

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Desarrollo temprano de las cavidades cardíacas ventriculares. Importancia de la Neuregulina 1

Early development of cardiac ventricles. Importance of neuregulin 1

Arlett Del Olmo-Turrubiarte,^{1,2} Concepción Sánchez-Gómez,²
Briseida López-Martínez,³ Alejandra Contreras-Ramos²

RESUMEN

Introducción. Los defectos septales ventriculares graves, asociados con un ventrículo hipoplásico y otro hiperplásico o con la ausencia total del tabique interventricular, suelen ser incompatibles con la vida embrionaria y fetal. Pese a su gravedad, no se conocen sus causas. Por marcaje *in vivo* en embriones de pollo se confirmó la importancia de las trabéculas en la morfogénesis del tabique interventricular. Por manipulación genética en embriones de ratón y aves se determinó que la ausencia de la Neuregulina 1 (NRG1) o sus receptores, además de provocar escasa diferenciación de los miocitos ventriculares y deficiente formación de las trabéculas, determina la muerte prematura del embrión. Con base en estos antecedentes, el objetivo fue determinar el papel real de NRG1 en la trabeculogénesis temprana y su importancia en la regulación de la proliferación y apoptosis.

Métodos. Se estableció un modelo de órgano cultivo de corazón de embrión de pollo previo al inicio de la trabeculogénesis. Se realizaron ensayos de inhibición total de la actividad de NRG1 endógena y posterior adición de la proteína exógena a diferentes concentraciones, determinando la actividad cíclica de los miocitos ventriculares con el antígeno nuclear de proliferación celular y la apoptosis con lisotraker.

Resultados. El suero fetal bovino promueve la proliferación, pero impacta negativamente la trabeculogénesis. La adición de NRG1 a concentraciones bajas y períodos cortos de incubación no induce trabeculogénesis. En contraste, a concentraciones medias y períodos de cultivo no mayores a 24 horas, tiene un efecto positivo sobre este proceso. También promueve la proliferación y evita la apoptosis del miocardio ventricular. El incremento en la concentración de NRG1 posiblemente provoca un desbalance molecular que favorece la proliferación desordenada pero no la trabeculogénesis.

ABSTRACT

Background. Serious ventricular septal defects associated with hypoplastic and hyperplastic ventricles or total absence of the inter-ventricular septum (IVS) are usually incompatible with embryonic and fetal life. Despite the importance of these cardiac diseases, their causes are not yet known. Using *in vivo* labeling in the chick embryo, the importance of ventricular trabeculation was confirmed in IVS morphogenesis. Using knockout mice and retrovirus in birds, it was determined that lack of function of neuregulin 1 (NRG1) or their ErbB receptors not only causes deficient differentiation of ventricular myocytes and poor formation of trabeculae, but also determines premature death of the embryos. Based on this background, the aim of this work was to determine the actual role of NRG1 in early trabeculogenesis and its importance in proliferation and apoptosis regulation.

Methods. An embryonic chicken heart organ culture system at the age prior to the beginning of the trabeculogenesis process was established. Endogenous activity of NRG1 was inhibited in the organ cultures that were then stimulated with NRG1 at different concentrations. Myocyte proliferation was determined using the proliferating cell nuclear antigen and apoptosis with LysoTracker (LTR).

Results. Fetal bovine serum promotes proliferation but negatively impacts trabeculogenesis. Low concentration of NRG1 and short periods of incubation do not induce trabeculogenesis. In contrast, average NRG1 concentrations and cultivation periods not exceeding 24 h have a positive effect on the onset of this process. This also promotes myocardial proliferation but avoids apoptosis. Higher concentrations of NRG1 possibly cause a molecular imbalance that favors untidy proliferation but not trabeculogenesis.

¹ Posgrado en Biología Experimental,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
² Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental
³ Laboratorio Central,
Hospital Infantil de México Federico Gómez

México D.F., México

Fecha de recepción: 05-02-13

Fecha de aceptación: 05-03-13

Conclusiones. El entendimiento del papel de NRG1 en la trabeculogénesis aporta datos para conocer las redes moleculares involucradas también en el desarrollo del tabique interventricular, información indispensable para entender el origen de los defectos septales ventriculares graves.

Palabras clave: trabeculogénesis ventricular, NRG1, cardiogénesis temprana.

Conclusions. Understanding of the role of NRG1 on ventricular trabeculogenesis provides valuable information for the molecular pathways also involved in IVS development. This information is essential for understanding the origin of serious ventricular septal defects.

Key words: ventricular trabeculogenesis, NRG1, early cardiogenesis.

INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías congénitas que involucran al tabique interventricular (TI-V) se denominan defectos septales ventriculares. Se encuentran entre las malformaciones congénitas más comunes y tienen gran impacto en la morbilidad y mortalidad pediátricas.¹ Su frecuencia se aproxima a 0.8 por cada cien nacidos vivos.^{1,2} Su complejidad depende de la región del TI-V en que se manifiestan. Los defectos septales relacionados con la región trabeculada del tabique (tercios medio y apical) pueden ser muy sencillos si se encuentran formando pequeñas comunicaciones a lo largo de esta zona. También los hay extremadamente graves y complejos que suelen asociarse a un ventrículo hipoplásico y otro hiperplásico. Incluso, hay casos en los que el TI-V está totalmente ausente.¹ Estas patologías casi siempre son incompatibles con la vida desde las etapas embrionaria y fetal. No obstante, actualmente no existe una explicación convincente sobre el origen de estas enfermedades, a pesar de que se han dedicado múltiples esfuerzos de investigación clínica y básica a desentrañar esta incógnita. En el ámbito de la investigación básica, el tema se ha abordado estudiando el desarrollo trabecular y del TI-V, pues se sabe que los defectos congénitos se forman durante la embriogénesis. De esta manera, se conoce que los esbozos trabeculares comienzan a formarse poco después que ha concluido el proceso de torsión y plegamiento cardiaco; es decir, alrededor del estadio 16-17HH en el corazón de embrión de pollo.^{3,4} El primer indicio es la aparición de pequeños grupos de miocitos separados por espacios estrechos aparentemente vacíos. Después incrementa el tamaño y longitud de los grupos de miocitos, se proyectan hacia la cavidad ventricular y permanecen cubiertos por endocardio en su superficie distal, en contacto directo con la cavidad ventricular, dando origen a incipientes esbozos trabeculares. Estos comienzan a alargarse y los espacios van siendo cubiertos por endocardio. A medida que los esbozos se elongan, se van ramificando

para formar trabéculas cada vez más diferenciadas.^{3,5} Con referencia al desarrollo del TI-V, Contreras y colaboradores, mediante marcaje *in vivo*, confirmaron la importancia de las trabéculas en este proceso y describieron que las trabéculas, al elongarse y ramificarse, se van adhiriendo progresivamente a una trabécula central hasta formar el TI-V primitivo que se remodela, incrementa de longitud y es alcanzado por los cojines del canal atrioventricular para transformarse en el TI-V definitivo.⁵ Además, al analizar la actividad cíclica de los miocitos durante el desarrollo del tabique, los mismos autores descubrieron dos picos de proliferación: el primero encaminado a la formación de los esbozos trabeculares (estadios 16-17HH) y el segundo, posterior al estadio 26HH, involucrado en la expansión de las cavidades ventriculares y elongación del TI-V.⁶ En el aspecto molecular, estudios recientes han demostrado que señales moleculares del endocardio hacia el miocardio ventricular inician la formación de las trabéculas.⁷ Una de las proteínas directamente involucradas es la Neuregulina 1 (NRG1), proteína de la familia del factor de crecimiento epidérmico. Mediante estudios de cultivo *in vitro* se descubrió que dicha proteína promueve la organización de sarcómeros y la concomitante diferenciación de miocitos ventriculares, tanto de adultos como de recién nacidos.^{8,9} Así mismo, se determinó que NRG1 es sintetizada por el endocardio de atrios y ventrículos y su acción sobre el miocardio puede ser autocrina o paracrina. La transducción de la señal promovida por NRG1 depende de receptores ErbB que, para ser funcionalmente activos, deben formar homodímeros (ErbB4/ErbB4) o heterodímeros (ErbB2/ErbB4 o ErbB3/ErbB4).¹⁰⁻¹² En concordancia con estos hallazgos se encontró que ratones nulos de cualquiera de las isoformas de NRG1 o sus receptores (ErbB2, ErbB4) mueren antes del día 11 de la embriogénesis, debido a la escasa diferenciación de los miocitos ventriculares y la deficiente formación de trabéculas.¹³ También, al inactivar la función de NRG1 mediante retrovirus en embriones de pollo, se provocaron anomalías cardiacas similares a las

del ratón.¹⁴ En contraste, ratones mutantes condicionales delectando ErbB2 o ErbB4 en los miocitos ventriculares fetales, a pesar de completar la gestación, presentaban un ventrículo dilatado con baja actividad contráctil, aunque sin afectación aparente del TI-V.¹⁵⁻¹⁷ Pese a toda esta información, aún queda por definir el papel real de NRG1 en la morfogénesis de los esbozos trabeculares. Con el propósito de investigar este aspecto, se realizaron estudios de inhibición e inducción de la actividad de NRG1 en un modelo de órgano-cultivo de corazón de embrión de pollo de estadio 16-17HH, coincidente con el inicio del desarrollo de los esbozos trabeculares. Para inhibir la actividad de NRG1 se utilizaron un anticuerpo y un siRNA específicos. Los ensayos de inducción se llevaron a cabo adicionando NRG1 α/β a diferentes concentraciones. Además, se determinó el efecto de NRG1 sobre la actividad cíclica y apoptótica de los miocitos ventriculares en este mismo período. Se descubrió que NRG1, a concentraciones medias, tiene un efecto positivo sobre la trabeculogénesis inicial, induce la proliferación y evita la apoptosis del miocardio ventricular. Sin embargo, el incremento en la concentración de NRG1 posiblemente provoca una desregulación molecular que no favorece la morfogénesis de las trabéculas sino la proliferación desordenada.

MÉTODOS

Material biológico

Huevos fértiles de gallina (*Gallus domesticus*) se incubaron durante tres días a 38°C y 86-87% de humedad para obtener embriones de pollo en los estadios 16 a 17, de acuerdo con la clasificación de Hamburger y Hamilton (HH), que correlaciona la morfología cardíaca con el tiempo de incubación.¹⁸

Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos anti-Neuregulin-1, IgG de cabra policlonal (Santa Cruz CA, USA); anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), IgG2a de ratón monoclonal (BioGenex, USA); Heregulin beta 1 recombinante, (Neo Markers Fremont CA, USA).

Inclusión en Paraplasto

Las muestras fueron fijadas con Bouin alcohólico, para llevar a cabo estudios de histología o formalina neutra, para análisis por inmunohistoquímica. Se deshidrataron con

alcoholes graduales, se transparentaron con aceite de cedro, cloroformo/parafina (1:1) y se incluyeron en parafina Paraplasto. Los corazones fueron orientados en posición ventral para obtener cortes frontales en cuatro cámaras de 5 μ m de grosor, empleando micrótopo (Microm HM315).

Histología

Las laminillas, una vez desparafinadas y rehidratadas, se tiñeron con hematoxilina/eosina (H/E). Se tomaron micrografías a 10x y 100x empleando un sistema de captura digital acoplado al microscopio (Olympus BH2) con un lente de 1.7x.

Órgano cultivo

Con el propósito de establecer las condiciones adecuadas de cultivo que permitieran un desarrollo armónico de la región trabecular, los embriones de pollo de estadio 16HH se extrajeron del cascarón y se colocaron en solución fisiológica Ringer de aves (NaCl, KCl, CaCl_2). Los corazones fueron disecados y lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) estéril adicionado con antibiótico (penicilina-estreptomicina a 0.1%). Después, se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 en cajas de cultivo de 8 pozos en 0.3 ml de medio líquido (DMEM) suplementado con antibiótico y suero fetal bovino (SFB) a diferentes concentraciones (2%, 4%, 6%). Se incubaron por 12 horas. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y los corazones fueron lavados con PBS 1X y fijados inmediatamente en Bouin alcohólico para elaborar cortes histológicos seriados y evaluar el desarrollo trabecular. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los corazones de embriones de pollo en estadios 16HH a 18HH cultivados *in ovo* fueron empleados para conocer las características histológicas de este órgano y compararlas con los tejidos cultivados *in vitro*.

Inducción con NRG1 α/β exógena

Con la finalidad de determinar el posible papel de NRG1 en la trabeculogénesis, se llevó a cabo un experimento de inducción de la actividad de NRG1. Para ello, con base en los resultados del establecimiento de las condiciones de cultivo, corazones de estadio 16-17HH se colocaron en cajas de cultivo de 8 pozos con 0.3 ml de medio DMEM libre de SFB, suplementado con antibiótico. Primero se inhibió totalmente la actividad de NRG1 endógena, adicionando simultáneamente anti-NRG1 (1:10) y siRNA-NRG1 (2 ng). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO_2 durante 2 horas y se dividieron en lotes para llevar a cabo los ensayos de inducción.

Con este propósito se adicionó Heregulin beta 1 recombinante a tres diferentes concentraciones (2, 10, 20 ng/ml); un lote se mantuvo intacto. Los corazones permanecieron en cultivo 12, 24 o 36 horas más. Se emplearon como controles corazones incubados en DMEM libre de suero. Una vez cosechado el material, fue fijado en Bouin o formalina neutra e incluido en Paraplasto, para analizar respectivamente las características histológicas o determinar la actividad cíclica de los miocitos ventriculares por inmunodetección del antígeno nuclear de proliferación (PCNA).

Evaluación de la actividad cíclica de los miocitos ventriculares

Basados en las instrucciones del fabricante (EnVision™ Stain System, Dako, USA), las laminillas con muestra fueron tratadas con solución de citratos a presión (15 lbs/pulg²) para liberar el antígeno. Después de los lavados con PBS-tween 20, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 0.1% (Dako, USA); a continuación, se incubó de 5 a 10 min con solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA) y con el anticuerpo primario (Anti-PCNA) durante 30 min. Posterior a los lavados, el polímero acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) fue incubado 30 min. El complejo de reacción fue visualizado con una solución de 3-3' diaminobecidina (DAB) como cromógeno. Las laminillas se montaron con PBS/glicerol 1:1 y se tomaron micrografías a 40x empleando un sistema de captura digital acoplado al microscopio (Olympus BH2) con un lente de 1.7x.

Análisis de la apoptosis

Los corazones obtenidos del cultivo de ensayos de inducción de actividad de NRG1 fueron incubados a 37°C con Lisotraker (LTR) 1M (Molecular Probes, USA) en DMEM durante una hora, lavados con PBS 1X, fijados con formalina neutra e incluidos en parafina para obtener cortes histológicos seriados de 5 µm. Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio confocal, empleando un láser de excitación de 594 nm, una emisión de 633 nm y el programa LSM 510.

RESULTADOS

Características histológicas del corazón cultivado *in ovo*

El corazón del embrión de pollo en estadios 16-17HH cultivado *in ovo* mostró la pared miocárdica ventricular relativamente

delgada, conformada por 2 a 3 células de grosor y cubiertas internamente por endocardio (Figura 1 A-B). Doce horas más tarde (estadio 18HH), la región ventricular presentó una delgada capa compacta y pequeñas protuberancias de miocardio rodeadas de endocardio que se proyectaban a la luz ventricular, denominadas esbozos trabeculares (Figura 1 C-D).

Condiciones de órgano cultivo

Los corazones de estadio 16-17HH cultivados *in vitro* por 12 horas tuvieron una organización tisular diversa, dependiendo de la cantidad de SFB adicionado (Figura 2). Los controles cultivados en medio DMEM sin SFB no aumentaron de tamaño. Sin embargo, aunque su pared miocárdica ventricular incrementó de grosor, era poco compacta y presentaba pequeños espacios libres de miocitos en la superficie opuesta al endocardio. No se llegaron a organizar esbozos trabeculares individuales (Figura 2 A-A'). El SFB produjo crecimiento del corazón e incremento del grosor de la pared miocárdica ventricular (con escasa compactación y mayor desorganización al incrementar la concentración del SFB) (Figura 2 B-B', C-C', D-D').

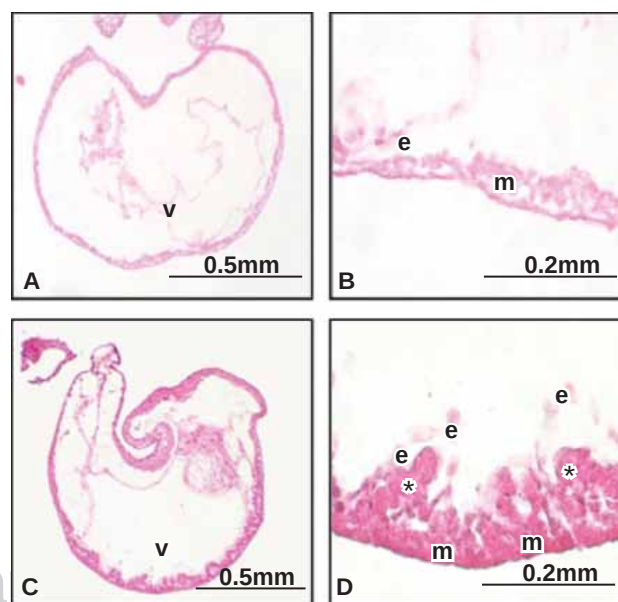


Figura 1. Características morfohistológicas del corazón en estadio 16HH (72 horas de incubación) y 18HH (3-4 días de incubación). **A-B.** Estadio 16HH. Se observa en la región ventricular del corazón (v) la pared plana de miocardio (m), con 2 a 3 células de espesor. **C-D.** Estadio 18HH. La región ventricular del corazón está conformada por miocardio compacto (m) y pequeños esbozos trabeculares (*) cubiertos por endocardio (e).

Inducción con NRG1 α/β exógena

El corazón en estadio 16-17HH cultivado en DMEM libre de SFB —empleado como control para analizar el posible proceso inductivo de NRG1 sobre el miocardio ventricular cuando se cultivó por 12 o 24 horas— fue capaz de desarrollar incipientes esbozos trabeculares delimitados por endocardio (Figura 3 A-B). Sin embargo, al prolongar el período de incubación hasta 36 horas, los esbozos mostraron una incipiente desorganización histológica y pérdida de la individualidad (Figura 3C). Al adicionar NRG1 exógena (Heregulin beta 1), previa inhibición de su actividad endógena, se encontró que la menor concentración empleada (5 ng) en cultivos de 12 horas no fue suficiente para inducir crecimiento del tamaño del corazón; tampoco afectó el grosor de la pared miocárdica ventricular ni la trabeculogénesis (Figura 3D). A las 24 horas de incubación, no creció el corazón ni incrementó el grosor de la pared compacta ventricular, pero se observaron incipientes esbozos trabeculares bastante bien organizados (Figura 3E). Sin embargo, al prolongar el cultivo hasta 36 horas, los corazones mostraron una pared ventricular completamente desorganizada en la que no se distinguió ni el miocardio compacto ni esbozos trabeculares (Figura 3F). La concentración media de NRG1 (10 ng) en los cultivos de 12 horas fue suficiente para inducir no solamente un crecimiento en el tamaño del corazón con un notable aumento de grosor de la pared miocárdica, sino también provocó trabeculogénesis incipiente, con esbozos trabeculares mejor organizados en los cultivos de 24 horas (Figura 3 G-H). En contraste, a las 36 horas, aunque incrementó el tamaño

del corazón y el grosor de la pared compacta ventricular, no se notaron trazos de esbozos trabeculares (Figuras 3I). Finalmente, todos los cultivos adicionados con 20 ng de NRG1 generaron corazones con nula trabeculogénesis. En este caso, el miocardio ventricular compacto tenía varias capas de grosor, que se diferenciaban del miocardio en contacto directo con la luz ventricular, relativamente laxo y completamente desorganizado (Figura 3 J-K). En los cultivos de 36 horas, la pared compacta fue poco menos gruesa (Figura 3L).

Importancia de NRG1 en la proliferación y apoptosis del miocardio ventricular

Con la finalidad de determinar si la NRG1 está involucrada en la regulación de la proliferación y apoptosis durante la formación de los esbozos trabeculares y el incremento en el grosor de la pared miocárdica ventricular, se llevaron a cabo experimentos de inducción de la actividad de NRG1. Después de 12 horas, se evaluó la actividad cíclica empleando PCNA y la apoptosis mediante marcaje con LTR. Los corazones cultivados con DMEM sin SFB mostraron características histológicas similares a las descritas previamente. Además, manifestaron alta positividad a PCNA y prácticamente nulo marcaje de LTR (Figura 4 A-D). En cambio, en los corazones en los que se inhibió parcialmente la función de NRG1 endógena, además de presentar escasa trabeculogénesis, se redujo severamente la actividad cíclica de las células y comenzaron a manifestarse algunos focos de apoptosis (Figura 4 E-H). En contraste, cuando se inhibió totalmente la actividad de NRG1

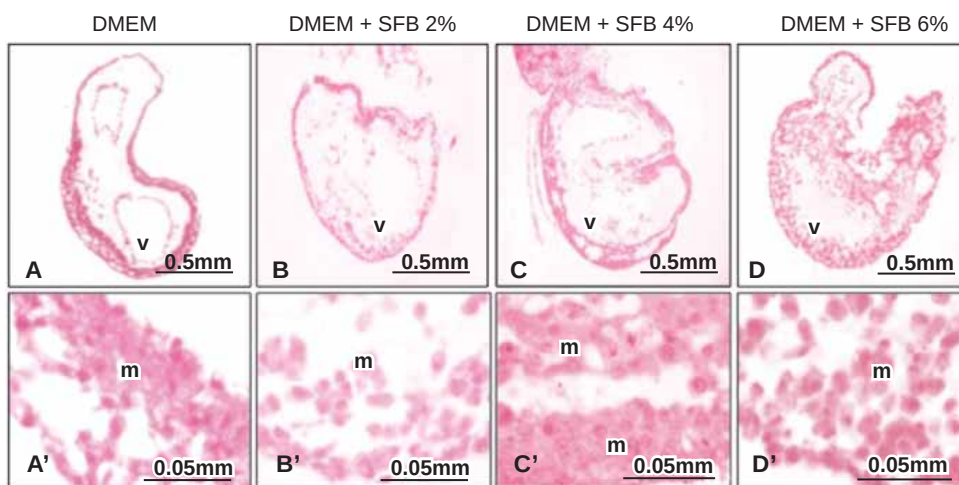


Figura 2. Efecto del suero fetal bovino (SFB) adicionado al medio de cultivo DMEM en condiciones de órgano-cultivo por 12 horas sobre las características morfohistológicas de la región trabeculada ventricular (v) del corazón de pollo de estadio 16HH. Micrográficas adquiridas a 20x (A-D) y 40x (A'-D'). Se observa que el grosor de la pared y la desorganización de los miocitos (m) incrementan conforme aumenta la concentración de suero. No se distingue la presencia de endocardio.

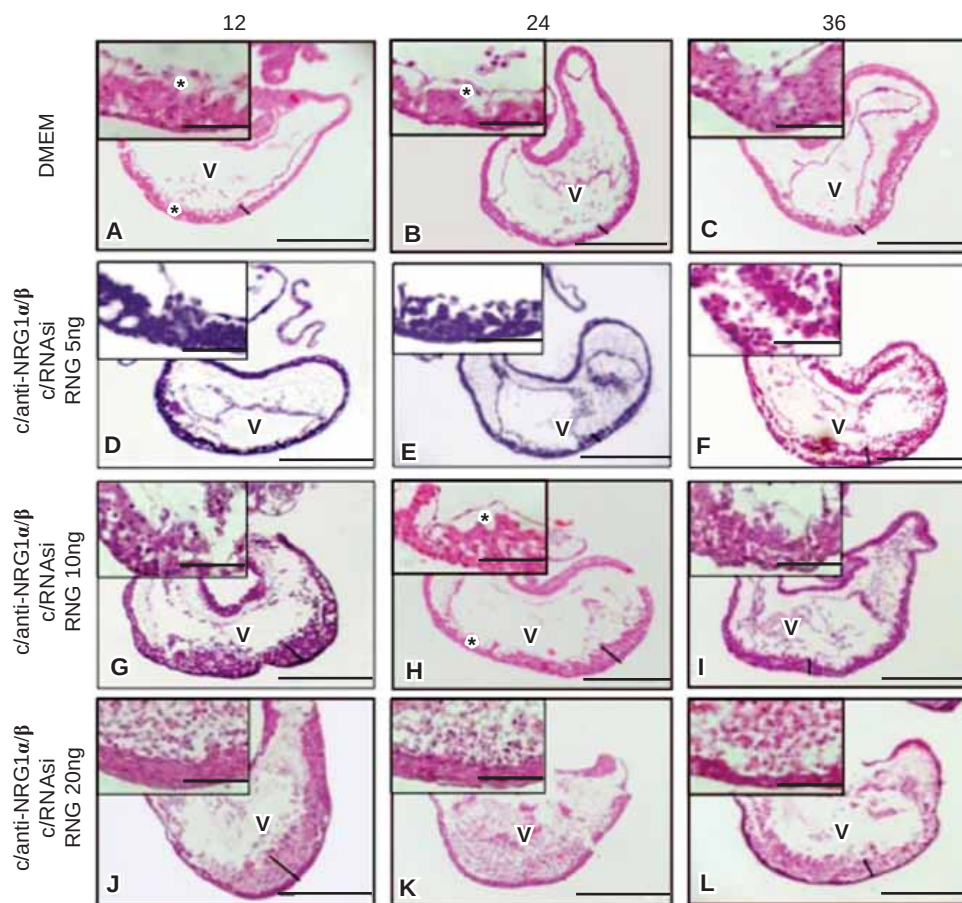


Figura 3. Efecto de NRG1 en la trabeculogénesis (*). Corazones de embrión de pollo en estadio 16HH, previamente tratados con anti-NRG1 y siRNA para inhibir totalmente la actividad de la proteína endógena, fueron incubados con diferentes concentraciones de NRG1 exógena por 12, 24 o 36 horas. Los recuadros muestran una amplificación de las características morfológicas de la región ventricular (V); la línea negra señala los cambios de grosor de la pared. **A-C.** Control sin tratamiento. **D-E.** Se observa que 5 ng de NRG1 por tiempos cortos no promueven cambios considerables. **F.** Pared ventricular completamente desorganizada, en la que no se distinguió ni el miocardio compacto ni esbozos trabeculares. **G.** Se observa que a 10 ng por 12 horas se induce un crecimiento en el tamaño del corazón con un notable aumento de grosor de la pared miocárdica. **H.** 10 ng de NRG1 por 24 horas son suficientes para promover trabeculogénesis (*). Se pueden distinguir incipientes esbozos de miocardio (m) cubiertos por endocardio (e). **I-L.** El incremento en la concentración de la proteína y mayor tiempo de incubación favorecen la proliferación de los miocitos cardíacos, pero no la trabeculogénesis. Barra recuadros = 0.2 mm, fotos panorámicas = 0.5 mm.

adicionando simultáneamente anti-NRG1 y siRNA, no se notaron indicios de trabeculogénesis ni actividad ciclica del miocardio. Sin embargo, el marcaje de LTR mostró un incremento notable (Figura 4 I-L). Finalmente, al adicionar 10 ng de NRG1 exógena a los cultivos previamente inhibidos, se apreciaron indicios de trabeculogénesis acompañados de elevada positividad al PCNA y prácticamente nulo marcaje de LTR (Figura 4 M-P).

DISCUSIÓN

Los esbozos trabeculares comienzan a formarse poco después que ha concluido el proceso de torsión y plegamiento cardíaco, es decir, alrededor del estadio 16-17HH en el corazón de embrión de pollo.^{3,4,19} Inicialmente, el miocardio trabeculado ventricular sirve tanto para incrementar la oxigenación del tejido cardíaco previo a la formación de las arterias coronarias como para separar el flujo san-

guíneo en las cámaras cardiacas antes de que se forme el TI-V. Así mismo, en la actualidad se ha documentado el papel que juegan las trabéculas en el desarrollo del TI-V.^{5,6} En los casos extremos en que no se forman las trabéculas o su desarrollo es deficiente, se afecta directamente la cardiogénesis temprana y se provoca la muerte prematura del embrión o bien, si se altera la morfogénesis del TI-V se originan defectos septales ventriculares. De ahí la importancia de conocer las redes moleculares que regulan la trabeculogénesis. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se planteó como objetivo determinar el papel de NRG1 en la trabeculogénesis y su posible función en la regulación de la proliferación celular y apoptosis del miocardio ventricular, procesos indispensables en el desarrollo de trabéculas y TI-V.

Inicialmente, se implementó un modelo de órgano-cultivo del corazón de embrión de pollo en estadio 16-17HH *in vitro*, por ser la etapa en la que aún no existen

esbozos trabeculares. En esta etapa fue posible analizar el efecto inductivo de NRG1 en la trabeculogénesis. Se notó que el corazón cultivado en DMEM sin SFB, manifestó un retraso de aproximadamente 6 horas respecto de lo que ocurre *in ovo* y conservó la estructura y características citodinámicas similares a las del corazón en estadio 17HH, cuando se observaron los primeros indicios de trabeculogénesis (Figura 2 A-A'). En contraste, el SFB adicionado al órgano-cultivo, en concordancia con lo reportado en la literatura, tuvo un efecto mitogénico en los miocitos cardíacos ventriculares.^{20,21} No obstante, provocó un crecimiento descompensado del corazón y ocasionó pérdidas de compactación y extrema desorganización del miocardio de la pared ventricular. Estos resultados indicaron un efecto negativo de SFB en la trabeculogénesis, hecho que

determinó que en los cultivos de los ensayos de inducción de la actividad de NRG1 no se empleara SFB.

Una vez establecido el modelo de órgano-cultivo, se analizó el efecto de la NRG1 α/β exógena. Por tanto, primero se inhibió la actividad endógena de la proteína, así como la síntesis de nueva proteína adicionando al medio un anticuerpo primario y un siRNA específicos. Se observó que las concentraciones bajas de NRG1 exógena (5 ng/ml) y los tiempos cortos de cultivo (12 horas) no son suficientes para inducir la formación de los esbozos trabeculares (Figura 3 D-F). Así mismo, las concentraciones altas de NRG1 exógena (20 ng/ml) generaron, desde un principio, el crecimiento elevado del corazón, pero con una evidente desorganización celular. Además, no se formaron trabéculas delimitadas por endocardio; en su lugar se observaron

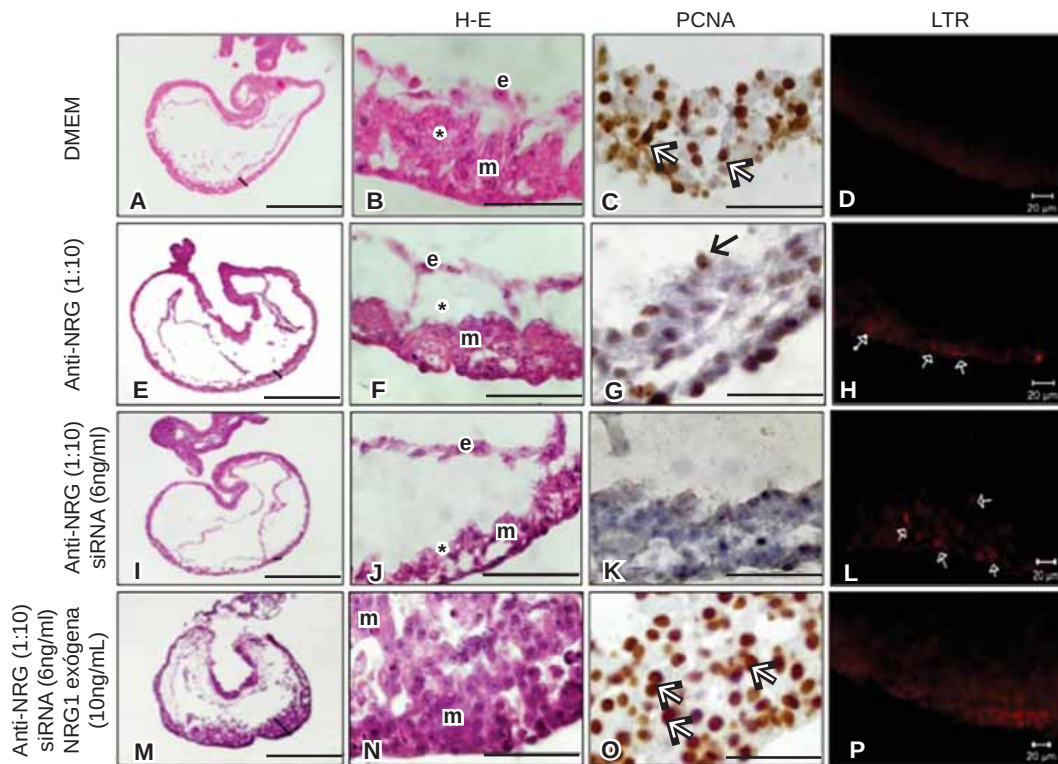


Figura 4. Implicación de NRG1 en la proliferación y apoptosis de miocitos ventriculares al inicio de la trabeculogénesis. **A-D.** Órgano-cultivo de corazón en estadio 16-17HH con DMEM por 12 horas que manifiesta inicio de trabeculogénesis (**A-B**) actividad cíclica (**C**) y ausencia de miocitos apoptóticos (**D**). **E-H.** Inhibición parcial de la actividad de NRG1 con pobre trabeculogénesis (**E-F**), disminución de actividad cíclica de miocitos (**G**) y escasos focos apoptóticos (**H**). **I-L.** Inhibición total de la actividad de NRG1, provoca trabeculogénesis casi nula (**I-J**), escasa actividad cíclica de miocitos ventriculares (**K**), con ligero incremento de focos apoptóticos (**L**). **M-P.** La adición de NRG1, favorece crecimiento de paredes de cámaras ventriculares (v) sin llegar a formar incipientes esbozos trabeculares (**M-N**), a través del incremento de la actividad cíclica de los miocitos (**O**) y reducción de muerte celular (**P**). Flechas en negro muestran núcleos positivos al antígeno de proliferación (PCNA). Flechas en blanco señalan focos apoptóticos detectados por LTR. * = zonas de trabeculogénesis. Barra fotos panorámicas = 0.5 mm; ampliificaciones = 0.2 mm.

abundantes miocitos altamente desorganizados (Figura 3 J-L). Respecto de los cultivos adicionados con 10 ng/ml de NRG1, se observó que el corazón incrementó en tamaño y conservó su morfología. La pared miocárdica, además de manifestar alta actividad cíclica, mostró esbozos trabeculares en desarrollo que mantenían su individualidad; sin embargo, dicha característica se perdió al cultivar el corazón por más de 24 horas (Figura 3 G-I). Estos resultados permitieron concluir, en concordancia con los resultados de Gassmann y colaboradores y Lee y colaboradores en ratones *knockout*,^{12,13} que la NRG1 a concentraciones intermedias puede tener un efecto inductor de la trabeculogénesis inicial, aunque no parece estar involucrada en el desarrollo ulterior de las trabéculas, pues su efecto se redujo en los cultivos que duraron más de 24 horas. Otra posibilidad es que la capacidad inductora de NRG1 en la trabeculogénesis dependa de la actividad sinérgica de esta proteína con el factor de crecimiento similar a la insulina, también secretado por el endocardio, como lo sugirieron inicialmente Herting y colaboradores²² y, recientemente, Li y colaboradores.²³

La adición excesiva de NRG1 no provocó mayor trabeculogénesis, aunque sí incrementó la actividad mitótica del miocardio. Estos hallazgos permiten suponer que el exceso de NRG1 provoca un desequilibrio molecular, que sobrepasa la capacidad morfogenética del miocardio para formar las trabéculas, y privilegia la proliferación desordenada.

El análisis de la actividad cíclica mediante la inmunodetección de PCNA y la apoptosis por LTR en el órgano-cultivo de corazones en estadio 16-17HH reveló que la actividad cíclica del miocardio disminuye cuando se inhibe la función de NRG1, parcial o totalmente, mientras que la muerte celular se incrementa (Figura 4G, H, K, L). En contraste, cuando se indujo la sobreexpresión de NRG1 se notó una elevada actividad mitótica y nula apoptosis (Figura 4 O-P). Estos resultados concuerdan con lo observado en cultivos primarios de cardiomiocitos de neonatos por Zhao y Lemke, quienes concluyeron que la NRG1 induce la proliferación del miocardio y protege contra la apoptosis.¹⁴

Los hallazgos de este trabajo muestran un papel importante de NRG1 en el inicio de la trabeculogénesis promoviendo, además de la proliferación del miocardio, una actividad protectora contra la apoptosis. Sin embargo, es importante resaltar que el exceso de NRG1 provoca un desequilibrio molecular que puede privilegiar la proliferación

del miocardio sobre la morfogénesis inicial de las trabéculas ventriculares. De esta manera, el entendimiento del papel de NRG1 y su desregulación durante la cardiogénesis temprana —ya sea por exceso o carencia— continúa siendo una prioridad de la investigación básica para aportar datos que permitan conocer las redes moleculares involucradas en la trabeculogénesis y ulterior desarrollo del TI-V.

AGRADECIMIENTOS

A la técnica Lucía Lima García, por su apoyo en las técnicas histológicas.

Al Financiamiento Fondos Federales Institucionales HIM/20007/006.

Al Programa de Becas de inicio a la Investigación (PROBEI), que otorgó una beca a Arlett Del Olmo de agosto del 2008 a diciembre de 2009.

Autor de correspondencia:

Dra. en C. Concepción Sánchez Gómez

Correo electrónico: csgomez_2000@yahoo.com

REFERENCIAS

1. Libby P, Bonow RO, Zipes DP, Mann DL, Braunwald E. Braunwald. Tratado de Cardiología. Texto de Medicina Cardiovascular. Madrid: Elsevier; 2009.
2. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Nelson Tratado de Pediatría. Madrid: Elsevier Health Sciences Spain; 2012.
3. Icardo JM, Fernandez-Terán A. Morphologic study of ventricular trabeculation in the embryonic chick heart. *Acta Anat (Basel)* 1987;130:264-274.
4. De la Cruz MV, Castillo MM, Villavicencio L, Valencia A, Moreno-Rodríguez RA. Primitive interventricular septum, its primordium, and its contribution in the definitive interventricular septum: in vivo labeling study in the chick embryo heart. *Anat Rec* 1997;247:512-520.
5. Contreras-Ramos A, Sánchez-Gómez C, García-Romero HL, Cimarosti LO. Normal development of the muscular region of the interventricular septum. I. The significance of the ventricular trabeculations. *Anat Histol Embryol* 2008;37:344-351.
6. Contreras-Ramos A, Sánchez-Gómez C, Fierro-Pastrana R, González-Márquez H, Acosta-Vázquez F, Arellano-Galindo J. Normal development of the muscular region of the interventricular septum. II. The importance of myocardial proliferation. *Anat Histol Embryol* 2009;38:219-228.
7. Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:866-880.

8. Elenius K, Corfas G, Paul S, Choi CJ, Rio C, Plowman GD, et al. A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem* 1997;272:26761-26768.
9. Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G. Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 1997;19:39-50.
10. Longart M, Buonanno A. Neuregulins: a family of factors with critical functions during nervous system development and in the cellular transformation and differentiation. *Rev Neurol* 2002;34:91-97.
11. Okoshi K, Nakayama M, Yan X, Okoshi MP, Schuldt AJ, Marchionni MA, et al. Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation* 2004;110:713-717.
12. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, et al. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 1995;378:390-394.
13. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995;378:394-398.
14. Zhao JJ, Lemke G. Selective disruption of neuregulin-1 function in vertebrate embryos using ribozyme-tRNA transgenes. *Development* 1998;125:1899-1907.
15. Smith TK, Bader DM. Signals from both sides: control of cardiac development by the endocardium and epicardium. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18:84-89.
16. Crone SA, Zhao YY, Fan L, Gu Y, Minamisawa S, Liu Y, et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2002;8:459-465.
17. García-Rivello H, Taranda J, Said M, Cabeza-Meckert P, Vila-Petroff M, Scaglione J, et al. Dilated cardiomyopathy in Erb-b4-deficient ventricular muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1153-H1160.
18. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951;88:49-92.
19. Sedmera D, Pexieder T, Hu N, Clark EB. Developmental changes in the myocardial architecture of the chick. *Anat Rec* 1997;248:421-432.
20. Brooks RF. Regulation of fibroblast cell cycle by serum. *Nature* 1976;260:248-250.
21. Larsson O, Zetterberg A, Engström W. Consequences of parental exposure to serum-free medium for progeny cell division. *J Cell Sci* 1985;75:259-268.
22. Herting RL Jr, Asaro PV, Roth AC, Barnes MR. Using external data sources to improve audit trail analysis. *Proc AMIA Symp* 1999:795-799.
23. Li P, Cavallero S, Gu Y, Chen TH, Hughes J, Hassan AB, et al. IGF signaling directs ventricular cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development. *Development* 2011;138:1795-1805.