras 24 horas de tratamiento del cultivo con dosis terapéutica

Frasco de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmira	Vimentina	Desmina	Vimentina
Control	1,170±0,108	0,990±0,109	1,305±0,113	0,975±0,104
Bezafibrato	1,260±0,062	1,065±0,106	1,425±0,110	0,795±0,087
Fenofibrato	1,065±0,097	0,855±0,105	1,320±0,105	0,675±0,061
Gemfibrozilo	1,155±0,112	1,005±0,114	1,440±0,106	0,705±0,092

TABLA XXXVII

Hemos determinado la cantidad (μg) de desmina y vimentina que contienen cada uno de los frascos de cultivo tras el tratamiento con los distintos fibratos (bezafibrato, fenofibrato y gemfibrozilo) a la dosis terapéutica plasmática durante 24 horas. La primera columna representa a los distintos fármacos ensayados, la segunda la desmina y vimentina citoplasmática y la tercera la cantidad de dichas proteínas en el citoesqueleto; debajo de cada valor proteico, entre paréntesis, se representa la cantidad (μg) de dicha proteína que corresponde a cada célula viva. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Influencia de los fibratos en la cantidad (μg) de desmina y vimentina de los cultivos, tras 24 horas de tratamiento con dosis terapéutica

Frasco de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
Control	86,970 \pm 10,158	73,590 \pm 9,934	12,919 \pm 1,497	9,652 \pm 1,317
	(9,6 x 10 ⁻⁶)	(8,1 x 10 ⁻⁶)	(1,4 x 10 ⁻⁶)	(1,0 x 10 ⁻⁶)
Bezafib.	89,124 \pm 5,388	75,331 \pm 8,512	11,162 \pm 0,570	6,227 \pm 0,167
	(9,9 x 10 ⁻⁶)	(8,3 x 10 ⁻⁶)	(1,2 x 10 ⁻⁶)	(0,6 x 10 ⁻⁶)
Fenofib.	75,047 \pm 7,532	60,249 \pm 7,975	15,400 \pm 2,175	7,875 \pm 1,202
	(8,3 x 10 ⁻⁶)	(6,6 x 10 ⁻⁶)	(1,7 x 10 ⁻⁶)	(0,8 x 10 ⁻⁶)
Gemfib.	81,389 \pm 7,976	70,819 \pm 8,107	15,456 \pm 1,653	7,567 \pm 1,200
	(9,0 x 10 ⁻⁶)	(7,8 x 10 ⁻⁶)	(1,7 x 10 ⁻⁶)	(0,8 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXXVIII

A partir de cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H., sembrados a una densidad de 1.000.000 células/ml, a los tres días de cultivo cuando la monocapa celular formada ha cubierto toda la superficie de cultivo, hemos añadido a los cultivos los diferentes fibratos a una dosis tóxica (0,1% p/v), habiéndose sembrado un cuarto frasco de cultivo como control, al cual no se le añade ningún fármaco. Tras 24 horas de interacción de los fármacos con los miocardiocitos en cultivo, éstos fueron recogidos y homogeneizados; después de realizado el subfraccionamiento celular, se determinó la concentración proteica (mg/ml) en los diversos homogenados, subfracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas obtenidas. Debajo de cada resultado, entre parentesis, se expresan el contenido proteico en μg correspondiente a cada célula viable en el cultivo. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Influencia de la dosis tóxica de fibratos sobre la concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo

Frasco de cultivo	Homogenado	Fracción Citoplasmática	Fracción Citoesquelética
Control	1,136±0,027 (126,2 x 10 ⁻⁶)	1,077±0,017 (119,6 x 10 ⁻⁶)	0,482±0,026 (26,7 x 10 ⁻⁶)
Bezafibrato	1,201±0,027 (133,4 x 10 ⁻⁶)	0,857±0,030 (95,2 x 10 ⁻⁶)	0,749±0,025 (41,6 x 10 ⁻⁶)
Fenofibrato	0,764±0,011 (84,8 x 10 ⁻⁶)	0,465±0,052 (51,6 x 10 ⁻⁶)	0,409±0,004 (22,7 x 10 ⁻⁶)
Gemfibrozilo	0,387±0,002 (43,0 x 10 ⁻⁶)	0,167±0,004 (18,5 x 10 ⁻⁶)	0,400±0,030 (22,2 x 10 ⁻⁶)

TABLA XXXIX

Los cultivos de miocardiocitos son tratados durante 24 horas con los diferentes fibratos (bezafibrato, fenofibrato y gemfibrozilo) a una dosis tóxica (0,1% p/v), posteriormente son separadas las fracciones subcelulares y las proteínas que la constituyen son corridas electroforéticamente mediante SDS-PAGE (geles 12%). Las bandas proteicas de los geles son leídas mediante densitómetro, determinándose la cantidad (μg) de cada proteína que forma parte de los 15 μg de proteínas totales corrida en cada carril. La primera columna representa los fármacos añadidos al cultivo, la segunda la cantidad de desmina y vimentina citoplasmática y la tercera columna representa la cantidad de dichas proteínas en 15 μg de proteínas del citoesqueleto. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Influencia de los fibratos en la cantidad de desmina y vimentina, tras 24 horas de tratamiento del cultivo con dosis tóxica

Frasco de cultivo	<u>Citoplasma</u>		<u>Citoesqueleto</u>	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
Control	1,245 \pm 0,108	0,975 \pm 0,085	0,675 \pm 0,041	0,240 \pm 0,187
Bezafibrato	0,855 \pm 0,093	1,170 \pm 0,106	1,785 \pm 0,177	0,615 \pm 0,065
Fenofibrato	1,020 \pm 0,068	1,335 \pm 0,099	1,800 \pm 0,124	0,465 \pm 0,033
Gemfibrozilo	0,480 \pm 0,034	1,305 \pm 0,111	1,983 \pm 0,179	0,390 \pm 0,038

TABLA XL

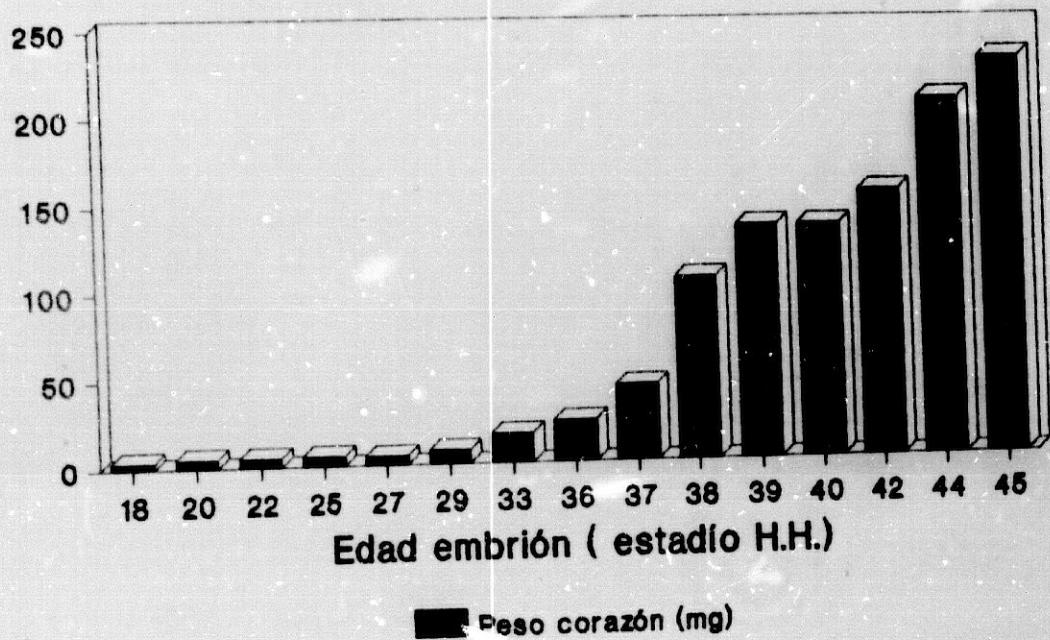
Hemos determinado la cantidad (μg) de desmina y vimentina que contienen cada uno de los frascos de cultivo tras el tratamiento con los distintos fibratos (bezafibrato, fenofibrato y gemfibrozilo) a una dosis tóxica (0,1% p/v) durante 24 horas. La primera columna representa a los distintos fármacos ensayados, la segunda la desmina y vimentina citoplasmática y la tercera la cantidad de dichas proteínas en el citoesqueleto; debajo de cada valor proteico, entre paréntesis, se representa la cantidad (μg) de dicha proteína que corresponde a cada célula viva. Los resultados se expresan como la media de 3 experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Influencia de los fibratos en la cantidad (μg) de desmina y vimentina de los cultivos, tras 24 horas de tratamiento con dosis tóxica

Frasco de cultivo	Citoplasma		Citoesqueleto	
	Desmina	Vimentina	Desmina	Vimentina
Control	89,391 \pm 8,385	70,005 \pm 6,385	10,845 \pm 1,279	3,856 \pm 0,488
	(9,9 x 10 ⁻⁶)	(7,7 x 10 ⁻⁶)	(1,2 x 10 ⁻⁶)	(0,4 x 10 ⁻⁶)
Bezafib.	48,849 \pm 7,209	66,846 \pm 8,608	44,565 \pm 6,054	15,354 \pm 2,190
	(5,4 x 10 ⁻⁶)	(7,4 x 10 ⁻⁶)	(4,9 x 10 ⁻⁶)	(1,7 x 10 ⁻⁶)
Fenofib.	31,620 \pm 5,879	41,385 \pm 5,172	24,540 \pm 1,947	6,339 \pm 0,379
	(3,5 x.10 ⁻⁶)	(4,5 x 10 ⁻⁶)	(2,7 x 10 ⁻⁶)	(0,7 x 10 ⁻⁶)
Gemfib.	5,344 \pm 0,515	14,529 \pm 1,613	26,440 \pm 4,548	5,200 \pm 1,078
	(0,5 x 10 ⁻⁶)	(1,6 x 10 ⁻⁶)	(2,9 x 10 ⁻⁶)	(0,5 x 10 ⁻⁶)

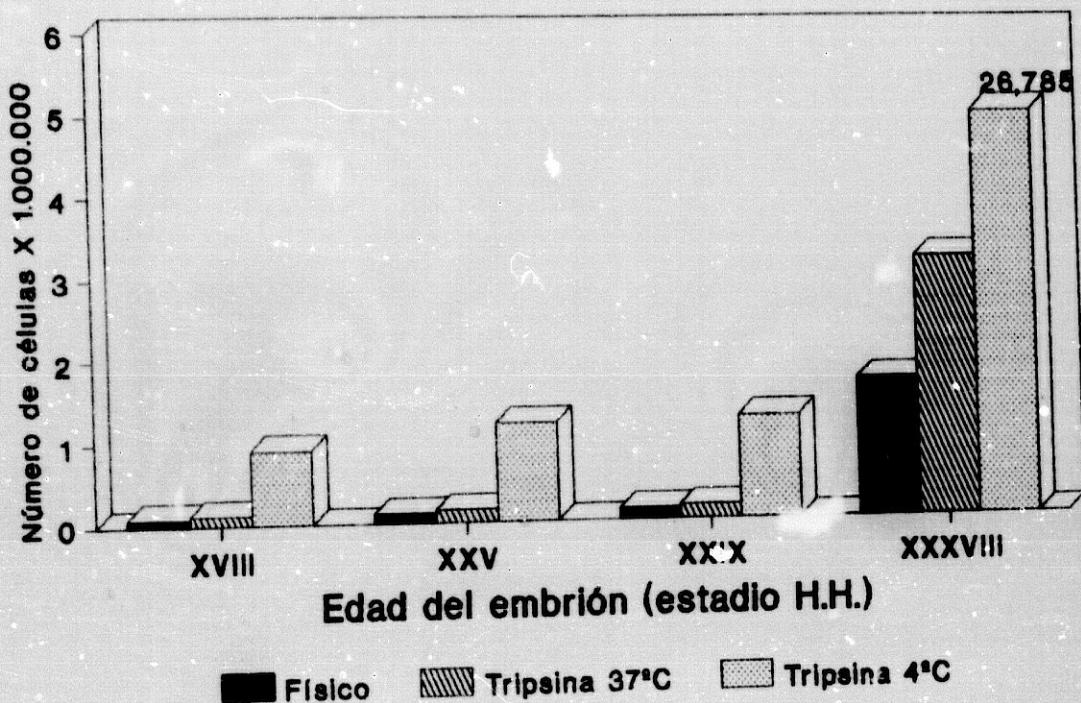
GRAFICAS

Evolución de la masa cardíaca En el desarrollo embrionario del pollo

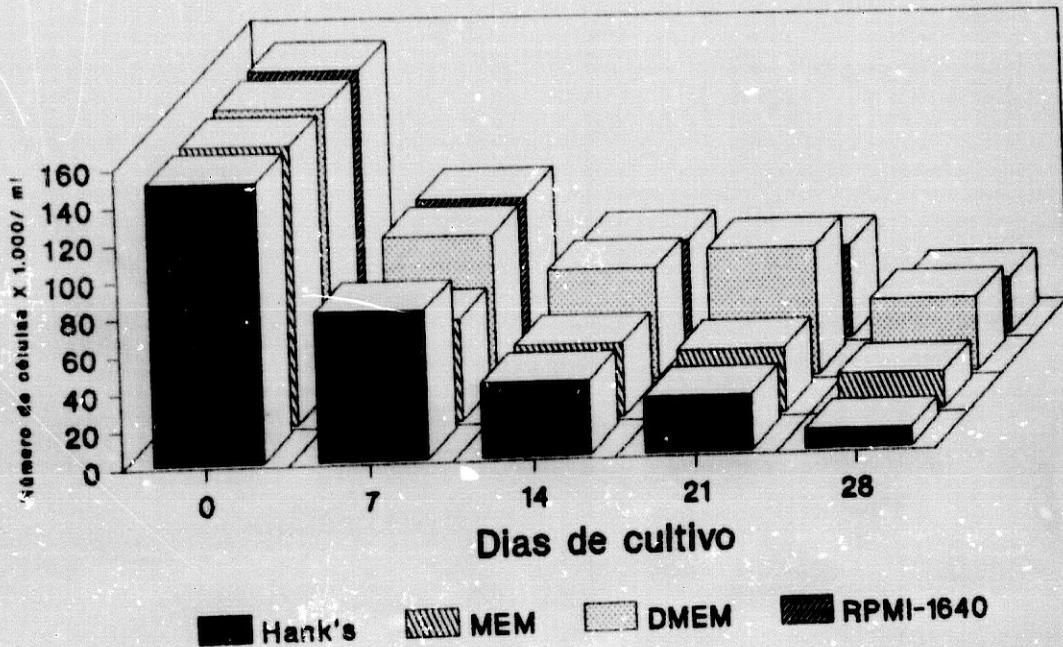


Número de células aisladas por corazón

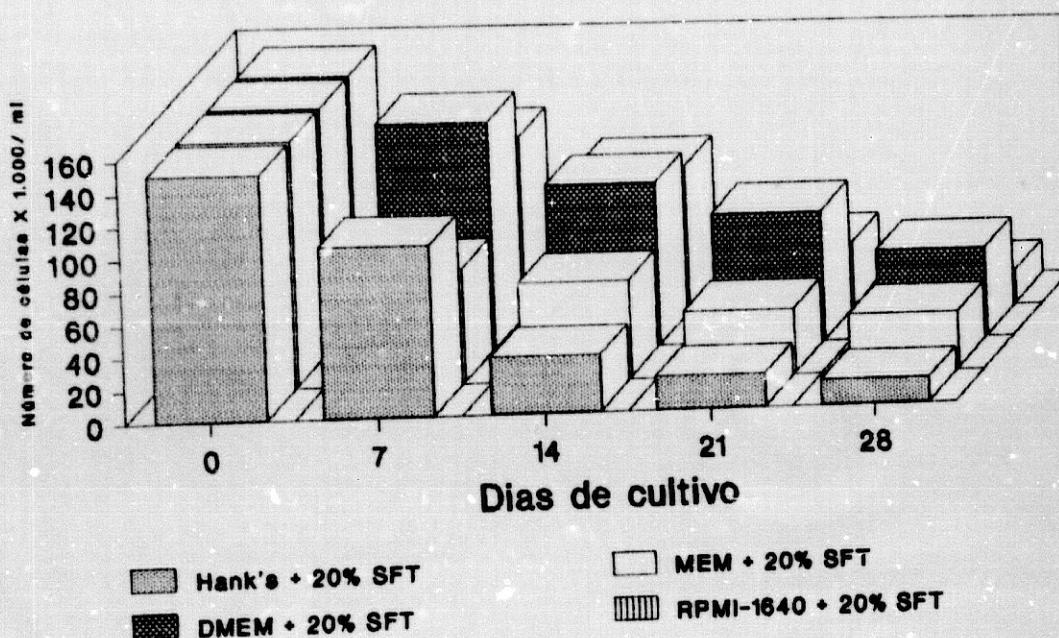
Métodos de disgregación tisular



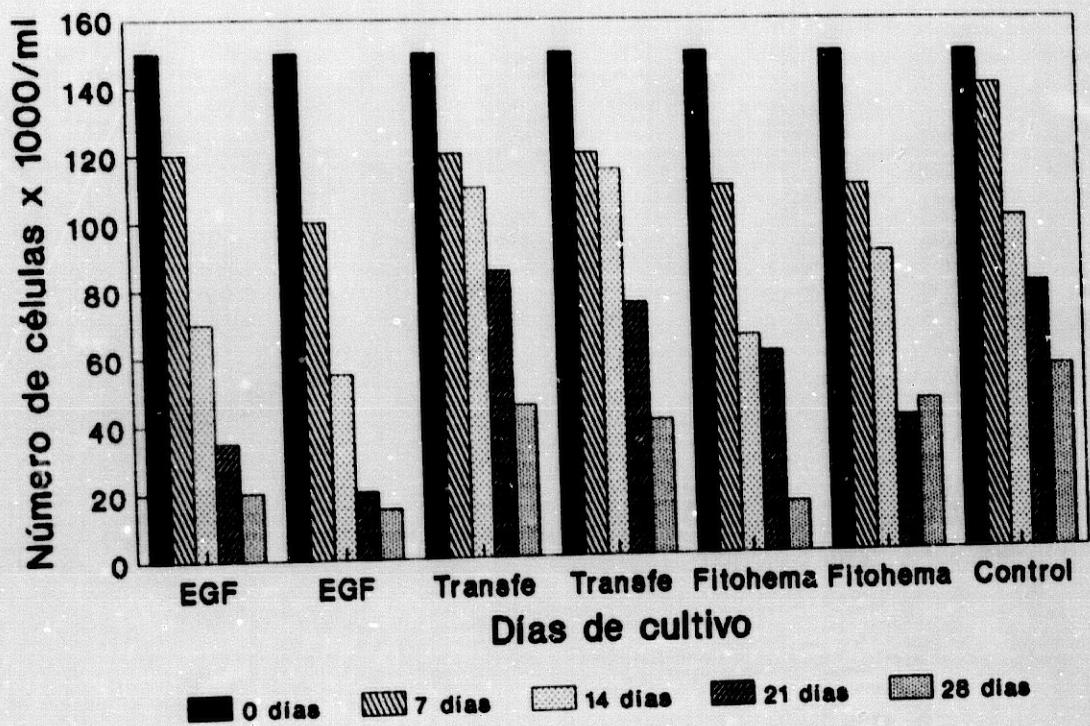
Evolución población celular Cultivos primarios



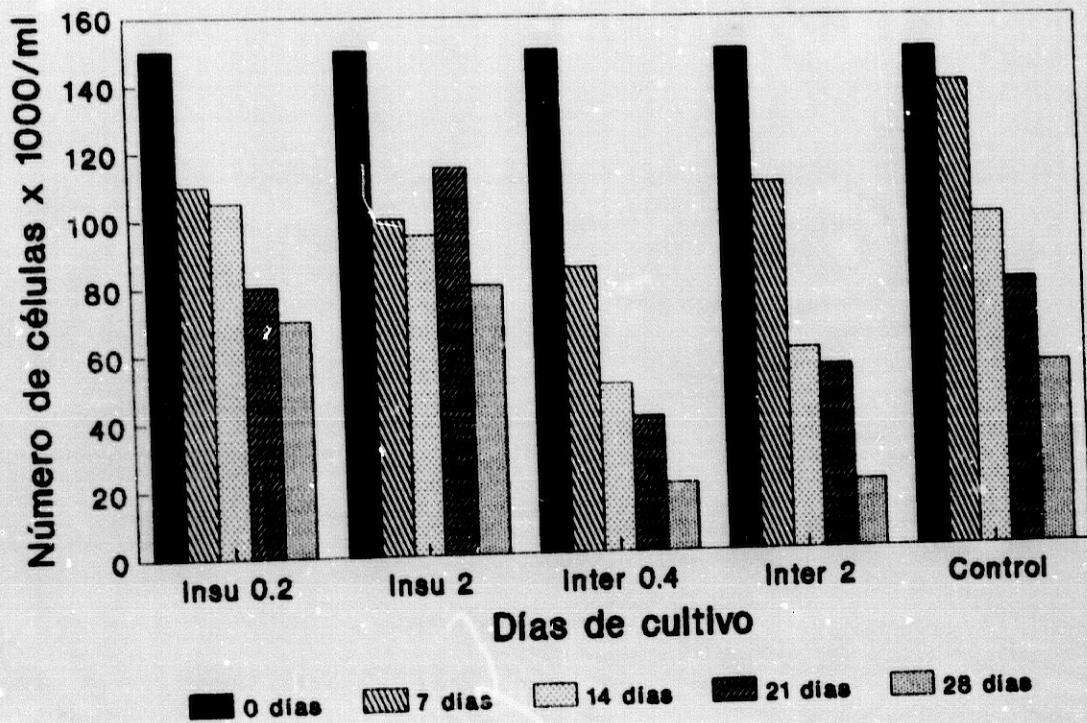
Evolución población celular Cultivos primarios



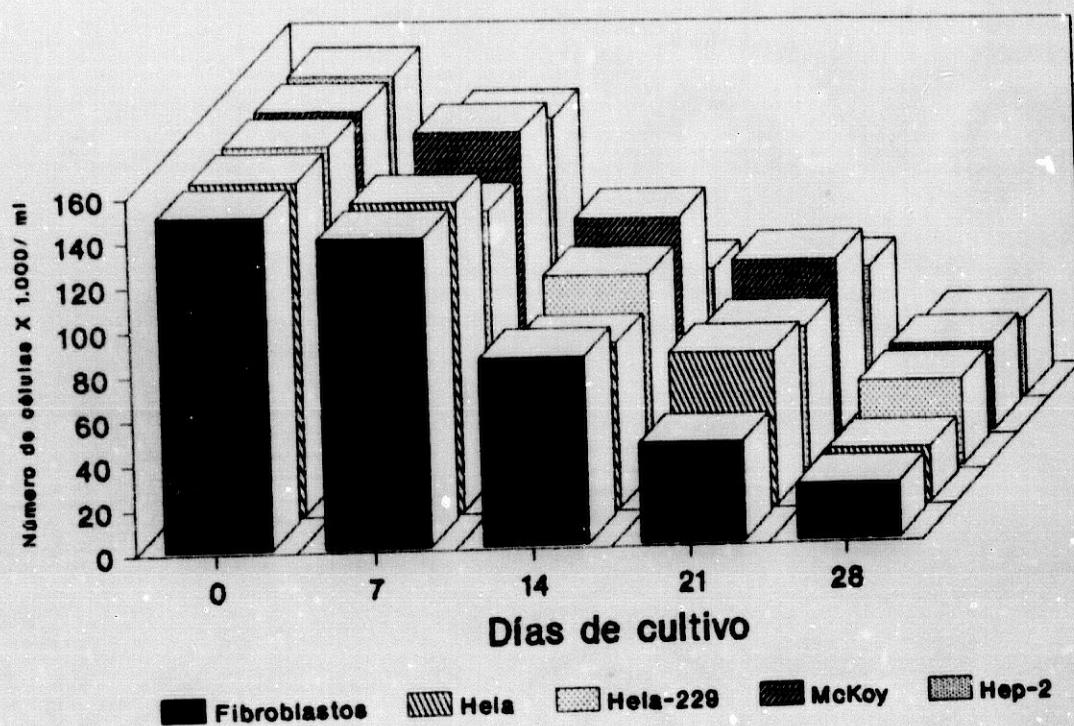
Influencia de factores de crecimiento



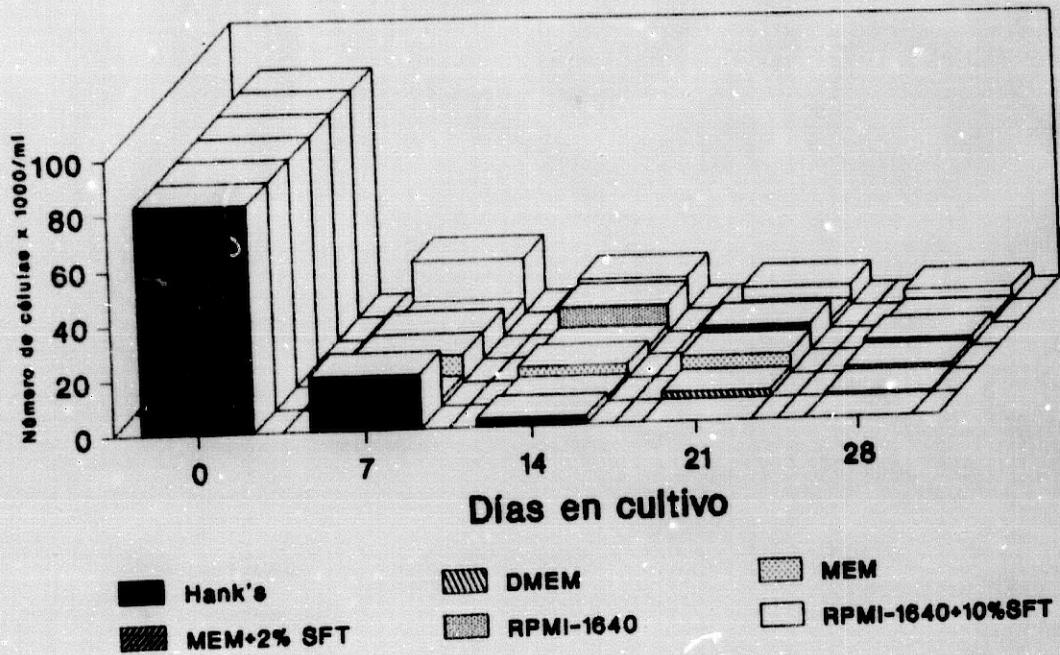
Influencia de factores de crecimiento



Influencia sobrenadantes de cultivos

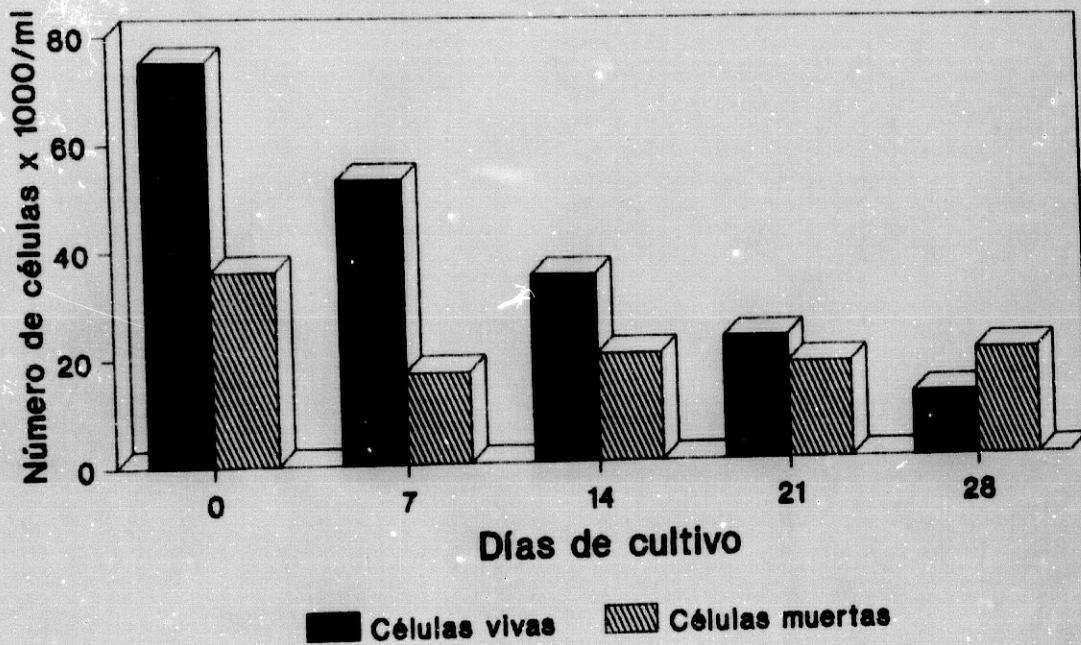


Evolución de cultivos secundarios Medios de cultivo



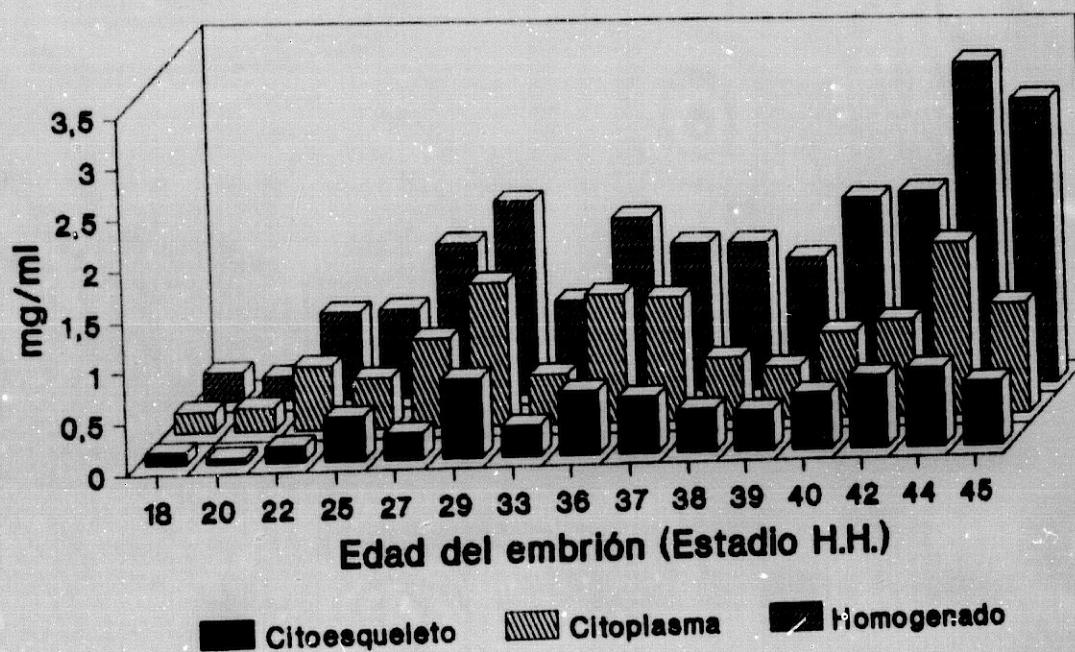
Cultivos miocardiocitos humanos

Evolución de la población celular

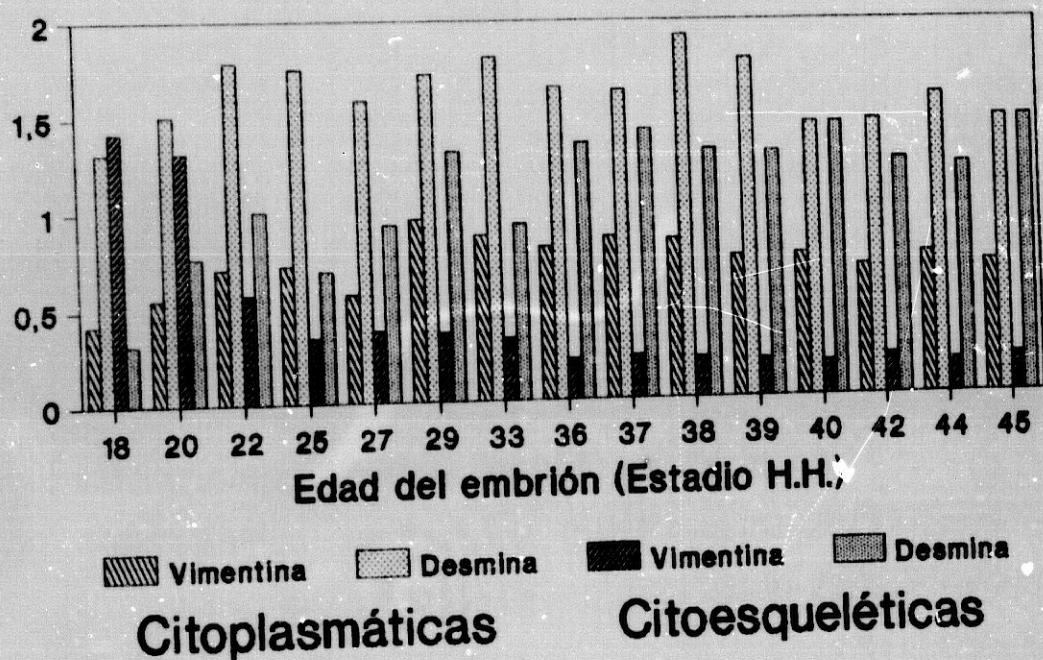


Contenido proteico del corazón

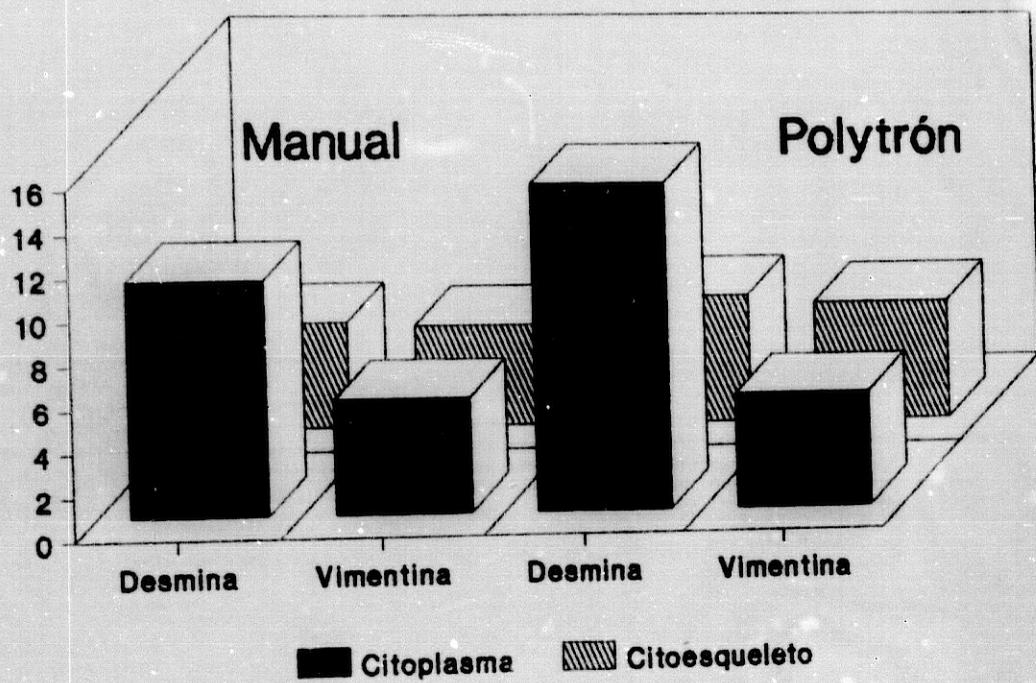
Desarrollo embrionario pollo



Contenido Desmina y Vimentina ($\mu\text{g}/15 \mu\text{g}$ proteínas totales) en embrión de pollo

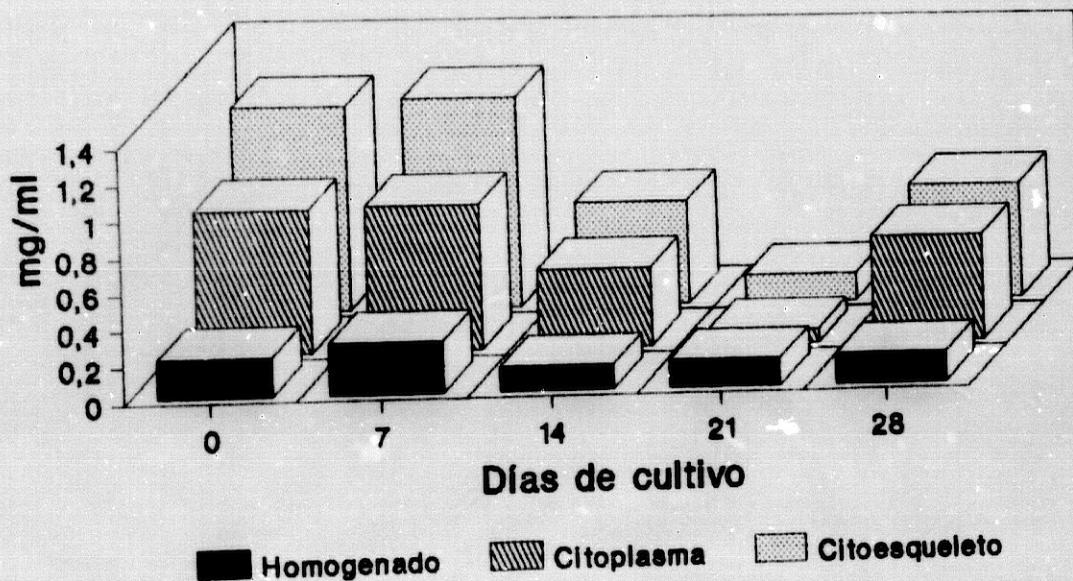


Contenido (μg) desmina vimentina Para 100 mg de miocardio adulto humano

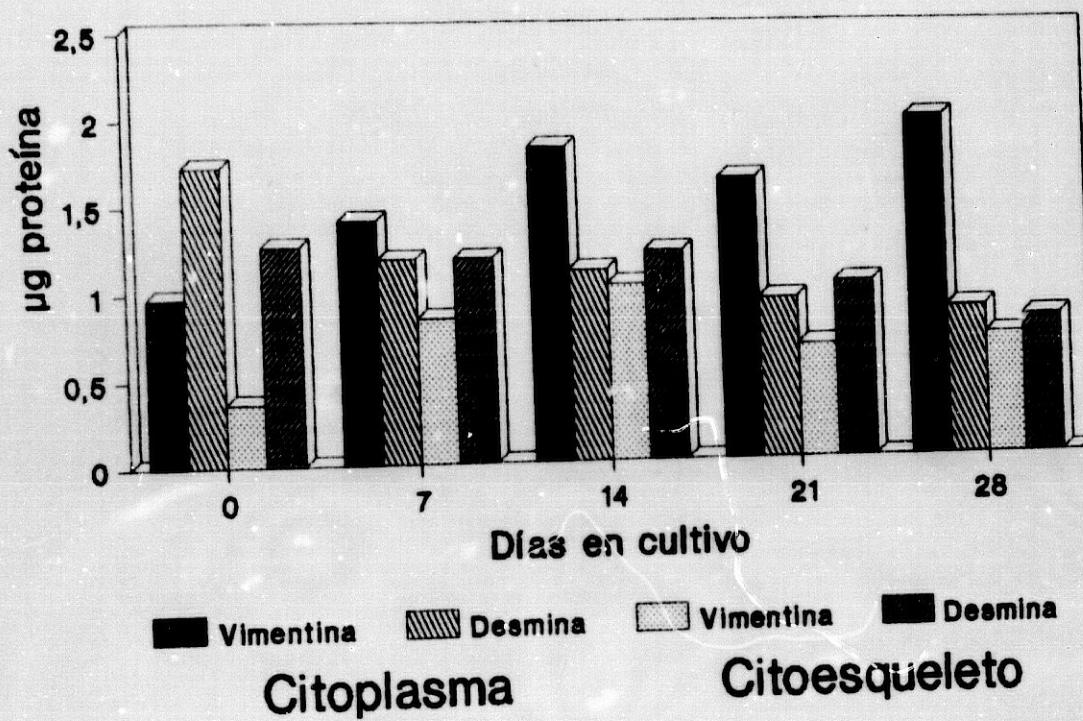


Concentración proteica

Cultivo de miocardiocitos del estadio XXIX H.H.

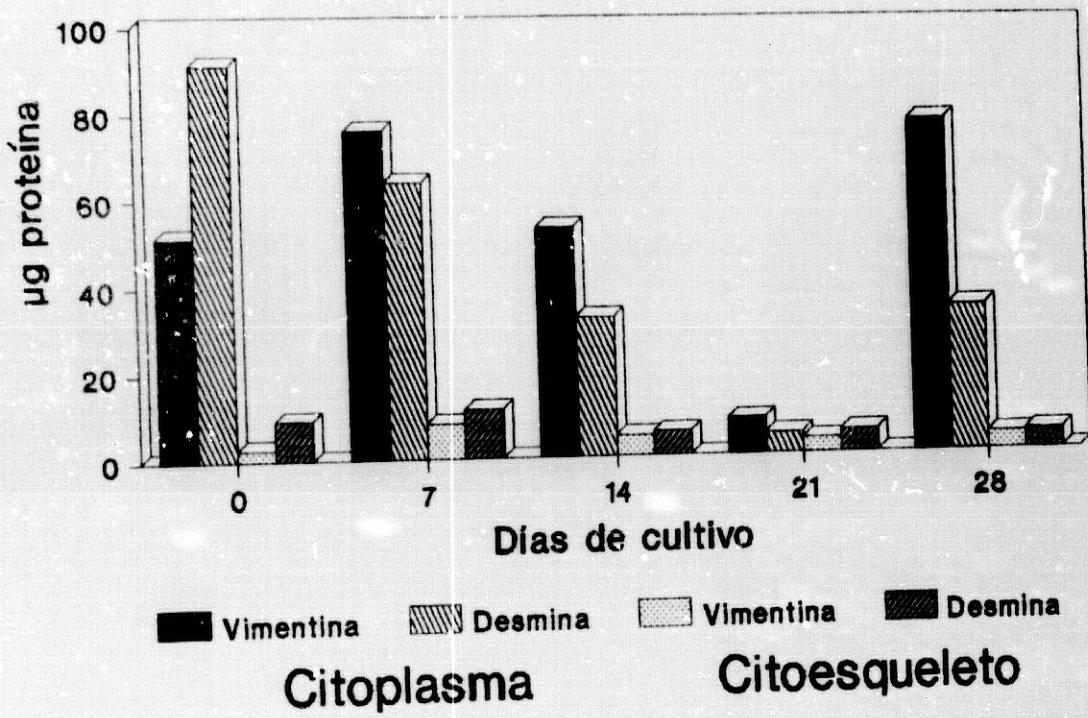


Cantidad de desmina y vimentina
En 15 µg de proteínas .
Estadio XXIX H.H.



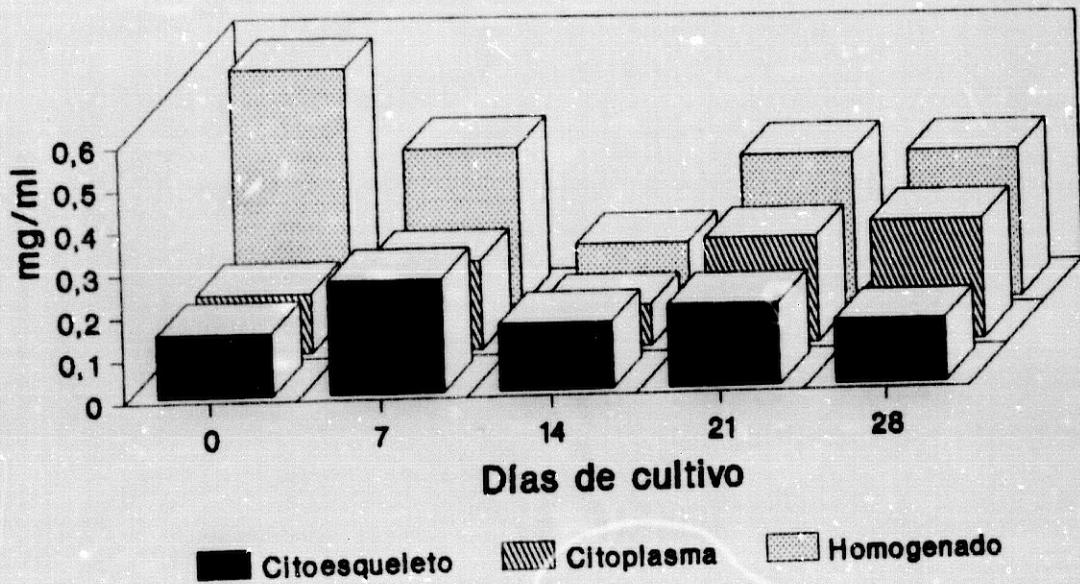
Contenido en Desmina y Vimentina

Cultivo de células
Estadio XXIX H.H.

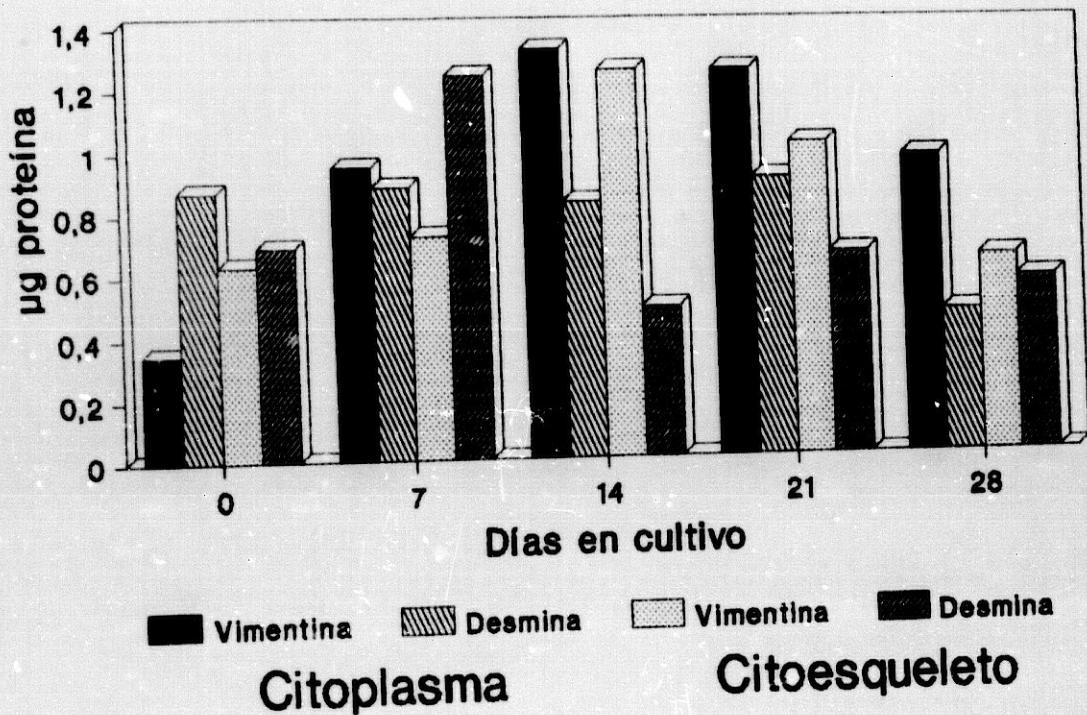


Concentración Proteica

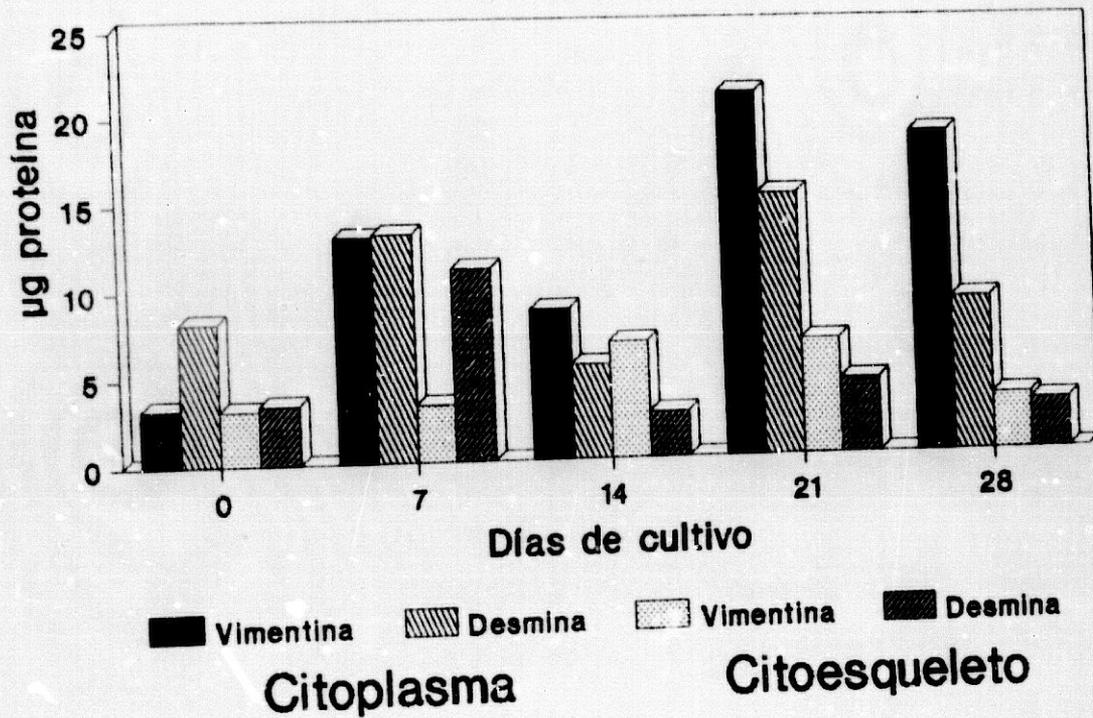
Miocardiocitos humanos adultos en cultivo



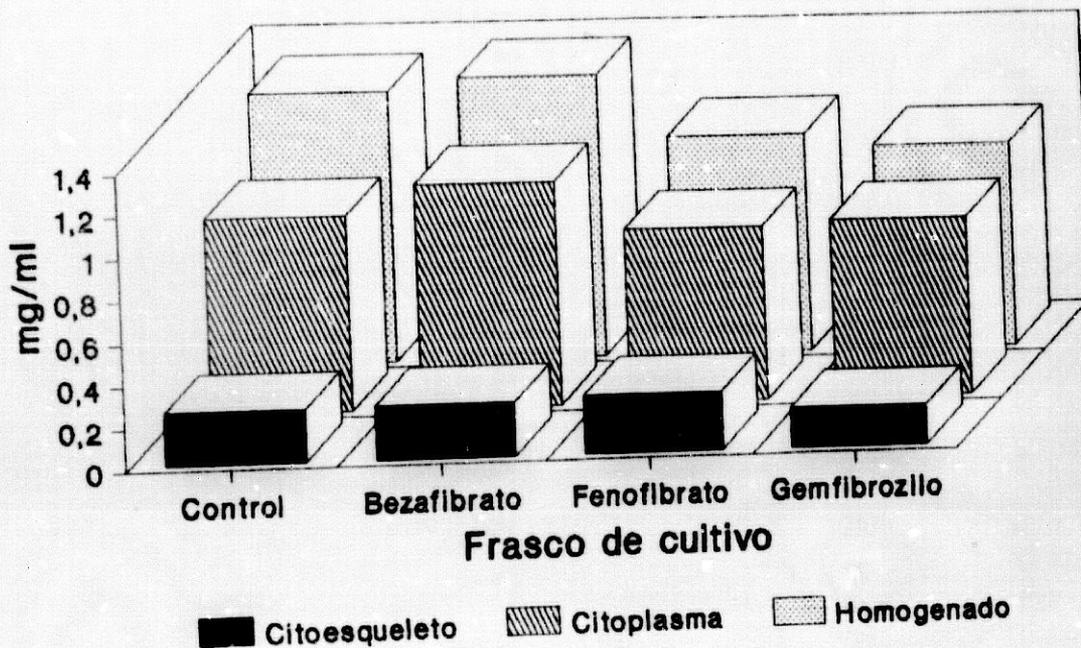
Cantidad Desmina y Vimentina En 15 µg de proteínas Miocardiocito humano adulto



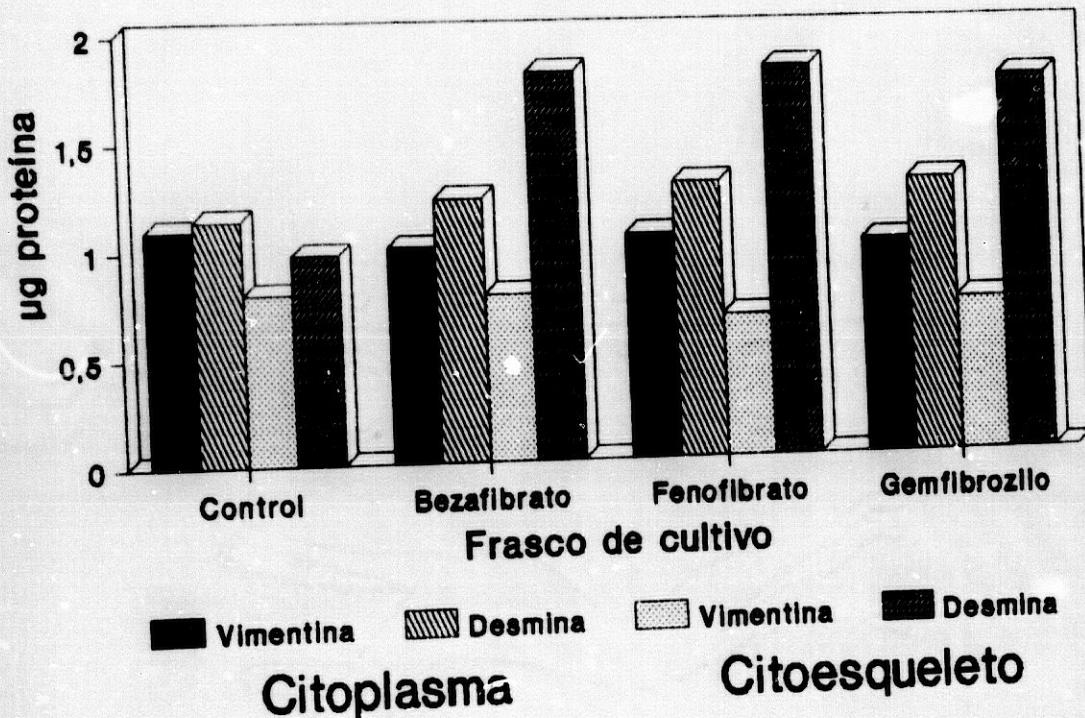
Contenido en Desmina y Vimentina En miocardiocitos humanos adultos en cultivo



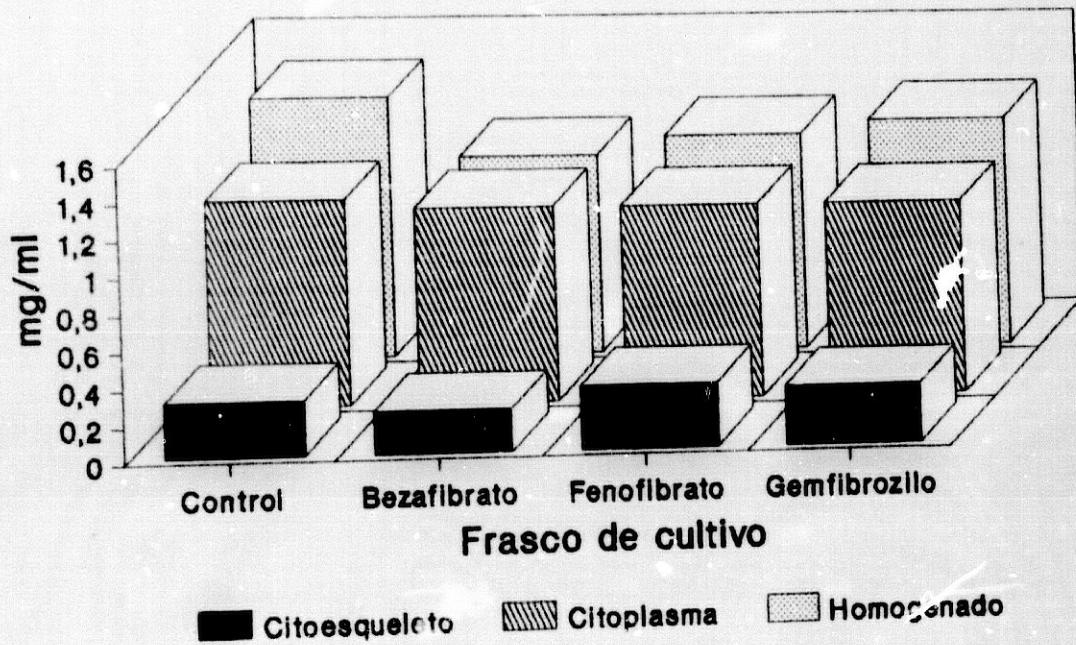
Influencia de la dosis terapéutica de fibratos sobre la concentración proteica en miocardiocitos (a las 6h)



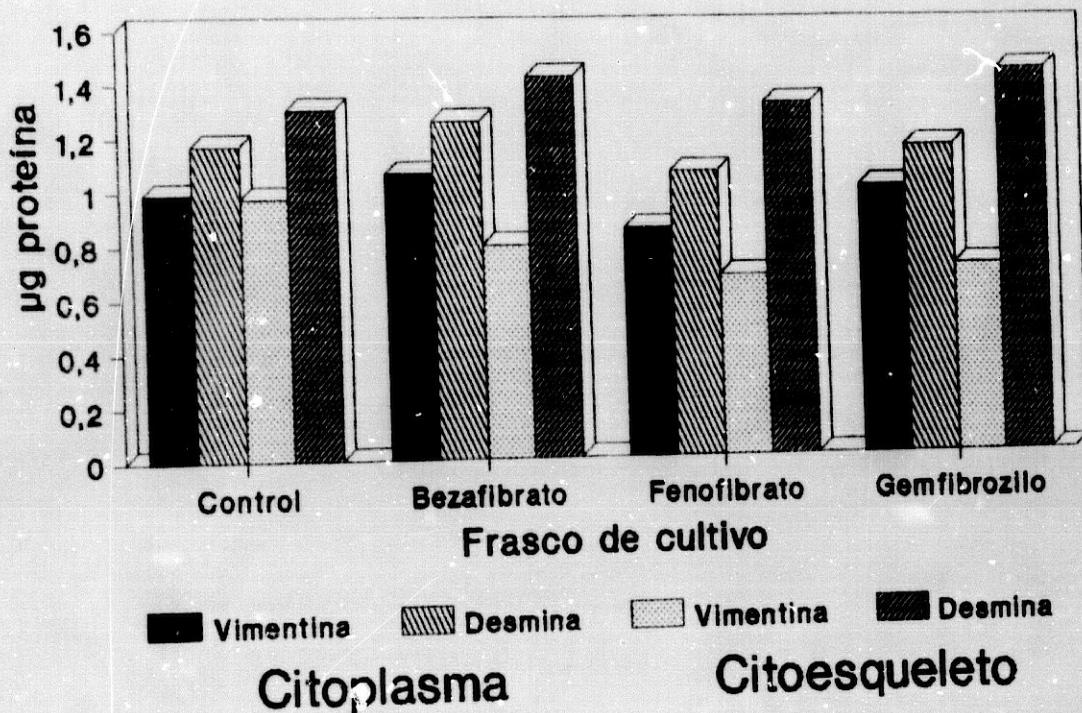
Influencia de la dosis terapéutica de fibratos sobre la cantidad de desmina y vimentina (a las 6h)



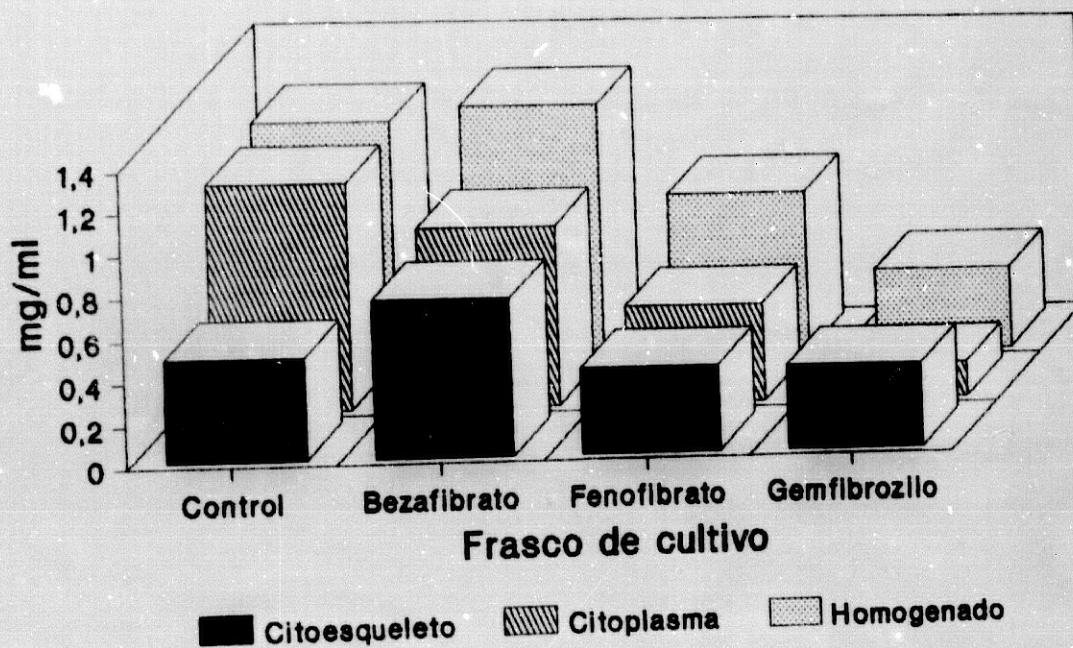
Influencia de la dosis terapéutica de fibratos sobre la concentración proteica en miocardiocitos (a las 24h)



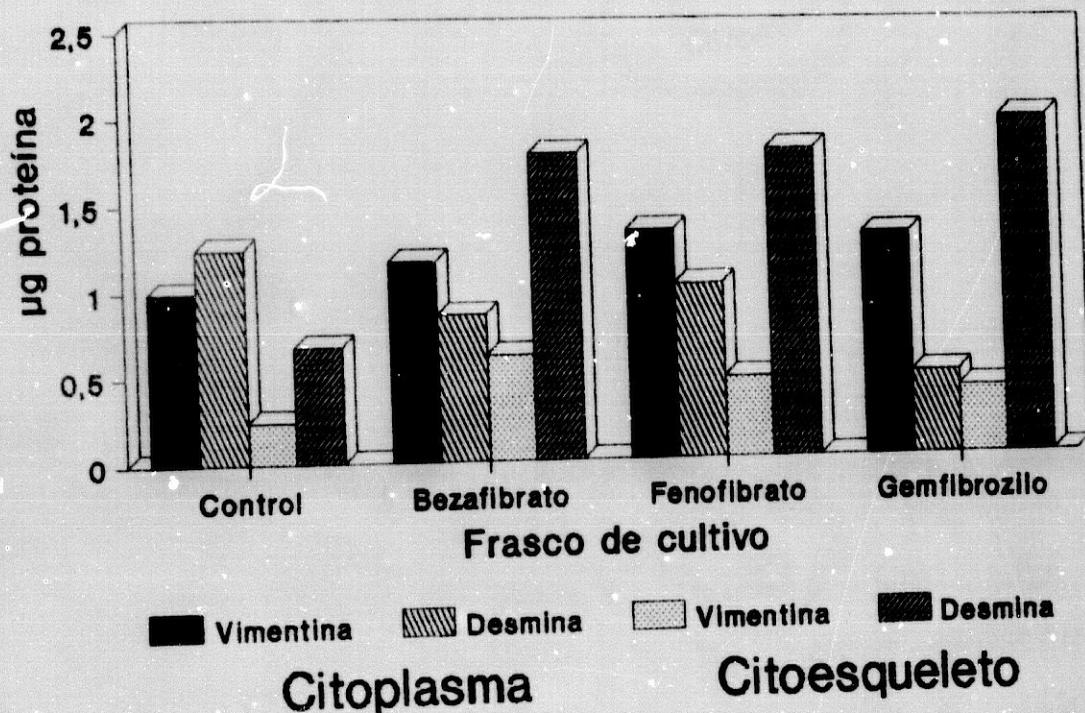
Influencia de la dosis terapéutica de fibratos sobre la cantidad de desmina y vimentina (a las 24h)



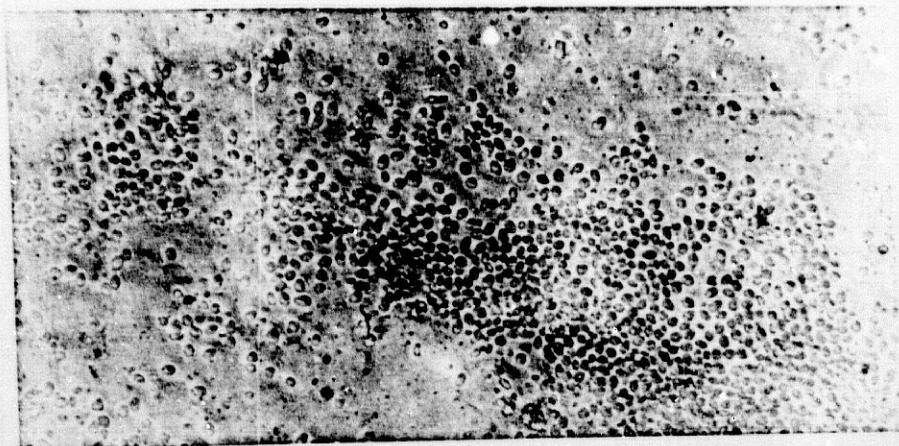
Influencia de la dosis tóxica de fibratos sobre la concentración proteica de miocardiocitos (a las 24h)



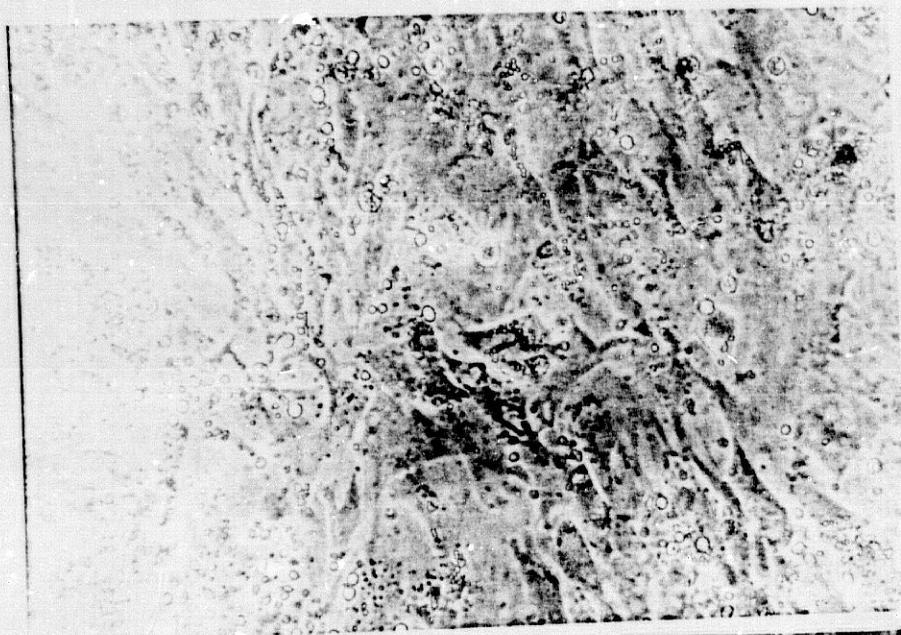
Influencia de la dosis tóxica de fibratos sobre la cantidad de desmina y vimentina (a las 24h)



FIGURAS



A



B



C

Figura 1.- Evolución en cultivo de células miocardiocíticas embrionarias de pollo. A) 2 horas en cultivo (suspensión) (100X), B) 48 horas (adheridas y suspensión) (200X) y C) 3 días monocapa en redes de colágeno) (100X).

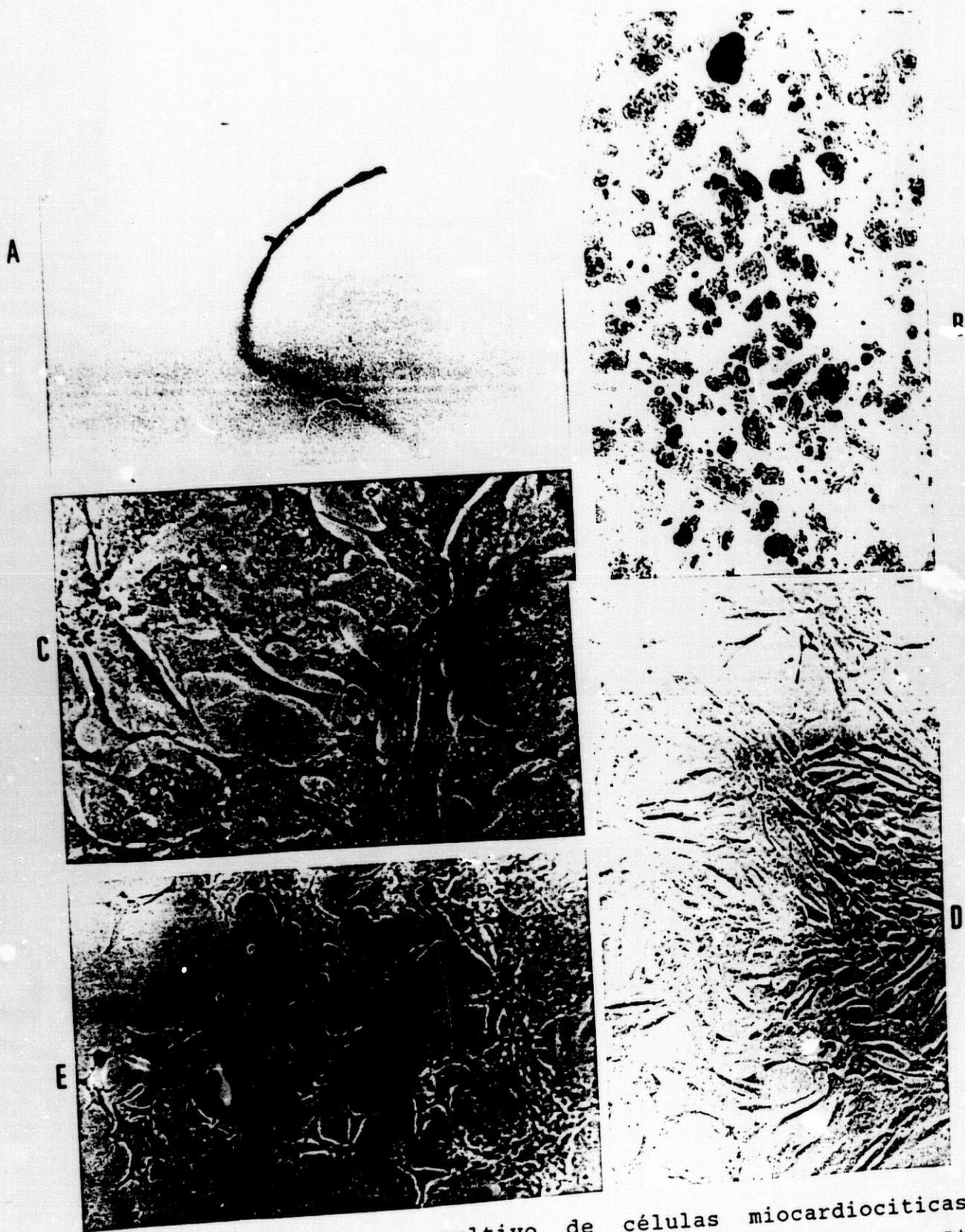
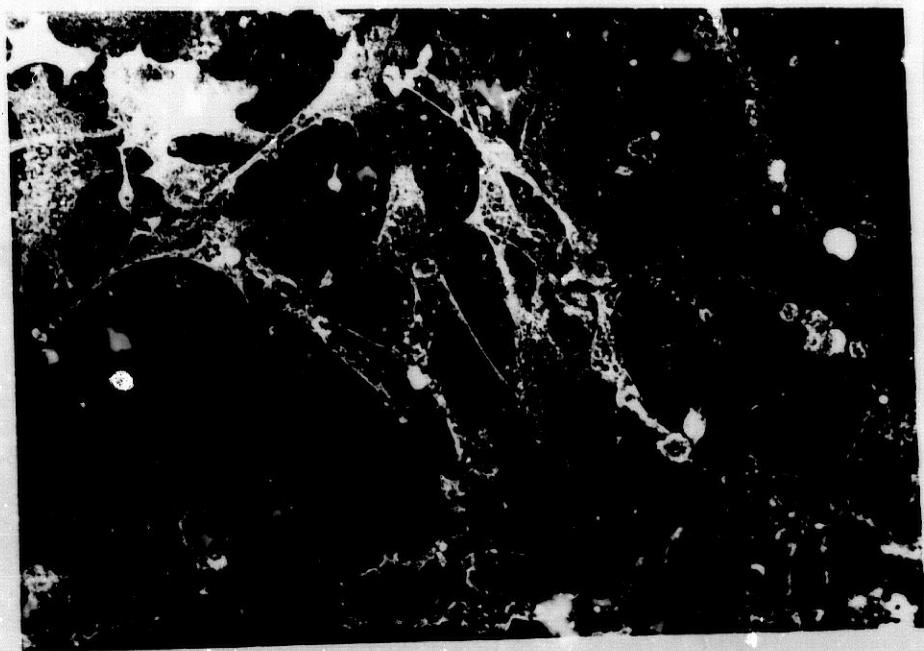
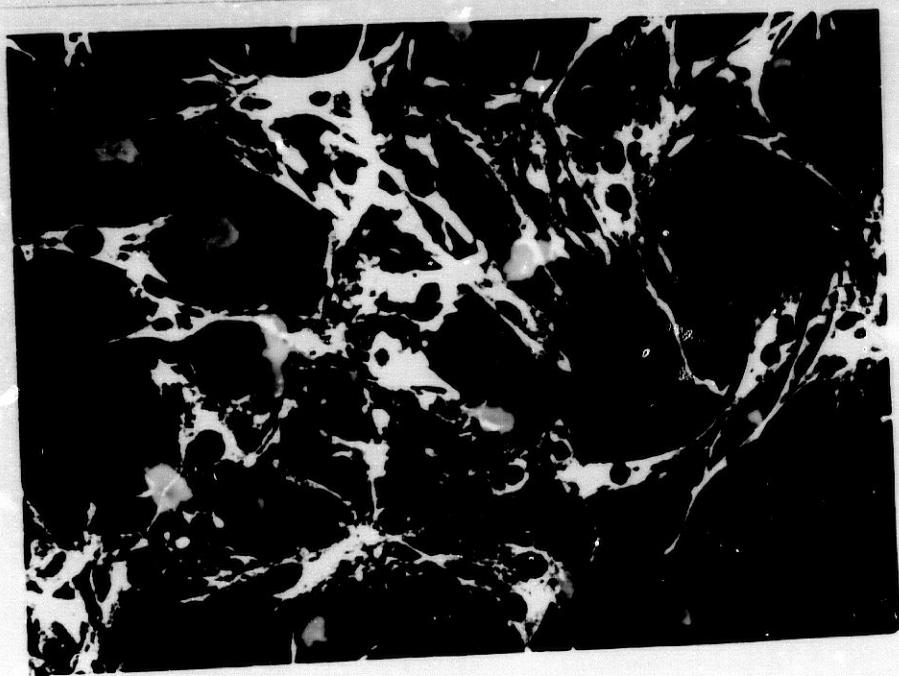


Figura 2.- Evolución en cultivo de células miocardiocíticas humanas adultas. A) Fibra muscular 36 horas cultivo (100X), B) células en cultivo 4 horas (200X), C) 26 días (200X), D) 45 días (100X) y E) 52 días (100X).



A



B

Figura 3.- Inmunofluorescencia indirecta en miocardiocitos embrionarios de pollo en cultivo (200X). A) con anticuerpo monoclonal antidesmina, B) con anticuerpo monoclonal antivimentina.



A



B

Figura 4.- Inmunofluorescencia indirecta en miocardiocitos humanos adultos en cultivo (200X). A) con anticuerpo monoclonal antidesmina, B) con anticuerpo monoclonal antivimentina.

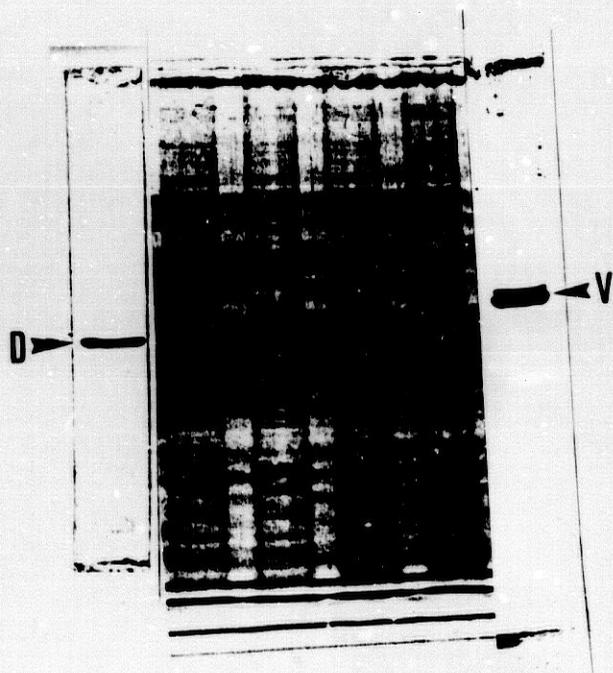


Figura 5.- Inmunoblotting con anticuerpo monoclonal antidesmina (D) y antivimentina (V).

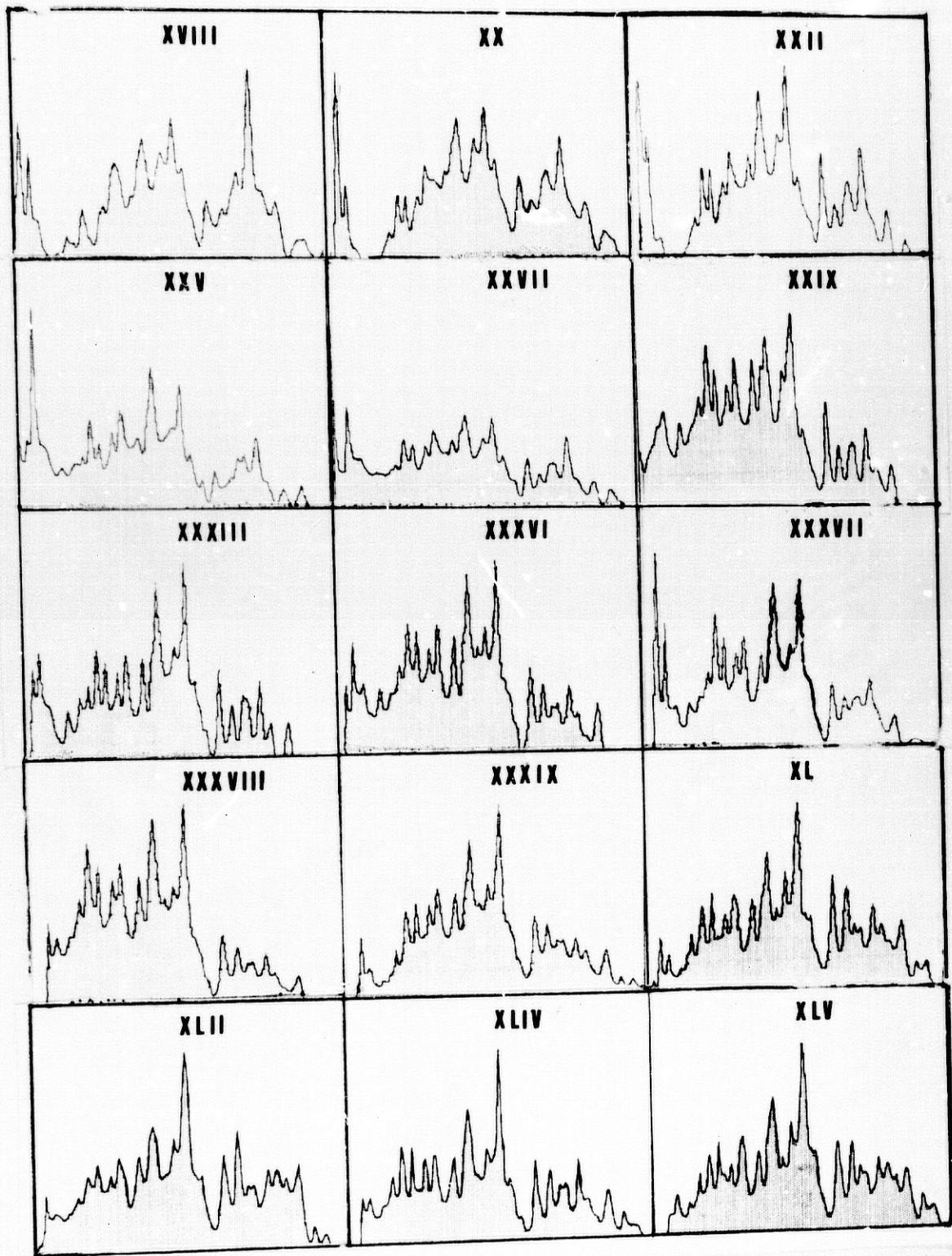


Figura 6.- Estudio densitométrico de la fracción citoplasmática del tejido cardíaco a lo largo del desarrollo embrionario del pollo.

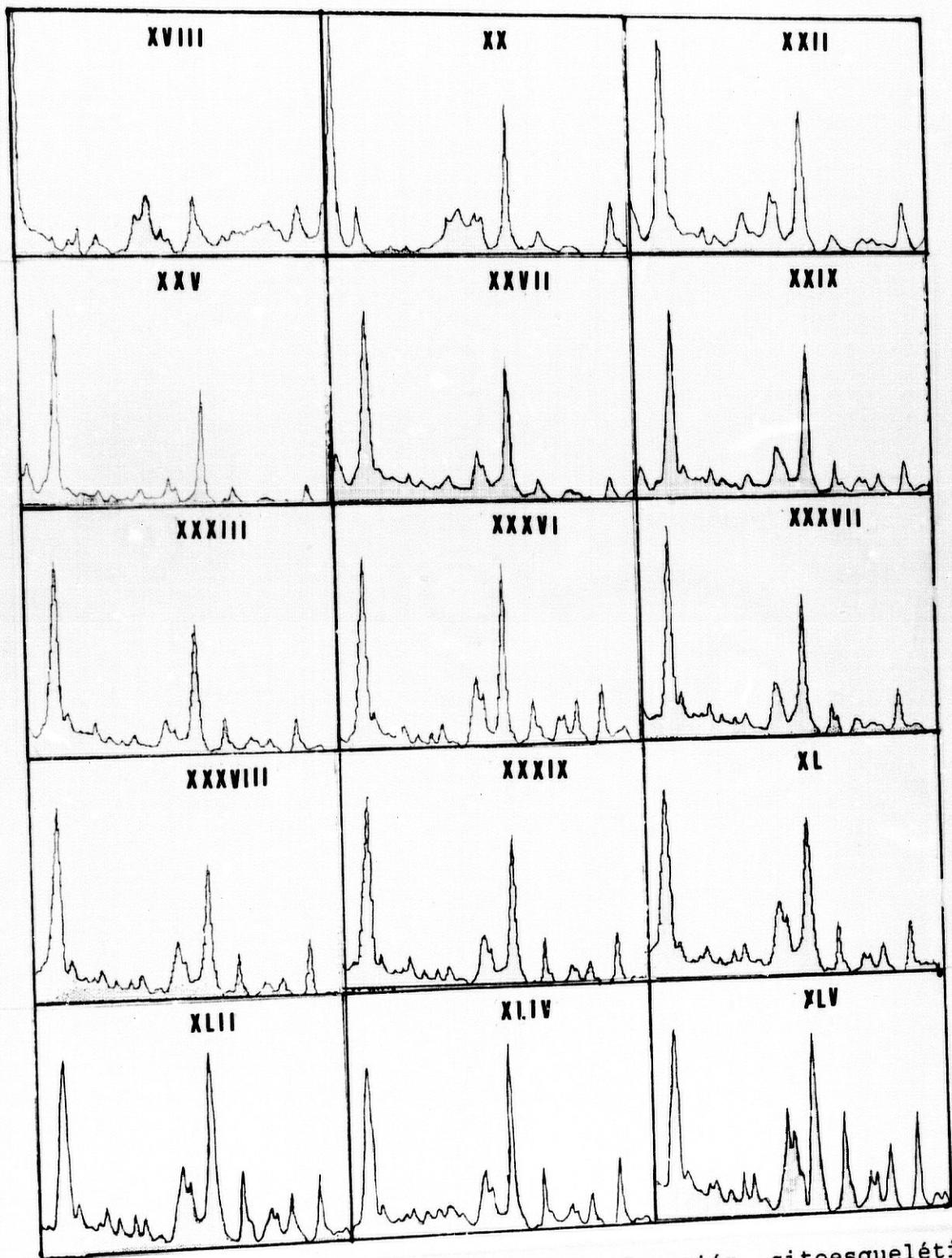


Figura 7.- Estudio densitométrico de la fracción citoesquelética del tejido cardíaco a lo largo del desarrollo embrionario del pollo

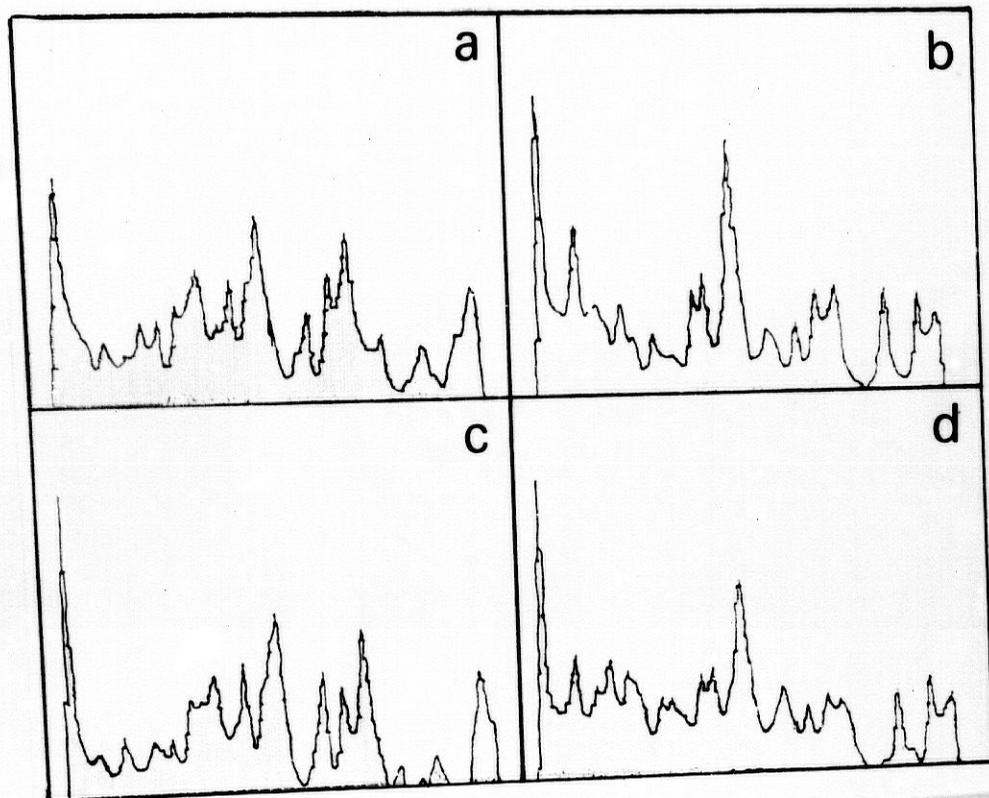


Figura 8.- Estudio densitométrico del tejido cardíaco humano. a) citoplasma homogeneizador manual, b) citoesqueleto homogeneizador manual, c) citoplasma homogeneizador polytrón y d) citoesqueleto homogeneizador manual .

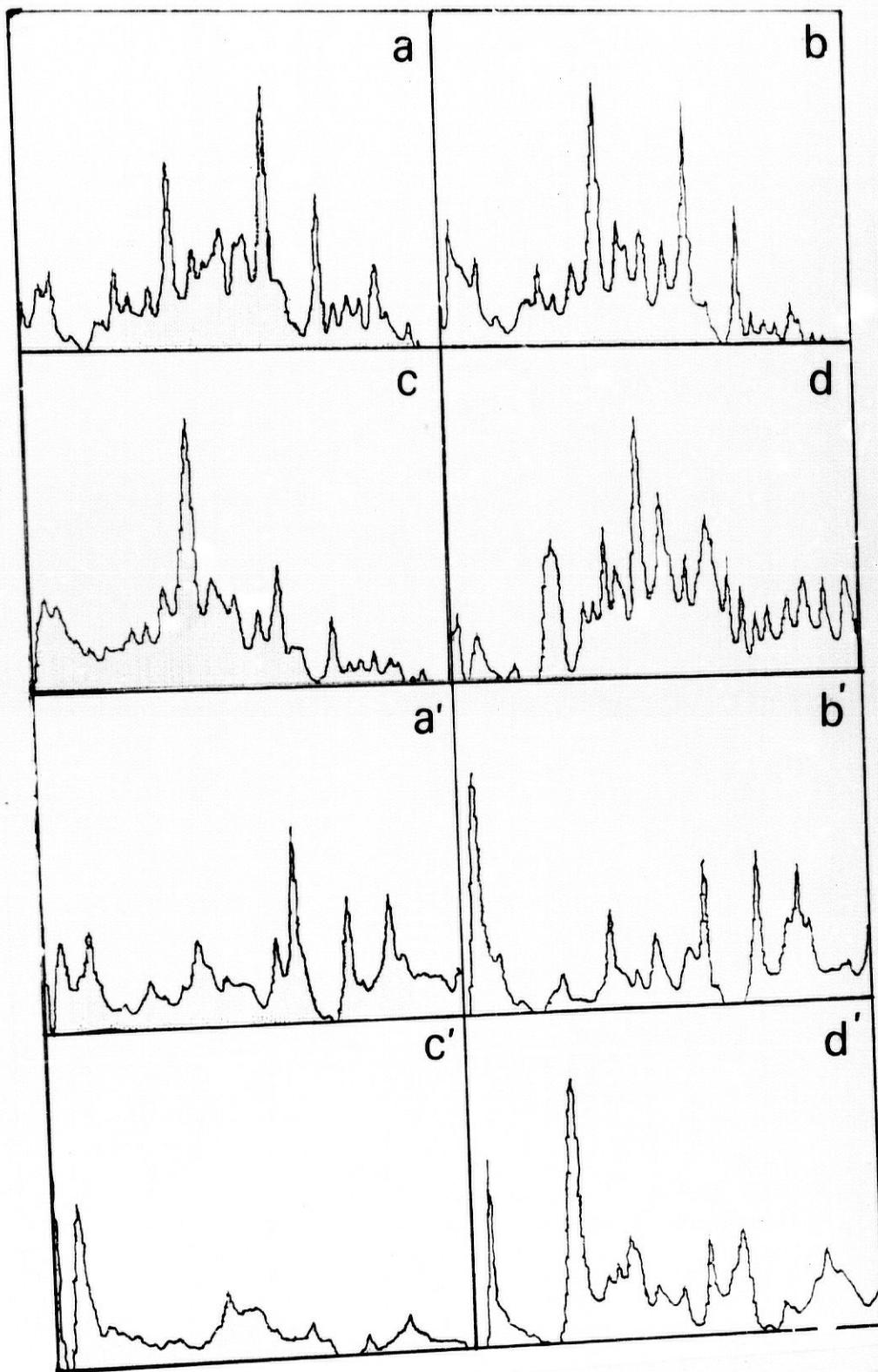


Figura 9.- Estudio densitométrico a lo largo de los días de cultivo de miocardiocitos embrionarios (estadio XXV H.H.).
 Citoplasma : a) 7 días, b) 14 días, c) 21 días y d) 28 días.
 Citoesqueleto: a') 7 días, b') 14 días, c') 21 días y d') 28 días.

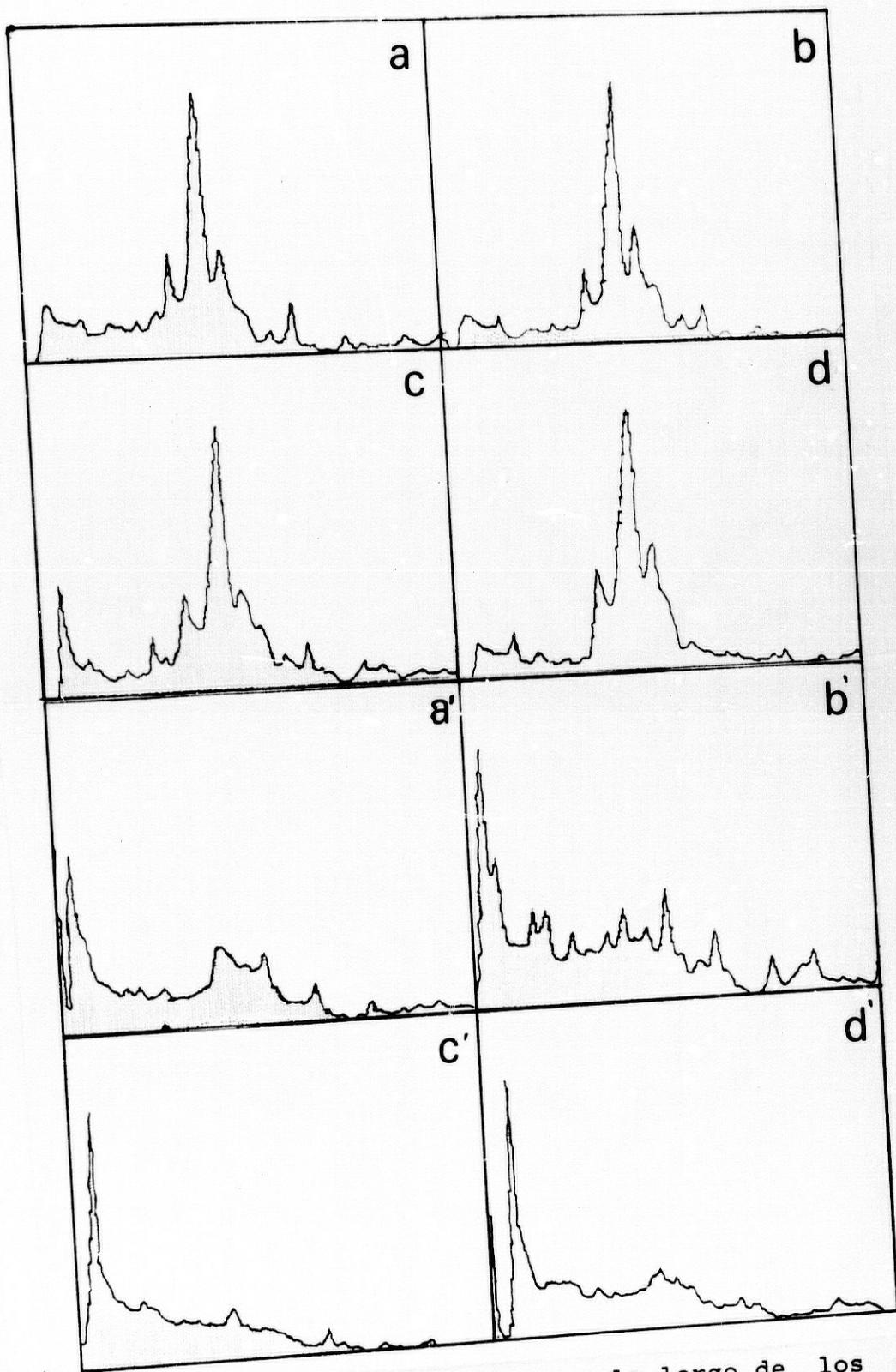


Figura 10.- Estudio densitométrico a lo largo de los días de cultivo de miocardiocitos embrionarios (estadio XXIX H.H.).
 Citoplasma : a) 7 días, b) 14 días, c) 21 días y d) 28 días.
 Citoesqueleto: a') 7 días, b') 14 días, c') 21 días y d') 28 días.

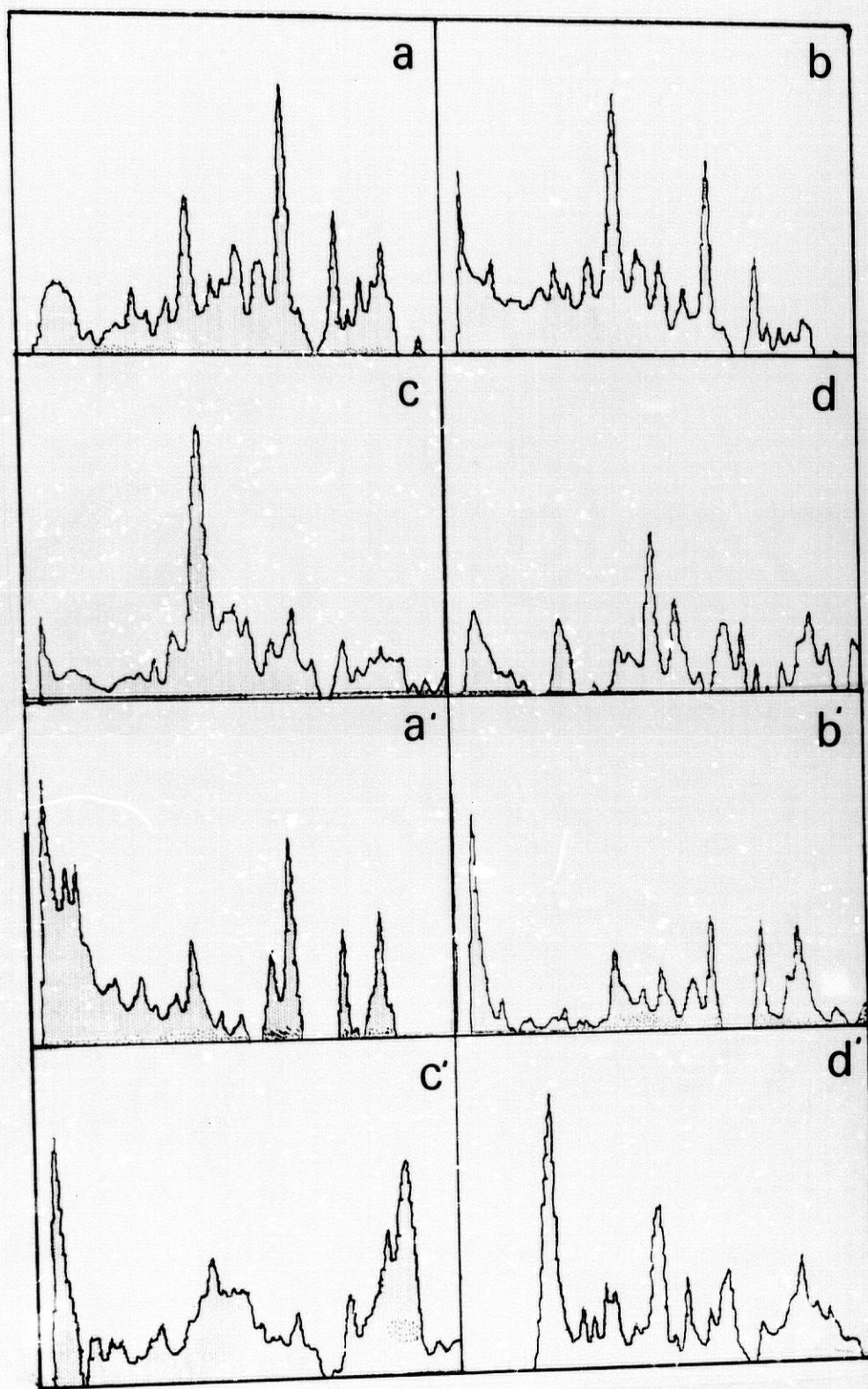


Figura 11.- Estudio densitométrico a lo largo de los días de cultivo de miocardiocitos embrionarios (estadio XXXIX H.H.).
 Citoplasma : a) 7 días, b) 14 días, c) 21 días y d) 28 días.
 Citoesqueleto: a') 7 días, b') 14 días, c') 21 días y d') 28 días.

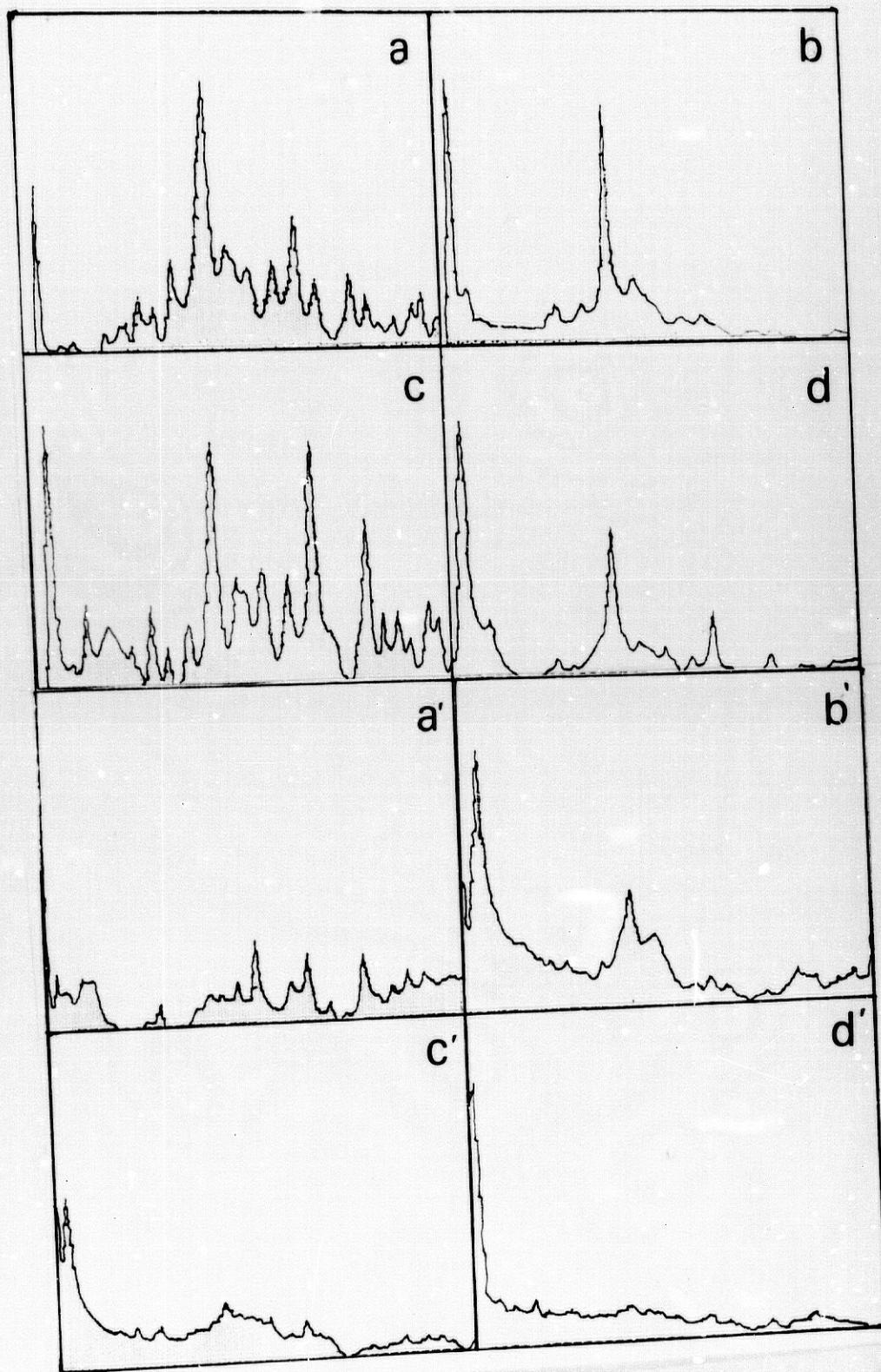


Figura 12.- Estudio densitométrico a lo largo de los días de cultivo de miocardiocitos humanos.
 Citoplasma : a) 7 días, b) 14 días, c) 21 días y d) 28 días.
 Citoesqueleto: a') 7 días, b') 14 días, c') 21 días y d') 28 días.

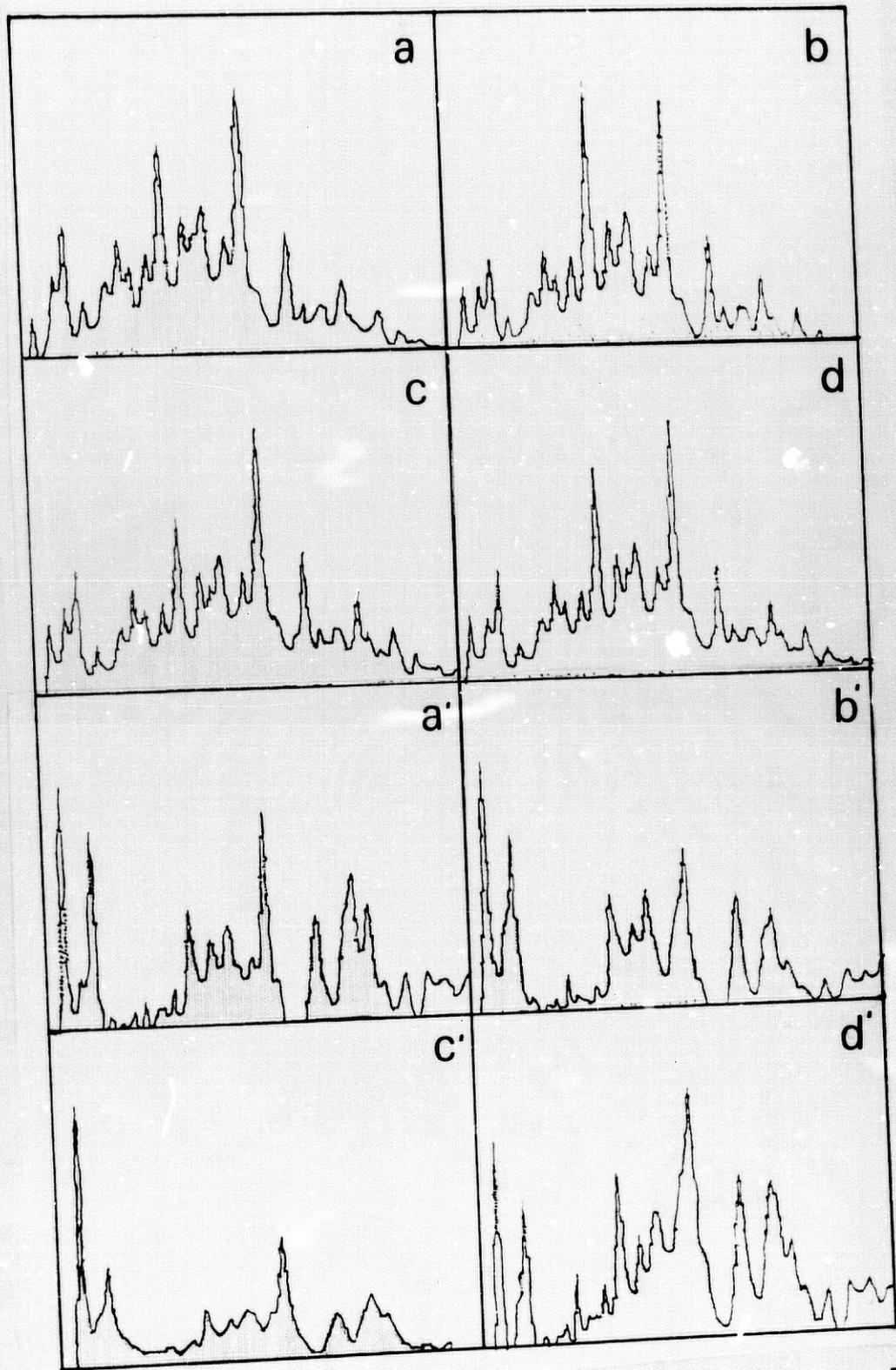


Figura 14.- Estudio densitométrico tras el tratamiento durante 24 horas con dosis terapéutica de los fármacos.
 Citoplasma : a) Control, b) BF, c) FF y d) GF.
 Citoesqueleto: a') Control, b') BF, c') FF y d') GF.

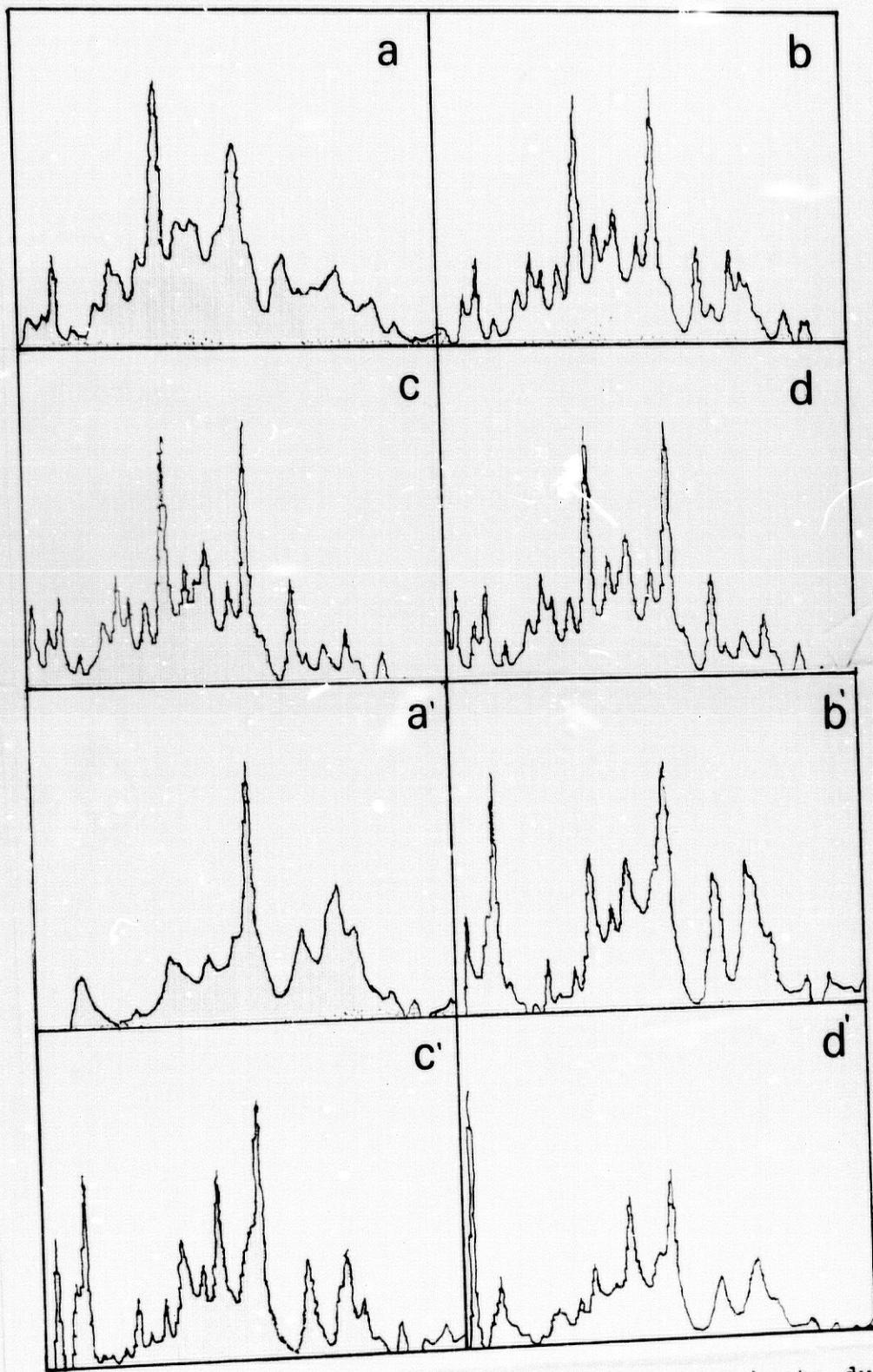


Figura 13.- Estudio densitométrico tras el tratamiento durante 6 horas con dosis terapéutica de los fármacos.
 Citoplasma : a) Control, b) BF, c) FF y d) GF.
 Citoesqueleto: a') Control, b') BF, c') FF y d') GF.

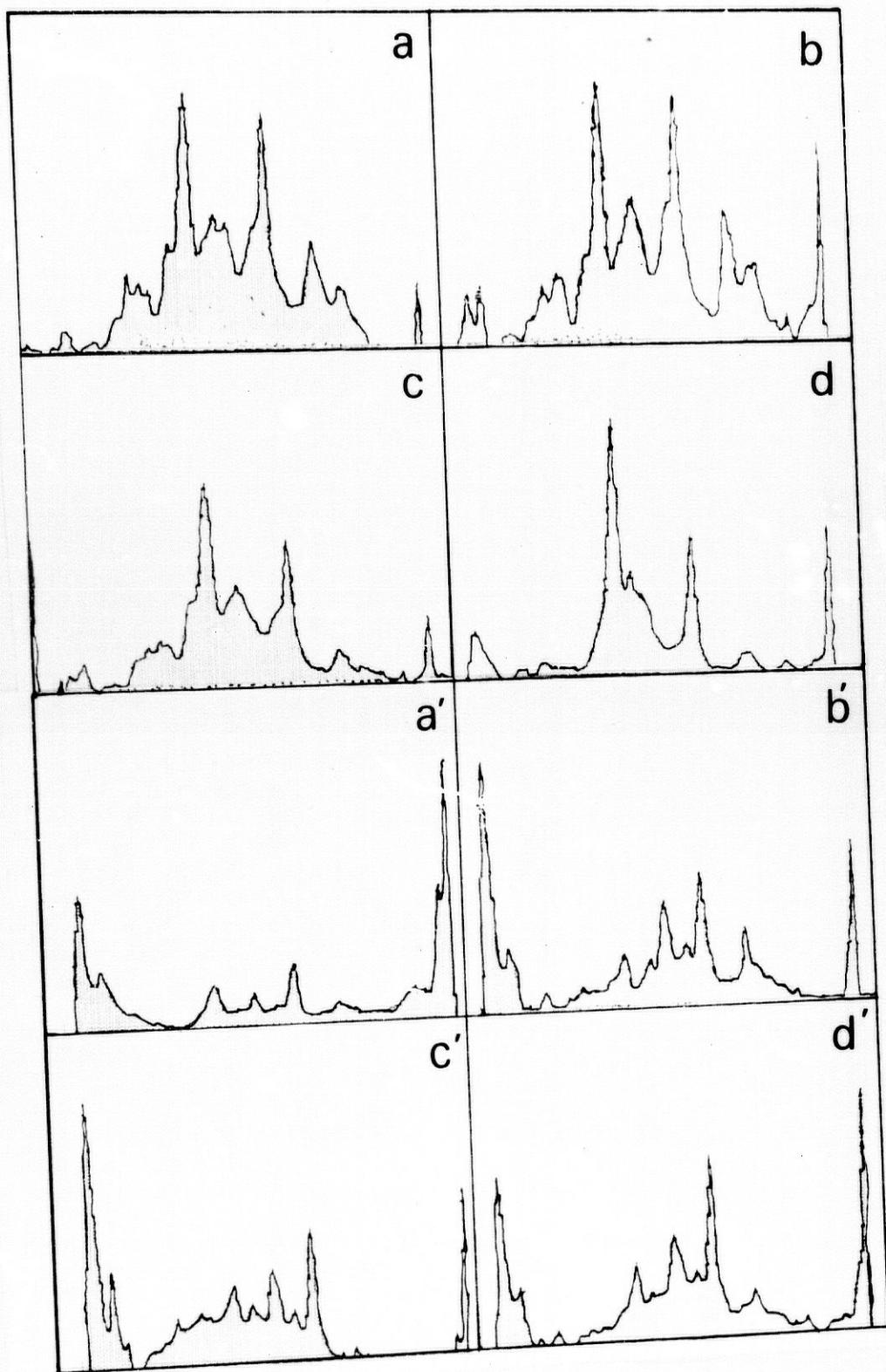


Figura 15.- Estudio densitométrico tras el tratamiento durante 24 horas con dosis tóxica de los fármacos.
 Citoplasma : a) Control, b) BF, c) FF y d) GF.
 Citoesqueleto: a') Control, b') BF, c') FF y d') GF.

DISCUSSION

V. DISCUSION

V.A. Cultivos de células cardíacas

V.A.1. Cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo

Desde las primeras experiencias de cultivos de miocardiocitos realizadas por MARGARET W. CAVANAUGH (1955), las técnicas de cultivos "in vitro" de células cardíacas embrionarias constituyen una metodología que es ampliamente utilizada para un mejor conocimiento del funcionamiento celular, siendo una tecnología largamente utilizada para los estudios de diferenciación celular, morfología celular, así como estudio de procesos bioquímicos que tienen lugar en la célula miocárdica (Frelin y col., 1974; Buja y col., 1985).

Clásicamente, desde la introducción de las técnicas de disgregación de tejidos (Moscona, 1952), el aislamiento celular del tejido cardíaco se ha llevado a cabo por diferentes procesos enzimáticos siendo el más utilizado la tripsinización (Harary y Farley, 1963; Shields y Glembotski, 1988). Nosotros hemos comprobado que sólo con métodos físicos se puede conseguir un buen aislamiento celular a partir de corazones embrionarios completos (González y col., 1990).

Nuestros resultados muestran que en estadios tempranos del desarrollo embrionario (XVIII-XXIX H.H.) es aconsejable la utilización del método físico en lugar de la tripsinización enzimática a 37° C, ya que si bien, el número de células obtenidas son similares, sobre todo en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario (XVIII H.H.) (Tabla II), la acción proteolítica de la tripsina también puede afectar a otras proteínas estructurales de las células y alterar la

viabilidad celular. Nuestras experiencias muestran que tras la disgregación del tejido cardíaco observamos un descenso progresivo de la viabilidad celular al ir avanzando en la edad del embrión utilizado, debido a que en los estadios más avanzados del desarrollo embrionario las células que componen el tejido cardíaco están estrechamente unidas e integradas en la red tisular, siendo necesario aumentar el tiempo de tratamiento del tejido en el proceso de digestión enzimática, concordando nuestros resultados con los obtenidos por CUMMINGS y otros autores (Cummings y col., 1985; Downward y col., 1984) para los cuales el aislamiento de las células a partir de los tejidos mediante métodos químicos, altera las proteínas de membrana de las células y por tanto repercute en la viabilidad de las mismas.

En estadios tempranos del desarrollo embrionario, el tejido cardíaco es un tejido bastante blando y las células no están tan estrechamente atrapadas por la red tisular, siendo por tanto posible el aislamiento de un gran número de células, evitándose la acción proteolítica de la tripsina; en estadios más avanzados del desarrollo embrionario las células están más organizadas en los tejidos y esto dificulta la disgregación tisular por métodos físicos.

Los resultados que hemos obtenidos en nuestras experiencias de aislamiento de miocardiocitos a partir de corazones embrionarios de diferentes estadios H.H. del desarrollo embrionario, avalan la primacía del método de disgregación tisular mediante tripsina a 4°C sobre los otros métodos de disgregación tisular empleados, ya que mediante este método de disgregación enzimático obtenemos en todos los estadios H.H. utilizados, un mayor rendimiento en el número de células aisladas (Tabla II) y una mayor viabilidad de la población celular aislada, que mediante el aislamiento celular por medio de métodos físicos o mediante el método extensamente utilizado de disgregación enzimática con tripsina en caliente (37°C). Coincidimos con FRESHNEY (1983b) en señalar a este método de

digregación enzimática de tripsina en frío (4°C) como el más adecuado para el aislamiento de las células a partir de sus tejidos de origen, ya que el remojo del tejido en la solución enzimática a 4°C permite la penetración del enzima en el tejido con una mínima acción proteolítica y la digestión enzimática en caliente (36,5 °C) va a ocurrir durante un corto espacio de tiempo, evitándose la destrucción de los componentes más lábiles de las células a la acción enzimática; además tras inhibir la acción enzimática de la tripsina mediante la adición de medio de cultivo con suero fetal de ternera (Maltese y Aprille, 1985), procedemos a disgregar el tejido mediante aspiración y expulsión de tejido con pipeta pasteur, evitando la agitación magnética que también podría dañar a las células. Así pues, mediante este método de disgregación tisular con tripsina en frío, podemos obtener una elevada cosecha de células viables con un mínimo coste celular, siendo por ello la técnica de aislamiento celular que hemos escogido para la realización de nuestras experiencias de cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo.

Una vez que hemos logrado aislar una amplia población celular de miocardiocitos embrionarios de pollo viables, nuestros resultados nos han demostrado, como comprobaron anteriormente otros autores, que la densidad celular de siembra empleada va a influir en el comportamiento de las células en los cultivos (De Haan, 1965b; Renaud y Le Douarin, 1972), observándose que a densidades celulares cercanas o inferiores a 10^5 células/ml solo una minoría de la población celular llega a adherirse en las superficies de cultivo, siendo necesario la utilización de densidades celulares de siembra del orden de 10^6 células/ml para poder obtener una monocapa celular. La utilización de matrices tridimensionales de colágeno favorece la rápida formación de la monocapa celular en el cultivo, además de disminuir rápidamente las células en suspensión, las células en las matrices tridimensionales de colágeno están estrechamente en contacto una con otras y con la matriz de colágeno, encontrándose con un ambiente parecido al de la estructura

espacial que presenta el tejido "in vivo", favoreciendo la viabilidad celular (Douglas y col.,1980); por ello creemos que para aumentar el rendimiento de la población celular viable en cultivo, con el fin de obtener una gran masa celular, es conveniente el uso de matrices tridimensionales de colágeno que van a favorecer la profiteración y viabilidad de los cultivos de miocardiocitos embrionarios.

En las primeras experiencias de cultivos de células cardíacas se utilizaba como medios de cultivo diversas soluciones salinas o mezclas de soluciones salinas y fluidos biológicos (Cavanaugh,1955), posteriormente conforme se ampliaba el número de autores que tenían acceso a estas técnicas fueron apareciendo los medios de cultivo sintéticos, con predominio en su uso de los medios básicos como el MEM y el M-199 (Mark y Strasser,1966; Laurent y col.,1986), pero en la actualidad el utilizado por una gran mayoría de autores es el DMEM sólo o mezclado en diversas proporciones con otros medios de cultivo (McMahon, 1988; Massey y Burton,1990). Nosotros hemos realizado un estudio comparativo de la bonanza de unos medios de cultivos básicos (Hank's, MEM y DMEM) muy utilizados para el cultivo de diferentes tipos celulares y sobre todo en el cultivo de miocardiocitos; además comparamos la evolución de la población celular en estos medios con otro actualmente muy utilizado para el cultivo de células tumorales e hibridomas como es el RPMI-1640 (Brower y col.,1986). También hemos estudiado la influencia del suero fetal de ternera cuando es añadido en una proporción del 20% a los medios de cultivo anteriormente citados.

Nuestros resultados nos muestran que el DMEM es el mejor medio de cultivo básico de los utilizados para la siembra de los miocardiocitos embrionarios de pollo y el posterior mantenimiento de los cultivos primarios a lo largo de los días en cultivo (Tabla III), observándose un gran descenso en el número de células viables tras la primera semana de cultivo debido a que las células necesitan adaptarse a las condiciones de

cultivo. A partir de esta primera semana de adaptación al cultivo, el número de células disminuye levemente o bien en la tercera semana de cultivo se producen modificaciones celulares en los miocardiocitos que se han adaptado a los cultivos que en el caso de la utilización como medio de cultivo DMEM se observa un aumento de la población celular a los 21 días de cultivo. Con el medio de cultivo RPMI-1640, no se observa mejoría en sus resultados con respecto al DMEM, pero sí presenta mejores resultados que otros medios muy utilizados por diversos autores para el cultivo de miocardiocitos y pudiendo ser una alternativa, como medio de cultivo de segunda elección, para el cultivo de miocardiocitos embrionarios.

La gran mayoría de los medios de cultivos utilizados en los cultivos de células animales están suplementados por sueros que proceden de diversos animales e incluso suero humano (Schmidt y Merrill, 1989; Belkin y col., 1988), los cuales contienen una serie de componentes (polipéptidos, hormonas, etc.) que poseen actividad mitótica, las cuales pueden estimular la proliferación celular (Antoniadis y col., 1979). Nuestros resultados confirman el efecto estimulante del suero fetal de ternera, uno de los sueros animales más utilizado y que hemos añadido a los medios de cultivo básicos citados anteriormente.

En todos los cultivos utilizados, observamos que después de la primera semana de cultivo, la población celular que se encuentra en el cultivo que contiene medio de cultivo suplementado con suero fetal de ternera es superior que el cultivo que tiene medio de cultivo sin suplementar con el suero (Tablas III y IV); en el caso del medio DMEM + 20% SFT la población celular observada tras siete días de cultivo es cercana a la inicial de siembra, pensamos que si bien deben morir un gran número de células, las sustancias que contiene el suero deben aumentar la capacidad proliferativa de la células en cultivo, mientras que en los cultivos que no llevan suero la

capacidad proliferativa celular no está tan estimulada y la velocidad de muerte celular en el cultivo es muy superior a la velocidad de proliferación celular. Conforme avanza el tiempo de cultivo, la población celular en los cultivos con medio sin suplementar o suplementado con el suero son más similares, y solo en el caso de medio MEM o DMEM suplementados con suero es superior que los correspondientes cultivos con medio de cultivo sin suero; es por ello por lo que tras la primera semana de cultivo, en nuestras experiencias de cultivos celulares suplementamos los medios de cultivo solamente con el 10% de suero fetal de ternera, mientras que en el momento de la siembra de los cultivos primarios utilizamos un 20% de suero fetal de ternera ya que este colabora para una mejor adaptación de las células al cultivo y para el mantenimiento y/o estimulación de la capacidad proliferativa que la célula manifiesta "in vivo".

Una vez que hemos determinado el medio más idóneo para el cultivo de los miocardiocitos embrionarios de pollo y comprobado el efecto positivo sobre la población celular en cultivo del suero fetal de ternera, hemos observado la incidencia de factores de crecimiento conocidos sobre la población miocardiocítica en cultivo (Tabla V).

En experiencias anteriores desarrolladas por diversos autores, se han suplementado los medios de cultivo con diversos sueros o extractos de tejidos que pueden poseer un alto contenido de sustancias que influyen en el crecimiento y diferenciación de las células musculares en cultivo (Florini, 1987; Kardami, 1990), suplementándose algunos cultivos con factores de crecimiento aislados (como el factor de crecimiento fibroblástico) que son predominantes en los tejidos cardíacos (Kardami y Fandrich, 1989). En nuestras experiencias hemos suplementado los medios de cultivo con una amplia batería de factores de crecimiento los cuales se han observado que poseen un efecto estimulante en la proliferación celular de muy diversos tipos celulares en cultivo (Kasai y col., 1987) y además estudiar

la posible actuación como factores estimuladores del crecimiento miocardiocítico en cultivo de diversas proteínas y hormonas que han mostrado poseer un efecto mitótico sobre las células en cultivo (Guilbert e Iscove, 1976).

De todas las sustancias utilizadas como factores de crecimiento, nuestros resultados muestran que la transferrina humana y la insulina son capaces de aumentar la proliferación de los miocardiocitos embrionarios de pollo en cultivo. La transferrina humana aumenta la capacidad proliferativa de los miocardiocitos en un valor superior al control (DMEM + 20% SFT) a los 14 días de cultivo a las dos concentraciones utilizadas (10^{-7} y 10^{-6}), en cambio a los 21 días de cultivo la concentración mayor tiene más efecto sobre la proliferación celular que el control. Así mismo, observamos que la insulina es capaz de aumentar la población celular con respecto a los controles, observandose dicho aumento a los 14 días de cultivo cuando la concentración de insulina que suplementa al medio de cultivo es de 0,2 UI/ml y este aumento en la capacidad proliferativa se observa en el día 21 de cultivo, cuando la concentración de insulina utilizada ha sido de 2 UI/ml; a ambas concentraciones utilizadas se observa que la población celular tras 28 días de cultivo es superior a los controles.

Con los resultados obtenidos en nuestras experiencias anteriormente expuestas, creemos que para experiencias con cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo en cortos periodos de tiempo (0-14 días), no es necesario adicionar factores de crecimiento a los medios de cultivo para aumentar la capacidad proliferativa de las células en cultivo, sin embargo para experiencias que se realizan durante periodos de tiempo elevados ó para la realización de experiencias con cultivos de células miocardiocíticas adultas, en los cuales la población celular en cultivo va perdiendo su capacidad proliferativa, es beneficioso la adición al medio de sustancias estimuladoras de la proliferación celular como son la

transferrina y la insulina, como han observado algunos autores en cultivos de miocardiocitos adultos (Claycomb y Lanson, 1984).

Además de sustancias aisladas y conocidas que pueden estimular la proliferación celular, hemos ensayado sobrenadantes de cultivo de líneas celulares establecidas y de cultivos con varios pases de fibroblastos de pulmón fetal humano, para observar si algunas de estas células en cultivo secretan a su medio de cultivo sustancias que pueden estimular la capacidad proliferativa de nuestros miocardiocitos embrionarios en cultivo, tal como ocurre en algunas células en cultivo cuya diferenciación y proliferación celular está estimulada por factores de crecimiento secretados por células cercanas (Lim y Mitsunobu, 1975). La población celular del cultivo permanece similar a los controles en los primeros días de cultivo cuando los medios han sido suplementado con sobrenadantes de cultivos de células Hela, McCoy y fibroblastos humanos, pero a partir de los 14 días de cultivo solamente cuando hemos diluido el medio de cultivo con sobrenadante de cultivo de células McCoy se mantienen la población celular en valores similares a los controles hasta el día 21 de cultivo, mientras que a los 28 días de cultivo las poblaciones celulares de todos los cultivos suplementados con sobrenadantes de cultivos muestran un valor inferior al observado en el cultivo control. Por los resultados obtenidos en nuestras experiencias, observamos que si bien la utilización de sobrenadante de cultivos McCoy nos va a proporcionar unos valores similares a los controles durante los primeros días de cultivo, ningún factor que puedan secretar al medio de cultivo las células citadas anteriormente, es capaz de aumentar la capacidad proliferativa que de por sí, tienen dichas células cuando crecen en DMEM + 20% SFT, no siendo por tanto útiles la adición al medio de cultivo de los sobrenadantes de dichos cultivos celulares durante el cultivo de los miocardiocitos embrionarios de pollo para aumentar el rendimiento de la población celular en cultivo.

Con respecto a la morfología de las células en

cultivo, mediante técnicas de microscopía óptica, algunos autores observaron en los cultivos primarios de miocardiocitos procedentes de ratas y de embriones de pollo (De Haan, 1967) que morfológicamente en los cultivos primarios, cuando las células se han adherido, se podían distinguir dos tipos de células adheridas, un tipo fibroblástico (células F) en un porcentaje del 25-35% y un tipo miocardiocítico (células M) en un porcentaje del 65-75%. En nuestros cultivos primarios las células que crecen adheridas a la superficie de cultivo muestran una morfología similar, observándose unas semejantes a las descritas como células M y otras a las etiquetadas como células F, mientras que los porcentajes de células F son ligeramente inferiores a los descritos por los autores anteriormente citados, coinciden con los porcentajes que obtiene FAYET y colaboradores (1974) en sus experiencias de cultivos. Las células que crecen en suspensión, normalmente a las primeras horas de siembra, adoptan una morfología esférica, pero conforme avanza el tiempo de cultivo nuestras células adoptan el mismo comportamiento que anteriormente han observado otros autores, ya que tras las primeras horas de cultivo empiezan a adherirse a la superficie de cultivo y aparece una morfología celular mas heterogénea, con células de mayor tamaño, aplanadas y tendiendo a extenderse por la superficie de cultivo ocupando la mayor superficie posible, hasta que encuentran otras células cercanas adheridas y se forman pequeñas agrupaciones (dos-tres células) por contacto entre las células, las cuales inhiben el crecimiento del tamaño celular por las zonas donde se encuentra con una célula cercana adherida (Le Douarin y col., 1974).

Para nosotros, la morfología celular "in vitro" no está directamente relacionada con el procedimiento de disgregación empleado, ya que en la observación minuciosa de la morfología celular al realizar la separación por medios físicos ó químicos, no se detecta ninguna alteración de dicha morfología celular; por lo tanto nuestros resultados nos indican que las técnicas alternativas (químicas ó físicas) de aislamiento

celular, aunque pueden influir en el índice de proliferación celular debido al daño que puede padecer la célula en los procesos de disgregación tisular, no influye en su morfología, este hecho difiere con los aportados por otros autores (Moscona y col., 1965).

Por el contrario la morfología celular en cultivo se encuentra influenciada por la capacidad de adherencia a las superficies de cultivo, la densidad de siembra y la utilización de matrices tridimensionales de colágeno que favorecen la formación de monocapas celulares en donde las células presentan una morfología celular más homogénea, con células rectangulares, alargadas y de tamaños similares.

Para que la realización de las experiencias tenga lugar en los miocardiocitos, es necesario eliminar en lo posible la población de fibroblastos que aparecen en los cultivos primarios de miocardiocitos embrionarios de pollo, como en otros muchos cultivos primarios (Jones y Haskill, 1976). Para la eliminación de los fibroblastos presentes en nuestros cultivos, hemos aprovechado la mayor capacidad de adherencia de los fibroblastos a la superficie de cultivo, las cuales se adhieren rápidamente en las primeras horas de siembra y con el posterior trasvase a las pocas horas de la siembra de la suspensión celular a otro frasco de cultivo, logramos separar la población fibroblástica en cultivo que queda atrapada en el frasco de cultivo mediante adherencia, de la población miocardiocítica que permanece en suspensión a las pocas horas de cultivo (Polinger, 1973: McCall, 1979). Repitiendo este proceso logramos reducir a menos de un 10% la población de fibroblastos presentes en nuestros cultivos.

La técnica anteriormente descrita que utiliza la diferente capacidad de adherencia de las células sobre la superficie de cultivo para separar las diversas poblaciones celulares, no puede ser utilizada cuando utilizamos matrices

tridimensionales de colágeno con el fin de aumentar el rendimiento de la masa celular en cultivo, ya que estas redes tridimensionales de colágeno atraparían rápidamente tanto a los fibroblastos como a los miocardiocitos. además los fibroblastos no encontrarían superficie plástica libre donde poder manifestar su mayor capacidad de adherencia que la célula miocardiocítica, por tanto al retirar la suspensión celular podríamos perder un gran número de miocardiocitos que quedarían atrapados por la matriz tridimensional de colágeno. Por ello cuando hemos utilizado matrices de colágeno para la realización de nuestros cultivos o la densidad de siembra utilizada es elevada hemos utilizado la citosina-1- β -D-arabinofuranósido para eliminar los fibroblastos de nuestros cultivos (Claycomb y Palazzo, 1980). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por CLAYCOMB y colaboradores (Claycomb y Moses, 1988; Springhorn y Claycomb, 1989), ya que tras la adición del citado azúcar la población de fibroblastos observada en nuestros cultivos fue inferior al 5%, debido a la capacidad antimitótica que ejercen la citosina-1- β -D-arabinofuranósido sobre los fibroblastos en los cultivos de miocardiocitos, como anteriormente se ha observado que ejerce en los cultivos de otras células musculares (Ross y col., 1987).

Tras la experiencia obtenida con nuestros cultivos, creemos que es aconsejable el uso de la citosina-1- β -D-arabinofuranósido para la eliminación de los fibroblastos en los cultivos de miocardiocitos, ya que si bien mediante adherencia diferencial en la superficie de cultivo se podría eliminar los fibroblastos del cultivo, esta técnica supone un gran número de manipulaciones del cultivo con el consiguiente aumento del riesgo de contaminación microbiana y además el rendimiento en la eliminación de la población fibroblástica del cultivo es menor que el obtenido cuando se le adiciona la citosina-1- β -D-arabinofuranósido.

Una de las características esenciales de las células cardíacas en cultivo es que conservan la actividad

contráctil que presentan "in vivo" (Patten,1949), nuestros resultados coinciden con los descritos por otros autores que describen que aproximadamente un 20% de la población celular en cultivo manifiestan actividad contráctil en los primeros días de cultivo cuando se utilizan huevos de 4-5 días de incubación (Cavanaugh,1955), como ocurre en nuestros cultivos con corazones embrionarios del estadio XVIII-XX H.H., posteriormente durante la primera semana de cultivo el porcentaje de células que laten va aumentando (hasta 70%) y llegan a alcanzar un ritmo de contracción variable en los diferentes cultivos y con el tiempo de cultivo como ha sido observado en otras experiencias desarrolladas anteriormente (20-100 latidos/minuto) (Freys. Beguin y Van Brussel,1979). Cuando el tiempo de permanencia de las células en el cultivo sobrepasa los 7-10 días, la actividad contráctil va disminuyendo y termina por desaparecer, en un amplio margen de tiempo según los cultivos.

En los cultivos de miocardiocitos los cuales van a seguir latiendo después de las manipulaciones propias para la puesta en cultivo de dichas células, algunos autores el inicio temprano o tardío del latido celular en cultivo lo adjudican a los días de incubación del embrión (Fayet y col.,1974) ; nosotros hemos observado que las células aisladas, inician inmediatamente el latido celular una vez puestas en cultivo, independientemente del estadio del desarrollo embrionario en que se encuentre el corazón del cual extraemos las células, por lo tanto discrepamos en este sentido con los resultados del citado autor. Lo que si observamos es una disminución del porcentaje de células que laten cuando los estadios utilizados son muy avanzados (XXXVIII-XL H.H.), como observaron en sus cultivos otros autores (Wollenberger, 1964).

La actividad de marcapasos rítmica de las contracciones cardíacas reside solamente en un número bajo de células, en los cultivos de células cardíacas el ritmo de contracción va a depender de la extensión y proximidad de dichas

células marcapasos con las otras células cardíacas (Cavanaugh, 1955), aunque a veces se encuentre que células continuas laten con diferentes frecuencias y la superficie de contacto no es suficiente para establecer la sincronía de contracción en el cultivo. En nuestros resultados observamos, sobre todo en los cultivos que forman monocapas celulares, que el ritmo de latido no está sincronizado en toda la superficie de cultivo, pero si está sincronizado por pequeñas zonas de cultivo entre células adyacentes que podría ser debido a una elevada concentración en dichas zonas de células que rigen el ritmo de contracción (Sommer y Johnson, 1979).

La viabilidad celular se encuentra disminuida conforme avanza el tiempo de cultivo y a partir de los 30-40 días son escasas las células que permanecen vivas en los cultivos (Renaud, 1980); por lo observado en nuestras experiencias, podemos considerar como claros signos del envejecimiento celular el cese de la actividad contractil, la pérdida de continuidad en la superficie esférica ú ovalada de las membranas de las células en suspensión, la aparición de arrugamientos en la membrana plasmática, y sobre todo un claro signo del envejecimiento de las células en cultivo es la observación de un aumento de vacuolas e inclusiones citoplasmáticas, tanto en número como en el tamaño de estos componentes citoplasmáticos celulares (Renaud y Le Douarin, 1972).

Diversos autores han realizado estudios de los días de incubación ideales para que, tras el aislamiento celular las células en cultivo presenten una máxima actividad, estos estudios han basado la actividad celular en su actividad contractil; la mayoría de los autores coinciden en que el tiempo de incubación ideal es de 7 días, en los cuales tras la puesta en cultivo se obtiene el máximo valor de actividad celular que varía desde el 80-90% de la población celular que manifiesta actividad espontánea (Lehmkuhl y Sperelakis, 1963), corregidos los porcentajes por los mismos autores en 1966, estimando un

porcentaje de células con actividad contráctil del 60-70% y para otros autores las células cardíacas procedentes de corazones embrionarios de 7 días de incubación, hasta un máximo del 40-50% de la población celular presenta actividad contráctil (De Haan, 1967). Pero todos los autores coinciden en que los 7 días de incubación son los que presentan una máxima actividad en cultivo, los corazones procedentes de embriones de pocos días de incubación (4-5 días) presentan el porcentaje de células con actividad contráctil es del 20-25% (Cavanaugh, 1955) y los de elevados días de incubación (18 días), solo un 10% de la población celular presentan actividad contráctil (De Haan, 1967). Nuestros resultados coinciden con los anteriormente expuestos, ya que la actividad contráctil que observamos en nuestros cultivos van aumentando con la edad del embrión hasta alcanzar un máximo en el estadio XXIX H.H. (7 días de incubación del huevo) del desarrollo embrionario, posteriormente empieza a disminuir el porcentaje de células en cultivo que presentan actividad contráctil y alcanza los valores mínimos en los estadios más avanzados del desarrollo embrionario.

Una gran mayoría de autores, como medida de la edad del embrión utilizan el tiempo de incubación de los huevos (Renaud, 1980; Vernadakis y col., 1986), la unidad de medida de la edad embrionaria del pollo que utilizamos en nuestras experiencias son los estadios del desarrollo embrionarios descritos por HAMBURGER Y HAMILTON (1951), ya que esta clasificación de la edad embrionaria del pollo basada en criterios morfológicos creemos que es más correcta, que la que está basada solamente en el tiempo de incubación del huevo, en el cual debido a pequeños cambios en las condiciones ambientales o en el lote de huevos utilizados, puede afectar el curso normal del desarrollo embrionario del pollo, pudiendo dar lugar a modificaciones en el desarrollo del corazón embrionario.

Creemos que los embriones del estadio XXIX H.H. del desarrollo embrionario, que generalmente coincide con los

6,5-7 días de incubación, son los adecuados para la realización de los cultivos celulares de células miocardiocíticas, porque además de presentar dichas células en cultivo una mayor actividad contráctil, son corazones de un mayor tamaño que el que presentan los de embriones de estadios más tempranos, siendo por tanto más fáciles de manipular y el rendimiento en células por embrión que obtenemos por las técnicas de disgregación tisular es mayor. Además de las razones anteriormente expuestas, la capacidad de migración celular en el desarrollo embrionario a través de la jalea cardíaca (Kinsella y Fitzharris, 1980), se encuentra presente en estadios tempranos del desarrollo embrionario, pero en estadios más avanzados (XXIV-XXVIII H.H.) va gradualmente cesando la actividad migratoria, parece ser debido a cambios en la arquitectura molecular de la matriz que impide la migración; en estos casos, parece ser que las células adquieren propiedades diferenciadas que las hacen ya adultas y que no cambian más, en este sentido a lo largo del desarrollo embrionario, lo cual avala que utilizemos el estadio XXIX H.H. para la realización de nuestros cultivos, ya que en este estadio las células han perdido la capacidad migratoria y se parecen aún más a las adultas en el comportamiento que estas últimas presentan "in vivo" (Kinsella y Fitzharris, 1982).

La identificación celular de los diferentes tipos celulares en cultivo se puede hacer por criterios morfológicos o bioquímicos (De Haan, 1967; Polinger, 1973), pero estos criterios pueden sufrir cambios a lo largo de los días de cultivo. Así, nosotros hemos observado en nuestros cultivos que las células miocardiocíticas cuando se adhieren a la superficie de cultivo pueden adoptar una morfología similar a la fibroblástica, cambiando así mismo la morfología de una misma célula a lo largo de los días de cultivo y con las diferentes interacciones con las células cercanas en el cultivo, haciéndose muy difícil la clasificación de los tipos celulares en cultivo basada en criterios morfológicos (Freshney y col., 1980). La velocidad de síntesis de diversas sustancias y otros procesos

bioquímicos también se ven alterados por los cambios en condiciones medioambientales de las células o por el tiempo de cultivo. Algunos autores han identificado los tipos celulares mediante el latido celular, aunque posteriormente se ha observado que células que presentaban morfología fibroblástica y que por lo tanto habían sido consideradas como fibroblastos (células F), latían y por tanto no puede ser un criterio válido para la identificación de los diversos tipos celulares en los cultivos de células cardíacas (Polinger, 1973).

En la actualidad la identificación de los tipos celulares en cultivo están basados en la identificación de componentes estructurales definidos y específicos de cada célula, que se realizan mediante estudios de microscopía electrónica o por técnicas inmunohistoquímicas, las cuales identifican algunas características estructurales específicas de la célula y que no varía a lo largo del tiempo de cultivo (Terracio y Borg, 1988). Nuestras técnicas de identificación celular las basamos en la búsqueda, en nuestras células en cultivo, de un marcador específico de estas células miocardiocíticas, este marcador específico que utilizamos es una proteína componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular y que es el marcador específico de las células musculares, como es la desmina (Quax y col., 1985; Pieper y col., 1989).

La técnica que utilizamos para la identificación de la proteína desmina es la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antidesmina, realizada en cultivos celulares en "shell-vial". Esta técnica de cultivos celulares para la realización de inmunofluorescencia, creemos que es una técnica asequible para cualquier laboratorio de cultivos celulares y no presenta la laboriosidad y el gasto económico que conllevan las técnicas de microscopía electrónica, las cuales necesitan una gran infraestructura instrumental que no es accesible para la gran mayoría de los laboratorios de investigación. Las inmunofluorescencias indirectas realizadas en

"shell-vial" es una técnica de bajo coste económico y muy utilizada actualmente (Mendoza y col.,1991).

La proteína desmina que es el marcador específico de las células musculares, se ha observado que se encuentra en los filamentos intermedios de las células musculares asociada con otra proteína denominada vimentina en los tejidos "in vivo" (Van Muijen y col.,1987; Muros y col.,1990), encontrándose asociadas también "in vitro" en una amplia variedad de células en cultivo (Virtanen y col.,1981). Nuestros resultados manifiestan la asociación de dichas proteínas en las células cardíacas embrionarias en cultivo, ya que en aquellos cultivos que hemos detectado mediante inmunofluorescencia indirecta la proteína desmina, también observamos positividad en la inmunofluorescencia realizada con anticuerpo monoclonal antivimentina, estando de acuerdo con aquellos autores que anteriormente detectaron la asociación de ambas proteínas en células cardíacas tanto "in vivo" como "in vitro" (Nag y col.,1986; Velez y col.,1990).

El marcaje punteado que observamos en el citoplasma celular de los miocardiocitos embrionarios de pollo en cultivo cuando realizamos la inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal antidesmina, podría estar relacionado con la localización de la desmina a nivel de la línea Z de la miofibrillas y entre las líneas Z de miofibrillas adyacentes detectados mediante numerosos estudios ultraestructurales, pudiendo ejercer un papel de soporte estructural o de interconexión de las miofibrillas adyacentes, lo cual permite el mantenimiento del aparato contráctil celular (Gabella,1979). Además en nuestras inmunofluorescencias con anticuerpo monoclonal antidesmina observamos marcados puntos de inmunofluorescencia cerca de las membranas plasmáticas (Figura 3), lo que avalaría la teoría defendida por algunos autores de que la desmina podría mediar en la sujeción de los filamentos de actina con la membrana plasmática y con las células adyacentes a través de los desmosomas (Lazarides y col.,1979) y así poder transmitirse el

impulso contráctil de una célula a otro cercana en cultivo, como ocurre "in vivo" (Thornell y Eriksson, 1981), esto favorecería la sincronización en el latido celular de células adyacentes en el cultivo celular, como observamos en nuestros cultivos en monocapa celular, donde observamos la contracción rítmica de las células por zonas de cultivo. En cambio en nuestros cultivos no encontramos evidencia de marcaje en forma filamentosa, lo que contrasta con la tesis mantenida por TOKUYASU y colaboradores (1983) de que la desmina se encuentra en el músculo cardíaco de pollo en forma de una red orientada longitudinalmente en los espacios interfibrilares.

La inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal antivimentina nos ha manifestado un patrón de marcaje en forma filamentosa, con fibras que parten de la zona perinuclear y llegan hasta la membrana plasmática (Figura 3), este marcaje se corresponde con la apariencia que muestran los filamentos intermedios en las microfotografías electrónicas de las células musculares (Campbell y col., 1979). Dicha distribución de red filamentosa rodeando el núcleo celular podría estar relacionada con la función de soporte mecánico y disposicional del núcleo en la célula que desempeñan estos filamentos (Virtanen y col., 1979) y también el hecho de que los filamentos de vimentina se extiendan desde el núcleo hasta las zonas más distantes de la membrana plasmática celular, podría avalar la opinión de algunos autores para los cuales la vimentina puede jugar un papel de transmisor de señales desde el núcleo hasta la membrana plasmática (Georgatos y Blobel, 1987).

Las diferentes experiencias realizadas hasta ahora, abarcan principalmente cultivos primarios de células cardíacas embrionarias, nosotros hemos avanzado en la línea de investigación de la búsqueda de las condiciones adecuadas para obtener un mayor rendimiento en los cultivos de células cardíacas, con la obtención de cultivos secundarios de los miocardiocitos embrionarios en cultivo e intentar profundizar en

la búsqueda de los medios de cultivo ideales para el desarrollo de estos cultivos secundarios (González y col.,1990).

En orden a tener la máxima fiabilidad de que las experiencias de cultivos secundarios se realizaban solo con miocardiocitos, es por lo que en el pase de las células a otros frascos de cultivo, hemos descartado aquellas otras células de morfología fibroblástica que son consideradas como miocardiocitos por otros autores cuando latén (Cavanaugh y col.,1955).

En nuestros resultados observamos que en todos los cultivos primarios de miocardiocitos en los cuales la proliferación celular en cultivo ha sido la adecuada para el establecimiento de los cultivos secundarios a partir de ellos, el aumento de la proliferación y por tanto de la población celular tiene lugar a partir del día 14 de cultivo primario y es en el día 21 de cultivo cuando la población celular se ha doblado con respecto a la población inicial utilizada en la siembra (Tabla VII); este hecho es destacable, ya que como algunos autores han observado en experiencias realizadas "in vivo", la capacidad proliferativa de los miocardiocitos desciende gradualmente en el período postnatal, llegando a cesar dicha actividad proliferativa en la tercera semana de vida postnatal (Cluzeaut y Maurer-Schultze,1986), pudiéndose en los días cercanos al día 21 de cultivo, en el cual comienza la tercera semana de vida "in vitro" de la célula cardíaca, ser el punto de partida clave en donde pueden ocurrir diversos procesos celulares que conduzcan a la degeneración celular o a su diferenciación y posterior proliferación de la población celular.

Los medios básicos de cultivo que hemos utilizado no producen por sí solo un aumento de la población celular a lo largo de los días de cultivo como para que fuera posible el establecimiento de cultivos terciarios, pues al cabo de los 28 días de cultivo la población celular existente es muy inferior a la inicialmente sembrada; el medio RPMI-1640 tampoco mejora los

resultados obtenidos con respecto a los medios básicos más utilizados en los cultivos de células cardíacas (MEM y DMEM). Lo que si observamos en nuestros resultados es que el suero fetal de ternera cuando suplementa algunos medios de cultivo, aún a bajas proporciones (2%), aumenta la población celular, siendo un factor beneficioso para el aumento de la población celular tal como ocurría en los cultivos primarios (Antoniadis y col., 1979).

También es destacable el hecho de que en estos cultivos secundarios, tal como ocurría en los primarios, se produzca un aumento de la población celular en el día 14 de cultivo cuando utilizamos medio RPMI-1640 y sobre todo en el día 21 de cultivo dicho aumento ocurre cuando se ha utilizado medio de cultivo DMEM, MEM y MEM + 2% SFT.

El comportamiento morfológico de las células miocardiocíticas en los cultivos secundarios es similar al observado en los cultivos primarios, permaneciendo en un principio en suspensión y posteriormente al avanzar el tiempo de cultivo comienzan a adherirse y a formar pequeñas agrupaciones; la contracción celular observada en los cultivos secundarios es mucho más escasa que en los primarios, en cuanto al ritmo y a la amplitud de la población celular que manifiesta contracción, no observándose sincronización en ninguna zona de los cultivos, un comportamiento muy similar al observado por otros autores al transferir células cardíacas neonatas de ratas, en las que no se ha observado actividad contráctil en las células una vez transferidas (Harary y Farley, 1963), aunque en nuestros cultivos secundarios de células embrionarias si presentan actividad contráctil, esta se realiza de forma esporádica y aislada. Lo que si es destacable, es que en nuestros cultivos se observa una gran homogeneidad morfológica de las células en el cultivo, como anteriormente habian observado otros autores en cultivos secundarios de células cardíacas obtenidas a partir de otras especies animales (Harary y Farley, 1963).

En nuestras experiencias realizadas con los cultivos de células cardíacas embrionarias procedentes de embrión de pollo, hemos conseguido la elección de la edad del embrión adecuada para la obtención de las células cardíacas, la puesta a punto del método de disgregación tisular adecuado, adaptación a los cultivos celulares de la técnica adecuada para la identificación de los miocardiocitos en cultivo, establecer el medio de cultivo y las condiciones de cultivo adecuadas para obtener un buen rendimiento de los cultivos de células cardíacas embrionarias de pollo. Así mismo mediante nuestros trabajos hemos colaborado en el avance del conocimiento de la evolución de la morfología celular en cultivo, del comportamiento de los miocardiocitos aislados en los cultivos celulares y un estudio del comportamiento de estas células en cultivos secundarios, con la evolución de la población celular secundaria en diversos medios de cultivo.

V.A.2. Cultivos de miocardiocitos humanos adultos

Las primeras experiencias de cultivos de células cardíacas se desarrollaron con corazones embrionarios procedentes de embriones de pollo (Cavanaugh, 1955), posteriormente basándose en las experiencias adquiridas con la realización de los cultivos anteriormente mencionados, las experiencias en cultivos de células cardíacas se fueron ampliando a otras especies animales, llegándose al cultivo de células cardíacas aisladas a partir de corazones de diversos mamíferos. Las primeras experiencias con células cardíacas adultas se realizaron con células cardíacas neonatas de ratas (Harary y Farley, 1963), siendo la especie de mamífero, junto con el ratón, más utilizada para los cultivos de células cardíacas y la gran mayoría de autores utilizan corazones de ratas de pocos días de vida para la realización de sus experiencias (Auclair y Freyss-Beguin, 1980).

La metodología para el aislamiento y cultivo de los miocardiocitos neonatos de rata, es similar a la utilizada para los cultivos de miocardiocitos embrionarios, siendo los métodos de disgregación tisular enzimática con tripsina el procedimiento de aislamiento celular más empleado, los medios utilizados para el cultivo son similares a los empleados para el cultivo de los miocardiocitos embrionarios de pollo y la densidad de siembra dependerá del tipo de cultivo deseado, de igual modo que para los miocardiocitos embrionarios (Anand-Srivastada y Cantin, 1986).

En los cultivos de miocardiocitos neonatos de rata, también se presenta el problema de contaminación de los cultivos por fibroblastos, pero el principal problema de estos cultivos de miocardiocitos adultos de rata recién nacida es su escasa capacidad mitótica, pues es conocido que el porcentaje de células miocardiocíticas adultas neonatas que es capaz de manifestar actividad mitótica es muy baja (Rumyantsev, 1963). Si estas células miocardiocíticas neonatas, que conservan todavía algunas características de las células embrionarias, presentan una muy baja actividad mitótica en cultivo, mayor dificultad presentan aún los cultivos de células miocardiocíticas procedentes de corazones adultos de animales con bastantes días o meses de vida, ya que además de dificultar el aislamiento celular el hecho de que los tejidos adultos son más complejos y duros que los embrionarios, quedando muy atrapados los miocardiocitos por la red tisular, la capacidad mitótica de las células adultas es casi nula, aunque algunos autores han detectado escasas mitosis "in vivo" (Manasek, 1968; Jeter y Cameron, 1971), el tiempo para que ocurra la mitosis de la célula cardíaca adulta en cultivo es muy prolongado y el porcentaje de células capaces de presentarlo muy bajo, por lo cual para la mayoría de los autores las células cardíacas adultas no presentan capacidad mitótica en cultivo (Kasten, 1972).

Por todo lo anteriormente expuesto, la metodología

necesaria para la realización de experiencias científicas con cultivos de miocardiocitos embrionarios o neonatos se desarrolla en un gran número de laboratorios de investigación, pero poner a punto la tecnología necesaria para el aislamiento y posterior cultivo de células cardíacas procedentes de corazón adulto de mamífero, solo es desarrollada actualmente por grupos de investigación con amplia experiencia en los cultivos anteriormente citados.

En los últimos años se ha ido ampliando el número de autores que han obtenidos cultivos celulares a partir de diversos tejidos humanos (Gibson-D'Ambrosio y col., 1986), pero son escasos los autores que realizan sus experiencias en cultivos de miocardiocitos humanos. Los cultivos de miocardiocitos de origen humano están escasamente desarrollados, en primer lugar por la escasa accesibilidad a los corazones humanos en las condiciones ideales para el cultivo de los miocardiocitos humanos y en segundo lugar la gran dificultad para el aislamiento y posterior mantenimiento en el cultivo de los miocardiocitos humanos aislados.

La fuente de los corazones humanos de los cuales se han aislado miocardiocitos, en general ha sido embrionaria, de individuos de escasos años de vida postnatal (Claycomb, 1988) ó de individuos adultos previamente transplantados, y en escasas ocasiones el tejido es obtenido a partir de operaciones quirúrgicas de extracción de válvulas en corazones normales (Bugaisky, 1988). Todas las biopsias cardíacas que hemos utilizado en nuestras experiencias de cultivos de miocardiocitos humanos adultos proceden de intervenciones quirúrgicas de valvulopatías coronarias, en el proceso de las cuales se ha procedido a la extracción de una biopsia del tejido cardíaco adulto.

Para el aislamiento y posterior cultivo de las células adultas miocardiocíticas humanas se han seguido los

mismos procesos que los distintos autores han desarrollado previamente con otros tipos de corazones de mamíferos (Claycomb y Palazzo, 1980; Claycomb y Lanson, 1984; Jacobson y col., 1985) y sobre todo en la experiencia obtenida con los cultivos de miocardiocitos adultos procedentes de un mamífero tan cercano a la especie humana como son los primates (Claycomb y Moses, 1985). Por lo general, el aislamiento de las células cardíacas adultas se realiza a partir de corazones enteros, requiriendo una previa perfusión del órgano antes del tratamiento enzimático (Powell, 1984). Con la metodología que hemos descrito anteriormente para el aislamiento celular de los miocardiocitos humanos adultos, no es necesario partir de órganos enteros para obtener un buen rendimiento de células viables en el proceso de aislamiento celular, ni se exigen aparatos para la perfusión del órgano (ya que esta no es necesaria), como son utilizados por otros autores (Jacobson, 1977).

Mediante el proceso de disgregación enzimática con colagenasa a 37°C y agitación mecánica, como lo realizan otros autores (Bugaisky, 1988) obtenemos un escaso número de células aisladas, pero en cambio sí creemos que es un buen método de disgregación tisular para la obtención de fibras musculares cardíacas adultas formadas por un escaso número de células unidas y que puedan manifestar en el cultivo actividad contráctil. Posteriormente, aprovechando nuestra experiencia en el desarrollo de los cultivos miocardiocíticos embrionarios de pollo (González y col., 1991), hemos logrado desarrollar una técnica de disgregación tisular a 4°C que nos permite mantener durante largos periodos de tiempo el tejido en contacto con la solución enzimática, al igual que hacen los autores que utilizan previa perfusión del órgano antes de la introducción del tejido cardíaco en la solución enzimática con agitación, pero en nuestras experiencias el contacto del enzima con el tejido se realiza a una temperatura baja permitiendo que la acción proteolítica del enzima sea escasa; posteriormente la actuación de la solución enzimática a su temperatura ideal (37°C) ocurre

durante un corto espacio de tiempo antes de añadir medio de cultivo con suero fetal de ternera que inhibe la acción proteolítica de las enzimas (Gibson-D'Ambrosio y col.,1986), reduciéndose el daño que pudieran sufrir las células debido a la acción enzimática.

La viabilidad obtenida tras los procesos de disgregación (68%) que es similar a la obtenida por otros autores en sus experiencias de aislamientos de miocardiocitos adultos procedentes de diversos mamíferos como el gato o el conejo (Powell,1988), hacen que esta técnica de aislamiento de miocardiocitos adultos humanos a partir de biopsias quirúrgicas sea una técnica útil para el aislamiento y posterior cultivo de estos miocardiocitos para la realización de estudios fisiológicos, morfológicos e inmunohistoquímicos de los miocardiocitos aislados en cultivo (Bkaily y col.,1984; Jacobson y Piper,1986; Campbell y col.,1979). Debido a que en esta técnica, para el buen aislamiento de las fibras de miocardio de los restos grasos depositados en el pericardio y de dicho pericardio, supone la pérdida del 60-70% del peso total de la biopsia, principalmente por ser la orejuela de la aurícula cardíaca una prolongación hueca de la parte superior de la aurícula, si las biopsias fueran extraídas de otra zona cardíaca en la cual la cantidad de fibra miocárdica fuese muy superior a la cantidad de pericardio y material graso de la biopsia, la biopsia pudiera ser de mayor peso neto o mejor aún, si se pudiera disponer de un corazón entero para la realización de la técnica, se obtendría una gran cosecha de células viables que podrían ser utilizadas para la realización de experiencias en donde se necesitan gran número de células, como son los ensayos bioquímicos, farmacológicos o estudios de ácidos nucleicos en biología molecular (Frelin y col.,1974; Lewis y González,1987; Claycomb,1988).

Una vez aislados los miocardiocitos humanos adultos son sembrados en un medio de cultivo que lleva como medio

base el DMEM, suplementado con suero fetal de ternera y una serie de sustancias como transferrina e insulina que hemos observado que favorecen la proliferación de las células miocardiocíticas embrionarias de pollo en cultivo (Tabla V) que otros autores también han observado son beneficiosas para el cultivo de células miocardiocíticas adultas de mamíferos (Claycomb y Lanson, 1984; Claycomb y Moses, 1985), además de suplementar el medio de cultivo con glucosa, un hidrato de carbono que hemos observado que aumenta la actividad de los miocardiocitos humanos adultos en cultivo (González y col., 1989). Por los resultados obtenidos en nuestros cultivos, creemos que el DMEM es el medio de cultivo adecuado para el cultivo de miocardiocitos humanos adultos, ya que otros medios utilizados por otros autores como el MEM (Bugaisky, 1988) no contienen glucosa, azúcar que si lleva en su composición el DMEM, también estamos de acuerdo con otros autores como CLAYCOMB (1988) que suplementa su medio de cultivo DMEM utilizado para el cultivo de células miocardiocíticas humanas adultas con un alto contenido de glucosa; otros autores para el cultivo de miocardiocitos adultos procedentes de diversos animales también utilizan medio de cultivo DMEM suplementado con una alta proporción de glucosa (Powell, 1988), tal como hacemos nosotros con nuestro medio para el cultivo de las células cardíacas humanas, ya que la presencia de este azúcar favorece el desarrollo de dichos cultivos celulares.

La densidad de siembra utilizada en estos cultivos (75.000 células/ml), es cercana a la utilizada por otros autores para el cultivo de miocardiocitos adultos procedentes de primates o de humanos (Claycomb y Moses, 1985; Claycomb, 1988). La contaminación de los cultivos de miocardiocitos adultos por fibroblastos fué minimizada por la adición al medio de cultivo citosina-1- β -D-arabinofuranósido (Claycomb, 1988; Claycomb y Moses, 1988).

La evolución morfológica de nuestras células en cultivo es similar a la observada por otros autores, así en las

fibras cardíacas aisladas se observan los miocardiocitos con una morfología larga, delgada y elíptica (Sommer y Waugh, 1976; Forbes y Sperelakis, 1984); las células aisladas en las primeras horas de cultivo tienen una morfología de barra cilíndrica con numerosas estriaciones transversales, la gran mayoría de células son uninucleadas aunque se puede observar un porcentaje elevado de células binucleadas como anteriormente habían descrito otros autores (Bugaisky, 1988). Al cabo de pocos días en cultivo las células van adoptando una morfología más irregular, la morfología inicial de barra cilíndrica se transforma en una morfología más poligonal-esférica y van apareciendo unas prolongaciones citoplasmáticas en las células a consecuencia de su adherencia en la superficie de cultivo, aumentando el tamaño celular. Estamos de acuerdo con BUGAISKY (1988), el cual observa que en sus cultivos de miocardiocitos humanos adultos la morfología celular con el tiempo de cultivo evoluciona hacia una morfología fibroblástica, en nuestros cultivos observamos que las células aisladas en forma de barra cilíndrica una vez adheridas se extienden adoptan una morfología fibroblástica, dicha morfología se manifiesta aún más en las células que han salido de los explantes de tejido que no han sido totalmente disgregados por los enzimas.

Cuando el tiempo de cultivo se prolonga (más de 15-25 días), las células adoptan gran tamaño, la gran mayoría manifiestan una morfología rectangular, observándose contacto entre las células cercanas, algunas presentan una morfología que recuerda a las neuronas, se observan algunas inclusiones citoplasmáticas, las células contienen más de un núcleo en los cuales se observan un manifiesto nucléolo, algunas células presentan cuatro núcleos con nucléolos, no se observan miofibrillas organizadas, ni tampoco observamos que nuestras células en el cultivo manifiesten actividad contráctil; nuestros resultados coinciden con las experiencias realizadas por otros autores que han logrado mantener por largos periodos de tiempo en cultivo células cardíacas adultas (Claycomb y Palazzo, 1980).

La población celular va disminuyendo a lo largo de los días de cultivo, no observándose a lo largo de todos los días que se ha mantenido el cultivo un aumento de la población celular de una semana de cultivo a la siguiente, debido a que las células miocardiocíticas adultas en cultivo han perdido su capacidad mitótica, aunque ocasionalmente se puedan observar alguna mitosis (Jeter y Cameron, 1971; Kasten, 1972).

Los distintos autores que han utilizado miocardiocitos procedentes de corazón humano para sus experiencias, las células las han mantenido vivas durante periodos de tiempo desde 48 horas para las células humanas embrionarias (14-16 semanas de gestación) y células procedentes de corazones juvenes (2,5 años de edad) (Claycomb, 1988), hasta 14 días en cultivo para células miocardiocíticas cilíndricas procedentes de corazones humanos adultos (36-39 años de edad) (Bugaisky, 1988). Con nuestras experiencias llegamos a mantener con vida a células miocardiocíticas procedentes de corazones humanos adultos (36-69 años de edad) hasta 56 días en cultivo; aunque la duración en cultivo es menor que la obtenida por otros autores para el cultivo de células miocardiocíticas adultas procedentes de corazones de otras especies de mamíferos (Claycomb y Palazzo, 1980), si es muy superior la duración en cultivo de nuestras células que las que han obtenido otros autores que han utilizado como fuente de procedencia de las células tejido cardíaco humano (Claycomb, 1988; Bugaisky, 1988).

La caracterización de los miocardiocitos humanos adultos en cultivo la hemos realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas usando anticuerpos específicos contra componentes estructurales del citoesqueleto, como previamente han hecho otros autores en cultivos de miocardiocitos adultos (Terracio y Borg, 1988). Como en el caso de los cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo el marcador específico escogido ha sido la proteína desmina componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células musculares

(Lazarides, 1980; Osborn y col., 1981; Pieper y col., 1989); se han realizado también las técnicas inmunohistoquímicas con el anticuerpo monoclonal antivimentina, ya que la vimentina se ha observado que está asociada a la desmina y forma parte también de los filamentos intermedios en las células cardíacas humanas (Thornell y col., 1984), al igual que se ha observado su coexpresión en células cardíacas en cultivo (Nag y col., 1986).

El marcaje con anticuerpo monoclonal antidesmina presenta una distribución punteada a lo largo del citoplasma celular, al igual que observan otros autores en células cardíacas y otras células musculares (Lazarides y Hubbard, 1976), y también similar al observado por otros autores en tejido cardíaco humano (Van Muijen y col., 1987); estamos de acuerdo con estos autores que observan que esta proteína se encuentra asociada con las líneas Z de las sarcómeras cardíaca y se extiende entre las líneas Z de miofibrillas adyacentes, observándose también en nuestros cultivos un marcado punteado fluorescente cerca de las membranas plasmáticas celulares (Figura 4). Esta distribución de la expresión de la desmina en los miocardiocitos humanos podría corresponderse con su función de integrar mecánicamente todos los componentes del aparato contráctil celular para que pueda efectuarse correctamente el ciclo activo de contracción y relajación de la célula muscular (Lazarides y Hubbard, 1976; Gabella, 1979).

El patrón de marcaje en forma de red filamentosa observado en las células miocardiocíticas adultas humanas cuando realizamos la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal antivimentina, concuerda con lo observado anteriormente en células musculares (Campbell y col., 1979); la disposición perinuclear observada en nuestras células en cultivo, creemos que puede concordar con las ideas expuestas por algunos autores (Virtanen y col., 1979; Georgatos y Blobel, 1987) que sugieren que esta disposición de los filamentos de vimentina en

el citoplasma celular desempeña una función de soporte mecánico del núcleo celular, fijando la posición de este dentro del citoplasma celular, así mismo los filamentos de gran longitud que llega hasta las prolongaciones citoplasmáticas pueden ejercer un papel de transmisor de señales desde el núcleo hasta la membrana plasmática (Figura 4). El gran número de filamentos de vimentina observadas en nuestras células adultas en cultivo, podría ser debido a que son células que llevan varios días en cultivo, han adaptado su morfología celular a la superficie de cultivo y por tanto al aumentar el tamaño celular, debe de aumentar la cantidad de filamentos de vimentina para poder seguir desempeñando su labor de soporte mecánico en el citoesqueleto y la gran cantidad de filamentos perinucleares siguen delimitando la disposición del núcleo celular en el citoplasma de las células, donde se observa un núcleo de gran tamaño o varios núcleos cuando la célula lleva largos periodos de tiempo en cultivo (Figura 2). Los resultados anteriormente expuestos concuerdan con los resultados obtenidos por algunos autores, para los cuales la cantidad de vimentina celular va aumentando con el tiempo de duración del cultivo y que sugieren que su expresión en las células en cultivo podría estar relacionada con la adaptación de las células a las condiciones del cultivo (Virtanen y col., 1981).

V.B. Contenido en Filamentos Intermedios de los miocardiocitos

En el desarrollo de la actividad contráctil de las células musculares, la actina y la miosina son las principales proteínas que intervienen en la realización de dicha actividad característica de todas las células musculares; pero además de estas dos proteínas componentes principales de las miofibrillas musculares existen una serie de proteínas accesorias necesarias para que el proceso de contracción-relajación de la célula muscular ocurra de una forma ordenada. Entre las proteínas

acesorias e importantes para un buen funcionamiento de la actividad contráctil celular se encuentran dos proteínas reguladoras del proceso que son la troponina y la tropomiosina, y además una serie de proteínas encargadas del mantenimiento correcto en el citoplasma celular del aparato contráctil que son los filamentos intermedios (Lazarides, 1980).

Los filamentos intermedios son los componentes más estables del citoesqueleto celular, localizados principalmente en la zonas sometidas a tensión mecánica, desempeñando una función estructural o de soporte mecánico en la célula; la composición polipeptídica de los diversos filamentos intermedios varía con los diversos tipos celulares y dentro de un mismo tipo celular puede variar con las diferentes especies animales (Eriksson y Thornell, 1979).

Mediante estudios con microscopía electrónica fueron observados los filamentos intermedios en las células cardíacas (Caesar y col., 1958), los cuales como en el resto de células musculares se les consideró como un grupo morfológicamente distinguible de los otros componentes estructurales de la célula muscular y por tanto un componente estructural con entidad propia dentro de las miofibrillas musculares (Ishikawa y col., 1968; Osborn y Weber, 1986).

Dentro de los filamentos intermedios que forman parte estructural de la célula cardíaca, como de los otros tipos de células musculares, la proteína característica de estos filamentos intermedios musculares es la desmina que presenta un peso molecular aproximado de 50.000-55000 daltons dependiendo de la procedencia celular (Lazarides y Weber, 1976). La desmina, proteína característica de las células musculares, está estrechamente relacionada en estas células con otra proteína de peso molecular de 52.000-53.000 daltons (Brown y col., 1976; Lazarides, 1980; Gown y Vogel, 1982) denominada vimentina; la vimentina se coexpresa con la desmina en los filamentos

intermedios de las células de músculo liso, esquelético y cardíaco (Tuszynski y col.,1979; Gard y Lazarides,1980; Thornell y col.,1984), observándose incluso heteropolímeros de ambas proteínas en algunas células presentes en los cultivos de miocardiocitos (Ip y col.,1983).

Los filamentos intermedios en las células musculares cardíacas desempeñan una importante función de soporte mecánico de las estructuras subcelulares, así se conoce que la desmina mantiene interconectadas las miofibrillas individuales unas con otras y a éstas con la membrana plasmática (Lazarides,1980), además la desmina puede unir los filamentos de actina de una forma continua a través de los desmosomas, pudiendo mantener unidas las sarcómeras adyacentes pertenecientes a células diferentes y pudiendo transmitir la intensidad y el ritmo cardíaco de una célula a otra (Thornell y Eriksson,1981). La vimentina aparte de estar estrechamente ligada a la desmina en los filamentos intermedios de las células musculares, desempeña un papel de soporte mecánico y mantenimiento del núcleo en un lugar determinado del citoplasma celular (Virtanen y col.,1979) y para otros autores desempeña un papel de transmisor de señales desde el núcleo a la membrana plasmática (Georgatos y Blobel,1987).

Por todo lo anteriormente expuesto se deduce que los filamentos intermedios en las células musculares juegan un papel fundamental en el mantenimiento de una correcta funcionalidad de la célula muscular cardíaca, una alteración en su composición y/o cantidad dentro de la célula es signo evidente de una alteración celular que puede afectar no solo a la actividad contráctil celular, sino también a la viabilidad celular, como se ha observado en situaciones patológicas de hipertrófia (Gabella,1979) ó en miopatías hereditarias del músculo cardíaco (Porte y col.,1980). Además la cantidad y distribución de estas proteínas, desmina y vimentina, componentes de los filamentos intermedios de las células musculares, se ha

observado estar muy relacionada con la embriogénesis del tejido cardíaco (Rong y col.,1987; Muros y col.,1990), así como con diversos procesos tumorales de las células musculares (Altmannsberger y col.,1981), siendo de uso cotidiano en el diagnóstico tumoral el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a la identificación de desmina ó vimentina (Seidal y col.,1987; Leader y col.,1987).

En nuestros trabajos hemos realizado un amplio estudio de la evolución de la presencia y cantidad de desmina y vimentina en los tejidos cardíacos a lo largo del desarrollo embrionario, en tejido humano adulto y de los miocardiocitos (embrionarios de pollo y humano adulto) en cultivo, ya que el conocimiento de la evolución de estas proteínas es importante para la buena funcionalidad cardíaca, ya que son fundamentales para una correcta actividad contráctil, típica de la célula muscular cardíaca, y la transmisión del latido cardíaco de una célula a otra (Thornell y Eriksson,1981) para una correcta funcionalidad del órgano entero. La posible alteración de la composición normal en desmina y vimentina de la célula cardíaca pueden dar lugar a situaciones patológicas que pueden alterar el funcionamiento del corazón.

V.B.1. Contenido de Filamentos Intermedios en el tejido cardíaco

V.B.1.1. Tejido cardíaco de embrión de pollo

Los niveles intracelulares de proteínas van a depender del desarrollo de la actividad biosintética y degradativa de estas biomoléculas, un aumento o disminución de cada una de estas actividades va a producir a un cambio de los niveles celulares de proteínas.

Las células musculares cardíacas nos proporcionan un modelo experimental para el estudio coordinado de la biosíntesis y degradación de las proteínas componentes de las típicas miofibrillas musculares, pudiendo realizarse estos estudios en células embrionarias que manifiestan un rápido crecimiento ó en células adultas las cuales no manifiestan crecimiento, sino que se mantienen estables (Zak y col.,1979: Jeter y Cameron,1971). También es ampliamente conocido que el músculo cardíaco adapta su masa y contenido de cada una de las proteínas contráctiles según sus requerimientos funcionales (Swynghedauw, 1986), por tanto cada célula cardíaca por sí sola puede variar su contenido y composición proteica adaptándola a las diversos procesos fisiológicos como durante los procesos de hipertrofica en que se observan incrementada la síntesis proteica (Morgan y col.;1987), ó cambios en la cantidad del contenido de algunas proteínas debido a manipulaciones mecánicas o farmacológicas en el corazón (Shimizu y col.,1988; Pritzl y Zak,1987).

En el desarrollo embrionario del pollo a lo largo del cual se produce una gran actividad mitótica celular, que va acompañada por una serie de cambios morfológicos ultraestructurales, que debe ir acompañada por una alteración del contenido proteico de los miocardiocitos (Bishopric y col.,1987); nuestros resultados concuerdan con lo expuesto anteriormente, ya que observamos una variación del contenido proteico del tejido cardíaco a lo largo del desarrollo embrionario (Tabla XII), con un aumento progresivo de la concentración proteica hasta el estadio XXIX H.H. (detectandose mediante un test de diferencias de medias para muestras independientes que existe una diferencia significativa entre las poblaciones, con un valor de $T = -47,207$ y probabilidad de error $< 0,00001$), en el cual se producen una serie de alteraciones importantes en las células, como la pérdida de algunas propiedades migratorias que los asemejan a los miocardiocitos adultos (Kinsella y Fitzharris,1982), o el hecho de que los

miocardiocitos procedentes de éste estadio del desarrollo embrionario una vez en cultivo presenten la máxima actividad contráctil en cultivo (Lehmkhul y Sperelakis, 1963; De Haan, 1967) para lo cual es necesario un alto contenido de miofibrillas y por tanto un elevado contenido de proteínas contráctiles en la célula.

Posteriormente se produce un descenso de la concentración proteica celular y un posterior aumento, alcanzándose un nuevo máximo en el estadio XXXVI H.H. y un posterior ligero descenso del contenido proteico con un nuevo mínimo en los estadios XXXVIII-XXXIX H.H. y posterior incremento hasta el estadio XLIV H.H., con descenso del 11% en la concentración proteica al pasar del estadio XLIV H.H. al último estadio del desarrollo embrionario del pollo (XLV H.H.) (con diferencias estadísticamente significativas, con un valor de $T=8,394$ y una probabilidad de error $<0,01$) ; estos últimos resultados concuerdan con los observados por otros autores, que miden la actividad ATPasa relacionada con la cantidad de una de las proteínas contráctiles más importantes como es la miosina presente en el contenido celular (Kirby y col., 1990), los cuales observan un máximo en el contenido de esta proteína a los 9 días de incubación (estadio XXXV H.H.) y un posterior descenso del contenido de la actividad ATPasa que alcanza un mínimo a los 12 días de incubación (estadio XXXVIII H.H.). Posteriormente se produce un aumento espectacular de la actividad ATPasa que alcanza valores superiores a los observados en el día 9 de incubación, tal como ocurre con la concentración proteica del homogenado celular a partir del estadio XL H.H. donde se observan unos valores superiores a los del estadio XXXVI H.H.. En el último estadio del desarrollo embrionario observamos un descenso del contenido proteico del homogenado celular, que puede coincidir con los resultados obtenidos por KIRBY y col. (1990), ya que si bien para estos autores la actividad ATPasa del ventrículo continúa aumentando en este estadio XLV H.H. (19-20 días de incubación), pero la actividad ATPasa de la aurícula

empieza a descender; este descenso de la actividad ATPasa en la aurícula podría estar relacionado con el descenso en la concentración proteica observado en nuestro homogenado celular, aunque los resultados de estos autores están referidos a la proteína miosina y los nuestros se refieren al contenido proteico total.

Una vez determinada la concentración proteica en el homogenado celular, es necesario el fraccionamiento subcelular para la realización de análisis del contenido proteico de cada una de las fracciones subcelulares que nos pueda dar información acerca de la relación entre composición proteica, estructura y función de las miofibrillas de las células cardíacas.

El fraccionamiento celular ha sido una técnica básica en los estudios realizados en los últimos años en Biología Celular, basándose principalmente el proceso de separación de las distintas fracciones subcelulares en las diferentes formas y densidades de los distintos componentes subcelulares (Howell y col., 1989). El proceso de fraccionamiento celular seguido en nuestras experiencias es el descrito por LEWIS y col. (1987, 1988), con algunas modificaciones introducidas por nosotros; así mientras LEWIS y col. para la extracción de la fracción citoesquelética a partir del botón insoluble en Tritón X-100 obtenido tras centrifugación, realiza solubilización en tampón de muestra de Laemmli (Laemmli, 1970); en nuestras experiencias la fracción citoesquelética la obtenemos mediante solubilización de las proteínas del citoesqueleto en una solución de SDS, glicerol, Tris y agua destilada, los mismos componentes que el tampón de muestra de Laemmli que además contiene en su composición azul de bromofenol y β -mercaptoetanol, sustancias que puede interferir en la determinación proteica que realizamos tras el fraccionamiento celular (Lowry, 1951). Una vez obtenidas las fracciones subcelulares, las proteínas que contienen son aisladas mediante acetona a muy baja temperatura (-20°C) y posterior centrifugación, disolviéndose posteriormente en el volumen apropiado de tampón de muestra de Laemmli.

En cuanto al uso de la diferente solubilidad en Tritón X-100 de los componentes de las fracciones citoesqueléticas y citoplasmáticas subcelulares, nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por LEWIS y col. (1987,1988), ya que obtenemos una buena separación de las proteínas correspondientes al citoplasma (solubles en Tritón X-100), de las del citoesqueleto (insolubles en Tritón X-100 y solubles en SDS), como anteriormente observaron otros autores que comprobaron la insolubilidad de las proteínas del citoesqueleto en Tritón X-100 (Isaacs y col.,1989), mientras otros autores manifiestan que esta fracción proteica subcelular insoluble en Tritón X-100, es una fracción rica en filamentos intermedios componentes del citoesqueleto celular (Ben-Ze'ev,1990).

Nuestros resultados muestran un aumento progresivo en la concentración proteica de la fracción citoplasmática celular a lo largo del desarrollo embrionario del embrión de pollo, alcanzándose un máximo en el estadio XXIX H.H. (no encontrándose diferencias estadísticamente significativas, con un valor de $T=-1,029$ y un nivel de significación= 0,361), al igual que ocurría con la concentración del homogenado celular, sufriendo un posterior descenso en el estadio XXXIII H.H. y a continuación un nuevo aumento en los estadios XXXVI y XXXVII H.H., obteniéndose valores inferiores a los de los estadios XXXVI y XXXVII H.H. hasta el estadio XLIV H.H., con posterior descenso en el último estadio del desarrollo embrionario, tal como ocurría en el contenido proteico del homogenado celular (valores estadísticamente significativos, con un valor de $T=13,453$ y una probabilidad de error $<0,001$).

En cuanto al contenido proteico de la fracción citoesquelética celular, formado por una serie de proteínas encargadas del control de la forma y motilidad celular, de funciones de la membrana y de la distribución de los diferentes componentes subcelulares (Senécal y col.,1987), evoluciona de

manera similar al citoplasmático (con valores estadísticamente significativos, con una probabilidad de error $< 0,0000001$ hasta el estadio XXIX H.H. e $< 0,000001$ para los estadios más avanzados) ; pero en los resultados obtenidos correspondientes a los estadios del desarrollo embrionario estudiados, en todos ellos observamos que el contenido proteico citoplasmático es superior al de la fracción citoesquelética, tal vez debido a que en el citoplasma celular se encuentran los ribosomas encargados de la biosíntesis proteica, por tanto en el citoplasma celular encontraremos las proteínas contráctiles que forman parte de las miofibrillas, los filamentos intermedios recién sintetizados que posteriormente formaran parte del citoesqueleto (Benítez-King y col., 1989) y además una serie de proteínas que forman parte del funcionamiento celular, pero no forman parte del citoesqueleto como pueden ser enzimas, proteínas transportadoras, etc.

Una vez estudiado el contenido proteico del homogenado celular, así como de las fracciones citoplasmática y citoesquelética, nuestro trabajo se dirigió hacia el estudio del contenido de las proteínas desmina y vimentina, componentes de los filamentos intermedios de las células musculares del tejido cardíaco, las cuales tienen una gran importancia para el buen desarrollo de la actividad celular miocardiocítica.

Para el estudio del contenido proteico en las diferentes fracciones subcelulares de desmina y vimentina, hemos procedido a la separación electroforética mediante SDS-PAGE de las proteínas previamente aisladas y disueltas en el tampón de muestra de Laemmli (Laemmli, 1970; Leiva y col., 1990). La cantidad de cada una de estas proteínas (desmina y vimentina) correspondientes a 15 μg de proteínas totales corridas en cada muestra, fue determinada mediante estudio densitométrico de las bandas proteicas teñidas, con la ayuda de un densitómetro que es capaz de procesar el área del pico densitométrico correspondiente a cada proteína y determinar su cantidad (Lewis y col., 1988; González y col., 1991).

La metodología seguida para la determinación de la cantidad proteica de desmina y vimentina correspondiente a cada muestra separada electroforéticamente, nos ha permitido conocer el contenido proteico de los miocardiocitos de estas proteínas, componentes de los filamentos intermedios. El estudio densitométrico de los geles mediante computador integrado lo consideramos un sistema apropiado para la obtención de la cuantificación de las cantidades de desmina y vimentina presente en el citoplasma y citoesqueleto celular, como otros autores lo han utilizado para el estudio de la evolución de las proteínas estructurales de la células musculares tras los procesos de isquemia muscular (Yuki,1987), el estudio de la alteración de del contenido celular en proteínas contráctiles estructurales debido a la influencia de ciertos fármacos (Lewis y col.,1987), e incluso algunos autores lo han utilizado para el estudio de los cambios de las proteínas del citoesqueleto en las células musculares en cultivo y dentro de esas proteínas, se ha cuantificado los cambios en desmina y vimentina que ocurren en células de músculo liso de rata en cultivo (Nikkari,1990).

El peso molecular correspondiente a cada banda proteica teñida en los geles de poliacrilamida una vez realizada la electroforesis fue determinado (Shapiro y col.,1967; Weber y Osborn,1969), detectándose una banda proteica correspondiente a la desmina a la cual le corresponde un peso molecular de 54.000-55.000 daltons como anteriormente observaron otros autores en las células musculares de diversas especies animales, incluidas células pertenecientes a tejidos humanos (Lazarides y Hubbard,1976; Campbell y col,1979; Clark y Zak,1981; Seidal y col.,1987); la banda proteica correspondiente a la vimentina se ha observado a una altura en el gel que corresponde a los 57.000-58.000 daltons tal como se ha descrito anteriormente en diversas experiencias realizadas con células musculares de diversas especies animales, incluidos tejidos humanos, realizadas por diferentes autores (Thornell y Eriksson,1981; Gown y Vogel,1982; Van Muijen y col.,1987).

Para una mayor certeza de que las bandas proteicas que hemos determinado son las correspondientes a las proteínas desmina y vimentina, en la diversas experiencias realizadas (tejido embrionario de pollo, tejido cardíaco humano adulto, cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo y cultivo de miocardiocitos humanos adultos), hemos procedido a la confirmación de dichas bandas mediante "immunoblotting" siguiendo la técnica utilizada anteriormente por otros autores (Towbin, 1979; Leiva y col.,1990) y mediante la utilización de anticuerpos monoclonales antivimentina y antidesmina, los cuales han sido utilizados por otros autores para la identificación de estas proteínas en tejido cardíaco embrionario de pollo (Muros y col.;1990; Velez y col.,1990) y además en nuestras experiencias realizadas en las células miocárdicas en cultivo (embrionarias de pollo y humanas adultos) hemos observado que marcan a las proteínas desmina y vimentina componentes de los filamentos intermedios de los miocardiocitos.

Nuestros resultados del " immunoblotting " (Figura 5) muestran que el anticuerpo monoclonal antidesmina da una banda nítida con un peso molecular aproximado de 54.000-55.000 daltons, mientras que cuando utilizamos el anticuerpo monoclonal antivimentina se observa una banda más nítida a la altura de la banda proteica correspondiente a un peso molecular de 57.000-58.000 daltons ; estos valores de los pesos moleculares de estas proteínas componentes de los filamentos intermedios de los miocardiocitos coinciden con los observados por otros autores (Virtanen y col.,1981; Thornell y Eriksson,1981).

Cuando observamos nuestros resultados de la cantidad de desmina y vimentina citoplasmáticas de cada uno de los estadios del desarrollo embrionario del pollo estudiados (Tabla XIII), observamos que la cantidad de desmina citoplasmática aumenta desde el valor mínimo obtenido en el estadio XVIII H.H., sufriendo ligeras oscilaciones a lo largo del desarrollo, obteniéndose el valor máximo en el estadio XXXVIII

H.H., con un valor que es un 45% superior que el observado en el estadio XVIII H.H.. Así pues los valores desmina citoplasmática que corresponden con la desmina que se está escindiendo del citoesqueleto y sobre todo con los de la desmina recién sintetizada cuyas subunidades monoméricas se reúnen y ensamblan en el citoplasma para adoptar su forma definitiva tetrámerica (Celis y col., 1983; Inagaki y col., 1987), al igual que otras proteínas constituyentes de las miofibrillas se sintetizan por los ribosomas citoplasmáticos y se ensamblan en el citoplasma (Stossel, 1989), a partir del primer estadio estudiado (XVIII H.H.) se mantienen sus valores con un ligero margen de variación del contenido citoplasmático a lo largo del desarrollo embrionario, observándose la mayor variación con respecto al valor del estadio XX H.H., en el estadio XXXVIII H.H. (27%); esta desmina citoplasmática es la que va regenerando a la desmina citoesquelética deteriorada ó está dispuesta para suplir las necesidades para un posible aumento del citoesqueleto celular.

Los valores de la vimentina citoplasmática, salvo en los dos primeros estadios estudiados (XVIII y XX H.H.) donde se observan los valores mínimos, se obtienen unos valores más homogéneos que los del contenido de desmina, a lo largo del desarrollo embrionario y en todos los estadios estudiados los valores de vimentina en el citoplasma son inferiores a los correspondientes de desmina observados en dicho estadio del desarrollo embrionario del pollo. Estos resultados pueden ser debidos a que en los primeros estadios del desarrollo estudiados donde los niveles de vimentina citoesquelética son máximos (Tabla XV), las subunidades de vimentina recién sintetizadas se van ensamblando y uniéndose al citoesqueleto, mientras que posteriormente, cuando los niveles de vimentina en el citoesqueleto va disminuyendo y va siendo reemplazada por la desmina, como ocurre en la miogénesis (Seidal y col., 1987), la vimentina recién sintetizada permanece en el citoplasma para reponer la vimentina citoesquelética deteriorada ó para su

utilización en procesos de diferenciación celular (Paranko y col.,1986).

Pero más importante que la cantidad de proteínas citoplasmáticas componentes de los filamentos intermedios, es la cantidad de las proteínas desmina y vimentina que podemos detectar en la fracción citoesquelética de los miocardiocitos de tejido embrionario de pollo, debido a la función que desempeñan los filamentos intermedios en el mantenimiento de la forma celular, disposición de las organelas celulares y es fundamental en la célula muscular la presencia de estos filamentos intermedios que mantienen correctamente dispuesto en el espacio celular al resto de proteínas que forma el aparato contráctil celular, pudiendo realizarse el proceso de contracción-relajación típico de la célula muscular, además de poder transmitirse la intensidad y el ritmo del latido celular de forma continua mediante la intervención de los filamentos intermedios (Lazarides,1980; Gabella,1979; Virtanen y col.,1979; Thornell y Eriksson,1981).

Nuestros resultados correspondientes a la cantidad de desmina y vimentina del citoesqueleto celular (Tabla XV), nos muestran que la desmina componente del citoesqueleto celular en los primeros estadios presenta un valor muy bajo y la cantidad de desmina va aumentando a lo largo del desarrollo embrionario del pollo, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en el último estadio del desarrollo embrionario (XLV H.H.) con valor que es un 371% superior al valor inicial obtenido en el primer estadio estudiado (XVIII H.H.) y esta diferencia es del 2.550% si comparamos los valores de desmina citoesquelética referidos a 100 mg de tejido (Tabla XVI), entre el primer estadio estudiado (XVIII H.H.) y el último (XLV H.H.). Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores que mediante inmunofluorescencia han observado que durante los primeros estadios del desarrollo embrionario la desmina presenta un

marcaje más débil y este marcaje aparece más predominante en los últimos estadios del desarrollo embrionario en los cuales las células se asemejan más a la célula adulta (Lazarides y Hubbard, 1976; Velez y col., 1990; Yablonka-Reuveni y Nameroff, 1990).

Los valores de vimentina del citoesqueleto obtenidos en nuestros resultados (Tabla XV), nos muestran los valores máximos en los primeros estadios del desarrollo embrionario del pollo estudiados (XVIII y XX H.H.), observándose a continuación un descenso prolongado a lo largo del desarrollo (observándose una diferencias estadísticamente significativas entre los valores del estadio XVIII y XXIX H.H., con un valor de $T=11,607$ y una probabilidad de error $<0,001$), hasta alcanzar unos valores mínimos de vimentina citoesqueletal que se mantienen en los últimos estadios del desarrollo embrionario. La cantidad de vimentina del citoesqueleto es superior a la cantidad de desmina citoesqueletal durante los primeros estadios del desarrollo embrionario estudiados (XVIII y XX H.H.), a partir del estadio XXII H.H. los valores de desmina citoesqueletales son superiores a los observados de vimentina citoesqueletal. Los datos anteriormente expuestos están de acuerdo con lo anteriormente publicado por otros autores, los cuales observan que la vimentina es la proteína componente de los filamentos intermedios predominante durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, siendo progresivamente reemplazada por la desmina durante la miogénesis (Bennet y col., 1979; Altmannsberger y col., 1981; Muros y col., 1990).

Cuando observamos el contenido de vimentina citoesqueletal correspondiente a 100 mg de tejido cardíaco embrionario (Tabla XVI), observamos un valor elevado en el estadio XXIX H.H., al igual que el valor de la desmina citoesqueletal, esto puede ser debido a los cambios celulares que se deben producir en dicho estadio, los cuales

pueden llevar a una diferenciación celular que implican unos cambios en las proteínas de los filamentos intermedios como otros autores han observado durante la diferenciación de diversos tipos celulares (Ishikawa y col.,1968; Paranko y col.,1986) ó con los mecanismos de fosforilización ó proteolíticos que predominantemente regulan el ensamblaje-desensamblaje de los filamentos intermedios "in vivo " y que hoy en día no están clarificados (Inagaki y col.,1989). Los cambios que deben producirse durante el estadio XXIX H.H. también pueden afectar a la detección mediante inmunofluorescencia de la vimentina a lo largo del desarrollo embrionario del pollo, siendo el estadio XXIX H.H. el último en el cual se detecta mediante inmunofluorescencia la presencia de vimentina en el tejido cardíaco embrionario de pollo (Velez y col.,1990).

Así pues nuestros resultados corroborean la teoría de que la vimentina es la proteína predominante durante los primeros estadios del desarrollo embrionario del pollo y a continuación, conforme los estadios son más avanzados y las células van adquiriendo características que las asemejan a las células musculares adultas (Velez y col.,1990; Muros y col.,1990), la proteína desmina característica de la célula muscular, va reemplazando paulativamente a la vimentina, conservándose ésta en una cantidad pequeña suficiente para el cumplimiento de sus funciones estructurales dentro de la célula, pero no tal vez la necesaria para que sea detectada por técnicas de inmunofluorescencia, ya que posteriormente puede ser detectada en tejido muscular liso adulto (Nikkari y col.,1990) o para unos autores la vimentina solo es parcialmente reemplazada por la desmina durante la miogénesis (Bennett y col.,1979), mientras que para otros la organización del músculo cardíaco es mucho más compleja que el músculo esquelético, y si bien se distingue claramente la presencia de desmina, existen otras especies de proteínas en pequeñas cantidades que no hacen difícil su identificación por inmunotinción (Tokuyasu,1983).

V.B.1.2. Tejido cardíaco humano adulto

En lo referente al tejido cardíaco humano adulto, observamos que el rendimiento en las concentraciones proteicas obtenidas cuando usamos como método de homogeneización el polytrón es superior que cuando usamos la homogeneización manual (Tablas XVII y XVIII), ya que el tejido cardíaco adulto es un tejido duro y es difícil la homogeneización total de toda la muestra utilizada, mientras que el polytrón que actúa mecánicamente suministrando una mayor fuerza sobre el tejido es capaz de lograr una mayor homogeneización, por lo cual creemos que la homogeneización mecánica mediante polytrón es el método de homogeneización adecuado para obtener un buen homogenado del tejido cardíaco adulto. En lo referente a las concentraciones proteicas pertenecientes a las fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas son similares, mientras que en el tejido embrionario de pollo la cantidad de proteínas del citoplasma era superior al del citoesqueleto (Tabla IX), tal vez debido a que los miocardiocitos en el tejido cardíaco embrionario tienen una mayor actividad proliferativa, con unas células con gran actividad mitótica que necesitan un gran aporte de proteínas para que aumente el tamaño celular y el número de células tras la división celular; mientras que en el tejido adulto la actividad biosintética de los ribosomas es mucho menor, el citoesqueleto celular está formado y además en estas células cardíacas adultas hacia la mitad de la tercera semana de vida postnatal, cesa su capacidad de síntesis de DNA y la posterior división celular (Claycomb, 1975; Erokhina y Romyantsev, 1988).

La concentración proteica y la cantidad de desmina citoplasmática en 100 mg de tejido miocárdico humano adulto (Tabla XIX), es superior que la cantidad de vimentina citoplasmática (entre 51-65%), mientras que las concentraciones y cantidades de desmina y vimentina del citoesqueleto son similares. Al contrario de las células embrionarias de pollo en

que la cantidad de vimentina citoesquelética correspondiente a 15 µg de proteínas totales del citoesqueleto era muy inferior a la desmina en los estadios avanzados del desarrollo embrionario y no era detectada mediante inmunofluorescencia (Velez y col., 1990), nuestros resultados obtenidos de las cantidades de vimentina en los tejidos cardíacos humanos adultos se coexpresa en estos tejidos con la desmina, proteína característica de los filamentos intermedios de las células musculares, como se ha observado por inmunofluorescencia en diversos tejidos musculares incluyendo el tejido cardíaco adulto (Lazarides, 1980), detectándose también esta coexpresión en tejidos cardíacos humanos tanto fetales como adultos (Van Muijen y col., 1987), observándose en estos tejidos adultos una relación entre el incremento en la expresión de vimentina en las células normales con diversas patologías y con un aumento de la capacidad proliferativa celular (Thornell y col., 1984).

V.B.2. Contenido de Filamentos Intermedios de los miocardiocitos en cultivo

Una vez que hemos estudiado la evolución del contenido proteico y de cada una de las proteínas que forman parte de los filamentos intermedios de los miocardiocitos " in vivo ", procedimos al estudio de la evolución en cultivo de estos parámetros de concentración proteica y de contenido en proteínas, así como la evolución de los contenidos en desmina y vimentina de las distintas fracciones subcelulares a lo largo de los días de cultivo, tanto en los cultivos de los miocardiocitos embrionarios de pollo, como en los cultivos de miocardiocitos humanos adultos.

La determinación del contenido proteico celular es un parámetro extensamente utilizado para hacer una estimación del contenido material total de la célula y siendo un valor que puede ser útil para la realización de experiencias de crecimiento

celular, expresión de actividades específicas de enzimas, contenido de receptores de membrana o contenido celular de ciertos metabolitos específicos (Freshney, 1988c). Todas nuestras experiencias de determinación de concentraciones proteicas las hemos realizado mediante método colorimétrico por la técnica descrita por LOWRY (1951), que es junto a la técnica descrita por BRADFORD (1976) la más utilizada en la determinación proteica en los cultivos celulares.

V.B.2.1. Contenido de los Filamentos Intermedios de los miocardiocitos embrionarios de pollo en cultivo

Los estudios del metabolismo proteico se han desarrollado en una amplia variabilidad de células cardíacas embrionarias y neonatas en cultivo (Clark y Zak, 1981; McDermott y col., 1985), en dichos modelos experimentales " in vitro " se ha observado que tanto la síntesis, como la degradación proteica se realiza en un rango que es 6-10 veces superior a los valores observados " in vivo " (Parmacek y col., 1986).

Cuando observamos la concentración y contenido proteico de nuestras células en cultivo observamos una gran fluctuación de estos valores a lo largo de los días de cultivo, así como también se observa una gran fluctuación en los valores del contenido proteico por célula, en todas las etapas del desarrollo embrionario del pollo utilizados en nuestras experiencias de cultivos de miocardiocitos embrionarios (XXV, XXIX y XXXIX H.H.) (Tablas XX, XXI y XXII), estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que observan una gran fluctuación en el contenido proteico de las células en cultivo (Morasca y Etba, 1986).

En todos los cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo, independientemente del estadio del

desarrollo embrionario del cual se ha extraído las células, se observa que a los siete días de cultivo ha aumentado la concentración proteica del homogenado celular, así como el contenido proteico por célula en cultivo; siendo este aumento de la concentración proteica mayor (49%) en los cultivos de células procedentes del estadio XXV H.H., mientras que el aumento del contenido proteico por célula ha aumentado un 66%, en el estadio XXIX H.H. el aumento del contenido proteico celular es del 21% y en el estadio XXXIX H.H. dicho incremento es del 88%; otros autores también han observado un incremento en el contenido celular de los miocardiocitos en cultivo, tras 5 días en cultivo de células miocardiocíticas embrionarias de pollo de 10 días de incubación, manifiestan un gran incremento en su contenido total proteico (Clark y Zak, 1981).

El aumento del contenido proteico para algunos autores parece ser estar relacionado con el sostenimiento del crecimiento celular (McDermott y Morgan, 1989), lo cual deben realizar estas células una vez se han adaptado al cultivo. La concentración proteica de los cultivos sigue aumentando a los 14 días de cultivo solo en las células procedentes del estadio XXV H.H., mientras que el contenido proteico por célula se observa incrementado en los cultivos del estadio XXV y XXXIX H.H..

Lo que si observamos en todos los cultivos es un descenso de la concentración proteica y del contenido proteico celular en el día 21 de cultivo, creemos que es debido a que en este día es donde tiene lugar una serie de procesos celulares que pueden derivar hacia la desaparición de las células vivas en el cultivo, ó hacia un aumento de la proliferación celular, como observamos en la evolución de la población celular en cultivo, donde también observamos un inicio del aumento de la proliferación celular a los 14 días en los cultivos de miocardiocitos del estadio XXIX H.H., los cuales van a ser posteriormente utilizados para el establecimiento del cultivo secundario (Tabla VII), esto podría justificar el descenso

proteico a los 14 días de cultivo observado en los cultivos de las células del estadio XXIX H.H., ya que pueden estar empezando a producirse modificaciones celulares, que se confirman en el día 21 de cultivo con un mayor descenso del contenido proteico. El hecho de que a los 21 días de cultivo se producen una serie de transformaciones, que pueden dar lugar a un aumento del número celular y a un incremento de la concentración proteica y del contenido proteico celular a los 28 días de cultivo, que en el caso del estadio XXIX H.H. el contenido proteico celular se ha incrementado 4 veces durante esta última semana de cultivo; dicho incremento es parecido a los valores del incremento del contenido proteico celular que observan otros autores durante un periodo de tiempo similar en cultivo (Clark y Zak, 1981; Parmacek y col., 1986).

Los valores de concentración proteica y contenido proteico celular referidos al citoplasma celular siguen un comportamiento similar al observado en los valores del homogenado celular, mientras que los valores proteicos referidos al citoesqueleto no sufren tantas fluctuaciones como los del citoplasma, manteniéndose en valores parecidos a lo largo de los días de cultivo. En lo referente a la concentración proteica de la fracción citoesquelética celular se observan que los valores tras 28 días de cultivo son inferiores a los iniciales, si bien el contenido proteico por célula va aumentando a lo largo de los días de cultivo, y el contenido en proteínas citoesqueléticas de la célula tras 28 días de cultivo es superior al contenido inicial en el momento de la siembra, en todos los cultivos estudiados; estos cambios están de acuerdo con lo observado por otros autores, los cuales en sus experiencias en cultivo encuentran una correlación entre el modo de organización y expresión de las proteínas del citoesqueleto, con los cambios producidos en las células en cultivo que conducen a la activación del crecimiento y la diferenciación celular (Ben-Ze'ev, 1990), así se ha observado un aumento del contenido de las proteínas del citoesqueleto en células que en principio crecen en suspensión y

se observa un descenso de la síntesis proteica, posteriormente cuando se adaptan al cultivo, crecen en monocapa y se observan un aumento de la síntesis de las proteínas que forman el citoesqueleto celular (Benítez-King y col.,1989).

Nuestros datos pues concuerdan con los de aquellos autores para los cuales se va incrementado el contenido proteico del citoesqueleto con la adaptación de las células al cultivo; en nuestros cultivos también observamos el incremento del contenido celular en proteínas citoesqueletales a lo largo de los días de cultivo, dicho aumento está correlacionado con la adaptación de las células al cultivo.

Una vez conocidas la evolución del contenido proteico celular, así como dicho contenido en las distintas fracciones subcelulares, nuestras experiencias se encaminaron al estudio del contenido de las proteínas constituyentes de los filamentos intermedios en cada una de las fracciones subcelulares a lo largo de los días en cultivo. Las experiencias desarrolladas para el estudio de la expresión de las proteínas desmina y vimentina en las células en cultivo han sido diversas, sobre todo mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a las células en cultivo (Virtanen y col.,1981; Ip y col.,1983; Ip y Fellows,1990); nuestras experiencias, una vez detectadas dichas proteínas en nuestras células en cultivo mediante inmunofluorescencia, las desarrollamos mediante electroforesis en SDS-PAGE y posterior " inmunoblotting", como han utilizado otros autores para la realización de sus experiencias con estas proteínas componentes de los filamentos intermedios en los cultivos celulares (Nikkari,1990; Raats y col.,1990).

Cuando observamos el contenido citoplasmático de desmina y vimentina (Tablas XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII y XXVIII), en todos ellos observamos que el contenido de desmina va disminuyendo a lo largo de los días de cultivo (con valores que estadísticamente muestran una diferencia significativa, así

en el estadio XXV H.H. muestran unos valores de $T = 9,848$ y un probabilidad de error $< 0,001$), siendo siempre el contenido en desmina citoplasmática tras 28 días en cultivo, inferior al contenido de desmina celular en el momento de la siembra, sufriendo sus valores diversas fluctuaciones a lo largo de los días de cultivo, fluctuaciones que son más marcadas en el día 21 de cultivo. En cambio el contenido de vimentina citoplasmática va aumentando a lo largo de los días de cultivo, debido a que en el citoplasma celular es dónde se produce la síntesis proteica de estas proteínas y el ensamblaje de sus subunidades para posteriormente formar parte del citoesqueleto celular (Raats y col., 1990), observándose en diversas experiencias que el contenido de vimentina celular va aumentando con los días de cultivo, relacionando la expresión de la vimentina con la adaptación de las células a las condiciones del cultivo (Virtanen, 1981).

El contenido proteico en desmina y vimentina del citoesqueleto a lo largo de los días en cultivo, se observa que es inferior al contenido de dichas proteínas en el citoplasma; mientras los valores de desmina en el citoesqueleto celular va aumentando ligeramente a lo largo de los días de cultivo, el incremento que experimenta el contenido de vimentina citoesquelética a lo largo del tiempo de cultivo es mucho mayor, con un incremento del 300% observado en los cultivos del estadio XXIX H.H. tras 28 días de permanencia de las células en cultivo.

Nuestros resultados del contenido proteico celular en desmina y vimentina, muestran que nuestras células al ir adaptándose a las condiciones de cultivo, van aumentando el contenido de vimentina, tanto citoplasmática como citoesquelética, produciéndose un cambio en la composición proteica de los filamentos intermedios durante la adaptación de las células a los cultivos (Guillou y col., 1990), cambios en la composición proteica que se manifiestan en un incremento del

contenido celular en vimentina y un mantenimiento ó ligero descenso de los niveles celulares de la desmina, proteína específica de los filamentos intermedios de células musculares (descenso de la desmina citoplasmática y aumento de la citoesquelética); este aumento de la vimentina en las células en cultivo se ha observado en células normales en cultivo (Virtanen y col.,1981), observándose también este incremento de la expresión de vimentina en otras células con gran capacidad de proliferación, las cuales han sufrido un proceso de transformación celular como son las células tumorales (Miettinen y col.,1984).

V:B.2.2. Contenido de Filamentos Intermedios de los miocardiocitos humanos adultos en cultivo

Nuestros resultados de la evolución de la concentración proteica en los cultivos de miocardiocitos humanos adultos (Tabla XXIX), manifiestan un descenso de los niveles proteicos en cultivo a lo largo de los días de cultivo, descenso que es más manifiesto a los 14 días de cultivo, aunque posteriormente sufre un aumento pero los valores obtenidos en los últimos días de cultivo son inferiores a los iniciales obtenidos en el momento de la siembra. En cambio los valores del contenido proteico por célula viva en cultivo sí manifiestan un aumento a lo largo de los días de cultivo, obteniéndose un valor final que es un 94% superior al inicial, siendo unos valores cercanos a los obtenidos para las células embrionarias de pollo para estadios del desarrollo embrionario avanzados en cultivo, si bien los valores finales obtenidos a los 28 días de cultivo en los cultivos adultos son muy superiores a los obtenidos con los cultivos embrionarios de pollo. Así pues, hemos observado una gran fluctuación de los valores proteicos a lo largo de los días de cultivo, del mismo modo que ha sido observado para otras células en cultivo (Freshney,1988c).

El contenido proteico de la fracción citoplasmática subcelular a los 28 días de cultivo es 6 veces superior al contenido proteico celular observado en el momento de la siembra, lo cual concuerda con los datos obtenidos por otros autores que logran en sus células miocárdicas embrionarias de pollo en cultivo un incremento (5-10 veces superior) del contenido proteico celular (Clark y Zak, 1981). El contenido de la fracción citoesquelal por célula aumenta después de la primera semana en cultivo, manteniéndose posteriormente en valores similares.

Una vez realizada la lectura densitométrica de los geles, observamos que la cantidad de desmina citoplasmática contenida en 15 μ g de proteínas citoplasmáticas totales (Tabla XXX), manifiesta un descenso de la desmina citoplasmática a lo largo de los días en cultivo, mientras que observamos un incremento de los valores de vimentina hasta alcanzar un máximo a los 14 días de cultivo, manteniéndose posteriormente en valores no muy lejanos. Los valores de desmina y vimentina citoplasmática por célula en cultivo (Tabla XXXI), también se observan aumentados a lo largo de los días de cultivo, tal vez debido a que las células adultas en el cultivo adoptan una morfología celular de gran tamaño y necesita gran cantidad de estas proteínas para formar parte de los filamentos intermedios que van a mantener en buena disposición a las proteínas componentes del citoesqueleto celular y también han de mantener en una correcta disposición a todas las organelas subcelulares (Claycomb y Palazzo, 1980; Virtanen y col., 1979).

Los resultados obtenidos con la distribución de la desmina y vimentina citoesquelal en las células cardíacas humanas adultas en cultivo, nos manifiestan que la cantidad de desmina citoesquelal que forma parte de cada 15 μ g de proteínas totales del citoesqueleto, aunque aumenta en los primeros 7 días de cultivo, posteriormente se mantiene en valores no muy diferenciados de los iniciales, aunque en el último día de

cultivo se observa un descenso del 17% con respecto al valor inicial observado en el momento de la siembra del cultivo; la desmina contenida en cada célula viable aumenta así mismo a los 7 días de cultivo, pero posteriormente desciende y se mantiene en valores similares. El contenido en vimentina citoesquelética aumenta hasta el día 14 de cultivo, a partir del cual se observa un descenso del contenido de vimentina en el citoesqueleto, obteniéndose un valor similar al inicial a los 28 días de cultivo; el contenido de vimentina citoesquelética por célula va aumentando hasta el día 14 de cultivo, posteriormente desciende aunque los valores tras 28 días de cultivo son un 233% superior a los iniciales en el momento de la siembra de las células.

Nuestros resultados con los cultivos de miocardiocitos humanos adultos nos manifiestan un aumento de la desmina y vimentina del citoesqueleto y del citoplasma durante los primeros días de cultivo (7-14 días), tal vez sea debido a que estas células han de adaptarse a las condiciones de cultivo, cambiando su morfología, reorganizando su aparato contráctil y su citoesqueleto, tal como han observado otros autores para células cardíacas adultas en cultivo (Moses y Claycomb, 1982); para la reorganización del aparato contráctil y del citoesqueleto debido al cambio de la morfología celular, es necesario un nuevo suministro de las proteínas constituyentes de estas estructuras subcelulares, siendo las proteínas desmina y vimentina las constituyentes de los filamentos intermedios de las células musculares, los cuales son unos de los principales componentes del citoesqueleto celular de estas células eucariotas (Lazarides, 1980).

El contenido en vimentina celular va aumentando a lo largo de los días de cultivo debido a la adaptación de las células a las condiciones de cultivo (Virtanen y col., 1981), en cambio a partir del día 14 de cultivo empieza a descender el contenido de vimentina del citoesqueleto, tal vez debido a que a partir de ese día 14, los cultivos de células miocardiocíticas

humanas adultas comienzan a pasar una fase crítica de supervivencia en cultivo como han observado otros autores (Bugaisky, 1988) y que nosotros observabamos dicho período crítico en los cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo a los 21 días de cultivo.

V.C. Influencia de los derivados del ácido fibrico en los filamentos intermedios de los miocardiocitos en cultivo

En los países desarrollados las enfermedades cardiovasculares es la principal causa de morbilidad y mortalidad, llegando a ser la causante de las dos terceras partes de todas las muertes producidas en los países occidentales (World Health Stat.Q., 1990). En los países mediterraneos que tradicionalmente presentaban las más bajas tasas de morbilidad debida a las enfermedades cardiovasculares, sin embargo en los países occidentales, en los últimos años se han elevado las tasas de morbilidad y mortalidad debida a estas enfermedades, dicho aumento también ha afectado a nuestro país (Encuesta de Morbilidad Hospitalaria I.N.E., 1987).

Los tres factores de riesgos principales que predisponen para el padecimiento de estas enfermedades son: la hiperlipemia, la hipertensión y el tabaco (Carletón y col., 1987). Se han realizado diversos estudios que correlacionan los niveles séricos de lípidos y la incidencia de las cardiopatías (Uemura y Pisa, 1985; Martin y col., 1986), observándose que dentro de los diversos lípidos estudiados, si la hiperlipemia es considerado como el factor de riesgo que más influye en el padecimiento de las enfermedades cardiovasculares, son los niveles plasmáticos de colesterol, el factor de riesgo conocido más importante, y se observa una relación entre sus valores y la incidencia de las enfermedades cardiovasculares (Keys, 1970; Pyörälä, 1988), siendo el único factor de riesgo que puede

justificar la variación geográfica de estas enfermedades en las distintas poblaciones y entre individuos pertenecientes a una misma comunidad (Ball y Mann, 1991a; WHO MONICA Project, 1988).

Debido a la alta morbilidad y mortalidad que representan en los países occidentales las enfermedades cardiovasculares y que su principal factor de riesgo sea la hiperlipemia, la lucha contra las enfermedades cardiovasculares se centra en combatir los altos niveles séricos lipídicos en la población en general y en particular en aquellos individuos con más alto riesgo de padecimiento de enfermedades cardiovasculares, así como la terapia del enfermo con cardiopatías se dirige hacia el descenso de su hiperlipemia.

La primera medida en el tratamiento de la hiperlipemia es el uso de la dieta para combatir los niveles lipídicos elevados en sangre, reduciendo en lo posible el consumo de grasa total, grasa saturada, colesterol, azúcar refinado y sal, y aumentando el consumo de otras grasas alternativas (grasa poliinsaturada y ácidos grasos monoinsaturados y de pescado) que previenen del padecimiento de las enfermedades cardiovasculares (Oya, 1988; Blankenhorn, 1990).

Si bien el tratamiento mediante dieta de la hiperlipemia suele ser la primera medida a tomar, a menudo no es suficiente para reducir los niveles lipídicos plasmáticos y a veces requiere una complementación con tratamiento farmacológico para poder disminuir los niveles lipídicos elevados en sangre, hasta los valores normales (Helsinki Heart Study 1987; European Atherosclerosis Society Study Group, 1987).

Durante las dos últimas décadas los derivados del ácido fibríco han sido los fármacos más usados en el tratamiento farmacológico de las hiperlipemias, siendo el gemfibrozilo el fibrato de mayor consumo en los países norteamericanos, mientras que el bezafibrato y el fenofibrato son los más utilizados en los

países europeos (Patsch,1990).

Los fibratos se han mostrado muy útiles en el tratamiento de la hiperlipemia (Illingworth,1988), tanto cuando se han administrado a los pacientes solos ó asociados con otros fármacos hipolipemiantes (Lussier-Cacan y col.,1989; Todd y Ward,1988; Goldstein,1990); pero su eficacia se ha visto disminuida debido a los efectos secundarios que presentan en los pacientes (Brown,1987; Todd y Ward,1988; Nicholls,1988) que llevaron a la retirada del mercado del primer fibrato usado en el tratamiento de la hiperlipemia, como es el clofibrato. Si bien los fibratos de las nuevas generaciones, solamente un bajo porcentaje de pacientes presentan efectos secundarios, al ser fármacos de reciente introducción para el tratamiento farmacológico de las hiperlipemias no es bien conocido aún el efecto que pueden producir en las diversas hiperlipemias conocidas, ni los posibles efectos que pueden producir tras un tratamiento prolongado, incluidos los efectos secundarios que pueden surgir que generalmente aparecen tras un tratamiento prolongado (Lussier-Cacan y col.,1989; Vessby y Lithell, 1990).

Entre los efectos secundarios que pueden presentar los pacientes tras el tratamiento con los fibratos, tienen especial interes los efectos secundarios sobre las fibras musculares, en especial de las que forman parte del sistema cardiovascular, ya que los enfermos que toman estos fármacos son generalmente enfermos que padecen diversas cardiopatías. Los datos obtenidos en la actualidad sobre los efectos secundarios producidos por estos fármacos, nos muestran datos analíticos que pueden estar relacionados con el daño muscular (Haubenstock, 1984; ødegaard,1988), también se han observado mialgias, rabdomiolisis y miolisis (Monk y Todd,1987; Grundy,1988; Pierce y col.,1990) y diversas alteraciones del ritmo de contracción cardíaco (La Rosa,1969; McGarvey,1973; Hüller y Glende,1984; Patsch,1990).

Puesto que las alteraciones del ritmo cardíaco pueden ser dependientes de la administración de los fibratos y ya que la actividad contráctil en los miocardiocitos está estimulada por un aumento de la capacidad de síntesis proteica (McDermott y Morgan, 1989), un aumento ó disminución en la síntesis proteica ó alteración de la composición de las proteínas que toman parte en los procesos de contracción celular, pueden producir una alteración en la actividad contráctil del corazón. Por tanto, es útil explorar la incidencia de los fibratos sobre el contenido proteico de los filamentos intermedios (desmina y vimentina), que desempeñan una importante función en la contracción cardíaca manteniendo en una correcta disposición espacial a las proteínas que forman el aparato contráctil y además colabora en la transmisión del latido a través del tejido cardíaco (Lazarides, 1980; Thornell y Eriksson, 1981).

Los ensayos farmacológicos para el estudio de la toxicidad de estos fármacos no se pueden realizar en humanos porque entrañan un elevado riesgo y se necesitan largos periodos de tiempo para detectarse algunos efectos adversos (Todd y Ward, 1988), por ello los ensayos tóxicos se han realizado en animales de experimentación mediante la administración de dosis elevadas de los fármacos (Anon, 1982; Stahlberg y col., 1989), los cuales conllevan una gran presión social en contra de dichos ensayos. Por ello creemos que los ensayos toxicológicos de los fármacos realizados en los cultivos de células miocardiocíticas, es una metodología útil para poder evaluar la citotoxicidad de los fibratos pues acortan el periodo de tiempo necesario para la realización de la experiencia, el fármaco está directamente en contacto con las células diana sobre las que pueden producir su efecto tóxico y se pueden reproducir las condiciones experimentales a las que se realizan los ensayos toxicológicos.

Trabajos recientes publicados por algunos autores han mostrado como los miocardiocitos en cultivo son un buen modelo experimental para demostrar la acción de determinados

fármacos sobre estas células (Severson y Carroll,1989; Barnett y col.,1989; Massey y Burton,1990), habiéndose determinado por metodología bioquímica la influencia de los fármacos sobre la síntesis de proteínas contráctiles (Lewis y González,1987); mediante electroforesis, se ha observado como diferentes fármacos interfieren la síntesis de diversas proteínas contráctiles, siendo la actina la más estudiada (Lewis y col. 1988).

La regulación de la síntesis de proteínas contráctiles y no contráctiles es independiente en el músculo cardíaco, con respecto a la observada en el esquelético (Preedy y Sugden,1989), por ello es interesante estudiar la influencia de los fibratos sobre las proteínas desmina y vimentina en miocardiocitos en cultivo, ya que otro modelo de miocitos de músculo liso ó estriado puede que no sea válido.

Mediante nuestras experiencias, hemos puesto a punto un modelo experimental de cultivo de células cardíacas las cuales son expuestas a la acción de diversos fármacos, explorándose posteriormente a nivel subcelular la acción de los citados fármacos sobre la desmina y vimentina celular. La experimentación en este modelo de cultivo miocardiocítico ofrece la ventaja de poder observar y cuantificar cómo influyen los fármacos en la síntesis y el contenido proteico tanto a nivel citoplasmático como citoesquelético.

Nuestras experiencias de ensayos de fármacos las realizamos con células miocardiocíticas embrionarias procedentes de embriones del estadio XXIX H.H. del desarrollo embrionario del pollo, ya que como hemos observado en nuestras experiencias es el estadio adecuado para el cultivo de estas células, datos que concuerdan con los obtenidos por otros autores (Cavanaugh,1955; Lehmkuhl y Sperelakis,1963; De Haan,1967), en este estadio las células han perdido propiedades características de las células embrionarias asemejándose más a las adultas (Kinsella y Fitzharris,1982), siendo el último estadio del desarrollo

embrionario en el que se observan coexpresión de desmina y vimentina por técnicas inmunohistoquímicas (Velez y col.,1990) y la concentración proteica total del cultivo se mantiene en valores similares durante la primera semana, periodo de tiempo en el cual se desarrollan las experiencias de citotoxicidad farmacológica.

Otros autores desarrollan sus experiencias de ensayos de fármacos con cultivos de miocardiocitos procedentes de embriones de siete días de incubación que presentan una edad embrionaria similar a la que nosotros utilizamos (Lewis y col.,1983), manteniendo en contacto los fármacos con las células en cultivo durante un periodo de 24 horas (Lewis y col.,1988), similar al que nosotros empleamos para la dosis terapéutica y tóxica, si bien nosotros empleamos un nuevo control para la dosis terapéutica a las 6 horas de contacto del fármaco con las células.

La síntesis de las proteínas que forman el aparato contráctil y el citoesqueleto de las células miocárdicas, puede ser modificada " in vitro " al someter a las células en cultivo a la acción de determinados fármacos (Lewis y col.,1988), cuando observamos la incidencia de estos fármacos sobre los valores de concentración proteica obtenidas en los homogenados observamos en general un descenso de la concentración proteica con respecto al control, salvo en el caso de tratamiento de los cultivos con bezafibrato a dosis terapéutica durante 6 horas (Tabla XXXII) ó tratamiento con dosis tóxica de este fármaco (Tabla XXXVIII), pero las diferencias son escasas y no significativas como observamos cuando realizamos el estudio estadístico de los datos . En otras experiencias realizadas con estos fármacos con modelos " in vivo " en hepatocitos de rata, se observa un incremento del contenido proteico total en las células, incrementándose este contenido proteico de los hepatocitos en la misma proporción con todos los fibratos utilizados (Stahlberg y col.,1989); estos resultados difieren con los obtenidos en

nuestra experiencia, en el cual existen diferencias significativas en el descenso de la concentración proteica en el homogenado al ser tratadas las células con uno u otro fármaco.

El descenso en las concentraciones proteicas del homogenado a los 6 horas de tratamiento con dosis terapéutica es del 19% para el fenofibrato y del 23% para el gemfibrozilo; a las 24 horas de tratamiento con dosis terapéutica, los valores del descenso en el fenofibrato son similares a los obtenidos a las 6 horas, en cambio los valores de los tratados con gemfibrozilo se han recuperado levemente siendo su disminución con respecto al control sólo del 11%, mientras que los valores de los tratados con bezafibrato manifiestan un descenso del 23% con respecto al control. Cuando las células son tratadas con dosis tóxica, sí bien el bezafibrato manifiesta valores cercanos al control, se observa un gran descenso en la concentración proteica cuando las células han sido tratadas con fenofibrato (32%) y más aún cuando el tratamiento se ha realizado con gemfibrozilo (66 %).

En lo referente a los valores de concentración en la fracción citoplasmática celular, los valores obtenidos al tratar las células con los diversos fibratos a dosis terapéutica son similares a los observados en el control; mientras que en las experiencias realizadas con dosis tóxica de los fármacos, en todos los casos se manifiesta un descenso de la concentración proteica con respecto al control, siendo el descenso del 20% para las tratadas con bezafibrato, del 56% en el caso del fenofibrato y alcanza valores del 84% en el caso de los cultivos miocardiocíticos tratados con gemfibrozilo.

La concentración proteica del citoesqueleto, solo disminuye significativamente con respecto al control en la experiencia realizada con dosis terapéutica durante 6 horas en el caso de tratamiento con gemfibrozilo que disminuye un 23%, cuando el tratamiento es de 24 horas se observa un incremento con

respecto al control al tratarse con gemfibrozilo del 8%, del 17% al tratarse con fenofibrato y un descenso del 20% al tratarse con bezafibrato. Cuando tratamos las células en cultivo con una dosis tóxica de los fármacos, se observa una disminución con el gemfibrozilo y fenofibrato del 15 y 17% respectivamente, mientras que cuando las células son tratadas con bezafibrato se observa un incremento del 55% con respecto a los cultivos controles.

Cuando observamos nuestros resultados de la influencia de los fármacos en el contenido de las células en las proteínas constituyentes de los filamentos intermedios (desmina y vimentina) en las diferentes fracciones subcelulares, al cabo de 6 horas de tratamiento observamos que la desmina citoplasmática se encuentra incrementada en todos los cultivos tratados con fármacos con respecto al control, aunque este incremento es ligero para el fenofibrato y gemfibrozilo, representa un aumento del 24% con respecto a la masa total de cultivo en el control para el bezafibrato; en cambio cuando el tratamiento con la dosis terapéutica se ha prolongado durante 24 horas, se observan valores cercanos al control en el caso de las células tratadas con bezafibrato, y valores inferiores en un 6% para el gemfibrozilo y un 13% para el fenofibrato con respecto al total de la masa celular del control. Como en el caso de las concentraciones proteicas, las cantidades de desmina en las células en cultivo se ven alteradas sensiblemente al ser tratadas las células con una dosis tóxica de estos fármacos (Tabla XL), siendo de nuevo el gemfibrozilo el que más efecto manifiesta en la desmina citoplasmática, produciendo un descenso del 94%, y el bezafibrato el que menos efecto produce, aunque produce un descenso del 45%.

La vimentina citoplasmática cuando las células son tratadas con los fármacos a una dosis terapéutica, no se observa muy alterada salvo en el caso de tratamiento durante 6 horas con fenofibrato y gemfibrozilo en que el contenido de la masa celular en cultivo desciende un 13% y un 15% respectivamente, y cuando el

tratamiento con fenofibrato se prolonga durante 24 horas en que se observa un descenso del 18%. Como en el caso de la desmina citoplasmática, con la dosis tóxica se produce un descenso del contenido proteico de vimentina citoplasmática, sobre todo en el caso de tratamiento con fenofibrato (desciende un 40%) y gemfibrozilo con un descenso del 79% con respecto al contenido de vimentina citoplasmática de la masa celular en cultivo del control.

Los valores de desmina citoesqueletales se observan incrementados cuando tratamos las células con los fármacos, detectándose el mayor incremento en el contenido proteico de la masa en cultivo con el fenofibrato y bezafibrato a las 6 horas de tratamiento, con un incremento máximo del 109% para el fenofibrato un 92% para el bezafibrato y el incremento mínimo con respecto al control se observa con el gemfibrozilo (41%); cuando el tratamiento ha durado 24 horas, se observan valores cercanos al control para el bezafibrato y un incremento cercano del 19% para el fenofibrato y gemfibrozilo. Cuando el tratamiento se realiza con dosis tóxica se observa un incremento en todos los cultivos tratados con fármacos, siendo el incremento menor para el fenofibrato y gemfibrozilo (126% y 144%) y el mayor el observado cuando las células se tratan con bezafibrato (312%).

La vimentina citoesqueletal se mantiene en valores similares a los controles para las células tratadas con bezafibrato y fenofibrato a dosis terapéutica durante 6 horas, mientras que desciende un 30% en las tratadas con gemfibrozilo; cuando el tratamiento se ha prolongado durante 24 horas las cantidades de vimentina de células tratadas con fármacos han descendido con respecto a los controles en todos los casos, siendo el descenso mayor para el bezafibrato (35%) y valores cercanos al 20% para el fenofibrato y gemfibrozilo. Cuando el tratamiento se ha realizado con dosis tóxica se observa un incremento generalizado del contenido celular en vimentina

citoesquelal, siendo el incremento del 34% para el gemfibrozilo, del 64% para el fenofibrato y del 298% para el bezafibrato.

En nuestros resultados hemos observado que todos los fármacos utilizados alteran de una u otra forma la composición proteica de los miocardiocitos en cultivo, este hecho podría afectar a la actividad contráctil de estas células, ya que como algunos autores han descrito anteriormente existe una estrecha relación entre la formación de las miofibrillas y el establecimiento de la contracción rítmica, pudiendo alterarse la actividad contráctil de estas células si se afectan de alguna manera la composición de dichas miofibrillas (Hiruma e Hirakow, 1985).

De todos los fármacos ensayados, observamos que es el bezafibrato el que menos afecta a la concentración proteica de la masa celular en cultivo, observándose significativas modificaciones cuando se ha tratado con una dosis terapéutica durante 24 h, que afecta fundamentalmente a su contenido proteico en el citoesqueleto y dentro de las proteínas citoesquelales, a la cantidad de vimentina que forma parte del citoesqueleto. Con dosis tóxica aunque el contenido proteico total no se ve afectado, ello es debido aun descenso en el contenido proteico del citoplasma y un aumento mayor de las proteínas del citoesqueleto; el descenso en el citoplasma afecta principalmente a la desmina citoplasmática, mientras que en el citoesqueleto aumentan ambas proteínas, desmina y vimentina (González y col., 1991).

El fenofibrato en todos los ensayos realizados produce una disminución del contenido proteico total, siendo el descenso similar para la dosis terapéutica a 6 y 24 horas y superior cuando la dosis administrada ha sido la tóxica (González y col., 1991). El efecto está centrado principalmente en el contenido en la fracción citoplasmática, afectando

principalmente a la desmina citoplasmática, aunque también afecta al contenido de vimentina en el citoplasma. En cambio el ligero descenso que se observa en la fracción citoesquelética tras el tratamiento con dosis tóxica,, parece ser debido al descenso de otras proteínas citoesqueléticas, ya que tanto la desmina, como la vimentina aumenta su contenido en el citoesqueleto al ser tratados con dosis tóxica de fenofibrato; aunque cuando el tratamiento es con dosis terapéutica durante 24 horas, si bien el contenido total de proteínas del citoesqueleto aumenta, este aumento también se produce en la desmina citoesquelética, pero el contenido de vimentina en el citoesqueleto disminuye.

El gemfibrozilo es el fibrato de los ensayos que más afecta al contenido proteico celular, siendo este descenso el mayor de los observados en los tres fármacos cuando el ensayo se ha realizado con dosis terapéutica a 6 horas y para el ensayo con dosis tóxica del fármaco (González y col.,1991). El descenso producido en el contenido proteico total con dosis terapéutica a 6 horas, afecta principalmente al contenido en proteínas del citoesqueleto, pero cuando el ensayo se ha realizado con dosis tóxica el efecto de descenso del contenido proteico total es mucho mayor y casi en una gran parte está localizado en el contenido proteico citoplasmático. El efecto de la dosis terapéutica durante 6 horas se centra en un descenso de la vimentina citoesquelética, que también disminuye ligeramente en el citoplasma, pero sin embargo se produce un gran aumento del contenido de la desmina del citoesqueleto. Con la dosis tóxica el descenso del contenido proteico citoplasmático afecta tanto a la desmina, como a la vimentina, mientras que el ligero descenso en la fracción citoesquelética debe afectar a otras proteínas componentes del citoesqueleto, ya que tanto la vimentina y sobre todo la desmina citoesquelética aumentan sus valores al tratarlos con esta dosis tóxica de gemfibrozilo.

Por los resultados obtenidos en nuestras experiencias, pensamos, que siendo los filamentos intermedios el

punto de anclaje de las proteínas más activas de la contracción cardíaca (Lazarides,1980; Thornell y Eriksson,1981), al verse modificado su contenido a nivel citoplasmático y citoesquelético, influye de alguna manera en la contracción cardíaca, pudiendo relacionarse estas alteraciones proteicas con los efectos secundarios detectados en pacientes sometidos al tratamiento con estos fármacos, que afectan al ritmo cardíaco y a la integridad de la célula muscular (La Rosa,1969; McGarvey,1973; Chung,1975; Huller y Glende;1984; Brown y col.,1986; Monk y Todd,1987). El hecho de que en nuestros resultados el gemfibrozilo sea el que más modifique al contenido de filamentos intermedios celular y entre estas proteínas afecte fuertemente al contenido de desmina, proteína característica de los filamentos intermedios de las células musculares, concuerda con los últimos datos obtenidos sobre el efecto secundario producido por este fármaco, sobre todo en asociación con un nuevo hipolipemiante de reciente introducción en la terapia hipolipemiante como es la lovastatina (Henwood y Heel, 1988); los enfermos tratados con este tratamiento conjunto de fármacos hipolipemiantes (gemfibrozilo y lovastatina), manifiestan un aumento de los efectos secundarios centrados en un aumento de diversas miopatías y de rabdomiolisis (Grundy,1988; Labreche,1988) y en algunos enfermos se han detectado en los datos de laboratorio, aumento en los niveles plasmáticos de ciertas enzimas relacionadas con la herida cardíaca (Van Lente y Cornell,1990; Pierce y col.,1990). Debido a los efectos adversos observados en los tratados con administración conjunta de gemfibrozilo y lovastatina, hacen que algunos autores sugieran la supresión de la administración conjunta de estos fármacos (Goldstein,1990).

El hecho de que los fármacos hipolipemiantes hayan sido permitidos como terapia hipolipemiante hace solo escasos años, hace que sea necesario un extenso estudio de la posible toxicidad de estos fármacos sobre todo porque existen efectos secundarios de lenta aparición, los cuales aparecen a lo largo del tratamiento durante periodos de tiempo prolongados. Con

nuestros trabajos, hemos pretendido acercarnos al estudio de los posible efectos secundarios de estos fármacos hipolipemiantes sobre los filamentos intermedios, proteínas fundamentales para que la célula manifieste una correcta actividad contráctil.

Este modelo experimental utilizado en nuestras experiencias para los ensayos de los fármacos, pudiera extenderse a los cultivos de miocardiocitos humanos siempre que se dispusiera de una buena fuente de tejido cardíaco humano que nos permitiera la obtención del número adecuado de células viables para la realización de los ensayos toxicológicos con fármacos. Finalmente creemos que nuestras experiencias con los cultivos de células cardiacas y los fármacos hipolipemiantes, se pueden extender a otros tipos de fármacos y de células en cultivo, simplemente con adaptar las condiciones de cultivo a las características de cada célula y buscar el marcador de toxicidad celular significativo para cada grupo de fármacos.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1.- El DMEM suplementado con suero fetal de ternera, transferrina humana e insulina ha resultado ser, el medio de cultivo más adecuado para los objetivos de nuestro trabajo.
- 2.- El estadio XXIX H.H. es el estadio óptimo para el cultivo de larga duración de los miocardiocitos embrionarios de pollo.
- 3.- Hemos conseguido optimizar, tanto el aislamiento como el medio de cultivo para poder obtener miocardiocitos humanos en cultivo de larga duración (56 días).
- 4.- La desmina y la vimentina siguen un proceso diferente en cuanto a compartimentalización subcelular durante el proceso del desarrollo cardíaco.
- 5.- La desmina se incrementa a lo largo del desarrollo cardíaco con un adecuado grado de significación estadística, mientras que la vimentina se expresa de una forma inversa al desarrollo cardíaco.
- 6.- La expresión de vimentina puede ser un marcador de la adaptación de los miocardiocitos a las condiciones de cultivo, mientras que la desmina es un marcador altamente fiable de la población miocardiocítica.
- 7.- Los miocardiocitos humanos alcanzan su máxima expresión de desmina en el día 7 de cultivo, mientras que los embrionarios en las primeras 24 horas.
- 8.- El día crítico del cultivo es diferente en las células embrionarias (21 días) y en las adultas (14 días).

9.- Los fibratos alteran la composición proteica de los miocardiocitos en cultivo, lo cual podría estar relacionado con los efectos secundarios sobre el sistema cardiovascular observados en algunos pacientes.

10.- El modelo experimental utilizado para los ensayos de toxicidad de los fármacos, nos permite evaluar la toxicidad de ellos sobre las células diana.

BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abrahams, P.J. y Van der Eb, A.J. In vitro transformation of rat and mouse cells by DNA from simian virus. *J. Virol.* 16, 206-209, 1975.
- Abshagen, U.; Spörl-Radun, S. y Marinow, J. Steady-state kinetics of bezafibrate and clofibrate in healthy female volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 17, 305-308, 1980.
- Adolphe, M. Articular chondrocytes in culture. Application in Pharmacology. *Advance in Cell Culture* 5 19-42, 1986.
- Agarwal, R.P.; Busso, M.E.; Mian, A.M. y Resnick, L. Uptake of 2',3'-dideoxyadenosine in human immunodeficiency virus-infected and non infected human cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5(5), 541-550, 1989.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D. El citoesqueleto En: *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 588-653, 1986.
- Altmannsberger, M.; Osborn, M.; Schauer, A. y Weber, K. Antibodies to different intermediate filament proteins. Cell type-specific markers on parafin-embeded human tissues. *Lab. Invest.* 45, 427-434, 1981.
- American Hospital Formulary Service. Drug Information. American Society of Hospital Pharmacists, Inc., Bethesda, 894-899, 1990.
- Anand-Srivastava, M.B. y Cantin, M. Atrial natriuretic factor receptor are negatively coupled to adenylate cyclase in cultured atrial and ventricular cardiocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 138, 427-436, 1986.

Andres, G. Experiments on the fate of dissociated embryonic cells (chick) disseminated by the vascular route. II. Teratomas. J. Exp. Zool. 122, 507-540, 1953.

Anon. Lopid (gemfibrozil): compendium of pharmacological and clinical studies. Warner Lambert Company, 1982.

Antoniades, H.N.; Scher, C.D. y Stiles, C.D. Purification of human platelet-derived growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1809, 1979.

Aránega, A.; González, F.J.; Aránega, A.E.; Fernandez, J.E.; Linares, A.; Muros, M.A.; Reina, A. y Alvarez, L. Primary cultures of human cardiac cells. Cell Differentiation and Development 27 (Suppl.), S97, 1989.

Aránega, A.; Contreras, J.A.; Aránega, E.; Muros, M.A.; González, F.J. y Alvarez, L. An improved method of Seichert's technique for in vivo marking of the embryonic heart. Arch. Biol. 100, 247-255, 1989.

Ardailou, N.; Nivez, M.; Striker, G. y Ardailou, R. Prostaglandin synthesis by human glomerular cells in culture. Prostaglandins 26, 773-784, 1983.

Arnold, J. Ueber theilungsvorgänge an den Wanderzellen, ihre progressiven und retrogressiven Metamorphosen. Arch. Mikr. Anat. 30: 205, 1887.

Aschoff, L. Lectures in Pathology. New York, Hoeber, 1924.

Auclair, M.C. Activité électrique des cellules en culture de coeur de cobaye. Comparaison avec le rat. C.R. Soc. Biol. 170, 543-548, 1976.

Auclair, M.C. y Freyss-Beguín, M. Heart cells in culture: methods and applications. Biologie cellulaire 37, 95-205, 1980.

Ball, M. y Mann, J. Lípidos plasmáticos y cardiopatía coronaria.
En: Lípidos y Cardiopatía. Orientación práctica. Ediciones
Doyma, S.A., Barcelona, 8-19, 1991a.

Ball, M. y Mann, J. Aterosclerosis: el proceso y sus factores de
riesgo. En: Lípidos y Cardiopatía. Orientación práctica.
Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 20-30, 1991b.

Bantle, J.P.; Oppenheimer, J.H.; Schwartz, H.L.; Hunninghake, D.B.;
Probstfield, J.L. y Hanson, R.F.. TSH response to TRH in
euthyroid hypercholesterolemic patients treated with graded
doses of dextrothyroxine. *Metabolism* 30, 63-68, 1981.

Barnett, J.V.; Haigh, L.S.; Marsh, J.D. y Galper, J.B. Effects of
low density lipoproteins and mevinolin on sympathetic
responsiveness in culture chick atrial cells. *J. Biol. Chem.*
264, 10779-10786, 1989.

Barrach, H.J. y Neubert, D. Significance of organ culture
techniques for evaluation of prenatal toxicity. *Arch. Toxicol.*
45, 161-187, 1980.

Barry, W.H. y Smith, T.W. Mechanism of transmembrane calcium
movements in cultured chick embryo ventricular cells. *J. Physiol.*
325, 243-260, 1982.

Barski, G.; Sorieul, S. y Cornefert, F. Production dans les
cultures in vitro de deux souches cellulaires en association de
cellules de caractère "hybride". *C.R. Acad. Sci. (D) Paris.* 251,
1825, 1960.

Belkin, A.M.; Ornatsky, O.I.; Kabakov, A.E.; Glukhova, M.A.
y Koteliansky, V.E. Diversity of vinculin/meta-vinculin in
human tissues and cultivated cells. *J. Biol. Chem.* 263, 6631-6635,
1988.

Ben-Ze'ev, A. Application of two-dimensional gel electrophoresis in the study of cytoskeletal protein regulation during growth activation and differentiation. *Electrophoresis* 11,191-200, 1990.

Benel, L.; Ronot, X.; Kornprobst, M.; Adolphe, M. y Mounolou, J.C. Mitochondrial uptake of rhodamine 123 by rabbit articular chondrocytes. *Cytometry* 7,281-28, 1986.

Benítez-King, G.; Cazares, F. y Meza, I. Synthesis and phosphorylation of cytoskeletal proteins during the in vitro biogenesis of MDCK cell monolayers. *J. Cell Sci.* 93,53-61, 1989.

Bennett, G.S.; Fellini, S.A.; Toyama, Y. y Holtzer, H. Redistribution of intermediate filament during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *J. Cell Biol.* 82,577-584, 1979.

Berger, M.R.; Bedford, P.; Zeller, W.J. y kaufmann, M. A comparative study of therapeutic activity, myelotoxicity and DNA damage in bone the marrow of mice after cyclophosphamide and ASTA Z 7557 (INN mafosfamide). *Invest. New Drugs* 2,181-190, 1984.

Bergeron, J.J.M. Different effects of thymidine and 5-fluorouracil 2'-deoxyriboside on biosynthetic events in cultured P815Y mast cells. *Biochem. J.* 123,385-390, 1971.

Bergman, B.L.; Scott, R.W.; Bajpai, A.; Watts, S. y Baker, J.B. Inhibition of tumors-cell-mediated extracellular matrix destruction by a fibroblast proteinase inhibitor, protease inhibitor, protase nexin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83,996-1000, 1986.

Berta, Ph.; Sladeczck, F.; Derancourt, J.; Durand, M.; Travo, P. y Haiech, J. Maitotoxin stimulated the formation of inositol phosphates in rat aortic myocytes. *FEBS lett.* 197,200-204, 1986.

Biedert, S.; Barry, W.H. y Smith, T.W. inotropic effects and changes in sodium and calcium contents associated with inhibition of monovalent cation active transport by ouabain in cultured myocardial cells. *J.Gen.Physiol.* 74, 479-494, 1979.

Bignani, A.; Dahl, D. y Rueger, D.C. Glial fibrillary acidic protein (GFA) in normal neural cells and in pathological conditions. *Avd.Cell.Neuribiol.* 7, 285-310, 1980.

Birkenbach, M.; Liebowitz, D.; Wang, F.; Sample, J. y Kieff, E. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein increases vimentin expression in human B-cell lines. *J. Virol.* 63(9), 4079-4084, 1989.

Bishopric, N.H.; Simpson, P.C. y Ordahl, C.P. Induction of the skeletal α -actin gene in α_1 -adrenoceptor-mediated hypertrophy of rat cardiac myocytes. *J.Clin.Invest.* 80, 1194-1199, 1987.

Bkaily, B.; Sperelakis, N. y Doane, J. A new method for preparation of isolated single adult myocytes. *Am.J.Physiol.* (Heart Circ. Physiol.) 247, H1018-1026, 1984.

Blane, G.F.; Bogalevsky, Y. y Bonnefous, F. Fenofibrate: influence on circulating lipids and side-effects in medium and long-term clinical use. En: Fears, R. (ed), *Pharmacological control of hyperlipidaemia.* JR Prous Sciences, Barcelona, 187-216, 1986.

Blane, G.F. Comparative toxicity and safety profil of fenofibrate and other fibric acid derivatives. *Am.J.Med.* 83(5B), 26-36, 1987.

Blankenhorn, D.H. Atherosclerosis regression in humans. *Atherosclerosis Reviews* 21, 151-157, 1990.

Blondel, E.; Roijen, I. y Cheneval, J.P. Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 27, 356-358, 1971.

Blose, S.H. Ten-nanometer filaments and mitosis: maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 3372-3376, 1979.

Boder, G.B.; Harley, R.J. y Johnson, I.S. Recording system for monitoring automaticity of heart cells in culture. Nature 231, 531, 1971.

Bogenman, E. y Eppenberger, H.M. DNA-synthesis and polyploidization of chicken heart muscle cells in mass cultures. J.Mol.Cell Cardiology 12, 17-27, 1980.

Bohn, B. Flow cytometry: a novel approach for the quantitative analysis of receptor-ligand interactions on surfaces of living cells. Mol.Cell.Endocrin. 20, 1-15, 1980.

Borg, T.K. y Terracio, L. Cellular adhesion to artificial substrates and long term culture of adult cardiac myocytes. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). Biology of isolated adult cardiac myocytes. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 14-24, 1988.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72, 248-254, 1976.

Braunwald, E.; Sonnenblick, E. y Ross, J. Jr. Mecanismos de contracción y relajación cardíacas. En: Tratado de Cardiología. Nueva Editorial Interamericana, S.A., Mexico I, 415-456, 1990.

Brenneman, D.E. y Spector, A.A. Utilization of ascites plasma VLDL triglycerides by Ehrlich cells. J.Lipid.Res. 15, 309-316, 1974.

Brower, M.; Carney, D.M.; Gie, H.K. y Gazdar, A.F. Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in serum free defined medium. Cancer Res. 46, 798-906, 1986.

Brown, M.S. y Goldstein, J.L. Drogas usadas en el tratamiento de hiperlipoproteinemias. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editorial Medica Panamericana, S.A., Madrid, 787-804, 1989.

Brown, S.; Levinson, W. y Spudich, J.A. Cytoskeletal elements of chick embryo fibroblasts revealed by detergent extraction. J. Supramolec. Struct. 5, 119-130, 1976.

Brown, W.V.; Dujovne, C.A.; Farquhar, J.W.; Feldman, E.B.; Grundy, S.M.; Knopp, R.H.; Lasser, N.L.; Mellies, M.J.; Palmer, R.H.; Samuel, P.; Schonfeld, G. y Superko, H.R. Effects of fenofibrate on plasma lipids. Arteriosclerosis 6, 706-708, 1986a.

Brown, W.V.; Dujovne, C.A.; Farquhar, J.W.; Feldman, E.B.; Grundy, S.M.; Knopp, R.H.; Lasser, N.L.; Mellies, M.J.; Palmer, R.H.; Samuel, P.; Schonfeld, G. y Superko, H.R. Effects of fenofibrate on serum lipids. A multicenter, double-blind study of the lipid-lowering effects of fenofibrate in patients with type II hyperlipidemia. Arteriosclerosis 6, 670-678, 1986b.

Brown, W.V. Fenofibrate a third-generation fibric acid derivative. Am. J. Med. 83(5B), 1-2, 1987.

Brunet, N.; Barritaule, D.; Gourdji, D. y Tixier-Vidal, A. Role of cell-substratum interactions in the hormonal control of rat prolactin cells. In: Fischer, G. and Wieser, R.J. (eds). Hormonally defined media, a tool in cell biology. Springer Verlag, Berlin, 132-142, 1983.

Brunk, U.; Collins, V.P. y Arro, E. The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM. J. Microsc. 123, 121-131, 1981.

Buesa, F.J.; Garcia-Verdú, R.; Pastor, M. y Escribano, A. Valoración de métodos de detección de virus respiratorio sincitial

en secreciones nasofaríngeas. *Enf. Infec. y Microbiol. Clin.* 8(2), 78-81, 1990.

Bugaisky, L.B. Isolation and culture of human adult cardiac myocytes. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). *Biology of isolated adult cardiac myocytes*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 272-275, 1988.

Buja, L.M.; Hagler, H.K.; Parsons, D.; Chien, K.; Reynolds, R.C.; y Willerson, J.T. Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid. *Lab. Invest.* 53, 397-402, 1985.

Burt, J.M. y Langer, G.A. Ca^{2+} distribution during Na^+ pump inhibition in cultured neonatal rat myocardial cells. *Circ. Res.* 51, 543-550, 1982.

Caesar, R.; Edwards, G.A. y Ruska, H. Electron microscopy of the impulse conducting system of the sheep heart. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 48, 698-719, 1958.

Calvet, M.C. Patterns of spontaneous electrical activity in tissue cultures of mammalian cerebral cortex versus cerebellum. *Brain Research* 69, 281-295, 1974.

Campbell, G.R.; Chamley-Campbell, J.; Groschel-Stewart, U.; Small, J.V. y Anderson, P. Antibody staining of 10-nm (100 Å) filaments in cultured smooth, cardiac and skeletal muscle cells. *J. Cell Sci.* 37, 303-322, 1979.

Campbell, S.E.; Rakusan, K. y Gerdes, A.M. Change in cardiac myocyte size distribution in aortic-constricted neonatal rats. *Basic Res. Cardiol.* 84, 247-258, 1989.

Cantin, M.; Ballak, M.; Beuzeron-Mangina, J. y Anand-Srivastava, M.B.

DNA synthesis in cultured adult cardiocytes. *Science* 214,569-570,1981.

Carleton, R.A. y Lasater, T.M. Primary prevention of coronary heart disease: a challenge for behavioral medicine. *Circulation* 76(suppl. I), I-124-I-129, 1987.

Carrel, A. On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* 15:516-528, 1912.

Cavanaugh, M.W. Pulsation, migration and division in dissociated chick embryo heart cells in vitro. *J. Exptl. Zool.* 128,573-589, 1955.

Celis, J.E.; Larsen, P.M.; Fey, S.J. y Celis, A. Phosphorylation of keratin and vimentin polypeptides in normal and transformed mitotic human epithelial amnion cells: behavior of keratin and vimentin filaments during mitosis. *J. Cell Biol.* 67,1429-1434, 1983.

Clark, W.A. y Zak, R. Assessment of fractional rates of protein synthesis in cardiac muscle cultures after equilibrium labeling. *J. Biol. Chem.* 256,4863-4870, 1981.

Clarke, G.D. y Ryan, P.J. tranquilizers can block mitogenesis in 3T3 cells and induced differentiation in Friend cells. *Nature* 287,160-161, 1980.

Clarke, B.J.; Brickenden, A.M.; Ires, R.A. y Chui, D.H.K. Effect of modulators of erythropoiesis on the hemoglobinization of human erythroid cell cultures. *Blood* 60,346-351, 1982.

Claycomb, W.C. Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Deoxyribonucleic acid synthesis and nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerase activity. *J. Biol. Chem.* 250(9), 3229-3235, 1975.

Claycomb, W.C. Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Possible control of deoxyribonucleic acid synthesis and cell differentiation by adrenergic innervation and cyclic adenosine 3':5'-Monophosphate. *J. Biol. Chem.* 251(19), 6082-6089, 1976.

Claycomb, W.C. y Palazzo, M.C. Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell: a light and scanning electron microscope study. *Dev. Biol.* 80, 466-482, 1980.

Claycomb, W.C. y Bradshaw, H.D. Jr. Acquisition of multiple nuclei and activity of DNA polymerase α and reinitiation of DNA replication in terminally differentiated adult cardiac muscle cells in culture. *Dev. Biol.* 99, 331-337, 1983.

Claycomb, W.C. y Lanson, N. Jr. Isolation and culture of the terminally differentiated adult mammalian ventricular cardiac muscle cell. *In Vitro* 20(8), 647-651, 1984.

Claycomb, W.C. y Moses, R.L. Culture of atrial and ventricular cardiac muscle cells from the adult squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *Exp. Cell Res.* 161, 95-100, 1985.

Claycomb, W.C. y Lanson, N.A. Jr. Proto-oncogen expression in proliferating and differentiating cardiac and skeletal muscle. *Biochem. J.* 247, 701-706, 1987.

Claycomb, W.C. "Dedifferentiation" of the cultured adult cardiac muscle cell by TPA. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). *Biology of isolated adult cardiac myocytes*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 284-287, 1988.

Claycomb W.C. y Moses, R.L. Growth factors and TPA stimulate DNA synthesis and alter the morphology of cultured terminally differentiated adult rat cardiac muscle cells. *Dev. Biol.* 127, 257-265, 1988.

Claycomb, W.C. Atrial natriuretic-factor mRNA is developmentally regulated in heart ventricles and actively expressed in cultured ventricular cardiac muscle cells of rat and human. *Biochem.J.* 255, 617-620, 1988.

Clevenger, C.V.; Bauer, K.D. y Epstein, A.L. A method for simultaneous nuclear immunofluorescence and DNA content quantitation using monoclonal antibodies and flow cytometry. *Cytometry* 6, 208-214, 1985.

Cluzeaut, F. y Maurer-Schultze, B. Proliferation of cardiomyocytes and interstitial cells in the cardiac muscle of the mouse during pre- and postnatal development. *Cell Tissue Kinet.* 19, 267-274, 1986.

Cohlberg, J.A.; Hajarian, H. y Saint-Marie, S. Discrete soluble forms of middle and high molecular weight neurofilament proteins in dilute aqueous buffers. *J. Biol. Chem.* 262, 17009-17015, 1987.

Cole, R.J. y Paul, J. The effects of erythropoietin on haem synthesis in mouse yolk sac and cultured foetal liver cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15, 245-260, 1966.

Connan, G.; Rassoulzadegan, M. y Cuzin, F. Locus transformation in rat fibroblasts exposed to a tumor promoter after transfer of polyome pl_t and myc oncogenes. *Nature* 314, 277-279, 1985.

Cooper, G.W. Induction of somite chondrogenesis by cartilage and notocord: A correlation between inductive activity and specific stage of cytodifferentiation. *Dev. Biol.* 12, 185-212, 1965.

Couillin, P.; Nicolas, H.; Grisard, M.C. y Boue, A. Méthodologie pour le typage HLA des cellules foetales du liquide amniotique. *Ann. Genet.* 22, 40-45, 1980.

Crissman, H.A. Simplified method for DNA and protein staining of human hematopoietic cell samples. *Cytometry* 2, 59-62, 1981.

Cummings, R.D.; Sonderquist, A.M. y Carpenter, G. The oligosaccharide moieties of the epidermal growth factor receptor in A-431 cell. Presence of complex-type N-linked chains that contain terminal N-acetylgalactosamine residues. *J. Biol. Chem.* 260, 1944-1952, 1985.

Chang, Z.L.; Huang, X.L.; Rinaldo, C.; Herberman, R.B. y Whiteside, T.L. Up-regulation of natural killer activity of human immunodeficiency virus-infected patients by in vitro-differentiated macrophages. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 51(1), 133-139, 1989.

Chung, E.K. Frequent premature atrial and ventricular contractions and paroxysmal atrial tachycardia occurred in a 63-year-old man with relatively asymptomatic cardiac arrhythmias when he was given clofibrate. Sinus rhythm with no arrhythmias was restored within 2 weeks of stopping clofibrate. *Drug Ther.* 5, 54, 1975.

Chung, Y.S.; Song, I.S.; Erickson, R.H.; Sleisinger, M.H. y Kim, Y.S. Effect of growth and sodium butyrate on brush border membrane associated hydrolases in human colorectal cancer cell lines. *Cancer Res.* 45, 2976-2982, 1985.

Dahl, A.; Bignami, A.; Bich, N.T. y Chi, N.H. Immunohistochemical characterization of neurofibrillary tangles induced by mitotic spindle inhibitors. *Acta Neuropathol.* 51, 165-168, 1980.

Darnell, J.; Lodish, H. y Baltimore, D. *Biología celular y molecular*. Editorial Labor, S.A., Barcelona, 811-854, 1988.

Dartsch, P.C.; Ischinger, T. y Betz, E. Differential effect of photofrin II on growth of human smooth muscle cells from

nonatherosclerotic arteries and atheromatous plaques in vitro. *Arteriosclerosis* 10,616-624,1990.

David, H.; Meyer, R.; Marx, I.; Gusk, H. y Wenzelides, K. Morphometric characterization of left ventricular myocardial cells of male rats during postnatal development. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 11,631-633,1979.

De Haan, R.L. Development of pacemaker tissue in the embryonic heart. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 127,7-18,1965.

De Haan, R.L. Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. *Dev.Biol.* 16,216-249,1967.

De Oya, M. Modificaciones dietéticas del patrón lipoproteico. Dietoterapia antidislipemiante. En: *Lipoproteínas plasmáticas y aterosclerosis coronaria.* Editorial MCR, S.A., Barcelona, 285-299, 1988

De Simone, C.; De Marco, F.; Arancia, G.; Tzantzoglou, S.; Paridisi, S. y Sorice, F. Influence of methisoprinol (isoprinosine) on HIV-infected human lymphocytes: in vitro immunological, virological, and ultrastructural studies. *J.Clin.Lab.anal.* 3(1), 26-33, 1989.

Decker, R.S.; Decker, M.L.; Simpson, D.G. y Lesch, M. Morphological approaches to the study of freshly isolated and cultured adult cardiac myocytes. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). *Biology of isolated adult cardiac myocytes.* Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 25-40, 1988.

Dendy, P.P. Some problems in the use of short-term cultures of human tumours for in vitro screening of cytotoxic drugs. *Chemotherapy* 7, 341-350, 1976.

Dhoot, G.K. y Perry, S.V. The components of the troponin complex and development in skeletal muscle. *Exp. Cell. Research* 127, 75-87, 1980.

Doorey, A.J. y Barry, W.H. The effects of inhibition of oxidative phosphorylation and glycolysis in cultured chick heart cells. *Circ. Res.* 53, 192-201, 1983.

Douglas, W.H.J.; McAteer, J.A.; Dell'Orco R.T. y Phelps, D. Visualization of cellular aggregates cultured on a three-dimensional collagen sponge matrix. *In Vitro* 16, 306-312, 1980.

Downward, J.; Yarden, Y.; Mayes, E.; Scrace, G. y Totty, N. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-527, 1984.

Durrington, P.N. y Miller, J.P. Double blind placebo controlled cross over trial of probucol in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 55, 187-194, 1985.

Eagle, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501-504, 1955a.

Eagle, H. The minimum vitamins requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies and their cure. *J. Exp. Med.* 102, 595-600, 1955b.

Eagle, H. y Foley, G. The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. *Am. J. Med.* 21, 739-749, 1956.

Earle, W.R. Production of malignancy in vitro-IV the mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer. Inst.* 4, 165-212, 1943.

Edström, L.; Thornell, L.E. y Eriksson, A. A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and

Intermediate (skeleton) filaments. *J. Neurol. Sci.* 47, 171-190, 1980.

Eliot, R.S. Coronary artery disease: biobehavioral factors. Overview. *Circulation* 76 (suppl. I), I-110-I-111, 1987.

Encuesta Morbilidad Hospitalaria (Instituto Nacional de Estadística) 71-93, 1987.

Enjoji, M. y Hashimoto, H. Diagnosis of soft tissue sarcoma. *Path. Res. Pract.* 178, 215-226, 1984.

Eriksson, A. y Thornell, L.E. Intermediate (skeleton) filaments in heart Purkinje fibers. A correlative morphological and biochemical identification with evidence of a cytoskeletal function. *J. Cell. Biol.* 80, 231-247, 1979.

Erokhina, I.L. y Rumyantsev, P.P. Proliferation and biosynthesis activities of myocytes from conductive system and working myocardium of the developing mouse heart. Light microscopic autoradiographic study. *Acta Histochem.* 84, 51-66, 1988.

European Atherosclerosis Society Study Group: Strategies for the prevention of coronary heart disease. *Eur. Heart J.* 8, 77-88, 1987.

Fairbanks, G.; Steck, L. y Wallach, D.F. Electrophoretic analysis of the major polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617, 1971.

Farmer, B.B.; Mancina, M.; Williams, E.S. y Watanabe, A.M. Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat hearts: review of the literature and description of a method. *Life Sci.* 33, 1-18, 1983.

Fayet, G.; Couraud, F.; Miranda, F. y Lissitzky, S. Electro-optical system for monitoring activity of heart cells in culture: application to the study of several drugs and scorpion

toxins. *European J. Pharmacol.* 27,165-174,1974.

Felix, H. y Sträuli, P. Intermediate-sized filaments in leukemia cells. *Virchows Arch. Cell Pathol.* 28,59-75,1978.

Fernandez, J.E.; Aránega, A.E.; González, F.J.; Aránega, A.; Muros, M.A.; Vélez, C.; Garrido, F. y Alvarez, L. A new monoclonal antibody, GR-ICOR-3, against chick embryo miocardiac cells. *Cell Differentiation and Development* 27(Suppl.), S98, 1989.

Florini, J.R. Hormonal control of muscle growth. *Muscle & Nerve* 10,577-598,1987.

Folkman, J. y Haudenschild, C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 288,551-556,1980.

Folkman, J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 46,467-47,1986.

Forbes, M.J. y Sperelakis, N. Ultrastructure de mammalian cardiac muscle. In: Sperelakis, N. (ed): *Physiology and Pathophysiology of the Heart.* Boston, 3-42, 1984.

Foxworthy, P.S.; White, S.L.; Hoover, D.M. y Eacho, P.I. Effect of ciprofibrate, bezafibrate and LY171883 on peroxisomal β -oxidation in cultured rat, dog, and rhesus monkey hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104,386-394,1990.

Francis, G.E. y Wing, M.A. Use of bone marrow culture in prediction of acute leukaemic transformation in preleukaemia. *Lancet* 1,1409-1412,1983.

Frelin, C.; Pinson, A.; Moalic, J.M. y Padieu, P. Energy metabolism of beating rat heart cell cultures. II. glucose metabolism. *Biochimie* 56,1597-1602,1974.

Freshney, R.I.; Morgan, D.; Hassanzadah, M.; Shaw, R. y Frame, M. Glucocorticoids, proliferation and the cell surface. En: Richards, R.J. y Rajan, K.T. (eds). Tissue culture in medical research(II), Pergamon Press, Oxford, 125-132, 1980.

Fresney, R.I.; Celik, F. y Morgan, D. Analysis of cytotoxic and cytostatic effects. En: Davis, W.; Malvoni, C.; Tanneberger, St. (eds): "The Control of Tumor Growth and Its Biological Base". Fortschritte in der Onkologie, Band 10. Berlin, Akademie Verlag, 349-358, 1982.

Fresney, R.I. Introduction. En: Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R. Liss, Inc., New York, 1-6, 1988a.

Fresney, R.I. The culture environment: substrate, gas phase, medium, and temperature. En: Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R. Liss, Inc. New York, 57-84, 1988b.

Freshney, R.I. Characterization. En: Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R. Liss, Inc., New York, 169-185, 1988c.

Freyss-Beguín, M. y Van Brussel, E. Cultures différentielles de myoblastes et de fibroblastes de coeur de rat: pulsations et acides gras non estérifiés. Biol. Cellulaire 35, 152-158, 1979.

Friend, C.; Scher, W.; Holland, J.G. y Sato, T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro. 2. Stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 373-382, 1971.

Fukuchi, K.I.; Tanaka, K.; Nakura, J.; Kumahara, Y.; Uchida, T. y Okada, Y. Elevated spontaneous mutation rate in SV-40 transformed Wrener syndrome fibroblast cell lines. Somatic Cell and Molecular Genetics 11, 303-308, 1985.

Fuster, V. *Cardiología*. En: *Medicina Interna*. Editorial
Marín, S.A., Hospitalet, I, 325-540, 1982.

Gabella, G. Hypertrophic smooth muscle. *Cell Tissue Res.* 201, 277-
288, 1979.

Gard, D.L. y Lazarides, E. The synthesis and distribution of
desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell* 19, 263-
275, 1980.

Geisler, N. y Weber, K. Comparison of the proteins of two
immunologically distinct intermediate-sized filaments by amino
acid sequence analysis: desmin and vimentin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7, 4120-4123, 1981.

Georgatos, S. y Blobel, G. Two distinct attachment sites for
vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in
avian erythrocytes. *J. Cell Biol.* 105, 105-115, 1987.

Gey, G.O. An improved technique for massive tissue culture.
Amer. J. Cancer, 17:752-756, 1933.

Gibson-D'Ambrosio, R.E.; Samuel, M. y D'Ambrosio, S.M. A method
for isolating large numbers of viable disaggregated cells
from various human tissues for cell culture establishment. In
Vitro Cell. Develop. Biol. 22(9), 529-534, 1986.

Gibson, G.J.; Schor, S.L. y Grant, M.E. Effects of matrix molecules
on chondrocyte gene expression: Synthesis of low molecular weight
collagen species by cells cultured within collagen gels. *J. Cell
Biol.* 93, 767-774, 1982.

Goldstein, J.L. y Brown, M. Defective lipoprotein receptors and
atherosclerosis. Lessons from a animal counterpart of familial
hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 309, 288-296, 1983.

Goldstein, M.R. Myopathy and rhabdomyolysis with lovastatin taken with gemfibrozil. JAMA 264, 2991, 1990.

Gonatas, N.K. y Avrameas, S. Detection of plasma membrane carbohydrates with lectin peroxidase conjugates. J. Cell Biol. 59, 436-440, 1973.

González, F.J.; Aránega, A.E.; Lara, J.; Fernández, J.E.; Muros, M.A.; Alvarez, L. y Aránega, A. Evolución en cultivo de células cardíacas humanas. I Congreso Iberoamericano sobre Biotecnología, Comunicación S06-056, La Habana-Cuba, 1989.

González, F.J.; Aránega, A.E.; Vélez, M.C.; Muros, M.A.; Fernández, J.E.; Alvarez, L. y Aránega, A. Establishing secondary cultures of embryonic myocardial cells. Eur. Arch. Biol. 101, 359-367, 1990.

González, F.J.; Aránega, A.E.; Linares, A.; Fernández, J.E.; Muros, M.A.; Vélez, C.; Alvarez, L. y Aránega, A. Influence of fibric acid derivatives on intermediate filament proteins in myocardiocyte cultures. Life Sciences 48(11), 1091-1099, 1991.

Goosens, M.; Lambert, T. y Durandy, A. Les progrès du dépistage anténatal des hémopathies. Hématologie 35, 1729-1736, 1985.

Gordon, T.; Castelli, W.P.; Hjortland, M.C.; Kannel, W.B. y Dawber, T.R. Predicting Coronary Disease in middle aged and older persons. The Framingham study. JAMA 283, 497-499, 1977.

Gordon, W.E.; Bushnell, A. y Burridge, K. Characterization of the intermediate (10 nm) filaments of cultured cells using an autoimmune rabbit antiserum. Cell 13, 249-261, 1978.

Gordon, T.; Kannel, W.B.; Castelli, W.B. y Dawber, T.R. Lipoproteins, cardiovascular disease and death. The Framingham study. Arch. Intern. Med. 141, 1128-1131, 1981.

Gordon, D.J. y Rifkind, B.M. High-density lipoprotein the clinical implications of recent studies. N.Engl.J.Med. 321, 1316, 1989.

Gourdji, D.; Tougard, C. y Tixier-Vidal, A. Clonal prolactin cells as a tool in neuroendocrinology. In: Ganong, W.F. and Martini, L. (eds). Frontiers in neuroendocrinology, Raven Press, New York, 317-357, 1982.

Gown, A.M. y Vogel, A.M. Monoclonal antibodies to intermediate filament proteins of human cells: unique and cross-reacting antibodies. J. Cell Biol. 95, 414-424, 1982.

Graham, F.L.; Abrahams, P.J.; Mulder, C.; Meijneker, H.L.; Warnaar, S.; De Vries, F.A.J.; Fiers, W. y J. Vander Eb, A. Studies on in vitro transformation by DNA and RNA fragments of human adenoviruses and simian virus 40. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 637-650, 1974.

Granger, B.L. y Lazarides, E. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. Cell 15, 1253-1268, 1978.

Green, H.; Kehinde, O. y Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5665-5668, 1979.

Griffith, J.B. y Pirt, S.J. The uptake of amino acids by mouse cells (strain LS) during growth in batch culture and chemostat culture: the influence of cell growth rate. Proc. Roy. Soc. Serie B. 168, 421-438, 1967.

Grobstein, C. Morphogenetic interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. Nature 4384, 869-871, 1953.

Grosclaude, J. Culture d'hybridomas. En: culture de cellules

animales. Methodologies-Applications. Inserm, Ed., Paris, 313-320, 1988.

Grosovsky, A.J.; Drobetsky, E.A.; De Jong, P.J. y Glickman, B.W. Southern analysis of genomic alterations in gamma-ray-induced APRT-hamster cell mutants. *Genetics* 113, 405-415, 1986.

Grundke-Iqbal, I.; Johnson, A.B.; Terry, R.D.; Wisniewski, H.M. y Iqbal, K. Alzheimer neurofibrillary tangles. antiserum and immunohistological staining. *Ann. Neurol.* 6, 532-537, 1979.

Grundy, S.M.; Mok, H.Y.I.; Zech, L.A.; Steinberg, D. y Bermar, M. Transport of very low density lipoprotein-triglycerides in varying degrees of obesity and hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.* 63, 1274-1281, 1979.

Grundy, S.M. y Vega, G.L. Influence of mevinolin on metabolism of low density lipoproteins in primary moderate hypercholesterolaemia. *J. Lipid. Res.* 26, 1464-1475, 1985.

Grundy, S.M. Cholesterol and cardiovascular disease. Dietary therapy for different forms of hyperlipoproteinemia. *Circulation* 76(3), 523-528, 1987.

Grundy, S.M. HMG-CoA reductase inhibitors for hypercholesterolemia (letter). *N. Engl. J. Med.* 319(18), 1223, 1988.

Grynberg, A.; Athias, P. y Degois, M. Effect in growth environment on cultured myocardial cells investigated in standardized medium. *In Vitro* 22, 44-60, 1986.

Guilbert, L.J. e Iscove, N.N. Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature* 263, 594-595, 1976.

Guillou, F.; Monet-Kuntz, C.; Fontaine, I. y Flechon, J.E. Expression

of fetal-type intermediate filaments by 17-day-old rat Sertoli cells cultured on reconstituted basement membrane. *Cell Tissue Res.* 260,395-401,1990.

Guner, M.; Freshney, R.I.; Morgan, D.; Freshney, M.G.; Thomas, D.G.T. y Graham, D.I. Effects of dexamethosone and betamethasone on in vitro: cultures from human astrocytoma. *Br.J.Cancer* 35,439-447,1977.

Hamburger, V. y Hamilton, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J.Morphol.* 88,49-92,1951.

Hamilton, R.L.; Williams, M.C.; Fielding, C.J. y Havel, R.J. Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J.Clin.Invest.* 58,667-680,1976.

Harary, I. y Farley, B. In vitro studies on single beating rat heart cells. Growth and organization. *Exp.Cell Res.* 29,451-465,1963.

Harary, I.; McCarl, R. y Farley, B. Studies in vitro on single beating rat heart cells. IX. The restoration of beating by serum lipids and fatty acids. *Biochim.Biophys.Acta* 115,15-22,1966.

Harris, H. y Watkins, J.F. Hybrid cells from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature* 205,640-646,1965.

Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 4,140-143,1907.

Harrison, R.G. The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphogenetic study. *Anat.Rec.* 6,181,1912.

Haubenstock, A.; Schröcksnadel, W.; Bauer, K.; Schmidt, P. y Gabl, F. Predominance of lactate dehydrogenase isoenzyme I in a patient

with bezafibrate-induced rhabdomyolysis. Clin.Chem. 30,1587-1588,1984.

Hawkes,R.; Niday,E. y Gordon,J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. 119,142-147,1982.

Hecquet,C.; Ronot,X.; Le Naour,L.; Josse,J.G. y Adolphe,M. In vivo methods for assessing cytotoxicity of contact lenses. Comparison with in vitro data. In: Goldberg,A.M.(ed). The alternative methods in toxicology. Mary Ann.Liebert.Inc.Publishers,New York, 5,327-333,1987.

Helsinki Heart Study. Primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia.N.Engl.J.Med. 317,1237-1245,1987.

Heller,F. y Harvengt,C. Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipaemic subjects. Eur.J.Clin.Pharmacol. 25,57-63,1983.

Henle,W. y Henle,G. Epstein-Barr virus and human malignancies. Adv. Viral Oncol. 5,201-238,1985.

Henwood,J.M. y Heel,R.N. Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemia. Drugs 36,429-454,1988.

Higgins,T.J.C.; Allsop,D; Baley,P.J. y D'Souza,E.D.A. The relationship between glycolysis, fatty acid metabolism and membrane integrity in neonatal myocytes. J.Mol.Cell Cardiol. 13,599-615,1981.

Hill,R.J.; Duff,H.J.; Cannon,N.J. y Sheldon,R.S. Cardiac myocyte sodium channel: biochemical evidence for a receptor for antiarrhythmic drugs. En: Clark,W.A.; Decker,R.S. y Borg,T.K. (eds). Biology of isolated adult cardiac myocytes.

Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 422-425, 1988.

Hiruma, T. y Hirakow, R. An ultrastructural topographical study on myofibrillogenesis in the heart of the chick embryo during pulsation onset period. *Anat. Embryol.* 172, 325-329, 1985.

Hoeg, J.M.; Schaefer, E.J.; Pomano, C.A. . Neomycin and plasma lipoproteins in type II hyperlipoproteinemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36, 555-559, 1984.

Hoh, J.F.Y.; McGrath, P.A. y Hale, P.T. Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: Effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J. Molec. Cell Cardiol.* 10, 1053-, 1978.

Horibata, K. y Harris, A.W. Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp. Cell Res.* 60, 61-77, 1970.

Howard, B.V. y Howard, W.J. Lipid metabolism in cultured cells. *Adv. Lipid. Res.* 12, 51-96, 1974.

Howell, K.E.; Devaney, E. y Gruenberg, J. Subcellular fractionation of tissue culture cells. *TIBS* 14, 44-47, 1989.

Hüller, H. y Glende, M. Drugs affecting lipid metabolism. En: Dukes, M.N.g. (ed), *Meyler's side effects of drugs.* Elsevier, Amsterdam, 817-828, 1984.

Huxley, H.E. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1366, 1969.

Hynes, R.O. y Destree, A.T. 10 nm filament in normal and transformed cells. *Cell* 13, 151-163, 1978.

Ibrahim, N.G.; Lutton, J.D. y Levere, R.D. The role of haem biosynthetic and degradative enzymes in erythroid colony development: the effect of haemin. *Br. J. Haematol.* 50, 17-28, 1982.

Illingworth, D.R. y Gowen, D. Management of lipoprotein abnormalities. *Recent Advances in Cardiology* 10, 71-101, 1987.

Illingworth, D.R. Lipid lowering drugs: an overview of indications and optimum therapeutic use. *Drugs* 33, 259-279, 1987.

Illingworth, D.R. An overview of lipid-lowering drugs. *Drugs* 36 (Suppl. 3), 63-71, 1988.

Inagaki, M.; Nishi, Y.; Nishizawa, K.; Matsuyama, M. y Sato, C. Site-specific phosphorylation disassembly of vimentin filament in vitro. *Nature* 328, 649-652, 1987.

Inagaki, M.; Gonda, Y.; Matsuyama, M.; Nishizawa, Y.; Nishi, Y. y Sato, C. Intermediate filament reconstitution in vitro; the role of phosphorylation on the assembly-desassembly of desmin. *J. Biol. Chem.* 263, 5970-5978, 1988.

Ip, W.; Danto, S.I. y Fischman, D.A. Detection of desmin-containing intermediate filaments in cultured muscle and nonmuscle cells by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 96, 401-408, 1983.

Ip, W. y Fellows, M.E. Fluorescence measurement of desmin intermediate filament assembly. *Anal. Biochem.* 185, 10-16, 1990.

Isaacs, W.B.; Cook, R.K.; Van Atta, J.C.; Redmond, C.M. y Fulton, A.B. Assembly of vimentin in cultured cells varies with cell type. *J. Biol. Chem.* 264, 17953-17960, 1989.

Ishikawa, H.; Bischoff, R. y Holtzer, H. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 38, 538-555, 1968.

Jacobson, S.L. Culture of spontaneously contracting myocardial cells from adult rats. *Cell Struct. Funct.* 2, 1-9, 1977.

Jacobson, S.L.; Banfaldi, M. y Schwarzfeld, T.A. Long-term primary cultures of adult human and rat cardiomyocytes *Basic Res. Cardiol.* 80(Suppl.), 79-82, 1985.

Jacobson, S.L. y Piper, H.M. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 18, 661-678, 1986.

Jacobson, S.L.; Juhasz, A.E. y Sculptoreanu, A. Time course of electrophysiological properties and concentration of sodium and potassium in cultured adult rat cardiac myocytes. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). *Biology of isolated adult cardiac myocytes.* Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 394-297, 1988.

Jennings, R.B.; Reimer, K.A.; Hill, M.L. y Mayer, S.A. Total myocardial ischemia in vitro: I. Comparison of high energy phosphate production, utilization and repletion and adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs severe ischemia in vivo. *Circ. Res.* 49, 992-999, 1981.

Jeter, J.R. y Cameron, I.L. Cell proliferation patterns during cytodifferentiation in embryonic chick tissues: liver, heart and erythrocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 25, 405-422, 1971.

Jolly, J. Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales dehors de l'organisme. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 55, 1266, 1903.

Jones, T.L. y Haskill, J.S. Use of polyacrylamide for cloning of primary tumors. *Methods Cell Biol.* 14, 195, 1976.

Kaltenbach, J.P.; Kaltenbach, M.H. y Lyons, W.B. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp. Cell Res.* 15, 112-117, 1958.

Kannel, W.B.; Neaton, J.D.; Wentworth, D.; Thomas, H.E.; Stamler, J.;

Hulley, S.B. y Kjelsberg, M.O. . Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for MRFIT. Am. Heart J. 112, 825-836, 1986.

Kantor, H.L.; Briggs, R.W. y Metz, K.R. Gated in vivo examination of cardiac metabolites with ^{32}P nuclear magnetic resonance. Am. J. Physiol. 251, H171-H175, 1986.

Kardami, E. y Fandrich, R. Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. J. Cell Biol. 109, 1865-1875, 1989.

Kardami, E. Stimulation and inhibition of cardiac myocyte proliferation in vitro. Mol. Cell. Biochem. 92, 129-135, 1990.

Kasai, K.; Hiraiwa, M.; Suzuki, Y.; Emoto, T.; Banba, N.; Nakamura, T. y Shimoda, S.I. Presence of epidermal growth factor receptors on human thyroid membranes. Acta Endocrinol. 114, 396-401, 1987.

Kasten, F.H. Cytology and cytochemistry of mammalian myocardial cells in culture. Acta histochem. 9 (Suppl.), 637-647, 1971.

Kasten, F.H. Rat myocardial cells in vitro: mitosis and differentiated properties. In Vitro 8(3), 123-150, 1972.

Keski-Oja, L.; Letho, V.P. y Virtanen, I. Keratin filaments of mouse epidermal cells are rapidly affected by epidermal growth factor. J. Cell. Biol. 90, 537-541, 1981.

Keyhani-Rofagha, S.; O'toole, R.; Meiser, R.K. y Neff, J. Identification of cultured pleural fluid cells by a direct immunofluorescence technique. Analyt. Quant. Cytol. 6, 238-242, 1984.

Keys, A.; Anderson, J. y Grande, F. Serum cholesterol response to changes in the diet. II. The effect of cholesterol in the diet. IV.

Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism*. 14,759-765 y 776-782,1965.

Keys,A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 41,1-198,1970.

Keys,A. Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge Massachusetts: Harvard University Press,1980.

Kim,D.;Barry,W.H. y Smith,T.W. Kinetics of ouabain binding and changes in cellular sodium content, $42K^+$ transport and contractile state during ouabain exposure in cultured chick heart cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 231,326-333,1984.

Kinsella,M.G. y Fitzharris,T.P. Origin of cushion tissue in the developing chick heart: Cinematographic recordings of in situ formation. *Science* 207,1359-1360,1980.

Kinsella,M.G. y Fitzharris,T.P. Control of cell migration in atrioventricular pads during chick early heart development: analysis of cushion tissue migration in vitro. *Dev.Biol.* 91,1-10, 1982.

Kirby,M.L.; Shimizu,N.; Gagnon,J.; Toyofuku,T.; Kennedy,J.; Conrad,D.C. y Zak,R. Actin and myosin isoforms in aneural and malformed chick hearts. *J.Mol.Cell Cardiol.* 22,955-964, 1990.

Klann,R.C. y Marchok,A.C. Effects of retinoic acid on cell proliferation and cell differentiation in a rat tracheal epithelial cell line. *Cell Tissue Kinet.* 15,473-482,1982.

Kocher,O. y Gabbiani,G. Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. *Hum.Pathol.* 17,875-880,1986.

Kohler, G. y Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497, 1975.

Kohlmeier, M.; Oster, P. y Schlierf, G. Hyperlipoproteinämie: therapie mit Bezafibrat und Gemfibrozil. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 129, 160-162, 1987.

Konigsberg, I.R. Clonal analysis of myogenesis. *Science* 140, 1272-1284, 1963.

Kurki, P.; Linder, E.; Virtanen, I. y Stenman, S. Human smooth muscle autoantibodies reacting with intermediate (100 Å) filaments. *Nature* 268, 240-241, 1977.

La Rosa, J.E.; Brown, W.V.; Frommer, P.L. y Levy, R.I. Clofibrate induced ventricular arrhythmia. *Am. J. Cardiol.* 23, 266, 1969.

Labarca, C. y Paigen, K. A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344-352, 1980.

Labreche, D.G. Reassessment of the value of lowering serum cholesterol. *Clin. Pharm.* 7(8), 597-603, 1988.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.

Langer, T. y Levy, R.I. Acute muscular syndrome associated with administration of clofibrate. *N. Engl. J. Med.* 279, 856-858, 1968.

Langer, C.A. Calcium at the sarcolemma. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16, 147, 1984.

Larno, S.; Calvet, M.C.; Calvet, J.; Adolphe, M y Lechat, P. Modifications of transmembrane potentials induced by Na Butyrate in cultured chondrocytes. *Life Sciences* 36(21), 2069-2073, 1985.

Laurent, S.; Marsh, J.D. y Smith, T.W. Enkephalins increase cyclic adenosine monophosphate content, calcium content, calcium uptake, and contractile state in cultured chick embryo heart cells. *J.Clin.Invest.* 77, 1436-1440, 1986.

Laurent, S. y Lechat, P. Culture de cellules cardiaques. En: *Culture de cellules animales. Methodologies-Applications.* Inserm, Ed., Paris, 245-255, 1988.

Lazarides, E. y Hubbard, B.D. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 73, 4344-4348, 1976.

Lazarides, E. The distribution of desmin(100A) filaments in primary cultures of embryonic chick cardiac cells. *Exp.Cell Res.* 112, 265-273, 1978.

Lazarides, E.; Hubbard, B.D. y Granger, B.L. En: Hatano, S.; Ishikawa, H. and Sato, H. (eds). *Cell Motility: Molecules and Organizacion.* University of Tokyo Press, Tokyo, 1, 521-543, 1979.

Lazarides, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283, 249-256, 1980.

Le Douarin, G.; Suignard, G.; Khasiye, A. y Renaud, D. Sensibilité aux catécholamines des cardiomyoblastes embryonnaires de poulet isolés en culture in vitro. *C.R.Acad.Sc.(Paris)* 278, 2943-2945, 1974.

Leader, M.; Collins, M.; Patel, J. y Henry, K. Desmin: its value as a marker of muscle derived tumours using a commercial antibody. *Virchows Arch.A.* 411, 345-349, 1987.

Lechat, P. Quelques données sur le chronotropisme, obtenues à l'aide de cellules cardiaques en culture. *Bull.Acad.Nat.Med.* 162, 401-406, 1978.

Lehmkuhl, D. y Sperelakis, N. Trans-membrane potentials of trypsin dispersed chick heart cells cultured in vitro. J. Physiol. 205, 1213, 1963.

Leighton, J.; Mark, R. y Rush, G. Patterns of three-dimensional growth in collagen coated cellulose sponge: Carcinomas and embryonic tissues. Cancer Res. 28, 286-296, 1968.

Leiva, J.; Mendoza, J.; Navarro, J.M.; Plata, J.C. y De La Rosa, M. Patrón de anticuerpos en brucelosis humana aguda definido por Western-blot. Enf. Infec. Microbiol. Clin. 8, 15-18, 1990.

Letho, V.P. y Virtanen, I. Intermediate (10 nm) filaments in human malignant mesothelioma. Virchows Arch. B Cell Pathol. 28, 229-234, 1978.

Lewis, M. y Lewis, W.H. The cultivation of tissues from chicks embryos in solutions of NaCl, CaCl₂, KCl and NaHCO₃. Anat. Rec. 5, 277, 1911.

Lewis, W.; Kleinerman, J. y Puzskin, S. Interaction of Adriamycin in vitro with cardiac myofibrillar protein. Cir. Res. 50, 547-553, 1982.

Lewis, W.; Galizi, M. y Puzskin, S. Compartmentalization of adriamycin and daunomycin in cultured chick cardiac myocytes. Effect on synthesis of contractile and cytoplasmic proteins. Cir. Res. 53, 352-362, 1983.

Lewis, W. y Gonzalez, B. Actin isoform synthesis by cultured cardiac myocytes. Effects of doxorubicin. Lab. Invest. 56(3), 295-301, 1987a.

Lewis, W. y Gonzalez, B. Actin synthesis in cultured cardiac myocytes comparative effects of doxorubicin, dactinomycin, and plicamycin. J. Lab. Clin. Med. 109, 67-74, 1987b.

Lewis, W.; Perillo, N. y Gonzalez, B. α -Actin synthesis changes in cultured cardiac myocytes relationship to anthracycline structure. J.Lab.Clin.Med. 112,43-51,1988.

Li, J. y Lemanski, L.F. Immunofluorescent studies for α -actinin in cultured cardiomyopathic hamster cells. Anat.Rec. 228,46-52, 1990.

Lim, R. y Mitsunobu, K. Partial purification of morphological transforming factor from pig brain. Biochem.Biophys. Acta 400,200-207,1975.

Lini, S.S.; Heving, G.E. y Borisy, G.G. Widespread occurrence of anti-Troponin T crossreactive components in non-muscle cells. J.Cell.Sci. 85,1-19,1986.

Lin, M.A.; Latt, S.A. y Davidson, R.L. Identification of human and mouse chromosomes in human-mouse hybrids by centromere fluorescence. Exp.Cell Res. 87,429-433,1974.

Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results. JAMA 251,351-375,1984.

Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results. JAMA 251,351-364,1984.

Littlefield, J.W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science, 145:709-710,1964.

Lobaugh, L.A. y Lieberman, M. Na-k pump site density and ouabain binding affinity in cultured chick heart cells. Am.J.Physiol. 253(Cell Physiol.22), C731-C743,1987.

Lowry, O.N.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193,265-

275,1951.

Lussier-Cacan, S.; Bard, J.M.; Boulet, L.; Nestruck, A.C.; Grothé, A.M.; Fruchart, J.C. y Davignon, J. Lipoprotein composition changes induced by fenofibrate in dysbetalipoproteinemia type III. *Atherosclerosis* 78,167-182,1989.

McCall, D. Cation exchange and glycoside binding in cultured rat heart cells. *Am.J.Physiol.* 236 (Cell Physiol. 5), C87-C95,1979.

MacPherson, I. y Montaignier, L. Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* 23,291-294,1964.

Magum, A.M.; Brasitus, T.A. y Glickman, R.M. Isolation of high density lipoproteins from rat intestinal epithelial cells. *J.Clin.Invest.* 75,209-218,1985.

Mahley, R.W.; Innerarity, T.L.; Rall, S.C.Jr y Weisgraber, K.H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J.Lipid.Res.* 25,1277-1294,1984.

Maitland, H.B. y Maitland, M.C. Cultivation of vaccinia virus without tissue culture. *Lancet* 215,596,1928.

Maitland, N.J. y Mc.Dougall, J.K. Biochemical transformation of mouse cells by fragments of herpes virus DNA. *Cell* 11,233-241,1977.

Malhotra, A.; Penpargkus, S.; Fein, F.S.; Sonnenblick, E.H. y Schener, J. The effect of streptozotocin-induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins. *Cir.Res.* 49,1243-1250,1981.

Maltese, W.A. y Aprille, J.R. Relation of mevalonate synthesis to mitochondrial ubiquinone content and respiratory function in

cultured neuroblastome cells. J.Biol.Chem. 260,11524-11529,1985.

Manasek,F.J. Mitosis in developing cardiac muscle.J.Cell Biol. 37,191-196,1968.

Mareel,M.; Dragonetti,C.H.; Hooghe,R.J. y Bruyneel,E.H. Effect of inhibitors of glycosylation and carbohydrate processing on invasion of malignant mouse MO₄ cells in organ culture. Clin.Exp.Metastases 3,197-208,1985.

Mareel,M.M.K. A model in vitro for tumour invasión. Verh.Dtsch.Ges.Path. 64,403,1984.

Mark,G.E. y Strasser,F.F. Morphology, growth and pacemaker activity of mammalian heart ventricle cells in culture.Abstr. 17th Ann. Meeting, Tissue Culture Assoc.,74-75,1966.

Mark,G.E.; Hackney,J.D. y Strasser,F.F. Morphological and contractile behavior of cultured heart cells, and their response to various oxygen tensions.En: "Factors influencing myocardial contractility" Tanz,R.D.;Kavalier,F. y Roberts,J. (eds),Academic Press, New York,301,1967.

Marsh,J.D.; Loh,E.; Lachance,D.; Barry,W.H. y Smith,T.W. Relationship of binding of a calcium channel blocker to inhibition of contraction in intact cultured embryonic chick ventricular cells. Cir.Res. 53,539-543,1983.

Martin,M.J.; Hulley,S.B.; Browner,W.S.;Kuller,L.H. y Wentworth,D. Serum cholesterol, blood pressure and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. Lancet 2,933-936,1986.

Massey,K.D. y Burton,K.P. Free radical damage in neonatal rat cardiac myocyte cultures: effects of α -tocopherol, trolox, and phytol. Free Radical Biology & Medicine 8,449-458,1990.

Mayall, B.H. Cytometry in the clinical laboratory: Quo Vadis?.
En: "Clinical cytometry". Andreef, M. (ed), Ann. N.Y. Acad. Sci. 468,
1-17, 1986.

Mazier, D.; Beaudoin, R.L.; Mellouk, S.; Druilhe, P.; Texier, B.;
Trosper, J.; Miltgen, F.; Landau, I.; Paul, C.; Brandicourt, O.; Guguen-
Guillouzo, C.; Langlois, P. y Gentilini, N. Complete development
of hepatic stages of Plasmodium falciparum in vitro. Science
227, 440-442, 1985.

McCall, D. Cation exchange and glycoside binding in cultured rat
heart cells. Am. J. Physiol. 236 (Cell Physiol. 5), C87-C95, 1979.

McCarthy, K.D. y De Vellis, J. Preparation of separate astroglial
and oligodendroglia cell cultures from rat cerebral
tissue. J. Cell. Biol. 85, 890-902, 1980.

McDermott, P.; Daoud, M. y Klein, I. Measurement of myosin
adenosinetriphosphate and myosin content in cultured heart cells.
Arch. Biochem. Biophys. 240, 312-318, 1985.

McDermott, P.J. y Morgan, H.E. Contraction modulates the capacity
for protein synthesis during growth of neonatal heart cells in
culture. Circulation Res. 64, 542-553, 1989.

McGarvey, J.F.X. Premature contractions and clofibrate. JAMA
225, 683, 1973.

McMahon, K.K. A study of adult rat atrial myocyte attachment to
extracellular matrix components and long term culture. En:
Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). Biology of isolated adult
cardiac myocytes. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New
York, 318-321, 1988.

Mendoza, J.; Navarro, J.M.; Quesada, R.; Cueto, M.; Garcia, F.; Leiva, J.;
Fernandez, J.M. y Hernandez, J.M. III Congreso Sociedad Española de

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Comunicación 21-11, Granada, 1988.

Mendoza, J.; Navarro, J.M. y De la Rosa, M. Utilización de la técnica de centrifugación-cultivo para el diagnóstico rápido de Citomegalovirus. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin.* 7, 403-407, 1989.

Mendoza, J.; Navarro, J.M.; Rojas, A. y De la Rosa, M. Evaluation of immunofluorescence, enzyme immunoassays and the shell-vial assay for detection of two respiratory syncytial virus. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 10, 40-42, 1991.

Merchant, D.J.; Kahn, R.D. y Murphy, W.H. Jr. Handbook of cell and organ culture. Burgess, Minneapolis, Minnesota, 205-206, 1964.

Metezeau, P.; Elguindi, I. y Goldberg, M. Endocytosis of the membrane immunoglobulins of mouse spleen B cells: a qualitative study of its rate, amount and sensitivity to physiological, physical and cross-linking agents. *EMBO J.* 3, 2235-2242, 1984.

Michiels, F.M.; Duverger, A.; y Chouroulinkov, I. Correlation between preneoplastic lesions in rat embryo lung treated with B(a)P or CSC in organ culture and tumour production in vivo. *Carcinogenesis.* 2, 885-896, 1981.

Miettinen, M.; Franssila, K.; Lehto, V.P.; Paasivuo, R. y Virtanen, I. Expression of intermediate filament proteins in thyroid gland and thyroid tumours. *Lab. Invest.* 50, 262-270, 1984.

Miettinen, T.A. Effect of neomycin alone and in combination with cholestyramine on serum cholesterol and fecal steroids in hypercholesterolemic subjects. *J. Clin. Invest.* 64, 1485-1493, 1979.

Miller, N.E., Weinstein, D.B. y Steinberg, D. Binding internalization and degradation of high density lipoprotein by cultured normal human fibroblasts. *J. Lipid. Res.* 18, 438-450, 1977.

Miller, N.E.; Hammet, F.; Saltissis, S.; Rao, S.; Zeller, H.V.;
Coltart, J. y Lewis, B. Relation of angiographically defined
coronary artery disease to plasma lipoprotein subfraction
and apolipoproteins. Br. Med. J. 282, 1741-1746, 1981.

Mittal, K.K. Standardisation of the HLA typing method and
reagents. Vox Sang 34, 58-64, 1977.

Mochon Martin, A. Técnica de cultivo "in vitro" de corazones
embrionarios de pollo (fase de asa cardiaca) por sumersión
completa en un medio líquido. Tesina-Licenciatura. Granada.
Facultad de Medicina, 1986.

Monk, J.P. y Todd, P.A. Bezafibrate. A review of its
pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic
use in hyperlipidaemia. Drugs 33, 539-576, 1987.

Montefiori, D.C.; Robinson, W.E. Jr. y Mitchell, W.M. In vitro
evaluation of mismatched double-stranded RNA (ampligen) for
combination therapy in the treatment of acquired immunodeficiency
syndrome. AIDS Res. Hum. Retroviruses 5(2), 193-203, 1989.

Moolenaar, W.H.; Tertoden, L.G.J. y De Laat, S.W. Phorbol ester and
diacylglycerol chimic growth factors in raising cytoplasmic pH.
Nature 312, 371-374, 1984.

Morasca, L. y Etba, E. Flow cytometry. En: "Animal Cell Culture-A
Practical Approach". Freshney R.I. (ed), Oxford, IRL Press, 125-
148, 1986.

Morgan, J.F.; Morton, H.J. y Parker, R.C. Nutrition of animal cells
in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium.
Proc. Soc. Exptl. Cel Res. 73, 1-8, 1950.

Morgan, H.E.; Gordon, E.E.; Kira, Y.; Chua, B.H.L.; Russo, L.A.;

Peterson, C.J.; McDermott, P.J. y Watson, P.A. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* 49, 533-543, 1987.

Morgan, H.E. Myocardial metabolic methods. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). *Biology of isolated adult cardiac myocytes*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1-8, 1988.

Morris, G.E. y Head, L.P. Monoclonal antibodies to intermediate filaments in chick muscle cell cultures. *Exp. Cell Res.* 158, 177-191, 1985.

Moscona, A. y Moscona, H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early embryo. *J. Anat.* 86, 287-301, 1952.

Moscona, A.A. Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.* 3, 535-539, 1952.

Moscona, A.; Trowell, O.A. y Willmer, E.N. Cells and tissues in culture. Willmer, E.N. (ed). Vol. 1, Academic Press, New York, 19, 1965.

Moses, R.L. y Claycomb, W.C. Disorganization and reestablishment of cardiac muscle cell ultrastructure in cultured adult rat ventricular muscle cells. *J. Ultrastruct. Res.* 81, 358-374, 1982.

Moses, R.L. y Claycomb, W.C. Ultrastructural alteration of cultured adult rat ventricular cardiac myocytes by TPA and diacylglycerols. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). *Biology of isolated adult cardiac myocytes*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 306-309, 1988.

Muirhead, K.A. y Horan, P.K. Applications of flow cytometry to tissue cultures systems. En: "Advances in cell culture", Maramorosch K. (ed.), Academic Press, Orlando, 57-91, 1984.

Muros, M.A.; Vélez, C.; Aránega, A.; González, F.J.; Aránega, A.E.; Fernández, J.E. y Alvarez, L. Modulación de la contractilidad cardíaca en la miogénesis mediante el anticuerpo monoclonal antidesmina. *Rev. Esp. Cardiol.* 43, 323-327, 1990.

Murphy, R.F.; Power, R.S. y Hedley, D. Flow cytometric measurement of cytoplasmic pH: a critical evaluation of available fluorochromes. *Cytometry* 2, 133-134, 1982.

Murphy, R.A. Contraction of muscle cells. In: Berne, R.M. and Levy, M.N. (eds): *Physiology*. St. Louis, C.V. Mosby, 359-386, 1983.

Murphy, E.; Aiton, J.F.; Russell, C. y Lieberman, M. Calcium elevation in cultured heart cells: its role in cell injury. *Am. J. Physiol.* 245 (Cell Physiol. 14), C316-C321, 1983.

Mustafa, S.J.; Berne, R.M. y Rubio, R. Adenosine metabolism in cultured chick-embryo heart cells. *Am. J. Physiol.* 228, 1474-1478, 1975.

Nag, A.C.; Fishman, D.A.; Rabinowitz, M. y Zak, R. Cell culture of adult rat cardiac muscle. *J. Cell Biol.* 63, 238a, 1974.

Nag, A.C. y Cheng, M. DNA synthesis of adult mammalian cardiac muscle cells in long-term culture. *Tissue Cell* 18, 491-497, 1986.

Nag, A.C.; Krehek, W. y Cheng, M. Distributions of vimentin and desmin filaments in embryonic cardiac muscle cells in culture. *Cytobios* 45, 195-209, 1986.

Nag, A.S. y Cheng, M. Structural organization, DNA synthesis and expression of myosin isoforms in adult cardiac muscle cells in culture. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). *Biology of isolated adult cardiac myocytes*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 288-291, 1988.

National Center for Health Statistics: Monthly vital statistics report. 33(9), Supplement, Dec 20, 1984.

National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Lowering blood cholesterol to prevent heart disease. JAMA 253, 2080-2086, 1985.

Nicholls, D.P. Treatment of hyperlipidaemia. Int. Pharm. J. 2(3), 94-98, 1988.

Nikkari, S.T.; Koistinaho, J. y Jaakkola, O. Changes in the composition of cytoskeletal and cytocontractile proteins of rat aortic smooth muscle cells during aging. Differentiation 44, 216-221, 1990.

Ødegaard, O.R. Drugs affecting lipid metabolism. In: Dukes, M.N.G. (ed), Meyler's side effects of drugs. Elsevier, Amsterdam, 916-927, 1988.

Offer, G. The molecular basis of muscular contraction. In: Companion to Biochemistry. Bull, A.T.; Lagnado, J.R.; Thomas, J.O.; Tipton, D.R. (eds), New York, 623-671, 1974.

Orts Llorca, F. Anatomía Humana. editorial Científico Médica, Madrid, III, 27-89, 1986.

Osborn, M.; Geisler, N.; Shaw, G.; Sharp, G.; y Weber, K. Intermediate filaments. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 46, 413-429, 1981.

Osborn, M. y Weber, K. Intermediate filament proteins. A multigene family distinguishing major cell lineages. Trends Biochem. Sci. 11(11), 469-472, 1986.

Osborn, M.; Caselitz, J.; Püschel, K. y Weber, K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. Virchows Arch. A. -411, 449-458, 1987.

Page, S. Management of structural parameters in cardiac muscle. CIBA Foundation Symposium 24 (New Series), Amsterdam, Elsevier, 13, 1974.

Pahwa, S.; Chirmule, N.; Leombruno, C.; Lin, W.; Harper, R.; Bhall, R.; Pahwa, R.; Nelson, R.P. y Good, R.A. In vitro synthesis of human immunodeficiency virus-specific antibodies in peripheral blood lymphocytes of infants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(19), 7532-7536, 1989.

Paranko, J.; Kallajoki, M.; Pelleniemi, L.T.; Lehto, V.P. y Virtanen, I. Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. Develop. Biol. 117, 35-44, 1986.

Parmacek, M.S.; Magid, N.M.; Lesch, M.; Decker, R.S. y Samarel, A.M. Cardiac protein synthesis and degradation during thyroxine-induced left ventricular hypertrophy. Am. J. Physiol. (Cell Physiol.) 251, C727-C736, 1986.

Patsch, J.R. Lipid-lowering drugs and atherosclerosis. En: Leaf, A. y Weber, P.C. (eds). Atherosclerosis Reviews. Raven Press, Ltd., New York, 21, 129-133, 1990.

Patten, B.M. Initiation and early changes in the character of the heart beat in vertebrate embryos. Physiol. Rev. 29, 31-47, 1949.

Pellerin, C.; Bapst, M.; Lys, I.; Petit, P. y Pellat, B. Human gingival explant culture on "serum substitute" containing medium. J. of Dental Research 65, 540, 1986.

Perez, A.; Rodriguez, R.; Leonard, R.; Guillen, I.; Hernández, L.; Hernández, E.; Santizo, C.; de la Fuente, J. y Herrera, L. Síntesis y secreción de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en células de mamíferos. Interferón y Biotecnología 5(3), 223-228, 1988.

Perry, S.V. The regulation of contractile activity in muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 7, 593-597, 1979.

Picard, R. y Tixier-Vidal, A. Description d'une méthode permettant la sélection et l'étude ultrastructurale de plages cellulaires dans des monocouches hétérogènes cultivées en flacons de plastique. *J. Microsc.* 130, 79-84, 1982.

Pieper, F.R.; Schaart, G.; Krimpenfort, P.J.; Henderik, J.B.; Moshage, H.J.; Van de Kemp, A.; Ramaekers, F.C.S.; Berns, A. y Bloemendal, H. Transgenic expression of the muscle-specific intermediate filament protein desmin in nonmuscle cells. *J. Cell Biol.* 108, 1009-1024, 1989.

Pierce, L.R.; Wysowski, D.K. y Gross, T.P. Myopathy and rhabdomyolysis associated with lovastatin-gemfibrozil combination therapy. *JAMA* 264, 71-75, 1990.

Polinger, I.S. Separation of cell types in embryonic heart cell cultures. *Exp. Cell Res.* 63, 78-82, 1970.

Polinger, I.S. Identification of cardiac myocytes in vivo and in vitro by the presence of glycogen and myofibrils. *Exp. Cell Res.* 76, 243-252, 1973.

Porte, A.; Stoeckel, M.E.; Sacrez, A. y Batzenschlager, A. Unusual familial cardiomyopathy with storage of intermediate filament in the cardiac muscular cells. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.* 386, 43-58, 1980.

Powell, T. Methods for the isolation and preparation of single adult myocytes. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). *Biology of isolated adult cardiac myocytes*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 9-13, 1988.

Preedy, V.R. y Sudgen, P.H. The effects of fasting or hypoxia

on rates of protein synthesis in vivo in subcellular fractions of rat heart and gastrocnemius muscle. *Biochem.J.* 257,519-527,1989.

Fritzl,N y Zak,R. Molecular biology of myocardial proteins. *Circulation* 75,185-191,1987.

Pyörälä,K.;Salonen,J.T. y Valkonen,T. Trends in coronary heart disease mortality and morbidity and related factors in Finland. *Cardiology* 72,35-51,1985.

Pujol,J.P.; Brisset,M.; Jourdan,C.;Bocquet,J.;Jouis,V.;Beliard,R. y Loyau,G. Effect of a monocyte cell factor (MCF) on collagen production in cultured articular chondrocytes: role a prostaglandin E2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 119,499-508,1984.

Purkinje,J.E.Mikroskopisch-neurologische Beobachtungen. *Arch.Anat. Physiol.Wiss.Med.*12,281-295,1845.

Quax,W.; Van den Broek,L.; Vree Egberts,W.; Ramaekers,F. y Bloemendal,H. Characterization of the hamster desmin gene: Expression and formation of desmin filaments in nonmuscle cells after gene transfer. *Cell* 43,327-338,1985.

Quinlan,R.A.; Cohlberg,J.A.; Schiller,D.L.; Hatzfeld,M. y Franke,W.W. Heterotypic tetramer (A₂D₂) complexes of non-epidermal keratins isolated from cytoskeletons of rat hepatocytes and hepatoma cells. *J.Mol.Biol.* 178,365-388,1984.

Raats,J.M.H.; Pieper,F.R., Vree Egberts,W.T.M.; Verrijp,K.N.; Ramaekers,F.C.S. y Bloemendal,H. Assembly of amino-terminally deleted desmin in vimentin-free cells. *J. Cell Biol.* 111,1971-1985,1990.

Rakusan,K. y Korecky,B. Regression of cardiomegaly induced in newborn rats. *Can.J.Cardiol.* 1,217-222,1985.

Ramaekers, F.C.S.; Beck, H.; Vooijs, G.P. y Herman, C.J. Flow cytometric analysis of mixed cell populations using intermediate filament antibodies. *Exp. Cell Res.* 153, 249-253, 1984.

Ramaekers, F.C.S.; Haag, D.; Kant, A.; Moesker, O.; Jap, P.H.K. y Vooijs, G.P. Coexpression of keratin- and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2618-2622, 1983.

Randinitis, E.J.; Kirkel, A.W.; Nelson, C. y Parker, T.D. Gas chromatographic determination of gemfibrozil and its metabolites in plasma and urine. *J. Chromatography* 307, 210-215, 1984.

Redgrave, T.G. y Small, D.M. Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat. *J. Clin. Invest.* 64, 162-171, 1979.

Renaud, J.F. y Le Douarin, G. Influence de l'âge de l'embryon donneur et de la concentration d'ensemencement sur l'évolution de la culture primaire de cellules cardiaques de Poulet. *C.R. Soc. Biol.* 12, 1780-1783, 1972.

Renaud, J.F. Use of cell cultures as a tool to elucidate physiological, pharmacological and biochemical membrane properties of the embryonic heart. *Biol. Cellul.* 37, 97-104, 1980.

Renaud, J.F.; Scana, A.M.; Kazazoglou, T.; Lombert, A.; Romez, G. y Lazdunski, M. Normal serum and lipoprotein-deficient serum give different expression of excitability, corresponding to different stages of differentiation in chick cardiac cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (24), 7768-7772, 1983.

Rengasamy, A.; Ptasienski, J. y Hosey, M.M. Purification of the cardiac 1,4-Dihydropyridine receptor/calcium channel complex.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 126(1),1-7,1985.

Romanoff,A.L. The avian Embryo Chap. 9,Macmillan,New York,1960.

Rong,P.M.; Ziller,C.; Pena-Melian,A. y Le Douarin,N.M. A monoclonal antibody specific for avian early myogenic cells and differentiated muscle. Dev.Biol. 122,338-353,1987.

Ross,A.F.; Rapuano,M.; Schmidt,J.H. y Prives,J.M. Phosphorylation and assembly of nicotinic acetylcholine receptor subunits in cultured chick muscle cells. J.Biol.Chem. 262,14640-14647,1987.

Rosztóczy,I. Estudio sobre el mecanismo del efecto iniciador (priming effect) del interferon in vivo e in vitro. Biotec 0,13-14,1989.

Roux,P.;Wilhelm. Beitráge zur entwicklungs mechanik des embryo. Z.Biol. 21,411,1885.

Rumyantsev,P.P. A morphological and autoradiographical study of the peculiarities of differentiation rate, DNA synthesis and nuclear division in the embryonal and postnatal histogenesis of cardiac muscles of white rats. Folia Histochem.Cytochem. 1,463-471,1963.

Rumyanchev,P.P. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. Int.Rev.Cytol. 51,187-273,1977.

Ryemond,O.L. y Pickett-Heaps. Routine flat embedding method for electron microscopy of microorganisms allowing selection and precisely oriented sectioning of single cells by light microscopy. J.Micros. 130,79-84,1982.

Samuel,P. Effects of gemfibrozil on serum lipids. Am.J.Cardiol.74,23-27,1983.

Sanford, K.K.; Earle, W.R.; Evans, V.J.; Waltz, H.K. y Shannon, J.E.
The measurement of proliferation in tissue cultures by
enumeration of cell nuclei. *J.Natl. Cancer Inst.* 11, 773, 1951.

Sano, K.; Takai, Y.; Yamanashi, J. y Nishizuka, Y. A role of calcium
activated phospholipid dependent protein kinase in human platelet
activation. Comparison of thrombin and collagene
actions. *J.Biol.Chem.* 258, 2010-2013, 1983.

Sato, S.; Ashrof, M.; Millard, R.W.; Fujwara, H. y Schwartz, A.
Connective tissue changes in early ischemia of porcine
myocardium: An ultrastructural study. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 15, 261-
275, 1983.

Saule, S.; Mérigaud, J.P.; Al-Moustafa, A.M.; Ferré, F.; Rong, P.M.;
Amougel, P.; Quatannens, B.; Stéhelin, D. y Dieterlen-Lièvre, F. Heart
tumors specifically induced in young avian embryos by the v-myc
oncogene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84, 7982-7986, 1987.

Schaeffer, W.T. Usage of vertebrate, invertebrate and plant cell
tissue and organ culture terminology. *In Vitro* 20, 19-24, 1984.

Schaper, J.; Meiser, E. y Stammler, G. Ultrastructural morphometric
analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice and from
human hearts. *Circ.Res.* 56, 377-391, 1985.

Schiaffino, S.; Gorza, L.; Sartore, S.; Saggin, L. y Carli, M.
Embryonic myosin heavy chain as a differentiation marker of
developing human skeletal muscle and rhabdomyosarcoma.
Expl. Cell Res. 163, 211-220, 1986.

Schimdt, E.E. y Merrill, G.F. Maintenance of dihydrofolate
reductase enzyme after disappearance of DHFR mRNA during muscle
cell differentiation. *In Vitro Cell.Develop.Biol.* 25, 697-
704, 1989.

Sei, C.A. y Glembotski, C.C. Calcium dependence of phenylephrine-, endothelium-, and potassium chloride-stimulated atrial natriuretic factor secretion from long term primary neonatal rat atrial cardiocytes. J.Biol.Chem. 265(13), 7166-7172, 1990.

Seidal, T.; Kindblom, L.G. y Angervall, L. Myoglobin, desmin and vimentin in ultrastructurally proven rhabdomyomas and rhabdomyosarcomas. Appl.Pathol. 5, 201-219, 1987.

Seigneurin, J.M. A quantitative image analysis of Epstein Barr Virus immortalized and Burkitt's lymphoma cell lines. Xth Int.Herpesvirus Workshop, Ann Harbor, USA, 1985.

Sen, A.; Dunnmon, P.; Henderson, S.A.; Gerard, R.D. y Chien, K.R. Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of SV40 large T antigen. J.Biol.Chem. 263(35), 19132-19136, 1988.

Senécal, J.L.; Fortin, S.; Roussin, A. y Joyal, F. Anticytoskeletal autoantibody to microfilament anchorage sites recognizes novel focal contact proteins. J.Clin.Invest. 80, 778-785, 1987.

Serrano, M.L.; Mendoza, J.; Lopez, J.A.; Molina, J.; Martinez-Aragón, A.; Navarro, J.M. y De la Rosa, M. Estudio preliminar de actividad antivírica de c-glucósidos relacionados a nucleósidos y a otras estructuras asociadas con acción antivírica. Enf.Infec. y Microbiol.Clin. 5, 329-332, 1987.

Severson, D.L. y Carroll, R. Effect of taxol on the heparin-induced secretion of lipoprotein lipase from cardiac myocytes. Mol.Cell.Biochem. 88, 17-22, 1989.

Shaler, R.C. y McCarl, R.L. Mechanism of cortisol action in cultured rat heart cells. Effects on RNA and protein synthesis.

J. Cell Biol. 49, 205-209, 1971.

Shapiro, A.L.; Vinuela, E. y Maizel, J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrilamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815-820, 1967.

Shapiro, H.M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. Cytometry 2, 143-150, 1981.

Shepherd, J.; Packard, C.J.; Bicker, S.; Lorie, T.D.V. y Morgan, H.G. Cholestyramine promotes receptor mediated low density lipoprotein catabolism. New Engl. J. Med. 302, 1219-1222, 1980.

Shields, P.P.; Dixon, J.E. y Glembotski, C. The secretion of atrial natriuretic factor-(99-126) by cultured cardiac myocytes is regulated by glucocorticoids. J. Biol. Chem. 263(25), 12619-12628, 1988.

Shimizu, K.; Goldfarb, M.; Perucho, M. y Wigler, M. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 383-387, 1983.

Shimizu, N.; Kamel-Reid, S. y Zak, R. Expression of actin mRNAs in denervated chicken skeletal muscle. Dev. Biol. 128, 435-440, 1988.

Shoeman, R.; Höner, B.; Stoller, T.J.; Kesselmeier, C.; Miedel, M.C.; Traub, P. y Graves, M.C. Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6336-6340, 1990.

Sigot-Luizard, M.F.; Sigot, M.; Domurado, D. y Broun, G. Matériaux utilisés en prothèse interne. RBS 3, 179-186, 1981.

Simpson, P.C. Measurement of pharmacological effects in isolated myocytes. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). Biology of isolated adult cardiac myocytes. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 108-117, 1988.

Simpson, P. Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. Circ.Res. 56, 884-894, 1985.

Soler-Argilaga, C. Introducción a las lipoproteínas y su relación con la aterosclerosis. En: Lipoproteínas plasmáticas y aterosclerosis coronaria. Editorial MCK, S.A., Barcelona, 17-26, 1988.

Soler-Argilaga, C. Posibilidades farmacológicas para reducir el potencial aterogénico del patrón lipoproteico. En: Lipoproteínas plasmáticas y aterosclerosis coronaria. Editorial MCR, S.A., Barcelona, 301-328, 1988.

Sommer, J.R. y Waugh, R.A. The ultrastructure of the mammalian cardiac muscle cell with special emphasis on the tubular membrane systems. Am.J.Pathol. 82, 192-232, 1976.

Sommer, J.R. y Johnson, E.A. Ultrastructure of cardiac muscle. En: Handbook of Physiology. Bethesda, MD: Am.Physiol.Soc. sect.2, I (5), 113-186, 1979.

Spector, A.A.; Mathur, S.N.; Kaduce, T.L. y Hyman, B.T. Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells. Prog.Lipid.Res. 19, 155-186, 1981.

Spengel, F.A.; Jadhav, A.; Duffield, R.G.M.; Wood, C.B. y Thompson, G.R. Superiority of partial ileal byaps over cholestyramine in reducing cholesterol in familial

hypercholesterolemia. Lancet 2,768-771,1981.

Sperelakis,N. y Lehmkuhl,D. Ionic interconversion of pacemaker and nonpacemaker cultured chick heart cells.J.Gen.Physiol. 49,867-895,1966.

Sperelakis,N. The electrical properties of embryonic heart cells in "Electrical Phenomena in the heart". De Mello,W.C. (ed), Academic Press, New York,1-61,1972.

Sperelakis,N. Developmental changes in membrane electrical properties of the heart. En: Sperelakis,N.(ed). Physiology and pathophysiology of the heart. Martinus Nijhoff Publishing,Boston,1-846,1984.

Springhorn,J.P. y Claycomb,W.C. Preproenkephalin mRNA expression in developing rat heart and in cultured ventricular cardiac muscle cells. Biochem.J. 258,73-78,1989.

Stahlberg,D.; Angelin,B. y Einarson,K. Effects of treatment with clofibrate, bezafibrate and ciprofibrate on the metabolism of cholesterol in rat liver microsomes. J.Lipid.Res. 30,953-958,1989.

Stamler,J.; Wentworth,D. y Neaton,J.D., for the MRFIT Research Group. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial(MRFIT). J.Am.Med.Assoc. 256,2823-2828,1986.

Stasse-Wolthuis,M.;Katan,M.B.;Hermus,R.J.J. y Hautvast,J.G.A.J. Increase of serum cholesterol in man fed a bran diet. Atherosclerosis 34,87-91,1979.

Stegmeier,K.; Stork,H.; Lenz,H.; Leuschner,F. y Liede,V.

Pharmacology and mode of action of bezafibrate in animals. In: Greten, H.; Lang, P.D. and Schettler, G. (editors) Lipoproteins and Coronary Heart Disease, Gerhard Witzstrock Publishing House, New York, Baden-Baden, Cologne, 76-82, 1980.

Steinberg, D. Studies on the mechanism of action of probucol. Am.J. Cardiol. 57, 16H-21H, 1986.

Steinert, P.M.; Steven, A.C. y Roop, D.R. The molecular biology of intermediate filaments. Cell 42, 411-420, 1985.

Stewart, J.M.; Packard, C.J.; Lorimer, A.R.; Boag, D.E. y Shepherd, J. Effects of bezafibrate on receptor-mediated and receptor-independent low density lipoprotein catabolism in type II hyperlipoproteinaemic subjects. Atherosclerosis 44, 355-365, 1982.

Stockdale, F.E. y Topper, Y.J. The role of DNA synthesis and mitosis in hormone dependent differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1283-1289, 1966.

Stossel, T.P. From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. J. Biol. Chem. 5, 18261-18264, 1989.

Study Group, European Atherosclerosis Society. Strategies for the prevention of coronary heart disease: a policy statement of the European Atherosclerosis Society. Eur. Heart J. 8, 77-88, 1987.

Styles, J.A. A method for detecting carcinogenic organic chemicals using mammalian cells in culture. Br. J. Cancer 36, 558, 1977.

Snignard-Khaskiye, G. y Le Douarin, G. Sensitivity of cultured chick embryo heart cells to acetylcholine evidence for nicotinic and muscarinic receptors. Archiv. Anat. micr. Morphol. exper. 74(4), 237-245, 1985

Sun, T.T. y Green, H. Immunofluorescent staining of keratin fibers

in cultured cells. Cell 14,469-476,1978.

Sutherland,R.; Vincent,P.C.;Raik,E. y Burgess,K. Quinine induced agranulocytosis: toxic effect of quinine bisulfate on bone marrow cultures in vitro. Br.Med.J. I,605-607,1977.

Swynghedauw,B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. Physiological Reviews 66(3),710-771,1986.

Sykes,J.A.;Whitescarver,J.;Briggs,L.; y Anson,J.H. Separation of tumor cells from fibroblasts with use of discontinuous density gradients. J.Natl.Cancer Inst. 44,855-864,1970.

Tankaven .; Van Driel-Kulker,A.M.J.; Cornelisse,C.J. y Ploem,J.S. Combined flow cytometry and image cytometry of the same cytological sample. J.Microsc. 130,11-22,1983.

Tarr,M. y Dowell,R.T. Effects of perinatal development on the contractile performance of isolated rat cardiac myocytes.En: Clark,W.A.;Decker,R.S. y Borg,T.K.(eds).Biology of isolated adult cardiac myocytes.Elsevier Science Publishing Co.,Inc.,New York,382-385,1988.

Taylor,K.A. y Amos,L.A. A new model for the geometry of the binding of myosin crossbridges to muscle thin filaments. J.Mol.Biol.147,297-324,1981.

Terracio,L. y Borg,T.K. Immunohistochemical characterization of isolated and cultured cardiac myocytes. En: Clark,W.A.; Decker,R.S. y Borg,T.K.(eds).Biology of isolated adult cardiac myocytes.Elsevier Science Publishing Co.,Inc.,New York,54-67,1988.

The Pooling Project Research Group: Relationships of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and

ECG abnormalities to incidence of major coronary events. J. Chronic Dis. 31, 201, 1978.

Thompson, D.; Ebin, C.E. y Cantab, D.P. Some further researches on the cultivation of tissues in vitro. Proc. R. Soc. Med. 7, 21, 1914.

Thompson, P.D.; Nugent, A.N. y Herbert, P.N. Increases in creatine kinase after exercise in patients treated with HMG-CoA reductase inhibitors. JAMA 264, 2992, 1990.

Thornell, L.E. y Eriksson, A. Filament systems in the Purkinje fibers of the heart. Am. J. Physiol. 241 (Heart Circ. Physiol. 10), H291-H305, 1981.

Thornell, L.E.; Johansson, B.; Lehto, V.P. y Virtanen, I. Intermediate filaments and associated proteins in the human heart: an immuno-fluorescence study of normal and pathological hearts. Eur. Heart J. 5 (suppl F), 231-241, 1984.

Thorogood, M.; Carter, R.; Benfield, L.; McPherson, K. y Mann, J.I. Plasma lipids and lipoprotein cholesterol concentrations in people with different diets in Britain. Brit. Med. J. 295, 351-353, 1987.

Tikkanen, M.J. y Nikkila, E.A. Cholesterol and cardiovascular disease. Current pharmacologic treatment of elevated serum cholesterol. Circulation 76(3), 529-533, 1987.

Tissue Culture Association Manual. 4, 779-782, 1978.

Tobert, J.A. New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. Circulation 76(3), 534-538, 1987.

Todd, P.A. y Ward, A. Gemfibrozil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in

dyslipidaemia. *Drugs* 36,314-339,1988.

Tokuyasu, K.T. Visualization of longitudinally-oriented intermediate filaments in frozen sections of chicken cardiac muscle by a new staining method. *J. Cell Biol.* 97,562-565,1983.

Tomás Abadal, L. Prevención de la cardiopatía coronaria, mediante medidas que influyen el patrón lipoproteico. ¿Hipótesis o realidad?. En: *Lipoproteínas plasmáticas y aterosclerosis coronaria*. Editorial MCR, S.A., Barcelona, 263-284, 1988.

Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(9), 4350-4354, 1979.

Tsien, R.Y. y Poenie, M. Fluorescence ratio imaging a new window into intracellular ionic signalling. *Trends in Biochem. Sci.* 11, 450-455, 1986.

Tunstall-Pedoe, H. y Smith, W.C.S. Cholesterol as a risk factor coronary heart disease. *Br. Med. Bulletin* 46(4), 1075-1087, 1990.

Tunstall-Pedoe, H.; Smith, W.C.S. y Tavendale, R. How-often-that-high Graphs of Serum Cholesterol. Findings from the Scottish Heart Health and Scottish MONICA Studies. *Lancet* 1, 540-542, 1989.

Tuszynski, G.P.; Frank, E.D.; Damsky, C.H.; Buck, C.A. y Warren, L. The detection of smooth muscle desmin-like protein in BHK12/C13 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 254, 6138-6143, 1979.

Uemura, K. y Pisa, Z. Recent trends in cardiovascular mortality in 27 industrialized countries. *World Health Stat. Q.* 38, 142-162, 1985.

Van Muijen, G.N.P.; Ruiters, D.J. y Warnaar, S.O. Coexpression of

intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. Lab. Invest. 57(4), 359-369, 1987.

Van Lente, F. y Cornell, W. Myopathy y rhabdomyolysis with lovastatin taken with gemfibrozil. JAMA 264, 2991-2992, 1990.

Vélez, C.; Muros, M.A.; Aránega, A.E.; Fernández, J.E.; González, F.J.; Alvarez, L. y Aránega, A. Coexpression of intermediate filament proteins in the chick embryo heart. Acta Anat. 139, 226-233, 1990.

Vemuri, R.; Heller, M.; y Pinson, A. Studies on oxygen and volume restriction in cultured cardiac-cells II. The glucose effect. Basic. Res. Cardiol. 80, 165-169, 1985.

Vemuri, R.; Willem, J.; Hegge, J.A.; Huizer, T.; Heller, M. y Pinson, A. Studies on oxygen and extracellular fluid restrictions in cultured heart cells: high energy phosphate metabolism. Cardiovas. Res. 23, 254-261, 1989.

Vessby, B. y Lithell, H. Interruption of long-term lipid-lowering treatment with bezafibrate in hypertriglyceridaemic patients. Effects on lipoprotein composition, lipase activities and the plasma lipid fatty acid spectrum. Atherosclerosis 82, 137-143, 1990.

Virtanen, I.; Kurkinen, M. y Letho, V.P. Nucleus-anchoring cytoskeletal in chicken red blood cells. Cell Biol. Int. Rep. 3, 157-162, 1979.

Virtanen, I.; Lehto, V.P.; Lehtonen, E.; Vartio, T.; Stenman, S.; Kurki, P.; Wager, O.; Small, J.V.; Dahl, D. y Badley, R.A. Expression of intermediate filaments in cultured cells. J. Cell Sci. 50, 45-63, 1981.

Warber, K.D. y Potter, J.D. Contractile proteins and phosphorylation. En: The heart and Cardiovascular System. Fozzard, H.A.; Haber, E.; Jennings, R.B.; Katz, A.M. y Morgan, H.E (eds), New York, Raven Press, 779, 1986.

Watson, J.D.; Tooze, J. y Kurtz, D.T. En: ADN Recombinante. Introducción a la ingeniería genética. Editorial Labor, S.A. Barcelona, 141-151, 1986.

Weber, K. y Osborn, M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 224, 4406-4412, 1969.

WHO cooperative trial on primary prevention of ischaemic heart disease using clofibrate to lower serum cholesterol: Mortality follow-up: report of the Committee of Principal Investigators. Lancet 2, 379-385, 1980.

WHO MONICA Project (prepared by Pajak, A.; Kuulasmaa, K.; Tuomilehto, J. y Kuokkoski, E.) Geographical variation in the major risk factors of coronary heart disease in men and women aged 35-64. World Health Stat. Q. 41, 115-137, 1988.

Wigler, M. Sweet, R.; Sim, G.K.; Wold, B.; Pellicer, A.; Lacy, E.; Maniatis, T.; Silverstein, S. y Axel, R. Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. Cell 16, 777-785, 1979.

Wildenthal, K.; Griffin, E.E. y Ingwall, J.S. Hormonal control of cardiac protein and amino acid balance. Cir. Res. 38 (Suppl. 1), I-138-I-142, 1976.

Wittenberg, B.A. y Robinson, T.F. Oxygen requirements, morphology, cell coat and membrane permeability of calcium-tolerant myocytes from hearts of adult rats. Cell Tiss. Res.

216,231-237,1981.

Wittenberg, B.A. y Haworth, R.A. Introduction: Biochemistry of isolated myocytes. En: Clark, W.A.; Decker, R.S. y Borg, T.K. (eds). Biology of isolated adult cardiac myocytes. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 211-215, 1988.

Wolf, R.N. y Grundy, S.M. Influence of weight reduction on plasma lipoproteins in obese patients. Arteriosclerosis 3, 160-169, 1983.

Wollenberger, A. Rhythmic and arrhythmic contractile activity of single myocardial cells cultured in vitro. Cir.Res. 2(Suppl.), 14-15, 1964.

World Health Stat.Q.Rapport 43(2), 110-111, 1990.

Worton, R.G. y Duff, C. Karyotyping. En : "Methods in Enzymology, Vol.LVII, Cell Culture". Jakoby, W.B.; Pastan, I.H. (eds), New York, Academic Press, 322-344, 1979.

Wysowski, D.K.; Kennedy, D.L. y Gross, T.P. Prescribed use of cholesterol-lowering drugs in the United States, 1978 through 1988. JAMA 263, 2185-2188, 1990.

Xenophontos, X.P.; Gordon, E.E. y Morgan, H.E. Effect of intraventricular pressure on protein synthesis in arrested rats hearts. Am.J.Physiol. 251, C95-C98, 1986.

Yallonka-Reuveni, Z. y Nameroff, M. Temporal differences in Jesmin expression between myoblasts from embryonic and adult chicken skeletal muscle. Differentiation 45, 21-28, 1990.

Yuki, M. The study of structural proteins in the ischemic contracture muscle. J.Jpn.Orthop.Assoc. 61, 1107-1121, 1987.

Zak, R.; Martin, A.F. y Blough, R. Assessment of protein

turnover by use of radioisotopic tracers. *Physiol. Rev.* 59,407-447,1979.

Zak,R. Factors controlling cardiac growth. En: Growth of the heart in health and disease. Zak,R.(ed),Raven Press,New York,165-185,1984.

Zaroff,L.; Sato,G.H. y Mills,S.E. Single-cell platings from freshly isolated mammalian tissue. *Exp. Cell Res.* 23,565-575,1961.