UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL:

OPTIMIZACION DE LOS CULTIVOS MIOCARDIOCITICOS HUMANOS Y EMBRIONARIOS COMO MODELO EXPERIMENTAL DE INTERACCION FARMACOLOGICA HIPOLIPEMIANTE

FRANCISCO JESUS GONZALEZ SANCHEZ

1991

GR - 27 - 1991

UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO

Curso de 19 90 a 19 91

Referencia 169

ACTA DE GRADO DE DOCTOR

DOCTORANDO D. FRANCISCO JESUS GONZALEZ SANCHEZ

LICENCIADO EN FARMACIA por la Universidad de GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

DEPARTAMENTO RESPONSABLE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

TITULO DE LA TESIS OPTIMIZACION DE LOS CULTIVOS MIOCARDIOCITICOS HUMANOS Y EMBRIONARIOS COMO MODELO EXPERIMENTAL DE INTERACCION FARMACOLOGICA HIPOLIPEMIANTE

DIRECTOR/ES Dra. Dª ANA LINARES GIL

Dra. Dª ANTONIA ARANEGA

TUTOR Dra. Dª ANA LINARES GIL

TRIBUNAL

PRESIDENTE JUAN MURLE GONZALEZ

VOCALES JAVIER PUERTA FONOLLA

Mª José FAUS DADER

FCA. REIG ISART

SECRETARIO José PULIDO CABALLERO

Reunido el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. FRANCISCO JESUS GONZALEZ SANCHEZ éste procede al acto de mantenimiento y defensa de la Tesis Doctoral.

Terminado dicho acto y contestadas las objecciones formuladas por el Tribunal, éste le calificó APTO CUM LAUDE (unanimidad)

Granada 17 - septiembre - 91

El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE,

Fdo.: JUAN M. MURLE GONZÁLEZ

Fdo.: José Pulido Caballero

EL VOCAL,

Fdo.: J. Puerta

EL VOCAL,

Fdo.:

EL VOCAL,

Fdo.: FRANCESCA REIG ISART

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia

por el Licenciado Francisco Jesús González Sánchez.

Directores de Tesis:

Prof. Dra. Ana Linares Gíl

Prof. Dra. Antonia Aránega Jimenez

Granada, Julio de 1991

ANA LINARES GIL, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, " **OPTIMIZACION DE LOS CULTIVOS MIOCARDIOCITICOS HUMANOS Y EMBRIONARIOS COMO MODELO EXPERIMENTAL DE INTERACCION FARMACOLOGICA HIPOLIPEMIANTE** ", ha sido realizado bajo mi dirección por el Licenciado D. **FRANCISCO JESUS GONZALEZ SANCHEZ** durante los años 1988-1991 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria ha sido revisada por mi y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su dia se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedido el presente en Granada, a 4 de Julio de 1991.

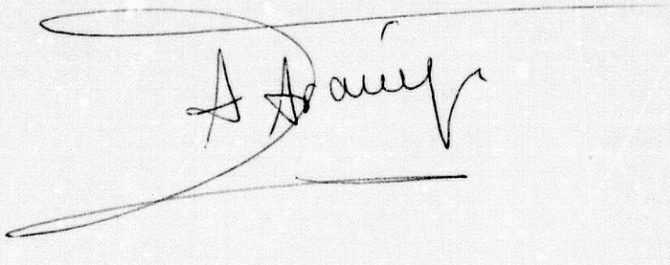
ANTONIA ARANEGA JIMENEZ, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, " **OPTIMIZACION DE LOS CULTIVOS MIOCARDIOCITICOS HUMANOS Y EMBRIONARIOS COMO MODELO EXPERIMENTAL DE INTERACCION FARMACOLOGICA HIPOLIPEMIANTE** ", ha sido realizado bajo mi dirección por el Licenciado D. **FRANCISCO JESUS GONZALEZ SANCHEZ** durante los años 1988-1991 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria ha sido revisada por mi y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su dia se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedido el presente en Granada, a 4 de Julio de 1991.



A mis padres.

A mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar la presente Memoria quiero expresar mi especial agradecimiento a las **Profs. Dra. Antonia Aránega Jimenez** y **Dra Ana Linares Gíl** por sus valiosas enseñanzas y por su constante estímulo y apoyo, los cuales han hecho posible la realización de esta Tesis.

He de hacer constar mi profunda gratitud al **Dr. Luis Alvarez Guisado** Director de la Sección de Investigación Básica Cardiovascular por su apoyo y su gran ejemplo de constancia en el trabajo investigador.

A **Dña. Amelia Aránega Jimenez** y **D. Jose Leiva León**, por su colaboración en la relización de esta Tesis y en especial por su amistad demostrada diariamente.

A todos mis compañeros de la Sección de Investigación Básica Cardiovascular, por su apoyo en el trabajo diario. Especial gratitud para **Tuti** y **Celia** por su amistad y colaboración en la realización del trabajo de laboratorio.

A todo el Personal del Departamento de Ciencias Morfológicas por su amistad y apoyo, en especial, a **Dña. Ascensión Muñoz Gijón** por su colaboración fotográfica.

A todos los Profesores y compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por su constante apoyo; con especial gratitud para **Loli** y **María** por la determinación de las concentraciones proteicas y para **Jesús María** y **Ramón** por su ayuda en la impresión de esta memoria.

No puedo dejar de expresar mi profunda gratitud al Personal del Servicio de Bacteriología del Hospital General de Especialidades " Virgen de las Nieves " de Granada por su amistad y su plena disposición, en especial a los **Doctores Joaquin Mendoza** y **José María Navarro** por su colaboración en la realización de esta Tesis.

A la **Dra. Rosa Sánchez** del Laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario " San Cecilio " de Granada, por su paciencia y ayuda en la lectura densitométrica de los geles.

Al Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital General de Especialidades " Virgen de las Nieves " de Granada, por su colaboración en la obtención de las biopsias quirúrgicas.

Finalmente he de hacer constar mi agradecimiento a todas aquellas personas que aunque no pertenecen al ámbito investigador de la Universidad de Granada, pero que tan importantes como las personas anteriormente citadas, han sido para la realización de esta Tesis; por ello quiero expresar mi más profunda gratitud a todos " mis malagueños ", en especial a **Toñi**, **Juan** y **Antonio** porque siempre me han enseñado lo que es ser amigos. A **Deli** y **Chemi** por su amistad y constante apoyo.

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin 5'-trifosfato
BF	Bezafibrato
DMEM	Medio esencial mínimo modificado por Dubelcco
EDTA	Acido etilén-diamintetiacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FF	Fenofibrato
GF	Gemfibrozilo
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEPES	Acido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanosulfónico
H.H.	Estadio de Hamburger y Hamilton
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
LDL	L poproteína de baja densidad
MEM	Medio esencial mínimo
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Tampón de fosfatos
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sodico
SFT	Suero fetal de ternera
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

INDICE

INDICE..... Pag. 1

I.-INTRODUCCION..... Pag. 12

I.A.- Cultivo de células animales..... Pag. 12
I.A.1.- Definiciones fundamentales para el cultivo de células animales..... Pag. 12
I.A.2.- Evolución histórica de los cultivos de células animales..... Pag. 14
I.A.3.- Condiciones medioambientales y metodología de los cultivos celulares... Pag. 19
I.A.3.1.- Obtención de las células..... Pag. 19
I.A.3.2.- Medios de cultivo..... Pag. 21
I.A.3.3.- Factores de crecimiento..... Pag. 25
I.A.3.4.- Substratos de cultivo..... Pag. 27
I.A.4.- Evolución de las células en cultivo. Pag. 28
I.A.5.- Cultivo de órganos..... Pag. 30
I.A.6.- Aplicaciones de los cultivos celulares..... Pag. 31
I.B.- Importancia y funcionalidad de la célula cardíaca..... Pag. 44
I.C.- Acción directa e indirecta sobre células cardíaca..... Pag. 60
I.D.- Cultivos de células cardíacas..... Pag. 65
I.D.1.- Cultivos de células cardíacas. procedentes de corazones de mamiferos..... Pag. 77
I.D.2.- Cultivos secundarios..... Pag. 84
I.D.3.- Aplicaciones de los cultivos de células cardiacas..... Pag. 87
I.D.4.- Cultivos de células cardíacas humanas..... Pag. 92
I.E.- Fármacos de mayor uso en la terapia de las enfermedades cardiovasculares..... Pag. 93

I.E.1.- Incidencia actual de las enfermedades cardiovasculares..... Pag. 93
I.E.2.- Esquema del metabolismo de lipoproteínas..... Pag. 101
I.E.3.- Tratamiento de la hiperlipemia..... Pag. 107
I.E.3.1.- Tratamiento de la hiperlipemia mediante dieta..... Pag. 107
I.E.3.2.- Tratamiento farmacológico de la hiperlipemia..... Pag. 109
I.E.4 - Métodos de evaluación de los efectos secundarios de los fármacos..... Pag. 125

II.- OBJETIVOS..... Pag. 127

III.- MATERIAL Y METODOS..... Pag. 128

III.A.- MATERIAL..... Pag. 128
III.A.1.- Animales..... Pag. 128
III.A.1.1.- Incubación de los huevos..... Pag. 128
III.A.2.- Biopsias de corazón húmano..... Pag. 128
III.A.3.- Instrumentación..... Pag. 129
III.A.4.- Reactivos..... Pag. 132
III.B.- METODOS..... Pag. 133
III.B.1.- Cultivos celulares..... Pag. 133
III.B.1.1.- Cultivo de células cardíacas procedentes de embrión de pollo..... Pag. 133
III.B.1.1.1.- Aislamiento de células miocardiocardiocíticas..... Pag. 133
III.B.1.1.1.1.- Obtención del embrión..... Pag. 133
III.B.1.1.1.2.- Extracción del corazón..... Pag. 134
III.B.1.1.1.3.- Disgregación del

tejido cardíaco embrionario
y aislamiento celular..... Pag. 134
III.B.1.1.1.3.1.- Métodos físicos Pag. 134
III.B.1.1.1.3.2.- Métodosquímicos Pag. 135
III.B.1.1.1.3.2.1.- Técnica de
tripsina a 37ºC..... Pag. 135
III.B.1.1.1.3.2.2.- Técnica de
tripsina a 4ºC..... Pag. 136
III.B.1.1.1.4.- Determinación de la
densidad celular..... Pag. 137
III.B.1.1.1.5.- Medios de cultivo.. Pag. 138
III.B.1.1.1.5.1.- Preparación de
los medios de cultivo..... Pag. 138
III.B.1.1.1.5.2.- Factores de
crecimiento..... Pag. 139
III.B.1.1.1.6.- Condiciones medio-
ambientales de los cultivos
celulares..... Pag. 140
III.B.1.1.1.7.- Preparación de las
matrizes tridimensionales de
colageno..... Pag. 140
III.B.1.1.1.8.- Mantenimiento del
cultivo..... Pag. 141
III.B.1.1.1.8.1.- Cambio del medio
de cultivo..... Pag. 141
III.B.1.1.1.8.2.- Propagación de
los cultivos celulares..... Pag. 141
III.B.1.1.1.8.3.- Establecimiento
de cultivos secundarios..... Pag. 142
III.B.1.1.1.8.4.- Control de la
esterilidad de los cultivos.. Pag. 143
III.B.1.1.1.9.- Técnica de inmuno-
fluorescencia indirecta en
células en cultivo..... Pag. 143

III.B.1.1.1.9.1.- Preparación de " shell-vial "..... Pag. 143
III.B.1.1.1.9.2.- Técnica de inmunofluorescencia indirecta..... Pag. 143
III.B.1.2.- Cultivos de células cardíacas humanas procedentes de biopsias quirúrgicas de corazón humano..... Pag. 144
III.B.1.2.1.- Extracción del miocardio.... Pag. 144
III.B.1.2.2.- Disgregación del tejido cardíaco humano..... Pag. 145
III.B.1.2.2.1.- Disgregación del tejido mediante solución enzimática a 37 ºC..... Pag. 146
III.B.1.2.2.2.- Disgregación del tejido mediante solución enzimática a 4ºC..... Pag. 146
III.B.1.2.3.- Cultivo de los miocardiocitos humanos..... Pag. 147
III.B.1.2.4.- Técnica de inmunofluorescencia indirecta en cultivo de miocardiocítos humanos adultos..... Pag. 148
III.B.2.- Tratamiento de los cultivos celulares con los fármacos..... Pag. 149
III.B.3.- Procesamiento de las muestras biológicas para la electroforesis en SDS-PAGE..... Pag. 150
III.B.3.1.- Procesamiento de las células miocárdicas en cultivo..... Pag. 150
III.B.3.1.1.- Fraccionamiento subcelular Pag. 151
III.B.3.1.2.- Determinación de la concentración de proteínas en las fracciones subcelulares..... Pag. 152
III.B.3.1.3.- Preparación de las fracciones subcelulares para la electroforesis

en SDS-PAGE..... Pag. 153
III.B.3.2.- Procesamiento de los tejidos cardiacos..... Pag. 153
III.B.3.2.1.- Procesamiento de los tejidos cardíacos de embriones..... Pag. 153
III.B.3.2.2.- Procesamiento del tejido cardíaco humano adulto procedente de biopsias quirúrgicas..... Pag. 154
III.B.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)..... Pag. 155
III.B.4.1.- Preparación de los geles y electroforesis de las muestras proteicas..... Pag. 155
III.B.4.2.- Tinción de geles..... Pag. 157
III.B.4.3.- Conservación de los geles... Pag. 158
III.B.4.4.- Determinación de los pesos moleculares de las bandas proteicas Pag. 158
III.B.5.- Identificación de las bandas proteicas en geles de poliacrilamida por inmunoblotting..... Pag. 159
III.B.5.1.- Inmunoblotting..... Pag. 159
III.B.5.2.- Tinción de proteínas en papel de nitrocelulosa..... Pag. 160
III.B.5.3.- Inmunodetección de proteínas Pag. 161
III.B.6.- Analisis densitométrico de los geles..... Pag. 162
III.B.7.- Analisis estadístico..... Pag. 162

IV.RESULTADOS..... Pag. 163

IV.A. Cultivos celulares..... Pag. 163
IV.A.1. Cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo..... Pag. 163

IV.A.1.1.- Efectos de las modificaciones de las técnicas de cultivo..... Pag. 163
IV.A.1.1.1.- Procesos de disgregación tisular..... Pag. 163
IV.A.1.1.2.- Densidad de siembra..... Pag. 165
IV.A.1.1.3.- Influencia del medio de cultivo en la evolución de la población celular..... Pag. 166
IV.A.1.1.4.- Influencia de los factores de crecimiento en la evolución de la población celular..... Pag. 168
IV.A.1.1.5.- Influencia de los sobrenadantes de cultivos celulares en la evolución de la población celular.. Pag. 170
IV.A.1.1.6.- Morfología de las células en cultivo..... Pag. 172
IV.A.1.1.7.- Influencia de la edad de los embriones en la evolución de los cultivos..... Pag. 178
IV.A.1.1.8.- Control de la esterilidad de los cultivos celulares..... Pag. 179
IV.A.1.1.9.- Inmunofluorescencia indirecta en miocardiocitos de pollo en cultivo..... Pag. 180
IV.A.1.1.9.1.- Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antidesmina..... Pag. 180
IV.A.1.1.9.2.- Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antivimentina..... Pag. 180
IV.A.1.1.10.- Evolución de los cultivos secundarios..... Pag. 181
IV.A.1.1.10.1.- Influencia de los medios de cultivo en el

comportamiento celular..... Pag. 181
IV.A.1.1.10.2.- Morfología celular en los cultivos secundarios..... Pag. 184
IV.A.2.- Cultivos de miocardiocitos adultos humanos..... Pag. 185
IV.A.2.1.- Disgregación tisular..... Pag. 185
IV.A.2.1.1.- Disgregación con solución enzimática a 37ºC..... Pag. 185
IV.A.2.1.2.- Disgregación con solución enzimática a 4ºC..... Pag. 187
IV.A.2.2.- Evolución de la población celular en el tiempo de cultivo.... Pag. 189
IV.A.2.3.- Inmunofluorescencia indirecta en miocardiocitos humanos en cultivo.. Pag. 190
IV.A.2.3.1.- Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antidesmina..... Pag. 190
IV.A.2.3.2.- Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antivimentina..... Pag. 190
IV.B.- Contenido proteico de los miocardiocitos... Pag. 191
IV.B.1.- Contenido proteico de los tejidos cardíacos..... Pag. 191
IV.B.1.1.- Contenido proteico del corazón embrionario de pollo..... Pag. 191
IV.B.1.1.1.- Pesos de los corazones de pollo en el desarrollo embrionario. Pag. 191
IV.B.1.1.2.- Concentración proteica en el tejido cardíaco embrionario de pollo..... Pag. 192
IV.B.1.1.2.1.- Concentración proteica en el homogenado..... Pag. 192
IV.B.1.1.2.2.- Concentración proteica en la fracción citoplasmática..... Pag. 194

IV.B.1.1.2.3.- Concentración proteica en la fracción citoesquelética..... Pag. 195
IV.B.1.1.3.- Composición proteica de desmina y vimentina de las distintas fracciones subcelulares..... Pag. 197
IV.B.1.1.3.1.-Fracción citoplasmática Pag. 197
IV.B.1.1.3.2.-Fracción citoesqueléticaPag. 200
IV.B.1.2.- Contenido proteico del corazón humano adulto..... Pag. 202
IV.B.1.2.1.- Concentración proteica en el tejido cardiaco humano adulto.. Pag. 202
IV.B.1.2.2.- Composición proteica de desmina y vimentina de las distintas fracciones subcelulares..... Pag. 203
IV.B.1.2.2.1.-Fracción citoplasmática Pag. 204
IV.B.1.2.2.2.-Fracción citoesqueléticaPag. 204
IV.B.2.- Contenido proteico de los miocardiocitos en cultivo..... Pag. 205
IV.B.2.1.- Cultivos de los miocardiocitos embrionarios de pollo..... Pag. 205
IV.B.2.1.1.- Concentración proteica de los cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo..... Pag. 205
IV.B.2.1.1.1.- Cultivos de miocardiocitos del estadio XXV H.H..... Pag. 206
IV.B.2.1.1.2.- Cultivos de miocardiocitos del estadio XXIX H.H..... Pag. 207
IV.B.2.1.1.3.- Cultivos de miocardiocitos del estadio XXXIX H.H..... Pag. 209
IV.B.2.1.2.- Composición proteica de las fracciones subcelulares..... Pag. 210
IV.B.2.1.2.1.- Cultivos de miocardiocitos del estadio XXV H.H..... Pag. 210
IV.B.2.1.2.2.- Cultivos de miocardio-

citos del estadio XXIX H.H..... Pag. 213
IV.B.2.1.2.3.- Cultivos de miocardiocitos del estadio XXXIX H.H..... Pag. 216
IV.B.2.2.- Cultivos de los miocardiocitos humanos adultos..... Pag. 219
IV.B.2.2.1.- Concentración proteica de los cultivos de miocardiocitos humanos adultos..... Pag. 219
IV.B.2.2.2.- Composición proteica de las fracciones subcelulares..... Pag. 220
IV.C. Efectos de los fármacos sobre los miocardiocítos en cultivo..... Pag. 223
IV.C.1.- Tratamiento de los cultivos con dosis terapéutica de los fármacos...Pag. 224
IV.C.1.1.- Tratamiento durante 6 horas.. Pag. 224
IV.C.1.1.1.- Concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo tras 6 horas de tratamiento..... Pag. 224
IV.C.1.1.2.- Composición proteica de las fracciones subcelulares tras el tratamiento..... Pag. 226
IV.C.1.2.- Tratamiento durante 24 horas. Pag. 228
IV.C.1.2.1.- Concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo tras 24 horas de tratamiento..... Pag. 228
IV.C.1.2.2.- Composición proteica de las fracciones subcelulares tras el tratamiento..... Pag. 229
IV.C.2.- Tratamiento de los cultivos con dosis tóxica de los fármacos..... Pag 231
IV.C.2.1.- Concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo tras 24 horas de tratamiento..... Pag. 231
IV.C.2.2.- Composición proteica de las

fracciones subcelulares tras el tratamiento..... Pag. 233

IV.D.- Resultado del inmunoblotting con los anticuerpos monoclonales antidesmina y antivimentina..... Pag. 235

IV.E.- Tablas..... Pag. 236
IV.F.- Gráficas..... Pag. 292
IV.G.- Figuras..... Pag. 316

V.DISCUSION..... Pag. 331

V.A.- Cultivos de células animales..... Pag. 331
V.A.1.- Cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo..... Pag. 331
V.A.2.- Cultivos de miocardiocitos humanos adultos..... Pag. 351
V.B.- Contenido en Filamentos Intermedios de los miocardiocitos..... Pag. 360
V.B.1.- Contenido de Filamentos Intermedios en el tejido cardíaco..... Pag. 363
V.B.1.1.- Tejido cardíaco de embrión de pollo..... Pag. 363
V.B.1.2.- Tejido cardíaco humano adulto Pag. 375
V.B.2.- Contenido de Filamentos Intermedios de los miocardiocitos en cultivo.. Pag. 376
V.B.2.1.- Contenido de los Filamentos Intermedios de los miocardiocitos embrionarios de pollo en cultivo. Pag. 377
V.B.2.2.- Contenido de Filamentos Intermedios de los miocardiocitos humanos adultos en cultivo..... Pag. 382
V.C. Influencia de los derivados del ácido fíbrico en los filamentos intermedios de los

miocardiocitos en cultivo..... Pag. 385

VI. CONCLUSIONES..... Pag. 398

VII. BIBLIOGRAFIA..... Pag. 400

INTRODUCCION

I INTRODUCCION

I.A. Cultivos de células animales

I.A.1. Definiciones fundamentales para el cultivo de células animales.

Cultivo de órgano: el mantenimiento ó crecimiento de un órgano entero ó parte de un órgano fuera del organismo de tal modo que pueda permitir la diferenciación y preservación de la arquitectura y/ó función del órgano.

Cultivo de tejido: el mantenimiento ó crecimiento de un tejido fuera del organismo, de tal modo que pueda permitir la diferenciación y preservación de la arquitectura y/ó función del tejido.

Cultivo celular: el mantenimiento ó crecimiento fuera del organismo de células no organizadas en tejidos, pero capaces de dividirse y de experimentar metabolismo y funciones específicas "in vitro".

Explante: tejido cogido desde su sitio original y transferido para el crecimiento hasta un medio artificial.

Cultivo de explante: el mantenimiento ó crecimiento de un explante en cultivo.

Cultivo en suspensión: un tipo de cultivo en el cual las células se multiplican mientras están suspendidas en el medio.

Cultivo en monocapa: un tipo de cultivo en el cual las células se multiplican adheridas a la superficie del cultivo, estando en

contacto unas con otras de tal manera que ocupan toda la superficie de cultivo.

Pase: la transferencia de células desde un frasco de cultivo a otro ú otros diferentes. Este termino es sinonimo con el termino "subcultivo".

Número de pases: número de veces que el cultivo ha sido transferido.

Cultivo primario: cultivo derivado de células, tejidos ú órganos puestos directamente a partir del organismo.

Cultivo secundario: cultivo derivado de un cultivo primario por medio de un primer pase.

Línea celular: derivada de un cultivo primario desde el momento del primer pase; si el estado de la línea es conocido se puede llamar contínua o establecida (estado contínuo) ó de vida limitada (estado finito).

Línea celular finita: Un cultivo el cual ha sido propagado en subcultivos pero sólo es capaz de un número limitado de generaciones "in vitro" antes de morir.

Línea celular continua: Línea celular que tiene la capacidad de supervivencia infinita. Previamente conocida como "establecida" y después referida como "inmortal".

Número de generaciones: El número de veces que se ha doblado la población tras la realización de los correspondientes pases. Necesariamente contiene un número celular aproximado al de la generación en los cultivos primarios.

Clon celular: población de células derivadas de una sola célula por división.

Medio de cultivo: una mezcla de sales inorganicas y otros nutrientes capaces de mantener vivas células "in vitro" durante veinticuatro horas.

Medio de crecimiento: es aquel medio que es usado en el cultivo de rutina para aumentar el número de células en cultivo con el tiempo.

Medio de mantenimiento: el medio que mantiene las células vivas en cultivo pero sin crecimiento.

Medio quimicamente definido: una solución nutritiva para el cultivo de células en el cual cada componente es de estructura quimica conocida.

Solución salina tamponada: Una solución isotónica de sales inorganicas presente en aproximadamente las mismas concentraciones fisiológicas. Pueden también contener glucosa pero normalmente están libre de otros nutrientes orgáanicos.

Aséptico: Libre de contaminación microbiana.

*Estas definiciones derivan de las presentadas por el Comite de Terminología de la Asociación Americana de cultivo de tejidos (TCA Manual,1978; Schaeffer,1984).

I.A.2. Evolución histórica de los cultivos de células animales

En el estudio de la evolución historica de los cultivos de células animales, un primer periodo corresponde a los precursores de estos cultivos y abarca desde los últimos años

del siglo pasado hasta gran parte de la primera década del presente siglo; un segundo periodo es el de los cultivos de tejidos que empieza en 1907 con las experiencias de HARRISON (Harrison,1907) y acaba en el año 1952 con el comienzo del periodo de los cultivos celulares.

Las primeras experiencias en cultivos de tejidos fueron realizadas en 1885 por WILHELM ROUX (Roux,1885), el cual a partir de técnicas embriológicas, fue el primero en mantener con vida,fuera del organismo de origen, durante algunos días médula de embrión de pollo en una solución salina a una temperatura cercana a la fisiológica. Dos años más tarde, ARNOLD (Arnold,1887) implantando pequeños fragmentos de médula de animales, observó que dichos fragmentos eran invadidos por leucocitos y que dichas células sanguíneas emigraban y supervivían durante periodos cortos de tiempos al ser pasados a otros recipientes con suero salino a una temperatura cercana a la del organismo de origen; estas experiencias fueron desarrolladas posteriormente (Jolly,1903) lograndose mantener leucocitos vivos en suspensión durante un mes.

El periodo de los cultivos de tejidos que se desarrolla a principios de la centuria, aprovecha las experiencias anteriormente realizadas y los diferentes investigadores intentan lograr un método para poder estudiar el comportamiento de las células animales libres evitando las posibles variaciones que se pueden presentar en las células en el organismo vivo, al producirse el experimento. Este periodo se inicia en 1907 con las experiencias de HARRISON, el cual desarrolló las primeras técnicas de explantes primarios utilizando tejido nervioso de rana no disgregado y el crecimiento celular estaba limitado a la emigración de dichas células alrededor de los fragmentos de tejidos. Estas técnicas de explantes primarios de fragmentos frescos de tejidos desde el organismo hasta las superficies de cultivo, fue la técnica dominadora en el cultivo de tejidos hasta mediados de siglo y aún

hoy en día es utilizada.

En este periodo destaca la figura de ALEXIS CARREL (1912,1913), el cual dirigió sus experiencias al mejoramiento de las técnicas de obtención de tejidos y a poder evitar uno de los mayores problemas al comienzo de los cultivos de tejidos, como era el problema de la contaminación bacteriana de los cultivos, para ellos elaboró una seria de reglas asépticas para la realización de los cultivos; más tarde profundizó en el estudio de las necesidades nutricionales de las células en cultivo realizadas por otros autores (Lewis,1911) e identificó algunos factores estimulantes. Como resultado del gran número de técnicas desarrolladas por este autor, logró mantener con éxito células en cultivo por grandes periodos de tiempo, así como la multiplicación de dichas células "in vitro", en unos medios de cultivo con ausencia total de antibioticos. Aunque las experiencias de CARREL demostraron que las células animales podian crecer indefinidamente "in vitro", la meticulosidad de las técnicas utilizadas, sobre todo para evitar la contaminación bacteriana, hizo pensar a muchos investigadores que la metodología necesaria para el cultivo de tejidos era muy dificil y solo alcanzable por escasos laboratorics, esta idea permaneció en el mundo científico hasta mediados de siglo.

En este periodo se avanzó bastante en los conocimientos sobre embriogénesis y endocrinología por medio de los cultivos de tejidos llevados a cabo en un principio por HARRISON (1912) y continuados por THOMSON (1914) con la intención de mantener en cultivo pequeños fragmentos de tejidos, por el mayor tiempo posible y sin deteriorarse. A medida que aumentaban el número de trabajos y se perfeccionaban las técnicas se potenciaba el valor de esta metodología como herramienta de trabajo para mejorar los conocimientos en algunas disciplinas como la morfógenesis y la virología; así en 1928 MAITLAND Y MAITLAND cultivando fragmentos de tejidos en suspensión, mostraron que el virus de la polio podia ser cultivado "in vitro"

en ausencia de tejido nervioso.

Los trabajos de CARREL condujeron a las primeras experiencias del periodo de los cultivos celulares, las cuales se produjeron en 1933 cuando GEY logró hacer crecer en suspensión diversas células tumorales cultivadas en tubos que giraban a gran velocidad; después otros autores contribuyeron al avanze de la metodología de aislamiento celular (Earle y col.,1943), pero para la gran mayoria de autores es clásico considerar el comienzo del periodo de los cultivos celulares en 1952 con la introducción de la tripsinización de tejidos para el aislamiento célular por MOSCONA, el cual utilizando esbozos de miembros de embriones de pollos logró aislar las células para su posterior cultivo en suspensión. A partir de las experiencias de MOSCONA, la mayoría de las técnicas básicas de esterilización, manipulación aséptica, aislamiento celular y demás condiciones de cultivo sólo están sujetas a pequeñas modificaciones, para adaptarlo a las pecularíedades de los diferentes tipos celulares; así muchos autores se dedicaron a mejorar las condiciones de cultivo, modificando la composición de los medios de cultivo y adaptándolos a las necesidades nutritivas de las células (Eagle,1955a; Eagle,1955b;Griffith y Pirt,1967). Posteriormente, la comercialización de los medios y sueros para el cultivo, y una mejora del equipamiento para poder trabajar en condiciones de esterilidad evitando la contaminación por microorganismos, hizo que la tecnología de cultivo fuera accesible a un gran número de laboratorios, aumentando en un gran porcentaje el número de experiencias realizadas con cultivos celulares.

Una vez que fueron establecidas las condiciones del aislamiento y mantenimiento de las células en cultivo, se realizaron numerosas investigaciones enfocadas al estudio del funcionamiento celular y el comportamiento de dichas células ante los cambios producidos en el medio ambiente donde vive. Se ha podido estudiar la actividad intracelular que abarca al metabolismo celular, movimientos de metabolitos, traslocación de

receptores de membrana, etc. (Spector y col.,1981); estudios de las interacciones de las células con las superficies de cultivo o con otras células cercanas, cinética del crecimiento celular y el comportamiento celular ante estímulos externos como la agresión por microorganismos, tóxicos. fármacos, etc. (Sutherland y col.,1977;McCarthy y De Vellis,1980).

A partir de la década de los sesenta empezaron a realizarse diversas manipulaciones en las células que dieron lugar a técnicas como las de fusión celular (Barski y col.,1960;Littlefield,1964;Harris y Watkins,1965) y como consecuencia de ellas las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein,1975), cuya utilización han proporcionado gran información acerca de los mecanismos básicos del funcionamiento celular, así el comportamiento antigénico de los diferentes componentes celulares, identificación de la ultraestructura celular y otros muchos aspectos celulares han sido clarificados mediante el uso de los anticuerpos monoclonales (Sun y Green,1978). La manipulación genética de las células ha permitido el conocimiento de procesos tal como la transcripción o las estructuras de los epítopos, aplicandose dicha manipulación para la obtención de líneas celulares a partir de células normales o la producción de compuestos como pueden ser hormonas humanas o interferón (Rosztóczy,1989).

La tecnología de cultivos ha llegado a ser en la actualidad de aplicación cotidiana en clínica e investigación sanitaria, así como a nivel industrial. Análisis de cromosomas para el diagnóstico de enfermedades hereditarias a partir de líquido amniótico, diagnóstico cualitativo y cuantitativo de enfermedades virales ó de los efectos de tóxicos, son realizados en células en cultivo. En el futuro los estudios sobre diagnóstico precoz en cancerología y virología pueden ser desarrollados mediante la utilización de estas técnicas, al igual que se han utilizado a lo largo de los años de investigacion sobre tumores experimentando un gran avance gracias a esta

metodología (Sykes y col.,1970; Horibata y Harris,1970). A nivel industrial la utilización de los cultivos para los ensayos de fármaco toxicidad son de gran utilidad y mediante la manipulación genética se podrán insertar los genes apropiados a las células humanas normales para poder obtener líneas celulares que sean capaces de producir fármacos que puedan ser utilizados en terapéutica, de igual manera que hoy en día se obtienen a partir de manipulación con microorganismos.

El avance de esta tecnología de cultivos celulares también permitirá la solución de diferentes problemas biomédicos, tales como la reparación de las lesiones epidérmicas mediante la utilización de células que crecen en cultivo (Green y col.,1979), la formación de pequeños capilares a partir de células endoteliales cultivadas (Folkman y Haudenschild,1980) o la reconstrucción de heridas por la reparación del tejido dañado mediante el uso de estas células que crecen "in vitro".

I.A.3. Condiciones medioambientales y metodología de los cultivos celulares

La tecnología aplicada a los cultivos de células animales "in vitro" intentan reproducir, en lo posible, las condiciones medioambientales en las cuales se desarrollan las células en los organismos vivos.

I.A.3.1. Obtención de las células

En los organismos vivos nos podemos encontrar dos tipos de células, unas que se encuentran libres, en suspensión en los diferentes fluídos biológicos (sobre todo las células

sanguíneas y las que forman parte de los diversos líquidos secretados por el organismo), y otro tipo de células que se encuentran adheridas estrechamente unas a otras formando los distintos tejidos del organismo. Las células que se encuentran en suspensión en los fluidos biológicos se pueden aislar mediante diferentes lavados con un tampón fisiológico y posterior centrifugación diferencial, obteniéndose en el botón del centrifugado las diferentes células aisladas. Las células que se encuentran formando tejidos organizados son más dificiles de obtener y requieren técnicas especializadas, pudiendose dividir su metodología de obtención en métodos físicos y métodos químicos.

Los métodos físicos son los primeros en utilizarse para el aislamiento celular a partir de los diferentes tejidos. La disección es el método físico más utilizado, el cual mediante el uso de pinzas y tijeras reduce el tejido a pequeños fragmentos que son suspendidos en un poco de medio de cultivo; posteriormente aprovechando la capacidad migratoria de las células se produce el aislamiento celular (Jensen y col.,1964). Si el tejido de origen es blando, se puede obtener las células mediante el rozamiento que producen los pequeños trozos de tejidos, suspendidos en medio de cultivo, al ser aspirados y expulsados sucesivamente a través de pipetas de pequeño diámetro de grosor o por el interior de agujas ,con ayuda de su correspondiente jeringa (Zaroff y col.,1961).

Los métodos químicos se basan en el uso de enzimas proteolíticos, los cuales producen la ruptura de las diferentes proteínas que mantienen atrapadas a las células dentro de los tejidos. La primera enzima en ser utilizada y las más utilizada en la actualidad es la tripsina, que aunque fue observada su acción proteolítica anteriormente (Rous y Jones,1911), hasta la experiencia realizada por MOSCONA (1952) no se generalizó su uso para el aislamiento de las células tisulares. Para el proceso de tripsinización los tejidos una vez fragmentados en pequeños

trozos, son suspendidos en un tampón salino que contiene el enzíma disuelto y mediante la agitación mecánica por fracciones de tiempo sucesivos se obtiene una suspensión celular; posteriormente por la adicción de medio de cultivo con suero, se inhibe la acción enzimatica (Fernandes,1958).

Otros procesos enzimáticos pueden ser utilizados, así para aislar las células a partir de tejidos ricos en colágeno, como el tejido conectivo o el muscular, se utiliza como enzíma proteolítico la colagenasa (Lasfargues,1973); la elastasa y una amplia serie de proteasas bacterianas pueden ser utilizadas para la disgregación tisular (Gwatkin,1973;Matumura y col.,1975), incluso se puede usar la combinación de varios enzimas para la digestión enzimática del tejido (Dartsch y col.,1990).

I.A.3.2. Medios de cultivo

Mediante el uso de los medios de cultivo se intenta reproducir las condiciones medio ambientales en que se desarrollan las células en los organismos vivos; los medios de cultivo además de aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento de todas las funciones celulares, contribuye a mantener las constantes fisico-químicas del medio ambiente celular "in vitro".

Los primeros medios de cultivo empleados para el cultivo de células de animales fueron diferentes fluídos biológicos naturales, tal como el plasma o el líquido de ascitis, utilizándose también extractos de embriones y mezclas de diversos fluídos biologicos y extractos (Cavanaugh,1955). Una segunda generación de medios de cultivo está marcada por el uso de soluciones salinas suplementadas por diversas sustancias energéticas como la glucosa, vitaminas,etc. (Carrel,1912); posteriormente otros autores profundizaron en el estudio de los

iones imprescindibles en los medios de cultivo, los cuales juegan un papel fundamental para el mantenimiento de la presión osmótica, transporte a través de las membranas y en el metabolismo, los iones que constituyen la base de la mayoría de las soluciones salinas utilizadas en los cultivos de células animales son: sodio,potasio, calcio, magnesio, fosfato, carbonato y cloro (Earle,1943;Hanks,1948). Todas las investigaciones llevadas a cabo en la primera mitad del presente siglo condujeron a que en 1948, FISCHER describiera el medio V605 considerado como el medio sintético más antiguo; a partir de este momento los medios utilizados serán sintéticos y generalmente llevan el nombre del autor que ha diseñado su composición.

Los medios sintéticos deben de conservar las propiedades fisico-químicas de los fluidos biológicos, debiendo poseer un pH óptimo que está comprendido entre 7,2-7,4 (pH sanguíneo), aunque puede variar según el tipo celular en cultivo entre los valores 7,0 y 7,8 de pH; las variaciones de pH son controladas al llevar los medios de cultivo en su composición un indicador de pH, siendo el más utilizado el rojo fenol que vira de violeta a amarillo al pasar de pH básicos a pH ácidos. Para intentar mantener el pH óptimo, los medios contienen un sistema tampón siendo los más utilizados el bicarbonato y el HEPES.

El ambiente gaseoso donde crecen las células "in vitro" está constituido por una mezcla de anhídrido carbonico (CO_2), oxígeno, nitrogeno y vapor de agua. La concentración de nitrogeno y oxígeno es normalmente igual a la del aire ambiental, por ello la atmósfera regulada en las estufas de cultivo está normalmente constituida por el 5% de CO_2 y el 95% de aire. Cuando se utiliza como tampón el bicarbonato, éste debe estar en equilibrio con el porcentaje de CO_2 existente en la atmósfera de cultivo, ya que el CO_2 formado en los medios de cultivo puede escapar de él aumentando el pH del medio y en caso de que el CO_2 atmosférico se disuelva en el medio o por producción de CO_2

endógeno por las células en cultivo pueden llevar el pH del medio hasta valores más ácidos (Freshney,1988).

La osmoloridad de los medios de cultivo debe de estar controlada para que las células no sufran daño debido a cambios bruscos de la presión osmótica, por ello los valores de osmoloridad del medio de cultivo deben de estar comprendidos entre 260 miliOsmolar/Kgr y 320 miliOsmolar/Kgr (Waymouth,1970). Para evitar el aumento de la osmoloridad del medio, por aumento de la evaporación del agua, la atmosfera de cultivo debe de estar saturada de vapor de agua.

La viscosidad del medio de cultivo está influída principalmente por el contenido de suero, pudiendo tener un pequeño efecto sobre el crecimiento celular sobre todo cuando las células crecen en suspensión; el daño celular debido a una baja viscosidad se puede evitar mediante la introducción en el medio de agentes químicos sintéticos que aumentan la viscosidad.

La temperatura del medio de cultivo debe ser lo más cercana a la corporal del animal de origen, siendo la idónea de 36,5±0,5°C; las variaciones de temperatura aparte de influir en el crecimiento celular, pueden influir sobre el pH al aumentar la solubilidad del CO_2 cuando baja la temperatura.

La base de la composición de los medios de cultivo es una disolución salina isotónica de diferentes sales inorgánicas, siendo los iones Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-} y HCO^{3-} los más abundantes, normalmente se reduce la concentración de Ca^{2+} cuando el cultivo va a ser en monocapa, ya que el Ca^{2+} reduce la agregación y adherencia celular en cultivo (Eagle,1959). Las disoluciones salinas más usadas son la disolución salina tamponada de fosfato (PBS "phosphate-buffered saline") (Dubelcco y Vogt,1954), la disolución salina balanceada de Earle (EBSS "balanced saline solution") (Earle y col.,1943) y la disolución salina balanceada de Hanks (HBSS "Hanks's buffered

saline solution") (Hanks y Wallace,1949); estas disoluciones además de servir como diluyentes de los diversos componentes del medio de cultivo, son utilizadas también como disoluciones de lavado, de disección y de digestión enzímatica cuando contienen las enzimas.

La composición de los medios de cultivo definidos varian en la complejidad de sus componenetes desde medios sencillos como el medio esencial mínimo de Eagle (MEM "minimum essential medium") (Eagle,1959) hasta otros más complejos como el F12 (Ham,1965) o el RPMI 1640 (Moore y col.,1967); la complejidad del medio aumenta al añadir nuevos componentes o al variar las proporciones de los nutrientes con respecto a la concentración de los medios básicos,como ocurre en el caso de unos de los medios de cultivo más utilizados, el medio esencial minimo de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM "Dulbecco's modification of Eagle's minimum essential medium") (Dulbecco y Freeman,1959).

Los medios definidos además de los iones componentes de las disoluciones salinas base de los medios de cultivo, pueden contener pequeñas trazas de minerales que contienen hierro, cobre, cobalto y zinc principalmente (Ham y McKeehan,1978). La mayoría de los medios de cultivo llevan glucosa como fuente de energía, generalmente utilizada a una concentración de 1 gramo/litro, pudiendo ser sustituida por otros hidratos de carbono; la glucosa es metabolizada fundamentalmente por glucolísis hasta piruvato el cual se puede convertir en lactato o acetacetato y entrar en el ciclo del ácido cítrico hasta formar CO^2 y obteniéndose gran cantidad de energia, almacenada en metabolitos ricos en energía como el ATP.

Los medios de cultivo deben de tener en su composición una serie de aminoácidos esenciales los cuales no pueden ser sintetizados "in vitro" por las células y que juegan un papel fundamental en el mantenimiento del funcionamiento celular, interviniendo en la síntesis proteica, regulando los

sistemas enzimáticos y la síntesis de DNA y RNA; siendo esencial la presencia de glutamina y una serie de doce aminoácidos más para la supervivencia de las células en cultivo (Eagle,1955). Las vitaminas necesarias en cada medio de cultivo varian con el tipo de células en cultivo, desempeñando un papel de cofactores en las reacciones que componen el metabolismo celular.

La mayoría de los medios de cultivo, para prevenir la contaminación bacteriana, suelen llevar una serie de antibióticos en su composición capaces de combatir la posible presencia de microorganismos. La concentración de estos antibióticos no debe ser muy elevada ya que podrían dañar a las células y además deben de poseer un margen de actuación, utilizandose un antibiótico con que actue sobre bacterias Gram positivas, otro dirigido contra bacterias Gram negativas y un antifúngico que suele ser la anfotericina B. Algunos autores suelen utilizar medios que están libres de antibióticos, debiendose extremar las medidas de esterilidad en los procesos de manipulación de las células .

I.A.3.3. Factores de crecimiento

Los constituyentes fundamentales de los medios de cultivo citados anteriormente, dependiendo de las necesidades celulares, pueden ser suplementados por una serie de componentes que enriquecen la composición del medio de cultivo. Se puede suplementar el medio con diversas sustancias de composición cualitativa y cuantitativa conocida como pueden ser proteínas de transporte como la transferrina, una serie de hormonas siendo la más utilizada la insulina que además de promover la utilización de la glucosa y de aminoácidos, puede tener un cierto poder mitógeno en algunas células (Freshney,1988), la hidrocortisona, progesterona y la hormona del crecimiento también son utilizadas (McLean y col.,1986). Pero sobre todo, es importante la

utilización de diversos factores de crecimiento y diferentes sueros para suplementar los medios de cultivo.

Los factores de crecimiento son sustancias que participan en todas las etapas de la fisiología celular y tisular, tanto en los procesos de embriogénesis como en la etapa adulta de la vida, participando también en procesos patológicos como el cancer o la aterosclerosis. Estas sustancias son añadidas a los medios de cultivo para mejorar las características de los cultivos , pues intervienen en los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia por largos periodos de tiempo de las células en cultivo. Las principales características que definen a un factor de crecimiento son las siguientes: a) la mayoría de su estructura es de naturaleza polipeptídica, b) al interaccionar con su receptor específico que se encuentra en la membrana plasmática celular forma un complejo factor de crecimiento-receptor específico que desencadena una respuesta celular, c) la célula responde ante el estímulo producido por el complejo factor de crecimiento-receptor específico con una respuesta hipertrófica (aumento del tamaño celular) y/o hiperplasica (aumento de la población celular) o bien induce todos los procesos de la diferenciación celular, y d) el factor de crecimiento y su receptor específico son eliminados de la superficie de la membrana plasmática celular por un proceso de endocitosis (James y Bradshaw,1984).

Los principales factores de crecimiento que son más utilizados en la actualidad como mitógenos de las células en cultivo, son: el factor de crecimiento epidermico (EGF "epidermal growth factor"), los factores de crecimiento semejante a la insulina (IGF "insulin-like growth factor"), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF "platelet-derived growth factor"), factores de crecimiento fibroblástico (FGF "fibroblast growth factors"), factor de crecimiento nervioso (NGF "nerve growth factor") y los factores de crecimiento transformante (TGF "transforming growth factors") (Courtois y Noureux-Uhlrich,1988).

La simple presencia de los medios sintéticos básicos definidos descritos anteriormente, no son suficiente para que la mayoría de las células sobrevivan y se desarrollen en cultivo. La mayoría de las células requieren que el medio de cultivo donde se siembran esté suplementado por sueros en cuya composición hay una gran variedad de componentes que van a influir en la funcionalidad celular. La composición del suero es compleja, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, y puede afectar a la morfología celular o a procesos como la capacidad de adherencia a las superficies de cultivo, la capacidad proliferativa, la diferenciación o la transformación celular. Los sueros utilizados pueden ser de origen animal o humano, siendo el más frecuente el suero fetal de ternera (FCS "fetal calf serum"), el suero fetal bovino (FBS "fetal bovine serum"), el suero de caballo y el suero humano; el porcentaje de suero utilizado varía desde el 2-20% dependiendo del tipo celular (Froger y Adolphe,1988). El porcentaje del suero en los medios de cultivo puede ser disminuido ú omitido, por la sustitución del suero por una combinación de hormonas y factores nutricionales a la cual se adaptan algunas células en cultivo (Sato y col.,1982).

I.A.3.4. Substratos de cultivo

Las células en cultivo pueden crecer en suspensión o adheridas a diversas superficies artificiales que forman los frascos de cultivo celular; la naturaleza de la superficie de cultivo en un principio era el vidrio, pero posteriormente y en la actualidad ha sido sustituida por las superficies de naturaleza plástica de policarbonatos ó polivinilo, a veces recubiertas de una matrices tridimensionales formadas por colágeno o nitrato de celulosa, que favorecen el crecimiento celular (Lillie y col.,1980;Savage y Bonney,1978).

I.A.4. Evolución de las células en cultivo

La evolución de las células en los cultivos es estudiada en función de dos propiedades fundamentales de las células: su capacidad proliferativa y sus funciones diferenciadas, estas dos propiedades van a evolucionar a lo largo del tiempo de cultivo de una manera muy diversa dependiendo del tipo de célula y de las técnicas de cultivo empleadas.

Las células aisladas de los tejidos por métodos enzimáticos o mecánicos son sembradas en los medios de cultivo obteniéndose los cultivos primarios (Paul,1975), en estos se pueden obtener además de las células especializadas del tejido, otras células pertenecientes a otros tejidos como el tejido conectivo o células sanguíneas; la evolución posterior de estos tipos celulares es muy variada, la mayoría tiene una vida media muy corta , como en el caso de la mayoría de células sanguíneas que mueren y desaparecen del cultivo a los dos o tres días, otras como las células nerviosas pueden permanecer en el cultivo durante meses sin dividirse, pero la mayoría de las células conservan en cultivo, en la mayoría de los casos, la capacidad de división que poseen "in vivo". El tiempo que tarda en aparecer esta capacidad proliferativa en cultivo depende del tipo celular y de la edad del tejido del cual se han aislado las células.

Algunas células, sobre todo las embrionarias, tienen la capacidad de dividirse en cultivo y continúan haciendolo durante algún tiempo, llegando posteriormente a morir después de un periodo variable de tiempo; pero algunos tipos celulares son capaces de proliferar, pudiendose estimular esta proliferación con diversos factores de crecimiento, aumentando la población celular hasta que las células llegan a ser confluentes formando una monocapa, en ese momento si las células no son transferidas (pasadas) a un medio fresco con división del número de células existentes en los subcultivos, se inhibe su

crecimiento por contacto con otras células cercanas y la población celular empieza a disminuir. Después del primer pase obtenemos los cultivos secundarios, empezando una línea celular que puede seguir creciendo y propagándose por pases sucesivos, obteniéndose cada vez una población celular más homogénea y que puede dar lugar a una línea celular finita con un número de generaciones limitada y definida, parandose el crecimiento después de la última generación (Lima y Maciera-Coelho,1972); pero algunas células son capaces de ser cultivadas por periodos prolongados de tiempo y aparentemente parecen haber adquirido la propiedad de proliferar en cultivo indefinidamente, cuando este tipo de células que forman una línea celular, han sido pasadas un mínimo de setenta veces en intervalos de tres días entre los pases, se les denomina línea celular estable (Paul,1975).

La transición de las células desde una línea celular primaria a una línea celular estable, en algunos casos es gradual y progresiva, pero otras veces ocurre mediante una alteración celular que se conoce con el nombre de transformación, en el cual las células sufren modificaciones morfológicas y cinéticas, apareciendo unas células con unas propiedades asociadas con las transformaciones malignas que sufren los tumores, apareciendo también modificaciones genéticas.

Las células que forman las líneas celulares primarias conservan las propiedades de las células que forman el tejido de origen, pero a lo largo de los sucesivos pases durante el tiempo en cultivo las células pueden sufrir el fenómeno de desdiferenciación mediante el cual las células pueden perder de una manera irreversible algunas de sus propiedades específicas (Monard y col.,1973). Normalmente la obtención de cultivos con células diferenciadas que puedan mantener sus funciones diferenciadas por largos periódos de tiempo es dificil, se deben utilizar medios de cultivos condicionados por células del mismo tipo celular o de diferente tipo celular (Gordon y Brice,1974); actualmente se utiliza factores de crecimiento específicos para

mantener las células con funciones diferenciadas durante largos periodos de tiempo en cultivo.

I.A.5. Cultivo de órganos

Los cultivos de organos son muy utilizados desde el inicio de la presente centuria tanto para estudios de investigación básica, como para investigacion aplicada. En investigación básica se han utilizado en estudios embriológicos orientados a requerir información sobre la organogénesis (Grobstein, 1953; Cooper, 1965; Mochón, 1986), intentando los distintos autores repetir el camino seguido por el órgano "in vivo" durante su desarrollo. Estos estudios se han realizado por medio del mantenimiento y posterior crecimiento con desarrollo del órgano "in vitro". También se han utilizado para investigaciones básicas relacionadas con los procesos fisiológicos que ocurren en el organismo como puede ser los procesos de inflamación (Pellerin y Col.,1986); en Toxicología se han realizado estudios de la evolución de la toxicidad de diferentes tóxicos en órganos en cultivo (Barrach y col., 1980), así como el estudio de la biocompatibilidad de ciertos materiales que posteriormente serán utilizados para prótesis interna en el cuerpo humano (Sigot-Luizard y col., 1981).

En la última década los cultivos de órganos se han utilizado para estudiar la transformación de células normales en células tumorales a través de la inducción por diferentes sustancias (Michiels y col., 1981) y en el estudio de la invasión de las células tumorales de los órganos en cultivo (Mareel y col., 1985).

Así pues, un órgano ó explante mantenidos en cultivo nos proporciona un modelo experimental que puede ser aplicado para el estudio de la evolución e interacciones de los

diferentes constituyentes tisulares que lo forman, proporcionandonos un modelo experimental intermedio entre los ensayos que se realizan " in vivo " (los cuales son prolongados en el tiempo y muy costosos) y la utilización de los cultivos celulares. El inconveniente es no poder representar todos los componentes tisulares que forman el órgano completo, ni las posibles interacciones entre dichos componentes.

I.A.6. Aplicaciones de los cultivos celulares

Desde las primeras experiencias significativas sobre cultivos célulares realizadas por MOSCONA (1952) hasta el principio de la década de los setenta, el avance en el desarrollo de las técnicas de cultivo ha sido lento pero progresivo. Durante las dos últimas décadas la puesta a punto de los cultivos celulares, en especial los de células animales, han experimentado un gran avance en el conocimiento y perfeccionamiento de su tecnología, así como en las aplicaciones de dichos cultivos a un gran número de campos científicos.

Desde el inicio del desarrollo de las técnicas de cultivo, éstos han sido utilizados para el mejor conocimiento de la biología celular, ya que la célula por sí sola es la menor unidad de vida existente en un organismo vivo; una gran cantidad de conocimientos se han obtenido en las investigaciones encaminadas hacia dos puntos esenciales en el ciclo de vida celular, como son : la división y la diferenciación celular.

Los cultivos celulares han permitido profundizar en el conocimiento de los pasos que tienen lugar en el ciclo de la división celular, de los procesos bioquímicos implicados, los factores que pueden alterarlo y los procesos genéticos que lo controlan. La utilización de células embrionarias ó de células malignas procedentes de tumores, con gran capacidad de adaptación

y de crecimiento en los frascos de cultivo, han permitido el desarrollo de los estudios enfocados hacia los procesos implicados en la diferenciación y del fenómeno acoplado a ella como es la transformación celular.

La metodología de cultivos celulares ha supuesto una ayuda fundamental para el conocimiento de la biología celular, pudiendose profundizar en el conocimiento de la composición y disposición espacial de los componentes celulares, así como de los mecanismos que rigen y desarrollan la función celular.

Se han utilizado los cultivos celulares para un mejor conocimiento de la morfología ultraestructural de los diferentes componentes celulares, llevandose a cabo mediante técnicas de microscopía electrónica tanto de barrido (Brunk y col., 1981), como de transmisión (Picard y col.,1974; Reynond, 1982), lo cual nos permite un grado de resolución inferior al nanometro, teniendo pues acceso a los niveles moleculares de la organización celular. Otros parámetros celulares como el volumen ó el tamaño han sido determinados utilizando la citometría de flujo (Muirhead y Horan, 1984), pero esta técnica también ha sido utilizada para poder conocer otros parámetros celulares como pueden ser el contenido en proteínas, ADN ó ARN (Shapiro, 1981; Crissman, 1981), estudio de diferentes antigenos de superficie, así como los antigenos que se encuentran en el citoplasma e incluso de aquellos que están localizados en el núcleo (Bohn, 1980; Ramaekers y col.,1984;, Clevenger, 1985), estudios sobre los mecanismos básicos del funcionamiento celular como puede ser la actividad mitocondrial (Benel y col., 1980) ó los procesos de fagocitosis-endocitosis (Murphy y col., 1982; Metezeau y col., 1984).

Algunos de los estudios anteriores ha sido posible perfeccionarlos mediante el uso de la citometría de flujo de barrido y el analisis de imagen en la citometría de flujo de

barrido (Tanke y col., 1983), utilizandose con una aplicacion clínica enfocada hacia el diagnóstico de las diferentes citopatologías (Seigneurin, 1985; Mayall, 1986); también se han utilizado para la identificación de las diferentes poblaciones celulares por medio de la detección y medida de diferentes marcadores en células individualizadas (Keyhani-Rofagha, 1984).

Se han realizado estudios de la actividad eléctrica de las células, sobre todo los cultivos de células nerviosas que han sido utilizados para diferentes investigaciones electrofisiológicas enfocadas principalmente al estudio de los potenciales de membrana, observándose en estos casos la actividad eléctrica de las neuronas en cultivo (Calvet, 1974), aunque también existen estudios de dicha actividad eléctrica de las células en cultivo provenientes de otros tejidos del organismo distinto del nervioso (Larno y col., 1985).

Los cultivos de células animales han proporcionado una gran herramienta para intentar clarificar todos los procesos genéticos relacionados con las células, tales como los procesos de identificación del genoma celular, fenómenos de diferenciación y de transformación celular. Para la identificación de las células en cultivo de diferentes especies se han utilizado técnicas basadas en el contenido cromosómico de las diferentes especies animales y en la realización de un cariotipo celular, lo cual nos dará una imagen cromosómica completa de la célula (Lin y col., 1974; Worton y Duff, 1979); la combinación de las dos técnicas anteriores puede ser suficiente para confirmar o excluir una línea celular determinada ó para determinar la contaminación celular por otras células diferentes en un cultivo de una línea celular concreta. El contenido celular en ADN y ARN también ha sido determinado por diferentes técnicas a partir de líneas celulares en cultivo (Labarca y Paigen, 1980; Morasca y Etba, 1986).

La introducción de técnicas de biología molecular

en el estudio de la genética, en principio de los microorganismos y posteriormente de las células animales en cultivo (Graham y col.,1974; Wigler y col., 1977), han permitido en la última década el estudio de la variación fenotípica celular cuando ocurre la diferenciación celular ó cuando a partir del conocimiento de la existencia de los oncogenes se puede conseguir la transformación de las células dando lugar a lineas celulares inmortales.

En su gran mayoría las células aisladas en cultivo de los individuos genéticamente definidos, conservan en cultivo las propiedades del individuo de origen, pero en la práctica pueden aparecer variantes o mutantes celulares a lo largo de generaciones sucesivas de cultivos; estas mutaciones celulares se pueden obtener al azar utilizando una línea celular la cual posee una alta capacidad de mutación (Fukuchi y col., 1985) ó se puede inducir la mutación artificialmente utilizando diferentes métodos, desde los métodos físicos como las radiaciones gamma (Grosovsky y col.,1986) ó métodos químicos usando diferentes compuestos de naturaleza química que pueden variar desde sustancias integrantes de los diferentes componentes fisiológicos del organismo inductores de la diferenciación celular como pueden ser la insulina ó el ácido retinoico (Stockdale y Topper, 1986; Klann y Marchok, 1982), también se pueden utilizar otras sustancias químicas que pueden actuar como inductores de la diferenciación y que no son parte de los componentes fisiológicos del organismo, como el butirato sódico ó las benzodiazepinas (Chung y co 1985; Clarke y Ryan, 1980).

Las técnicas anteriores tienen el incoveniente que la actuación de los rayos ó componentes químicos es al azar , en gran parte de las experiencias se pueden afectar a unos genes que son distintos de los que nos interesa actuar, obteniéndose una gran variedad de mutantes que será necesario aislar y clonar. Para evitar en lo posible los inconvenientes anteriormente

expuestos, se han desarrollado en los últimos años técnicas de clonaje de genes, de mutagénesis dirigida y de transfección de ADN mediante la utilización de vectores como los virus (Abrahams y Van der Eb, 1975) ó mediante microinyección del ADN en células de mamíferos en cultivo (Watson y col., 1986), permitiendonos introducir genes identificados y la obtención de mutantes dirigidos.

La mayoría de las células animales en cultivo tienen una vida finita que comprende entre veinte a cien generaciones, pero hay algunas células procedentes de roedores y sobre todo las células malignas procedentes de tumores que tienen las mismas características que las células transformadas " in vivo "(Saule y col., 1987) ó " in vitro " (Connanetal, 1985), dentro de esas características destaca la inmortalidad de dichas células, las cuales pueden dar lugar a una línea célular continua con una vida infinita. Estas líneas celulares continuas nos han proporcionado una buena herramienta para poder estudiar " in vitro " todos los procesos genéticos relacionados con las células tumorales y por tanto con el cancer, desarrollandose en los ultimos años un gran despliegue en el estudio molecular de los oncogenes, la regulación de su expresión y las consecuencias de su activación en experiencias realizadas en cultivos de células animales (Niles y Makarski, 1978;Shimizu y col., 1983; Folkman, 1986). Además de los estudios relacionados con la malignidad de las células tumorales, estas células también son utilizadas para el mejor conocimiento de otros procesos fisiológicos como pueden ser la síntesis de la hemoglobina (Friend y col., 1971), la quimiosensibilidad y los mecanismos de resistencia de dichas células a diferentes sustancias químicas (Guner y col., 1977) ó para la producción de anticuerpos monoclonales mediante la formación de células híbridas con linfocitos procedentes de animales previamente inmunizados con diferentes antigenos (Fernandez y col.,1989).

Las técnicas inmunológicas desarrolladas en los

ultimos años han sido aplicadas a los cultivos de células animales para un mejor conocimiento de los procesos inmunológicos, así como para un mejor conocimiento de las moléculas que forman la célula ó el estudio de las moléculas solubles secretadas por las células inmunes y que están implicadas en los mecanismos de defensa. Esta metodología ha sido aplicada para el estudio de los antígenos de membrana en las células en cultivo, dichos antígenos están implicados en los mecanismos de citotoxicidad mediados por el complemento (Mittal, 1977) , para el estudio de los antígenos de los grupos sanguíneos y para el tipaje de los antígenos de histocompatibilidad (Couillin, 1980), lo cual es de gran importancia en los transplantes de órganos. También se han aplicado diferentes técnicas inmunológicas, en las cuales se utilizan anticuerpos marcados dirigidos hacia el analisis y caracterización de las diversas moléculas que forman parte de los antigenos de la superficie, del citoplasma ó del núcleo celular (Gonatas y Avrameas, 1973).

Los cultivos de células implicadas en la defensa del organismo han servido para conocer aspectos inmunológicos, viendo por ejemplo los mecanismos de defensa contra las infecciones por microorganismos (Chang y col.,1989). Las técnicas de fusión celular para producir hibridomas capaces de sintetizar y secretar al medio anticuerpos monoclonales, son muy utilizados hoy en día en la separación y purificación de las poblaciones celulares; esto ha supuesto una gran ayuda para el inmunodiagnóstico precoz de las patologías vegetales producidas por virus y parásitos, así como su amplio uso en las técnicas utilizadas en el campo de la salud (Buesa y col., 1990).

La Bioquímica ha sido una de las disciplinas científicas que más han utilizado los cultivos célulares para llevar a cabo sus investigaciones, así, con técnicas de Biología Molecular en los cultivos se han realizado estudios de los genes

implicados en la biosíntesis de ciertos metabolitos (Berta y col., 1986), estudios del genoma celular y los resultados de sus posibles manipulaciones en los procesos bioquímicos (Maitland y McDougall, 1977). También se han realizado estudios para la caracterización de las diferentes moléculas que forman parte del mecanismo fisiológico del organismo, así se han utilizado cultivos de hematíes para la cuantificación y estudio de los diferentes variedades de hemoglobina (Clarke y col., 1982), cultivos de fibroblastos han sido utilizados para el estudio del flujo ionico intracelular (Tsien y Poenie, 1986, y es una herramienta de trabajo muy recurrida para el estudio de la actividad enzimática (Sano y col., 1983).

Pero sobre todos los aspectos bioquímicos, en uno de los que más eco ha encontrado las técnicas de cultivo ha sido en la aplicación al estudio del metabolismo; empezando por el estudio de la biosíntesis de las diversas moleculas estructurales que forman el organismo como son algunas proteínas estructurales (Gibson y col., 1982) o sustancias que tienen una gran importancia para la regulación del funcionamiento del organismo como las prostaglandinas (Ardaillou y Col., 1983). El camino seguido en las rutas metabólicas por las diferentes sustancias puede ser seguido en cultivo mediante la utilización de precursores marcados, así se puede seguir el metabolismo de degradación de los diferentes metabolitos (Ibrahim y col., 1982), los componentes subcelulares implicados en la actividad metabólica o estudiar el papel que jugaría un efector que afectara a la actividad metabólica desarrollada en la célula (Moolenar y col., 1984).

Dentro del metabolismo un apartado especial, es el metabolismo lipídico, por la gran importancia en la dieta en las enfermedades cardiovasculares. Los cultivos celulares se han utilizado mucho en el estudio del metabolismo lipídico y su aprovechamiento ha sido dirigido hacia un mejor conocimiento de los mecanismos básicos bioquímicos de utilización de los lípidos

por las células, la ruta seguida para el metabolismo lipídico y su regulación, la variación en los diferentes tipos de células en cultivo y una aplicación especial de toda esta metodología enfocada hacia la investigación básica y clínica de la patología relacionada con el metabolismo lipídico (Howard y Howard, 1974).

La investigación básica ha estado dirigida hacia el conocimiento de la utilización de los lípidos por las células, biosíntesis de los diferentes lípidos, lipoproteínas y sustancias relacionadas, papel de los lípidos en las membranas celulares, estudio de las modificaciones que puedan ejercer ciertos activadores ó inhibidores del metabolismo lipídico y el estudio de las posibles modificaciones en la composición lipídica celular (Brenneman y Spector, 1974; Beirne y col., 1977). Un interés especial tiene la investigación básica dirigida hacia una mejor compremsión del metabolismo del colesterol y la patología acoplada a los fallos de su regulación.

En el área de la salud, los cultivos celulares son cada día más utilizados en todos los campos. Se utilizan para investigación básica en busca de los fundamentos de las diferentes patologías, así mediante la expresión por las células en cultivo de las características de las enfermedades y la reproducción por dichas células de los mecanismos que "in vivo" dan lugar a las patologías del organismo. Hoy en día los cultivos celulares son fundamentales para el diagnóstico de ciertas enfermedades, así como para las investigaciones farmacológicas y toxicológicas, tomando cada vez más importancia en la producción de fármacos y reactivos utilizados para el tratamiento y diagnóstico de las enfermedades.

Los cultivos celulares han sido de gran utilidad para el conocimiento del cancer debido a la gran facilidad de las células tumorales para crecer "in vitro" y la obtención de líneas celulares contínuas, pudiendose profundizar en las bases

moleculares que hacen que las células se transformen de células normales en células malignas y los mecanismos implicados en la metástasis (Mareel, 1984); también se utilizan para el estudio de las bases fisiopatológicas de otras enfermedades como pueden ser las afecciones reumáticas, utilizandose para ello cultivos de condriocítos a partir de biopsias patológicas ó bien mediante la reproducción "in vitro" de la patología, obteniéndose mediante la acción de las interleukinas sobre los cultivos de condriocítos normales en caso de reuma inflamatoria ó sobre cultivos de condriocítos envejecidos para el estudio de enfermedades reumáticas degenerativas (Pujol y col., 1984). Entre otras muchas patologías variadas estudiadas, se pueden encontrar la de los estudios relacionados con las afecciones de los vasos sanguíneos (Dartsch y col.,1990), el estudio de las bases de las infecciones del organismo producidas por diferentes microorganismos patógenos ó por parásitos (Mazier y col.,1985).

La metodología de los cultivos celulares, ha sido fundamental para el desarrollo de la virología pues le ha proporcionado un medio para poder reproducir los procesos de infección de los virus sobre sus células diana (Theze y col., 1987), sin peligro alguno para los posibles enfermos, para poder comprender las respuestas inmunológicas de defensa frente a la agresión externa del virus, profundizar en el peso específico que juega el germen vírico en los procesos de transformación celular que ocurren en la carcinogénesis (Macpherson y Montagnier, 1964) ó para el estudio de los mecanismos a través de los cuales actúa y desarrolla su actividad el virus causante del síndrome de inmunodefeciencia adquirida, una de las enfermedades más temidas por la sociedad actual (Agarwal y col., 1989).

Una de las grandes aplicaciones de los cultivos es el uso de estas técnicas para el diagnóstico de diferentes enfermedades; se han utilizado los cultivos de células procedentes del líquido amniotico para el estudio cromosómico,

enzimático y del DNA para un posterior diagnóstico de enfermedades hereditarias y malformaciones en el feto , también el cultivo de células procedentes de biopsias de embriones han servido para el diagnóstico prenatal de anomalías bioquímicas relacionadas con el metabolismo y la aplicación de las técnicas de Biología Molecular a estas células en cultivo han permitido el diagnóstico de ciertas hemoglobinopatías ó de enfermedades hereditarias como la hemofilia (Goossens y col., 1985). En las enfermedades neoplásicas son también un buen método para el pronóstico de los diferentes estados preneoplásicos, así como para el diagnóstico e identificación de los diferentes tipos ó grados dentro de una misma enfermedad como puede ser la leucemia (Francis y Wing, 1983); siendo una metodología de uso cotidiano en los laboratorios de Virología para el diagnóstico de las diferentes patologías víricas que se dan en el hombre (Mendoza y Col.,1988,1989;Pahwa y col.,1989).

La industria farmacéutica es uno de los sectores que más uso ha hecho y hace en la actualidad, de la metodología de cultivos celulares para la investigación y desarrollo de los fármacos. A mediados de la década de los cincuenta, en el comienzo del desarrollo de las técnicas de cultivos celulares, una de las primeras disciplinas científicas que utilizó esta metodología fue la farmacotoxicología; la primera experiencia científica de la acción de medicamentos sobre células en cultivo fueron realizadas por EAGLE y FOLEY, los cuales observarón los efectos citotóxicos que desarrollaban ciertos fármacos al ser incorporados a los medios de cultivo de las células (Eagle y Foley, 1956). A partir de entonces ha ido creciendo el uso de los cultivos para el desarrollo de la investigación tanto en Farmacología, como en Toxicología; enfocadas estas investigaciones en dos direcciones principales: la toxicidad celular y los mecanismos de acción de los medicamentos.

La legislación existente de los países occidentales requiere un extenso estudio de la toxicidad de

fármacos, cosméticos,aditivos alimentarios y otros productos de consumo antes de su puesta en el mercado; estos estudios normalmente han sido realizados en animales, lo cual acarrea un elevado costo económico así como una gran presión de algunos sectores de la sociedad por cuestiones de moralidad, convirtiendose los cultivos celulares como una alternativa razonable para evitar en lo posible los problemas anteriormente expuestos.

La gran mayoría de los métodos desarrollados "in vitro" para evaluar la toxicidad celular están basados en la alteración de la viabilidad, del crecimiento, de la diferenciación ó del metabolismo celular, llegándose a la determinación de la llamada dosis inhibitoria 50 que es la equivalente a la clásica dosis letal 50 empleada en las experiencias de toxicología "in vivo" llevada a cabo con animales (Freshney y col., 1982).

Los cultivos celulares han sido utilizados para evaluar la posible citotoxicidad de un variado grupo de sustancias (fármacos, aditivos alimentarios, contaminantes ambientales, etc.), estudios de la penetración y actuación de los tóxicos e investigaciones sobre los efectos de la exposición crónica de las células a dosis bajas de tóxicos entre otros usos. Especial interés tienen las investigaciones de citotoxicidad realizados a los fármacos anticancerígenos, en este apartado los cultivos celulares proporcionan una herramienta para poder medir la sensibilidad de las células tumorales (sembradas a partir de una biopsia del enfermo) a los posibles agentes químicos que podrían ser utilizados para la quimioterapia y poder utilizar " in vivo " sobre el enfermo la quimioterapia adecuada (Dendy, 1976).

También es importante la evaluación de la mutagénesis y carcinogénesis que podrían tener ciertos fármacos al estar en contacto con las células que componen los diferentes

tejidos del enfermo; hoy en día es considerado como un buen testigo de lo que pueda ocurrir " in vivo ", los ensayos de transformación maligna ó estabilidad de las células humanas en cultivo usadas como células dianas ante la acción de los agentes químicos utilizados en la terapia del cancer (Styles, 1977).

La Farmacodinamia ha sido otras de las disciplinas científicas más beneficiadas por el desarrollo de los cultivos celulares y es una de las que más utilidad le dá a esta tecnología, los cultivos han sido utilizados y son utilizados para las investigaciones en todos los apartados que abarca la farmacodinamia, así en lo que se refiere a los mecanismos de acción de los medicamentos, se han realizado estudios desde la caracterización de las estructuras de los fármacos y la relación de dicha estructura con la actividad desarrollada por el fármaco (Gourdji y col., 1982;Serrano y col.,1987), hasta poder reproducir "in vitro" procesos fisiológicos que puedan ser afectados por diferentes drogas como es la fagocitosis , procesos fisiopatológicos en los cuales hay una implicación celular como en la inflamación (Adolphe, 1986) ó estudios de los mecanismos de acción de cierta fármacos antimicrobianos (De Simone y col.,1989). También se pueden adaptar los cultivos para el estudio de las comunicaciones intercelulares, tento mediante la implicación de mensajeros ó sin ellos, lo cual podría implicar la regulación de la secreción de ciertos mensajeros por células que podrían formar parte de las glándulas secretoras (Brunet y col., 1983). Gran importancia ha tenido en la investigacion de los fármacos utilizados en el tratamiento de las patologías derivadas de alteraciones del metabolismo, resultando fundamental su uso para el conocimiento de los mecanismos de acción y para el descubrimiento de nuevas sustancias que puedan corregir estas anomalías patológicas; así en las patologías relacionadas con alteraciones del metabolismo lipídico, una de las de mayor extensión en la población y de gran coste social en su tratamiento, ha sido muy utilizados los cultivos celulares desde el inicio de esta tecnología, enfocados dichos estudios hacia la

determinación de los mecanismos de acción de ciertos fármacos sobre el metabolismo celular y hacia la obtención de inhibidores específicos del metabolismo lipídico que puedan ser utilizados a posteriori para la terapia de las diferentes patologías relacionadas con los lípidos (Bergeron, 1971).

Los cultivos celulares también tienen aplicación para la evaluación de los fenómenos de sinergismo entre diferentes fármacos, utilizando la combinación de diferentes fármacos conjuntamente y observando los efectos resultantes sobre las células en cultivo (Montefiori y col., 1989).

Como hemos visto anteriormente los cultivos celulares tienen una gran importancia en los estudios desarrollados por la farmacotoxicología para el screening de los efectos secundarios tóxicos de los agentes quimioterapeúticos, siendo una alternativa cada día con más ventaja sobre los ensayos " in vivo " en animales; son utilizados en el screening de las sustancias que forman parte de los preparados oftalmológicos que van a estar en contacto con una estructura muy delicada como es la cornea, se han realizado estudios en cultivos de células corneales de los mecanismos de acción y toxicidad de los productos farmacológicos utilizados como cicatrizantes, antiinflamatorios ó antimicrobianos; pero también estos cultivos de células corneales han servido de base para la investigación de la citotoxicidad de compuestos ó artilugios utilizados en parafarmacia, como pueden ser las lentes de contacto (Hecquet y col., 1987).

En los países desarrollados cada día están ocupando un lugar más destacado la aplicación de las nuevas biotecnologías en la producción industrial, así se está haciendo uso de la Biofarmacia a nivel industrial para a partir de cultivos de células animales producir sustancias que puedan tener una actividad terapéutica o para el diagnóstico de las enfermedades. En la actualidad, se está produciendo a nivel

industrial gran cantidad de sustancias utilizadas en la quimioterapia de alteraciones fisiopatológicas (factores de crecimiento, hormonas, interferón ,etc.), la producción a nivel industrial de gran cantidad de células en cultivo que son utilizadas para el ensayo de toxicidad de los diferentes fármacos ó de los nuevos fármacos antes de su puesta en el mercado (Berger y col., 1984) y la tecnología de cultivo de hibridomas ha proporcionado una gran herramienta para la producción a gran escala de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia una actividad específica, siendo de uso diario en los laboratorios clínicos como componentes de los test de diagnóstico de diferentes enfermedades (Mendoza y col.,1991).

La investigación en Biofarmacia industrial sigue desarrollandose para la producción de fármacos, de reactivos para el diagnóstico, de vacunas que pueden ser utilizadas para la inmunización en grandes poblaciones contra enfermedades infecciosas de gran incidencia como la hepatitis (Perez y Col., 1988) y nos deja abierta una puerta a la esperanza en la victoria sobre el cancer mediante la producción de sustancias obtenidas a partir de cultivos celulares que se ha demostrado " in vitro " que juegan un papel protector ante el ataque de células malignas a las células normales del organismo (Bergman y col., 1986) ó la producción de anticuerpos monoclonales que actúen como verdaderos misiles capaces de transportar los fármacos dirigidas solamente hacia sus células dianas malignas, evitandose mediante esta metodología sus efectos adversos.

I.B. Importancia y funcionalidad de la célula cardíaca

El sistema cardiovascular tiene como labor fundamental la de llevar(transportar) la sangre con oxígeno y nutrientes a los diferentes tejidos del organismo y transportar para su posterior eliminación, los productos de desecho del

metabolismo de los tejidos a los órganos excretores.

El sistema cardiovascular está compuesto de dos partes principales: el corazón y los vasos sanguíneos. El corazón sirve de motor para movilizar la sangre y los vasos sanguíneos conducen la sangre desde el corazón a los diferentes tejidos y biceversa. Los vasos sanguíneos se dividen en arterias que distribuyen la sangre que parte del corazón, venas que son las encargadas de recoger la sangre de los tejidos, la cual transporta los productos de deshecho del metabolismo celular y lo devuelven al corazón y capilares que facilitan el intercambio de las diferentes sustancias entre la sangre y los tejidos. Todos los componentes que forman el sistema cardiovascular están intimamente unidos desde el punto de vista funcional (Fuster,1982).

La función del corazón es de impulsor de la sangre: arterial procedentes de los pulmones a los tejidos periféricos y venosa procedente de los tejidos periféricos hacia los pulmones, así pues el corazón actúa como motor de la circulación sanguínea.

El corazón consta de cuatro cavidades cardíacas, dos aurículas y dos ventrículos; las aurículas ("atria") que se caracterizan por que se comunican cada una con el ventrículo correspondiente a su lado, la aurícula izquierda con el ventrículo izquierdo y la aurícula derecha con el ventrículo derecho, a través de su orificio auriculoventricular correspondiente, pero ni las aurículas, ni los ventrículos, se comunican entre sí en el organismo adulto. Por otra parte las aurículas poseen unas prolongaciones ventrales llamadas orejuelas (Orts LLorca,1986).

La pared cardíaca está compuesta de una capa externa o epicardio, una capa media muscular o miocardio que abarca la mayor parte del espesor de la pared cardíaca y una capa

interna que reviste la luz de las distintas cavidades, que se denomina endocardio. La capa media muscular cardíaca está formada por tres tipos principales de músculo: músculo ventricular, músculo auricular y un sistema de células especializadas en la excitación y la conducción del impuso eléctrico para la contracción secuencial del músculo cardíaco, este último se denomina sistema de conducción de los estímulos (fibras de Purkinje) (Purkinje,1845; Sommer y Johnson,1979).

Los miocitos, también denominadas fibras miocárdicas, son las células musculares que forman el miocardio, morfológicamente existen diferencias de tamaño dependiendo de la parte anatómica del corazón de donde proceden, así los miocitos ventriculares tienen una longitud entre 50 y 100 µm, los miocitos auriculares tienen una longitud cercana a las 20 µm y los pertenecientes al sistema de conducción (fibras de Purkinje) son mucho mayores que los anteriores y su longitud oscila entre las 150-200 µm. El caracter morfológico que presentan los diferentes miocitos también varia de unos a otros, mientras que el miocito ventricular presenta una forma alargada y delgada con un diámetro entre 10-15 µm, el miocito auricular presenta una forma elíptica de 5-6 µm de diámetro y el miocito perteneciente a las fibras de Purkinje tiene una forma alargada y ancha con un diámetro que oscila entre 35 y 40 µm (Braunwald,1990). Los miocitos cardíacos o miocardiocitos adyacentes en el músculo están estrechamente conectados entre sí por sus extremos, la conexión se reliza mediante una porción de la membrana plasmática o sarcolema que se denomina disco intercalado, el cual presenta una debil resistencia a la transmisión de la actividad eléctrica entre los miocardiocitos (Sommer y Waugh,1976).

De todas las estructuras subcelulares que forman parte de la célula, son las fibrillas o miofibrillas las que representan casi la mitad del volumen celular (50% en el caso de la rata)(Schaper y col.,1985), el citoplasma de estas células, denominado sarcoplasma, representa el 12% del volumen celular,

el núcleo representa el 5%. El reticulo sarcoplásmico que es el encargado de liberar y almacenar calcio durante el ciclo de la contracción, en el miocito de rata neonata representa el 33%, mientras que en el adulto sólo representa el 2% del volumen; si el porcentaje que representa el sarcolema es muy bajo, no así el porcentaje del volumen total celular que representan las mitocondrias que oscila entre el 16% para la rata neonata y el 33% para la adulta(David y col.,1979), este alto contenido de mitocondrias es debido a la elevada y continua actividad de estas células que necesitan gran cantidad de ATP para la contracción, suministrado principalmente por las mitocondrias.

El sarcoplasma de los miocitos cardíacos o miocardiocitos está ocupado por numerosas miofibrillas dispuestas longitudinalmente, paralelas al eje de contracción, que presentan un aspecto estriado al ser observadas al microscopio óptico y que están parcialmente separadas por inclusiones citoplasmáticas. Estas miofibrillas que son de naturaleza proteica forman el citoesqueleto celular y son las encargadas de darle soporte y movimiento a la célula.

Las miofibrillas están formadas por unas unidades estructurales o sarcómeros iguales que tienen una longitud que oscila entre 1,6 y 2,2 µm, repitiéndose regularmente de una forma ordenada, de tal manera que los sarcómeros de las miofibrillas adyacentes están alineados, dando a la célula una apariencia estriada (Forbes y Sperelakis,1984). Al analizar cada sarcómero individualmente, se puede observar una serie de bandas claras y oscuras alternando, la banda oscura que ocupa el centro del sarcómero recibe el nombre de banda A (banda anisotrópica o birrefringente que rota la luz polarizada), la cual tiene una longitud aproximada de 1,5 µ; la banda clara es más delgada, de longitud variable y recibe el nombre de banda I (banda isotrópica). En el centro de la banda A existe una región clara denominada zona H que está divida en dos partes por la linea M compuesta de varias proteínas de diversa naturaleza. La línea

oscura situada en el centro de la banda I se denomina línea Z o banda Z, ésta linea Z separa un sarcómero del siguiente; así pues cada sarcómero está comprendido entre dos lineas Z adyacentes (Offer,1974).

Las estriaciones transversales observadas en la célula cardíaca son debidas a la disposición de los componentes del sarcómero , cada sarcómero contiene dos grupos de filamentos proteicos paralelos y parcialmente superpuestos: los filamentos delgados y los filamentos gruesos. Ambos filamentos forman parte del aparato contráctil de la célula y no varian su longitud al pasar del estado de contracción al de reposo y biceversa (Warber y Potter,1986).

Los filamentos delgados de una longitud aproximada de 1 µm y un diámetro de 55 nm (Malhotra y col.,1981), se extienden desde la linea Z a lo largo de la banda I hasta llegar a la banda A en donde se extienden parcialmente, siendo en la banda A en la zona en donde se superponen los filamentos delgados y los filamentos gruesos, mientras que la banda I sólo se encuentran los filamentos delgados; la zona H de la banda oscura A sólo contiene filamentos gruesos.

El compuesto que forma mayoritariamente los filamentos delgados es una proteína de peso molecular 42.000 daltons y que recibe el nombre de actina; los filamentos delgados están constituidos por dos cadenas de actina enrrolladas entre si en una hélice de giro a derechas, estas cadenas de actina contienen ATP o ADP fuertemente unido (Stossel,1989), el ATP se hidroliza durante los procesos de polimerización de las cadenas de actina. Aproximadamente un 10% de la composición de los filamentos delgados lo ocupan dos proteínas contráctiles la troponina y la tropomiosina (Sato y col.,1983) que son las encargadas de regular la contracción.La tropomiosina es una proteína alargada de 70.000 daltons de peso molecular, compuesta de dos subunidades idénticas de 35.000 daltons de peso molecular,

las cuales se enrollan entre sí formando la hélice del dímero; la tropomiosina se dispone a lo largo de los surcos formados por la hélice de actina y le confiere rigidez al eje central de actina del filamento delgado. Unidos a la tropomiosina y en lugares específicos se encuentra la troponina que es una proteína contráctil formada por tres subunidades polipeptídicas: la troponina T (37.000 daltons de peso molecular), troponina I (24.000 daltons de peso molecular) y troponina C (18.000 daltons de peso molecular) (Swynghedauw,1986); la troponina T tiene un centro de unión para la tropomiosina y sirve para que las otras subunidades se unan al complejo actina-tropomiosina, la troponina I actúa inhibiendo la actividad ATPasa del complejo actina-miosina, como veremos posteriormente, y la proteína C que se une al Ca^{++} produciendose la desaparición de la inhibición de la actividad ATPasa del complejo actina-miosina (Dhoot y Perry,1980;Lini y col.,1986).

Los filamentos gruesos tienen una longitud de 1,5 µm y un diámetro aproximado de 15 nm, se extienden desde un extremo al otro de la banda A y están compuestos principalmente por moléculas proteicas de miosina (Page,1974). La miosina que se encuentra en casi todas las células de vertebrados, tiene un peso molecular de 500.000 daltons; está formada por seis subunidades polipeptídicas: dos cadenas pesadas de 200.000 daltons de peso molecular y dos pares de cadenas ligeras, con un peso molecular de 20.000 y 16.000 daltons cada una de las cadenas (Hoh y col.,1978). Las cadenas pesadas de la miosina están divididas en dos dominios con diferentes propiedades estructurales y funcionales, así el dominio correspondiente al extremo carbono terminal son hélices α enrolladas entre sí formando la cola del filamento grueso, el dominio del extremo amino terminal de cada cadena pesada, junto con un par de cadenas ligeras distintas, forma una de las dos cabezas globulares las cuales se orientan hacia el extremo de la banda A más cercano del filamento delgado, llegando a unirse con ellos cuando el músculo se activa (Murphy,1983).

La molécula de miosina por sí sola puede actuar como un enzima con actividad ATPasa (capaz de hidrolizar al ATP), pero la miosina como molécula purificada presenta una actividad ATPasa baja; al unirse con la actina de los filamentos delgados la velocidad de la reacción de hidrólisis del ATP se ve incrementada 200 veces, originandose una energia que es utilizada para la específica contracción muscular (Darnell y col.,1988). Durante el estado de reposo, una de las cabezas de la miosina está formando un angulo de 90° con el filamento de actina, cuando la cabeza de miosina llega a contactar con la actina se inicia el proceso de contracción produciendose la liberación del ADP y del fósforo inorganico (productos de la hidrolisis del ATP) unidos a la cabeza de miosina produciendose una energia que es utilizada para cambiar la conformación de la cabeza de miosina forzandola a formar un angulo de 45° con la actina, empujando al filamento de actina hacia el centro de la banda A del sarcómero. En el siguiente paso una molecula de ATP se une a la cabeza de la miosina provocando la separación del filamento de actina y se produce una hidrólisis del ATP que libera una energía que es utilizada por la cabeza de la miosina para volver a su posición normal de reposo (Alberts y col.,1986).

Durante la contracción se ha observado que tanto los filamentos delgados, como los gruesos, no modifican su tamaño; esto es debido a que en el proceso de contracción muscular los filamentos gruesos y delgados se deslizan unos sobre los otros, no alterándose la longitud de los mismos(Huxley,1969), se cree que las cabezas de miosina "andan" a lo largo del filamento cercano de actina. Para iniciar la contracción muscular las proteínas contráctiles actina y miosina, en presencia de ATP y Mg^{++}, interaccionan y se activan por completo; sin embargo las proteínas tropomiosina y troponina pertenecientes a los filamentos delgados, inhibe la formación de puentes o uniones cruzadas entre las cabezas de miosina y la actina inhibiéndose la contracción muscular(Perry,1979).

Las proteínas tropomiosina y troponina actúan como reguladoras de la contracción celular, esta actividad reguladora depende de la presencia de niveles específicos de ión Ca^{++} adecuados en el interior de la célula (Langer,1984). En estado de reposo la tropomiosina bloquea estéricamente los sitios activos de la actina que pueden interaccionar transversalmente con las cabezas de miosina, al aumentar los niveles de Ca^{++} éste se une a la troponina C, se inhibe la unión de la troponina I con la actina, produciendose un cambio en la conformación de la tropomiosina alterando ligeramente su posición y su desplazamiento deja libre los centros activos de unión entre la miosina y la actina produciendose las interacciones intercatenarias y posterior desarrollo de la contracción; la posterior liberación sucesiva de Ca^{++} de la troponina produce que la tropomiosina bloquee la interacción entre la miosina y la actina y se produce la relajación (Taylor y Amos,1981).

Aunque, como hemos visto anteriormente, la actina y la miosina son las proteínas principales que intervienen en la contracción muscular, no son los únicos componentes de las miofibrillas; existen unas proteínas musculares accesorias que desempeñan un papel fundamental para que ocurra la contracción de una manera ordenada, entre estas proteínas se encuentran la tropomiosina y la troponina encargadas de regular la contracción y una serie de proteínas denominadas filamentos intermedios que desempeñan un papel estructural asegurando el mantenimiento del conveniente alineamiento de las estructuras celulares durante el ciclo de contracción-relajación de la célula muscular.

Los filamentos intermedios son polímeros de polipéptidos fibrosos , con asociaciones laterales entre las diferentes cadenas polipeptídicas, formando una estructura filamentosa en forma de soga de gran resistencia a la tracción,que se encuentra en el sistema filamentoso citoplasmático de la gran mayoría de células eucarióticas, principalmente localizados en las zonas celulares sometidas a una

tensión mecánica y que desempeñan un papel estructural o mecánico en la célula. Son los componentes más estables del citoesqueleto celular y los componentes menos solubles de la célula, están compuestos de polipéptidos de muy diversos tamaños que varian en los diferentes tipos celulares y entre las diferentes especies animales dentro del mismo tipo celular (Eriksson y Thornell,1979).

En la década de los cincuenta fueron observados los filamentos intermedios en el citoplasma de células cardíacas en los primeros estudios de microscopia electrónica(Caesar y col.,1958), pero no fue hasta finales de la década de los sesenta cuando fueron considerados como una unidad con entidad propia en células musculares (Ishikawa y col.,1968); se les denominó "filamentos intermedios" debido a estudios de microscopía electrónica en que se observó el diámetro característico de estos filamentos comprendido entre 8 y 12 nm, intermedio entre los diámetros de los filamentos gruesos de miosina(15 nm) y microtubulos (25 nm), y los filamentos delgados de actina (6 nm) (Osborn y Weber,1986).

Aunque los filamentos intermedios presentan similitud morfológica, las subunidades proteicas que los componen difieren en sus características bioquímicas, lo que las hacen diferenciarse en terminos de pesos moleculares, punto isoeléctrico y antigenicidad. Basándose en criterios inmunológicos de los filamentos intermedios, LAZARIDES en 1980 hizo una clasificación , que perdura hoy en día, dividiendolos en cinco tipos: filamentos de queratina o tonofilamentos que se encuentran en las células epiteliales o células de origen epitelial, la desmina que se encuentra en las células musculares, la vimentina en células mesenquimales o de origen mesenquimal y que se ha observado que en células musculares está estrechamente relacionada con la desmina, los neurofilamentos encontrados en las neuronas y los filamentos de las células gliales (proteína acidógena fibrilar glial) (Bignani y col.,1980).

Si estudiamos la estructura de las cadenas polipeptídicas de las proteínas que componen los diversos filamentos intermedios existentes, observamos que poseen zonas estructurales comunes; todos contienen una región central en hélice α que comprende de 300 a 330 aminoácidos que es muy semejante para las diversas proteínas de filamentos intermedios y unas regiones no en hélice α en los extremos carboxi y amino terminal que presentan gran variabilidad entre las diferentes proteínas que forman los filamentos intermedios de las diversas células (Steiner y col.,1985). Todos las proteínas que forman los filamentos intermedios se ha observado que son tetraméricas, salvo las proteínas que forman los filamentos intermedios de las neuronas, que probablemente en un principio se enrollan de dos (estabilizadas por las interacciones entre las regiones centrales de las cadenas polipeptídicas) y a continuación se forma una subunidad o protofilamento formado por el tetrámero enrollado (Quinlan y col.,1984;Cohlberg y col.,1987). Se han desarrollado estudios "in vivo" e "in vitro" dirigidos al estudio de la unión y desunión de las subunidades que forman los filamentos intermedios (Celis y col.,1983;Inagaki y col.,1987), observándose que en condiciones iónicas fisiológicas los protofilamentos se unen espontáneamente formando unos filamentos de 10 nm de ancho que se ha visto que son morfológicamente idénticos a los filamentos intermedios observados en las células "in vivo".

Como hemos mencionado anteriormente, la proteína característica que forma los filamentos intermedios de las células musculares de músculo esquelético, liso y cardíaco es la desmina, y estrechamente relacionada con ella se expresa en las células musculares otra proteína componente de los filamentos intermedios que es la vimentina (Tuszynski y col.,1979; Gard y Lazarides,1980;Thornell y col.,1984). Se ha observado que la vimentina puede formar heteropolímeros con la desmina en los fibroblastos presentes en los cultivos de miocitos cardíacos (Ip y col.,1983). La coexpressión de estas dos proteínas también se

puede presentar en otros tipos de tejidos de procedencia fetal o que tenga cierta relación con el feto como es la decidua del tejido materno (Van Muijen y col.,1987).

La desmina fue la primera proteína aislada de los filamentos intermedios de células musculares con un peso molecular que oscila entre 50.000-55.000 daltons dependiendo de la procedencia celular y cuyo nombre procede del vocablo griego "δεσμός" que significa vínculo ó lazo (Lazarides y Hubbard,1976). Las cadenas polipeptídicas que forman la desmina, varian en los diferentes tejidos y células, así como entre las diferentes especies, en su secuencia de aminoácidos sobre todo del extremo carboxi terminal (Geisler y Weber,1981); las cadenas polipeptídicas se enrollan entre si para formar los protofilamentos que son subunidades tetraméricas que en las condiciones fisiológicas se emsamblan espontáneamente formando unos filamentos de 10 nm de diámetro como se ha observado "in vitro" mediante estudios con fluorescencia (Ip y Fellows,1990).

Esta proteína está presente en las células musculares de los tres tipos de músculos (esquelético,liso y cardíaco), tanto de tejido embrionario como de adulto. Mediante estudios con microscopia electrónica e inmunoflorescencia se ha observado que esta proteína se encuentra formando parte de la linea Z de las miofibrillas y entre las lineas Z de miofibrillas adyacentes, también localizado a lo largo de los espacios interfibrilares (Tokuyasu,1983)y en los de asociación entre las miofibrillas y la membrana plasmática, estando intimamente asociado con los desmosomas que permiten el que las células puedan sujetar a las células adyacentes que forman parte del tejido (Lazarides,1978).

En base a las investigaciones realizadas por los diversos autores se han propuesto diversas funciones que puede realizar la desmina, en primer lugar actúa como un soporte estructural tridimensional que mantiene interconectadas todas las

miofibrillas individuales unas con otras y a éstas con la membrana plasmática a nivel de las lineas Z, lo cual contribuye a mantener en la posición adecuada las miofibrillas adyacentes a través de las lineas Z; de esta manera esta molecula puede proporcionar un marco que integra mecánicamente en el espacio todos los miofilamentos contractiles durante los procesos de contracción y relajación muscular; el hecho de su localización y el aumento de su número en situaciones de hipertrofia inducidas mecánicamente o por esteroides (Gabella,1979), avalan esta sugerencia del papel de soporte de la proteína. En segundo lugar, como la actina está unida a la desmina (Lazarides y col.,1979), esta última puede mediar en la sujección de los filamentos de actina con su membrana plasmática y con las células adyacentes a través de los desmosomas, como los discos intercalares cardíacos, pudiendo mantener en registro las sarcómeras adyacentes pertenecientes a diferentes células, manteniendose la integridad del cable de conducción del latido celular y pudiendose por tanto transmitir la intensidad y ritmo del latido cardíaco de unas células a otras (Thornell y Eriksson,1981).

La vimentina es la segunda proteína que forma parte de los filamentos intermedios de las células musculares estrechamente ligada a la desmina, fue aislada en primer lugar de los fibroblastos (Brown y col.,1976)) y tiene un peso molecular de 52.000-58.000 daltons; su nombre deriva del vocablo latino "vimentus" que significa ondulado, pudiendose encontrar en todas las células de origen mesenquimal.

La desmina es un tetrámero, cuyas cadenas polipeptidicas varian de una especie a otra de animales y entre las células de diferentes tejidos principalmente en su extremo carboxi terminal. Del mismo modo que la desmina, la vimentina sufre procesos de unión y desunión de las subunidades que componen los filamentos de 10 nm de diámetro, los mecanismos citoplasmáticos que regulan estos procesos no están todavía bien caracterizados aunque se sabe que procesos de fosforilación en

sitios específicos de estas proteínas (vimentina y desmina) inducen la desunión de las subunidades y la defosforilación por enzimas fosfoprotein-fosfatasas inducen el reemsamblaje de las subunidades para formar los filamentos (Inagaki y col.,1990).

La vimentina se encuentra principalmente en los fibroblastos y en una gran variedad de tipos celulares, encontrandose en todas las clases de células musculares muy relacionada con la desmina. La vimentina son unos filamentos muy insolubles que se distribuyen en la región central del citoplasma alrededor de la membrana nuclear; debido a su disposición en la célula, estando estrechamente asociado con el núcleo se ha propuesto que juega un papel que proporciona un soporte mecánico y mantiene al núcleo en un lugar específico dentro de la célula (Virtanen y col.,1979). También se ha sugerido que la vimentina puede jugar un papel de transmisión de señales desde la membrana plasmática al núcleo, ya que estudios realizados "in vitro" han mostrado que la vimentina puede interaccionar por su extremo amino terminal con la membrana plasmática y por su extremo carboxi terminal con el núcleo (Georgatos y Blobel,1987).

La vimentina es una proteína que está ampliamente asociada con la desmina ya que se ha demostrado que coexisten en células musculares, coinciden en su distribución en miotubulos y miofibrillas esqueletales aisladas (Granger y Lazarides.,1978) aparecen morfológicamente como filamentos muy similares y agregados alrededor del núcleo al ser tratadas las células con diversas sustancias (Hynes y Destree,1978), los procesos de ensamblaje y desensamblaje de las subunidades tetraméricas que componen ambas proteínas son muy similares (Inagaki y col.,1987,1988).

Las proteínas desmina y vimentina que forman los filamentos intermedios de las células musculares se han utilizado para investigación básica, intentando los diversos autores conocer la composicíon y procesos bioquímicos que afectan a estas

moléculas, papel que desempeñan en el funcionamiento celular, su amplia distribución en los diversos estudios "in vivo" realizados en diferentes tejidos en animales de experimentación y en humano, tanto a nivel de tejidos embrionarios como tejidos adultos (Van Muijen y col.,1987;Muros y col.,1990), y estudios "in vitro" de expresion de estas proteínas realizados en cultivos celulares (Virtanen y col.,1981; Morris y Head,1985). Sobre las células que forman el tejido cardíaco también se han desarrollado diversos estudios enfocados al estudio de estas proteínas que se encuentran tanto en las células en los tejidos, como er las células en cultivo (Nag y col.,1986;Vélez y col.,1990).

En la última década muchos estudios han relacionado a los filamentos intermedios con un gran número de los procesos patológicos que ocurren en el organismo. Se han relacionado algunas enfermedades con defectos en el metabolismo de los filamentos intermedios que produce una proliferación de dichos filamentos que ha sido observada por medio de la microscopía electrónica en diversas neuropatias (Grundke-Iqbal y col.,1979;Dahl y col.,1980) y en miopatías hereditarias que afectan tanto a músculo esquelético (Edström y col.,1980), como a músculo cardíaco (Porte y col.,1980). Alteraciones en la cantidad y en la distribución han sido observada en varios procesos fisiológicos (Blose,1979) y también se ha observado que al ser estas proteínas intracitoplasmáticas, una casual salida de los filamentos intermedios al medio extracelular puede inducir la producción de autoanticuerpos en animales de experimentación (Gordon y col.,1978) ,también se producen autoanticuerpos en procesos inflamatorios y enfermedades malignas desarrolladas en humanos (Kurki y col.,1977).

Se ha puesto de manifiesto que entre los filamentos intermedios y los procesos de diferenciación célular existe una gran relación, observándose cambios en la coexpresión de las proteínas que forman los filamentos intermedios, demostrado tanto en las diferentes etapas del desarrollo

embrionario (Paranko y col.,1986), como a lo largo de la evolución celular de los días que permanecen dichas células en cultivo (Guillou y col.,1990), y también se ha demostrado que al ser tratadas las células en cultivo por diversos fármacos, se producen alteraciones en su síntesis, así como factores de crecimiento celular. Dichas sustancias alteran la organización de los filamentos intermedios (Keski-Oja y col.,1981). Las proteínas desmina y vimentina componentes de los filamentos intermedios musculares se han usado como marcadores de los diferentes estadios de la miogénesis, encontrándose la vimentina en los primeros estadios , mientras que la desmina aparece en estadios más tardios de maduración celular (Bennett y col.,1979).

Los filamentos intermedios juegan un importante papel en los procesos patológicos en los cuales intervienen células alteradas malignas (Letho y Virtanen,1978), en muchos de estos procesos se ha observado un cambio en la cantidad y distribución de los filamentos intermedios (Felix y Sträuli,1978). Algunos autores han demostrado que en algunos carcinomas(de piel) cuando se produce la transformación de las células normales en tumorales, comienza la expresión de vimentina adicionada a la expresión de otro filamento intermedio típico de estas células epiteliales normales como es la queratina (Miettinen y col.,1984). RAMAEKERS y colaboradores sugieren que la expresión aberrante de genes causado por contacto célula-célula o por activacion de genes de desdiferenciación por diversos agentes, podría conducir a la coexpression de vimentina y queratina como filamentos intermedios, lo cual puede ser una característica de todos los procesos metástasicos de las células que forman los carcinomas (Ramaekers y col.,1983).

Para el diagnóstico de los tumores musculares se han utilizado como marcadores, proteínas que forman parte de los músculos esquelético y cardíacos como es la mioglobina (Enjoji y Hashimoto,1984), también se han utilizado para el diagnóstico algunos subtipos ó variantes de la actina y miosina como

marcadores de la diferenciación rabdomioblástica (Schiaffino y col.,1986). Pero mucho más interesante ha resultado la búsqueda de un marcador que sirva para el diagnóstico de los tumores rabdomiomatosos, cuando la investigación se ha enfocado sobre las proteínas vimentina y desmina que componen los filamentos intermedios de las células musculares. La vimentina se ha encontrado en una gran variedad de células normales y neoplásicas de origen mesenquimal, mientras que la desmina se encuentra exclusivamente presente en células de músculo liso,esquelético y cardíaco (Altmannsberger y col.,1981). La expresión de desmina es hoy en día mayoritariamente utilizado como marcador tumoral de los procesos de diferenciación muscular en músculo liso y esquelético; la desmina es reconocida inmunohistoquímicamente por anticuerpos policlonales y monoclonales y sus propiedades tintoriales puede diferir entre tejidos normales y neoplásicos, siendo de gran ayuda en el diagnóstico tumoral (Seidal y col.,1987), el uso cotidiano de la expresión de esta proteína para el diagnóstico ha llevado a las industrias biofarmaceúticas a la producción de anticuerpos monoclonales que son utilizados en los laboratorios de Anatomía Patológica (Leader y col.,1987).

En trabajos recientes se ha relacionado la vimentina con diversas enfermedades de origen viral, así se ha observado una estrecha relación entre el virus Epstein-Barr causante de la mononucleosis infecciosa , asociado con desordenes neoplásicos en humanos (Henle y Henle,1985) y el incremento de la expresión de vimentina en linfocitos B humanos; las células B transformadas por el virus conservan en su genoma parte del genoma viral que expresa una proteína integral de membrana con cierto potencial transformante y relacionada con el incremento de la expresión de la vimentina (Birkenbach y col.,1989). Las proteínas desmina y vimentina que forman parte de los filamentos intermedios son segmentadas "in vitro" por una proteasa producida por el virus (tipo 1) causante del Sindrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA); el hecho de que este virus aumente "in vitro" el porcentaje de células con una distribución

de vimentina alterada y anormal, apoyan la posibilidad de que las proteínas de los filamentos intermedios puedan servir como sustratos para el virus cuando este infecta a las células (Shoeman y col.,1990).

Por último, ha sido relacionada la presencia de los filamentos intermedios con las diferentes etapas que ocurren en la formación de las placas de ateroma en la arteriosclerosis; la expresión de las dos proteínas desmina (D) y vimentina (V) está presente en un porcentaje de células (D+V+) de la túnica media de las arterias, coexistiendo con otras células D-V+, variando este procentaje con el tipo de vaso sanguíneo (Kocher y Gabbiani 1986), mientras que las células endoteliales de la túnica íntima interna son células D-V+. En las primeras etapas del desarrollo de las placas de ateromas casi todas las células son D-V+, aunque podemos encontrar algunas D+V+, en estadios avanzados y necróticos de las placas sólo están presentes células D-V+. El hecho de que exista diferencias en la expresión de desmina y vimentina entre las células normales de la túnica media arterial y las células de las placas ateromatosas, hace sugerir a algunos autores que estas proteínas pueden ayudar a comprender los procesos etiolo-patológicos asociados con el inicio y desarrollo de la arteriosclerosis (Osborn y col.,1987).

I.C. Acción directa e indirecta sobre las células cardíacas

El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que ocurren en las células cardíacas durante los procesos fisiológicos y fisiopatológicos, son necesarios para poder explicar el funcionamiento cardíaco en condiciones normales y en las diversas patologías que afectan al sistema cardiovascular. Para una buena comprensión del funcionamiento del sistema cardiovascular, es necesario el estudio de la composición y de la disposición ultraestructural de macromoléculas, como los

receptores de membrana, las proteínas del citoesqueleto y del aparato contráctil o los canales iónicos de membrana, y el estudio de los mecanismos de procesos esenciales para la vida celular como la regulación del metabolismo aeróbico y anaeróbico, la síntesis de macromoléculas, expresión génica o la actividad contráctil; los cuales pueden alterar el correcto funcionamiento del sístema cardiovascular

La elección de un modelo experimental adecuado para la investigación del funcionamiento cardiovascular a nivel celular y molecular, debe de ser uno de los pasos preliminares y de gran importancia, para que se puedan recoger los frutos apetecidos al final de las experiencias. Las diferentes investigaciones se han desarrollado sobre animales "in vivo", órganos, tejidos y células aisladas, orgánulos celulares y macromoléculas aisladas.

Corazones "in vivo":

El corazón entero "in vivo" en los animales y en el hombre ha sido principalmente utilizado para su estudio como órgano integrado en un organismo vivo y el estudio de la composición y función del corazón como entidad funcional. Se han desarrollado estudios sobre la influencia de determinadas sustancias (metabolitos, tóxicos,fármacos) sobre el trabajo cardíaco o el contenido tisular en las diferentes fases del funcionamiento cardíaco (Kantor y col.,1986). Ha sido de gran utilidad el uso de embriones para el conocimiento de la embriogénesis del corazón, habiendose observado la actividad bioquímica o proliferativa de las células cardíacas a lo largo del desarrollo (Erokhina y Rumyantsev,1988) o el estudio de la movilidad celular en la embriogénesis por medio de técnicas de marcaje aplicadas en corazones a lo largo del desarrollo embrionario (Aránega y col.,1989). Mediante diversas manipulaciones se han puesto los corazones en situaciones similares a las que ocurren en los procesos patológicos

observándose la respuesta cardíaca ante estas situaciones extrañas (Rakusan y Korecky 1985); el estudio de las posibles alteraciones que se pueden producir en las células cardíacas por diversos agentes farmacológicos que son cardiotóxicos, los cuales pueden interaccionar con los procesos bioquímicos y la ultraestructura que forman las proteínas de las miofibrillas cardíacas (Lewis y col.,1982).

Las experiencias realizadas en el corazón "in vivo" están influídas por el funcionamiento general del organismo, así la concentración de las sustancias que llegan al corazón dependen del flujo sanguíneo que circula por los vasos sanguíneos coronarios, las sustancias cuando alcanzan sus células dianas ya han sufrido una serie de modificaciones debido al metabolismo del organismo y la respuesta que obtenemos se debe a una heterogeneidad de tipos celulares, lo cual no nos permite obtener la respuesta de las células cardíacas como tales.

Corazones aislados y perfundidos:

La actividad contráctil del corazón puede ser medida con la utilización de corazones aislados que se mantienen activos manteniendo el flujo coronario y la presión aórtica por el uso de bombas peristálticas que mantienen en circulación un tampón que contiene los metabolitos, oxígeno y hormonas que normalmente contiene la sangre. Diversos procesos bioquímicos pueden ser estudiados, como el consumo de sustratos y oxígeno durante la contracción cardíaca, actividad enzimática, sintesís proteica, producción de metabolitos o la influencia de los niveles iónicos citoplasmáticos en la actividad contráctil (Xenophontos y col.,1986).

El inconveniente del uso de los corazones aislados perfundidos para las diferentes experiencias estriba en el escaso tiempo disponible para la utilización del corazón, que varia de tres a seis horas, la concentraciones de las sustancias que

llegan a la periferia celular depende de el volumen del medio de perfusión y de la presión a que lo hace circular la bomba peristáltica, además, como ocurría con las experiencias "in vivo", la respuesta es producida por una gran heterogeneidad de tipos celulares (Morgan,1988).

Corazones y trozos de corazones en cultivo:

El cultivo del órgano cardíaco procedentes de embriones, ha sido utilizado para el estudio de la biología celular del corazón, pudiendo seguir la evolución cardíaca a lo largo del proceso de embriogénesis (Mochón,1986). La preparación puede ser mantenida por más tiempo que en el caso de los corazones perfundidos, la difusión de las células está limitada, la población celular es pequeña y heterogénea, existiendo en la misma preparación zonas cardíacas con células bien oxigenadas y otras zonas con una situación de hipoxia celular (Wildenthal y col.,1976).

Diversos aspectos del metabolismo del músculo cardíaco como es la biosíntesis del DNA y la regulación de este proceso puede ser estudiado mediante el cultivo de pequeños trozos de órgano cardíaco (Claycomb,1976). Pero los trabajos se realizan sobre una población celular pequeña y heterogénea, la difusión de las disoluciones a las células está limitada y la actividad contractil celular no puede ser medida.

Cultivo de células cardíacas aisladas:

Los parámetros que nos indican la funcionalidad de la célula cardíaca que no pueden ser medidos en los modelos experimentales anteriores; por medio del aislamiento y posterior cultivo de los miocardiocitos, sí han podido ser valorados. Una gran variedad de parámetros celulares se han obtenido con el uso de este modelo experimental de cultivos celulares, que abarcan aspectos morfométricos como la forma y tamaño celular, evolución

de la morfología celular a lo largo del tiempo en cultivo, ultraestructura celular o la influencia de diversas sustancias en la morfología celular (Moses y Claycomb,1988). Aspectos fisiológicos y bioquímicos celulares como la actividad eléctrica, concentracion intracelular de metabolitos e iones, efectos de hormonas y fármacos, flujo iónico, expresión de RNA y síntesis de proteínas, localización celular de metabolitos y muchos más parámetros celulares que abarcan la actividad celular pueden ser estudiados con este modelo experimental (Renaud,1980;Kim y col.,1984;Nag y Cheng,1988).

Los inconvenientes que presentan este módelo experimental están principalmente localizados en el daño celular que se produce en los procesos de aislamiento y la búsqueda de las condiciones de cultivo idóneas para el mantenimiento, durante largos periodos de tiempo, la viabilidad celular.

Orgánulos y macromoléculas celulares:

Las células procedentes de los tejidos o de los cultivos pueden ser fragmentadas y las diferentes fracciones subcelulares, orgánulos celulares ó macromoléculas, para el estudio de la actividad cardíaca. Se han utilizado orgánulos celulares de miocardiocitos en cultivo, principalmente mitocondrias, o enzimas aisladas sobre todo para la búsqueda de información sobre el papel que juega el Ca^{++} en procesos como la actividad enzimática mitocondrial y el metabolismo oxidativo; realizándose también ensayos de fármacos antagonistas del calcio sobre membranas aisladas y observándose el efecto de estos fármacos sobre los receptores de membrana que forman los canales del calcio (Rengasamy y col.,1985).

El inconveniente de este modelo radica en el daño que se realiza sobre los orgánulos y macromoléculas celulares durante los procesos de subfraccionamiento celular y la relativa pureza obtenida en las distintas subfracciones celulares.

I.D. Cultivo de células cardíacas

La introducción de las técnicas de disociación de distintos tejidos, entre ellos el cardíaco, en sus componentes celulares (Moscona,1952) y su posterior cultivo, ha posibilitado el estudio de una gran variedad de cuestiones concernientes al funcionamiento del corazón; hay algunos parámetros funcionales de estas células cardíacas que sólo pueden ser medidos en miocardiocitos aislados siendo imposible su estudio en corazones aislados y perfundidos, ya que la actividad celular se vería influída por diversos factores extrínsecos a la célula.

Los cultivos de células cardíacas o miocardiocitos aislados tienen ciertas ventajas con respecto a los estudios realizados con corazón intacto tanto "in vivo" como "in vitro", pues las técnicas de cultivos celulares permi en la medida de las funciones específicamente celulares , como pueden ser el crecimiento celular, estudio del mecanismo de automatismo celular en un medio libre de las señales nerviosas que alteran el comportamento celular, respuesta celular ante agentes externos, relación de las células con otras células cercanas ó la organización de las células aisladas en estructuras semejantes a tejidos, la biología celular (DNA, RNA,etc.). Para la gran mayoría de autores las propiedades de las células en cultivo son comparables a las propiedades observadas "in vivo" y en consecuencia los resultados pueden ser extrapolables al comportamiento celular en el tejido ú órgano de origen aislado (Laurent y Lechat,1988).

La característica principal de los miocardiocitos en cultivo es la capacidad que tienen estas células de retener las funciones de las células que forman el tejido cardíaco y por lo tanto son capaces de contraerse de forma espontánea y rítmica de manera semejante a como lo hace el corazón entero; este hecho fue primero observado en fragmentos de corazones aislados

(Patten, 1949) y posteriormente observada por los distintos autores en los cultivos de células cardíacas, tanto embrionarias, como las procedentes de corazones adultos (Marsh y col.,1983;Frelin y col.,1974). La capacidad de contraerse que es una característica esencial de las células cardíacas en cultivo que está estrechamente ligada a otras características fisiológicas (Biedert y col.,1979), nos proporciona un medio para poder apreciar el estado funcional de la célula.

Las células cardíacas embrionarias completamente aisladas conservan la capacidad de formar estructuras histológicas y discretos tejidos al ser recombinadas en cultivo, como anteriormente fue observado para otros tejidos tanto "in vivo" (Andres,1953), como "in vitro"(Moscona y Moscona,1952). La utilización de células aisladas para el estudio del comportamiento celular proporciona la ventaja de que las células no se ven influídas por otros tejidos, podemos controlar la densidad celular y podemos estudiar no sólo la interacción entre las células, sino también el estudio a nivel subcelular de diferentes procesos tales como pueden ser los bioquímicos y la acción farmacológica de diferentes sustancias.

El cultivo de células cardíacas aisladas se inició al poco tiempo de la introducción de las técnicas de disgregación de tejidos en sus componentes celulares (Moscona,1952), la primera experiencia de cultivo de miocardiocitos fue realizada en 1955 por MARGARET W. CAVANAUGH la cual utilizó corazones procedentes de embrión de pollo para aislar las células, manteniéndolas en cultivo durante extensos periodos de tiempo y estudiando el comportamiento de estas células "in vitro".

Desde la primera experiencia realizada de cultivos de miocardiocitos hasta la actualidad, las células embrionarias han sido las más utilizadas para estos cultivos ya que además de ser más fáciles de separar a partir de sus tejidos, los métodos y concentraciones enzimáticas utilizadas producen un menor daño a

las membranas celulares, lo que favorece la supervivencia en cultivo que de por sí poseen estas células. Aunque se utilizan embriones de otras especies como pueden ser ratones ó cobayas (Auclair,1976), el porcentaje más elevado de las experiencias se desarrollan utilizando como animal de experimentación el embrión de pollo, esto es debido a que esta especie presenta una serie de ventajas para la realización de los trabajos experimentales. Entre las ventajas se encuentra el hecho de que podemos escoger la fecha exacta de cultivo, con el simple hecho de adaptar la fecha de puesta del huevo en la incubadora y mantenerlos durante el tiempo adecuado incubando para que la extracción del embrión del huevo sea en el estadio del desarrollo embrionario deseado; una segunda ventaja es que el desarrollo del embrión en el huevo es un hecho reproducible siempre que respetemos las condiciones de humedad y temperatura a que se realiza la incubación; en tercer lugar es facil calcular el número de huevos que debemos poner a incubar para la posterior obtención de la población celular requerida para la realización de la experiencia. El mayor inconveniente podría ser el origen aviar de estas células, pero ha sido observado que el mecanismo de contracción que ocurre en el corazón embrionario de pollo a partir de estadios de desarrollo avanzados, son idénticos a los del corazón del pollo adulto y muy cercanos a aquellos que ocurren en el de los mamíferos(Barry y Smith,1982) y en el corazón humano.

Con técnicas de microscopía óptica normal y a través de cortes histológicos en corazones embrionarios, se ha determinado que en el corazón a lo largo del desarrollo, a partir del estadio XVII de desarrollo de HAMBURGER-HAMILTON (H.H.) (Hamburger y Hamilton,1951), se pueden distinguir tres tipos de estructuras, una que corresponde al miocardio cuyas células son de tipo muscular, otra que corresponde al pericardio con morfológia epitelial y mesenquimal, y un tercer tipo de células endoteliales que se corresponde con el endocardio (Romanoff,1960).

Durante la primera mitad del presente siglo, la disección fue muy utilizada para la obtención de las células que forman parte de los distintos tejidos, pero a partir de las experiencias de MOSCONA el aislamiento de las células se ha llevado a cabo siguiendo métodos enzimáticos. El aislamiento de las células cardíacas para su posterior cultivo también se ha realizado por medio de metodos enzimáticos utilizados para los otros tejidos y desde las primeras experiencias desarrolladas por CAVANAUGH hasta la actualidad, la tripsina es la enzima más utilizada para la disgregación celular de los tejidos, debido a que esta enzima causa menor daño celular que otras enzimas y agentes quelantes, además tiene un amplio campo proteico donde desarrollar su actividad proteolítica, ya que rompe por el lado carboxílico de los residuos de arginina y lisina que forman parte de los enlaces peptídicos de las cadenas polipeptídicas proteicas.

Los distintos autores que han utilizado la tripsina para el aislamiento celular han seguido utilizando el mismo método, con algunas modificaciones que afectan a la concentración de enzima utilizada, el tiempo en que el enzima está en contacto con el tejido, la utilización de algunos accesorios mecánicos durante la realización de la técnica o el intercambio cualitativo y cuantitativo de algunos de los componentes iónicos que forman parte del disolvente del enzima (Farmer y col., 1983; Shields y Glembotski,1988).

Del aislamiento celular y posterior cultivo, DE HAAN en 1967 mostró que en el tejido cardíaco dentro de la capa miocardica, el 65-75% de las poblaciones celulares corresponden al tipo de células que denominó células M (miocardiocitos) describiendo las características morfológicas celulares, las cuales se parecerían a los mioblastos de músculo esquelético descrito anteriormente por otros autores (Konigsberg,1963), estos miocardicítos después del primer día de cultivo presentan una forma redondeada y pequeña, normalmente uninucleadas y muy

refractarias; mientras que el 25-35 % de la población corresponde a las células denominadas células F (fibroblastos) describiendo su típica morfología fibroblástica con forma triangular o estrellada, muy delgadas con un núcleo que normalmente contiene dos o más densas inclusiones intranucleares y no refractarias. Algunas veces se encontró una proporción practicamente despreciable de células las cuales tenían unas características morfológicas intermedias entre los dos tipos celulares descritos anteriormente.

Diversos estudios morfométricos realizados sobre los miocardiocitos embrionarios y adultos en cultivo, de diversas especies, se ha observado que el tamaño celular es de unos 15 µm de largo y hasta 3 µm de ancho para las células alargadas y adheridas pudiendo alcanzar a lo largo de los días de cultivo una longitud de 50 µm y a veces mayor, mientras que las que presentan la forma esférica o irregular su tamaño puede oscilar entre 10-30 µm (Jacobson y Piper,1986).

La contracción celular cardíaca puede ser observada con el microscóspio óptico, conociéndose que las células cardíacas después de las primeras veinticuatro horas en cultivo, un 50% de la población celular realizan contracciones espontáneas, de los dos tipos células existentes el 70-80% de las células M laten espontáneamente y menos de un 0,3% de las células F lo hacen. Estos porcentajes de células que laten espontáneamente pueden variar con la edad del embrión de donde se ha extraído, el método utilizado para el aislamiento celular, la concentración celular sembrada o algunos cambios en las condiciones de cultivo (Shaler y McCarl,1971); pero se conoce que en general a las cuarenta y ocho horas de cultivo aumenta el porcentaje de células que laten, considerandose que una célula late cuando se produce un desplazamiento de al menos 1 µm (Tarr y Dowell, 1988). La sincronización del latido celular en el cultivo se observa entre el segundo y tercer día de duración del cultivo, después de esta sincronización la frecuencia de los latidos va

variando desde el caso del embrión de rata que inicialmente es muy elevada (80-200 latidos/minuto) y después se estabiliza entre 30-80 latidos/minuto hasta el duodécimo día en cultivo (Freyss-Beguin y Van Brussel,1979) y en el caso del embrión de pollo puede oscilar entre 10-110 latidos /minuto y a partir del séptimo día de cultivo cesa el latido , en un margen de tiempo amplio (8-45 días) dependiendo de las condiciones celulares y de cultivo (Sperelakis,1984). La frecuencia del latido celular puede ser un buen reflejo de la viabilidad celular, pero existen numerosos factores como la temperatura, el pH ó diversos fármacos que la pueden alterar (Boder y col.,1971).

La identificación celular de los diferentes tipos de células en cultivo basada en criterios morfológicos y del latido celular, no es la adecuada ya que se ha visto que diversas características morfológicas están alteradas "in vitro" con respecto a las mismas características observadas "in vivo", y es también conocido desde hace tiempo que la estructura y forma celular se ve modificada por las circunstancias del medio ambiente donde se desarrollan los cultivos, estando influenciadas por los procesos de disgregación de los tejidos, la composición del medio de cultivo, adaptación de las células al cultivo, de la motilidad y capacidad de adherencia de las células, superficies de cultivos y habiéndose observado por diversos autores que las células cuando se adhieren a las superficies de cultivo, al crecer, muchas de ellas adoptan una morfología similar a la fibroblástica (Freshney y col.,1980). La capacidad de las células miocárdicas de latir en cultivo también se pueden ver alteradas por diversos parámetros medio ambientales como la disgregación tisular, concentración celular en el momento de la siembra del cultivo, composición del medio de cultivo o la edad del corazón donde se han obtenido las células (Harary y col.,1966).

También se pueden utilizar características bioquímicas para la identificación de los diferentes tipos celulares, algunas características metabólicas han sido

utilizadas pero estas pueden estar muy influenciadas por las condiciones ambientales y la composición de los medios de cultivo. La observación del hecho de que la presencia de depósitos de glucógeno esté estrechamente relacionado con la presencia de miofibrillas, ha sido utilizado para clasificar mediante estudios histoquímicos los diferentes tipos celulares, siendo las células M (miocardiocitos) las que presentan acúmulos de glucógeno (gly +) que corresponden con las células que por estudios ultraestructurales presentan miofibrillas, mientras que las células F (fibroblastos) que por estudios ultraestructurales no presentaban miofibrillas, tampoco presentan acúmulos de glucógeno (gly -), por tanto las células que son "gly +" son células que laten. Algunas células que con los anteriores criterios morfológicos fueron catalogadas como células F pero que se observaban que latían, con este nuevo criterio son consideradas células musculares ya que son "gly +" (Polinger,1973). La clasificación de los tipos celulares se ha basado también en las diferentes velocidades de síntesis de ADN que presentan las células pertenecientes a distintos tipos celulares o en el número de nucleólos; también se identifican las células pertenecientes a un determinado tipo mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcar características bioquímicas, como la existencia de algunas enzimas ATPasas específicas en la membrana plasmática de los miocitos, para distinguir las células musculares de otras células no musculares (Lobaugh y Lieberman,1987).

Los criterios morfológicos y bioquímicos pueden sufrir cambios a lo largo de los días de cultivo, así las células cuando son aisladas presentan una morfología diferente que las células que llevan varias semanas en cultivo y la síntesis proteica u otros criterios bioquímicos se alteran con el tiempo de cultivo, por ello en la actualidad el principal criterio utilizado para la identificación de las células en cultivos son los estudios de microscopía electrónica y los métodos inmunohistoquímicos basados en la identificación de

componentes estructurales definidos, los cuales son característicos de cada célula y permanecen a lo largo del tiempo de cultivo (Terracio y Borg,1988). Estos métodos se han centrado en proteínas estructurales de la membrana basal como el colágeno tipo IV, la fibronectina, la laminina o los diferentes proteoglicanos; pero las proteínas estructurales más importantes y características de las células cardíacas son las proteínas contráctiles y las proteínas que forman el citoesqueleto celular, desarrollandose un gran número de anticuerpos monoclonales capaces de marcar las diferentes proteínas contráctiles y las del citoesqueleto (Li y Lemanski,1990), pero se utiliza principalmente el anticuerpo monoclonal anti-desmina ya que esta proteína es el marcador específico de las células musculares (Quax y col.,1985;Pieper y col.,1989).

Ambos tipos de células pueden ser aisladas y cultivadas con relativa pureza de sus poblaciones (Polinger,1970), algunos autores aprovechando la mayor capacidad de adherencia sobre las superficies en las primeras horas de cultivo, que presentan los fibroblastos con respecto a los miocardiocitos, reducen el número de fibroblastos hasta proporciones muy bajas del total de la población celular pasando las células sembradas que se mantienen en suspensión a otros frascos de cultivo al cabo de las primeras horas en cultivo, quedando los fibroblastos atrapados por adherencia en el fondo de los frascos de cultivo (Blondel y col,1971;McCall,1979); repitiendo este proceso cada dos o cuatro horas, se puede reducir la población de fibroblastos hasta cifras muy bajas después de los primeros días en cultivo, siendo la reducción bastante significativa a partir del septimo día de cultivo. Otros autores para enriquecer los cultivos de células musculares y reducir el número de fibroblastos utilizan un medio de cultivo al que se le añade un suero desnaturalizado mediante calor (100 °C durante 10 minutos)(Frelin y col.,1974) o la utilización de sueros desprovistos de lipoproteínas lo cual inhibe la proliferación de los fibroblastos (Renaud y col.,1983); un método

muy utilizado en la actualidad para la reducción de las células fibroblásticas y de otras células no musculares es la utilización de sustancias antimitóticas capaces de inhibir la proliferación de las células no musculares y fibroblásticas, produciendo el menor daño posible a los miocardiocitos, siendo la Citosina-1-β-D-arabinofuranósido el antimitótico más utilizado (Springhorn y Claycomb,1989).

Las primeras experiencias de mantenimiento de las células en cultivo desarrollados por CAVANAUGH (1955), utilizaba como medio de cultivo una mezcla de solución salina y plasma, posteriormente los diversos autores han utilizado sobre todo medios sintéticos para la realización de sus experiencias con miocardiocitos en cultivo. Los medios de cultivos más sencillos utilizados fueron soluciones salinas suplementadas con algún tipo de hidrato de carbono que sirviera como fuente de energía de las células en cultivo, pero desde la década de los sesenta hasta la actualidad para el cultivo de células cardíacas se han utilizado medios básicos que están comercializados, siendo los más utilizados el MEM (Mark y Strasser,1966) y el M-199 (Morgan y col.,1950; Laurent y col.,1986), pero sobre todo, la gran mayoría de autores, actualmente utilizan para la realización de los cultivos celulares con miocardiocitos, una modificación del medio MEM como es el DMEM o mezclas del DMEM con otros medios en el que el DMEM representa una gran proporción del volumen total del medio (Sen y col.,1988;McMahon,1988).

Los medios anteriormente expuestos, antes de su utilización, son suplementados por diversas sustancias las cuales favorecen el crecimiento de las células en cultivo, el más utilizado el suero fetal de ternera a una proporción del 10 % del volumen total, aunque a veces puede ser sustituido por otro suero animal o humano, también se puede utilizar mezclas de diversos sueros para suplementar el medio de cultivo (Grynberg y col.,1986). Como fuente de sustancias favorecedoras del crecimiento celular, como pueden ser sustancias mitóticas, se han

utilizado extractos de embriones completos (Merchant y col.,1964) o extractos de diversos tejidos, generalmente tejidos musculares cardíacos procedentes de embriones y de adultos (Kardami,1990); se ha demostrado que el músculo cardíaco puede acumular una gran cantidad de factores de crecimiento los cuales influyen en el crecimiento y diferenciación de las células musculares en cultivo (Florini,1987), demostrándose también que el factor de crecimiento fibroblástico es el mitógeno predominante en los extractos cardíacos (Kardami y Fandrich,1989). También se utilizan diversos factores de crecimientos aislados para añadir al medio de cultivo, los cuales pueden inducir la síntesis de DNA en cultivo y por tanto inducir la proliferación celular en los cultivos; los factores de crecimiento más utilizado son: la insulina, el factor de crecimiento derivado de fibroblastos y el factor de crecimiento epidérmico. Algunos autores utilizan sustancias sintéticas que han servido de promotores de tumores, como son los esteres del forbol, para estimular la proliferación de los miocardiocitos en cultivo (Claycomb,1988).

La evolución de los cultivos primarios de miocardiocitos procedentes de embriones dependen en gran medida del estadio ó edad del embrión utilizado para la obtención de las células, se ha hecho un amplio estudio abarcando todos los estadios de desarrollo en la embriogénesis de los embriones y las primeras etapas del desarrollo en los animales; después de la eclosión del huevo ó en ratas recién nacidas (Mark y col.,1967), orientados entre otros objetivos, a la búsqueda de la edad ideal para la obtención y posterior cultivo de las células. Las investigaciones se dirigen al estudio de los días de incubación del huevo ideales para que las células una vez en cultivo presenten una actividad máxima, el parámetro utilizado para medir la actividad celular es la actividad contractil espontánea de estas células; la actividad observada en los cultivos procedentes de los primeros días de incubación (4-5 días) es del 20-25 % de la población celular (Cavanaugh,1955), de un 60-70 % para las células tras 6-8 días en incubación (Sperelakis y Lehmkuhl,1966)

y en estadios de desarrollo más avanzados, correspondientes a más días de incubación, la actividad celular va disminuyendo llegando a ser inferior al 10 % a los 18 días de incubación (Wollenberger,1964; De Haan,1967). Asi pues, para la gran mayoría de autores la incubación del huevo durante 7 días es el periodo adecuado para que las células obtenidas presenten una máxima actividad en cultivo, como demostrarón las experiencias de DE HAAN (1967).

La concentración de células utilizada para la siembra en los cultivos celulares es un factor que influye considerablemente en la posterior evolución del cultivo(De Haan,1965b); la densidad de la suspensión celular utilizada para la siembra debe de estar en concordancia con el tipo de cultivo que deseamos, debiendose emplear concentraciones inferiores a 10^5 células/ml para la obtención de células aisladas o agregadas en pequeñas agrupaciones, emplear una concentración de 10^6 células/ml para la obtención de una monocapa celular y para la obtención de multicapas celulares se necesitan concentraciones del orden de $3x10^6$ células/ml (Renaud y Le Douarin,1972).

La evolución de las células a lo largo de los días de cultivo ha sido seguida desde la realización de las primeras experiencias de cultivos de miocardiocitos, observándose que en las primeras horas de cultivo, las células son generalmente esféricas, suspendidas en el medio de cultivo, pero a partir de las primeras cinco horas en cultivo hasta las veinticuatro horas de cultivo, algunas células empiezan a adherirse volviendose aplanadas e irregulares en su forma, cambiando de forma a consecuencia de su adherencia a la superficie del frasco de cultivo (Le Douarin y col.,1974). Conforme va evoluciando el cultivo se presenta una amplia variedad de tipos celulares, algunas con la típica morfología mioblástica alargada, otras se adhieren por tres puntos de ahderencia adoptando una forma triangular y los fibroblastos que son los primeros en adherirse, tienen su típica forma alargada. Conforme el tiempo de cultivo va

avanzando e incluso en las primeras veinticuatro horas se van formando de forma pasiva pequeñas agrupaciones o agregados celulares que manifiestan un movimiento browniano al igual que las células aisladas, observándose conjuntos de dos o tres células que se comportan como una unidad. A partir de las primeras 12 horas de cultivo los miocardiocitos pueden empezar a latir, esto depende de la edad del embrión utilizado y de la concentración celular empleada para la siembra, así la contracción espontánea se observa en las primeras 24 horas de cultivo en embriones de 9 días ó menos de incubación y también aparece antes si se aumenta la concentración celular de siembra empleada para el cultivo; al producirse los contactos entre las células cardíacas, se puede establecer una coordinación de las contracciones y la sincronización del latido celular observada que es de 50-80 latidos/minuto, tiene lugar entre el segundo y el tercer día de cultivo (Fayet y Col.,1974). Conforme los días de cultivo avanzan, se van formando más agregados celulares, aumentando también el número de células que forman los agregados y estos comienzan a depositarse en la superficie de cultivo, empezando las células a adherirse y adoptar la típica morfología aplanada y alargada de las células que crecen adheridas.

En el caso de células que crecen aisladas la viabilidad celular no excede de 7-10 días de cultivo, observándose también el cese del latido celular a partir del octavo día, aunque puede prolongarse por algún periodo mayor de tiempo en algunos casos; si las células se encuentran a concentraciones elevadas, formando agregados o monocapas, la viabilidad celular se ve prolongada hasta los 30-45 días (Renaud,1980). DE HAAN y otros autores observaron que se pueden producir mitosis espontáneas a lo largo de los días de cultivo, pudiendose observar células uni o binucleadas e incluso multinucleadas en el caso de células procedentes de estadios muy tempranos (Renaud y Le Douarin,1972), observándose un rápido comienzo de la proliferación celular cuando se añade extracto de embrión de pollo al medio de cultivo.

I.D.1. Cultivos de células cardíacas procedentes de corazones de mamíferos

La gran mayoría de experiencias sobre cultivos de células cardíacas se realizan mediante la utilización del embrión de pollo como animal de experimentación, pero también se han desarrollado un gran número de técnicas enfocadas a la puesta a punto de la tecnología de cultivo necesaria para el cultivo de miocardiocitos procedentes de corazones de mamíferos adultos. Si en los cultivos de miocardiocitos procedentes de embriones de pollo el punto de referencia son los trabajos desarrollados por CAVANAUGH y DE HAAN, el primer trabajo y referencia básica en el caso de los cultivos de células cardíacas adultas de mamíferos son las experiencias realizadas en el año 1963 por HARARY y FARLEY con corazones de ratas recién nacidas.

Aunque también se pueden utilizar embriones de distintas especies de mamíferos para las experiencias de cultivos celulares, el primer paso para el cultivo de miocardiocitos adulto fue la experiencia de HARARY y FARLEY (1963), los cuales utilizando la tecnología utilizada anteriormente para el cultivo de células embrionarias, aislaron y cultivaron células procedentes de corazones de ratas de 3-10 días de vida. Las técnicas de disgregación del tejido y de siembra de cultivo es muy similar a la utilizada para los embriones de pollo, siendo la enzima tripsina la mayoritariamente utilizada, los medios de cultivo más utilizados vuelven a ser el MEM y M-199, actualmente el DMEM es el preferido por los diversos autores suplementado por diversas proporciones de sueros en los que predomina el suero fetal de ternera (Shields y col.,1988); la concentración de la suspensión celular en el momento de la siembra dependerá del tipo de cultivo deseado, así utilizando una concentración de $5x10^5$ células/ml y sembrando un número total de $2x10^6$ células por cada disco Petri de 60 mm de diámetro es suficiente para que a los dos

o tres días de cultivo se obtengan monocapas celulares (Anand-Srivastada y Cantin,1986).

Cuando los tejidos son disgregados y las células sembradas, se observan diversos tipos celulares. Como en el caso de los embriones de pollo, las células en las primeras horas de cultivo adoptan una morfología redondeada, pero en el primer día de cultivo algunas empiezan a adherirse en la superficie de cultivo, alisandose la forma celular, algunas adoptan forma triangular adheriendose por tres puntos y abonbandose por el centro. La mayoría de las células contienen un sólo núcleo redondeado, pero pueden aparecer algunas binucleadas e incluso con tres núcleos, los núcleos normalmente presentan uno o dos nucleolos densos y redondos; las miofibrillas son frecuentemente observadas y la típica estructura de los sarcómeros es visible en las células vivas e incluso discos intercalares han sido observado ocasionalmente entre células miocardicas (Kasten,1971). La característica principal de estas células, como el de todas las células cardíacas, es que pueden latir espontánea y rítmicamente en cultivo, pero se observa que el látido comienza después de que las células se encuentren adheridas a la superficie del cultivo, lograndose una sincronización del latido a los tres o cuatro días de cultivo, pero al poco tiempo la actividad contráctil celular empieza a decrecer y finalmente se para, aunque algunas células pueden latir por periodos de tiempo de hasta 30-40 días de cultivo; la frecuencia del latido puede variar entre 30-80 latidos/minuto. Las células al adherirse tienden a extender aumentando el tamaño celular, pudiensose observar una morfología variada en las células adheridas que laten, presentándose unas de forma alargada con una longitud de unas 15 µm y hasta 3 µm de anchura, las de forma irregular pueden presentar un diámetro de hasta 30 µm de diámetro (Harary y Farley,1963).

En los cultivos de miocardiocitos procedentes de corazones de ratas recién nacidas, también se presentan

contaminación por fibroblastos y otras células epiteliales procedentes de las membranas cardíacas que se encuentran en mayor cantidad que en el caso de corazones embrionarios, e incluso si los tejidos no han sido bien lavados se pueden presentar células sanguíneas. En general, los miocardiocitos se pueden diferenciar de las células endoteliales: son más pequeñas, presentan miofibrillas y sarcómeras, un denso citoplasma, binucleación con uno o dos densos nucleolos, no presentan capacidad de migración celular en cultivo, pero sobre todo presentan una capacidad como es la de latir espontáneamente que está ausente en las células e doteliales; estando muy relacionada la presencia de miofibrillas con la capacidad de contracción de la célula, ya que las miofibrillas organizadas no se observan cuando las células presentan un minimo latido o cesan de latir (Kasten,1972). También se utilizan las diferentes capacidades de adherencia a lo largo del tiempo o la utilización de antimitóticos para eliminar del medio las diferentes células no musculares en los cultivos de miocardiocitos cardíacos.

La capacidad mitótica de las células cardíacas ha sido largamente discutida por los diversos autores, en un principio fueron detectadas mitosis de estas células "in vivo" (Manasek,1968), se creía que era propiedad exclusiva de las células embrionarias y diferentes experiencias demostraron posteriormente que podría ocurrir también, aunque en una pequeña medida, en otros tipos celulares (Jeter y Cameron,1971); pero el tiempo para que ocurra la mitosis en las células musculares cardíacas en cultivo es muy largo (6 horas) comparada con las células endoteliales (2,5 horas), además el porcentaje de células capaces de presentar síntesis de DNA y mitosis durante las primeras etapas del desarrollo postnatal es bajo (Rumyantsev,1963); por todo lo anteriormente expuesto la actividad mitotica de las células cardíacas en cultivo es tan extremadanente baja, que se puede decir que estas células practicamente no presentan actividad mitótica en cultivo (Kasten,1972).

En la evolución de las células en cultivo seguida por HARARY y FARLEY, observaron que al cabo del tercer o cuarto día de cultivo las células se han aplanado al adherirse e incrementado su area, adoptando diversas formas, incluso junto a células alargadas e irregulares que están aplanadas al haberse adheridos, se encuentran otras células pequeñas y redondeadas; también se observan contactos entre las células y la presencia de grandes células en forma de sabanas adheridas, con varios núcleos sin separar por membranas celulares que podría indicar que se ha formado por el crecimiento y posterior contacto entre diversas células individuales. El porcentaje de células que manifiestan contracción espontánea es muy bajo en los primeros días de cultivo, pero va aumentando conforme avanza el tiempo de cultivo: en un principio el latido celular se observa de forma aislada entre las células, pero a partir de tres o cuatro días de cultivo el latido está sincronizado por zonas de cultivo entre las células adyacentes, siendo evidente que hay un pequeño número de células que son capaces de iniciar el latido celular y las demás tienen la capacidad de continuar la contracción y transmitir el ritmo a las células adyacentes. El número de células vivas disminuye a la mitad entre el segundo y octavo día de cultivo.

La edad de las ratas utilizada para las experiencias oscila entre los tres y diez días, ya que a estas edades tempranas las células son más resistentes a la desintegración celular, son capaces de adherirse a las superficies de cultivo y se obtiene un gran número de células que laten espontáneamente. Se han aislado células capaces de latir a partir de ratas de seis semanas, pero no son tan activas y las células aisladas de ratas de dieciseis semanas, permanecen redondeadas y sin latir, habiendose relacionado la capacidad de adherencia celular con su capacidad de latir (Harary y Farley,1963).

La metodología necesaria para el aislamiento y cultivo de las células cardíacas procedentes de embriones y de

diferentes animales recién nacidos, es llevada a cabo con éxito por diversos grupos científicos y está muy desarrollada en las dos últimas décadas, pero la metodología necesaria para aislar y mantener durante largo tiempo en cultivo las células cardíacas aisladas de corazones de mamíferos adultos, está aún hoy en día al alcanze de pocos laboratorios de cultivo.

Mientras que los cultivos de embriones y de animales recién nacidos se pueden mantener en cultivo y ser utilizado para experiencias durante largos periodos de tiempo, los miocardiocitos cardíacos adultos de mamíferos se suelen utilizar como preparaciones en fresco de las células recién aisladas y al cabo de las pocas horas se realizan las diferentes experiencias, ya que es muy dificil de mantener por largo periodo de tiempo las células en cultivo. La dificultad de mantener en cultivo a las células cardíacas adultas es en gran medida debido a la pérdida de la capacidad para la síntesis de DNA y posterior división celular de las células cardíacas, habiendose observado que "in vivo" la síntesis de DNA y posterior proliferación celular desciende progresivamente después del nacimiento y llega a cesar por la mitad de la tercera semana de vida postnatal (Claycomb,1975;Erokhina y Rumyantsev,1988), observándose posteriormente que de la misma manera que ocurre "in vivo", la capacidad para la síntesis de DNA y división celular desciende rápidamente después de que las células permanecen la primera semana en cultivo (Bogenman y Eppenberger,1980).

Ha sido en la última década donde se han desarrollado las experiencias del aislamiento y posterior mantenimiento de los miocardiocitos adultos en cultivo por largos periodos de tiempo, anteriormente se habían realizado pocos trabajos en este sentido lograndose aislar las células adultas mediante el uso de métodos enzimáticos utilizando la tripsina junto con la colagenasa. Esta última enzima tendrá gran importancia en el aislamiento de estas células (Jacobson,1977), lográndose mantener las células vivas en cultivo por varias horas

(Nag y col.,1974); pero el rendimiento celular obtenido por estas técnicas fue muy bajo, la viabilidad de las células en cultivo fue muy pobre y además la población de miocardiocitos en cultivo mostraban una gran contaminación de fibroblastos. En 1980, CLAYCOMB y PALAZZO lograron aislar con relativa pureza células cardíacas procedentes de corazones cardíacos adultos, obteniéndose una buena viabilidad celular y lograndose mantener en cultivo por largos periodos de tiempo, resultando esta experiencia básica para los diferentes experiencias posteriores que utilizan cultivos de miocardiocitos adultos.

El aislamiento de las células cardíacas lo realizaron CLAYCOMB y PALAZZO, mediante la perfusión del órgano cardíaco una vez aislado con una solución que contenia como enzíma proteolítica la colagenasa, una vez terminada la perfusión del órgano, el tejido es fragmentado en pequeños trozos y posteriormente fueron incubados por diferentes periodos de tiempo en el medio de perfusión que contiene colagenasa, lográndose obtener una buena cosecha de células viables. Para la gran mayoría de autores es imprescindible la perfusión del órgano antes de los procesos de disgregación de los tejidos para obtener un buen rendimiento celular, pero a veces estos tratamientos enzimáticos y mecánicos prolongados pueden producir un daño celular, por ello los diferentes autores intentan ajustar las condiciones del aislamiento celular, de tal manera que permita obtener una buena cosecha de células viables (Powell,1988).

Las células cardíacas "in vivo" se encuentran en una compleja red tridimensional formada por una serie de proteínas, para intentar mantener el medio ambiente donde se desarrolla las células en el organismo, algunos autores utilizan sustratos artificiales impregnados por proteínas como el colágeno, fibronectina o laminina las cuales forman unas membranas artificiales que favorecen la adhesión celular que en estas células adultas está muy disminuida (Borg y Terracio,1988); otros autores utilizan medios condicionados por otros tipos de

células, ó previamente tratan la superficie de cultivo con algún suero para formar una lamina basal donde se adhieran las células. Mientras que las células se adhieren a las superficies tratadas con colágeno o laminina en 30-60 minutos, la adherencia de estas células en los plásticos utilizados como superficie de cultivo, sin tratamiento previo con las proteínas anteriormente citadas, puede requerir de 5 a 7 días (Jacobson y Piper,1986).

La concentración celular utilizada en la siembra suele ser de 1 x 10^5 células/ml, realizándose en un medio de cultivo cuya base es principalmente el MEM ó el DMEM; pero las células adultas son mucho más exigentes en lo que se refiere a nutrientes que cuando están en su estado embrionario ó postnatal, por ello los medios de cultivo deben de ser suplementados con una serie de nutrientes muy amplios y variados que abarcan diversos tipos de sueros, aminoácidos, vitaminas, proteínas transportadoras como la transferrina, hormonas como la insulina y muy diversas trazas de minerales (Claycomb y Lanson,1984). Para evitar la contaminación del medio por fibroblastos y otras células no musculares se usa la citosina-1-β-D-arabinofuranósido adicionado al medio en los primeros días de cultivo (Claycomb y Bradshaw, 1983).

Del aislamiento celular resulta una mezcla de miocardiocitos en forma de barra o barilla y otros con forma redondeada que generalmente son menos viables que las anteriores, y una serie de células no musculares en su gran mayoría fibroblastos (Wittenberg y Robinson,1981). El tamaño de estos miocitos puede variar, como de por sí ocurre "in vivo" donde los miocitos de un ventrículo u otro presentan diferente tamaño y volumen (Campbell y col.,1989), pero conservan el tamaño cercano al del miocito en el tejido, presentando una longitud de 45-100 µm y un diámetro de 10-30 µm (Decker y col.,1988). Los miocitos que presentan forma barra cilíndrica, muestran un sarcolema arrugado debajo del cual se observan las miofibrillas, mostrando poros periodicamente cada 1,5 µm; durante las primeras cuatro

horas en cultivo las células conservan la forma cilíndrica y sus estriaciones transversales, después empiezan a acortarse, redondearse y a perder sus estriaciones, de tal manera que a las veinticuatro horas más del 95% de las células presentan una forma redondeada, durante este tiempo las células no logran adherirse a la superficie de cultivo. A los pocos días de cultivo las células empiezan a emitir seudopodos de unión hacia la superficie de cultivo , extendiendose y alisándose disminuyendo cada vez la proporción de células redondeadas y observándose algunos contactos entre las células adyacentes. Las células son normalmente binucleadas con un gran nucleolo por cada núcleo, aunque se observan algunas células con cuatro núcleos, el citoplasma contiene granulos oscuros y las miofibrillas están organizadas en bandas; la mayoría de las células presentan contracciones rítmicas durante el proceso de redondear su forma, cesando cuando termina este proceso y volviendo a reanudar las contracciones cuando se han adherido (Claycomb y Palazzo,1980).

Las células viables en forma de barra aisladas de los tejidos cardíacos y posteriormente cultivadas, se extienden y adhieren a las superficies de cultivo pudiendose mantener vivas en el cultivo por periodos de tiempo de 7-14 días, durante este tiempo las células reorganizan su aparato contráctil y su citoesqueleto, reteniendo otras características adultas como es el metabolismo o un elaborado sistemas de túbulos, típicas de las células adultas (Moses y Claycomb,1982); pero a partir de los 14 días el número de células viables que permanece en cultivo es muy bajo aunque algunos autores mantienen cultivos de miocardiocitos ocasionales durante periodos más prolongados de tiempo (Claycomb y Lanson,1984).

I.D.2. Cultivos secundarios de células cardíacas

Por lo general, los cultivos de células cardíacas

son utilizados para las distintas experiencias a los tres o cuatro días de cultivo, debido a la dificultad de mantener por largos periodos de tiempo los miocardiocitos en cultivo y a la poca capacidad proliferativa de estas células en cultivo. Aunque en el estado embrionario las células cardíacas pueden experimentar procesos mitóticos, por las experiencias desarrolladas "in vivo" se sabe que la actividad proliferativa de los miocitos cardíacos desciende gradualmente en el periodo posnatal, llegando a cesar en la tercera semana después del nacimiento (Cluzeaut y Maurer-Schultze,1986).

Los cultivos primarios de células cardíacas embrionarias ó neonatales pueden ser mantenidos en cultivo hasta por cuarenta días en buenas condiciones de viabilidad llegando las células a confluir y formar monocapas; en ese momento las células son tratadas con diferentes procesos enzimaticos para despegar las células y sembrarlas en nuevos frascos de cultivo, observándose que al tratarlas con los enzimas las células cardíacas experimentan un inmediato aumento de la frecuencia del látido cardíaco que cesa rápidamente. Las células transferidas a los distintos frascos de cultivo aparecen redondeadas, más regulares,más transparentes y la población celular es más uniforme; comenzando pronto a adherirse a la superficie de los frascos de cultivo y vuelven a latir pero sólo por pocas horas. Las células en estas condiciones continuan creciendo y se dividen de una manera irregular, así mientras algunos cultivos logran duplicar la población celular tres o cinco veces a la semana, otros sólo lo consiguen una vez, pero siempre en una forma mucho más lenta que lo hacen las líneas celulares establecidas a partir de otros tipos celulares (Harary y Farley,1963).

Las células cardíacas adultas, cuando crecen en cultivo, se ha observado que mantienen la mayoría de las propiedades ultraestructural s, bioquímicas y fisiológicas del miocardiocito adulto. Los miocardiocitos cardíacos ventriculares adultos procedentes de mamíferos están considerados como células

que han terminado su diferenciación y han perdido su capacidad de proliferar (Zak,1984), en cambio se cree que los miocardiocitos procedentes de la aurícula pueden retener un pequeño potencial mitótico (Rumyanchev,1977). Pero en experiencias realizadas en cultivos de miocardiocitos procedentes de aurículas y ventrículos de corazones adultos de mamíferos, se ha observado que estas células cuando crecen en cultivo son capaces de sintetizar DNA,readquiriendo la capacidad de replicación del DNA perdida en las primeras etapas del desarrollo postnatal (Cantin y col.,1981;Claycomb y Bradshaw,1983;Nag y Cheng,1986).

Basándose en los datos obtenidos con las experiencias "in vitro", en los últimos años de la década de los ochenta y en la actualidad diversos grupos de investigación dirigen sus trabajos hacia la búsqueda de los medios y sustancias que puedan estimular la actividad biosintética del DNA y en examinar los mecanismos implicados que regulan el reinicio de la replicación del DNA con posterior proliferación de estos miocardiocitos adultos que han finalizado su diferenciación, así como para estimular la proliferación de las células cardíacas embrionarias y neonatales en cultivo, para poder obtener cultivos secundarios de estas células.

La reactivación de la síntesis del DNA puede ocurrir en los cultivos primarios de las células, por ello diversos autores han utilizado sustancias que pueden encontrarse los miocardiocitos en su medio natural, para ello suministran a los cultivos extractos de embriones o extractos crudos de tejido cardíaco que se ha visto que contienen una gran cantidad de factores de crecimiento los cuales influyen en el crecimiento y diferenciación de células musculares esqueléticas en cultivo, que por tanto podrían influir en la proliferación de los miocardiocitos (Florini,1987). Se ha observado que extractos de tejidos cardíacos procedentes de embriones de adulto y de gallina estimulan la síntesis de DNA en los miocitos y ello es debido a que en estos tejidos se encuentran en gran cantidad de factores

de crecimiento (sobre todo el factor de crecimiento fibroblástico y el factor de crecimiento parecido a la insulina) que son los que estimulan la capacidad proliferativa del miocardiocito en cultivo (Kardami,1990).

Además de diversos factores de crecimiento aislados que son añadidos al medio de cultivo, también se ha observado que diversas sustancias químicas pueden activar la síntesis del DNA, utilizándose con éxito un promotor de tumores como son los ésteres derivados del forbol y los diacilgliceroles, aunque estas sustancias también, al ser tóxicas, pueden alteran la morfología celular, extendiendose las células de una forma más delgada a lo largo de la superficie de cultivo, adquiriendo multiples núcleos y sufren fragmentación nucleolar (Claycomb,1988;Claycomb y Moses,1988).

En los últimos años también se está profundizando en el papel que podrían jugar los diferentes oncogenes conocidos en la diferenciación y proliferación de las células cardíacas (Saule y col.,1987), observándose diferencias diversas en la expresión de los diferentes oncogenes en el tejido cardíaco y en el esquelético, así como que la expresión de estos oncogenes difiere entre el tejido cardíaco adulto y el embrionario (Claycomb y Lanson,1987). También se utilizan virus recombinates humanos como vectores de genes los cuales puedan activar la capacidad proliferativa de estas células cardíacas en cultivo y que dichas células puedan expresar proteínas codificadas por un gen extraño a su genoma (Sen y col.,1988).

I.D.3. Aplicaciones de los cultivos de células cardíacas

La utilización de células cardíacas aisladas en cultivo tiene numerosas ventajas para el estudio del comportamiento celular ante situaciones fisiológicas normales del

organismo o la reacción frente a agresiones extrañas. Mediante la utilización de esta tecnología se puede medir parámetros de la función celular que no podrían ser medidos en animales de experimentación ó en corazones perfundidos, ya que la función celular se vería influída por elementos nerviosos y hormonales endógenos. La ausencia de las barreras de difusión de las sustancias presentes en el animal, nos permite acortar el tiempo de las experiencias y el poder observar el efecto directo sobre las células de las sustancias a la concentración deseada. Otra gran ventaja es que las condiciones experimentales pueden ser rigurosamente controladas y los resultados obtenidos en uno u otro cultivo son comparables debido a la homogeneidad de los cultivos.

Han sido numerosas las experiencias realizadas para poder conocer los mecanismos funcionales básicos de los miocardiocitos,sobre todo los mecanismos que intervienen en la característica principal de estas células como es su capacidad de latir. Se pudo conocer en cultivo, al aislar las células cardíacas, que cada célula tiene la capacidad innata de latir y se estudió la influencia de diferentes componentes fisiológicos del suero sobre el latido celular (Harary y col.,1966), desarrollandose posteriormente numerosos estudios sobre el inotropismo y el cronotropismo de los miocardiocitos en cultivo (Marsh y col.,1983;Lechat,1978).

La célula cardíaca presenta una gran actividad electrofisiologica, por ello, se han utilizado los cultivos de miocardiocitos para conocer el papel de los distintos iones presentes en los fluidos biologicos implicados en los procesos electrofisiologicos desarrollados por estas células y el flujo iónico a través de las membranas (Sperelakis,1972;Jacobson y col.,1988). El papel que juega la bomba Na^+-k^+ en el trasvase de los iones a un lado u otro de la membrana y la relación entre la concentración de iones y la carga eléctrica puede ser estudiado en estos cultivos, dirigiéndose estos estudios hacia el ión Ca^{++}

debido al importante papel que juega en los procesos acoplados de excitación-secreción y excitación-contracción de la contracción cardíaca (Barry y Smith,1982;Burt y Langer,1982), ó la influencia ejercida por este ión en la secreción del factor natriuretico atrial (ANF) que es una hormona secretada por los miocardiocitos auriculares que posee una actividad vasodilatadora y diurética (Shields y Glembotski,1988;Sei y Glembotski,1990).

Se ha podido profundizar en el conocimiento de la actividad bioquímica de la célula cardíaca por el uso de los cultivos celulares, ya que esta metodología nos permite definir la composición cualitativa y cuantitativa de los medios extracelular, poder monotorizar el medio ambiente intracelular para poder conocer las interacciones que ocurren entre los diferentes componentes y las sustancias extracelulares, siendo especialmente importante para el estudio de ciertos procesos bioquímicos como es el catabolismo de los nucleótidos de adenina ó la actividad de la lipoprotein lipasa, donde es importante que la actividad del miocardiocito no se vea influída por otras células (Wittenberg y Haworth,1988); se ha podido profundizar en el estudio de la fosforilación oxidativa desarrollada, la glucolisis celular, el metabolismo de los ácidos grasos principal fuente de energía de estas células o la influencia en la procesos bioquímicos ejercida por diversas sustancias (Doorey y Barry,1983;Laurent y col.,1986).

Los estudios morfológicos de las células en cultivo permiten un mejor conocimiento de la ultraestructura celular, estudiando la influencia que pueden ejercer las condiciones medio ambientales en la evolución de la morfología celular a lo largo del tiempo de cultivo y la adaptación de estas células a las características específicas de las experiencias desarrolladas "in vitro" (Jacobson y col.,1988).

La tecnología de cultivos celulares ha proporcionado un modelo experimental. Así se puede reproducir las

condiciones en que se encuentran las células cardíacas en el organismo vivo cuando ocurren procesos patológicos como la isquemia cardíaca. Es conocido que los eventos que ocurren en al isquemia "in vivo" son comparables con los que ocurren enlas isquemias desarrolladas en corazones perfundidos, habiéndose observado que el daño producido por isquemias experimentales en las células cardíacas en cultivo es de un grado similar al producido en experiencias desarrolladas en corazones perfundidos "in vivo" (Jennings y col.,1981). La reproducción de la anoxia cardíaca se puede desarrollar mediante el uso de agentes artificiales añadidos al medio de cultivo que dañan la cadena respiratoria y la glucolisis (Higgins y col.,1981) o reduciendo del ambiente de cultivo el oxígeno y la glucosa, tal como ocurre en la isquemia "in vivo" (Vemuri y col.,1985), lo cual nos proporciona una buena herramienta para el estudio de los procesos básicos que ocurren en las células en estas condiciones anaeróbicas y la alteración producida en el funcionamiento celular (Mustafa y col.,1975;Vemuri y col.,1989).

Una de las aplicaciones más importante que tienen los cultivos de células cardíacas es la investigación de las respuestas del miocardiocito ante manipulaciones farmacológicas. En los ensayos farmacológicos llevados a cabo con modelos experimentales desarrollados en tejidos y órganos animales, la respuesta celular está condicionada por diversos factores neuronales ,hormonales y a veces de complicadas interacciones mecánicas necesarias para producir el estímulo celular, estando implicadas un gran número de células en la respuesta al estímulo externo. Mientras que en las experiencias realizadas sobre cultivos de células cardíacas el estímulo va a actuar solamente sobre las células dianas, pudiendose manipular con facilidad los parámetros que definen al estímulo externo y la respuesta de la población celular homogénea puede ser estudiado. La medida de la respuesta celular se puede basar en criterios morfológicos (formas celulares, cambios ultraestructurales en las sarcómeras,etc.), bioquímicos (sintesís de DNA, concentración de

metabolitos,etc.), fisiológicos (flujo de iones a través de las membranas,efecto en bomba Na^+-K^+,etc.), electrofisiológicos (potencial de membrana,canales del calcio,etc.) o complejas respuestas de la célula entera (viabilidad celular, contracción,etc) El tiempo necesario para obtener la respuesta celular a los estímulos externos puede variar de segundos-horas hasta varias horas-días dependiendo del agente utilizado (Simpson,1988).

Mediante este modelo experimental "in vitro" se pueden preparar curvas de dosis del fármaco-respuesta celular, estudiar los fenómenos de sinergismo y antagonismo entre distintos fármacos y el estudio de los mecanismos básicos relacionados con la respuesta celular como puede ser el estudio de los receptores para los fármacos o sus antagonistas (Simpson,1985; Suignard-Khasiye y Le Douarin,1985).

La naturaleza de los fármacos utilizados para los bioensayos farmacológicos es muy diversa utilizandose a veces biomoléculas conocidas como la insulina para estudiar su potencial terapeútico o la utilización de sustancias sintetizadas en el laboratorio para el estudio de su posible utilidad como sustancia terapéutica. A veces las experiencias se realizan con fármacos de uso cotidiano, como pueden ser los fármacos con acción antiarrítmica cardíaca, para poder esclarecer su mecanismo de acción que a veces no está muy clarificado (Hill y col.,1988). Estos cultivos también están resultando ser muy útiles para el estudio de los efectos de los diferentes tóxicos sobre estas células, realizándose bioensayos con tóxicos normales como puede ser el veneno producido por el escorpion (Fayet y col.,1974) o la toxicidad no deseada que se manifiesta en forma de efectos secundarios de los fármacos de uso cotidiano que pueden alterar las funciones o estructuras celulares que son necesarias para el buen funcionamiento celular (Lewis y col.,1982; Lewis y González,1987a; González y col.,1991).

I.D.4. Cultivos de células cardíacas humanas

En la última década han sido descritas diversas técnicas para el aislamiento de células cardíacas adultas procedentes de corazones de diferentes especies de mamíferos, pero han sido escasos los trabajos dirigidos hacia la obtención de células adultas viables procedentes de corazón humano. Aunque se han desarrollado técnicas que obtienen cultivos celulares de diversos tejidos humanos (Gibson-D`Ambrosio y col.,1986), pero la obtención de cultivos cardíacos humanos ha tenido menos éxito, tal vez debido a que la accesibilidad al tejido cardíaco donde se han de extraer las células está muy restringida y también el escaso rendimiento resultante de las limitadas experiencias realizadas hasta la actualidad.

El aislamiento y posterior cultivo de miocardiocitos humanos están basados en la tecnología utilizada en las experiencias realizadas en otras especies de mamíferos(Claycomb y Palazzo,1980:Jacobson y col.,1985), abarcando muy diversas especies entre ellas una especie muy cercana a los humanos como son los primates(Claycomb y Moses,1985). La edad de los corazones utilizados abarca desde las 14-16 semanas de gestación fetal, jovenes (2,5 años de edad) y diversas corazones adultos que abarcan las diferentes décadas de la vida humana hasta los sesenta y nueve años de edad; se utiliza colagenasa como enzima proteolítica y el medio de cultivo donde van a ser sembradas las células son los mismos que se utilizan para otras especies de mamíferos, sólo que en este caso suele ser elevado el contenido de glucosa (Claycomb,1988).

Las células una vez en cultivo son de forma cilíndrica, con estriaciones transversales, observándose un porcentaje de células mayor del 50% de células binucleadas y el resto son uninucleadas, las células cilíndricas se adhieren rápidamente a las redes tridimensionales formadas por el colágeno

o laminina conservando su forma cilíndrica durante los tres primeros días de cultivo. Al cabo de algunos días más en cultivo, las células se extienden, no reapareciendo las estriaciones desaparecidas en los primeros días de cultivo y conforme avanza el tiempo de cultivo va adoptando una morfología parecida a los fibroblastos. No se ha observado contracción espontánea de estas células en cultivo (Bugaisky,1988).

Un gran inconveniente, hasta el momento, de los cultivos cardíacos humanos, en las escasas experiencias desarrolladas hasta ahora, es que el porcentaje de células viables obtenidas para poder ser utilizados en los diversos estudios funcionales de la célula cardíaca humana, es muy pequeño. Los estudios realizados han ido enfocados al establecimiento de las condiciones ideales para el aislamiento y cultivo de las células cardíacas, y la aplicación de estos cultivos para la evaluación de los efectos hormonales sobre los genes que regulan la expresión de factor natriuretico atrial (ANF) en los miocardiocitos ventriculares , observándose que dicha expresión puede ser estimulada en las células cardíacas ventriculares cuando están en cultivo (Claycomb,1988).

I.E. Fármacos de mayor uso en la terapia de las enfermedades cardiovasculares

I.E.1. Incidencia actual de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y de mortandad de los países desarrollados, llegando a ser la causante de las dos terceras partes de todas las muertes que tienen lugar en los países occidentales. A principios de la década de los cincuenta un 15% de las muertes producidas fue a causa de cardiopatías, pero treinta años

después, a principios de la década de los ochenta las cardiopatias eran la causa del 50% de las muertes producidas; casi la mitad de las muertes por cardiopatías son debidas a la cardiopatía isquémica como causa secundaria de la arteriosclerosis coronaria, seguida en importancia por la cardiopatía hipertensiva y por la cardiopatía reumática crónica. En la actualidad, como hemos dicho anteriormente, las enfermedades cardiovasculares son la causa de las dos terceras partes de las mortalidad en los países desarrollados; siendo en los países de la Europa del Este donde se dan la más elevadas tasas de mortalidad, las cuales en el caso de los varones son cercanas o exceden de 800 por 100.000 habitantes ((Polonia (781,0), Hungría (793,5), URSS (806,7), Checoslovaquia (819,2) y Rumanía (823,2)), mientras que en los países europeos mediterraneos y en el Japón se localizan las tasas de mortalidad más bajas, normalmente inferiores a 400 por 100.000 habitantes (Japón (291,0), Francia (348,6) y España (397,1)). En el caso de las mujeres las tasas de mortalidad, son inferiores que la de los varones de sus respectivos países y así en los países del este europeo la tasa es de 500 por 100.000 habitantes, comparados con los 201,9 por 100.000 habitantes en el Japón y los 205,4 por 100.000 habitantes en el caso de Francia (World Health Stat.Q., 1990). La morbilidad hospitalaria de las enfermedades cardiovasculares en nuestro país también es elevada (1.255 por 100.000 habitantes), comparados con las otras enfermedades predominantes , causantes de elevadas morbilidades hospitalarias y de elevada mortalidad, tal como los distintos tumores malignos (692 por 100.000 habitantes) o las anomalías congénitas (148 por 100.000 habitantes) (Encuesta de Morbilidad Hospitalaria I.N.E.,1987).

La enfermedad coronaria del corazón o isquemia cardíaca es la causante del 34% de la mortalidad cardiovascular y en las últimas décadas es considerada como el mayor problema de la salud pública de los países industrializados, encontrándose los niveles más elevados de mortalidad en los países de la Europa

del Este (URRS (486,2), Checoslovaquia (409,0) y Hungria (328,0) y en los países nórdicos europeos y anglosajones (Finlandia (391,0),Irlanda (390,1),Nueva Zelanda (349,5) y Suecia (340,0)); como en el caso de las estadisticas referidas a las enfermedades cardiovasculares en su totalidad, las tasas de mortalidad más bajas están localizadas en los países del sur de Europa (Grecia (123,1), Francia y España (114,5), y Portugal (108,49) y en un pais muy industrializado como el Japón (52,5). Así mismo, las tasas de mortalidad son más elevadas en los varones que las tasas correspondientes a las mujeres de sus respectivos países, en el caso de la URRS la mortalidad femenina por esta enfermedad es de 296,6 por 100.000 habitantes y en el Japón es de 30,5 por 100.000 habitantes, esto parece ser debido a las diferencias fisiológicas y hormonales existentes entre ambos sexos (World Health Stat.Q., 1990). La morbilidad hospitalaria de la isquemia cardíaca en nuestro pais es de 311 por 100.000 habitantes, observándose que la incidencia en los varones (443) es más del doble que la observada en las mujeres (185) (Encuesta de Morbilidad Hospitalaria I.N.E.,1987).

También es significativo destacar el descenso observado en las tasas de mortalidad de los Estados Unidos y otros países anglosajones desde la década de los sesenta (Estados Unidos (520) y Canada (470)) hasta la actualidad (275), debido a cambios en los hábitos de vida y de alimentación los cuales disminuyen los factores de riesgo que predisponen al padecimiento de estas enfermedades. En los últimos años, a pesar de haber disminuido la tasa de mortalidad, en países desarrollados occidentales como en los Estados Unidos, la isquemia cardíaca es la causante de casi un 40% de la mortalidad total de la población (National Center for Health Statistics,1984).

Los tres factores de riesgos principales que predisponen para el padecimiento de esta enfermedad son: los niveles elevados de lípidos en sangre (hiperlipémia), los altos

niveles de presión sanguínea (hipertensión) y el tabaco (Carleton y col.,1987). Otros factores de riesgo de menor importancia que pueden influir, pueden ser la obesidad, edad avanzada, factores de tipo hereditario, el estilo de vida sedentario o la presencia de diabetes mellitus (Gordon y Rifkind,1989), y últimamente se ha profundizado en el estudio de ciertos factores medioambientales (status social, aislamiento social, hostilidad,etc.) que pueden aumentar los niveles del stress de vida, el cual se ha observado que al interaccionar con los otros factores de riesgo, aumenta el riesgo de padecimiento de la isquemia cardíaca (Eliot,1987). El binomio etiológico formado por la hiperlipemia y la hipertensión además de ser los principales causantes de las afecciones cardíacas, son la causa fundamental de los accidentes vasculares cerebrales, siendo los causantes de más de la mitad de las muertes producidas en humanos.

El interés por el estudio del papel desarrollado por la hiperlipemia como factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares ha ido aumentando conforme avanzaba la década de los ochenta; habiéndose observado, a partir de estudios estadísticos de población realizados durante los años setenta, que existe una correlación entre los niveles séricos de lípidos de la población y las tasas correspondiente a la mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Uemura y Pisa,1985). Se han realizado numerosas investigaciones acerca de la importancia de los lípidos, y sobre todo del colesterol, como factor de riesgo de las afecciones cardiovasculares; el riesgo de padecer enfermedad cardíaca coronaria con respecto a los niveles de colesterol total en plasma, es graduado y continuo (Stamler y col.,1986; Martin y col.,1986). Esta correlación intensamente positiva y constante entre los niveles de colesterol en plasma y la mortalidad por enfermedad cardiovascular, se ve correspondida por estudios epidemiológicos de prevención primaria en los que se observan un descenso en la morbilidad y mortalidad debida a enfermedades cardiovasculares cuando se produce una reducción de

los niveles medios de colesterol plasmático en la población (Pyörälä y col.,1985).

El colesterol plasmático total es el factor de riesgo conocido más importante relacionado con la incidencia de la cardiopatía isquemica y determinante en la distribución geográfica de las enfermedades cardiovasculares, estos hechos fueron observados en estudios epidemiológicos clásicos sobre la incidencia de las enfermedades cardíacas coronarias en la población (Keys,1970; Gordon y col.,1977); en estos estudios realizados sobre distintas poblaciones demostraron que la incidencia de enfermedades cardíacas coronarias de una comunidad determinada depende fundamentalmente de los niveles plasmáticos de colesterol y los otros factores de riesgo relacionados con estas afecciones cardíacas (hipertensión, tabaco, obesidad, etc.), sólo adquieren importancia cuando existe riesgo a causa del elevado nivel de colesterol en sangre (hipercolesterolemia , siendo los niveles plasmáticos de colesterol el único factor de riesgo capaz de justificar la variación geográfica de la incidencia de las enfermedades cardíacas coronarias entre las distintas poblaciones (Ball y Mann,1991a).

En los indíviduos pertenecientes a una misma comunidad también se observa una relación significativa entre los niveles plasmáticos de colesterol y la incidencia de enfermedades cardiovasculares, ello es debido principalmente a las diferencias existentes en las dietas alimentarias de los individuos de una misma población (Thorogood y col.,1987). La asociación entre los niveles plasmáticos de colesterol y enfermedades cardiovasculares se observan en ambos sexos, por tanto la incidencia de estas enfermedades no depende directamente de factores como el sexo o la edad, sino de los niveles plasmáticos de colesterol en los individuos, los cuales pueden variar con el sexo y la edad del individuo (WHO MONICA Project,1988).

Se han realizado diversos estudios de la distribución de los niveles plasmáticos de colesterol en las poblaciones de diversos países, para intentar relacionar los niveles de colesterol sérico con el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, detectándose los niveles "normales" en diversas poblaciones localizadas por areas geográficas, no coincidiendo muchas veces estos valores "normales" que son los más frecuentes para una determinada población con los valores de colesterol sérico considerados como "óptimos" para evitar en lo posible el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. La determinación del valor del nivel "óptimo" de colesterol sérico ha llevado a una variada divergencia entre los diferentes autores y los valores adjudicados a diferentes poblaciones de distinta distribución geográfica, pero hoy en día esta ampliamente admitido como valores de colesterol plasmático "óptimo" los sugeridos por la Sociedad Europea de Aterosclerosis que consideran como valores "óptimos" concentraciónes plasmáticas de colesterol de 200 mg/ml o inferiores a dicho valor, debiendose aumentar el grado de alerta cuando la concentración es de 210 mg/ml o superiores (Study Group, European Atherosclerosis Society, 1987). Algunos autores han sugerido que debe ser tenido en consideración dos variables como son la edad y el sexo de los individuos para determinar el valor aconsejable de colesterol plasmático, pues se ha observado que en el caso del varón los valores séricos de colesterol aumentan hasta los cuarenta y cinco años, tendiendo a estabilizarse a partir de esa edad; el sexo también influye, observándose niveles inferiores de colesterol plasmático en las mujeres con respecto a los varones de edad similar, pero después de la menopausia los niveles plasmáticos de colesterol en la mujer son más elevados que los de los varones correspondientes a su misma edad, debido a cambios hormonales (Ball y Mann,1991a).

Los estudios clásicos epidemiológicos relacionaban la incidencia de cardiopatía isquémica con los niveles de colesterol plasmático de la población (Gordon y col.,1977), la

relación existente es independiente y significativa en los estudios epidemiológicos referidos a los grupos de población comprendidos entre los 40-50 años de edad (Pooling Project Research Group, 1978), mientras que para los grupos de población de edades superiores a los 55 años el poder predictivo basado en la relación entre los niveles plasmáticos de colesterol y el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria, se encuentra debilitado; para poder justificar dicha relación en los grupos de población de edad avanzada, se debe considerar el colesterol en sus fracciones lipoproteicas para justificar el riesgo coronario. Estudios epidemiológicos posteriores pusieron de manifiesto la relación existente entre los niveles plasmáticos de colesterol-LDL (Lipoproteína de baja densidad "Light Density Lipoprotein") y colesterol-HDL (lipoproteína de alta densidad "Hight Density Lipoprotein") y las enfermedades coronarias (Miller y col.,1981), observándose que la disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y de colesterol-LDL están asociados a una disminución de la morbilidad y de la mortalidad por cardiopatía coronaria (Lipid Research Clinics Program, 1984).

Los últimos estudios metabólicos y epidemiológicos han servido para una mejor comprensión del papel que juegan el colesterol y las lipoproteínas en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, observándose una positiva, independiente y significativa relación entre el riesgo coronario y el colesterol-LDL; mientras que el colesterol-HDL está inversamente relacionado con el riesgo coronario, para los grupos de población que abarca a hombres y mujeres de edad superior a los 55 años. El hecho de que las LDL tengan un efecto promotor de las afecciones coronarias y que las HDL tengan un efecto protector ante estas enfermedades, han conducido a la conclusión de que el efecto neto del colesterol en el riesgo coronario viene determinado mucho mejor por la relación colesterol total/colesterol-HDL o colesterol-LDL/colesterol-HDL (Tomás Abadal,1988).

Otro de los factores de riesgo importantes a tener en cuenta para el estudio de la incidencia de las enfermedades cardiovasculares en la población es la presión sanguínea, observándose en poblaciones de alto riesgo coronario una estrecha relación entre las cardiopatías y las presiones arteriales sistólica y diastólica; diversos autores demostraron que la presión sistólica superior a 160 mmHg o la diastólica superior de 95 mmHg producen un aumento de 2-3 veces el riesgo de cardiopatía coronaria (Gordon y col.,1981), produciendo un aumento aún mayor del riesgo de padecer enfermedad vascular cerebral. El tratamiento de la hipertensión, que en nuestro pais tiene una morbilidad hospitalaria de 63 por 100.000 habitantes (Encuesta de Morbilidad Hospitalaria I.N.E.,1987), produce una disminución de la mortalidad.

El tabaco es el tercer gran factor de riesgo a tener en consideración en los estudios epidemiológicos sobre la incidencia de las enfermedades cardiovasculares, los cuales muestran una relación lineal entre el consumo de tabaco y las cardiopatías coronarias. Está demostrado que en los países con elevada incidencia de afecciones coronarias en los varones que fuman más de 20 cigarrillos/día presentan un riesgo de morir por cardiopatía coronaria de 3-4 veces superior a los no fumadores (Keys, 1980). Los grandes fumadores que consumen un gran número de cigarrillos al día, presentan niveles elevados de carboxihemoglobina en sangre y como consecuencia de ello tienen ligeramente reducido el contenido de oxígeno en sangre, presentando un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular o cerebrovascular. La muerte súbita debida a cardiopatía tiene una incidencia tres veces superior en fumadores que en no fumadores, observándose "post mortem" que las lesiones ateroscleróticas observadas en la aorta y arterias coronarias, están estrechamente relacionadas con los hábitos tabáquicos (Bail y Mann,1991b).

Los estudios epidemiológicos acerca de la incidencia de las enfermedades cardiovasculares han puesto en

evidencia que aunque los niveles plasmáticos de colesterol presenten un alto riesgo coronario, la incidencia de este valor sérico como factor de riesgo elevado está modulada por la presencia y niveles de otros factores de riesgo, pudiendose concluir que el riesgo que presenta la población de padecer enfermedades cardíacas coronarias es multifactorial (Tunstall-Pedoe y Smith,1990). Diversos estudios han mostrado cómo otros factores de riesgo como el tabaco aumentan la incidencia de la mortalidad por enfermedades cardíacas coronarias debida a la actuación del colesterol como factor de riesgo (Kannel y col.,1986), otros autores han realizado estudios estadísticos asociando los tres factores de riesgo más influyentes (colesterol plasmático, hipertensión y tabaco), observándose un aumento de la mortalidad cuando los indivíduos presentan niveles elevados de colesterol en sangre, presiones diastólicas superiores a 90 mmHg y son fumadores (Tunstall-Pedoe,1989).

I.E.2. Esquema del metabolismo de lipoproteínas

Los lípidos que son unas sustancias hidrofóbicas, salvo los ácidos grasos y algunas pequeñas excepciones como el retinol y la lisolecitina, se transportan en el plasma humano asociados con unas proteínas (denominadas apolipoproteínas) en forma de lipoproteínas. Todas las lipoproteínas plasmáticas comparten la misma estructura micelar formada por un núcleo hidrofóbico compuesto por lípidos neutros (triglicéridos y ésteres del colesterol), que está separado del medio acuoso por una cubierta formada por lípidos polares (fosfolípidos y colesterol libre) y apolipoproteínas. Las apolipoproteínas son las encargadas de mantener la estructura de las lipoproteínas y además algunas apolipoproteínas poseen funciones reguladoras del metabolismo lipídico; en las lipoproteínas plasmáticas se pueden encontrar ocho tipos de apolipoproteínas: A-I, A-II, B-48, B-100, C-I, C-II, C-III y E. Las lipoproteínas plasmáticas son

particulas que presentan generalmente morfología esférica, salvo las HDL nacientes que adoptan morfología discoidal; las lipoproteínas están en estado de equilibrio entre sí y con los tejidos, siendo la velocidad de transferencia de sus componentes variable, de tal manera que el colesterol libre se equilibra rápidamente mientras que el esterificado lo hace lentamente y necesita la participación de un factor proteico de transferencia (Mahley y col.,1984).

Las lipoproteínas plasmáticas se pueden clasificar en función de su densidad en : quilomicrones (densidad <0,95 g/ml), lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL ("very light density lipoprotein") (densidad: 0,95-1,006 g/ml), lipoproteínas de baja densidad o LDL ("light density lipoprotein") (densidad: 1,019-1,063 g/ml) y lipoproteínas de alta densidad o HDL ("hight density lipoprotein") (densidad: 1,063-1,21 g/ml). Las partículas lipoprotéicas presentan una heterogeneidad en cuanto a su tamaño y composición, siendo más elevado su contenido lipídico conforme aumenta el tamaño de las particulas y disminuyendo la densidad de la partícula con el aumento del contenido lipídico.

Los lípidos procedentes de la dieta sufren una hidrólisis parcial en el intestino delgado, produciéndose monoglicéridos y ácidos grasos libres que son absorbidos y luego reesterificados en las células de la mucosa formándose triglicéridos. El colesterol también es absorbido en el intestino delgado y se combina con triglicéridos,fosfolípidos y apolipoproteínas específicas de las células intestinales formándose los quilomicrones que son ricos en triglicéridos, dependiendo su contenido en triglicéridos y de ésteres del colesterol de la tasa de absorción de colesterol y de ácidos grasos de origen alimentario; los quilomicrones una vez formados son secretados al sistema linfático y a través de éste pasan a la circulación sanguínea.

La VLDL es otra lipoproteína plasmática rica en

triglicéridos, que se sintetiza principalmente en las células hepáticas, procediendo su composición en triglicérido del exceso de ácidos grasos circulantes en la sangre que no son incorporados a la vía oxidativa y también del exceso de hidratos de carbono de la dieta. Para que se produzca la síntesis intracelular de las VLDL es necesario la presencia de la apolipoproteína B-100 en los hepatocitos, de igual manera que es indispensable la presencia de la apolipoproteína B-48 en las células intestinales para la formación de los quilomicrones.

En la circulación los quilomicrones transportan los lípidos desde el intestino a otros tejidos y las VLDL lo hacen desde el hígado, durante dicho transporte dichas lipoproteínas ricas en triglicéridos sufren la acción hidrolítica de la lipoproteinlipasa, enzima catalítica que se sintetiza en las células parenquimatosas y a continuación es transportada y fijada a las células del endotelio arterial de muchos tejidos. La fijación de los quilomicrones y de las VLDL a la lipoproteinlipasa produce la hidrólisis de los triglicéridos; los ácidos grasos y glicéridos liberados son captados y oxidados en las células musculares, representando la principal fuente de energía para el metabolismo aerobio en el músculo, ó bien los ácidos grasos liberados son reesterificados, sobre todo en el tejido adiposo. A medida que los triglicéridos son hidrolizados la partícula residual disminuye y se forman los remanentes de quilomicrones y de VLDL, partículas que están desprovistas de la mayoría de los triglicéridos, fosfolípidos y apo C, pero conservan las apo B y apo E.

Los remanentes de quilomicrones son eliminados del torrente circulatorio, al ser captados por el hígado mediante la unión a unos receptores específicos que reconocen la apo E y son posteriormente introducidos en el interior celular por un proceso de endocitosis. Los remanentes de VLDL o IDL sufren una degradación gradual por pérdida de triglicéridos y apoproteínas convirtiendose la mayor parte en LDL antes de producirse su

depuración plasmática.

La LDL es una partícula rica en colesterol y su metabolismo está intimamente ligado al metabolismo del colesterol. El colesterol que es componente necesario de las membranas celulares de los mamíferos, es sintetizado principalmente en el hígado y los tejidos periféricos obtienen la mayor parte del colesterol que utilizan a partir de las LDL; los excesos de colesterol se almacenan en forma de depósitos de esteres del colesterol, lo cual produce un aumento del riesgo de padecimiento de enfermedades cardiovasculares.

Las IDL y las LDL son depuradas del plasma por fijación y posterior endocitosis mediadas por receptor, que en el caso de las IDL tiene lugar en el hígado por receptores específicos de apo E , en el caso de las LDL tiene lugar en el hígado y tejidos extrahepáticos mediadas por receptores específicos de apo B-100 situados en la membrana plasmática. Mediante el proceso de endocitosis mediada por receptor la concentración de lipoproteína intracelular es 50 veces superior a la concentración plasmática y el mecanismo posterior de degradación intracelular es similar para LDL y para IDL. En el interior celular la vesícula membranosa formada por la lipoproteína y su receptor que se denomina endosoma sufre la escisión de los receptores que vuelven a la membrana celular y la vesícula que contiene la lipoproteína se fusiona con un orgánulo digestivo denominado lisosoma para formar un lisosoma secundario, en el cual las lipasas ácidas se encargan de hidrolizar los lípidos componentes de las lipoproteínas y las proteínas por acción de proteasas se degradan hasta sus aminoácidos libres que la forman. El colesterol liberado en el lisosoma difunde al exterior y puede ser utilizado por la célula para la formación de membrana plasmática; el exceso de colesterol libre que se convierte en ésteres del colesterol, inhibe a la HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A reductasa) la enzíma que cataliza la etapa reguladora de la

biosíntesis del colesterol, además inhibe la biosíntesis de receptores de LDL.

Existe otra vía de depuración plasmática de LDL que no está mediada por estos receptores de alta afinidad dependiente de apo B-100,E, esta vía con receptores de baja afinidad se da en el hígado y otros tejidos, adquiere mayor importancia cuando aumenta mucho la concentración plasmática de LDL, aunque la expresión de este tipo de receptores no está influenciada por el contenido de colesterol celular (Soler-Argilaga,1988).

La actividad de los receptores de alta afinidad de LDL es el factor determinante principal de los niveles plasmáticos de LDL y colesterol, los defectos en la actividad del receptor de LDL conduce a que las IDL no puedan ser degradadas en los tejidos periféricos y se transforman en LDL muy ricas en colesterol, que van aumentando progresivamente su nivel plasmático y el colesterol se puede acumular en las arterias de las personas afectadas, aumentando el riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Los defectos en la biosíntesis del receptor de LDL puede ser de dos tipos: que la biosíntesis del receptor se realize de forma incompleta, de tal manera que no se forme la región de unión a la LDL o en otros individuos aunque el receptor se forma completamente pero no se distribuye adecuadamente en la membrana plasmática; la consecuencia del defecto en la biosíntesis del receptor es que las LDL no pueden ser absorbidas y permanecen en el plasma, caracterizando a la patología conocida como hipercolesterolemia familiar (Goldstein y Brown,1983). El grado de expresión de los receptores de LDL aumenta ó disminuye de acuerdo con las necesidades de colesterol de la célula y está regulada por factores genéticos, hormonales, dietéticos y farmacológicos.

El otro gran grupo de lipoproteínas plasmáticas lo forman las HDL son las encargadas del transporte reverso de

colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado donde es catabolizado y excretado en forma de sales biliares por la bilis. Las HDL recién formadas o HDL nacientes son partículas discoidales de unos 20 nm de diámetro y 4,5 nm de espesor, no poseen esteres del colesterol y existen evidencias de que tienen un origen hepatointestinal, aunque no han podido ser identificadas en las estructuras subcelulares del hígado y del intestino (Magun y col.,1985; Hamilton y col.,1976); también pueden formarse en el plasma como subproductos de la degradación de las otras lipoproteínas ricas en triglicéridos (Redgrave y Small,1979). Las HDL nacientes mediante la intervención del enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) que se activa por la apo A-I y cataliza la transferencia de un grupo acilo graso de la fosfatidilcolina o lecitina al grupo hidroxilo libre del colesterol en la superficie de HDL formándose ésteres del colesterol, que por razones de solubilidad los ésteres recién formados se transfieren al interior de la partícula HDL que se van convirtiendo en partículas maduras esferoidales. Además las HDL poseen la apo C-II la cual activa la lipoprotein lipasa que cataliza la liberación de los triglicéridos del núcleo de los quilomicrones y VLDL.

Una parte de los esteres de colesterol formados en las HDL son transferidos a las lipoproteínas de baja densidad y a través de las cuales llegan al hígado y a los otros tejidos, otra parte de HDL se ha observado en cultivos celulares "in vitro", que son capaces de fijarse en la superficie celular produciendo la captaciór de los ésteres de colesterol por la célula y el reflujo de colesterol libre a las HDL (Miller y col.,1977). Así pues, la HDL transportan el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado, donde es catabolizado y excretado, por tanto una concentración plasmática elevada de HDL disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular.

I.E.3. Tratamiento de la hiperlipemia

I.E.3.1. Tratamiento mediante dieta de la hiperlipemia

La modificación de la dieta constituye la primera línea de la terapia de la hiperlipemia. Los primeros resultados observados de la influencia de la disminución de la grasa de la dieta en la incidencia de las enfermedades cardiovasculares, tuvieron lugar de la observación de los cambios en la dieta durante la I guerra mundial (Aschoff,1924) y poster ores estudios demostraron la posibilidad de modificar la concentración plasmática de colesterol mediante cambios en la dieta (Keys y col.,1965;Stasse-Wolthuis y col.,1979). Aunque las enfermedades cardiovasculares son consecuencia de múltiples factores y dentro de éstos,la dieta es uno más de los que tienen mayor importancia, pero la dieta fue el primer factor utilizado para los estudios epidemiológicos de la escuela de Minnesota en donde nace la teoría lipídica de las cardiopatías coronarias, relacionando la mortalidad coronaria con la ingesta de grasa saturada y los niveles plasmáticos de colesterol (Keys y col.,1965;Keys,1970).

Los factores dietéticos que más influencia tienen sobre los niveles plasmáticos de colesterol son: los ácidos grasos saturados, el colesterol y el exceso en las calorías totales ingeridas en la dieta. El principial objetivo de la terapia de la hiperlipemia mediante la dieta es el reducir los ácidos grasos saturados y colesterol, restringiendo también el exceso de calorías. El efecto beneficioso de las dietas bajas en grasa sobre las enfermedades cardiovasculares, está avalado por los diversos estudios epidemiológicos que demuestran que en diferentes países orientales que usan una dieta relativamente baja en grasa, la incidencia de las cardiopatías coronarias es baja. La utilización de ácidos grasos monoinsaturados en la dieta también favorece el que descienda los niveles plasmáticos de

colesterol, como se observa en los países mediterráneos donde hay un gran consumo de estos ácidos monoinsaturados sobre todo del oléico (Grundy,1987). En la actualidad se tiende al uso de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta como terapia de la enfermedades cardiovasculares, mediante el consumo de pescados ricos en ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico, los cuales disminuyen los niveles séricos de colesterol mediante la reducción de la síntesis hepática de VLDL y parece ser que también ejercen una acción beneficiosa sobre las LDL al disminuir su tamaño (Oya,1988).

El colesterol de la dieta procede principalmente de los huevos, mariscos y productos lácteos, aumenta el nivel sérico de colesterol cuando se consume en grandes cantidades y además está relacionado con el consumo de grasa, pudiendo aumentar los niveles de LDL plasmático. El excesivo consumo de calorías en la dieta mediante el consumo de dietas elevadas en hidratos de carbono, está asociado con un incremento en la síntesis de VLDL que conduce a niveles elevados de triglicéridos en plasma y a veces de colesterol (Grundy y col.,1979); también se ha relacionado la obesidad con la reducción de los niveles de HDL plasmáticos (Wolf y Grundy,1983).

La dieta que se consume debe de tener un contenido calórico adecuado para cada individuo, reduciendo en lo posible el consumo de la ingesta de grasa total, grasa saturada, colesterol, azúcar refinado y sal, aumentando paralelamente el consumo de grasa poliinsaturada y el aporte de hidratos de carbono complejos. El consumo de ácidos grasos monoinsaturados y de pescado, ,que en nuestro pais es elevado, es un buen factor para prevenir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Así pues, la primera línea de actuación en la terapía hiperlipemiante lo constituye la modificación cualitativa y cuantitativa de la dieta alimentaria, lo cual puede conducir a una disminución de la afección coronaria y reducir el riesgo de formación de nuevas lesiones coronarias que aumente la mortalidad debida a las

enfermedades cardiovasculares (Blankenhorn,1990)

I.E.3.2. Tratamiento farmacológico de la hiperlipemia

La terapia mediante la dieta debe ser el primer principio del tratamiento de todas las hiperlipemias e hiperlipoproteinemias, debiéndose proporcionar una dieta que sea capaz de mantener el peso normal del indivíduo y además sea capaz de reducir la concentración lipídica en plasma; pero algunos individuos con solo el tratamiento mediante dieta no es suficiente para reducir su nivel de lípidos en plasma, requiriendo un tratamiento farmacológico que pueda complementar el efecto producido mediante la dieta. El hecho de que diversos estudios epidemiológicos demostraran la eficacia del tratamiento farmacológico en la reducción del nivel de los lípidos en plasma y por tanto su efecto positivo para prevenir la aparición de las enfermedades cardiovasculares (Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results,1984; Helsinki Heart Study,1987), así como la elevada incidencia que tiene esta patología en la población, ha hecho aumentar el interés de los profesionales sanitarios y de la industria farmacéutica en el desarrollo de agentes farmacológicos capaces de bajar los niveles lipídicos y en particular los niveles de colesterol en plasma. Así en Estados Unidos, si a partir de mediados de la década de los ochenta la visita al médico debida a la hipercolesterolemia ha aumentado nueve veces, el consumo de fármacos hipolimeniantes ha aumentado cinco veces en la pasada década y sigue aumentando en la actualidad (Wysowski y col.,1990).

El tratamiento farmacológico depende de muchos factores que abarca la edad, historia clínica personal y familiar entre otros, pero no debe iniciarse sin antes haber aplicado un tratamiento dietético e intentando evitar la incidencia de los diversos factores de riesgo sobre el enfermo, debiendose seguir

con una dieta adecuada cuando se requiera tratamiento farmacológico. La definición de los niveles de colesterol plasmático a los cuales es necesario un tratamiento farmacológico, debe depender de los diversos factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares que se suman al riesgo individual de los niveles séricos de colesterol. Para los estamentos sanitarios de Estados Unidos recomiendan el tratamiento con fármacos en aquellos pacientes que presentan unos valores de colesterol plasmático ≥220 mg/dl(5,6 mmol/l) para pacientes de 20-30 años de edad, ≥240 mg/dl(6,2 mmol/l) para pacientes de 30-39 años y ≥260 mg/dl(6,7 mmol/l) para individuos de más de 40 años de edad (National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement,1985); para los países europeos la Sociedad Europea de Aterosclerosis recomienda que se empieze el tratamiento farmacológico cuando los niveles de colesterol plasmático son superiores a 250 mg/dl(6,5 mmol/l) (European Atherosclerosis Society Study Group,1987).

La accion hipolipemiante de un fármaco está enfocada hacia su capacidad de reducir la concentración plasmática de una ó más clases de lipoproteínas mediante mecanismos que inhiben la síntesis y/ó aumentan el catabolismo de las lipoproteínas circulantes en el plasma. Existen un número limitado de fármacos capaces de ser utilizados para el tratamiento de la hipercolesterolemia, el consumo de uno u otro fármaco varia entre los diferentes países, así algunos fibratos como el bezafibrato y el fenofibrato son más utilizados en algunos países europeos y poco usados en los países desarrollados norteamericanos, en cambio en Estados Unidos el consumo de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa es mayor que en los países europeos, pues es muy reciente su existencia como fármaco hipolipemiante en los países europeos, aunque hace algunos años que se está usando en Estados Unidos y Canada. El mayor problema de estos fármacos es que no son bien tolerados por todos los pacientes y los pequeños efectos secundarios, pueden convertirse en problemas mayores por el uso de estos agentes farmacológicos

durante décadas por pacientes asintomáticos (Tikkanen y Nikkila,1987).

Los fármacos hipolipemiantes más utilizados en la prevención de la cardiopatía coronaria son:

Secuestrantes de ácidos biliares

Los secuestrantes de ácidos biliares constituyen el tratamiento de primera línea de la hipercolesterolemia causada por una concentración elevada de colesterol de LDL. La colestiramina (copolímero de estireno y dimetilbenceno) y el colestipol (copolímero de dietilpentamina y epiclorohidrina) son las resinas fijadoras de ácidos biliares que más se han utilizado como hipocolesterolemiantes y son capaces de disminuir la concentración plasmática de colesterol-LDL por un 20-35% (Spengel y col.,1981).

Mecanismo de acción: estos fármacos se trata de resinas de intercambio aniónico, hidrofílicos pero insolubles en agua, que no se absorben y que se unen a los ácidos biliares en el intestino, formando complejos con los ácidos biliares y se eliminan por las heces sin que existan reabsorción ni neutralización. La excreción fecal de los ácidos biliares a nivel del intestino, produce una interrupción de la circulación enterohepática de los ácidos biliares, lo cual aumenta la síntesis de estos compuestos biliares en el hígado a partir del colesterol y un aumento de la excreción intestinal de esteroides. La disminución del contenido de esteroles en las células hepáticas induce a un aumento de la biosíntesis de colesterol celular aumentando la actividad de la HMG-CoA reductasa, así mismo aumenta la biosíntesis de receptores de LDL, habiendo una mayor distribución de estos receptores en la membrana plasmática de los hepatocitos, y como consecuencia de ello hay una mayor utilización de las LDL del plasma, disminuyendo sus niveles (Shepherd y col.,1980). El incremento de la síntesis hepática de

colesterol puede estar acompañado por un aumento en la biosíntesis de VLDL y potencialmente de LDL por el hígado.

Indicación clínica: Los secuestrantes de los ácidos biliares son fármacos de primera elección en las hipercolesterolemias primarias, aunque puede aumentar la hipertrigliceridemia en estos pacientes.

Dosis y forma de administración: La colestiramina se administra por via oral a una dosis que oscila entre 8-24 g/día y el colestipol que también se administra por via oral en una dosis de 10-30 g/día (Illingworth,1987).

Efectos secundarios: La administración de estos fármacos aparte de presentar un sabor desagradable, pueden presentar como efectos secundarios más frecuentes flatulencia, náuseas, molestias abdominales, estreñimiento que puede potenciar o exacerbar los hemorroides preexistentes, hipoprotrombinemia y producir acidosis hiperclorémica en niños. También pueden interferir con la absorción de las vitaminas D y K, siendo capaces de fijar en el lumen intestinal a ciertos fármacos como la fenilbutazona, digitálicos, anticoagulantes o el fenobarbital, interfiriendo con la absorción de los mismos (Soler-Argilaga,1988).

Acido nicotínico

El ácido nicotínico (ácido piridin-3-carboxílico) y sus derivados son fármacos de primera elección en el tratamiento de hipercolesterolemia primaria produciendo un descenso de la síntesis hepática de VLDL y de LDL. Son capaces de reducir la concentración plasmática de colesterol-LDL en un 20-33%, reducen los triglicéridos del plasma por 20-40% y pueden aumentar los niveles plasmáticos de colesterol-HDL en un 10-20% (Illingworth y Gowen,1987).

Mecanismo de acción: Este fármaco actúa disminuyendo la síntesis

de VLDL y como consecuencia de ello también disminuye la formación de IDL y LDL, reduciendo la lipolisis a nivel de tejido adiposo y con ello el flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado, no formándose triglicéridos hepáticos que posteriormente son utilizados para la biosíntesis de VLDL.

Indicación clínica: Es un hipolipemiante de primera elección en el tratamiento de la hipercolesterolemia primaria y también indicada para la hiperlipemia familiar combinada.

Dosis y forma de administración: Se administra por via oral en dosis de 2-6 g/día, preferentemente con las comidas con el fin de aumentar su absorción y disminuir los posibles efectos adversos sobre el tubo gastrointestinal.

Efectos secundarios: Normalmente presenta una serie de efectos adversos en todos los pacientes y en algunos pacientes estos efectos hacen que no puedan tolerar el fármaco, limitando sus posibilidades terapéuticas. Comunmente se presenta vasodilatacíon cutánea, prurito, trastornos gastrointestinales (vómitos, diarrea, dispepsia y ulceración gástrica) y visión borrosa. También se pueden observar anormalidades en los datos séricos tomados en el laboratorio clínico, observándose aumento en los niveles séricos de ácido úrico, glucosa, transaminasas y fosfatasa alcalina, estando contraindicados estos fármacos en los pacientes que presenten gota, diabetes, hepatopatías o historia clínica de ulcera péptica (Illingworth,1988).

Inhibidores de la HMG-CoA reductasa

La HMG-CoA reductasa cataliza la conversión de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA hasta mevalonato, un paso importante y limitante en la ruta metabólica de la biosíntesis del colesterol. Existen una serie de compuestos que inhiben competitivamente a la HMG-CoA reductasa como son la lovastatina (mevinolina), mevastatina (compactina), simvastatina

(synvinolina), eptastatina (CS-514,SQ-31.000,prevastatina) y el SRI-62320, inhibiendo con ello la colesterogénesis y por tanto reducen los niveles de colesterol en plasma (Tobert,1987). Son fármacos de primera elección en el tratamiento de las hipercolesterolemias, siendo capaces de reducir el colesterol-LDL hasta un 40% y un 30% el colesterol total, sin observarse alteración significativa de las concentraciones de colesterol-HDL, colesterol-VLDL y triglicéridos en humanos (Henwood y Heel,1988), aunque para algunos autores también pueden afectar a los otros componentes lipoproteicos (-35% VLDL, -25% triglicéridos y +10% HDL) (Tobert,1987).

Mecanismo de acción: A nivel celular los inhibidores de la HMG-CoA reductasa inhiben la conversión de HMG-CoA hasta mevalonato y como consecuencia de la inhibición de esta reacción se produce una inhibición de la biosíntesis celular de colesterol; como mecanismo compensatorio de la anterior inhibición se aumenta la producción de los receptores LDL de alta afinidad, habiendo una mayor distribución en la membrana plasmática y estimulándose el catabolismo de las LDL, acompañado de una reducción en la síntesis de VLDL y LDL (Grundy y Vega,1985).

Indicación clínica: Son fármacos de primera elección en la hipercolesterolemia primaria, incluyendo las familiares y las no familiares; administrándose muchas veces asociados con otros fármacos, con los cuales tiene un efecto sinérgico en la estimulación del catabolismo de LDL.

Dosis y forma de administración: La vía de administración es oral en dosis que oscilan entre 20-80 mg/día, debiendose ajustar la dosis periodicamente y vigilar los posibles efectos adversos.

Efectos secundarios: Estos fármacos de reciente uso en el tratamiento terapéutico de la hipercolesterolemia (aprobado para su prescripción en Estados Unidos a partir de septiembre de 1987), presentan a lo largo de su tratamiento diversos efectos

adversos que pueden afectar al aparato gastrointestinal (flatulencia, movimientos intestinales irregulares y naúseas), cefalea, aumento de las trasaminasas hepáticas, erupción cutánea, insomnio y opacidad en la visión (Henwood y Heel,1988). Especial interés tiene sus efectos adversos sobre las células musculares, observándose en algunos enfermos un aumento de la creatin quinasa, dolor y debilidad muscular que han caracterizado a las miopatías; el riesgo de miopatías severas y rabdomiolisis se ve aumentado cuando el inhibidor de la HMG-CoA reductasa más usado (lovastatina), es administrado en combinación con otros hipolipemiantes como el gemfibrozilo o el ácido nicotínico, no observándose riesgo de miopatía cuando se administra en combinación con las resinas secuestradoras de ácidos biliares (Grundy,1988). El mecanismo por el cual estos fármacos producen la herida muscular no es conocido, aunque se sabe que puede interrumpir la producción de energía en el músculo por reducción de la ubiquinona, un transportador de electrones en la cadena de transporte electrónico de la respiración (Thompson y col., 1990). Deben analizarse la relación beneficio/riesgo de estos fármacos, llegándose a veces a suprimir la administración de estos fármacos debido a la duración y severidad de los efectos secundarios, sobre todo la miolisis y los efectos adversos hepáticos.

Fibratos

Durante las dos últimas décadas los derivados del ácido fíbrico han sido los fármacos más usados en el tratamiento farmacológico de las hiperlipemias. El clofibrato fue el primer fibrato, utilizado desde 1963 como agente hipolipemiante, el fármaco es hidrolizado "in vivo" hasta ácido clofíbrico (ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico) que es el responsable de la actividad farmacológica; el clofibrato y sus metabolitos activos están relacionados estructuralmente con el gemfibrozilo. Pero debido a sus efectos secundarios su uso ha disminuido marcadamente y en algunos países ha sido retirado del mercado

farmacéutico, al haberse asociado su consumo con los excesos de la mortalidad no cardiovascular y de la mortalidad total en pacientes que utilizaban como tratamiento hipolipemiante a este fármaco (WHO,1980).

Los diferentes fibratos varian su uso según la zona geográfica, así mientras en Estados Unidos y Canada son el gemfibrozilo y el clofibrato los más utilizados, en los países occidentales europeos y en Australia son el bezafibrato y el fenofibrato los fibratos de mayor consumo como fármacos hipclipemiantes. Todos los derivados del ácido fíbrico reducen la concentración plasmática de colesterol total y de colesterol-LDL, aumentando frecuentemente la concentración plasmática de colesterol-HDL en un 10-20%; pero los mecanismos de acción por los que actúan cada fármaco es diferente, incluyendo un aumento de la actividad de la lipoprotein lipasa, un incremento del catabolismo de LDL y una reducción en la síntesis de VLDL (Illingworth,1988).

Bezafibrato

El bezafibrato (ácido 2- (4-(2- (4-clorobenzamido) etil) fenoxi)-2-metilpropiónico) es un análogo del ácido clofíbrico, que no actúa a través de la liberación de este ácido, se cree que su actividad farmacológica refleja las propiedades biológicas de la totalidad de la molécula. Es uno de los componentes de una nueva serie de derivados del ácido fíbrico muy usados en Europa; la prescripción mayoritaria de los fármacos pertenecientes a la tercera generación de derivados del ácido fíbrico (bezafibrato, fenofibrato y ciprofibrato), ha sido muy positiva para la valoración a corto tiempo de los beneficios que presentan estos agentes farmacológicos con respecto a los primeros miembros de esta clase terapéutica: se necesitan unas dosis más bajas para producir un mayor descenso hipolipemiante, reduciendose la LDL, al mismo tiempo que producen un mayor aumento de los niveles de HDL que los fármacos más antiguos. El

bezafibrato una vez administrado por vía oral se absorbe casi completamente (> 95%) en el tracto gastrointestinal, circula principalmente asociado a las proteínas del plasma, teniedo una vida media corta (2 horas). Este fármaco es capaz de disminuir el colesterol total (10-20%), los triglicéridos (50-60%), disminuyendo también el colesterol-LDL (15-25%) y acompañado habitualmente de un aumento del colesterol-HDL (20-30%) (Monk y Todd,1987).

Mecanismo de acción: El mecanismo por el cual el bezafibrato ejerce su acción hipolipemiante, es debido a un incremento de la actividad de la lipoproteinlipasa que acelera el catabolismo de las VLDL e IDL, produciendo ocasionalmente un acúmulo de LDL. La síntesis hepática de VLDL está disminuida como efecto del bezafibrato como respuesta a una inhibición de la síntesis hepática de ácidos grasos y a una mayor oxidación de los mismos. Además se ha observado que el bezafibrato inhibe a la HMG-CoA reductasa, disminuyendo el contenido celular de colesterol y aumentando la biosíntesis del receptor LDL que captaría a las LDL plasmáticas retirandolas de la circulación y disminuyendo sus niveles séricos (Stewart y col.,1982).

Indicación clínica: Es un fármaco de primera elección en el tratamiento de la hipercolesterolemia, mostrándose particularmente eficaz en las hiperlipoproteinemias tipo IIa, IIb y IV, se usa como tratamiento de primera línea en la hiperlipidemia familiar combinada.

Dosis y vía de administración: El bezafibrato se administra por vía oral a una dosis de 200 mg/8 h (600 mg/día) o se puede emplear una única dosis diaria de 400 mg empleando la forma retard que tiene una acción prolongada.

Fenofibrato

El fenofibrato (ester isopropílico del ácido 2-

(4-(4-clorobenzoil)-fenoxi-)-2-metilpropanoico) pertenece a la tercera generación de derivados del ácido fíbrico, siendo uno de los fármacos hipolipemiantes más prescrito en el mundo, muy utilizado sobre todo en Europa. Es un compuesto estructuralmente relacionado con el clofibrato, pero la sustitución del cloro del clofibrato por el radical paraclorobenzoil le confiere a la molécula del fenofibrato una mayor potencia y especificidad. El fármaco es absorbido en el tracto gastrointestinal, circula en gran parte unido a las proteínas plasmáticas, y su acción farmacológica produce una marcada disminución de la concentración de triglicéridos en plasma (40-50%), así como del colesterol-LDL (25-35%) y produce un aumento de la concentración de colesterol-HDL (10%) en especial en aquellos pacientes que presentan niveles plasmáticos bajos de esta lipoproteína (Brown y col.,1986a).

Mecanismo de acción: El fenofibrato activa la lipoproteinlipasa y aumentando el catabolismo de las VLDL; algunos autores sugieren que puede inhibir a la HMG-CoA reductasa, lo que disminuiría la concentración intracelular de colesterol y como consecuencia de dicha disminución, se activa la biosíntesis de receptores LDL que retirarían el LDL circulante (Blane y col.,1986).

Indicación clínica: Es fármaco de primera elección en el tratamiento de la hipercolesterolemia, indicado especialmente en pacientes con hiperlipoproteinemia tipo IIa familiar, aunque también puede ser eficaz en las de tipo IIb, III y IV (Lusier-Cacan y col.,1989).

Dosis y vía de administración: Se administra por vía oral en dosis de 100 mg/8 h (300 mg/día) , aunque también existe un preparado de acción prolongada (retard) que administra una sola dosis de 200 mg/día.

Gemfibrozilo

El gemfibrozilo (ácido 5-2,5-dimetilfenoxi-2,2-dimetilpentanoico) es un congénere estructural del clofibrato que fue sintetizado en 1968, en los Estados Unidos en el año 1982 fue por primera vez comercializado para su uso y en Europa está siendo utilizado en la terapia hipolipemiante desde mediados de la pasada década, siendo en los países norteamericanos comunmente utilizado, habiendo desplazado al clofibrato. El fármaco se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, circulando una gran parte de el unido a la albumina del suero, algunos autores consideran que tiene una vida media de 7,5 horas, pero la gran mayoría de estudios consideran que tras la administración oral la vida media de este fármaco es de 1,5-2 horas , eliminándose principalmente por vía urinaria (Randinitis y col.,1984). La acción farmacológica de gemfibrozilo es capaz de disminuir la concentración plasmática de los triglicéridos en un 40-60%, disminuye el colesterol total (10-20%), disminuye muy poco los niveles de colesterol-LDL (10-15%) y aumenta la concentración de colesterol-HDL (15-25%) (Samuel,1983; Kholmeier y col.,1987).

Mecanismo de acción: Este fármaco influye en la síntesis y degradación de las VLDL; la menor producción hepática de VLDL es debida en gran parte a que el gemfibrozilo reduce la concentración de triglicéridos circulantes, mediante la inhibición de la lipólisis de los triglicéridos del tejido adiposo, suprimiendo la movilización de los ácidos grasos desde este tejido. El gemfibrozilo también estimula la actividad de la lipoproteinlipasa, contribuyendo a aumentar el poder hipotrigliceremiante de este fármaco. El mecanismo de acción por el cual el gemfibrozilo aumenta la concentración plasmática de colesterol-HDL no es conocido, aunque podría ser debido al aumento de las concentraciones séricas de las apolipoproteínas A-I y A-II las mayores proteínas transportadoras de HDL (Todd y Ward,1988).

Indicación clínica: Aunque el gemfibrozilo, debido a su escasa incidencia en la reducción de las LDL (10-15%), no es considerado fármaco de primera elección en las hipercolesterolemias primarias, es el fármaco de elección en los casos de hiperlipoproteinemia tipo IV que presentan una hipertrigliceridemia severa. También está indicada en las hiperlipoproteinemias tipo IIa, IIb, III y IV. Los resultados del tratamiento con gemfibrozilo presentados en el "Helsinki Heart Study" (1987), han mostrado la efectividad del tratamiento de las hiperlipemias con este fármaco, produciendo un aumento significativo de la relación colesterol-HDL/colesterol-LDL que va acompañado de una reducción de los infartos cardíacos y de otros tipos de accidentes cardiovasculares. El gemfibrozilo se usa mucho en la actualidad asociados con otros fármacos como las resinas fijadoras de ácidos biliares o los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (Goldstein,1990).

Dosis y vía de administración: El gemfibrozilo se administra por vía oral en una dosis recomendada de 1.200 mg/día (dividida en dos tomas al día), aunque el rango de la dosis diaria puede variar de 900-1.500 mg.

Efectos secundarios de los fibratos

En general los fibratos de las nuevas generaciones son bien tolerados, solamente un 5% de los pacientes que reciben tratamiento con estos fármacos manifiestan los efectos adversos producidos por estos fármacos, aunque la prescripción del primer fibrato (clofibrato) no es recomendada y en muchos países está retirado del mercado debido a sus efectos secundarios. Las alteraciones indeseables del tracto gastrointestinal como son molestias en la parte alta del abdomen, flatulencia, diarreas, nauseas y vómitos; también son frecuentes las reacciones cutáneas de tipo alérgico (prurito, eritema,rash), pero estas reacciones adversas y las que afectan al tracto gastrointestinal remiten cuando se suprime la

medicación (Todd y Ward,1988). Otras manisfestaciones clínicas debidas a estos fármacos que pueden manifestar los enfermos son: insomnio, cefaleas, impotencia sexual, cansancio y fórmación de cálculos biliares (Brown,1987; Nicholls,1988).

Los valores clínicos obtenidos en el laboratorio se ven afectados por estos fármacos, observándose una reducción en las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina, aumento de los niveles de aminotransferasas, aumento de urea y creatina, los niveles de glucosa parece ser que se ven poco afectados y se observa un descenso en el hematocrito y en los niveles de hemoglobina al principio del tratamiento, pero se estabilizan con el tratamiento continuado por estos fármacos (Blane,1987; Monk y Todd,1987).

Especial interés tienen los efectos secundarios producidos por estos fármacos sobre las fibras musculares y más concretamente sobre el sístema cardiovascular, ya que estos agentes farmacológicos de gran uso, son utilizados generalmente por enfermos que padecen cardiopatías coronarias. Los datos obtenidos en el laboratorio clínico indican un posible daño muscular, ya que se ha observado un incremento en la concentración de la fosfocreatinquinasa que está asociado con el sindrome muscular caracterizado por dolor muscular, debilidad y calambres musculares, que está relacionado con el daño muscular (con un aumento de la concentración de mioglobina en el suero) y que aparece especialmente en los pacientes nefróticos (Haubenstock y col.,1984; ødegaard,1988). El sindrome muscular agudo se encontró frecuentemente en los pacientes tratados con clofibrato (Langer y Levy,1968), pero también se ha observado que el tratamiento con otros fibratos más nuevos, también se han observado mialgias severas y rabdomiolisis (Monk y Tood,1987). En el caso del gemfibrozilo que algunos enfermos tratados con este fármaco presentan dolores musculares, se ha observado un gran aumento de la miopatía y de rabdomiolisis cuando se administra en combinación de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa

como es la lovastatina (Grundy,1988; Labreche,1988), observándose que las mujeres son más suceptibles que el hombre a estas miopatías producidas por los medicamentos; trás estos datos algunos autores han sugerido que debe suprimirse la administración conjunta de gemfibrozilo y lovastatin como terapia farmacológica hipolipemiante (Goldstein,1990).

En lo referido a los efectos adversos de estos fármacos sobre el sistema cardiovascular, en la literatura científica aparecen dos casos bien documentados de enfermos que al ser tratados con clofibrato además de manifestar el sindrome muscular agúdo, simultaneamente manifiestan bigemia ventricular, contracciones prematuras y latidos ectópicos atriales y ventriculares, que desaparecen a las pocas semanas de haber cesado el tratamiento (La Rosa,1969; McGarvey,1973). Posteriormente se han detectado otros casos de enfermos que presentan arritmias cardíacas al tratarlos con fibratos (Chung,1975; Hüller y Glende,1984), incluso se ha observado reacciones adversas cardiovasculares en fibratos de la tercera generación como es el fenofibrato (Brown y col.,1986b). En fechas cercanas, se han detectado algunos casos de pacientes tratados con gemfibrozilo asociado con lovastatina, que aunque presentan un manifiesto sinergismo en su acción hipolipemiante, aparecen una serie de efectos adversos miopáticos, con un gran aumento en los niveles plasmáticos de creatinquinasa debidos a severas miolisis y mionecrosis en músculo esquelético; pero en los datos analíticos del laboratorio clínico, también se observa un incremento en la expresión de algunas isoenzimas de la creatinquinasa que están asociadas con la herida cardíaca, aunque los datos electrocardiográficos fueron normales (Van Lente y Cornell,1990; Pierce y col.,1990).

Probucol

El probucol ((4,4-lisopropilidenoditio) bis (2,6-di-tibutilfenol)) es un fármaco de segunda elección en el

tratamiento de la hipercolesterolemia, estructuralmente distinto a los otros agentes hipolipemiantes, que tiene una doble acción hipocolesterolemiante y antioxidante; su administración es capaz de reducir los niveles plasmáticos de colesterol-LDL un 8-15%, pero a su vez, también reduce la concentración plasmática de HDL en un 15-25% (Durington y Miller,1985).

Mecanismo de acción: Este fármaco aumenta el catabolismo de las LDL por un mecanismo no receptor dependiente y la reducción de la síntesis de apo A-I sería la causante de la disminución de HDL plasmático.

Indicación clínica: Es un fármaco de segunda elección en el tratamiento de la hipercolesterolemia, mostrando muy buenos resultados en enfermos con hipercolesterolemia familiar heterozigótica (Steinberg,1986).

Dosis y vía de administración: El probucol se administra por vía oral a una dosis de 1 g/día.

Efectos secundarios: Como efectos adversos se pueden presentar diarreas, flatulencia, dolor abdominal y naúseas. Se acumula en el tejido adiposo por un periodo de hasta 6 meses después de suprimir su administración, desconociéndose su efecto sobre el feto en la mujer embarazada. El probucol está contraindicado en pacientes con cardiopatías isquémicas o con alteraciones electrocardiográficas sugestivas de irritabilidad ventricular, pues puede facilitar la aparición de arritmias cardíacas (Soler-Argilaga,1988).

Neomicina

La neomicina es un antibiótico que es pobremente absorbido en el tracto gastrointestinal, utilizado como fármaco de segunda elección en el tratamiento de la hipercolesterolemia, reduciendo la concentración de colesterol-LDL plasmático en un

10-15% (Hoeg y col.,1984).

Mecanismo de acción: La neomicina es capaz de bloquear la absorción intestinal del colesterol de la dieta y el procedente de los ácidos biliares, probablemente a que interfiere en la formación de las micelas (Miettinen,1979); el efecto anterior hace que disminuya el contenido de colesterol hepático y aumente la síntesis de receptores LDL y por tanto la utilización de la LDL plasmática.

Indicación clínica: Es utilizado como agente hipocolesterolemiante de segunda elección.

Dosis y vía de administración: Se administra por vía oral en una dosis de 1,5 g/día.

Efectos secundarios: La neomicina no puede ser generalmente administrada como agente hipolipemiante debido a que presenta unos efectos adversos con alta frecuencia, frecuentemente son efectos secundarios gastrointestinales y además tiene un alto potencial ototóxico y nefrotóxico.

Tiroxina

Las hormonas tiroideas son capaces de alterar el metabolismo del colesterol, produciendo una disminución de la LDL de 10-15% (Bantle y col.,1981).

Mecanismo de acción: Este fármaco es capaz de aumentar la síntesis hepática del colesterol, aumentando su conversión en sales biliares y posterior eliminación por las heces; también aumentan la eliminación de LDL plasmática por estimulación de la síntesis de receptores LDL.

Indicación clínica: La tiroxina es un fármaco de segunda elección en la terapia de la hipercolesterolemia, especialmente indicado

en enfermos jóvenes sin enfermedad coronaria e incapaces de tolerar otro tipo de fármaco hipolipemiante.

Dosis y vía de administración: Se administra por vía oral , en una dosis inicial de 1-2 mg/día que va aumentando progresivamente hasta una dosis máxima de 8 mg/día.

Efectos secundarios: Este fármaco no puede ser generalmente administrado debido a sus efectos secundarios, siendo el más importante el aumento de la frecuencia y severidad de crisis anginosas en pacientes con cororcriopatías. En pacientes sin afecciones coronarias pueden aparecer arritmias cardíacas y efectos secundarios debido a la alteración del metabolismo que producen estas hormonas (nerviosismo, diaforesis, temblores e insomnio) (Brown y Goldstein,1989).

I.E.4. Métodos de evaluación de los efectos secundarios de los fármacos

La metodología actual para la valoración de la actividad farmacológica de los hipolipemiantes, como la utilizada para la mayoría de los fármacos, se basan en estudios realizados en animales de diversas especies (roedores, perros y monos) o en voluntarios húmanos (Stahlberg y col.,1989; Heller y Harvengt,1983). Pero estos métodos además de no poder reproducir fielmente las condiciones de trabajo en sucesivos experimentos, conllevan un elevado costo económico que se suma a la gran presión social por cuestiones morales, debida a la realización de estas experiencias con animales y humanos. Los modelos "in vitro" desarrollados con cultivos celulares proporcionan un método que potencialmente puede ser utilizado para el estudio de los mecanismos de acción de los fármacos, pudiendose observar la incidencia directa de las sustancias con las células dianas deseadas, extendiendose los estudios a las diferentes especies,

con una metodología que nos permite reproducir las condiciones de las experiencias y que conllevan una reducción del costo económico (Freshney,1988a).

Los estudios toxicológicos de los efectos secundarios producidos por estos fármacos se han realizado en animales de experimentación mediante el suministro de dosis elevadas durante largos periodos de tiempo (Anon,1982), y se necesitan periodos de varios años para poder detectar algunos efectos adversos, como efectos mutagénicos y carcinogénicos, en los pacientes que consumen dichos fármacos (Todd y Ward,1988). La evaluación de los efectos secundarios en humanos conllevan un elevado riesgo, por ello fue necesario el uso de los modelos animales; los métodos basados en los cultivos celulares, nos permite establecer un modelo experimental para el estudio de la respuesta celular a los diferentes agentes farmacológicos, pudiendose evaluar la citotoxicidad de los fármacos, acortando el periodo de tiempo necesario para la realización de la experiencia y pudiéndose reproducir las condiciones experimentales en que se desarrollan las diversas experiencias toxicológicas.

Los estudios sobre la toxicidad de los fármacos hipolipemiantes se han desarrollado en diversos tipos de células en cultivo, realizándose diversos trabajos enfocados al estudio del papel desarrollado por estos agentes hipolipemiantes en la proliferación de los peroxisomas hepáticos en hepatocitos en cultivo (Foxworthy y col.,1990); otros autores utilizan para sus ensayos citotóxicos los cultivos de células musculares cardíacas, para poder estudiar el efecto negativo sobre algunos receptores de membrana necesarios para la respuesta celular (Barnett y col.,1989), ó con el fin de poder esclarecer la relación existente entre los fármacos hipolipemiantes y las lesiones miopáticas no deseadas producidas por el consumo de estos agentes farmacológicos, que pueden conducir a alteraciones del ritmo cardíaco (González y col.,1991).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1.- Poner a punto las técnicas de cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo y de miocardiocitos humanos adultos.

2.- La búsqueda de una metodología cualitativa y cuantitativa capaz de determinar el contenido protéico de las diferentes fracciones subcelulares de los miocardiocitos, especialmente dirigida a los filamentos intermedios.

3.- Conocer cómo es el patrón de maduración a nivel subcelular de los filamentos intermedios a lo largo del desarrollo cardiaco.

4.- Diseñar un modelo experimental de cultivos celulares capaz de evaluar sin interferencias los efectos secundarios de los fármacos sobre los miocardiocitos.

MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL y METODOS

III.A. MATERIAL

III.A.1. Animales

Las experiencias se realizarón en embriones de la especie Gallus domesticus, raza Shavers-Star-Cross. Las edades de los animales utilizados estuvieron comprendidas entre los 3 y 21 días de desarrollo embrionario.

III.A.1.A. Incubación de los huevos

La incubación se llevó a cabo a una temperatura constante de 37±0,5 °C, tras disponer los huevos con el extremo más estrecho hacia abajo y formando un ángulo de 30° con la vertical, para evitar malas posiciones del embrión dentro del huevo.

Durante el periodo de desarrollo embrionario, los huevos fueron volteados de forma automática cada hora. La humedad relativa fue del 70% a lo largo de la incubación.

III.A.2. Biopsias de corazón húmano

Las biopsias humanas utilizadas en las experiencias proceden de músculos pectíneo y papilar obtenidas en las intervenciones quirúrgicas cardiovasculares realizadas en el

Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Regional "Virgen de las Nieves" de Granada.

III.A.3. Instrumentación

La incubación de los huevos se realizó en dos incubadoras con volteo automático y ventilación marca Masalles typ.-0675, con capacidad para 90 huevos cada una.

Las pesadas se hicieron en una balanza Mettler AJ-100.

Para las medidas de pH se utilizó un pHmetro Crison micropH 2000 (pH $\pm$ 0,004).

Para la agitación de los tubos se empleó un vibrador Heidolph Reax-2.000, la agitación de los distintos reactivos se realizó mediante un balanceador Adams Nutator Modelo-1106 y un Magneto Agitador A-06 SBS.

Las centrifugaciones se realizaron mediante centrífuga Labofuge Ae de Heraeus para bajas velocidades utilizadas en las técnicas de cultivos celulares; para las técnicas de aislamiento y separación de proteínas se utilizaron microcentrifuga Hermle Z-229 y centrífuga Beckman J-21B (Rotor J-20).

La esterilización del material no fungible se realizó mediante autoclave CERTOclav Typ.CV II/1600 y el material fungible no desechable se esterilizó en un pupitre de esterilización por rayos ultravioletas Selecta 415. La esterilización de las soluciones utilizadas en los cultivos celulares se llevó a cabo mediante filtración con filtros de Millipore.

El material plástico utilizado para los cultivos celulares fueron suministradas por las casas comerciales Greiner y Nunclon Nunc, Inter Med.

Para la aclimatación de todas las soluciones a las temperaturas adecuadas para las distintas técnicas de cultivos celulares se utilizó baño termostato Selecta TECTRON S-473.100.

Todas las manipulaciones que requerían condiciones de esterilidad fueron realizadas en cabina de flujo laminar CAPTAIR tipo 2005-HPS.

La incubaciones de los cultivos se realizó en estufa de cultivos celulares Heraeus modelo 5060 EK/O_2, suministrandole los gases a partir de balas de O_2 (OXIMESA) y CO_2 (Sociedad Española de Oxigeno S.A.).

La conservación de los reactivos y muestras biológicas a bajas temperaturas se realizó en frigorífico y congelador (Miele).

La observación microscópica se realizó mediante lupa PZO modelo 17318, microscopio Leitz Wetz Lar. Germany 585039, microscopios de contraste de fase invertido BAUSCH & LOMB modelo PhotoZoom y Nikon modelo DIAPHOT-TMD; para la observacion de las preparaciones tratadas con técnicas de inmunofluorescencia se utilizaron microscopio de fluorescencia Nikon modelo LABOPHOT y microscopio de contraste de fase invertido Nikon modelo DIAPHOT-TMD.

Para la impresión en películas fotográficas de las observaciones microscópicas mediante el instrumental mencionado anteriormente, se utilizaron cámaras de fotografía PENTAX P50,Nikon FX-35WA y Nikon MF-20.

Los tejidos y células (a menos que se indique lo

contrario) se homogenizaron en un "Potter" manual.

Las determinaciones colorimétricas se hicieron en un fotocolorímetro Perkin-Elmer 35 Spectrophotometer.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sodico (SDS-PAGE) se realizó en el equipamiento para electroforesis Mini-Protean II Slab Cell de Bio-Rad el cual se compone de los siguientes constituyentes:

- Peine de 10 pocillos.
- Separadores de 0,75 mm.
- Cristales internos y externos.
- Soportes de cristales.
- Electrodos.
- Cubeta de electroforesis.

El inmunoblotting (Western-blot) se realizó en el equipamiento para transferencia electroforética Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad que consta de los siguientes componentes:

- Cubeta de transferencia.
- Estuche del gel.
- Esponjas (Scotch-Brite, 3M).
- Papel Wathman 3 MM.
- Papel de Nitrocelulosa.

Para la electroforesis en SDS-PAGE y para el inmunoblotting se utilizó como fuente de alimentación la G.205 de GAOC Instruments.

El secado de los geles se llevó a cabo por medio de un secador de geles Modelo 543 de Bio-Rad.

El análisis densitómetrico de geles realizados

mediante la técnica del SDS-PAGE, se realizó mediante un densitómetro Appraise, con la ayuda de una computadora integral (Beckman).

III.A.4. Reactivos

Todas las soluciones enzimáticas proteolíticas utilizadas en los procesos de disgregación tisular fueron de Sigma; el tampón de fosfatos (PBS) utilizado como base para todas las disoluciones utilizadas en los cultivos celulares, la base de los medios de cultivo (salvo la base de los medios MEM y Hank's (Gibco)) y el suero fetal de ternera fueron suministrados por Flow Laboratories. El colágeno, la citosina-β-D-arabinofuranósido y los factores de crecimiento (salvo que se especifique lo contrario) fueron suministrados por Sigma.

El azul trypan utilizado en las tinciones vitales de las células, los anticuerpos monoclonales y los reactivos utilizados en las inmunofluorescencias (salvo que se especifique lo contrario), fueron adquiridos de Sigma.

Los fármacos fueron suministrados por el Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico Universitario de Granada.

Todos los reactivos utilizados en el subfraccionamiento celular, en la electroforesis en SDS-PAGE y en el Inmunoblotting (salvo que se especifique lo contrario), fueron suministrados por Bio-Rad.

III.B. METODOS

III.B.1. Cultivos celulares

III.B.1.1. Cultivo de células cardíacas procedentes de embriones de pollos

III.B.1.1.1. Aislamiento de las células miocardiociticas

III.B.1.1.1.1. Obtención del embrión

Los huevos fértiles fueron incubados a diferentes periodos de tiempo, obteniéndose un intervalo de estadios de desarrollo embrionario que abarcaba los estadios XV-XL de Hamburger y Hamilton (H.H.) (Hamburger y Hamilton, 1951). Una vez que los huevos fértiles han alcanzado el estadio H.H. deseado, se procede a la localización del embrión por transiluminación en un ovoscopio, marcándose con un círculo dibujado en la cáscara y el huevo podrá ser trasladado con el embrión localizado.

La cáscara de los huevos son limpiadas con alcohol etílico de 70°C y tras depositar el huevo sobre una placa Petri (60/15 de diámetro, Greiner) amortiguada con algodón, en condiciones estériles y con la ayuda de aguja enmangada, microsegueta y pinzas vanas, abrimos una ventana en la cáscara del huevo en la zona donde estaba localizado el embrión. A continuación procedemos a retirar las membranas extraembrionarias.

Posteriormente con la ayuda de pinzas y tijeras el

embrión es extraido del huevo y depositado en una placa petri esteril con 10 ml de PBS a 37°C (todas las soluciones utilizadas en las técnicas de cultivos celulares, salvo que se indiquen lo contrario, al ponerse en contacto con las células se encuentran a una temperatura de 37°C).

III.B.1.1.1.2. Extracción del corazón

En los estadios tempranos del desarrollo embrionario la localización del corazón es extracorporea, siendo fácil su extración con la ayuda de unas pinzas de disección de puntas rectas.

Cuando el desarrollo embrionario es más avanzado, el corazón se encuentra en el interiór del embrión, siendo necesario diseccionar el embrión para extraer el corazón.

Los corazones son extraidos siguiendo dos planos de corte, uno a nivel del tronco arterial y otro a nivel de seno venoso en aurícula; previamente al corte, fueron perfundidos con PBS para eliminar en lo posible las células sanguíneas. Una vez aislados los corazones se depositaron en una placa de Petri esteril que contenía 2 ml de PBS.

III.B.1.1.1.3. Disgregación del tejido cardíaco embrionario y aislamiento celular

III.B.1.1.1.3.1. Método físico

Los tejidos cardíacos embrionarios fueron disgregados mecánicamente basándose en la técnica descrita por

ZAROFF y colaboradores (1961) y utilizando las modificaciones a esta técnica introducidas por nosotros (González y col.,1990).

Los corazones embrionarios extraidos son colocados en una placa de Petri estéril con 2 ml de PBS. A continuación se procedió a la disgregación mecanica mediante tijeras y pinzas, reduciendo el tejido cardíaco a pequeños trozos de aproximadamente 2-3 mm de lado, se lavaron 5 veces con PBS en tubo universal (1.000 r.p.m. durante 5 minutos), desechando el sobrenadante de las centrifugaciones, con objeto de retirar los restos sanguíneos de los tejidos. Posteriormente a las pequeñas piezas de tejido se le añade 3 ml de PBS y la suspensión de tejido se hace pasar 100 veces por jeringa con aguja de 0,8 mm de diámetro y seguidamente por otra jeringa con aguja de 0,36 mm de diámetro, con el fin de lograr la disgregación de las células del tejido por rozamiento, continuándose esta operación hasta que no observemos ningún resto de tejido en la suspensión en PBS.

La suspensión celular obtenida se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga Heraeus Labofuge Ae. Tras la centrifugación, en el botón se obtiene una capa inferior de color rojizo que contiene los restos de tejidos, células sanguíneas y algunos miocardiocitos, y una capa superior blanquecina donde predominan los miocardiocitos; se extrajo la capa superior mediante una pipeta pasteur y las células fueron suspendidas en el medio de cultivo.

III.B.1.1.1.3.2. Métodos químicos

III.B.1.1.1.3.2.1. Técnica de tripsina a 37°C

Los corazones embrionarios una vez trozeados y lavados varias veces con PBS, fueron disgregados en una solución

enzimática de tripsina y basándonos en la técnica descrita por MOSCONA (1952).

La solución enzimática contiene tripsina al 0,025% en PBS libre de iones Ca^{++} y Mg^{++} (Murphy y col.,1983b), los trozos de tejidos son introducidos en dicha solución enzimática que se encuentra a 37°C y en agitación continua durante 1 hora.

Posteriormente se añade 2 ml de medio de cultivo con el 20% de suero fetal de ternera y se procede a recoger las células mediante centrifugación diferencial, retirándose en primer lugar los restos de tejidos y posteriormente recogiendo las células en suspensión (1.500 r.p.m. durante 5 minutos).

III.B.1.1.1.3.2.2. Técnica de tripsina a 4°C

El tejido cardíaco embrionario una vez trozeado en pequeñas piezas de 2-3 mm de lado y lavado para eliminar los restos sanguíneos, fue disgregado para su posterior cultivo usando el método descrito por COLE y PAUL (1966), con algunas modificaciones.

Una vez lavadas las pequeñas piezas de tejido, se retira el último sobrenadante y se pesa la cantidad de tejido obtenida, añadiéndose a continuación por cada 100 mg de tejido 1 ml de solución de tripsina (0,5 g/l) en PBS libre de iones Ca^{++} y Mg^{++}, y suplementada con EDTA (0,2 g/l) (González y col.,1991). La digestión enzimática del tejido se produjo durante un periodo de tiempo de 18 horas a 4°C, posteriormente es retirada la tripsina y el tejido con el residuo de tripsina fue incubado durante 30 minutos a 36,5°C.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión enzimática a 36,5°C, se añade 1 ml de medio de cultivo DMEM

adicionado con el 20% de suero fetal de ternera, por cada 100 mg de tejido digerido, y mediante una pipeta pasteur, pipeteando suavemente y expulsando la suspensión de tejido con suavidad, se repite el proceso hasta la total disgregación del tejido.

Tras dejar que se depositen en el tubo los restos de tejido que hayan quedado sin disgregar, se recoge con una pipeta pasteur la suspensión celular y se deposita en un tubo universal estéril, estando lista para su utilización para el cultivo.

III.B.1.1.1.4. Determinación de la densidad celular

Las suspensiones celulares obtenidas tras la disgregación de los tejidos, se procedió a la determinación de la densidad de la población celular existente mediante de un hemocitometro (Brand) y con la ayuda de azul trypan (Sigma) como colorante vital, para distinguir las células vivas de las muertas (Kaltenbach y col.,1958).

La suspensión celular antes de ser introducida en el hemocitómetro, ha sido previamente diluída a una dilución 1/2 con solución de azul trypan (0,1% (p/v)), y tras agitación se añade 2 gotas con ayuda de una pipeta pasteur en el hemocitometro, procediendose posteriormente al contaje del número de células con ayuda de microscopio invertido con un ocular 10X y un objetivo de 10X. El recuento celular se lleva a cabo en los cuadros grandes del hemocitómetro, haciendose la media de 10 contajes (medidas) y posteriormente se determina la concentración celular (Sanford y col.,1951).

La concentración celular (c.c.) referida en número de células/ml, se realizó utilizando la siguiente fórmula matemática:

$c.c. = n \times 10^4 \times d$

n= número de células contadas.
d= dilución realizada con solución de colorante.

Mediante diluciones o concentraciones de la suspensión celular en los medios de cultivo, se obtiene la densidad celular deseada para su puesta en cultivo.

III.B.1.1.1.5. Medios de cultivo

III.B.1.1.1.5.1. Preparación de los medios de cultivo

La base de los medios de cultivo utilizados (MEM, DMEM, Hank's y RPMI-1640) fue disuelta en PBS, posteriormente, una vez disueltos, fueron suplementados con HEPES (ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanosulfónico) (Sigma) (20 mM), bicarbonato sódico (8,92 mM), glutamina (4 mM), bencilpenicilina (100 UI/ml) (Roger), gentamicina (40 µg/ml) (Hubber) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Squibb).

La contaminación por células no musculares, sobre todo fibroblastos, fue evitada por la adición de 10 µM de citosina-β-D-arabinofuranósido en los días 1 y 3 de cultivo (Claycomb y Moses,1985; Springhorn y Claycomb,1989), cuando utilizamos una gran masa celular en cultivo para nuestras experiencias como es la obtención de las proteínas celulares en cultivo.

La capacidad de crecimiento celular en cada medio de cultivo, fue valorada mediante la siembra de cultivos

primarios y secundarios, observándose mediante recuento la evolución de la población celular al cabo de 28 días de cultivo.

III.B.1.1.1.5.2. Factores de crecimiento

Los medios de cultivo, generalmente, fueron suplementados con diferentes proporciones de suero fetal de ternera y en algunas experiencias con diferentes factores de crecimiento, aislados a una concentración determinada o medios de cultivo en donde se han cultivado células de líneas celulares establecidas, o fibroblastos cultivados a partir de pulmón de embrión humano, añadidos a una dilución determinada con el medio de cultivo de nuestras células. Las concentraciones de los factores de crecimiento y las diluciones de los sobrenadantes de cultivos celulares utilizados, fueron las siguientes:

Factor de crecimiento	Concentración
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	10^{-7} y 10^{-8} (p/v)
Fitohemaglutinina (Flow Lab.)	6 µl/ml y 8 µl/ml
Transferrina	10^{-6} y 10^{-7} (p/v)
Insulina (Nordisk)	0,2 UI/ml y 2 UI/ml
Interferón-τ murino*	0,4 µl/ml y 2 µl/ml

Cultivos celulares	Dilución
Hela-229	1/2
HELA	1/2
McCoy	1/2
Hep-2	1/2
Fibroblastos humanos	1/2

El efecto de los diferentes factores de crecimiento y de los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizados sobre la proliferación celular, fue observado mediante el recuento de la población celular en los diferentes pocillos de cultivo al cabo de los días 7,14,21 y 28 de cultivo.

*Gentilmente cedido por el Dr. Federico Garrido del Servicio de Analisis Clínico de la Residencia Sanitaria "Virgen de las Nieves".

III.B.1.1.1.6. Condiciones medioambientales de los cultivos celulares

Las células una vez aisladas y suspendidas en los medios de cultivo, son depositadas en las placas de pocillos o en los frascos de cultivo de tejido (falcon) de 50 ml y son incubados en la estufa de cultivo a una temperatura ambiental de 37°C, 80% de humedad relativa y el 5% de CO_2.

III.B.1.1.1.7. Preparación de las matrizes tridimensionales de colágeno

La solución de colágeno stock (0,01% (p/v) en ácido acético 0,1 M), es esterilizada mediante filtros estériles de 0,22 µm de diámetro y posteriormente mediante la ayuda de una micropipeta automática es depositada sobre la superficie de cultivo, a una cantidad de colágeno de 6 $\mu g/cm^2$. Los frascos de cultivo se dejan a temperatura ambiente durante 18 horas y a continuación son lavados con PBS estéril, siendo guardados a temperatura ambiente hasta su utilización para el cultivo celular (Leighton y col.,1968).

III.B.1.1.1.8. Mantenimiento del cultivo

III.B.1.1.1.8.1. Cambio del medio de cultivo

El medio de cultivo generalmente es cambiado cada 3 días, cuando se observa un viraje de color del medio de cultivo (desde rojo a anaranjado), dependiendo la periodicidad del cambio, de la proliferación y de la densidad celular.

En el caso de las células que crecen adheridas el cambio de medio de cultivo se efectuó por simple retirada del medio de cultivo y adición del medio fresco. Las células que crecen en suspensión, son recogidas mediante centrifugación diferencial (1.500 r.p.m. durante 5 minutos) y posteriormente son resuspendidas en medio fresco.

III.B.1.1.1.8.2. Propagación de los cultivos celulares

Cuando el número de células en los frascos de cultivo es muy elevado, las células están adheridas cubriendo toda la superficie de cultivo y disminuyen su crecimiento celular, siendo necesario la transferencia de población celular a distintos frascos de cultivo. Para la división de la población celular en subcultivos celulares, en primer lugar procedemos a desprender las células adheridas de las superficies de cultivo mediante solución de tripsina (0,25% (p/v)) en PBS.

Una vez desechado el medio de cultivo, añadimos 1ml de tripsina al frasco de cultivo (50 ml) y lavados las células adheridas en la superficie, repetimos la operación una vez más y a continuación añadimos 1 ml de nueva tripsina, procediéndose a balancear el frasco de cultivo levemente para que

la tripsina llege a toda la superficie de cultivo durante 1 minuto. Posteriormente desechamos la solución de tripsina y añadimos 2 ml de medio de cultivo con el 20% de suero fetal de ternera, repitiendose un proceso de succión-expulsión con pipeta pasteur sobre la superficie de cultivo durante 30 veces, obteniéndose las células suspendidas en el medio de cultivo.

Una vez las células están suspendidas, se hace un recuento de la población y se diluyen en medio de cultivo fresco, repartiéndose en nuevos frascos de cultivo.

Las células que crecen en suspensión, son recogidas mediante centrifugación y posteriormente disueltas en medio de cultivo fresco, repartiéndose en los nuevos frascos de cultivo.

III.B.1.1.1.8.3. Establecimiento de cultivos secundarios

A los 22 días de cultivos primarios, para la obtención de cultivos secundarios y observar el comportamiento de estas células en diferentes medios de cultivo, se procedió a la siembra en placas de 24 pocillos de las células procedentes de los cultivos primarios a una concentración de 83.000 células/ml, sembrándose 2 ml de suspensión celular en cada pocillo y utilizándose los siguientes medios de cultivo: MEM, Hank's, DMEM, RPMI-1640, MEM + 2% SFT (suero fetal de ternera) y RPMI-1640 + 10% SFT.

Para observar el crecimiento de la población celular, se hizo recuento de la densidad celular durante los días 7, 14, 21 y 28 de cultivo secundario (González y col., 1990).

III.B.1.1.1.8.4. Control de la esterilidad de los cultivos

Para comprobar la esterilidad de los cultivos celulares, periódicamente (cada 15 días), se sembraron placas de agar-sangre (Bio Merieux) con muestra de los diferentes cultivos; posteriormente las placas fueron incubadas un lote a temperatura ambiente y otro lote de placas sembradas con las mismas muestras a 37 °C, tras 48 horas de cultivo fueron leídas, observándose si aparecían alguna colonia bacteriana.

III.B.1.1.1.9. Técnica de inmunofluorescencia indirecta en células en cultivo

III.B.1.1.1.9.1. Preparación de los "shell-vial"

Las células en cultivo fueron sembradas en tubos "shell-vial" (Soria Melguizo,S.A.), los cuales llevan en su fondo un cristal cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro. Se añade en cada tubo 2 ml de suspensión celular a una concentración de 200.000 células/ml.

Los tubos "shell-vial" sembrados se mantienen en la estufa de cultivo, hasta que las células se adhieren y forman una monocapa, en dicho momento son utilizadas para la inmunofluorescencia (Mendoza y col.,1991).

III.B.1.1.1.9.2. Técnica de inmunoflorescencia indirecta

En primer lugar se retira el medio de cultivo de los "shell-vial" y se lava 3 veces con 1 ml de PBS; a

continuación se añade 2 ml de metanol y se mantiene en el tubo durante 10 minutos. Posteriormente se realizan 3 lavados con PBS y se extrae el cubreobjetos pinchando en el fondo del "shell-vial" con una aguja enmangada y caliente.

Los cubreobjetos obtenidos son adheridos por la cara contraria a donde están las células, a un portaobjetos con la ayuda de una gota de DPX (Aldrich Chemical), comprimiendo ligeramente con unas pinzas para evitar la presencia de burbujas de aire.

Una vez preparados los cubreobjetos con las células, se añaden 30 µl del primer anticuerpo antivimentina (Clone V9, Sigma) a la dilución de 1/50 y antidesmina (Clone DE-4-10, Sigma) a la dilución 1/50 y se incuba en cámara húmeda a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se lava con PBS 4 veces y añadimos 30 µl del segundo anticuerpo (Anti-Mouse Ig G (whole molecular)-FITC Conjugate (Sigma), a la dilución 1/20 e incubamos en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos y se lava 2 veces con PBS durante 5 minutos.

Una vez finalizados los lavados con PBS, se dejan secar y se añade una gota de glicerina tamponada previamente con carbonatos hasat un pH 8, se coloca un cubreobjetos y se presiona ligeramente para que no queden burbujas de aire. A continuación se procede a su observación mediante microscopio de fluorescencia.

III.B.1.2. Cultivos de células cardíacas humanas procedentes de biopsias quirúrgicas de corazón adulto

III.B.1.2.1. Extracción del miocardio

El tejido miocardico es aislado a partir de biopsias de músculo papilar y pectíneo (0,240-0,933 g de peso) (Tabla I), (para los cultivos se han utilizado las biopsias que presentaban un mayor peso) obtenidas mediante intervención quirúrgica de enfermos adultos humanos (42-65 años de edad) y transportada en frasco estéril, suspendidas en PBS hasta la cámara de flujo laminar.

La biopsia es introducida en un contenedor estéril y suspendidas en una mezcla enzimática (Amikacina (Bristol-Myers) 1 mg/ml, Anfotericina B 100 µg/ml y Vancomicina (Dista) 50 mg/ml), a una proporción de 200 µl de muestra enzimática por cada ml de muestra (biopsia suspendida en PBS); manteniéndose a 37°C durante 30 minutos.

Una vez trascurrido los 30 minutos de suspensión de la biopsia en la mezcla enzimática, la biopsia es extraída de la solución enzimática con ayuda de unas pinzas e introducida en una caja de Petri estéril de 60/15, a la cual añadimos 5 ml de PBS y con la ayuda de pinzas y tijeras se limpia de los restos grasos que lleva adherido el pericardio; a continuación se aislan las fibras musculares del miocardio que son separadas del pericardio y trozeadas en pequeñas piezas de 2-4 mm de lado.

Los fragmentos musculares son introducidos en un contenedor estéril al cual añadimos 10 ml de PBS y lavamos para retirar los restos sanguíneos, centrifugando a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos, repitiéndose la operación 5 veces. A continuación se retira el sobrenadante de la última centrifugación, se pesa el tejido y tenemos preparados los fragmentos de miocardio para añadirle la solución enzimática.

III.B.1.2.2. Disgregación del tejido cardíaco humano

III.B.1.2.2.1. Disgregación del tejido mediante solución enzimática a 37°C

Los fragmentos de miocardio fueron introducidos en una solución enzimática que contenía colagenasa 1 mg/ml y elastasa 0,5 mg/ml en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} a 37°C y con agitación contínua (mediante un agitador magnético) durante 1 hora, se recoge el sobrenadante y los restos de tejido se vuelven a incubar en solución enzimática durante 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación en la solución enzimática, la suspensión celular obtenida por la digestión enzimática es recogida mediante centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos y las células se recogen en el botón de centrifugación (González y col.,1989).

El resto de tejido que ha quedado sin disgregar se vuelve a introducir en solución enzimática, procediendo a la digestión enzimática con agitación, en dos ciclos de 30 minutos; recogiéndose mediante centrifugación las células aisladas en cada ciclo de digestión enzimática del tejido.

III.B.1.2.2.2. Disgregación del tejido mediante solución enzimática a 4°C

Una vez retirado el sobrenadante de la última centrifugación de lavado, se añade la solución enzimática compuesta por tripsina al 0,05%, EDTA 0,2 g/l y colagenasa 1 mg/ml en PBS libre de iones Ca^{++} y Mg^{++}, a unas concentraciones enzimáticas utilizadas por otros autores (Claycomb y Palazzo,1980; Suignard-Khaskiye y Le Douarin,1985; Aránega y col.,1989). Se añade la mezcla enzimática a la proporción de 1 ml de mezcla enzimática por cada 100 mg de tejido y se mantiene

durante 18 horas a 4°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación enzimática a 4°C, se retira el sobrenadante y el tejido cardíaco con el resto de solución enzimática que permanece se incuba a 37°C durante 30 minutos; a continuación se añade 2 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con el 20% de suero fetal de ternera, haciéndose pasar por pipeta pasteur mediante un proceso de succión-expulsión 30 veces, para disgregar el tejido; se recoge el sobrenadante donde se encuentran las células aisladas y se van almacenando a una temperatura de 4°C.

Al resto de tejido que ha quedade sin disgregar se añade 1 ml de solución de tripsina al 0,05% y EDTA 0,2 g/l, se tiene incubando a 36,5°C durante 30 minutos, se añade 1 ml del medio de cultivo suplementado con el suero fetal de ternera, se pipetea con pipeta pasteur (succión-expulsión) 30 veces el tejido y se vuelven a recoger el sobrenadante, conservándose a 4°C. Se repite la operación de disgregación con tripsina-EDTA de los restos de tejidos 3 veces.

Las células de los diferentes sobrenadantes obtenidos son recogidas mediante centrifugación a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos.

III.B.1.2.3. Cultivo de los miocardiocitos humanos

El tejido muscular disgregado con la método enzimático a 37°C, son sembrados en medio de cultivo DMEM; algunos de estos cultivos tisulares son posteriormente suplementados con el 10% de suero fetal de ternera o de glucosa (1 g/100 ml).

Los miocardiocitos aislados son suspendidos en 5

ml de medio DMEM suplementado con insulina 0,2 UI/ml (Nordisk), transferrina humana 1 µg/ml, glucosa 10 µg/ml, 20% de suero fetal de ternera, bencilpenicilina 200 UI/ml, gentamicina 40 µg/ml y anfotericina B 1,25 µg/ml. Las células fuerón sembradas a una densidad de 75.000 células/ml en frascos de cultivo de 50 ml e incubados en estufa de cultivo a una temperatura de 37°C, con una atmosfera del 85% de humedad relativa del aire y al 5% de CO_2 atmosférico. El medio de cultivo fue cambiado generalmente cada 7 dias, utilizándose el medio de cultivo suplementado con el 10% de suero fetal de ternera.

La contaminación por células no musculares, sobre todo fibroblastos, fue evitada por la adición de 10 µM de citosina-β-D-arabinofuranósido en los días 1 y 3 de cultivo (Claycomb y Moses,1985; Springhorn y Claycomb,1989).

El recuento del número celular fue llevado a cabo mediante un hemocitómetro y utilizando el azul trypan como colorante vital.

Los restos de tejido que quedan tras la digestión enzimática son depositados en un frasco de cultivo de 250 ml con 3 ml de medio de cultivo, para facilitar la adherencia de los explantes en la superficie de cultivo, añadiéndose 10 ml de medio fresco a los 2 días de cultivo. Los explantes de tejido cardíaco son cultivados con el mismo medio de cultivo y las mismas condiciones ambientales que las células aisladas.

III.B.1.2.4. Técnica de inmunoflorescencia indirecta en cultivo de miocardiocitos humanos adultos

Las células adheridas en los cubreobjetos depositados en los "shell-vial" se obtuvieron a partir de los restos de tejidos que quedaron tras los procesos de disgregación

enzimática a 4°C, depositándose pequeñas piezas de tejido tratados enzimáticamente sobre la superficie de los cubreobjetos y solamente humedecidos con medio de cultivo durante 24 horas, posteriormente se añade 0,5 ml de medio de cultivo fresco y al segundo día de cultivo se añade 1,5 ml de medio de cultivo fresco; teniendo cuidado de que en estos procesos no se despeguen los explantes de tejido adheridos a los cubreobjetos.

La contaminación por células no musculares, sobre todo fibroblastos, fue evitada por la adición de 10 µM de citosina-β-D-arabinofuranósido en los días 1 y 3 de cultivo (Claycomb y Moses,1985; Springhorn y Claycomb,1989).

Los medios de cultivo son cambiados cada 7 días y al cabo de los 14 días de cultivo, los "shell-vial" con las células adheridas pueden ser utilizados para la inmunofluorescencia, siguiéndose el mismo proceso que el utilizado para las células embrionarias cardíacas de pollo y utilizando los mismos anticuerpos monoclonales.

III.B.2. Tratamiento de los cultivos celulares con los fármacos

Las células miocardíacas embrionarias de pollo utilizadas para la experiencia con los fármacos, fueron sembradas a una densidad de 10^6 células/ml en frascos de cultivo de 50 ml previamente tratados con colágeno, añadiéndose 10 ml de suspensión celular por frasco de cultivo.

La contaminación de los cultivos por células no musculares, fue eludida por adición de citosina-β-arabinofuranósido 10 µM en el medio de cultivo en los días 1 y 3 de cultivo.

Las células fueron creciendo en el cultivo, hasta

que tras 3 días de cultivo las células han formado una monocapa, siendo en este momento cuando añadimos los diferentes fármacos .

En el día 4 de cultivo, cuando las células han formado la monocapa, se cambian los medios de cultivo y se añaden los derivados del ácido fíbrico utilizados en nuestras experiencias que han sido el bezafibrato (BF), fenofibrato (FF) y gemfibrozilo (GF). Las concentraciones de los fármacos en el medio utilizadas han sido la concentración plasmática terapéutica de dichos fármacos (BF 10 µg/ml (Abshagen y col., 1980), FF 30 µg/ml y GF 23 µg/ml (American Hospital Formulary Service,1990)) y una concentración tóxica de 1 mg/ml de dichos fármacos (ødegaard,1988; Steigmeier,1980).

En cada experiencia además de los diversos frascos de cultivo tratados con los fármacos, utilizamos frascos de cultivo sembrados a la misma densidad celular y en las mismas condiciones de cultivo, a dicho frascos de cultivo que van a ser utilizados como controles, solamente le añadimos medio de cultivo fresco.

El tiempo de tratamiento de las células en cultivo con los fármacos ha sido en unas experiencias de 6 horas y en otras de 24 horas. Trascurrido el tiempo de tratamiento con los diversos fibratos, las células en cultivo son recogidas para su procesamiento y posterior utilización en la electroforesis en SDS-PAGE.

III.B.3. Procesamiento de las muestras biológicas para la electroforesis en SDS-PAGE

III.B.3.1. Procesamiento de las células miocardicas en cultivo

Las células miocardicas en cultivo fueron procesados para la electroforesis en los geles de poliacrilamida de acuerdo con los métodos descritos por LEWIS y colaboradores (Lewis y Gonzalez,1987b; Lewis y col.,1988), con algunas modificaciones introducidas por nosotros (González y col.,1991).

III.B.3.1.1. Fraccionamiento subcelular

En primer lugar el medio de cultivo es decantado de los frascos de cultivo y cada frasco de cultivo que contienen las células adheridas, son posteriormente lavados 3 veces con 2 ml de una solución de ClNa 40 mmol/l a una temperatura de 4°C. A continuación 1 ml de tampón F (2mmol/l Tris, 0,2 mmol/l Cl_2Ca (Sigma), 0,2 mmol/l ATP (Sigma) y 0,2 mmol/l de 2-mercaptoetanol) conteniendo 0,1% de Triton X-100 (Sigma) es adicionado a cada frasco de cultivo y las células son recogidas con ayuda de una pipeta pasteur curvada. Si las células crecen en suspensión son recogidas mediante centrifugación.

Las células cosechadas son homogeneizadas en un homogeneizador manual vidrio-vidrio (vaso y vástago) a una temperatura de 4°C, a una velocidad de 60 golpes/minuto durante un tiempo de 30 segundos. Antes de proseguir se aisló una muestra del homogenado de 100 µl para determinar su concentración proteica.

La suspensión celular del homogenado es posteriormente sometida a una centrifugación a 13.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente; el sobrenadante de esta centrifugación contiene la fracción soluble en Triton X-100 que corresponde a las proteínas citoplasmáticas celulares. Dicha fracción soluble en Tritón X-100 es recogida aislándose una muestra de 100 µl para la determinación de la concentración proteica y se guardaron hasta su utilización para la disolución

en tampón de muestra de electroforesis en alícuotas de 300µl a una temperatura de -20°C.

La fracción insoluble en Triton X-100 que ha quedado en el botón de la centrifugación es lavada 3 veces con tampón F (500 µl), sometiendose a centrifugaciones de 13.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de los lavados son desechados.

Tras los lavados el residuo de las centrifugación (fracción insoluble en Triton X-100), es resuspendido en 500 µl de tampón de extracción de la fracción citoesquelética (0,121% (p/v) Tris, 2% SDS y 10% glicerol (Panreac) en agua destilada), colocándose a una temperatura de 100°C (en agua en ebullición) durante 3 minutos y posteriormente sujeto a centrifugación de 13.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, para retirar los restos que no se han disuelto. De éste modo obtenemos un sobrenadante con la solución proteica soluble en SDS e insoluble en Triton X-100 que corresponde con la fracción proteica del citoesqueleto celular, del cual se aisla 100 µl para la determinación de la concentración proteica y el resto es guardado hasta su utilización para la disolución en tampón de muestra para electroforesis en alicuotas de 300 µl a -20°C de temperatura.

III.B.3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas en las fracciones subcelulares

La concentración proteica del homogenado, de la fracción citoplasmática y de la fracción del citoesqueleto fue determinada en las alicuotas de 100 µl aisladas a tal efecto y la determinación se ralizó por el método descrito por LOWRY y colaboradores (1951).

III.B.3.1.3. Preparación de las fracciones subcelulares para la electroforesis en SDS-PAGE

Para aislar las proteínas de las fracciones aisladas ponemos las muestras de las fracciones obtenidas a una dilución 1/6 en acetona (Panreac) (estando previamente a -20°C) a -20°C durante 1 hora, lográndose que precipiten las proteínas que son recogidas por centrifugación diferencial a 8.000 r.p.m. durante 15 minutos, a una temperatura de 4°C en una centrífuga J-21 de Beckman.

Los sobrenadantes de las centrifugaciones son desechados y los residuos proteicos obtenidos son disueltos en los volumenes adecuados de tampón de muestra Laemmli (Laemmli, 1970) (0,121% (p/v) Tris, 2% SDS, 10% glicerol (Panreac), 5,5% 2-mercaptoetanol y 0,02% de azul de bromofenol) hasta obtener una concentración final de 1 mgr/ml.

Posteriormente los diferentes tampones de muestras con las proteicas celulares disueltas, son guardados hasta su utilización en la electroforesis en alicuotas de 100 µl a una temperatura de -20°C.

III.B.3.2. Procesamiento de los tejidos cardíacos

III.B.3.2.1. Procesamiento de los tejidos cardíacos de embriones

Los corazones de los embriones una vez obtenidos y desprovistos de los restos de otros tejidos, fueron lavados en PBS y cortados en pequeños fragmentos de de 1 mm de diámetro aproximadamente; posteriormente fueron lavados con PBS para eliminar los restos sanguíneos mediante centrifugación

diferencial.

Para el subfraccionamiento celular, aislamiento de proteínas citoplasmaticas y citoesqueléticas, y la disolución de dichas proteínas en el tampón de muestra para la electroforesis, el tejido cortado y bien lavado se le sometió al mismo protocolo que seguimos para las células miocardicas recogidas de los cultivos celulares.

III.B.3.2.2. Procesamiento del tejido cardíaco humano adulto procedente de biopsias quirúrgicas

La biopsia de tejido cardíaco humano obtenidas (0,240-933 g) (Tabla I), son desprovistas del pericardio y restos grasos que llevan adheridas, siendo aisladas las fibras musculares de miocardio; el miocardio aislado es trozeado en pequeñas piezas de aproximadamente 1 mm de diámetro y a continuación son lavadas en PBS para eliminar los restos sanguíneos.

La homogeneización se llevo a cabo por los métodos siguientes:

A) Homogeneización manual:

Se realizó por el mismo proceso seguido para las células miocardicas en cultivo y para el tejido cardíaco de pollo, solo que el tiempo que duró la homogeneización fue de 1 minuto (a una velocidad de 60 golpes/minuto).

B) Homogeneización mecánica:

Los trozos de tejido cardíaco fueron introducidos en 1 ml de tampón F con el 1% de triton X-100, y

posteriormente fueron homogeneizados con la ayuda de un Polytron (Polytron PCU PT10-35, Kinematica AG), accionado en la posición 5 durante un periodo de tiempo de 20 segundos, repitiendose la operación 3 veces.

Una vez obtenido el homogenado, el proceso posterior seguido fue el mismo que para las células en cultivo y para el tejido cardíaco procedente de los animales de experimentación.

III.B.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

III.B.4.1. Preparación de los geles y electroforesis de las muestras proteicas

Las proteínas disueltas en el tampón de muestra para la electroforesis, fueron sometidas a la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, por la técnica con el sistema de geles discontinuos descrita por LAEMMLI (1970), adaptada a microgeles (53x80x0,75mm) y con un gel superior de 10 mm, realizada en un equipo de electroforesis vertical Mini-Protean II Slab Cell el cual nos permite la realización de dos geles en un mismo tiempo (Leiva y col.,1989).

En primer lugar se ensamblaron los cristales con los separadores, ajustándose a los soportes con un ajuste especial de tornillos y posteriormente dichos soportes con los cristales, se introdujeron en su base en posición vertical, estando preparados para la introducción de los geles entre los cristales.

A continuación se preparó el gel inferior o de

separación con una concentración final de poliacrilamid· del 12%, a partir de una solución stock que contenia 29,2% (p/v) de acrilamida y 0,8% (p/v) de N,N'-metilenbisacrilamida. La concentración final deotros componentes en el gel inferior fue de 0,375M de Tris-ClH, pH 8,8 y 0,1% (p/v) de SDS. La polimerización se logró por adicción de 0,05% (p/v) de persulfato amónico (a partir de una solución del 10%) y 0,05% (p/v) de N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED). La mezcla de los componentes del gel inferior (realizada en un tubo universal) excluyendo el SDS, persulfato amónico y TEMED, se desgasificaron durante 15 minutos al vacio. Una vez añadidos los tres componentes anteriormente excluídos, mediante una pipeta pasteur la mezcla se vertió hasta la altura indicada entre los cristales, se cubrió con alcohol isopropílico (Panreac) para eliminar los meniscos y homogeneizar el borde superior del gel, dejándose polimerizar 30-45 minutos a temperatura ambiente.

Una vez polimerizado el gel inferior, se vuelcan los cristales para eliminar el alcohol isopropílico utilizado y se preparó el gel superior o de concentración a partir de la misma solución stock usada para el gel inferior, lográndose una concentración final de poliacrilamida del 5%. Se añadieron los diferentes componentes hasta alcanzarse una concentración final de 0,125M de Tris-ClH, pH 6,8 y 0,1% (p/v) de SDS; la polimerización se produjo por la adicción de 0,05% (p/v) (a partir de una solución del 10%) de persulfato amonico y 0,1% (p/v) de TEMED. La mezcla de los componentes del gel superior excluyendo el SDS, persulfato amónico y TEMED, se desgasificó y una vez añadidos los componentes anteriores, se vertió rapidamente, con la ayuda de una pipeta pasteur, sobre el gel inferior polimerizado y se colocó el peine formador de pocillos (10 pocillos de 4 mm), permitiendose polimerizar durante 30-45 minutos.

Transcurrido el tiempo de polimerización, se retiró el peine, se colocaron los cristales con sus soporte en la

cubeta de electroforesis y los pocillos se lavaron dos veces con tampón de electroforesis 0,25M de Tris, 0,192M de glicina, 0,1% (p/v) de SDS, pH 8,3.

Inmediatamente antes de ser colocadas en los pocillos del gel, las diferentes muestras proteicas se calentaron a 95°C durante 5 minutos, para que terminara de actuar el SDS y se centrifugaron a 13.000 g durante 5 minutos, eliminándose los restos de proteínas que queden sin disolver. A continuación las muestras fueron introducidas en los pocillos mediante una jeringa Hamilton, en un volumen de 15 µl/pocillo , reservándose uno de los pocillos para el patrón de pesos moleculares de bajo rango de pesos moleculares, cuya composición es la siguiente:

- Fosforilasa B.....97.400 Daltons.
- Albúmina de suero bovino.....66.200 Daltons.
- Ovoalbúmina.....45.000 Daltons.
- Anhidrasa carbónica.....31.000 Daltons.
- Inhibidor de la tripsina.....21.500 Daltons.
- Lisozima.....14.400 Daltons.

Una vez introducidas las muestras en los pocillos, se conectó la cubeta de electroforesis a la fuente de alimentación y se procedió al corrido de los geles a 100 voltios durante 45 minutos.

III.B.4.2. Tinción de geles.

Una vez realizada la electroforesis en SDS-PAGE, los geles de poliacrilamida fueron teñidos durante 30 minutos utilizando como colorante de las proteínas Azul Coomassie R-250 (Fairbanks y col.,1971), el cual se encuentra disuelto en la solución de teñido de geles (0,05% (p/v) de Azul Coomassie R-250, 21,2% de isopropanol del 95%, 10% de ácido acético glacial

(Panreac) en agua destilada).

La decoloración del gel se llevó a cabo mediante sucesivos lavados durante 5 minutos del gel teñido en la solución de desteñido o decolorante (45% de ácido acético glacial y 10% de metanol en agua destilada), a lo largo de un periodo de 1-2 horas hasta que se observaron nítidas las bandas proteicas teñidas.

III.B.4.3. Conservación de los geles.

Una vez los geles teñidos se conservaron desecados entre dos láminas de papel de celofán; para evitar los posibles hinchazones y rupturas de los geles, fueron previamente sumergidos en una solución que contenía 3% de glicerol (Panreac), 40% de metanol (Panreac) y 10% de ácido acético. La desecación se realizó en el secador de geles a 80°C durante 2 horas conectado a un vacio de aproximadamente 175 mm Hg de presión, siguiendo las intrucciones del fabricante.

III.B.4.4. Determinación de los pesos moleculares de las bandas proteicas

En las condiciones de la electroforesis en SDS-PAGE las movilidades relativas (Rf) de las proteínas están en función lineal de los logaritmos de sus pesos moleculares (Shapiro y col,1967; Weber y Osborn,1969). Mediante el patrón de pesos molecular se determinó las movilidades relativas aproximadas (distancia recorrida por la proteína/ distancia recorrida por el frente del colorante) de cada proteína, las cuales se representarón gráficamente frente al logaritmo del peso molecular obteniéndose una recta patrón.

Posteriormente se determino la movilidad relativa de cada banda proteica observada en los geles, permitiéndonos calcular tomando como referencia la recta patrón los pesos moleculares de las bandas proteicas obtenidas en los geles.

III.B.5. Identificación de las bandas proteicas en geles de poliacrilamida por inmunoblotting.

III.B.5.1. Inmunoblotting

El inmunoblotting o western-blot se realizó por una modificación de la técnica descrita por TOWBIN y colaboradores (1979) (Leiva y col.,1989).

Antes de finalizar la electroforesis en SDS-PAGE, los geles destinados al inmunoblotting, se le añadió a cada pocillo el colorante verde de metilo disuelto en un tampón de muestra sin β-mercaptoetanol y sin azul de bromofenol; con la finalidad de que nos marcara en el gel inferior el límite de la electroferis en cada pocillo. Despues de la electroforesis los geles fueron equilibrados en tampón de transferencia (25 mM de Tris, 192 mM de glicina (Boehringer), 20% de metanol, pH 8,3), durante media hora.

Se cortaron papel Whatmam, papel de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,45 µm, siguiendo las dimensiones del gel y también se equilibraron junto a las esponjas durante media hora en el tampón de transferencia.

A continuación se procedió a la elaboración del sandwich de transferencia, colocando seriadamente y del polo negativo al positivo los siguientes componentes:

esponja, papel Whatman, gel, papel de nitrocelulosa, papel Wahtman y esponja. Las burbujas de aire formadas entre el gel y el papel de nitrocelulosa, deben ser eliminadas rodando una pipeta de 5 ml sobre la lamina de papel de nitrocelulosa pegada al gel.

El sandwich una vez completo, se colocó en su receptaculo soporte y se introdujo en la cubeta de transferencia, se añadió tampón de transferencia hasta cubrir el gel y se conectó a la fuente de alimentación a 30 voltios, realizándose la transferencia durante 12-14 horas a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la transferencia, se sacó el papel de nitrocelulosa y el gel del receptáculo soporte, descartándose el gel. El papel de nitrocelulosa se cortó en tiras de 8 mm de ancho, utilizándose como guía el verde metilo corrido en cada pocillo.

III.B.5.2. Tinción de proteínas en papel de nitrocelulosa.

Para la comprobación de que la transferencia se había realizado en las condiciones adecuadas, se utiliza la tinción con Negro Amido de una de las tiras de nitrocelulosa (Towbin y col.,1979) como control de la electrotranferencia. Las tiras de papel de nitrocelulosa se tiñerón durante 5 minutos con la solución colorante (0,2% (p/v) de Negro Amido (Sigma), 7% de ácido acético, en solución acuosa); posteriormente se lavarón con agua destilada y el exceso de colorante fue eliminado con la solución decolorante (70% metanol y 7% de ácido acético en solución acuosa). A continuación las tiras fueron lavadas con agua destilada y secadas con papel de filtro.

III.B.5.3. Inmunodetección de las proteínas.

Para la inmunodetección de las proteínas las tiras de papel de nitrocelulosa transferidas se sometieron a 3 lavados de 15 minutos cada uno con una solución de lavado (0,1% de Tween-20 en solución de TBS al 6% (p/v)), posteriormente se procedió al bloqueo de los sitios de unión inespecíficos del papel de nitrocelulosa mediante la solución bloqueante (5% de leche desnatada (Molico) en TBS) durante 3 horas, añadiéndose 2 ml de solución bloqueante por cada tira de papel de nitrocelulosa.

Tras el bloqueo se procedió a la incubación con el primer anticuerpo, añadiendo a cada tira de papel de nitrocelulosa distintas diluciones de los anticuerpos monoclonales anti-Desmina (Clone DE-4-10, Sigma) y anti-Vimentina (Clone V9, Sigma), observándose que la dilución más efectiva era la 1/200 para el anticuerpo monoclonal anti-Desmina y de 1/200 para el anticuerpo monoclonal anti-Vimentina. La incubación con el primer anticuerpo tubo lugar durante 4-5 horas. A continuación las tiras de papel de nitrocelulosa se sometierón a 3 lavados de 5 minuto con la solución Tween-TBS.

A continuación se realizó la incubación con el segundo anticuerpo (anti mouse IgG marcado con peroxidasa) a una dilución de 1/1.000, llevándose a cabo durante un periodo de tiempo de 3 horas.

Una vez finalizada la segunda incubación, se realizaron 2 lavados de 5 minutos con solución Tween-TBS y un último lavado sólo con TBS. Para el revelado se usó una solución de 4-cloro-1-naftol 0,05% (Sigma), peróxido de hidrógeno (30%) (Sigma) 0,015% y 20% de metanol en TBS (Hawkes y col, 1982).

Una vez reveladas, las tiras de papel de

nitrocelulosa se guardaron entre dos papeles Whatman empapados en TBS y en la oscuridad, antes de ser fotografiadas.

III.B.6. Analisis densitométrico de los geles

Una vez secados los geles tras la electroforesis en SDS-PAGE conservados en el papel de celofán, las cantidades relativas de las distintas bandas proteicas teñidas con Azul Coomassie en las diferentes calles de los geles, fueron evaluadas con un densitómetro colocado a una anchura de banda de 4 mm y a una longitud de onda de 540 nm, con la ayuda de un computador integral que analiza los datos obtenidos.

III.B.7. Analisis estadístico

Para comprobar la distribución Normal de las variables, hemos aplicado el TEST DE KOLMOGOROV SIMRNOFF.

Hemos aplicado un TEST DE CONTRASTE DE MEDIAS (T DE STUDENT) para comparar medias densitométricas de las diferentes bandas proteicas medidas y de las concentraciones proteicas determinadas.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.A. Cultivos celulares

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

IV.A.1.1. Efectos de las modificaciones en las técnicas de cultivo

IV.A.1.1.1 Procesos de disgregación tisular

Los corazones aislados de diferentes estadios del desarrollo embrionario (XVIII, XXV, XXIX y XXXVIII H.H.) fueron disgregados y sus células aisladas por los tres métodos de disgregación utilizados.

Mediante el método físico el número de células obtenidas por corazón disgregado es ligeramente inferior a las obtenidas mediante el método de la tripsina a una temperatura de 37°C, en los primeros estadios del desarrollo embrionario utilizados (XVIII, XXV y XXIX H.H.), creciendo la diferencia conforme avanzan los estadios del desarrollo (Tabla II). Con la utilización de ambos métodos de disgregación, siempre permanece una pequeña cantidad de tejido sin disgregar dicha cantidad va aumentando conforme avanzan los estadios del desarrollo embrionario utilizados.

En los estadios muy avanzados en el desarrollo embrionario (XXXVIII H.H.), el número de células obtenidas

por corazón mediante el método enzimático de tripsina a 37°C es muy superior al obtenido por el método físico (Tabla II). En ambos casos, quedaron tras los procesos normales seguidos en las técnicas, gran cantidad de tejido sin disgregar, debiendo de repetirse los procesos de disgregación en el caso del método físico 10 veces más que con los tejidos blandos de los estadios de desarrollo XXVIII, XXV y XXIX H.H. Cuando utilizamos como método de disgregación la tripsina a 37°C, tras la hora de disgregación enzimática a 37°C, debemos someter el tejido a nuevas disgregaciones mediante agitación con tripsina a 37°C en 5 ciclos de 30 minutos de duración cada uno. A pesar de haber forzado las condiciones de disgregación, cuando utilizamos el método físico nos queda grandes restos de tejido sin disgregar; de la misma manera, aunque en una cantidad menor, permanecen restos de tejido sin disgregar por el método de tripsina a 37°C.

Los resultados obtenidos por corazón cuando utilizamos el método de disgregación enzimática a 4°C es muy superior que a los obtenidos por los otros métodos en todos los estadios del desarrollo embrionario experimentados (Tabla II). El número de células obtenidas por corazón va aumentando gradualmente conforme avanza la edad del embrión, notandose una gran diferencia con respecto a los otros métodos cuando el tejido embrionario pertenece a estadios avanzados del desarrollo embrionario.

La viabilidad celular de las células aisladas mediante los métodos físicos fue del 75-85%, la obtenida cuando utilizamos la tripsinización a 37°C fue del 70-85% (obteniéndose los valores de viabilidad más bajos en el estadio más avanzado (XXXVIII H.H.) y en el caso de tripsinización a 4°C la viabilidad fue superior a la de los otros dos métodos y muy similar para todos los estadios, oscilando entre el 90-95%.

IV.A.1.1.2. Densidad de siembra

La densidad celular inicial de células viables utilizada para la siembra es importante dependiendo el tipo de cultivo que queramos obtener, el frasco de cultivo utilizado y la utilización que le demos a dicho cultivo.

Cuando utilizamos como superficie de cultivo placas de 24 pocillos de 1,5 cm de diámetro, la densidad celular utilizada para estadios del desarrollo embrionario inferiores (XVIII-XIX H.H.) fue de 85.000 células/ml, obteniéndose un cultivo en el cual a los 7 días de cultivo algunas células están adheridas, pero la gran mayoría permanece en suspensión. Para estadios más avanzados (XXIX-XXX H.H.), se han utilizado una densidad celular inicial de siembra de 150.000 células/ml y a los 7 días de cultivo, aunque ha aumentado el número de células adheridas con respecto a los estadios XVIII-XIX H.H., más de la mitad del porcentaje celular permanece en suspensión.

En el caso de utilización como superficie de cultivo los frascos de cultivo de 50 ml de capacidad (25 cm^2 de superficie), la densidad celular de siembra utilizada fue de 1.10^6 células/ml después de 48-72 horas de cultivo todos los frascos de cultivo presentan las células en cultivo confluentes y si utilizamos los frascos de cultivo con matriz de colágeno en su superficie, tras 3 días de cultivo una espesa monocapa celular se ha formado y escasas células permanencen en suspensión. Conforme la densidad de siembra utilizada es inferior a 10^6 células/ml, la confluencia celular en el caso de las células adheridas es menor, no formándose monocapas; si la densidad de siembra es de 100.000 células/ml ó inferior, solamente algunas células aisladas o en pequeñas agrupaciones se observan adheridas, la gran mayoría permanece en suspensión.

IV.A.1.1.3. Influencia del medio de cultivo en la evolución de la población celular

Para la búsqueda del medio de cultivo adecuado para los miocardiocitos embrionarios de pollo hemos estudiado la evolución de la población de miocardiocitos viables procedentes de embriones del estadio XXIX H.H. del desarrollo embrionario, a lo largo del tiempo de cultivo en diferentes medios comerciales (MEM, Hank's, DMEM y RPMI-1640) y la evolución del número celular cuando dichos medios de cultivo son suplememtados con el 20% de suero fetal de ternera (SFT).

La densidad celular inicial de siembra utilizada en todos los pocillos de cultivo fue de 150.000 células/ml y el recuento celular se realizó periódicamente cada 7 días. En todos los casos se ha observado una disminución de la densidad celular a lo largo del tiempo de cultivo; solamente existe una excepción en el caso del medio DMEM, en el cual se observa un ligero aumento en el número celular en el día 21 de cultivo con respecto al día 14 de cultivo (Tabla III).

Tras 7 días de cultivo se observa una disminución de casi el 50% (46%) en la población celular en el caso de los medios de cultivo Hank's con respecto a la densidad celular de siembra, DMEM y RPMI-1640 y la disminución es superior en el caso del medio MEM (63%). A los 14 días de cultivo la población celular ha disminuido un 73% en el caso de los medios de cultivo MEM y Hank's, siendo la reducción del número celular menor en los medios RPMI-1640 (63%) y DMEM (60%). A los 21 días de cultivo la disminución es muy elevada para los medios de cultivo Hank's (80%) y MEM (76%), en el caso del RPMI-1640 la disminución fue del 66% y cuando hemos utilizado el medio de cultivo DMEM aunque la disminución de la población celular ha sido del 53%, observamos que la población celular ha aumentado un 16% con respecto al valor observado en el día 14 de

cultivo. A los 28 días de cultivo la densidad de la población celular es muy pequeña en todos los medios de cultivo, el porcentaje de la disminución celular es muy elevado (Hank's 93%, MEM 86%, RPMI-1640 80% y DMEM 73%) y en el caso del medio de cultivo DMEM no se observa que el número de células/ml siga aumentando, sino que al contrario ha disminuido un 42% con respecto a la semana anterior (día 21 de cultivo) (Tabla III).

Cuando los medios de cultivo los suplementamos con el 20% de SFT, a los 7 días de cultivo observamos una disminución en el número de células, pero en todos los casos el porcentaje de disminución de la población celular (DMEM + 20% SFT 6%, RPMI-1640 + 20% SFT 26%, Hank's + 20% SFT 30% y MEM + 20% SFT 53%), es mucho menor que cuando hemos utilizado los respectivos medios de cultivo sin suplementar con SFT densidad; observándose que en el caso del medio de cultivo DMEM + 20% SFT, el número de células/ml permanece practicamente casi igual que el número de células sembradas. A los 14 días de cultivo, la población celular sigue disminuyendo en todos los pocillos (DMEM + 20% SFT 33%, RPMI-1640 + 20% SFT 40%, MEM + 20% SFT 60% SFT y Hank's + 20% SFT 76%), siendo el pocillo con medio de cultivo DMEM + 20% SFT el que mayor número de células viables conserva. A los 21 días de cultivo siguen disminuyendo las células en cultivo (DMEM + 20% SFT 46%, RPMI-1640 + 20% SFT y MEM + 20% SFT 73%, y Hank's + 20% SFT 86%), pero se observa que el porcentaje de disminución celular en el caso de los medios de cultivo RPMI-1640 y Hank's suplementados con el 20% de SFT, son superiores que los porcentajes de disminución celular para sus respectivos medios de cultivo sin SFT. A los 28 días de cultivo siguen aumentando el porcentaje de disminución celular (DMEM + 20% SFT 63%, MEM + 20% SFT 76% RPMI-1640 + 20% SFT 86% y Hank's + 20% SFT 90%), volviendose a observar un mayor número celular en el pocillo que contienen como medio de cultivo DMEM + 20% SFT (Tabla IV), de igual modo que en el caso de los medios de cultivo sin suplementar.

IV.A.1.1.4. Influencia de los factores de crecimiento en la evolución de la población celular

Las células embrionarias cardíacas procedentes de embriones de pollo del estadio XXIX H.H. del desarrollo embrionario, las hemos sembrado en diferentes pocillos con medio de cultivo (DMEM + 20% SFT) suplementado con diferentes factores de crecimiento conocidos y a diversas concentraciones, para estudiar la influencia de dichos factores de crecimiento sobre la población celular.

Cuando el medio de cultivo es suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF "epidermal growth factor"), en todas las concentraciones usadas se observa una disminuación de la densidad celular a lo largo de los días de cultivo; el porcentaje de dicha disminución es mayor que en el caso de los pocillos controles que contienen el medio de cultivo sin factor de crecimiento a los mismos días de cultivo. A lo largo de los días de cultivo la disminución de la población celular es mayor cuando la concentración de EGF utilizada es mayor (10^{-7}), siendo el porcentaje de disminución de la población celular a los 7 días de cultivo del 33% para la concentración de EGF 10^{-7} y del 20% para una concentración de EGF 10^{-8}, a los 14 días de cultivo la disminución es del 63% para concentración de 10^{-7} y del 53% para la concentración 10^{-8}, a los 21 días de cultivo la disminución es del 86% para la concentración de 10^{-7} y del 76% para 10^{-8} de concentración y a los 28 días de cultivo son del 90% y del 86% respectivamente para el medio con más concentración de EGF y para el de menor concentración (Tabla V).

En el caso de aplicación de transferrina humana como factor de crecimiento, con respecto al control observamos un aumento de la población a los 14 días de cultivo a ambas concentraciones utilizadas (10^{-7} y 10^{-6}), así como al día 14 de cultivo a una concentración de transferrina de 10^{-7}. A los 7 días

de cultivo la disminución de la población celular es de 20% en ambos casos, a los 14 días son muy similares, del 26% (10^{-7}) y del 23% (10^{-6}); a los 21 días de cultivo cuando la transferrina está más diluida (10^{-7}) la disminución es del 43% y para la concentración 10^{-6} es del 50%; tras 28 días de cultivo la disminución es del 70% y del 73% respectivamente (Tabla V).

Cuando el medio de cultivo es suplementado con fitohemaglutinina no observamos ningún aumento de la población celular con respecto al cultivo control. Se observa a los 7 días de cultivo la misma disminución de la población celular (26%) para las dos concentraciones utilizadas (6 y 8 µl/ml), a los 14 días de cultivo la disminución de la población es menor para la concentración de 8 µl/ml del factor de crecimiento (40%), que en el caso del uso de una concentración más baja de 6 µl/ml (56%); al cabo de los 21 días de cultivo la disminución ha sido del 60% para una concentración de 6 µl/ml y del 73% para una concentración de 8 µl/ml. Tras 28 días de cultivo la población celular ha sufrido una disminución del 90% cuando se ha utilizado una concentración del 6 µl/ml, por el contrario se observa un aumento de la población celular del 12% con respecto al día 21 de cultivo, cuando una concentración de fitohemaglutinina del 8 µl/ml (Tabla V).

La insulina es el factor de crecimiento utilizado que más aumenta la población celular con respecto al cultivo control, si bien a los 7 días de cultivo la población celular es menor que en el control, a los 14 días de cultivo la población celular es ligeramente inferior a la control para concentraciones de insulina de 2 UI/ml y ligeramente superior para concentraciones de 0,2 UI/ml; si para concentraciones del factor de crecimiento de 0,2 UI/ml la población celular es inferior a la control en los días 21 y 28 de cultivo, para concentraciones de 2 UI/ml la población celular aumenta con respecto a los controles en un 43% y un 45% respectivamente para los días 21 y 28 del cultivo (Tabla V). Conforme avanzan los días de cultivo se va

produciendo una disminución de la población celular con respecto a la densidad celular de siembra, así a los 7 días de cultivo la disminución ha sido del 33% para concentraciones de insulina de 2 UI/ml y del 26% para una concentración de 0,2 UI/ml; en el día 14 del cultivo la disminución de la población ha sido del 36% y del 30% respectivamente; a los 21 días de cultivo se produce un aumento de la población para medios de cultivo con 2 UI/ml de insulina, aunque con respecto a la población celular utilizada como siembra se ha producido una disminución por ml del 23%, disminuyendo en un 46% para concentraciones de 0,2 UI/ml de insulina. Tras 28 días en cultivo la disminución ha sido del 46% (2 UI/ml) y del 53% para la insulina más diluida (0,2 UI/ml).

El interferón no produce en ninguno de los días de cultivo un aumento de la población con respecto al control. Con respecto a la densidad celular de siembra se produce una disminución de la población celular del 43% para concentraciones de 0,4 µl/ml de interferón y para concentraciones de 2 µl/ml la disminución es del 26%, para el día 14 de cultivo se ha producido una disminución del 66% para concentraciones de 0,4 µl/ml y para concentraciones de 2 µl/ml la disminución es del 60%. En el día 21 de cultivo la población celular ha disminuido un 73% (0,4 µl/ml) y un 63% (2 µl/ml), y tras 28 días de cultivo para una la disminución es del 86% para ambas concentraciones (Tabla V).

IV.A.1.1.5. Influencia de los sobrenadantes de cultivos celulares en la evolución de la población celular

Hemos utilizado sobrenadantes de cultivos celulares de líneas celulares establecidas (Hela-229, McCoy, Hela y Hep-2) y de cultivos de fibroblastos embrionarios procedentes de pulmón humano, para estudiar la posible existencia de factores de crecimiento producidos por estas células y pudieran estimular la proliferación de los miocardiocitos en

cultivo. Hemos utilizado, como en las experiencias con los factores de crecimiento, un cultivo control que contenía como medio de cultivo DMEM + 20%SFT.

La concentración celular de siembra en todos los cultivos fue de 150 . 10^3 células/ml, sembradas en el control y en diferentes medios formados por diluciones 1/2 de medio de cultivo (DMEM +20% SFT) y sobrenadantes de los cultivos celulares. El recuento de las células viables se realizó cada 7 días, hasta el día 28 de cultivo.

En ninguno de los pocillos con células en cultivo con diferentes sobrenadantes se observa a lo largo de los días de cultivo aumento de la población celular con respecto al recuento efectuado la semana anterior. Tomando como referencia el cultivo control, la densidad celular permanece muy semejante en todos los cultivos al cabo de 7 días, después el número celular va disminuyendo con respecto al control, salvo en el pocillo que contiene sobrenadante de los cultivos de célula McCoy en que el número de células/ml se mantiene semejante a los del control hasta el día 21 de cultivo en que el número celular del control es ligeramente superior al del cultivo con medio de cultivo con sobrenadante de cultivos McCoy (Tabla VI

A los 7 días de cultivo la población celular es igual a la del control en los casos de cultivos que contienen medio de cultivo con dilución 1/2 con sobrenadantes de células Fibroblastos humanos, Hela y McCoy, siendo la disminución de la población celular con respecto a la inicial de siembra del 6%; en el caso de células tratadas con sobrenadante de Hela-229 y Hep-2, la disminución fue del 20% y del 13% respectivamente. A los 14 días de cultivo la disminución de la población es más diversa, dependiendo del tipo de sobrenadante utilizado; mientras para las que están en contacto con sobrenadante McCoy la población celular es igual a la control y solo disminuye un 10%, para las que han estado en contacto con sobrenadante Hela-229, la disminución es

del 15, 25 y 40% respectivamente para los que llevan sobrenadantes de fibroblastos, Hela y Hep-2.

En el día 21 de cultivo las tratadas con McCoy contienen el mismo número que las controles y su disminución fue del 46% con respecto a la densidad inicial de siembra, del 53% para las que han estado en contacto con sobrenadante Hela, con Hela-229 la disminución fue del 56%, para las tratadas con sobrenadante de fibroblastos humanos del 70% y cuando utilizamos sobrenadante de Hep-2 la disminución fue del 60%. A los 28 días de cultivo el número celular en los pocillos que contienen sobrenadante McCoy fue inferior a la población celular de los controles y su disminución con respecto a la densidad de siembra, al igual que en el caso de las que han estado en contacto con sobrenadante Hela-229 fue del 73%, para los sobrenadantes de fibroblastos humanos y Hela fue del 83% y del 76% para las tratadas con sobrenadante de Hep-2.

IV.A.1.1.6. Morfología de las células en cultivo

Para el estudio de la morfología celular hemos aislado células de corazones embrionarios con un amplio margen de estadios H.H. del desarrollo embrionario (XXVII-XL), tanto por el método de disgregación físico como por tripsinización a 37°C de temperatura. La morfología de las células recién aisladas y a lo largo de cultivo no suele variar si se utiliza un método ú otro de aislamiento celular.

En la observación en microscopio de contraste de fases de las células recién aisladas, morfológicamente se distinguen dos tipos celulares, uno formados por células esféricas pequeñas y más refringentes que el segundo grupo formado por células un poco mayores en tamaño y morfología ovalada; en ambos tipos celulares se observa un núcleo central.

Las células más pequeñas corresponden a células sanguíneas que se observan en mayor proporción cuando la disgregación ha sido mecánica que cuando se ha realizado mediante el uso de enzimas; las células ovaladas y de mayor tamaño corresponden al tejido cardíaco. En ambos casos de disgregación siempre se observan restos de tejido sin disgregar, en mayor medida permanecen estos restos cuando la disgregación ha sido de forma mecánica, que cuando se ha realizado químicamente mediante la utilización de enzima tripsina.

Las primeras experiencias dirigidas a la observación de la evolución morfológica de las células a lo largo del cultivo, se realizaron en placas de 24 pocillos. Tras 24 horas de cultivo, en medio de cultivo DMEM +20% SFT o RPMI-1640 +20% SFT,las células sanguíneas pequeñas han disminuido en su número, se observan mayor proporción de las células ovaladas en las cuales se observa de forma nítida la membrana plasmática que limita el contenido celular, lisa sin invaginaciones, algunas inclusiones en el citoplasma y un núcleo central. Las células sanguíneas y las cardíacas ovalas permanecen en suspensión, generalmente aisladas, aunque pueden observarse algunas pequeñas agrupaciones de 2-3 células, sobre todo cercanas a las paredes laterales de los pocillos. También se observa otro tipo celular con una morfología totalmente distinta a las anteriores, son células de mayor tamaño, que se encuentran adheridas a la superficie del pocillo, generalmente aisladas y con una morfología irregular y variada; se observan algunas células adheridas alargadas por los extremos, con típica morfología fibroblástica y otras también de gran tamaño con respecto a las ovaladas que crecen en suspensión, con muchas prolongaciones del citoplasma celular y nucleada. Se observa en el medio que van apareciendo detritus celulares, así como restos de tejidos sin disgregar (Figura 1).

A los 2 días de cultivo, se observa gran cantidad de detritus, el número de células sanguíneas ha disminuido, van

aumentado las agrupaciones o agregaciones celulares en tamaño y en número localizandose preferentemente en los bordes laterales del pocillo; también se observan un mayor número de células adheridas. Conforme avanza la edad del embrión del cual se aislan las células, las agregaciones celulares se observan antes en el tiempo de cultivo.

En los primeros días de cultivo, con objeto de retirar los detritus celulares y los restos de tejidos que se necrosan, se retira el medio de cultivo y se recogen las células que se vuelven a vertir en los pocillos con medio de cultivo fresco.

A lo largo de los días en cultivo, van desapareciendo las células sanguíneas, las células ovaladas forman agregaciones celulares en los laterales, algunas de estas células se observan que se están adheriendo a la superficie de cultivo, alargándose por sus extremos y adaptando una forma estrellada, no alcanzando las prolongaciones la longitud observada en los fibroblastos que se han adheridos con mayor rapidez y de una forma más fuerte a la superficie de cultivo. La población de fibroblastos adheridos también se ha visto incrementada, observándose que las células que presentan una morfología fibroblástica representa un 20% de la población celular.

A los 10 días de cultivo las células sanguíneas han desaparecido, y en el fondo de los pocillos se observan adheridas un gran número de células con morfología fibroblástica y otras células miocárdicas adheridas, confluentes con los fibroblastos; también se observan agrupaciones de células ovaladas correspondientes a miocardiocitos que ocupan el resto del pocillo (sobre todo en los bordes laterales). Algunos miocardiocitos ovalados crecen en suspensión, generalmente aislados, por encima de las agrupaciones de miocardiocitos y de los fibroblastos y miocardiocitos adheridos.

En el día 11 de cultivo con objeto de separar los fibroblastos con mayor capacidad de adherencia a la superficie de cultivo, de los miocardiocitos adheridos y de las agrupaciones de miocardiocitos ovalados, se pipeteó con pipeta pasteur esteril cada uno de los pocillos, aspirando y expulsando el medio de cultivo sobre el fondo del pocillo con objeto de despagar los miocardiocitos, repitiendose la operación 6 veces consecutivas. Con el proceso anterior se consiguió despegar los miocardiocitos adheridos y las agrupaciones de miocardiocitos que se encontraban en el pocillo, observándose en el fondo del pocillo que han quedado los fibroblastos adheridos con su típica morfología.

Las células recogidas fueron lavadas con PBS, eliminándose los detritus celulares y suspendidos en medio de cultivo fresco (DMEM +10% SFT o RPMI-1640 +10% SFT), puestos de nuevo en cultivo en nuevos pocillos. Los sobrenadantes con los detritus celulares y las placas con los fibroblastos adheridos, fueron deshechados.

Las células empiezan de nuevo a adherirse y se forman agrupaciones celulares, localizadas principalmente en los bordes de los pocillos, el número de células adheridas va aumentando en detrimento de las suspendidas.

A partir del día 30 de cultivo, cuando va disminuyendo drásticamente la población celular, la morfología de las células que quedan va variando con el envejecimiento de las células en cultivo observándose un recorte de las prolongaciones citoplasmáticas, se observan estriaciones en el citoplasma, los núcleos se observan más divididos, aumentan el número de inclusiones y sobre todo el de vacuolas conforme transcurre el tiempo de cultivo; cuando las vacuolas han aumentado en número y en tamaño, ocupando casi todo el citoplasma celular, los miocardiocitos adheridos se despegan de la superficie de cultivo y se quedan adheridos solamente por una pequeña zona de la membrana plasmática, observándose una desintegración del

contenido celular. Las células en suspensión aisladas han disminuido en tamaño, su membrana que se observada nítida, se ha arrugado, el núcleo celular no se observa tan nítidamente y disminuye la refringencia celular.

Cuando los cultivos se realizan en frascos de cultivo de 50 ml de capacidad, donde la superficie de cultivo es mucho mayor (25 cm^2), si la concentración de siembra es del orden de 100-500 . 10^3 células/ml la mayoría de la población celular se adhiere por zonas, en los primeros días de cultivo (1-3 días) las primeras zonas con células adheridas están localizadas cerca de la boca del frasco de cultivo, posteriormente se van extendiendo por toda la superficie con células aisladas con típica morfología de fibroblasto las primeras en adherirse y con más prolongaciones, más regulares y extendidas los miocardiocitos. Al cabo de los días de cultivo, se localizan zonas con células adheridas (fibroblastos y miocardiocitos) sobre todo cercanas a la boca del frasco y en el fondo de éste; en el centro de la superficie del cultivo se observan células aisladas. A la concentración de siembra anteriormente usada, no llega a producirse la confluencia de las células adheridas a lo largo de la superficie de cultivo.

Cuando sembramos los miocardiocitos, si hemos añadido además de las células aisladas, algún trozo de tejido sin terminar de disgregarse, conforme pasan los días de cultivo empiezan a escapar células del tejido que actúa como un explante; las primeras en escapar son unas células alargadas, con típica morfología fibroblástica, núcleo con varios nucleolos y son las que más lejos emigran del lugar donde está localizado el explante de tejido. Al cabo de 7 días de cultivo se observan una gran zona de células confluentes alrededor del explante, con las células alargadas más lejanas y células casi rectangulares, con núcleo central e inclusiones citoplasmáticas. Los miocardiocitos cuando crecen confluentes disminuyen su anchura celular, las células confluentes presenta una morfología muy homogénea, sólo

las células que más alejadas están del explante son las que presentan las prolongaciones más alargadas. Si los trozos de tejidos sin terminar de disgregarse que hemos depositado en la superficie de cultivo y actúan como explantes, lo colocamos próximos unos de otros y llegamos a cubrir con los trozos, toda la superficie de cultivo al cabo de 10-15 días de cultivo obtenemos muchas zonas de células adheridas que llegan a ser confluentes.

Si la densidad de siembra inicial es de 500-800 . 10^3 células/ml, se producen confluencia de algunas zonas de células adheridas con otras, pero siguen permeneciendo algunas zonas del frasco de cultivo con células aisladas. Si la densidad de siembra es de 1.000 . 10^3 células/ml, a las 24 horas de cultivo se observan que casi toda la superficie de cultivo está ocupada por células adheridas con una confluencia casi total en el cultivo; a los tres días de cultivo, en todos los casos se observa una fina monocapa celular homogénea, con células rectangulares, alargadas y un núcleo en el centro de las células. Si los frascos de cultivo han sido previamente tratados con colágeno, para formar una matriz de colágeno donde adherirse las células, la monocapa de células homogéneas se forma a las 24 horas y a los 3 días de cultivo encontramos una espesa monocapa de células homogéneas atrapadas por la matriz de colágeno.

Con la matriz de colágeno a los 3 días, para la cual hemos utilizado una densidad de siembra de 1.000 10^3 no se observan células que crezcan en suspensión, si la concentración utilizada para la siembra es inferior a 1.000 . 10^3 células/ml, se observan algunas células en suspensión, sobre todo en la primera semana de cultivo; el número de células que permanecen en suspensión es mayor cuanto menor haya sido la densidad celular de siembra utilizada.

La población de fibroblastos en los cultivos sembrados a una elevada densidad celular y adicionados con

citosina-β-D-arabinofuranósido, fue inferior al 5%.

IV.A.1.1.7. Influencia de la edad de los embriones en la evolución de los cultivos

La actividad que presentan los cultivos celulares a lo largo del tiempo de cultivo va a depender de la edad del embrión del cual se aislan las células. Para estadios del desarrollo embrionario muy tempranos (XVIII-XX H.H.), las células aisladas van a ser muy refringentes, con gran actividad mitótica y van a presentar actividad contráctil a las 24 horas de cultivo aproximadamente un 20% de la población, al cabo de 5 días de cultivo el 70% de la población celular va a presentar actividad contráctil que va disminuyendo cuando transcurre el tiempo de cultivo; la actividad contráctil no es homogénea, cada célula aislada se contrae rítmicamente por separada, observándose diferentes ritmos en todo el cultivo; cuando las células crecen en agrupaciones el ritmo de las células cercanas es más homogéneo, si el crecimiento celular es en monocapas celulares se observa una actividad contráctil homogéneas en diferentes zonas de la monocapa, pero cada una de estas zonas de latido llevan un ritmo diferente, observándose diversos ritmos de latidos a lo largo de la superficie de cultivo. El ritmo de la contracción inicial es muy elevado 80-100 latidos/minuto, disminuyendo progresivamente conforme avanza el tiempo de cultivo y cesando el latido celular al cabo de los 25-55 días de cultivo; conforme el tiempo de cultivo avanza sin cada vez más escasas las células que laten y a un ritmo menor (20-45 latidos/minuto).

Conforme avanza la edad de los embriones utilizados en las experiencias se observa una mejor adaptación a las condiciones de cultivo de los miocardiocitos aislados, presentando actividad mitótica las células y al cabo de las 48 horas de cultivo el 70% de las células presentan actividad

contráctil (70-100 latidos/minuto), si las células han sido aisladas enzimáticamente con tripsina a 4°C, si la disgregación tisular se ha realizado con tripsina a 37°C o por métodos físicos el porcentaje de células que presentan actividad contráctil puede reducirse al 50% y necesitan un periodo mayor de tiempo (3-5 días) para que el 70% de la población celular lata. A partir de los días 7-10 de cultivo la actividad contráctil empieza a disminuir progresivamente y llega a cesar en un amplio margen de tiempo (20-50 días de cultivo) dependiendo del cultivo.

La actividad mitótica se observa con frecuencia y la actividad contráctil se presenta en un elevado porcentaje de la población cuando los miocardiocitos proceden de embriones del estadio de desarrollo inferiores al XXX-XXXII H.H., a estadios más avanzados se observa una disminución de la actividad mitótica y contráctil de la población celular. Los cultivos de miocardiocitos de estadios avanzados (XXX-XXXII H.H. en adelante), se observa un precoz envejecimiento celular, que se manifiesta precozmente en estadios del XXXVIII-XL H.H., son muy escasas las mitosis y el ritmo del latido es muy bajo (30-50 latidos/minuto) y el porcentaje de la población celular que manifiesta esta actividad contráctil es inferior al 10%. Estos cultivos de estadios de desarrollo avanzado empiezan a morir antes que los estadios más tempranos y los cultivos con células en buenas condiciones de actividad celular no suelen pasar de los 15-20 días y son escasas las células que permanecen viables después del día 30-35 de cultivo.

IV.A.1.1.8. Control de esterilidad de los cultivos celulares

La esterilidad de los cultivos celulares, tanto en los cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo, como en los cultivos de células cardíacas humanas, fue controlada mediante la siembra de muestras de los cultivos en placas de agar-sangre,

cuya lectura se realizó a las 48 horas. En todos nuestros cultivos realizados a lo largo de las experiencias, la contaminación por microorganismos afectó a menos del 5% de los cultivos celulares.

IV.A.1.1.9. Inmunofluorescencia indirecta en miocardiocitos de pollo en cultivo

IV.A.1.1.9.1. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antidesmina

Cuando realizamos la inmunofluorescencia indirecta en las células miocardiocíticas embrionarias de pollo en cultivo con el anticuerpo monoclonal antidesmina, observamos un marcaje punteado, difuso en todo el citoplasma celular; aparecen densidades de fluorescencia redondeadas de diferentes tamaños y distribuidas en la superficie celular (Figura 3). No observamos evidencia de marcaje en forma filamentosa a lo largo del citoplasma celular y el núcleo no se observa marcado por el anticuerpo monoclonal antidesmina.

IV.A.1.1.9.2. Inmunoflorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antivimentina

La inmunofluorescencia indirecta de los miocardicitos embrionarios de pollo en cultivo con anticuerpo monoclonal antivimentina, nos dá un patrón de marcaje en forma de una red filamentosa irregular que se extiende a lo largo de toda la superficie celular (Figura 3). Los filamentos intermedios de vimentina aparecen marcados como fibras gruesas y resistentes, con disposiciones rectilíneas o ligeramente

curvadas. Los haces de filamentos , intensamente marcados, se distribuyen por todo el citoplasma celular, con una gran concentración de dichos haces en las zonas cercanas al núcleo celular; también se observan tractos de fluorescencia más gruesos dirigiéndose desde el núcleo a la periferia celular y especialmente hacia las zonas de la membrana plasmática donde se localizan las prolongaciones celulares más pronunciadas.

IV.A.1.1.10. Evolución de los cultivos secundarios

IV.A.1.1.10.1. Influencia de los medios de cultivo en el comportamiento celular

Para las experiencias de los cultivos secundarios hemos realizado los cultivos primarios a partir de embriones de estadios de desarrollo embrionario tempranos (XVIII-XXIX H.H.), ya que los cultivos primarios de éstas células presentan un alto porcentaje de viabilidad celular, observándose unos resultados muy similares para los cultivos realizados a partir de cortes embrionarios de dichos estadios de desarrollo.

La población celular de todos los estadios sembrados (XVIII, XXVI y XXIX H.H.) evoluciona de una manera similar, observándose un descenso del número celular en el día 7 de cultivo y un aumento en el día 14 de cultivo, siendo el número de células superior a la concentración inicial usada para la siembra (Tabla VII). En el día 21 de cultivo, los cultivos que han proliferado han cubierto toda la superficie del frasco de cultivo y el valor de la densidad celular es cercano a 200.000 células/ml, habiéndose doblado la población inicial sembrada.

En el día 22 de cultivo se procedió a pasar las células a diferentes medios de cultivo (Hank's, DMEM, MEM, MEM +

2%SFT, RPMI-1640 y RPMI-1640 + 10%SFT), sembrados a una densidad de 83.000 células/ml y 2 ml de medio de cultivo con suspensión celular por cada pocillo, realizándose un recuento periódico cada 7 días de la densidad celular en cada pocillo cultivado.

Los resultados de la evolución de la densidad celular durante 28 días de seguimiento del cultivo secundario, en los diferentes medios de cultivo utilizados fueron los siguientes (Tabla VIII):

A) Hank's

Se observó un agrupamiento de los miocardiocitos en los bordes del pocillo en los primeros días del cultivo. El número celular fue disminuyendo a lo largo del tiempo de cultivo, de tal manera que a los 7 días de cultivo la densidad celular era de 20.000 células/ml, a los 14 días disminuye drásticamente hasta 3.000 células/ml y a partir de los 21 días de cultivo no se observa ningún tipo de células viables.

B) DMEM

A las 24 horas de cultivo, nos encontramos con gran cantidad de detritus celulares; las células en cultivo se mantuvieron aisladas, no mostrando tendencia a agruparse. El número celular disminuyó drásticamente a los 7 días de cultivo hasta 2.500 células/ml, a los 14 días disminuyo hasta casi desaparecer (1.200 células/ml), pero en el día 21 de cultivo la población se duplicó siendo de 2.500 células/ml, desapareciendo practicamente las células en cultivo (500 células/ml) a los 28 días de cultivo secundario.

C) MEM

Durante la primera semana de cultivo comenzaron a aparecer agrupaciones celulares, sin embargo al comienzo de la

segunda semana de cultivo, las agrupaciones celulares se disolvieron espontáneamente y las células permanecieron en el cultivo de forma aislada. La disminución de la población celular ha sido progresiva a lo largo de los días de cultivo, siendo la densidad celular de 10.000 células/ml a los 7 días, de 5.000 células/ml; sin embargo se observó un aumento de la población celular en el recuento realizado en el día 21 (7.500 células/ml), aunque volvió a disminuir el número celular a los 28 días de cultivo (2.000 células/ml).

D) MEM + 2% SFT

El comportamiento de las células durante la primera semana fue similar al de los cultivos con medio de cultivo MEM, con agrupaciones celulares en los bordes laterales de los pocillos y células aisladas sobre todo en el centro del pocillo; a partir de la segunda semana de cultivo el número de agrupaciones fue disminuyendo. La morfología que presentaban la células era más nítida que en los otros medios, observándose células ovaladas, con bordes brillantes y núcleo central bien caracterizado. La población celular disminuyó a los 7 días de cultivo hasta 10.000 células/ml y a los 14 días de cultivo fue de 2.500 células/ml, pero a los 21 días de cultivo la población celular aumentó hasta una densidad de 10.000 células/ml, disminuyendo posteriormente hasta 3.500 células/ml a los 28 días de cultivo secundario.

E) RPMI-1640

En todo el cultivo la células se mantuvieron aisladas entre gran cantidad de detritus celulares. A los 7 días de cultivo la población celular disminuyó hasta 5.000 células/ml, experimentandose un aumento de la población a los 14 días de cultivo (10.000 células/ml), aunque posteriormente siguió disminuyendo, 2.500 células/ml a los 21 días, hasta alcanzar una densidad de 1.500 células/ml a los 28 días de cultivo.

F) RPMI-1640 + 10% SFT

Cuando el cultivo se realizó en este medio, las células mantuvieron la forma ovalada, con los núcleos bien definidos, manteniendose siempre en pequeñas agrupaciones y una gran mayoría celular, se mantuvieron de forma aislada a lo largo del tiempo de cultivo. La población celular fue disminuyendo progresivamente, no observándose ningún aumento de la población celular a lo largo de los 28 días de seguimiento del cultivo; a los 7 días de cultivo la densidad celular observada fue de 20.000 células/ml, a los 14 días de 12.000 células/ml, a los 21 días de 7.500 células/ml y llegando al valor de 5.000 células/ml tras 28 días de cultivo.

En los cultivos primarios, un porcentaje cercano al 70% de las células que forman la población se contraen espontáneamente, pero a los 21 días de cultivo primario solamente un 20% de la población sigue latiendo. En los cultivos secundarios las células siguen latiendo, sin embargo, el latido se realiza de forma esporádica y no se observa ninguna sincronización del ritmo de contracción celular a lo largo del cultivo; el ritmo que manifiestan las células que laten es muy bajo (20-40 latidos/minuto).

IV.A.1.1.10.2. Morfología celular en los cultivos secundarios

La morfología que manifiestan las células en los cultivos secundarios es similar a la observada para los cultivos primarios, observándose células ovaladas, brillantes, con núcleo central y membrana plasmática bien definida; éstas células forman agrupaciones celulares, sobre todo en los márgenes del pocillo. La gran diferencia con los cultivos primarios es que en los secundarios se observa gran homogeneidad morfológica en la población celular, con grandes agrupaciones laterales de células ovaladas brillantes en los pocillos.

Conforme avanza el tiempo de cultivo las células comienzan a adherirse, mostrando la típica morfología de miocardiocito adherido, con prolongaciones, núcleo central, a veces con 2 nucleolos, se adhieren de forma aisladas o varias células confluentes en pequeñas zonas de la superficie de cultivo; no observamos células fibroblásticas de morfología alargada.

A medida que transcurre el tiempo de cultivo secundario, aumenta los detritus celulares en el medio de cultivo, pues la mortalidad celular va aumentando, observándose c da vez las células más aisladas; las células ovaladas que crecen en suspensión son las primeras en desaparecer, apreciándose en un principio un deterioro de la membrana plasmática que se arruga, hasta que llega a romperse, invadiendo el medio de cultivo el interior celular y destrucción de la célula. Las células adheridas son las que perduran viables durante mayor tiempo en cultivo, pero a partir del día 28 del cultivo secundario, son escasas las que se observan; a los 40-45 días de cultivo sólo se observan células aisladas, adheridas por una pequeña zona de la superficie celular al fondo del pocillo y siguiendo el mismo proceso de envejecimiento celular seguido por las células en los cultivos primarios.

IV.A.2. Cultivos de miocardiocitos adultos humanos

IV.A.2.1. Disgregación tisular

IV.A.2.1.1. Disgregación con solución enzimática a 37°C

El miocardio aislado a partir de biopsia de tejido cardíaco humano, tras disgregación a 37°C de temperatura con

agitación mecánica es depositado en un frasco de cultivo con un poco de medio de cultivo DMEM. Tras la disgregación se observa en el tejido unas zonas con una maraña de fibras musculares en medio de la masa tisular.

A las 24 horas de la puesta en cultivo, se observan algunas fibras que empiezan a aislarse por uno de sus extremos de la masa tisular y que dicho extremo liberado late lentamente a un ritmo de contracción cardíaca de 4 latidos/minuto; los trozos de tejido que se han adherido a manera de grandes explantes a la superficie de cultivo. A los 2 días de cultivo se distinguen fibras musculares aisladas dentro del tejido adherido, observándose los desmosomas que separan una célula de otra y adoptando el extremo liberado una conformación helicoidal suspendida en el medio de cultivo; las células de dichas fibras musculares presentan una morfología rectangular-alargada, refringentes y núcleo central alargado. Las fibras musculares permanecen atrapadas por el tejido, aunque por el extremo que se va liberando de la masa tisular, se observa una contracción ritmica de la fibra (10 latidos/minuto).

Cuando han trascurrido 7 días de cultivo, las fibras musculares siguen latiendo (7 latidos/minuto) y se distinguen en la masa tisular un mayor número de fibras musculares que se van aislando, suspendiendose las hélices en el medio de cultivo y en el extremo liberado se observa nitidamente la contracción fibrilar. A los 10-12 días de cultivo ya se observan fibras aisladas en el medio de cultivo, generalmente adheridas por su zona central a la superficie de cultivo y manifestando contracción rítmica en sus extremos (10 latidos/minuto); la longitud de estas fibras aisladas varia de unas a otras, desde la de pequeñas longitud compuesta por 3-5 células hasta otras más largas compuestas por 10-15 células. A los 15 días de cultivo la maraña tisular está más suelta, las fibras aunque atrapadas se distinguen unas de otras y ha aumentado el número de fibras aisladas y la contracción rítmica

es de 11 latidos/minuto (Figura 2).

A partir del día 22 de cultivo las fibras cesan en su contracción, las fibras comienzan a deteriorarse y los restos de tejidos se van necrosando. Hasta éste día de cultivo, mediante tinción vital con azul trypan se observaban las células vivas dentro de las fibras, sobre todo en las zonas de los tejidos más disgregada y de más fácil diferenciación de las fibras aisladas; los explantes de tejidos se suelen teñir a partir del día 5-7 de cultivo de azul intenso, señal de la necrosis tisular, la cual comprende todos los trozos de tejidos observados a partir del día 20 de cultivo.

En otras experiencias, a los 2 días de haber sembrado los tejidos hemos suplementado el medio de cultivo con el 10% de SFT o glucosa (1 g/100 ml), manifestándose un aumento de la actividad contráctil de las fibras musculares aisladas, alcanzando en algunos casos a los 2-3 días de cultivo un ritmo de contracción de 23 latidos/minuto.

Por otro lado, las fibras musculares aisladas a partir de músculo pectíneo presentaban una mayor viabilidad en cultivo que las aisladas a partir de músculo papilar, manteniéndose las primeras tras 20 días en cultivo en buenas condiciones de viabilidad (no se teñian con azul trypan y manifiestan actividad contráctil), mientras que las procedentes de músculo papilar sólamente hasta el día 15 de cultivo manifestaban buena viabilidad.

IV.A.2.1.2. Disgregación con solución enzimática a 4°C

Del proceso de disgregación enzimática realizado a 4°C de temperatura obtenemos células cardíacas aisladas con morfología cilíndrica, núcleo central y estriaciones

transversales; las células aisladas generalmente se encuentran en suspensión y algunas permanecen atrapadas por los pequeños trozos de tejido que quedan sin disgregar en su totalidad. Al cabo de 24 horas de cultivo, el 80-90% de la población celular ha adoptado morfología casi esférica, aunque se observa una gran variedad morfológica en la suspensión celular. La gran mayoría de la población celular presenta un gran y único núcleo central, aunque un elevado porcentaje de células son binucleadas.

A los 5 días de cultivo, en las zonas donde habían quedado pequeños trozos de tejido sin disgregar totalmente y que han actuado como explantes tisulares, se ven aparecer las primeras células adheridas saliendo de los explantes, dichas células manifiestan la típica morfología fibroblástica de células muy alargadas, con grandes prolongaciones en los extremos. En el día 7 de cultivo, se observan unas células adheridas en el cultivo que presentan una morfología triangular, con los extremos del triángulo alargándose para poder adherirse y extenderse en la superficie de cultivo, un gran núcleo central y bastantes inclusiones en el citoplasma.

A partir del día 12 de cultivo una gran cantidad de células han salido de los explantes, apareciendo unas células con morfología rectangular, muchas citoplasmáticas cercanas al núcleo, distingiéndose miofibrillas citoplasmáticas que le dan cierto aspecto estrellado a algunas células.

Cuando han transcurrido 21 días de cultivo, predominan las células en suspensión con morfología poligonal-esférica; las células adheridas manifiestan una morfología rectangular pero con muchas prolongaciones en sus extremos, conservan las miofibrillas, muchas inclusiones citoplasmáticas y algunas presentan varios nucleolos en su núcleo. A los 28 días de cultivo el número de las células en suspensión ha disminuido en gran medida, observándose gran cantidad de restos celulares en suspensión; mientras que las células adheridas no ha cambiado

mucho su morfología, manteniéndose una morfologia rectangular cuando las células están muy próximas ó confluentes en algunas zonas de la superficie de cultivo, pero cuando las células crecen aisladas adoptan una morfología con mayor número de prolongaciones y de mayor tamaño (Figura 2).

Posteriormente comienzan a deteriorarse, apareciendo detritus en suspensión y las células adheridas pierden citoplasma, su membrana se rompe y van quedando el citoesqueleto celular adherido a la superficie decultivo, como verdadera huella de la presencia anterior de una célula viva.

IV.A.2.2. Evolución de la población celular en el tiempo de cultivo

Tras el proceso enzimático realizado a una temperatura de 4°C, el número de células vivas en forma de barra cilíndrica es de 75.000 células/ml y se obtienen 36.000 células/ml muertas; por cada biopsia disgregada se ha cosechado un volumen de suspensión celular de 5 ml, habiéndose cosechado una media de 375.000 células vivas/biopsia y de 180.000 células muertas/biopsia; así pues la viabilidad del proceso de aislamiento celular fue del 68%. A los 7 días de cultivo el número de células vivas ha disminuido hasta 53.000 células/ml, mientras que a los 14 días el número de células viables han pasado a ser un poco menos de la mitad de la densidad celular de siembra (35.000 células/ml); el descenso se ve incrementado conforme avanzan los días de cultivo, llegando a ser la densidad celular de 12.000 células/ml a los 28 días de cultivo (Tabla IX).

Las células adheridas que han salido de los explantes, comienzan a aparecer a partir de los días 10-12 de cultivo principalmente, observándose un aumento del número celular de estas células conforme avanza los días de cultivo,

mientras que los explantes pequeños se van disgregando y desprendiéndose de la superficie de cultivo. Algunas zonas en donde se encontraban explantes pueden llegar a permanecer gran cantidad de células viables adheridas a los 50 días de cultivo.

IV.A.2.3. Inmunoflorescencia indirecta en miocardiocitos humanos en cultivo

IV.A.2.3.1. Inmunoflorescencia indireta con anticuerpo monoclonal antidesmina

Cuando la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antidesmina es realizada sobre los miocardiocitos humanos adultos en cultivo, se observa un patrón de marcaje punteado, difuso a lo largo de todo el citoplasma celular. Al igual que ocurría con los miocardiocitos embrionarios de pollo en cultivo, las densidades redondeadas de fluorescencia aparecen de diferentes tamaños y distribuidas homogeneamente en la superficie celular; el núcleo se distingue claramente, no estando marcado por el anticuerpo monoclonal antidesmina y localizado, generalmente, en el centro de un citoplasma celular marcado de forma punteada por dicho anticuerpo monoclonal (Figura 4). En estas células no observamos marcaje en forma filamentosa en las partículas de desmina teñida con la inmunofluorescencia.

IV.A.2.3.2. Inmunoflorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal antivimentina

El marcaje observado en las células cardíacas humanas adultas en cultivo cuando realizamos la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal

antivimentina, es semejante al observado en los miocardiocitos de pollo. Se observa un marcaje en forma de red filamentosa distribuída por toda la superficie celular, con un núcleo central no marcado por el anticuerpo monoclonal antidesmina, aunque en algunas células se observan filamentos de vimentina marcados que parecen pasar por encima del núcleo celular (Figura 4). Los filamentos intermedios de vimentina aparecen en el marcaje como fibras gruesas y resistentes, en disposición rectilínea o ligeramente curvadas en las zonas cercanas a la membrana plasmática. Los haces de filamentos de vimentina marcados se distribuyen por todo el citoplasma celular, pero aparecen más concentrados en la región perinuclear. También observamos trazos de fluorescencia más gruesos que se dirigen desde el núcleo a las prolongaciones del citoplasma celular, observándose dichos trazos principalmente en las prolongaciones celulares más largas.

IV.B. Contenido proteico de los miocardiocitos

IV.B.1. Contenido proteico de los tejidos cardíacos

IV:B.1.1. Contenido proteico del corazón embrionario de pollo

IV.B.1.1.1. Pesos de los corazones de pollo en el desarrollo embrionario

Los corazones embrionarios una vez extraidos del embrión fueron lavados con PBS y pesados, para conocer el aumento del peso de la masa cardíaca a lo largo del desarrollo embrionario. El número de corazones extraídos por estadio de desarrollo, fue disminuyendo a medida que aumentaban la edad de los embriones, con objeto de obtener una cantidad de tejido

cardíaco cercano a los 100 mg de peso, de cada uno de los estadios del desarrollo estudiados.

Se observa un aumento progresivo a lo largo del desarrollo embrionario de los pesos de los corazones extraídos, este aumento es mayor conforme avanzan los estadios H.H., mientras que para los estadios tempranos (XVIII-XXIX) la proporción del aumento es mucho menor. En la tercera decena de los estadios H.H. sólo se llega a doblar el peso del corazón embrionario desde el estadio XX H.H. al XXIX H.H.; en estadios más avanzados correspondientes a la cuarta decena de estadios de desarrollo, llega a doblarse el peso del corazón embrionario desde un estadio (XXXVII H.H.) al siguiente del desarrollo embrionario (XXXVIII H.H.). (Tabla X).

IV.B.1.1.2. Concentración proteica en el tejido cardíaco embrionario de pollo

IV.B.1.1.2.1. Concentración proteica en el homogenado

Los corazones embrionarios de pollo procedentes de los diversos estadios del desarrollo embrionario, una vez extraidos, lavados y homogeneizados, se realizó el subfraccionamiento celular obteniéndose las fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas de las células que componen el tejido cardíaco; posteriormente se determinó la concentración proteica (mg/ml) del homogenado y de las fracciones celulares obtenidas.

Se observa un aumento progresivo en la concentración proteica obtenida en los diferentes homogenados de los estadios del desarrollo embrionario, este aumento es muy significativo (185%) al pasar del estadio XX H.H. hasta el XXII

H.H.; destacando también en estadios intermedios el aumento observado (68%) al comparar la concentración proteica del homogenado del estadio XXVII H.H. y la correspondiente al estadio XXIX H.H..

A partir del estadio XXIX H.H. sigue aumentando ligeramente la concentración proteica, así en el estadio XXXIII H.H. el aumento con respecto al estadio XXIX H.H. ha sido sólamente del 3%. A partir de éste estadio XXXIII H.H. se produce un descenso en la concentración proteica del homogenado, en el estadio XXXVI H.H. este descenso es del 42%; a continuación empieza de nuevo a aumentar la concentración proteica, llegando en el estadio XXXVIII H.H. a ser superior a la observada en el estadio XXXIII H.H..

En estadios avanzados del desarrollo embrionario, la concentración proteica sigue aumentando progresivamente, observándose concentraciones muy similares en los últimos estadios H.H. del desarrollo (XLIV y XLV H.H.). (Tabla XI).

Para una mejor comparación de los resultados obtenidos, hemos obtenido la concentración proteica correspondiente a 100 mg de tejido en cada uno de los estadios H.H. estudiados (Tabla XII). En dichos resultados se observa el mismo aumento significativo entre los estadios XX y XXII H.H. y el aumento progresivo hasta el estadio XXIX H.H.. A partir de éste estadio, XXIX H.H., se observa un descenso pronunciado (51%) de la concentración proteica cuando alcanzamos el estadio XXXIII del desarrollo embrionario del pollo; en el estadio XXXVI H.H. casi se dobla la concentración proteica del estadio XXXIII H.H., en los dos siguientes estadios (XXXVII y XXXVIII H.H.) la concentración es similar y ha descendido ligeramente (15%) con respecto al estadio XXXVI H.H.. En los estadios XL y XLII H.H. los resultados son cercanos a los del estadio XXIX H.H., produciendo a continuación un aumento (66%) de la concentración proteica y un posterior descenso (11%) en el último estadio del

desarrollo embrionario (XLV) (Tabla XII).

IV.B.1.1.2.2. Concentración proteica en la fracción citoplasmática

Una vez realizado el subfraccionamiento celular del tejido cardíaco embrionario se determinó la concentración proteica de las fracciones obtenidas, observándose en la fracción citoplasmática un aumento progresivo a lo largo del desarrollo embrionario, salvo algunos excepciones que se producen conforme avanza la edad del embrión.

Como en el caso del homogenado, se produce un fuerte aumento (125%) en la concentración proteica entre el estadio XX y XXII H.H., en el estadio XXV H.H. se produce un ligero descenso (8%) y a continuación sigue aumentando, siendo este aumento del 113% al comparar los resultados obtenidos en los estadio XXVII y XXIX H.H.. A continuación se produce un descenso de la concentracón proteica del citoplasma celular (26-28%) en los estadios XXXIII-XXXVI H.H., alcanzándose niveles similares a los del estadio XXIX H.H. en el estadio XXXVII H.H.; en el XXXVIII H.H. se observa una disminución (19%), un posterior aumento del 60% en el estadio XL H.H. y en el XLII H.H. la concentración proteica es superior a la observada en el estadio XL (29%). Al avanzar un estadio en la edad del embrión se produce un aumento del 20% en la concentración proteica citoplasmática y en el último estadio del desarrollo embrionario (XLV H.H.) se observa un descenso del 28% (Tabla XI).

Los valores de la concentración proteica citoplasmática a lo largo del desarrollo embrionario, con respecto a 100 mg de tejido cardíaco procedente de cada uno de los estadios H.H. estudiados (Tabla XII), son similares en los estadios tempranos (XVIII y XX H.H.), produciendose un gran

aumento (178%) en el estadio XII H.H. y un descenso (21%) en el estadio XXV H.H.. A continuación se obtienen niveles más elevados que en el estadio XXII H.H. y en el estadio XXIV H.H. se produce un aumento del 61% con respecto al estadio XXVII H.H.. En los primeros estadios de la cuarta decena del desarrollo embrionario se observa un gran descenso de la concentración proteica del citoplasma con respecto al estadio XXIX H.H. (65% para el estadio XXXIII H.H.), en los estadios XXXVI y XXXVII H.H. se observan niveles cercanos al del estadio XXIX H.H.; entre el estadio XXXVIII y XLII H.H. se produce un descenso comprendido entre el 21-57% con respecto a la concentración proteica del estadio XXXVII H.H.. En el estadio XLIV H.H. se produce una aumento de la concentración proteica del 141% con respecto al estadio XLII H.H.; en el último estadio del desarrollo embrionario, se observa un descenso del 35% con respecto al estadio anterior.

IV.B.1.1.2.3. Concentración proteica en la fracción citoesquelética

Tras el subfraccionamiento celular del tejido cardíaco las concentraciones proteicas del citoesqueleto celular fueron determinadas en cada una de las fracciones correspondientes de los estadios del desarrollo embrionario estudiados.

De una concentración proteica inicial de 0,104±0,009 mg/ml observada en el estadio XVIII H.H., en el siguiente estadio estudiado (XX H.H.) se observa un descenso del 52% en la concentración proteica del citoesqueleto, observándose un aumento en los siguientes estadios, siendo significativo en el estadio XXV H.H. que aumenta un 229% con respecto al estadio XXII H.H.. En el estadio XXVII H.H. se

observa un descenso del 50% con respecto al anterior y un aumento muy significativo del 307% al avanzar la edad embrionario desde el estadio XXVII al XXIX H.H.. En los primeros estadios de la cuarta decena del desarrollo embrionario, los valores obtenidos son inferiores a los del estadio XXIX H.H., con una disminución comprendida entre el 5-35%; en el estadio XXXIX H.H. la concentración de proteínas del citoesqueleto es un 15% mayor que en el estadio XXIX H.H. habiendo aumentado un 21% con respecto al anterior estadio (XXXVIII H.H.). Hasta el estadio XLII H.H. sigue aumentando progresivamente la concentración proteica (42%, 27% en los estadios XL, XLII H.H.), a continuación empiezan a disminuir hasta el estadio XLV H.H. (Tabla XI).

Las concentraciones proteicas del citoesqueleto celular pertenecientes a 100 mg de tejido cardíaco de cada uno de los estadios del desarrollo embrionario, nos proporcionan una mejor escala de comparación de las distintas concentraciones proteicas a lo largo de la edad embrionaria (Tabla XII).

A partir del estadio XVIII H.H. se observa en principio una disminución del 49% al avanzar al estadio XX H.H., hasta el estadio XXV H.H. va aumentando progresivamente el contenido proteico del citoesqueleto; en el XXVII H.H. se produce un descenso del 42% con respecto al anterior estadio estudiado (XXV H.H.), produciéndose un aumento muy significativo (207%) al llegar al estadio XXIX H.H.; desde el estadio XXXIII-XL H.H. los valores observados son inferiores a los del estadio XXIX H.H. con una disminución comprendida entre 18-61%. En el estadio XLII H.H. el aumento con respecto al estadio anterior es del 11% y en el estadio XLIV H.H. su valor es cercano al observado en el estadio estadio XXIX H.H.. En el último estadio del desarrollo se observa un descenso (19%) de las proteínas del citoesqueleto.

IV.B.1.1.3. Composición proteica de desmina y vimentina de las distintas fracciones subcelulares

Los proteínas correspondientes a las diferentes fracciones subcelulares (citoplasma y citoesqueleto), fueron disueltas en tampón de muestras para electroforesis a una concentración de 1 µg/µl y posteriormente separadas electroforéticamente mediante SDS-PAGE, utilizándose geles del 12% y en alí otas de 15 µl de muestra por cada carril de electroforesis.

Una vez realizada la electroforesis, los geles fueron leídos mediante densitometría, determinandose los µg de las proteínas desmina y vimentina, componentes de los filamentos intermedios que se encuentran tanto en el citoplasma , como en el citoesqueleto celular, del tejido cardíaco a lo largo del desarrollo embrionario.

IV.B.1.1.3.1. Fracción citoplasmática

En los resultados obtenidos tras correr electroforéticamente 15 µg de proteínas totales citoplasmáticas en cada carril, se observa que la cantidad de desmina más elevada la encontramos en el estadio XX H.H. y durante los primeros estadios estudiados se mantienen en valores superiores a 1 µg, hasta el estadio XXIX H.H. en que desciende un 26% con respecto al valor del estadio XX H.H.. En el estadio XXXIII H.H. se observa de nuevo un valor superior a 1 µg, en los estadios posteriores del desarrollo los valores encontrados van a ser inferiores a 1 µg, alcanzandose los mínimos en los estadios XXXVII y XXXVIII en que han descendido un 40% y un 39% respectivamente,en relación al valor máximo obtenido en el estadio XX H.H.. En los ultimos estadios del desarrollo el

descenso de los valores de desmina obtenidos están comprendidos entre un 26% en el estadio XXXIX H.H. y un 36% para el último estadio del desarrollo embrionario (Tabla XIII).

En relación a la vimentina contenida en 15 µg de proteínas citoplasmáticas totales, se observa que en todos los casos los valores obtenidos en cada estadio son superiores al valor de desmina observado en dicho estadio del desarrollo embrionario. El mínimo se obtiene en el primer estadio del desarrollo estudiado (XVIII H.H.) y el máximo se obtiene en el estadio XXXIX H.H., aumentando un 42% con respecto al mínimo obtenido en el estadio XVIII H.H. (Tabla XIII). Salvo escasas excepciones (estadio XXVII H.H. que desciende un 7%), los valores se mantienen o van subiendo progresivamente en una media del 5% de aumento, hasta alcanzar el máximo en el estadio XXXIX H.H.; a continuación desciende un 15% en el estadio XL H.H., manteniéndose en un valor similar en el siguiente estadio y obteniendo valores ligeramente inferiores al máximo (6%) en los dos últimos estadios del desarrollo embrionario.

Para una mejor observación de la evolución del contenido proteico de componentes de los filamentos intermedios, desmina y vimentina, a lo largo del desarrollo embrionario del corazón de pollo, hemos relacionado el contenido de dichas proteínas con respecto a 100 mg de tejido cardíaco en cada uno de los estadios del desarrollo embrionario estudiado (Tabla XIV).

En lo referido al contenido de desmina en 100 mg de tejido cardíaco se observa un mínimo en el primer estadio estudiado (XVIII H.H.) y dos máximos bien diferenciados en el estadio XXIX H.H. (aumentando un 488% su valor con respecto al mínimo), y en el estadio XLIV H.H. (aumentando su valor un 543% con respecto al mínimo). En los primeros estadios estudiados se observa un aumento del 29% en el contenido tisular de desmina al pasar del primer estadio al estadio XX H.H., posteriormente hay un gran incremento (127%) en el estadio XXII H.H. y un leve

descenso en el estadio XXV (hasta un máximo del 17%), posteriormente sigue creciendo un 67 y 45% respectivamente hasta alcanzar el primer máximo en el estadio XXIX H.H.. En el estadio XXXIII H.H. se observa un descenso del contenido tisular de desmina de un 61% con respecto al máximo observado en el estadio XXIX H.H., a continuación aumenta un 123% en el estadio XXXVI H.H. descendiendo un 18% en el estadio XXXVII H.H. y un 48% en el siguiente estadio y manteniéndose en el siguiente estadio del desarrollo; en el primer estadio de la quinta decena del desarrollo embrionario se produce un aumento del 58% en el valor de la desmina citoplasmática obtenida, se mantienen en valores similares, hasta aumentar un 68% en el estadio XLIV y sufriendo posteriormente un descenso del 30% para el estadio XLV H.H..

Cuando observamos los valores de la vimentina, de nuevo observamos el valor mínimo en el estadio XVIII H.H. y los máximos también se observa en el estadio XXIX H.H. siendo un 1.502% superior al mínimo y en el estadio XLIV H.H. con un valor que es 1450% superior al mínimo observado en el estadio XVIII H.H. (Tabla XIV). A lo largo del desarrollo embrionario se observa un leve aumento del 15% desde el estadio XVIII al XX H.H., a continuación hay un gran aumento del 231% en el estadio XXII H.H. y un descenso del 22% en el estadio XXV H.H.; en los siguientes estadios estudiados el contenido en vimentina continúa aumentando en un 60-70% hasta alcanzar el máximo en el estadio XXIX H.H.. Posteriormente en el estadio XXXIII H.H. sufre un descenso del 68% y unos estadios más avanzados en el desarrollo embrionario, en el estadio XXXVI H.H. alcanza un nuevo máximo inferior en un 23% al máximo observado en el estadio XXIX H.H.; a continuación se mantienen los valores y en los estadios XXXVIII y XXXIX H.H. descienden en valores cercanos al 50% con respecto al valor del estadio XXXVII H.H.. En el estadio XL H.H. aumenta un 39%, en los siguientes estadios el aumento es ligero hasta alcanzar el estadio XLIV H.H. en que se doblan los valores de vimentina con respecto al estadio anterior. En el último estadio del desarrollo se observa un descenso del 37% con

respecto al valor máximo del estadio XLIV H.H..

IV.B.1.1.3.1. Fracción citoesquelética

Tras la electroforesis de 15 µg de proteínas del citoesqueleto de células componentes del tejido cardíaco embrionario de pollo, se observa que tanto la desmina como la vimentina del citoesqueleto se encuentra en menor cantidad que en el citoplasma en todos los estadios del desarrollo embrionario, salvo en lo referente a la desmina del estadio XLV H.H. que es similar en citoplasma y citoesqueleto, observándose también que la vimentina del citoesqueleto es superior a la citoplasmática en los dos primeros estadios del desarrollo estudiados (Tablas XIII y XV).

El contenido del citoesqueleto en desmina se dobla del estadio XVIII al XX H.H., a continuación aumenta ligeramente y se mantiene posteriormente en valores similares o inferiores en un 30% como máximo del valor obtenido en el estadio XXII H.H.. En el estadio XXXIII H.H. se produce un descenso del 29% con respecto al estadio XXIX H.H. y continua aumentando los valores ligeramente a partir del estadio XXXVI H.H. ,que presenta un valor ligeramente superior al observado en el estadio XXIX H.H., hasta alcanzar el máximo en el último estadio del desarrollo embrionario que presenta un valor que es un 371% superior al inicial observado en el primer estadio del desarrollo embrionario estudiado (XVIII H.H.) (Tabla XV).

El contenido de vimentina citoesquelética desciende gradualmente a lo largo del desarrollo embrionario, desde los valores máximos observados en el primer estadio del desarrollo embrionario estudiado (XVIII H.H.), hasta los estadios más avanzados del desarrollo embrionario dónde se observan los valores mínimos de vimentina en el

citoesqueleto (Tabla XV). El máximo de contenido de vimentina citoesqueletal se observa en el estadio XVIII H.H., descendiendo ligeramente (7%) en el estadio XX H.H. y al llegar al estadio XXII H.H. sufre un gran descenso del 56% con respecto al valor obtenido en el estadio anterior. En el estadio XXV H.H. sufre un nuevo descenso del 39%, manteniéndose posteriormente en valores similares hasta el estadio XXXIII H.H.; en el estadio XXXVI H.H. sufre un nuevo descenso del 36% y se mantienen en valores similares hasta el estadio XXXVIII H.H., donde posteriormente se observa un nuevo descenso en el estadio XXXIX H.H. del 7% y se mantiene en valores similares al del estadio XXXIX H.H. en los últimos estadios del desarrollo embrionario. En los últimos estadios del desarrollo embrionario, se observan los valores mínimos de vimentina citoesqueletal, siendo dichos valores un 87% inferior al máximo observado en el estadio XVIII H.H..

Cuando estudiamos el contenido proteico de la desmina citoesqueletal referida a 100 mg de tejido cardíaco embrionario (Tabla XVI), se observa el valor mínimo en el estadio XVIII H.H. del desarrollo aumentando progresivamente a lo largo del desarrollo embrionario; en los primeros estadios el aumento es del 59% en el estadio XX H.H., pero posteriormente al alcanzar el estadio XXII H.H. experimenta un aumento del 168% con respecto al valor del estadio XX H.H.. En el estadio XXV H.H. se detecta un aumento del 96%, descendiendo (21 %) en el estadio XXVII H.H. y experimentando un nuevo incremento del 242% con respecto al valor observado en el estadio XXV H.H.; en este estadio XXIX H.H. del desarrollo embrionario, junto con los últimos del desarrollo embrionario, se observa el valor máximo de desmina en el citoesqueleto. Aunque en el estadio XXXIII H.H. sufre un gran descenso del 72%, en los siguientes estadios se obtienen valores elevados de desmina citoesqueletal, alcanzándose los máximos en los estadios más avanzados del desarrollo embrionario, con unos valores que son un 2.610% superior al valor inicial observado en el estadio XVIII H.H..

El valor de la vimentina contenida en 100 mg en el tejido cardíaco embrionario en el primer estadio del desarrollo estudiado, XVIII H.H., es superior en un 352% con respecto al valor de la desmina observado en dicho estadio; en el estadio XX H.H. el valor de la vimentina citoesqueletal sigue siendo superior (72%) a la de la desmina, pero a partir del estadio XXII H.H. los valores de la desmina citoesqueletal en cada estadio del desarrollo embrionario estudiado son mucho mayores que los correspondientes a la vimentina citoesqueletal del estadio estudiado, aumentando la diferencia entre ambos valores conforme se avanza en los estadios del desarrollo embrionario (Tabla XVI). Se obtiene un máximo del contenido de vimentina en el estadio XXIX H.H., posteriormente disminuye el valor de la vimentina citoesqueletal hasta un 64% en el estadio XXXIII H.H. aumentando (38%) en el estadio XXXVI H.H., descendiendo en los siguientes estadios alcanzando un mínimo en el estadio XXXIX H.H. que es un 52% inferior al valor observado en el primer estadio del desarrollo estudiado (XVIII H.H.). En los últimos estadios del desarrollo embrionario el contenido de vimentina en los 100 mg de tejido embrionario es inferior a los máximos observados en el estadio XVIII H.H. y XXIX H.H, siendo los valores un 53% y un 20% respectivamente inferior en el último estadio del desarrollo embrionario (Tabla XVI).

IV.B.1.2. Contenido proteico del corazón humano adulto

IV.B.1.2.1. Concentración proteica en el tejido cardíaco humano adulto

A partir de biopsias quirúrgicas de corazón humano adulto, hemos procedido a aislar el miocardio y tras posterior homogeneización mediante homogeneizador manual o polytrón, hemos realizado el subfraccionamiento celular de los miocardiocitos que forman el miocardio del corazón humano adulto.

Las biopsias obtenidas mediante intervención quirúrgica, generalmente de la orejuela cardíaca, lleva adherida al pericardio acúmulos lipídicos que son retirados junto al pericardio, aislándose la masa muscular que forma el miocardio que suele representar el 15% de la masa total de la biopsia obtenida, con una peso comprendido entre 0,073-0,096 g por biopsia quirúrgica.

Tras la homogeneización y posterior subfraccionamiento celular hemos determinado la concentración proteica, observándose en los diferentes homogenados obtenidos que la concentración proteica es un 30% superior cuando utilizamos polytrón para la homogeneización que por medio de homogeneizador manual. Los valores obtenidos para las fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas son muy similares, aunque cuando utilizamos el polytrón la concentración de las proteínas obtenidas es ligeramente superior (9%) que la obtenidas por homogeneizador manual (Tabla XVII).

Los valores de concentración proteica, referidos a 100 mg de miocardio adulto humano, son en todas las muestras obtenidas previa homogeneización con polytrón superiores a las homogeneizadas manualmente ; así la concentración proteica del homogenado obtenido mediante polytrón es un 26% superior a la obtenida manualmente, en las fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas los valores son similares (Tabla XVIII).

IV.B.1.2.2. Composición proteica de desmina y vimentina de las distintas fracciones subcelulares

Las muestras proteicas correspondientes a las distintas subfracciones celulares obtenidas mediante homogeneización del tejido miocardíco procedente de biopsias quirúrgicas de corazón adulto humano, fueron disueltas en el

tampón de muestra para electroforesis y separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE (geles 12%), determinándose mediante densitometría las proporciones correspondientes a cada banda proteica con respecto a los 15 µg de proteína corridos en cada calle del gel.

IV.B.1.2.2.1. Fracción citoplasmática

En la cantidad de filamentos intermedios (desmina y vimentina) que forman parte de 15 µg de proteínas citoplasmáticas totales, fueron determinadas tanto cuando la homogeneización se ha realizado manual como mecanicamente (Tabla XIX), observándose en ambos casos que el contenido en desmina es superior al de vimentina observado. Así cuando la homogeneización se realiza manualmente, el contenido de desmina es un 51% superior al de vimentina y si la homogeneización se ha realizado mecanicamente mediante polytrón la cantidad de desmina obtenida es un 65% superior a la de desmina. La cantidad de desmina obtenida mediante homogeneización mecánica con polytrón es un 34% superior a la obtenida mediante homogeneización manual, mientras que los valores de vimentina obtenidos son similares en ambos procesos de homogeneización.

Cuando obtenemos los valores de ambas proteínas que corresponderían a 100 mg de tejido miocárdico humano adulto, los valores de vimentina son similares en ambos métodos de homogeneización, mientras que el valor de la desmina obtenida mediante homogeneización manual es un 28% inferior al obtenido por homogeneización mecánica con polytrón.

IV.B.1.2.2.2. Fracción citoesquelética

Los valores de desmina y vimentina del

citoesqueleto son muy similares, siendo así mismo muy similares los valores de dichas proteínas obtenidas por ambos métodos de homogeneización (Tabla XIX). Con respecto a la desmina citoplasmática, se observa que el contenido de desmina citoesqueletal es aproximadamente un 21% inferior que el contenido de desmina citoplasmática; mientras que el contenido de vimentina del citoesqueleto es aproximadamente un 78% superior que el contenido de vimentina citoplasmática.

Cuando determinamos el contenido de desmina y vimentina correspondiente a 100 mg de tejido miocardico, se obtienen valores similares en el contenido de desmina y vimentina del citoesqueleto; observándose en cambio que el contenido de vimentina citoplasmática y citoesquelética son muy similares en los 100 mg de tejido, en cambio el contenido de desmina citoplasmática es aproximadamente un 60% superior que el contenido de desmina citoesqueletal

IV.B.2. Contenido proteico de los miocardiocitos en cultivo

IV.B.2.1. Cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo

IV.B.2.1.1. Concentración proteica de los cultivos de miocardiocitos embrionarios de pollo

Para poder estudiar la evolución del contenido proteico de los miocardiocitos a lo largo de los días de cultivo, a partir de corazones embrionarios de pollo de los estadios del desarrollo embrionario XXV, XXIX y XXXIX H.H. hemos aislados miocardiocitos y posteriormente han sido sembrados en frascos de cultivo a una densidad de 1.000.000 células/ml. Posteriormente se han recogido las células del cultivo cada 7 días, hasta el día 28

de cultivo, realizándose la homogeneización manual de la masa celular cultivada y procediendose al subfraccionamiento celular, obteniéndose una fracción citoplasmática y otra citoesquelética. Tanto del homogenado obtenido en cada caso, como de las fracciones subcelulares obtenidas se ha determinado la concentración proteica (mg/ml) correspondiente al día de cultivo en que han sido cosechadas las células.

IV.B.2.1.1.1. Cultivos de miocardiocitos del estadio XXV H.H.

En el contenido proteico del homogenado obtenido a partir de miocardiocitos en cultivo procedentes de corazones del estadio XXV H.H., se observa un aumento del 49% a los 7 días de cultivo, el aumento del contenido proteico prosigue en el día 14 de cultivo, habiendo aumentado un 29% en la segunda semana de cultivo; a los 21 días de cultivo se produce una disminución del 60%, en cambio a los 28 días de cultivo se produce un significativo aumento del 239% (Tabla XX). Cuando los resultados del contenido proteico de los cultivos lo referimos a la cantidad de proteínas que contiene cada célula, observamos que a los 7 días de cultivo, en donde la viabilidad de las células inicialmente sembradas es del 90%, la cantidad proteica por célula en cultivo ha aumentado un 66%; a los 14 días de cultivo con un descenso de la población viable con respecto a la población sembrada de un 25%, el contenido proteico de las células continúa aumentando en un 54% con respecto a la semana anterior, mientras que a los 21 días de cultivo con una población cercana al 50% de la inicialmente sembrada, el contenido proteico celular experimenta un descenso del 43% en los últimos siete días de cultivo, mientras que a la semana siguiente de cultivo (28 días de cultivo) la población celular experimenta un ligero aumento (5%) y el contenido proteico se incrementa en un 64%.

En el contenido proteico correspondiente al

citoplasma, el aumento a los 7 días de cultivo es del 192%, siguiendo el aumento en el día 14 de cultivo, en que ha aumentado un 22% en la segunda semana de cultivo; a los 21 días de cultivo se produce un descenso pronunciado (69%) de la concentración proteica, mientras que a los 28 días de cultivo se ha duplicado la concentración proteica en la última semana de cultivo. El contenido proteico por célula, inicialmente experimenta un aumento del 225% a los 7 días de cultivo, continúa aumentando a los 14 días de cultivo (47%), experimentando a los 21 días de cultivo un descenso del 56% y volviendo a incrementarse el contenido proteico celular en los siguientes 7 días de cultivo en un 87% (Tabla XX).

En lo que respecta al contenido proteico del citoesqueleto, en la primera semana de cultivo se produce un descenso de la concentración proteica del 25%, tras la segunda semana de cultivo la concentración proteica se mantiene en los mismos niveles que el día 7 de cultivo, produciendo un descenso del 19% en el día 21 de cultivo y tras una semana más de cultivo, en el día 28 de cultivo, se recuperan los niveles de concentración proteica de los días 7 y 14 de cultivo. El contenido proteico del citoesqueleto celular experimenta un descenso del 17% a los 7 días de cultivo, observándose un ligero aumento del 13% en el día 14 de cultivo, siguiendo aumentando en las siguientes semanas de cultivo un 16 y un 23% respectivamente.

IV.B.2.1.1.2. Cultivos de miocardiocitos del estadio XXIX H.H.

Los cultivos de miocardiocitos procedentes del estadio XXIX H.H. (Tabla XXI), presentan unos niveles similares de concentración proteica en el homogenado obtenido cuando se han sembrado los miocardiocitos y tras una semana de cultivo; a los 14 días de cultivo se observa un gran descenso del contenido proteico del homogenado que alcanza el 50%, en la siguiente

semana de cultivo el descenso se eleva al 73%, en cambio a los 28 días de cultivo se produce un aumento del 323%, pero la concentración es aproximadamente la mitad de la observada en los primeros días de cultivo. En lo referente al contenido proteico por célula, se observa que a los 7 días de cultivo, en donde la población inicial de siembra ha descencido un 15%, la cantidad proteica celular se encuentra incrementada un 21%, a los 14 días de cultivo con una población celular un 35% inferior a la inicial, el contenido proteico desciende un 35%; posteriormente a los 21 días de cultivo con una población celular viable inferior reducida a menos de la mitad de la población sembrada (44%), se registra el valor proteico celular más bajo, habiendo disminuído un 61% en los últimos siete días de cultivo, mientras que a los 28 días de cultivo ha experimentado un incremento del 305%, alcanzándose un valor similar al observado en el día 14 de cultivo.

La fracción citoplasmática mantiene su contenido proteico en la primera semana de cultivo, produciéndose un descenso del 46% en la segunda semana de cultivo; en la tercera semana de cultivo se alcanzan unos niveles mínimos en las concentraciones correspondientes a las proteínas citoplasmáticas, produciéndose un descenso del 82%, sin embargo a los 28 días de cultivo se observa un aumento del contenido proteico del 684% en la última semana de cultivo. El contenido de proteínas citoplasmáticas celular experimenta un aumento del 15% en los primeros siete días de cultivo, mientras que a los 14 días de cultivo se observa un descenso 29% que se ve incrementado (74%) a los 21 días de cultivo donde se obtiene el valor mínimo del contenido proteico; a los 28 días de cultivo se observa un gran aumento del contenido (651%) y se obtiene el valor máximo de los días en cultivo.

La concentración proteica del citoesqueleto sufre un aumento del 33% en la primera semana de cultivo, pero en la siguiente semana de cultivo se observa un descenso del 53% en la

concentración proteica; tras el día 14 de cultivo, en las dos semanas siguientes de cultivo, se mantienen los niveles proteicos en el citoesqueleto celular, aumentando solamente un 12% en el día 21 de cultivo y en la siguiente semana se recupera el valor obtenido en el día 14 de cultivo. El contenido proteico del citoesqueleto celular experimenta un aumento del 56% a los 7 días de cultivo, mientras que en el día 14 de cultivo se obtiene el valor mínimo de contenido proteico citoesqueletal con un descenso del 38%, mientras que en la siguiente semana de cultivo se observa un aumento del 64% y el contenido proteico del citoesqueleto celular se mantiene en valores ligeramente superiores a los 28 días de cultivo.

IV.B.2.1.1.3. Cultivos de miocardiocitos del estadio XXXIX H.H.

El homogenado obtenido a partir de miocardiocitos en cultivo procedentes de embriones del estadio XXXIX H.H. (Tabla XXII), experimenta un aumento del 28% en la primera semana de cultivo, manteniéndose en valores muy similares en la segunda semana de cultivo; a los 21 días de cultivo se produce un descenso en la concentración proteica del homogenado del 65% y en la última semana de cultivo experimenta un aumento del 178%. La población celular que se ve disminuída en un 32% en los primeros 7 días de cultivo, experimenta un aumento del contenido proteico del 88%, a los 14 días de cultivo el contenido proteico de la población celular (50% del valor inicial), continua aumentando en un 26%, mientras que a los 21 días de cultivo con una población celular cercana al 30% de la inicialmente sembrada, se observa el mínimo en el contenido proteico celular del citoplasma, habiendo descendido un 43% en los últimos siete días de cultivo; posteriormente a los 28 días de cultivo la población celular desciende levemente (9%), se obtiene el valor máximo que es un 207% superior al valor observado en la semana anterior de cultivo.

En la concentración proteica del citoplasma se observa un aumento del 80% durante la primera semana de cultivo, manteniéndose la concentración proteica en la segunda semana de cultivo; a los 21 días de cultivo se produce un descenso del 76% en la concentración proteica y experimenta un aumento del 234% en la última semana de cultivo. El contenido del citoplasma celular experimenta un aumento del 165% a los 7 días de cultivo, en la semana siguiente los valores aumentan en un 31%, mientras que a los 21 días de cultivo se obtienen los valor mínimos que son un 61% inferiores a los obtenidos a los 14 días de cultivo; a los 28 días de cultivo se obtienen los valores máximos del contenido proteico citoplasmático de las células que ha aumentado un 269% en la última semana de cultivo.

La concentración de las proteínas citoesqueléticas celulares disminuye un 16% durante la primera semana de cultivo, manteniéndose en valores similares a lo largo de la segunda semana de cultivo; en la tercera semana se produce un descenso del 39% en la concentración proteica y posteriormente un aumento del 64% en la última semana de cultivo. El contenido proteico del citoesqueleto celular se encuentra aumentado un 22% tras los primeros 7 días de cultivo, el contenido proteico continua aumentando a los 14 días de cultivo (35%); a los 21 días de cultivo se mantienen y en la última semana de cultivo se obtienen los valores máximos que son un 46% superiores a los obtenidos en los días 14 y 21 de cultivo.

IV.B.2.1.2. Composición proteica de las fracciones subcelulares

IV.B.2.1.2.1. Cultivos de miocardiocitos del estadio XXV H.H.

Una vez secados los geles, mediante densitometría determinamos la cantidad de cada proteína que forma parte de 15

µg de proteínas citoplasmáticas o citoesqueletales corridas en cada carril de electroforesis, correspondientes a los diferentes días de cultivo de los miocardiocitos embrionarios de pollo procedentes de embriones del estadio XXV H.H. del desarrollo embrionario (Tabla XXIII).

Cuando observamos los resultados obtenidos en la fracción citoplasmática celular se observa que los valores de desmina citoplasmática van disminuyendo a lo largo de los días de cultivo, mientras que los valores de vimentina citoplasmática van aumentando. La desmina citoplasmática se mantiene en valores similares durante los primeros 7 días de cultivo, disminuyendo posteriormente en las siguientes semanas de cultivo, así desciende un 34% a los 14 días de cultivo, un 18% a los 21 días y un 29% a los 28 días de cultivo. Los valores de vimentina citoplasmática, aunque descienden ligeramente (8%) en la primera semana de cultivo, a partir de los 14 días de cultivo se observa que van aumentando (63%), aumentando levemente (4%) en el día 21 de cultivo y alcanzando el valor máximo en el día 28 de cultivo, el cual ha aumentado un 18% durante la última semana de cultivo.

Los valores de desmina citoesqueletal descienden ligeramente (12%) durante la primera semana de cultivo, aumentando posteriormente un 84% a los 14 días de cultivo donde se observa el valor máximo; posteriormente empiezan a descender el contenido de desmina del citoesqueleto en un 14% y un 20% respectivamente a los 21 y 28 días de cultivo. La vimentina citoesqueletal se ve aumentada un 65% durante los primeros siete días de cultivo, posteriormente sufre un descenso del 18% a los 14 días de cultivo y continúa aumentando (38%) en el día 21 de cultivo, con un valor superior al observado a los 7 días de cultivo y se mantiene en valores similares y elevados al cabo de 28 días de cultivo.

A partir de los valores anteriormente obtenidos,

podemos determinar el contenido proteico de la masa celular en cultivo a lo largo de los días de cultivo, así como el contenido proteico celular de cada una de las proteínas que forman los filamentos intermedios (Tabla XXIV).

El contenido de desmina citoplasmática de la masa celular en cultivo aumenta un 187% durante los primeros días de cultivo y a continuación se observa un descenso del 20% a los 14 días de cultivo, continua disminuyendo el contenido de desmina en el cultivo en el día 21 de cultivo en un 75% y aumenta de nuevo a los 28 días de cultivo (40%); el contenido de vimentina citoplasmática aumenta un 168% y un 102% respectivemente en los días 7 y 14 de cultivo, a los 21 días de cultivo desciende un 68%, aumentando de nuevo (135%) a los 28 días de cultivo. Cuando observamos los valores del contenido proteico citoplasmático por célula, se observa que la desmina aumenta un 223% durante la primera semana de cultivo, manteniendose en valores similares a los 14 días de cultivo y experimenta un descenso del 64% en el día 21 de cultivo y a continuación se observa un aumento del 32% en el contenido de desmina en el citoplasma celular a los 28 días de cultivo; la vimentina citoplasmática aumenta un 205% durante la primera semana de cultivo, continúa aumentando (140%) durante la segunda semana de cultivo y a los 21 días de cultivo se observa un descenso del 54% en el contenido de vimentina celular y de nuevo, a los 28 días de cultivo, se recuperan los valores observados en el día 14 de cultivo, debido a un incremento del contenido citoplasmático de vimentina del 122% durante la última semana de cultivo.

En la contenido proteico del citoesqueleto, se observan valores inferiores de dichas proteínas de los filamentos intermedios que los observados en el citoplasma celular, observándose que mientras la desmina ha disminuido al final de los 28 días de cultivo, el contenido de vimentina celular del citoesqueleto ha aumentado tras 28 días de cultivo. El contenido de desmina del citoesqueleto desciende un 34% a los 7 días de

cultivo, obteniéndose un valor superior al inicial en el día 14 de cultivo y posteriormente desciende de nuevo (31%) a los 21 días de cultivo y se mantiene en valores similares a los 28 días de cultivo; en lo referente al contenido de desmina citoesqueletal por célula se observa un descenso del 28% a los 7 días de cultivo, doblandose su valor en la siguiente semana de cultivo y posteriormente se mantienen los valores a lo largo de los días de cultivo. El contenido del citoesqueleto en vimentina se encuentra aumentando en un 23% durante la primera semana de cultivo, posteriormente experimenta un descenso del 22% y a continuación observamos que va aumentando a lo largo de los días de cultivo, obteniéndose el valor máximo en el último día de cultivo, con un valor que es superior en un 35% al observado inicialmente en el momento de la siembra; los valores de vimentina citoesqueletal por célula van aumentando a lo largo del tiempo de cultivo, siendo dicho aumento de un 33% durante la primera semana de cultivo, se mantinen los valores en la siguiente semana y aumenta un 75% a los 21 días de cultivo, posteriormente en el último día de cultivo se obtiene el valor máximo que es un 166% superior al valor inicial de las células sembradas.

IV.B.2.1.2.2. Cultivos de miocardiocitos del estadio XXIX H.H.

De igual modo que determinamos la cantidades de desmina y vimentina de las diferentes fracciones subcelulares en los cultivos miocardiocíticos procedentes de embriones del estadio XXV H.H. del desarrollo embrionario, lo hemos realizado para los cultivos de miocardiocitos embrionarios procedentes del estadio XXIX H.H. del desarrollo embrionario .

En la cantidad de proteínas de filamentos intermedios que forman parte de 15 µg de proteínas totales de las diferentes fracciones (Tabla XXV), se observa que el contenido

de desmina citoplasmática disminuye a lo largo de los días de cultivo, mientras que la vimentina citoplasmática va aumentando. La desmina citoplasmática disminuye un 31% durante la primera semana de cultivo, manteniéndose en valores similares a los 14 días de cultivo, descendiendo un 16% a los 21 días de cultivo y se mantienen a los 28 días de cultivo, con un valor ligeramente inferior (6%) al observado en el día 21 de cultivo. La vimentina citoplasmática aumenta un 45% durante la primera semana de cultivo, posteriormente continua aumentando (29%) a los 14 días de cultivo, experimentando un leve descenso del 10% a los 21 días de cultivo y a los 28 días de cultivo se obtiene el valor máximo de vimentina citoplasmática en cultivo, siendo un 104% superior al valor inicial en el momento de la siembra de los cultivos.

Los valores proteicos de la desmina van disminuyendo a lo largo del cultivo, mientras que los valores de vimentina son superiores a los observados en el momento de la siembra celular. La desmina del citoesqueleto disminuye ligeramente (5%) durante la primera semana de cultivo, manteniéndose en valores similares a los 14 días de cultivo, posteriormente va disminuyendo en una proporción cercana al 20% por semana a medida que avanza el tiempo de cultivo. La vimentina del citoesqueleto aumenta un 133% tras los primeros siete días de cultivo, posteriormente continua aumentando (21%), descendiendo un 35% en el día 21 de cultivo, aunque el valor que se observa en dicho día de cultivo es un 83% superior al valor inicial del momento de siembra; posteriormente durante la última semana de cultivo continúa aumentando ligeramente (6%) el contenido de vimentina en el citoesqueleto.

Cuando observamos el contenido proteico de la masa celular en cultivo (Tabla XXVI), observamos que el contenido de ambas proteínas en el citoplasma evoluciona de forma diferente, mientras que el contenido de desmina disminuye a lo largo del tiempo de cultivo, la cantidad de vimentina ha aumentado tras los 28 días de cultivo. La cantidad de desmina citoplasmática

desciende un 29% después de la primera semana de cultivo, en el día 14 de cultivo continúa el descenso (49%) de la desmina citoplasmática, la cual alcanza el valor más bajo a los 21 días de cultivo con un descenso del 85% y posteriormente en el día 28 de cultivo se recuperan los valores observados en el día 14 de cultivo; el contenido en desmina citoplasmática por célula desciende un 17% durante la primera semana de cultivo, a continuación continúa disminuyendo (34%) y alcanza su valor mínimo a los 21 días de cultivo, volviendo a alcanzar los niveles obtenidos a los 7 días de cultivo, en la siguiente semana de cultivo (28 días de cultivo). Los valores de vimentina citoplasmática de la masa celular en cultivo aumenta un 48% durante la primera semana de cultivo, volviendo a los valores iniciales en la segunda semana de cultivo y alcanzando su valor mínimo a los 21 días de cultivo, posteriormente a los 28 días de cultivo experimenta un gran incremento del 851% y vuelve a alcanzar los valores máximos observados a los 7 días de cultivo; los valores de vimentina celular aumenta un 74% durante la primera semana de cultivo, manteniendo en valores similares durante la segunda semana y desciende un 76% en el día 21 de cultivo donde alcanza el mínimo, mientras que a los 28 días es cuando alcanza su valor máximo con un aumento del 838%.

Los valores de desmina del citoesqueleto aumenta un 25% en la masa de cultivo tras siete días de cultivo, experimentando un descenso del 52% a los 14 días de cultivo, se mantiene con valores ligeramente inferiores a los 21 días de cultivo y continua el descenso (11%) a los 28 días de cultivo; el contenido de desmina citoesqueletal por célula aumenta un 62% a los siete días de cultivo, recuperando lo valores iniciales a los 14 días de cultivo, volviendo a crecer (37%) durante la tercera semana de cultivo y posteriormente, en la última semana de cultivo desciende (22%) dicho valor. Los valores de vimentina citoesqueletal en la masa celular en cultivo, experimenta un gran aumento (210%), disminuyendo un 42% durante la segunda semana de cultivo, a los 21 días de cultivo sufre un

nuevo descenso del 29% y empieza de aumentar de nuevo su valor (19%) en el último día de cultivo observado; la cantidad de vimentina citoesqueletal por célula aumenta un 350% durante la primera semana de cultivo, posteriormente sufre un descenso del 22% en el día 14 de cultivo y se mantiene o aumenta (14%) dichos valores elevados en las días avanzados de cultivo.

IV.B.2.1.2.3. Cultivos de miocardiocitos del estadio XXXIX H.H.

Las proteínas componentes de los filamentos intermedios en las distintas subfracciones celulares de los miocardiocitos en cultivo procedentes de embriones del estadio XXXIX H.H. del desarrollo embrionario, fueron determinadas tras haber corrido 15 µg de proteínas en cada carril (Tabla XXVII).

La cantidad de desmina citoplasmática va descendiendo a lo largo de los días de cultivo (15% la primera semana de cultivo y 40% la segunda semana) hasta alcanzar el mínimo en el día 14 de cultivo, posteriormente aumenta ligeramente (14%) y a los 28 días de cultivo alcanza valores cercanos a los obtenidos a los 7 días de cultivo, siendo un 11% superior al obtenido en el momento de la siembra celular. La vimentina citoplasmática va aumentando a lo largo del tiempo de cultivo, a los 7 días de cultivo el aumento es del 22%, incrementándose en la misma proporción durante la segunda semana de cultivo; durante la tercera semana de cultivo el incremento observado fue del 38% y en la última semana de cultivo el valor de vimentina citoplasmática aumenta un 23% hasta alcanzar el máximo a los 28 días de cultivo, con un valor que es un 172% superior al valor inicial observado en el momento de la siembra.

El contenido proteico del citoesqueleto, salvo la

desmina en el día 14 de cultivo, es inferior a los valores proteicos citoplasmáticos. La desmina del citoesqueleto desciende un 41% durante la primera semana de cultivo, a los 14 días de cultivo aumenta 50%, y posteriormente va descendiendo su valor hasta alcanzar el mínimo a los 28 días de cultivo con un valor un 35% inferior al observado en el momento de la siembra celular. Los valores de vimentina en el citoesqueleto, aumenta durante los 2 primeras semanas de cultivo (un 50% y un 74% respectivamente), posteriormente una vez alcanzado el máximo, el día 14 de cultivo, desciende gradualmente hasta alcanzar valores similares a los iniciales a los 28 días de cultivo.

Cuando determinamos la cantidad de desmina y vimentina en la masa de cultivo, observamos que en todos los casos los valores citoplasmáticos a lo largo de los días de cultivo son superiores a los correspondientes del citoesqueleto en el mismo día de cultivo (Tabla XXVIII).

Los valores citoplasmáticos de desmina aumentan un 52% durante la primera semana de cultivo, descendiendo posteriormente un 39% durante la segunda semana de cultivo y un 72% durante la tercera semana de cultivo donde alcanza su valor mínimo, posteriormente se observa un aumento del 410% en el día 28 de cultivo; los valores de la cantidad de desmina citoplasmática por célula aumentan un 126% durante los primeros siete días, posteriormente desciende un 21% y un 56% durante las dos semanas siguientes y aumenta un 474% en el día 28 de cultivo donde se observa el valor máximo. Los valores de vimentina citoplasmática en la masa celular en cultivo aumentan a lo largo de los días de cultivo, este incremento es del 121% durante la primera semana, de un 30% durante la segunda semana de cultivo y en el día 21 de cultivo se observa un descenso del 66%, posteriormente aumenta de nuevo el contenido de vimentina del cultivo hasta alcanzar el valor máximo a los 28 días de cultivo, donde se observa un valor que es un 296% superior al inicial en el momento de la siembra de los cultivos; el contenido de

vimentina citoplasmática por célula viva en cultivo va aumentando a lo largo del tiempo de cultivo, un 226% durante la primera semana de cultivo y un 71% durante la segunda hasta llegar al día 14 de cultivo, posteriormente experimenta un descenso del 46% al llegar al día 21 de cultivo y a los 28 días de cultivo ha experimentado un aumento del 361%, alcanzando su valor máximo que es un 1.284% superior al inicial observado en el momento de la siembra.

Los valores de desmina citoesqueletal desciende con respecto al valor inicial de siembra en los diferentes días de cultivo, durante la primera semana de cultivo el descenso es del 51%, posteriormente aumenta un 56% en el día 14 de cultivo donde se obtiene un valor inferior (23%) al inicial, continua descendiendo (54%) en el día 21 de cultivo donde se obtiene el valor mínimo y aumenta un 31% en el último día de cultivo; los valores de desmina del citoesqueleto por célula desciende en la primera semana de cultivo (25% 9, posteriormente aumenta un 100% en la segunda semana de cultivo, descendiendo de nuevo en la tercera semana donde se obtiene un valor cercano al inicial de siembra y se obtiene el máximo a los 28 días de cultivo con un valor un 66% superior al inicial. El contenido de vimentina del citoesqueleto va aumentando a lo largo de los días de cultivo, un 24% durante la primera semana y un 80% durante la segunda semana de cultivo, hasta obtener un valor máximo en el día 14 de cultivo, posteriormente va descendiendo un 55% en la tercera semana de cultivo y un 28% en la última semana de cultivo; el contenido de vimentina del citoesqueleto celular aumenta en todos los días de cultivo con respecto al inicial, así en la primera semana el aumento es del 100%, durante la segunda semana de cultivo dicho incremento alcanza el 175%, posteriormente desciende en proporciones cercanas al 255 durante las dos últimas semanas de cultivo, alcanzandose sin embargo en el día 28 de cultivo un valor que es un 200% superior al observado inicialmente en el momento de la siembra de los cultivos.

IV.B.2.2. Cultivos de miocardiocitos humanos adultos

IV.B.2.2.1. Concentración proteica en los cultivos de miocardiocitos humanos adultos

A partir de biopsias quirúrgicas de corazón humano adulto hemos aislado miocardiocitos y puestos en cultivo, recogiéndose las células cultivadas cada 7 días de cultivo durante los 28 días de cultivo que ha durado la experiencia. Una vez que las células son cosechadas, se procede a la homogeneización celular y posteriormente se realiza el subfraccionamiento celular, obteniéndose las correspondientes fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas celulares. Del homogenado y de las subfracciones celulares obtenidas, se determinaron sus correspondientes concentraciones proteicas a lo largo de los días de cultivo (Tabla XXIX).

Tras homogeneización de las células recogidas después de la primera semana en cultivo en donde el descenso de la viabilidad celular ha sido cercano al 50%, se observa un descenso del contenido proteico del 33%, en la segunda semana de cultivo en que la viabilidad celular ha disminuido un 64% con respecto a la inicial, durante esta semana la disminución de la concentración proteica ha sido del 62%; a los 21 días de cultivo se observa un aumento de la población celular del 33% y un aumento del 146% en la concentración proteica del homogenado, en la cuarta semana de cultivo la población celular desciende un 50% y se mantiene la concentración proteica del homogenado. El contenido proteico por célula viva en cultivo aumenta un 23% durante la primera semana de cultivo, en la segunda semana experimentan un descenso del 43% alcanzando a los 14 días de cultivo su valor mínimo y en las dos últimas semanas aumenta un 84% y un 51%, en el día 28 de cultivo alcanza su valor máximo que es un 94% superior al inicial.

En la fracción citoplasmática se observa un aumento del 50% en la concentración proteica durante la primera semana de cultivo, en la segunda semana de cultivo se produce un descenso de la concentración proteica del 366%; en la tercera semana de cultivo se produce un aumento de de la concentración proteica del 157% y el incremento continua en la cuarta semana de cultivo, aunque solamente es del 14%. El contenido proteico citoplasmático por célula aumenta en un 177% durante la primera semana de cultivo, durante la segunda semana se observa un descenso del 30% y en las dos últimas semanas de cultivo aumenta el contenido proteico citoplasmático en un 93% y un 71% respectivamente, alcanzando su valor máximo en el día 28 de cultivo, con un valor que es un 542% superior al valor inicial obtenido en el momento de la siembra.

La concentración proteica correspondiente al citoesqueleto experimenta un incremento del 81% durante los primeros 7 días de cultivo, en el día 14 de cultivo se observa un descenso en la concentración proteica del 40%, posteriormente en el día 21 de cultivo se observa un aumento del 23% en la concentración proteica y durante la última semana de cultivo de la experiencia sufre un descenso del 23%. El contenido proteico del citoesqueleto por célula se encuentra incrementado con respecto al valor inicial a lo largo de los días de cultivo, así a los 7 días de cultivo el aumento es del 235%, en los 14 y 21 de cultivo desciende levemente (10% y 7% respectivamente) y a los 28 días de cultivo se obtienen valores cercanos a los obtenidos en el día 7 de cultivo.

IV.B.2.2.2. Composición proteica de las fracciones subcelulares

Las proteínas correspondientes a las fracciones subcelulares fuerón corridas mediante electroforesis en alicuotas de 15 µg por carril y determinada la cantidad de cada una de las

proteínas de los filamentos intermedios (desmina y vimentina) que forman parte de dichos 15 µg de proteínas totales citoplasmáticas o citoesqueléticas en las células humanas adultas a lo largo de los días de cultivo (Tabla XXX).

La desmina citoplasmática se mantiene en valores muy similares durante los primeros 21 días de cultivo, mientras que a los 28 días de cultivo el valor de la desmina citoplasmática desciende un 46% con respecto a la inicial y se obtiene su valor mínimo de todo el tiempo de cultivo. La vimentina citoplasmática, por el contrario es superior en todos los días de cultivo que el valor inicial observado en el momento de la siembra celular, así a los 7 días de cultivo aumenta un 176%, un 39% en la siguiente semana de cultivo, manteniéndose en valores cercanos durante la tercera semana de cultivo y aunque desciende un 22% en el último día de cultivo estudiado, el valor obtenido en dicho día 28 de cultivo es un 182% superior al inicialmente observado en la siembra.

Los valores citoesqueléticos de desmina aumentan un 80% a los 7 días de cultivo, alcanzando su valor mínimo a los 14 días de cultivo con un descenso del 60% en esta segunda semana de cultivo, posteriormente experimenta un aumento del 35% en la tercera semana de cultivo y alcanza valores cercanos al inicial de siembra y posteriormente en el día 28 de cultivo se observa un un leve descenso y se obtiene un valor que es un 17% inferior al que presentaban las células en el momento de la siembra. En la vimentina del citoesqueleto se observan valores superiores a los iniciales a lo largo de los días de cultivo, así los cultivos experimentan un aumento de la vimentina del citoesqueleto del 15% en los primeros siete días de cultivo, a los 14 días de cultivo el incremento observado en la segunda semana de cultivo fue del 73% y en las siguientes semanas descienden los valores en un 19% y un 36%, alcanzándose a los 28 días de cultivo un valor que es ligeramente superior al inicialmente observado en el momento de la siembra.

Cuando determinamos el contenido en desmina y vimentina en las diferentes fracciones subcelulares, correspondientes a la masa celular en cultivo a lo largo del tiempo de cultivo (Tabla XXXI), se observa que las cantidades citoplasmáticas de estas proteínas son siempre superiores que las correspondientes a las del citoesqueleto a lo largo de los diferentes días de cultivo.

La desmina citoplasmática experimenta un aumento del 62% a los 7 días de cultivo, posteriormente se observa un descenso del 58% en el día 14 de cultivo donde se observa el valor mínimo de todo el tiempo de cultivo, en el día 21 de cultivo se observa un aumento del 180% y se obtiene el valor máximo, posteriormente en el día 28 de cultivo se obtiene un valor que es ligeramente superior (9%) al inicial; la concentración de desmina citoplasmática por célula aumenta un 203% en los primeros 7 días de cultivo, descendiendo un 38% en el día 14 de cultivo, aumentando posteriormente un 110% y un 11% respectivamente en las dos últimas semanas de cultivo, obteniéndose un valor 36% superior al inicial. Los valores de vimentina citoplasmáticas son superiores al inicial en todos los días de cultivo estudiados, así aumenta un 305% en los primeros siete días, posteriormente desciende un 33% en el día 14 de cultivo y aumenta un 144% en el día 21 de cultivo, descendiendo levemente (11%) en el día 28 de cultivo donde se observa un valor que es un 481% superior al valor inicial; el contenido de vimentina por citoesqueleto celular aumenta a lo largo de los días de cultivo, este aumento es del 700% en los primeros 7 días de cultivo, se mantiene durante la segunda semana y experimenta un aumento del 83% y del 32% durante la tercera y cuarta semana de cultivo, en el último día de cultivo se obtienen unos valores que son un 1.850% superiores a los inicialmente observados en el momento de cultivo.

El contenido de desmina en el citoesqueleto aumenta un 226% durante la primera semana de cultivo,

posteriormente desciende un 76% en la segunda semana de cultivo, donde se obtiene un valor inferior al inicial de siembra, a los 21 días de cultivo experimenta un aumento del 67% y posteriormente un descenso del 33% alcanzandose un valor final que es un 15% inferior al observado en el momento de la siembra de los cultivos; la cantidad de desmina citoesqueletal por célula aumenta durante la primera semana de cultivo (546%), posteriormente experimenta un descenso (66%) y un ligero aumento (25%) en el día 21 de cultivo, posteriormente se mantiene los valores superiores a los iniciales durante la última semana de cultivo. El contenido de vimentina del citoesqueleto aumenta a lo largo de los días de cultivo , así durante la primera semana se incrementa un 6%, durante la segunda semana el incremento es del 101%, posteriormente se mantienen los valores a los 21 días de cultivo y durante la última semana de cultivo (51%), alcanzandose un valor final levemente superior (4%) al valor inicial en el momento del inicio de los cultivos; el contenido de vimentina citoesqueletal por célula en cultivo aumenta un 100% durante la primera semana de cultivo, éste incremento es del 208% a los 14 días de cultivo, a los 21 días desciende un 25% y a los 28 días de cultivo el descenso es del 27% alcanzandose un valor final que es un 233% superior al valor inicial observado en las células sembradas.

IV.C. Efectos de los fármacos sobre los miocardiocitos en cultivo

Los miocardiocitos procedentes de corazones embrionarios de pollo del estadio XXIX H.H. del desarrollo embrionario, fueron sembrados en frascos de cultivo a una densidad celular de 1.000.000 células/ml y tras 3 días en cultivo cuando se ha formada una monocapa celular que cubre toda la superficie de cultivo, se procede al tratamiento de los cultivos celulares con los fármacos hipolipemiantes (fibratos) a una concentración que es igual a la concentración plasmática que se

alcanza con la dosis terapéutica (bezafibrato 10 µg/ml, fenofibrato 30 µg/ml y gemfibrozilo 23 µg/ml), recogiendose la cosecha celular a las 6 ó 24 horas de tratamiento con los fármacos hipolipemiantes; también se ha estudiado la posible interacción de dichos fármacos con las células en cultivo a una dosis tóxica (0,1% p/v) y durante un periodo de tiempo de 24 horas. En todas las experiencias sembramos un frasco de cultivo en las mismas condiciones que los tratados, salvo que no van a incluir en la composición del medio de cultivo ningún fármaco, estos frascos de cultivo nos serviran de controles para las diferentes experiencias.

La viabilidad celular observada en los cultivos celulares fue del 90% y la población de células no musculares observada es inferior al 5% de la población total celular.

IV.C.1. Tratamiento de los cultivos con dosis terapéutica de los fármacos

IV.C.1.1. Tratamiento durante 6 horas

IV.C 1.1.1. Concentración proteica de los miocardiocitos en cultivo tras 6 horas de tratamiento

Una vez que han trascurrido 6 horas de contacto de los miocardiocitos en cultivo con los fármacos a las dosis terapéutica, se recogen las células y después de la homogeneización, se realiza el subfraccionamiento celular; posteriormente se determina la concentración proteica (mg/ml) de cada una de las muestras recogidas (Tabla XXXII).

En la determinación de la concentración proteica

del homogenado, se observa un leve incremento (4%) en la concentración proteica obtenida cuando las células son tratadas con bezafibrato, con respecto a los valores obtenidos en el cultivo control; cuando el tratamiento se ha realizado con fenofibrato el contenido proteico del homogenado es inferior (19%) que el del control y éste descenso de la concentración proteica es aún mayor (23%) cuando las células han estado en contacto con el gemfibrozilo. El contenido proteico por célula se observa valores muy similares a los controles en los cultivos tratados con bezafibrato, en cambio en los tratatos con fenofibrato y gemfibrozilo se observa un descenso del 18% y del 23% respectivamente.

El contenido proteico del citoplasma celular también se ve afectado con estos fármacos, con respecto a lo observado en el control; así el bezafibrato produce un incremento del contenido proteico citoplasmático en un 15%, mientras que el fenofibrato y el gemfibrozilo producen una disminución del 10 y 8% respectivamente. El contenido proteico citoplasmático por célula viva en cultivo se encuentra aumentado ligeramente (15%) con respecto al control en los cultivos tratados con bezafibrato, sin embargo se encuentra disminuido en un 10% y 8% respectivamente en los cultivos tratados con fenofibrato y bezafibrato.

La concentración proteica citoesquelética es similar en el control y en los cultivos tratados con bezafibrato, mientras que el fenofibrato produce un incremento del 11% en la concentración proteica del citoesqueleto y el gemfibrozilo va a producir una disminución del 23%. El contenido proteico del citoesqueleto de cada célula en cultivo, se observa que se mantienen en niveles similares a los controles en los cultivos tratados con bezafibrato, en los que han estado en contacto con el fenofibrato se observa un aumento del contenido proteico citoesqueletal del 11%, en cambio los tratados con gemfibrozilo experimentan un descenso del 23% en su contenido proteico.