



UNAM

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**ESTUDIO HISTOLOGICO DE LA PARED DEL CONO
ANTERIOR Y DEL TRONCO DURANTE LA EMBRIOGENESIS DEL
INFUNDIBULO DEL VENTRICULO DERECHO EN EL CORAZON DE
EMBRIONES DE POLLO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

PLIEGO PLIEGO LILIANA YANET



FES - IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN SÁNCHEZ GÓMEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo se llevo a cabo en el Departamento de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

DEDICATORIA

A MIS PADRES EVERARDO Y JUANA QUE HAN
GUIADO MIS PASOS PARA PODER LOGRAR CADA UNO
DE MIS SUEÑOS APOYÁNDOME HASTA EL ÚLTIMO
MOMENTO Y A QUIENES DEBO TODO LO QUE SOY.

A MIS HERMANOS HUGO Y MAYTE POR TODO LO QUE
HEMOS VIVIDO JUNTOS Y POR LO QUE NOS FALTA .

AGRADECIMIENTOS

...

A la Dra. Concepción Sánchez Gómez, por su dirección en la realización del presente trabajo, por su amistad y entusiasmo para sembrar en mí la pasión por la embriología cardíaca.

A la M.C. Alejandra Contreras Ramos, por todos los consejos brindados para la mejora de este trabajo pero sobre todo por su amistad.

A mis revisores de tesis. M.C. Bertha Segura, M.C. Rodolfo Cárdenas, M.C. Mónica Chávez y Biol. Carmen Álvarez.

Al personal del Departamento de Biología del desarrollo y Teratogenesis Experimental del hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Dr. Manuel Arteaga, Dra. Isabel García y M.C. Laura Villavicencio por las facilidades brindadas para la utilización de su equipo de cómputo.

A la Q.F.B. Marcela Salazar y a los técnicos Lidia Blancas y Oswaldo Aguirre por el apoyo brindado en la parte histológica.

A los técnicos Lucía Lima y Inés Jurado por su amistad, consejos y regaños nunca los olvidare.

Al Fotógrafo Mario Jáuregui por la dedicación para la obtención de mejores imágenes.

A mis amigos Biol. Gabriela Dávila, Sonia Cruz, Miguel A. Munguía por todo lo que compartimos durante la carrera.

Y a todas aquellas personas que sin su apoyo y ayuda no hubiera sido posible la consumación de esta meta.

INDICE	PAG
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES ANATÓMICOS	1
ANTECEDENTES EMBRIOLÓGICOS	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y METODO	21
RESULTADOS ANATOMICOS	25
RESULTADOS HISTOLOGICOS	35
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	59
LITERATURA CITADA	60
ANEXOS	65

INDICE DE ILUSTRACIONES Y FIGURAS

INDICE DE ILUSTRACIONES Y FIGURAS

ILUSTRACIONES	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Ilustración 1	Diseción del Ventrículo Derecho del corazón de embrión de pollo en el estadio 22HH.	4
Ilustración 2	Segmentos Cardiacos Primitivos	13
Figura 1	Microfotografía Electrónica de Barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 22HH.	28
Figura 2	Microfotografía Electrónica de Barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 24HH.	29
Figura 3	Microfotografía Electrónica de Barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 26HH.	30
Figura 4	Microfotografía Electrónica de Barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 28HH.	31
Figura 5	Microfotografía Electrónica de Barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 30HH.	32
Figura 6	Microfotografía Electrónica de Barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 36HH.	33
Figura 7	Histología de la pared del Tronco, Cono y Ventrículo (TS), en el corazón de embriones de pollo en el estadio 22HH.	41
Figura 8	Histología del Saco Aórtico en el corazón de embriones de pollo en el estadio 24HH..	42
Figura 8	Histología de la pared del Tronco, Cono y Ventrículo , en el corazón de embriones de pollo en el estadio 24HH.	43
Figura 10	Histología de la pared Tronco, Cono y Ventrículo, en el corazón de embriones de pollo en el estadio 26HH.	44
Figura 11	Histología del Tronco, en el corazón de embriones de pollo en el estadio 26HH.	46
Figura 12	Histología de la pared del Saco Aórtico, Tronco, Cono y Ventrículo , en el corazón de embriones de pollo en el estadio 28HH.	47
Figura 13	Histología del Tronco, en el corazón de embriones de pollo en el estadio 28HH.	48
Figura 14	Histología del anillo de inserción de la válvula pulmonar y el Tronco de la Aorta en el corazón de embriones de pollo en el estadio 30 HH.	49
Figura 15	Histología del tracto de salida en el corazón de embriones de pollo en el estadio 30HH.	50
Figura 16	Histología de las ramas de la Aorta , Tronco de la Arteria Pulmonar, Válvula Pulmonar y el TS, en el corazón de embriones de pollo en el estadio 36HH.	51

RESUMEN

El tracto de salida del ventrículo derecho, se llama infundíbulo debido a que sus paredes son musculares; de él surge la arteria pulmonar. Respecto a la embriogénesis de los tractos de salida ventriculares y las regiones proximales ó troncos de las grandes arterias se ha descrito que el Cono y el Tronco son los componentes que participan en su morfogénesis. Ambas estructuras están cubiertas por una pared miocárdica, son adyacentes entre sí, tienen un origen común, de células que se integran paulatinamente al extremo cefálico del corazón. Al inicio de su desarrollo no existe un límite de demarcación que permita distinguirlos. Estudios experimentales han demostrado que el cono anterolateral se integra a su ventrículo correspondiente debido al crecimiento diferencial de este último y que su pared anterior da origen a la pared ventral del infundíbulo. Respecto al destino prospectivo del tronco, existe gran controversia, algunos autores suponen que debido a que el tronco origina las regiones proximales (troncos) de las grandes arterial, su pared se transforma en músculo liso de pared arterial. Otros investigadores sugieren que solo forma las válvulas pulmonar, lo que implica que su pared se transforma en fibroblastos de tejido conectivo. Debido a esa falta de acuerdo, como un primer acercamiento para distinguir cuál de los dos procesos de transformación celular sucede, se estudiaron las características anatómicas del corazón embrionario desde el estadio 22HH hasta el 36HH. mediante microscopia electrónica de barrido y las histológicas de la pared del cono y el tronco, en el corazón de embriones de pollo previamente marcados en el estadio 22HH en los límites conales, rastreando los cambios en diferentes etapas del desarrollo, hasta el estadio 36HH, en la que es posible definir el destino prospectivo de las estructuras del corazón embrionario. Los estudios anatómicos mostraron los cambios del cono y el tronco, confirmaron el crecimiento diferencial del ventrículo y demostraron que los surcos conoventriculares no son un buen parámetro para distinguir al cono del ventrículo. Lo mismo sucede con el sitio en el que el tubo cardiaco cambia de una dirección caudo-cefálica a una ventro dorsal que tampoco corresponde al límite troncoconal. En los estudios histológicos

encontramos el límite entre las crestas del cono y las del tronco es un buen parámetro para distinguir estas dos estructuras, además en todos los estadios analizados, que la pared del tronco permanece formada por miocitos; a partir del estadio 30HH rodea el anillo de inserción y las sigmoideas de las válvulas de la arteria pulmonar y la aorta. Hacia el estadio 26HH los miocitos adyacentes al mesénquima de las crestas, pierden sus uniones y lo invaden, perdiendo la organización de las miofibrillas. Las crestas en su región proximal participan en el desarrollo del anillo valvular, mientras que en la distal intervienen en el desarrollo de las sigmoideas. En el estadio 24HH aparece el saco aórtico que da origen a la región proximal de las grandes arterias, cuya pared está formada por mesénquima, que más tarde a partir del estadio 30HH es invadido por células de músculo liso. Estas características nos permiten distinguir al tronco del saco aórtico. Basados estos resultados y en la demostración que el músculo liso de la pared del tronco de las grandes arterias se origina de células de la cresta neural concluimos que el miocardio del tronco se transforma en fibroblastos de tejido conectivo. Además describimos un modelo del desarrollo de los tractos de salida ventriculares y los troncos de las grandes arterias, señalando sus componentes embrionarios, la etapa en la que aparecen y sus límites. Nuestros resultados son útiles para iniciar análisis del proceso de transdiferenciación de la pared miocárdica del tronco en fibroblastos a nivel ultraestructural y molecular.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El infundíbulo del ventrículo derecho es una de las tres regiones anatómicas que forman esta cavidad cardiaca, de él surge la arteria pulmonar. Sin embargo debido a la importancia que tiene el conocimiento preciso de la anatomía de un órgano en el abordaje de su desarrollo ontogenético y considerando la utilidad de los resultados obtenidos en este trabajo, usando el corazón del embrión del pollo, en la valoración de los conocimientos que existen al respecto en el humano, la introducción se dividió en dos secciones. En la primera se analizan con gran detalle las características anatómicas e histológicas del corazón mientras que en la segunda se estudia el desarrollo embrionario, comparando ambos tipos de organismos.

Antecedentes Anatómicos e Histológicos

El corazón de aves y mamíferos es un órgano formado por cuatro cavidades: dos atrios y dos ventrículos, en cada caso uno es derecho y el otro izquierdo. Así, la sangre venosa de todo el organismo ingresa a través de las venas cavas (humano) ó directamente por el seno venoso (pollo) al atrio derecho, quien la transfiere al ventrículo derecho (VD), éste último la impulsa hacia los pulmones por la arteria pulmonar. Por otro lado, el atrio izquierdo recibe la sangre oxigenada que llega desde los pulmones por las venas pulmonares, la pasa al ventrículo izquierdo (VI) quien la bombea hacia la arteria aorta, que al ramificarse la distribuye a todo el cuerpo¹.

Los ventrículos a pesar de ser unidades funcionales, están constituidos por tres regiones anatómicas bien definidas^{2,3}, cada una con un origen embrionario distinto^{4,5}. Dichas regiones son:

1. Tracto de entrada, corresponde a la región atrioventricular (A-V), regulada por las válvulas atrioventriculares. La del VD es diferente en ambos modelos biológicos, en mamíferos se denomina tricúspide porque consta de tres valvas. En el pollo se ha reconocido la presencia de una gran valva de tipo muscular, dividida en dos regiones que se insertan a la pared libre ventricular mediante un músculo

papilar, pero carece de cuerdas tendinosas; existen además pequeñas valvas fibrosas que se insertan directamente en el tabique interventricular⁶. En el hombre y el pollo la válvula A-V izquierda es similar, en ambos se denomina mitral por estar constituida por dos valvas principales. La posterolateral se inserta en la pared libre de la región trabeculada del VI mediante cuerdas tendinosas y músculos papilares. La anteroseptal tiene dos porciones, una se inserta en el tabique interventricular también mediante cuerdas tendinosas y músculos papilares; la otra región no tiene inserciones, es libre, constituye la continuidad mitroaórtica⁷ y corresponde a la pared fibrosa del tracto de salida del VI⁸. Ambos tractos de entrada se originan a partir de un segmento común denominado tracto de entrada primitivo⁷.

2. Región trabeculada, es la que lleva a cabo la función de bombeo. En ambos ventrículos son muy similares en los dos grupos de vertebrados. La del VD tiene menor cantidad de trabéculas, las cuales son más gruesas y su aspecto es menos rugoso en comparación con el ventrículo izquierdo, que tiene múltiples trabéculas muy delgadas y el aspecto de sus paredes es rugoso^{2,3,9}. La región trabeculada de cada ventrículo tiene un primordio independiente^{4,5}.

3. Tracto de salida, es la región que conecta a los ventrículos con su arteria correspondiente; del derecho emerge la pulmonar y del izquierdo la aorta. Los tractos de salida están regulados por las válvulas arteriales, la derecha es la pulmonar y la izquierda la aórtica^{3,8}. En el VI el tracto de salida se llama vestíbulo porque consta de una pared muscular y otra es fibrosa (continuidad mitroaórtica)³, mientras que en el VD se denomina infundíbulo porque son musculares sus tres paredes (anterior ó ventral, izquierda, mal denominada septal y la cresta supraventricular)^{8,10}. Estas estructuras del corazón maduro se originan de un primordio común denominado cono^{8,11}.

Desde el punto de vista anatómico, ambos tractos de salida tienen un límite ventricular y otro arterial. En el caso del infundíbulo del VD, el límite ventricular ó caudal corresponde al borde libre de la cresta supraventricular y el arterial ó cefálico es el anillo de inserción de la válvula pulmonar^{8,10} (Ilustración 1)

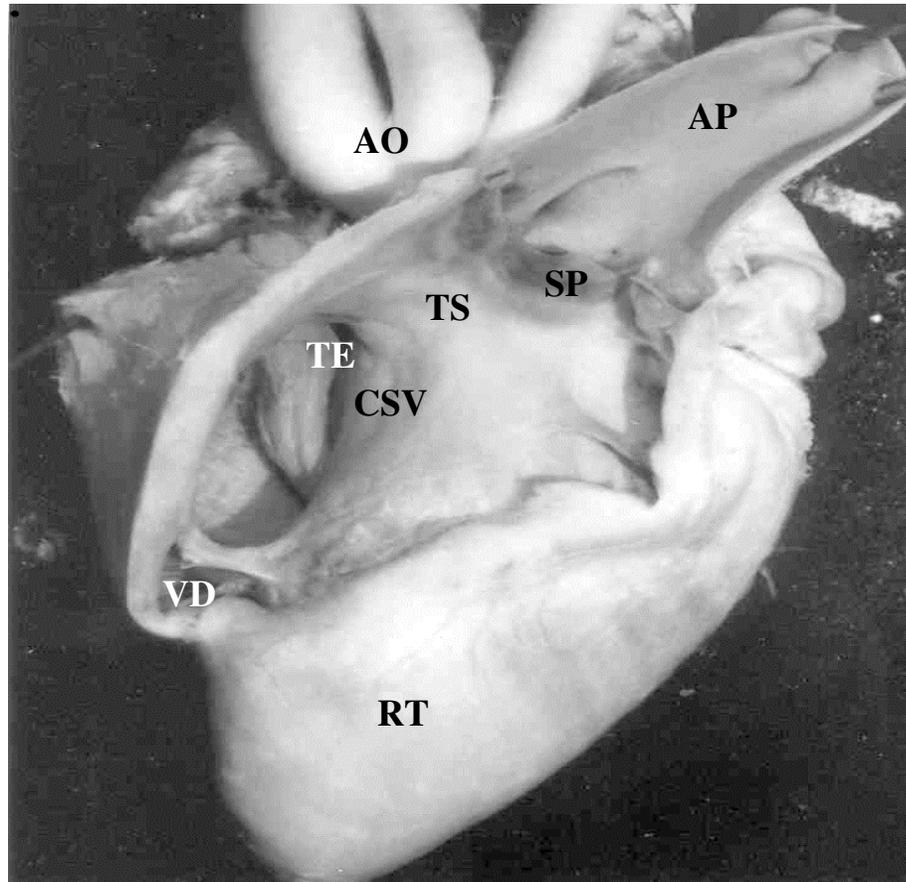


Ilustración 1.- Disección del ventrículo derecho mostrando las diferentes regiones anatómicas en las que se ha dividido. TE= Tracto de entrada, RT= Región trabeculada, TS= Tracto de salida, CSV= Cresta supraventricular; SP= Sigmoides pulmonares VD= Ventrículo derecho, VI= Ventrículo izquierdo, Ao= Arteria aórtica.

Los límites del vestíbulo del VI son la proyección de la inserción de la cresta supraventricular y el anillo de inserción de la válvula aórtica⁸. Los aparatos valvulares que regulan el infundíbulo y el vestíbulo, son más sencillos que las válvulas A-V, carecen de cuerdas tendinosas y músculos papilares. Constan de un anillo de inserción y tres cúspides ó valvas denominadas semilunares ó sigmoideas. Cada una de ellas presenta una inserción en forma de media luna, localizada en la unión de la cámara de salida ventricular con su arteria correspondiente. Cada extremo distal de una inserción semilunar contacta con el extremo distal de la inserción adyacente dando origen a los espacios intervalvulares ó comisuras; de esta manera se forman tres bolsas valvulares ó senos de Valsalva¹².

Histológicamente el corazón se compone por una cubierta interna formada por el Endocardio, el tejido contráctil que es el miocardio y una cubierta externa llamada Epicardio, todos ellos soportados por tejido conectivo. El endocardio forma el revestimiento interno de las cavidades auriculares y ventriculares; recubre todas las estructuras que se proyectan en el interior del corazón (válvulas, cuerdas tendinosas y músculos papilares), está formado por células fusiformes de núcleos grandes, redondos y oscuros, que se continúan con el endotelio de los vasos sanguíneos que entran y salen del corazón. Inmediatamente por debajo del endotelio existe una capa fina de colágena y elástica con escasos fibroblastos y otra de tejido conectivo más denso, rico en fibras elásticas, que contiene un número variable de células musculares lisas y constituye el mayor espesor del endocardio. Una capa subendocárdica de tejido conectivo laxo une al endocardio con el miocardio, mezclándose con el endomicio (membrana basal de las células miocárdicas). Este tejido conectivo laxo contiene pequeños vasos sanguíneos, nervios y haces de fibras del sistema de conducción cardíaca¹³.

El miocardio ó músculo cardíaco está compuesto por células musculares estriadas (miocitos) rodeadas por tejido conectivo. Las células miocárdicas son alargadas y bifurcadas en uno de sus extremos, lo que le confiere la forma de un pantalón.

Cada una posee un solo núcleo central grande y ovalado, una membrana limitante (sarcolema) y numerosas miofibrillas contráctiles separadas por diferentes cantidades de sarcoplasma. Los miocitos están unidos entre sí por los discos intercalares formando fibras que están separadas unas de otras por espacios intercelulares que contienen pequeñas cantidades de colágena, fibroblastos y numerosos capilares. Las fibras se ramifican y forman redes continuas de células miocárdicas que se agrupan y forman haces paralelos, oblicuos o transversales. En el citoplasma de las células miocárdicas (sarcoplasma), están presentes los diferentes orgánulos, siendo las mitocondrias muy abundantes, posiblemente porque las necesidades energéticas de este músculo son muy grandes. Las unidades de contracción de las células miocárdicas son las miofibrillas que se organizan formando sarcomeras^{13,14}.

El epicardio es la capa más externa de la pared cardiaca, su grosor varía según la parte del corazón que recubre, es más amplio al nivel de los surcos A-V. Está constituido por tejido conectivo fibroelástico, revestido en ambas caras (miocárdica y pericárdica) por células mesoteliales que en cada caso forman una capa de una célula de grosor con escaso citoplasma y un núcleo central pequeño muy oscuro. El tejido fibroelástico subyacente más superficial es de tejido conectivo ordinario y contiene algunos capilares sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas. La capa más profunda contiene vasos sanguíneos de mayor calibre y es más rica en grasa¹³.

El corazón así protegido, está rodeado de otra membrana fibroelástica, el pericardio, revestido también de un mesotelio. Entre el pericardio y el epicardio se encuentra la cavidad pericárdica que contiene un líquido seroso que lubrica las superficies y permite el movimiento del corazón libre de fricción durante las contracciones¹³.

Respecto a las válvulas arteriales, por sus características anatómicas, cada valva ó sigmoidea tiene dos caras (superficies) la axial³ ó ventricular¹² mira hacia la luz del vaso y la parietal hacia la pared del mismo. Histológicamente cada una de ellas muestra un armazón central (trama) de tejido conectivo fibroso ó capa fibrosa, revestida en ambas caras por tejido endotelial endocárdico, que en la cara ventricular es liso y en la parietal tiene una apariencia rugosa. La armazón central

de tejido conectivo consta de tres capas: ventricular, media y parietal. La primera es muy densa, con fibras en tres distintas orientaciones, las dos últimas son finas^{3,12}. En el borde libre de las valvas, la capa media desaparece y las laterales son extremadamente delgadas. Sin embargo, en la parte media del borde libre de cada cúspide, el tejido conectivo es más grueso, lo que permite que se formen unos engrosamientos ó nódulos que se observan cuando las válvulas están cerradas³. Los nódulos de la válvula pulmonar se denominan de Margagni y los de la aórtica de Arancio¹². El anillo de inserción de las válvulas arteriales, es de tejido conectivo en el que se insertan abundantes fibras musculares cardíacas, es importante señalar que Testut¹² describe la existencia de fibras musculares lisas adyacentes a la capa subendocárdica. Además se ha mencionado que el límite superior (cefálico) del miocardio ventricular no coincide exactamente con la zona de inserción de las cúspides. Según Langer (citado en 12), el origen valvular es más alto en el niño que en el adulto y no es adyacente al miocardio. Externamente en la superficie epicárdica, la zona que corresponde a los senos de Valsalva está rodeada de abundante grasa. Es importante señalar que las sigmoideas no son vascularizadas y no contienen fibras musculares.¹²

La aorta y la arteria pulmonar se consideran dentro del grupo de las arterias elásticas. Están constituidas por tres capas ó tunicas: íntima, media y adventicia. La íntima está formada por un epitelio fino escamoso que proporciona al vaso una capa lisa de revestimiento y una barrera parcialmente selectiva de difusión entre la sangre y las capas más externas de la pared vascular. El endotelio está separado de la elástica interna por tejido conectivo laxo que contiene escasos fibroblastos, raras células musculares lisas y fibras finas de colágena. La túnica media está constituida por múltiples láminas concéntricas, fenestradas de elastina que se alternan con capas finas de células musculares lisas orientadas circularmente y fibras de colágena y elastina inmersas en una matriz extracelular con un contenido abundante de proteoglicanos. Las laminas de elastina y los otros componentes extracelulares están ocultos por las células musculares lisas. La túnica adventicia es bastante delgada y se compone de tejido conectivo, que en su mayor parte contiene fibras de colágeno. La lámina elástica externa de la túnica adventicia al

igual que la membrana elástica fenestrada de la túnica media y la lamina elástica interna de la íntima no se diferencia de los demás componentes que las rodean^{13,15}. La adventicia y la porción externa de la túnica media contiene pequeños vasos sanguíneos y linfáticos, mientras que la región luminal de la pared vascular se nutre por difusión desde la luz, proceso facilitado por las fenestraciones de las membranas elásticas^{13,15}.

Antecedentes Embriológicos

La primera información que se obtuvo sobre los componentes embriológicos de los tractos de salida ventriculares y la región proximal de las grandes arterias (tronco) fue lograda en embriones humanos, a través de las técnicas descriptivas. Al respecto es importante el trabajo de Davis¹⁶, que estableció que el corazón en tubo recto estaba formado por las cavidades cardíacas primitivas y que cada una de ellas daba origen a una cavidad cardíaca definitiva. Según este autor, las cavidades cardíacas primitivas eran en sentido cefalocaudal: el bulbo aórtico, el *bulbus cordis*, el ventrículo primitivo y los atrios primitivos el derecho y el izquierdo y darían origen respectivamente a las grandes arterias, el ventrículo derecho, el ventrículo izquierdo y los atrios derecho e izquierdo definitivos. Es importante mencionar que Davis¹⁶ no hizo referencia al Cono ni a los tractos de salida ventriculares. Más adelante Kramer¹⁷ estudiando embriones humanos considera al Cono como parte del *bulbus cordis*, señala que da origen a los tractos de salida ventriculares y describe que en su interior existen dos crestas: la dextrodorsal y la sinistroventral, que al fusionarse forman el septum conal que lo divide en un cono anterolateral y otro posteromedial. Kramer¹⁷ también estudia la embriogénesis de las válvulas de las grandes arterias, describe que el sitio donde se desarrollan corresponde al límite entre el tronco y el cono y concluye que el tronco da origen a la región proximal o tronco de la aorta y la arteria pulmonar. El hecho de que este autor haya considerado al cono parte del *bulbus cordis* lleva implícito que aparece en el corazón en tubo recto, lo que fue aceptado por todos los embriólogos dedicados al estudio de la región tronco-conal tanto en los mamíferos como en las aves.

El advenimiento de técnicas de cultivo y marcaje *in vivo* e *in ovo* en el *Gallus domesticus* proporcionó un modelo biológico de estudio adecuado para investigar la cardiogénesis, por ser fácil de manipular, porque se pueden obtener embriones en cualquier etapa del desarrollo y además porque su corazón es similar al del embrión humano. Estos hechos llevaron a lograr la acción selectiva sobre las estructuras cardiacas en desarrollo, sin producir la muerte materno embrionaria, condición indispensable para el estudio de la embriogénesis de cualquier órgano, debido a que este proceso tiene como características esenciales ser progresivo, secuencial, ininterrumpido e irreversible. Usando este modelo y mediante este tipo de metodologías De la Cruz y colaboradores⁴ encontraron en el corazón en tubo recto (estadio 9) que al principio es una canal abierta dorsalmente, que solo está constituido por dos segmentos cardiacos primitivos; el cefálico es el primordio de la región trabeculada del VD y el caudal corresponde al primordio de la región trabeculada del VI, negando así lo establecido previamente por Davis¹⁶ en el embrión humano. Este mismo grupo de investigadores, también hallaron que conforme avanza el desarrollo, el canal se cierra y se forma un verdadero tubo⁴, además se van integrando al corazón nuevos segmentos cardiacos primitivos denominados así porque cada uno de ellos da origen a una región anatómica específica de una cavidad cardiaca definitiva^{4,18}. En el caso de los ventrículos participan tres segmentos: el primordio de la región apical trabeculada de cada ventrículo, el tracto de entrada primitivo y el cono^{4,18}.

Desde el punto de vista histológico, el tubo cardiaco primitivo cuando aparece (estadio 9) está compuesto por miocardio y endocardio, es decir es un manto mioendocardico, el epicardio aún no está presente. Las células miocárdicas (miocitos) contienen en su citoplasma escasas miofibrillas con distinto grado de organización, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, que son el testimonio de su gran actividad en la síntesis proteica. Entre el endocardio y el miocardio se encuentra una matriz extracelular amorfa, antiguamente denominada gelatina cardiaca¹⁶, que es elaborada tanto por las células miocárdicas como por las endocardicas. En la actualidad se considera que la matriz extracelular debido a su constitución química que incluye ácido hialurónico, heparina, sulfato de

condroitina, glucoproteínas y colágena de diferentes tipos, es uno de los elementos claves en la cardiogénesis inicial, pues juega un papel importante en la fusión de los dos tubos endocárdicos y en la curvatura y septación del corazón¹⁹.

Una vez establecido el corazón en tubo recto, el órgano comienza a cambiar de forma y constitución embrionaria debido al cierre de la canal y a la integración paulatina de nuevos segmentos, iniciándose el proceso de torsión y plegamiento²⁰.

El resultado de este proceso es que los diferentes segmentos cardiacos primitivos cambian de posición espacial y establecen nuevas relaciones entre sí, que determinan que la septación del corazón sea normal. La torsión y plegamiento del tubo cardiaco ocurre en un periodo largo del desarrollo, por esta razón para su estudio se ha dividido en tres etapas²⁰ (Ilustración 2)

La primera etapa se inicia con la integración del tracto de entrada primitivo y los atrios primitivos derecho e izquierdo en la región caudal del tubo cardiaco, mientras que en la cefálica comienza a surgir el cono^{3,11,20} (Ilustración 2A). Simultáneamente el corazón empieza a curvarse a la derecha, adquiriendo la forma de una asa en forma de "C", cuya superficie convexa (curvatura mayor) está a la derecha y el borde cóncavo (curvatura interna) a la izquierda²⁰. En el embrión de pollo esta etapa se presenta en el estadio 12HH. En este corazón se pueden distinguir tres regiones en las que están presentes cinco segmentos cardiacos primitivos. La región cefálica contiene al Cono, que es el primordio de ambos tractos de salida ventriculares^{8,11}. La Región media corresponde al asa cardiaca y está constituida por tres segmentos que en un orden céfalo-caudal son: el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo derecho, el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo izquierdo (ambos separados por el surco interventricular izquierdo que es muy profundo) y el tracto de entrada primitivo, que es el primordio de ambos tractos de entrada ventriculares. Finalmente la región caudal contiene los atrios primitivos^{20,21} (Ilustración 2B).

A medida que avanza el desarrollo, el tubo cardiaco toma la forma de S (estadio 14HH), en esta etapa el asa es convexa ventralmente y cóncava dorsalmente, ubicándose en posición sagital, de tal manera que los segmentos cardiacos primitivos siguen una dirección ventro-dorsal. En este caso el cono y el primordio

de la región apical trabeculada del ventrículo derecho están en posición cefálica, mientras que el primordio de la región trabeculada del ventrículo izquierdo y el tracto de entrada primitivo son caudales, también aparece el seno venoso²⁰ (Ilustración 2 C). En los mamíferos el seno venoso participa en la morfogénesis del atrio derecho, integrándose a su pared dorsal e interviene en el desarrollo del septum interatrial, en las aves permanece como una cavidad independiente, conectada al atrio derecho.

A continuación se presenta la etapa avanzada de la torsión, que se inicia entre los estadios 16HH-17HH²⁰. En este periodo comienza a surgir un nuevo segmento en la región cefálica del corazón, justo adyacente al cono²². Este segmento se denomina tronco arterioso, porque se piensa que da origen a las válvulas pulmonar y aórtica y a los segmentos proximales de dichas arterias (tronco de las grandes arterias). Simultáneamente, el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo derecho y el de la región trabeculada del ventrículo izquierdo se colocan uno a la derecha y el otro a la izquierda respectivamente; los demás segmentos cardíacos primitivos adquieren una ubicación en el espacio similar a la que tendrán en el corazón maduro (Ilustración 2D,D), lo que determina que la septación cardíaca, que se iniciará inmediatamente, suceda de manera correcta²⁰.

Respecto al proceso de septación del corazón, De la Cruz y cols.²³ hallaron –en el embrión de pollo- que se inicia con la aparición de un tabique continuo que denominaron septum cardíaco primitivo, que surge entre los estadios 17HH-18HH. Además describen que dicho tabique separa simultáneamente los dos atrios entre sí, el tracto de entrada del VD del tracto de entrada del VI y a la región apical trabeculada de cada uno de los ventrículos, por consiguiente comienza a expresarse el corazón tetracavitario²³. El mismo grupo de investigadores demostró que en esta etapa del desarrollo (estadio 18HH), el cono aún no dividido persiste en forma de un segmento tubular conectado al primordio de la región apical trabeculada del VD, por lo que el VI aún carece de tracto de salida¹¹. Además encontraron que en el estadio 22HH el cono -al igual que sucede en el corazón del embrión humano- presenta en su interior dos crestas: dextrodorsal y sinistroventral

que lo dividen en un cono anterolateral y otro posteromedial y confirmaron mediante marcaje en vivo que el primero es el primordio del infundíbulo del VD¹¹. Respecto al segundo, se ha descrito que participa en el desarrollo del vestíbulo del VI, sin embargo, esta participación es muy cuestionada, pues el marcaje en vivo en el embrión de pollo demuestra la contribución del cojín superior del canal A-V en el tracto de salida de dicho ventrículo²⁴. A pesar de que en el estadio 22HH se ha iniciado el proceso de septación cardiaca y que el cono se ha dividido parcialmente en dos, ambos conos aún persisten conectados a la región apical trabeculada del VD.

La integración de cada uno de los conos a su ventrículo correspondiente sucede tardíamente en el desarrollo, mediante procesos poco conocidos y muy discutidos, señalándose aspectos mecánicos como la rotación y el acortamiento^{17,25,26} y mecanismos aparentemente contradictorios como la proliferación celular²⁶ y la apoptosis²⁷ de las células miocárdicas.

Por otro lado la morfogénesis de la región proximal de la arteria pulmonar y la aorta (troncos de las grandes arterias), así como las válvulas arteriales, que regulan los tractos de salida ventriculares, sucede en etapas aún mas avanzadas de la cardiogénesis y es uno de los temas más controvertidos de la biología del desarrollo cardiaco, pues no existe un acuerdo de los componentes embriológicos que participan. Algunos autores mencionan que ambas estructuras se originan del tronco^{17,28}; sin embargo; otros investigadores proponen que éste sólo da origen a las válvulas pulmonar y aórtica, pero no participa en la región proximal de las grandes arterias, la cual señalan debe formarse por el saco aórtico²⁹⁻³².

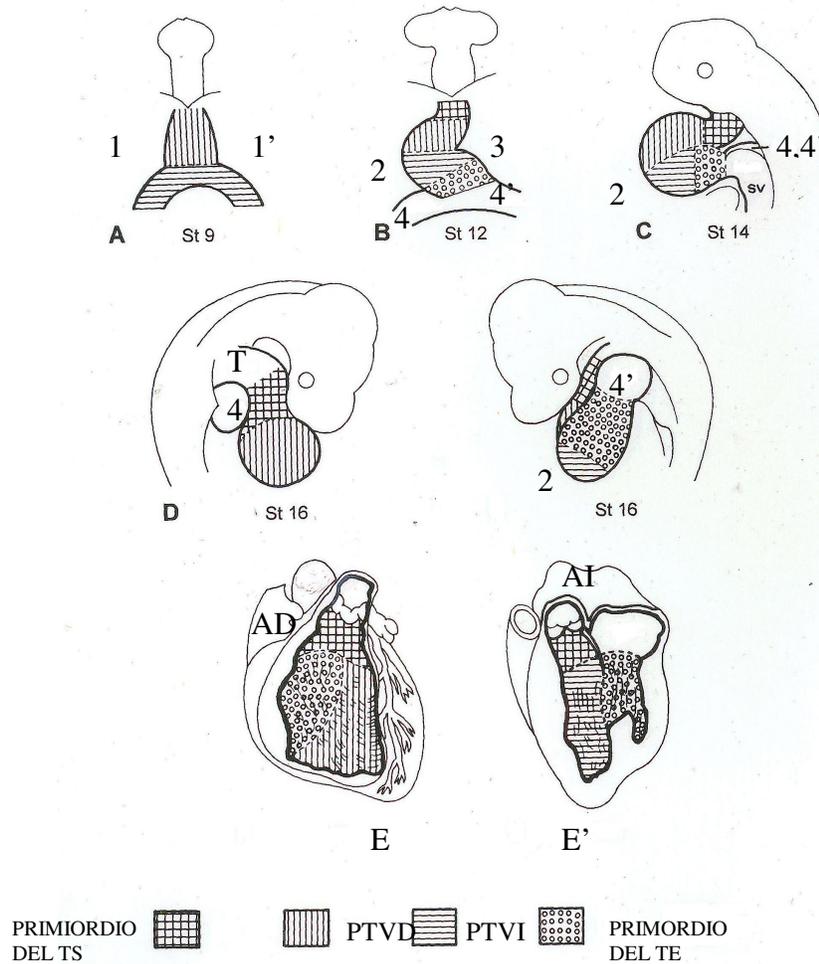


Ilustración 2.- Esquema que muestra el estadio en que aparecen los segmentos cardiacos primitivos, sus cambios de posición durante el proceso de torsión y plegamiento cardiaco y su expresión anatómica en el corazón maduro. **A.** Estadio 9. *Corazón en tubo recto*, formado por el primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho (PTVD) en posición cefálica y el de la región trabeculada del ventrículo izquierdo (PTVI) en posición caudal, separados por los surcos interventriculares derecho (1) e izquierdo (1'). **B.** Estadio 12. *Corazón en asa en C*. La curvatura mayor (2) es derecha, mientras que la menor (3) es izquierda. Aparecen el cono ó primordio de los tractos de salida (TS), el primordio de los tractos de entrada (TE) y los atrios primitivos derecho (4) e izquierdo (4'). **C.** Estadio 14. *Corazón en asa en S*. La curvatura mayor (2) es ventral y la menor dorsal. Los atrios se colocan ligeramente dorso-cefálicos; aparece el seno venoso (SV). **D, D'.** Estadio 16-17. *Etap avanzada de la torsión*. Vistas sagitales derecha e izquierda respectivamente. Los segmentos cardiacos primitivos adquieren la relación de vecindad similar al del corazón definitivo. La curvatura mayor (2) forma el ápice cardiaco; aparece el tronco y los atrios primitivos (4, 4') se colocan en posición dorsocéfálica. **E, E'.** Vista interna de los ventrículos maduros mostrando las regiones que los forman y su constitución embrionaria.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha descrito que el cono y el tronco son los componentes embriológicos que participan en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares, las válvulas que los regulan y la región proximal de la arteria pulmonar y de la aorta^{17,25,28}. Respecto al cono, trabajos previos experimentales realizados en el corazón del embrión de pollo demuestran que aparece en el estadio 12HH¹¹, etapa de asa en C, mientras que el tronco comienza a surgir en el estadio 16HH²², etapa de post-asa temprana.

En una investigación reciente, realizada por Sánchez Gómez³³ y cols. usando marcaje en vivo en el corazón del embrión de pollo, se establecieron los límites del cono anterolateral (primordio del tracto de salida del ventrículo derecho) en el corazón del estadio 22HH³³. También se demostró que el límite caudal o ventricular se encuentra al nivel de los surcos conoventriculares, mientras que el cefálico o tronco-conal está en el sitio en el que el tubo cardiaco cambia de dirección caudocefálica a una dirección ventrodorsal, que en este estadio también corresponde al límite cefálico de las crestas del cono³³. Esta información es muy útil en nuestra investigación pues nos permitió distinguir con precisión estos dos segmentos cardiacos primitivos. Además, estos mismos investigadores hallaron que el cono anterolateral se integra a su ventrículo correspondiente debido al crecimiento diferencial de este último³³.

Respecto al destino prospectivo del tronco existen dos propuestas, la primera señala que da origen a las regiones proximales (tronco) de las grandes arterias^{17,25,28}, lo que implica la transformación de una parte de su pared -que inicialmente es de músculo cardiaco- en músculo liso de pared arterial. Este mecanismo a pesar de ser sugerido por todos los autores que apoyan esta primera propuesta, ha sido escasamente abordado experimentalmente, siendo el trabajo de Ya y cols³⁴ uno de los más citados. Sin embargo, otros investigadores proponen que el tronco únicamente origina las válvulas pulmonar y aórtica, pero no participa en las regiones proximales de las grandes arterias²⁹⁻³², que se formarán a partir del saco aórtico. Debido a que las válvulas arteriales están

compuestas por un anillo de inserción y las valvas (sigmoideas), ambos constituidos por tejido conectivo, en este caso es de sospechar una transformación del miocardio en tejido conectivo, proceso previamente demostrado por Argüello y cols³⁵.

Esta descripción hace evidente que la pared miocárdica del cono permanece con esas características, sin embargo es obvio que no existe un consenso sobre el destino real de las células miocárdicas de la pared del tronco. Además tampoco se conocen de manera secuencial e integrada los cambios histológicos de la pared de estos dos segmentos del corazón embrionario durante las etapas de la cardiogénesis en que se desarrollan los tractos de salida ventriculares, las válvulas arteriales y las regiones proximales de la aorta y la arteria pulmonar. Por esta razón como un primer acercamiento para confirmar el destino de la pared del cono y distinguir si el miocardio de la pared del tronco se transforma en músculo liso o en fibroblastos de tejido conectivo, en el presente trabajo se estudiaron las características histológicas de la pared del cono anterior y del tronco en el corazón de embriones de pollo previamente marcados en el estadio 22HH en los límites conales, para poder diferenciarlos, rastreando sus cambios hasta el estadio 36HH, en el que es posible conocer la manifestación anatómica de estas estructuras embrionarias.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

Debido a que existen dos propuestas distintas y excluyentes sobre el destino de las paredes del tronco, la información lograda en este trabajo aportará elementos para poder sugerir cuál es la correcta, conocimiento indispensable para iniciar estudios sobre el proceso de histodiferenciación de la pared del tronco a nivel ultraestructural, molecular y genético.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar mediante técnicas morfológicas e histológicas el destino del cono anterolateral y del tronco en el corazón de embriones de pollo previamente marcados en los límites conales en el estadio 22HH, rastreando los cambios hasta el estadio 36HH.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Describir mediante microscopia electrónica de barrido las características anatómicas del corazón de embriones de pollo de los estadios 22HH, 24HH, 26HH, 28HH, 30HH y 36HH.

2.- Estudiar por medio de técnicas histológicas las propiedades de la pared anterior del cono y de las paredes del tronco, así como de la pared de las estructuras en las que se transforman, en el corazón de embriones de pollo previamente marcados en los límites del cono, rastreando los cambios entre los estadios 22HH a 36HH.

3. Analizar los resultados confrontándolos con los de otros autores.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO

Se hicieron dos tipos de estudios: anatómicos usando el microscopio electrónico de barrido e histológicos mediante cortes seriados de los corazones incluidos en paraplasto.

Con el propósito de conocer las características anatómicas del corazón embrionario, se usaron huevos fértiles de *Gallus domesticus* que se incubaron a 37.5⁰C y 86% de humedad, el tiempo necesario para obtener embriones de los estadios deseados. Para establecer los cambios histológicos de las estructuras objetos de este estudio, se usó el corazón de embriones de pollo obtenidos de los experimentos de marcaje en vivo de los límites conales (Anexo 1). En ambos casos la edad de los embriones se calculó de acuerdo a los estadios de Hamburger y Hamilton³⁶, ya que esta clasificación relaciona la cronología (tiempo de incubación) con la morfología.

Las investigaciones se llevaron a cabo a partir del estadio 22HH, debido a que en esta etapa aparecen las crestas en el interior del cono que lo dividen en dos, cuyo borde cefálico permite establecer el límite entre el cono y el tronco.

I. Estudios anatómicos

Con el propósito de conocer los cambios morfológicos de las estructuras objeto de este estudio y su relación espacial con los demás segmentos cardiacos primitivos, se eligieron seis embriones de cada estadio (22HH, 24HH, 26HH, 28HH, 30HH y 36HH) y se procesaron para hacer fotografías con el microscopio electrónico de barrido, siguiendo una técnica de preparación previamente establecida por Sánchez Gómez³⁷. Para retirar el exceso de sangre y lograr una mejor preservación de la muestra, los especímenes se lavaron por perfusión con la solución de Ringer (Soluciones 2) y se fijaron por el mismo método con glutaraldehído al 3.5% disuelto en un amortiguados de fosfatos durante 2 hrs. (Anexo 2, Soluciones 3). Posteriormente los embriones se lavaron con la solución amortiguadora de fosfatos . El corazón se separó del cuerpo del embrión y con la ayuda de una aguja muy delgada ó un pequeño bisturí, se realizó

una incisión en el lugar donde se encontraron las marcas. Las muestras se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales de 30% a 96%, un cambio de 10 minutos en cada uno y 2 baños de 20 minutos cada uno en el alcohol absoluto. Los especímenes ya deshidratados se desecaron por punto crítico en un aparato Samdri modelo 789A y se montaron en porta muestras orientándolos para poder tener imágenes del corazón en el plano frontal, superficie ventral. Finalmente las muestras se recubrieron con una capa de oro de 30-50 nm en el evaporador de iones, marca Denton Vacuum Desk 1A, se observaron en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 5300 a 15kV, haciendo fotografías a una amplificación de 35X en todos los estadios.

II. Estudios histológicos

Se seleccionaron seis embriones de cada estadio (22HH, 24HH, 26HH, 28HH, 30HH y 36HH) para estudiar las propiedades histológicas de las estructuras de interés, empleando una técnica establecida en el laboratorio³⁸. Se usaron corazones previamente marcados en los límites del cono y capturados para conocer la ubicación de las marcas. Los especímenes se fijaron en Bouin alcohólico durante 24 horas (Soluciones 3). Debido a que el fijador se prepara en una solución de alcohol al 70%, para eliminar el exceso de ácido pícrico (color amarillo) las muestras se lavaron en alcohol de esa graduación dando 2 o 3 cambios de 3 a 4 hrs. cada uno. Inmediatamente se realizó la deshidratación de los especímenes pasándolos por un tren de alcoholes graduales del 70% al 90%, 2 cambios de 15 minutos cada uno y alcohol 96% y 100%, dos cambios de media hora. El proceso de aclaración se llevó a cabo pasando las muestras en una mezcla de alcohol absoluto / aceite de cedro 1:1 durante 1 hora, aceite de cedro puro, toda la noche, aceite de cedro/ cloroformo 1:1, 2 horas.

La preinclusión se realizó con cloroformo puro, un baño de 2 horas, un cambio en una mezcla de cloroformo / paraplast en proporción 1:1 por un tiempo mínimo de 4 horas, paraplasto puro de 4 a 12 horas, dependiendo del tamaño del corazón. Estos últimos procedimientos se realizaron dentro de un horno de inclusión a 58-60°C. Las muestras se incluyeron

con paraplasto, usando moldes de plástico especiales; con la ayuda de un microscopio estereoscópico los corazones se orientaron adecuadamente para poder obtener cortes en los planos frontal o transversal. Mediante un micrótopo Leitz 1512, se hicieron cortes seriados de 5 μ m de grosor para poder lograr una mayor resolución y observar los límites celulares. Los cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio.

Las preparaciones se tiñeron con la técnica de Hematoxilina y Eosina (Anexo 3) y se seleccionaron tres embriones de cada estadio en cada orientación. Esto nos permitió identificar el tipo de células y las características de su núcleo. La descripción de los resultados y obtención del material fotográfico se realizó con la ayuda de una cámara digital conectada a un microscopio óptico; las imágenes se procesaron con el programa de computo Image Expert- Photo PC 3000 Z.

RESULTADOS

I. Estudios Anatómicos

Estadio 22HH, 31/2 días de incubación (Fig. 1). En esta etapa el corazón en una vista externa está constituido por dos atrios en posición cefálica y dos ventrículos en posición caudal. De la parte distal del ventrículo derecho emerge el cono que se puede distinguir por estar delimitado por dos rasgaduras. En posición aún más cefálica se observa el tronco. Los ventrículos están ubicados en la posición que les corresponde, uno a la derecha y otro a la izquierda, ambos separados por el surco interventricular muy pequeño. El límite inferior del cono corresponde a los surcos cono-ventriculares, el derecho es poco evidente, mientras que el izquierdo es muy profundo. Este segmento cardiaco primitivo está desplazado hacia la derecha respecto al eje embrionario, por esta razón, en el plano frontal no es posible observar al atrio derecho. El cono es casi recto, sigue una dirección caudo-cefálica y ligeramente de derecha a izquierda, descansa sobre la superficie ventral del canal atrioventricular. El tronco es el segmento más cefálico del corazón. No existe una estructura anatómica que corresponda al límite tronco-conal, éste lo pudimos distinguir por la presencia de las marcas que evidenciamos mediante una pequeña incisión. Además en esta etapa, este lugar corresponde al sitio en el que el tubo cardiaco cambia de una dirección caudo-cefálica a una dirección ventro-dorsal. El tronco se encuentra en posición central respecto al eje embrionario y descansa sobre la superficie ventral del atrio izquierdo.

Estadio 24HH, 4 días de incubación (Fig. 2). Es notable el crecimiento de la región ventricular, principalmente del lado derecho. El cono al igual que en la etapa anterior lo pudimos distinguir por la presencia de dos pequeñas incisiones. El surco cono-ventricular derecho ha desaparecido, mientras que el izquierdo se mantiene profundo. En esta etapa, la marca que inicialmente se encontraba en el surco cono-ventricular derecho se halla desplazada en dirección caudal (Fig. 2A). El cono continúa inclinándose hacia la izquierda y aún descansa sobre la

superficie ventral del canal atrioventricular (Fig. 2B). A pesar de que el cono aún está desplazado hacia la derecha respecto al eje embrionario, en el plano frontal ya es posible observar una pequeña porción del atrio derecho (Fig. 2A). El tronco aún es el segmento más cefálico del corazón y su límite con el cono ya no corresponde al sitio en el que el corazón cambia su dirección, está ligeramente desplazado hacia la región caudal; este segmento se mantiene en posición central respecto al eje embrionario y descansa sobre una muesca que comienza a formarse entre los dos atrios (Fig. 2B).

Estadio 26HH, 5 días de incubación (Fig. 3). El crecimiento ventricular continúa. La marca que señalaba el límite entre el cono y el ventrículo derecho se encuentra más integrada al componente ventricular, mientras que la que señalaba el límite tronco-conal se ha alejado más -en el sentido céfalo caudal- del sitio en el que el corazón cambia su dirección. El cono sigue inclinándose hacia la izquierda y permanece sobre la superficie dorsal del canal atrioventricular. En el plano frontal el atrio derecho se hace cada vez más evidente. El tronco se mantiene en posición central respecto al eje embrionario y descansa sobre una muesca cada vez más profunda presente entre los dos atrios.

Estadio 28HH, 6 días de incubación (Fig. 4). La morfología cardíaca ha cambiado mucho con respecto a la etapa anterior, principalmente en la región tronco-conal y las grandes arterias. Tanto la marca que señalaba el límite entre el cono y el ventrículo derecho, como la del borde tronco-conal, se han integrado al componente ventricular. El tronco que en las etapas anteriores seguía una dirección ventrodorsal ahora se encuentra en el mismo plano que los ventrículos y sigue una dirección caudo-cefálica, tiene la forma de un anillo ancho y grueso. Es importante señalar que la marca (rasgadura) que originalmente señalaba el límite tronco-conal, ahora corresponde al límite entre el anillo y el componente ventricular. Por encima de este anillo, en posición aún más cefálica comienza a definirse la región proximal (truncos) de la aorta y de la arteria pulmonar así como sus ramas principales. Estas últimas descansan en una muesca que existe entre

los atrios que ya se encuentran en su posición definitiva, uno ubicado a la derecha y otro a la izquierda.

Estadio 30HH, 7 días de incubación (Fig. 5). Los cambios más importantes se observan en el segmento que corresponde al tronco, la región proximal de la aorta y la arteria pulmonar y sus ramas principales. El cono está completamente incorporado a los ventrículos, de tal manera que ahora se observan los tractos de salida. El tronco mantiene la forma de un anillo, cuyos bordes están mejor definidos y su límite con el componente ventricular es similar al de la etapa anterior. La región proximal (troncos) de la aorta y de la arteria pulmonar así como sus ramas principales ya se han diferenciado y se mantienen sobre la muesca que separa ambos atrios.

Estadio 36 HH, 10 días de incubación (Fig. 6). Clásicamente denominado corazón maduro. Existen pocos cambios en la forma del corazón, lo más evidente es el aumento de tamaño de todo el órgano. La región proximal de las grandes arterias y sus ramas principales ya se han definido completamente. Es de llamar la atención que la marca que al inicio señalaba el límite tronco-conal, ahora se encuentra al nivel del borde del anillo de inserción de las sigmoideas pulmonares.

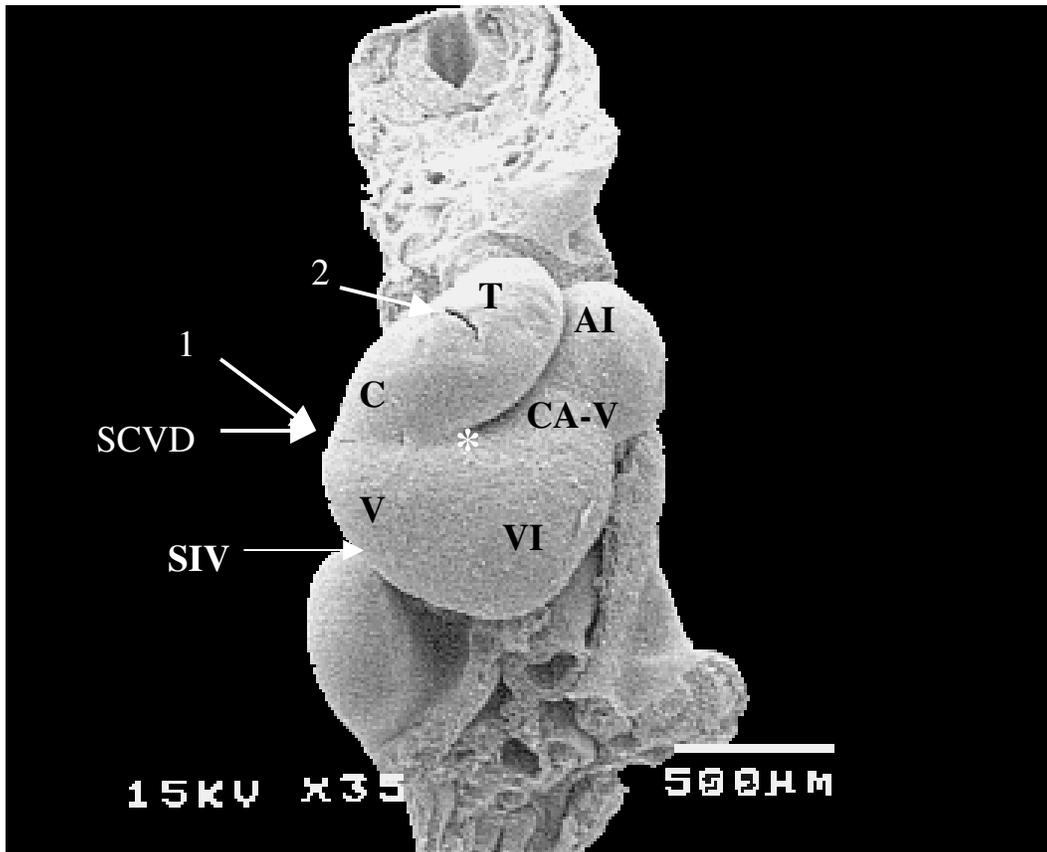


Fig. 1. Microfotografía obtenida con el microscopio electrónico de barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 22HH. Vista frontal mostrando la relación espacial que guardan el Cono (C) y el tronco (T) con las demás estructuras del corazón. Note que el Cono delimitado por dos rasgaduras (1, 2) emerge de la región apical trabeculada del ventrículo derecho (VD) y descansa sobre el canal atrioventricular (CA-V). La rasgadura (1) y el surco conoventricular derecho (SCVD) están en el mismo sitio. AI= Atrio Izquierdo; VI= Ventrículo Izquierdo; *= Surco conoventricular izquierdo.

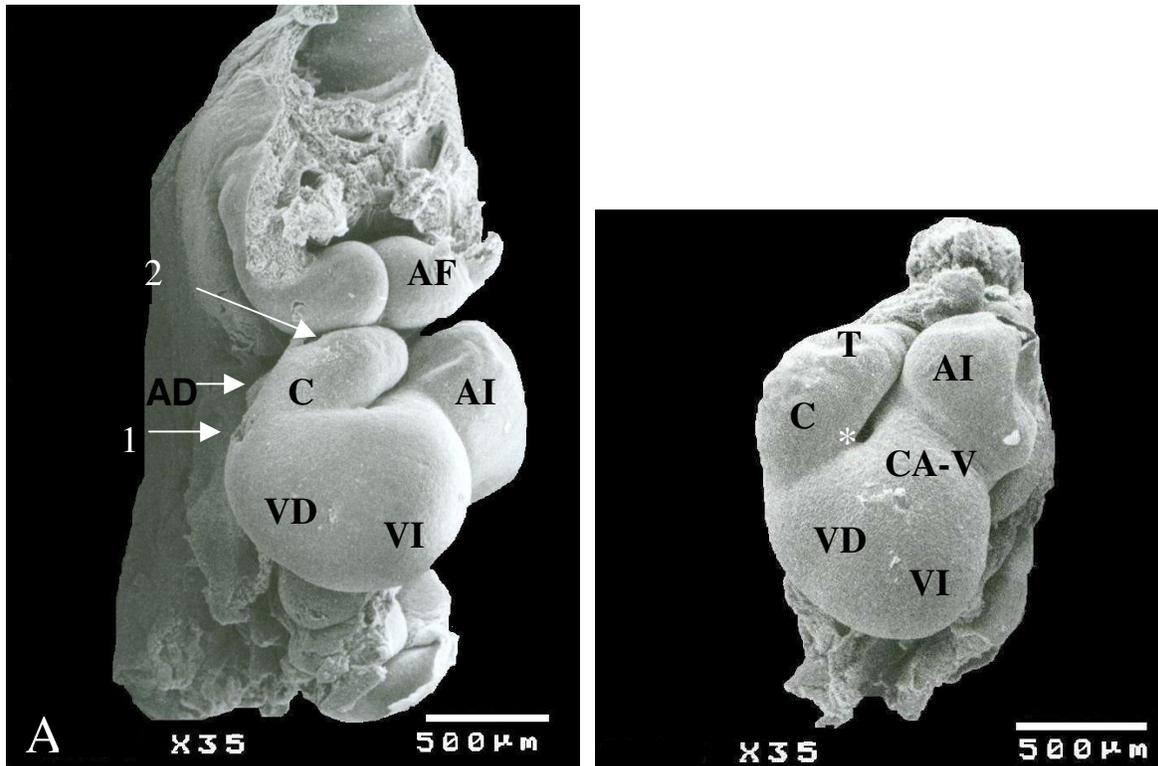


Fig. 2. Estudio anatómico con el microscopio electrónico de barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 24HH. **A.** Vista frontal. El atrio derecho (AD) comienza a evidenciarse. **B.** Vista frontal eliminando los arcos faríngeos. Note que el tronco (T) es el segmento mas cefálico del corazón y que su límite con el Cono (C) se ha desplazado caudalmente. AF= Arcos faríngeos; AI= Atrio izquierdo VD= Ventrículo derecho; VI= Ventrículo izquierdo; CA-V= Canal atrioventricular; *= Surco conoventricular izquierdo; 1= Límite cono-ventricular. 2= Límite tronco-conal.

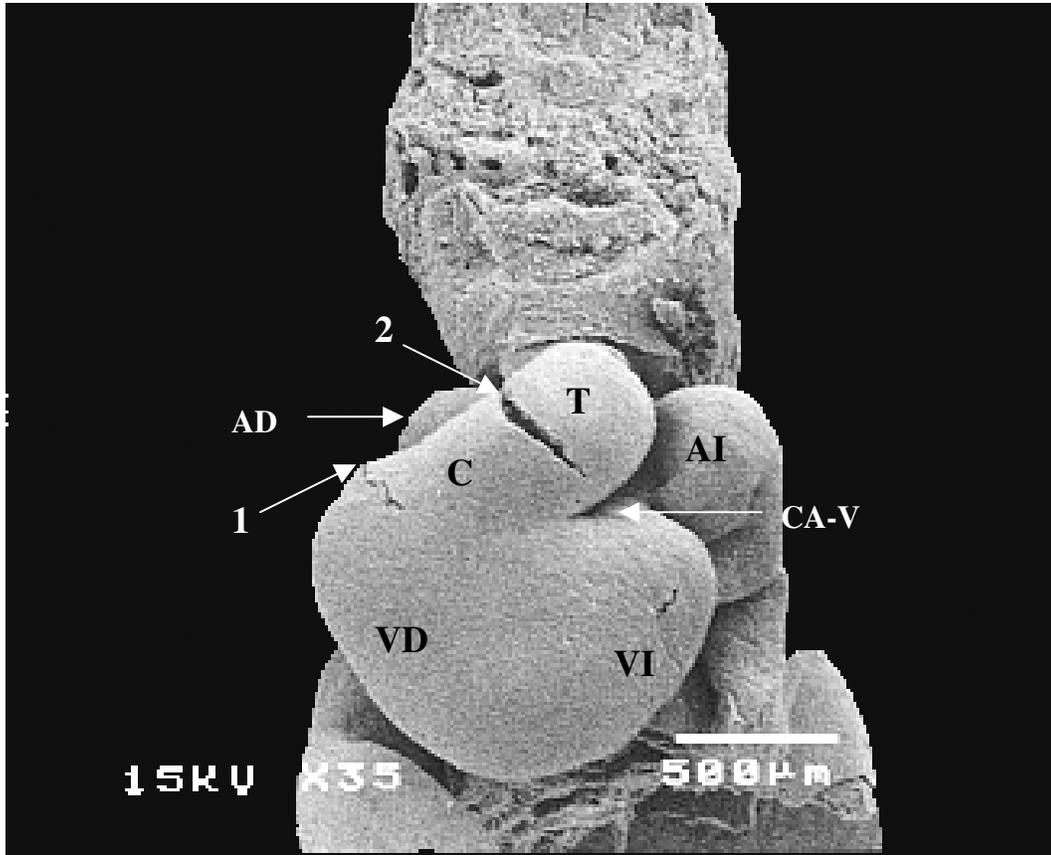


Fig. 3. Microfotografía lograda con el microscopio electrónico de barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 26HH. Vista frontal. Observe que la marca 1 que señala el límite cono-ventricular está parcialmente incorporada al ventrículo, mientras que la marca 2, que corresponde al límite tronco-conal, se ha alejado en el sentido céfalocaudal del sitio donde el corazón cambia de dirección. AD= Atrio derecho; VD= Ventrículo derecho; AI= Atrio izquierdo; VI= Ventrículo izquierdo; CA-V= Canal atrio-ventricular.

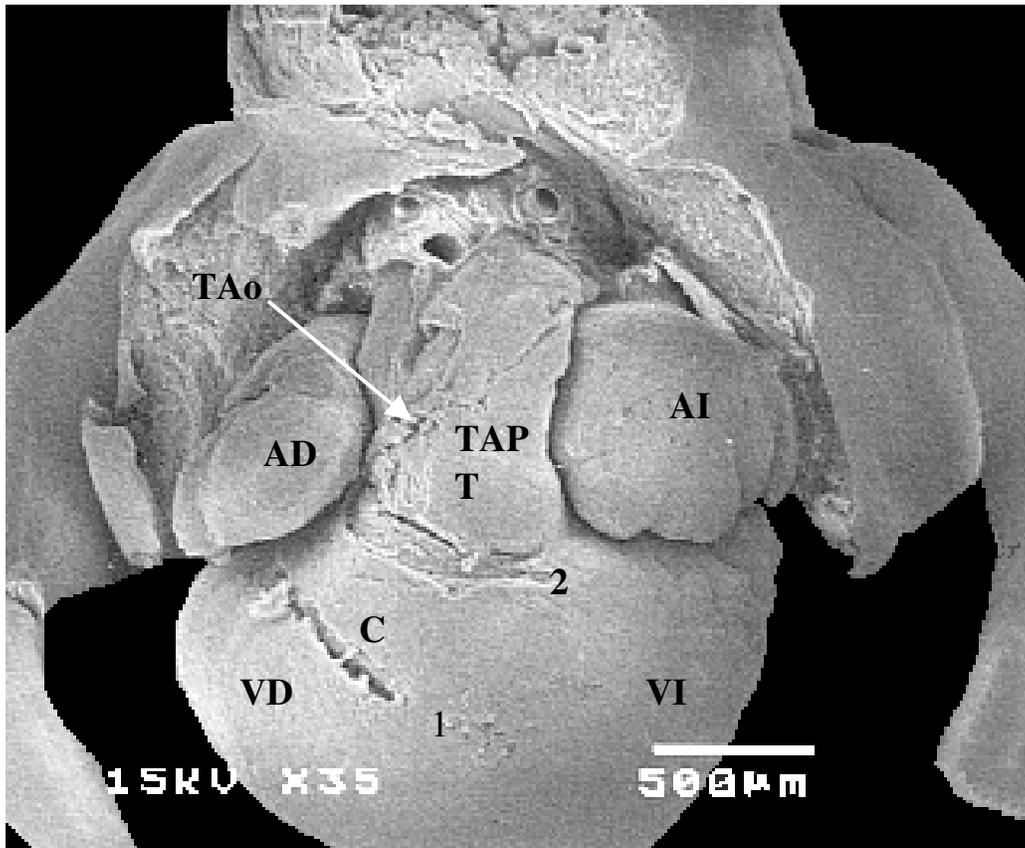


Fig. 4. Estudio con el microscopio electrónico de barrido del corazón de embrión de pollo del estadio 28HH. Vista frontal. Note que el tronco (T) se encuentra en el mismo plano que los ventrículos y tiene la forma de un anillo; además empiezan a distinguirse el tronco de la aorta (TAo) y el de la arteria pulmonar (TAP) y sus ramas principales. AD= Atrio derecho; VD= Ventrículo derecho; AI= Atrio izquierdo; VI= Ventrículo izquierdo; C= Cono; 1= Límite cono-ventricular; 2= Límite tronco-conal.

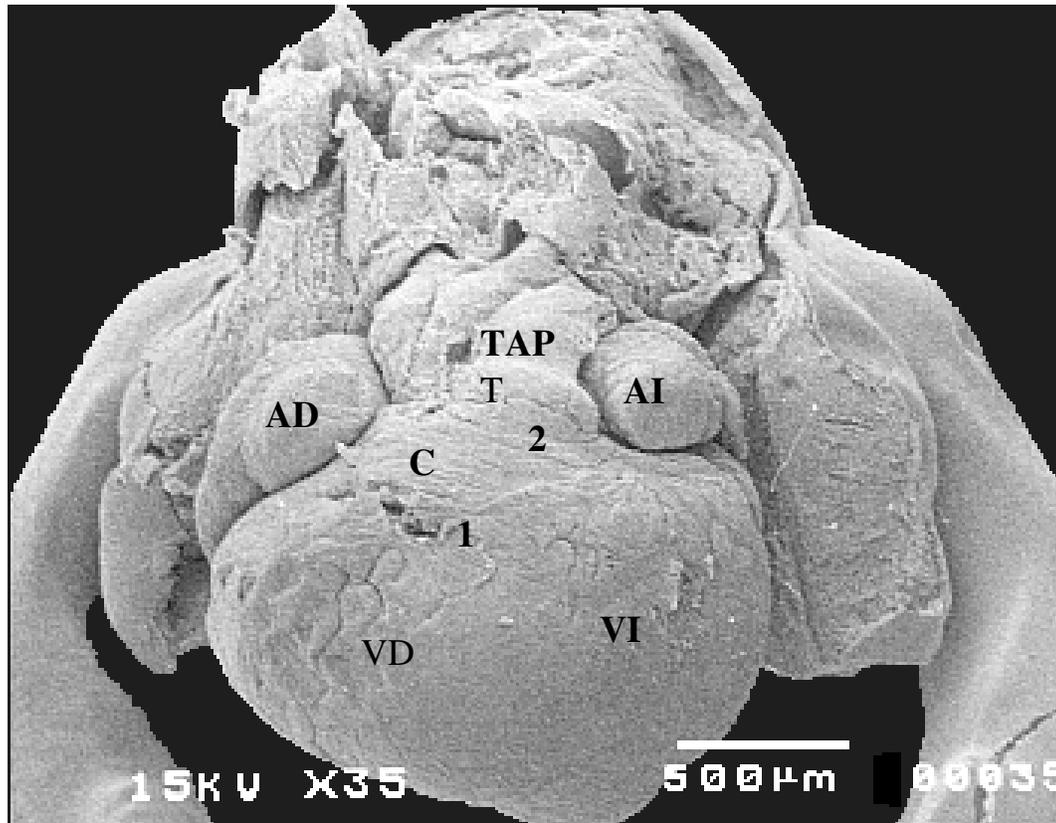


Fig. 5. Microfotografía obtenida con el microscopio electrónico de barrido del corazón embrionario de pollo, estadio 30HH. Vista frontal. Observe que el Cono (C) se ha incorporado a los ventrículos. Las ramas principales de la aorta y la arteria pulmonar se encuentran diferenciadas. TAo= Tronco de la aorta; TAP= Tronco de la arteria pulmonar; AD= Atrio derecho; AI= Atrio izquierdo; VD= Ventrículo derecho; VI= Ventrículo izquierdo; 1= Límite cono-ventricular; 2= Límite tronco-conal.

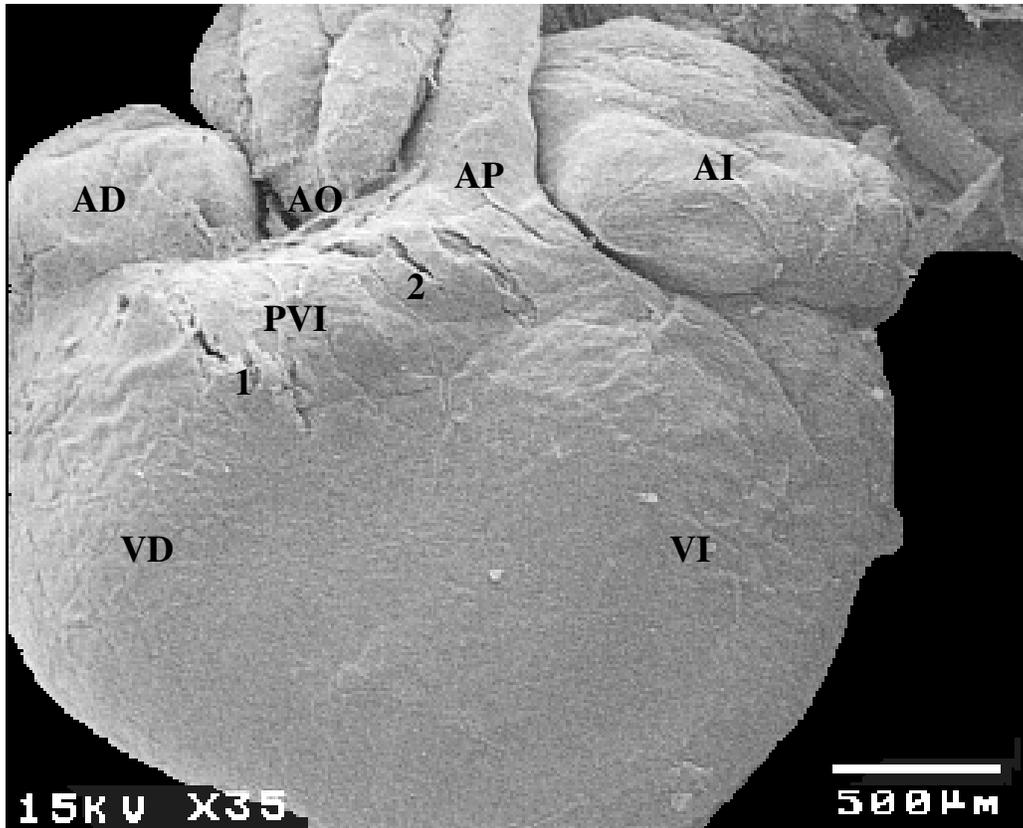


Fig. 6. Microfotografía del corazón de embrión de pollo en el estadio 36HH, obtenida con el microscopio electrónico de barrido, vista frontal. Note que la marca 2 -que señala el límite tronco-conal- se halla en el borde del anillo de inserción de las sigmoideas pulmonares y que la pared anterior del cono corresponde a la pared ventral del infundíbulo del ventrículo derecho (PVI). AD= Atrio derecho; AI= Atrio izquierdo; VD= Ventrículo derecho; VI= Ventrículo izquierdo 1= Límite cono-ventricular; 2= Límite tronco-conal.

RESULTADOS HISTOLÓGICOS

II. Estudios Histológicos

Estadio 22HH (Fig. 7). El segmento más cefálico del corazón es el tronco. En un corte sagital, siguiendo una dirección céfalo-caudal se observan el tronco, el cono y el ventrículo derecho muy pequeño. En el interior del tronco y el cono están presentes dos crestas endocárdicas, mientras que el ventrículo se caracteriza porque su pared es trabeculada (Fig. 7A). El tronco está cubierto externamente por una pared miocárdica delgada que no tiene una organización concéntrica (lamelar). Este tejido en algunas regiones no es muy compacto, pues existen espacios entre las células. Los miocitos no son todos iguales en forma y tamaño (Fig. 7B). Las crestas externamente están cubiertas por miocardio e internamente por endocardio (Fig. 7A). El espacio entre estas dos capas de células contiene abundante matriz extracelular de tipo fibrilar, en cuyo interior están inmersas múltiples células de forma estrellada, con un núcleo central grande redondo u ovalado un poco más oscuro que el de los miocitos. En conjunto la matriz extracelular y las células que contiene forman un tejido mesenquimatoso (Fig. 7B). La pared del cono está constituida por miocitos que forman una capa relativamente delgada y compacta, de dos a tres células de grosor y no tienen una organización lamelar (Fig. 7C). Estos miocitos al igual que los del tronco tienen un citoplasma menos diferenciado y son menos alargados que los de las trabéculas ventriculares. Las características citológicas de las crestas del cono son similares a las del tronco, aunque tienen mayor población de fibroblastos. En esta etapa, el epicardio solamente cubre la mitad proximal del cono, la mitad distal y el tronco están aún desnudos. Las trabéculas ventriculares están formadas por miocitos delgados, su citoplasma contiene miofibrillas bastante diferenciadas. Su núcleo es grande y claro; el nucleolo es central (Fig. 7D). Los miocitos se agrupan y forman una capa de una a tres células de grosor. Estas trabéculas están rodeadas por células endocárdicas fisiformes con escaso citoplasma y un núcleo central redondo (Fig. 7D).

Mediante el análisis secuencial de los cortes histológicos, la marca más caudal la observamos al nivel de los surcos cono-ventriculares y la cefálica en el límite entre las crestas del tronco y del cono.

Estadio 24HH (Figs. 8, 9). El saco aórtico empieza a proyectarse hacia la cavidad pericárdica, por lo que el tronco ya no es el segmento más cefálico del corazón (Fig. 8A). El saco aórtico aún está parcialmente embebido en el mesénquima branquial, su pared no es miocárdica (Fig. 8B) y está en continuidad con la del tronco que sí está formada por miocitos (Fig. 8A,C). La pared del saco aórtico está constituida por fibroblastos que forman un tejido mesenquimatoso relativamente laxo, con poca matriz extracelular. No tiene una organización lamelar, tampoco existen en su interior crestas endocárdicas (Fig. 8B). En un corte sagital del corazón se observa que la pared del tronco sigue siendo miocárdica y más delgada que la del cono, aunque ha aumentado su grosor con respecto al estadio anterior (Compare Figs. 7, 9A,B). En casi toda la superficie de la pared externa del tronco se observa que los miocitos no forman un tejido compacto, existen espacios intercelulares más amplios que en el estadio 22HH (Compara Fig. 7B con 9B). En los miocitos se nota una mayor diferenciación con respecto a la etapa anterior y siguen siendo parecidos a los del cono. Respecto a las crestas, hay un aumento muy significativo de células fibroblásticas, la matriz extracelular que las rodea es de tipo fibrilar (Fig. 9A,B). En el caso del cono su pared miocárdica ha aumentado de grosor (Fig. 9A,C), los miocitos no forman un tejido compacto, han aparecido algunos espacios, más o menos grandes entre los grupos de miocitos (Fig. 9C). Las miofibrillas en estas células son más evidentes; en general las características del núcleo son similares al estadio anterior, sin embargo en algunos miocitos el nucleolo es un poco mayor. En las crestas del cono se observa un aumento muy significativo tanto de la matriz extracelular como de los fibroblastos, cuyas características son similares a las del tronco (Fig. 9A). La región ventricular ha aumentado de tamaño y su contenido trabecular también es mayor, los miocitos mantienen las mismas características que en el estadio 22HH (Fig. 9A,D).

Estadio 26HH (Figs. 10,11). En todos los embriones analizados el segmento más cefálico es el saco aórtico, que presenta un tabique que lo divide en dos conductos (Fig. 10A). En un corte parasagital, se observa que el tronco en su región más distal se continúa con el saco aórtico que tiene características histológicas

distintas (Fig. 10A). Su pared no es miocárdica, las células que la forman son de tipo fibroblástico, de forma estrellada, con abundante citoplasma, un núcleo pequeño y dos nucleolos centrales. Estas células no están organizadas en forma lamelar y están rodeadas por una matriz extracelular fibrilar (Fig. 10B). El tronco tiene características distintas en su región adyacente al saco aórtico respecto a la cercana al cono (Fig. 11). En la primera están presentes tres crestas endocárdicas y la pared miocárdica es muy laxa con miocitos cuyas miofibrillas son poco evidentes (Fig. 11A,B). En la segunda, solo existen dos crestas endocárdicas y los miocitos que rodean la pared forman una más capa compacta (Fig. 11C,D) y tiene características similares a los del cono (Compare Fig. 10D con Fig.11B,D). Es importante señalar que en esta etapa, algunos miocitos adyacentes a las crestas del tronco han invadido la matriz extracelular (Fig. 11B,D). El cono está más integrado al componente ventricular (Fig. 10A), su pared se mantiene miocárdica y comienza a adquirir características de pared trabeculada. Los miocitos forman grupos, separados por espacios que no parecen estar limitados por endocardio (Fig. 10D); su contenido miofibrilar es similar al de los miocitos de las trabéculas ventriculares. Las crestas del cono contienen una mayor población de células en comparación con la etapa anterior. Las trabéculas de los ventrículos están mejor definidas (Fig. 10A), son muy ramificadas y más delgadas que en el estadio 24HH (Compare Fig. 9A con Fig. 10A), contienen un mayor número de miocitos con miofibrillas muy desarrolladas (Fig.10E).

En el análisis secuencial de los cortes histológicos, se encontró que el límite entre el cono y el tronco solo se puede distinguir por la presencia de las marcas, la caudal ya no corresponde a los surcos cono ventriculares, se localiza dentro del ventrículo, la cefálica permanece en el borde entre las crestas del cono y el tronco pero este sitio ya no se encuentra en el lugar donde el tubo cardiaco cambia de una dirección caudocefálica a una ventrodorsal.

Estadio 28HH (Figs.12,13). La región del saco aórtico no forma parte de la estructura cardiaca y ha sufrido muchas modificaciones. Ese segmento se ha transformado en dos conductos individualizados que corresponden al tronco de la

pulmonar y el de la aorta, cuyas paredes son de fibroblastos que empiezan a organizarse formando capas concéntricas ó lamelas (Fig. 12A, B). Además dichos conductos están en continuidad con los arco branquiales. La pared del tronco permanece rodeada de miocitos que forman dos estratos, la capa adyacente al epicardio es continua (Fig. 13B), sin embargo los miocitos adyacentes al tejido mesenquimatoso de las crestas, se ha dispersado y se encuentra mezclado con los fibroblastos que forman ese tejido (Figs. 12C,D, 13B). La invasión del mesénquima por los miocitos es más evidente en el extremo distal del tronco, en donde además están presentes las tres crestas aún no fusionadas (Compare Fig. 12C;D con 13B). En este caso los miocitos tienen miofibrillas menos evidente. El cono continúa integrándose a los ventrículos, su pared es más amplia y comienza a tener una apariencia de pequeñas trabéculas (Fig. 13A), aunque los espacios entre los grupos de miocitos aún no están cubiertos por endocardio. Las crestas del cono tienen mayor volumen y hacen contacto entre sí, pero aún no se fusionan (Fig. 13A). El desarrollo de las trabéculas ventriculares sigue avanzando, dichas estructuras aunque son de mayor tamaño y más ramificadas, mantienen las características que tenían en las etapas anteriores, los miocitos son similares a los del cono (compare Fig. 13C con 13D).

Estadio 30HH (Figs. 14,15). La pared de las regiones proximales (troncos) de la arteria pulmonar y de la aorta está formada por fibroblastos que se empiezan a organizar en forma lamelar (Fig. 14A,B), también comienzan a formarse las tunicas de la pared arterial. La pared externa del tronco está formada por miocitos con miofibrillas similares a los del cono (Fig. 15B), sin embargo no parecen tener una organización topográfica específica, forman un tejido muy laxo y continúa el proceso de invasión de los miocitos al tejido mesenquimatoso de las crestas, que en su extremo distal, adyacente al saco aórtico, se están transformando en las sigmoideas pulmonares y aórticas (Fig. 14C), las cuales al igual que su anillo de inserción están rodeadas exteriormente por miocardio (Fig. 14C). El cono anterior ya se ha integrado al ventrículo derecho (Fig. 15A), su pared anterior corresponde a la pared ventral del tracto de salida de este ventrículo, está

organizada en pequeñas trabéculas relativamente gruesas, cubiertas por endocardio (Fig. 15C). Los miocitos son similares a los de las trabéculas ventriculares, aunque menos alargados (Compare Fig. 15C con 15D). La crestas del cono ya se han fusionado en el extremo proximal (caudal), en el distal aún se nota una muesca que las separa (Fig. 15A). Los ventrículos continúan su desarrollo, sus trabéculas tienen la forma que caracteriza a cada uno de ellos (Fig. 15A), sus miocitos están muy diferenciados, son alargados, tienen un núcleo grande con uno ó dos nucleolos y el citoplasma está ocupado por una abundante cantidad de miofibrillas (Fig. 15D).

En esta etapa la marca caudal está en el ventrículo derecho y la cefálica en el borde ventricular del anillo de inserción de las sigmoideas pulmonares.

Estadio 36HH (Fig.16). En esta etapa, los ventrículos se han separado totalmente, pues la comunicación que existía entre ellos se ha cerrado porque el septum interventricular ya se ha completado, en este último se observa la presencia de vasos coronarios (Fig. 16A). La pared de las regiones proximales de la arteria pulmonar y de la aorta (troncos) está formada por fibroblastos que tienen una organización lamelar, pero aún no se distinguen las tónicas. Inmersas entre los fibroblastos están presentes algunas células de músculo liso (Fig. 16B). En las ramas principales de la aorta y la arteria pulmonar las lamelas ya se están definiendo (Fig. 16A). El tronco ha perdido algunas de las características que permitían identificarlo, en su lugar se encontró un segmento bordeado por una pared miocárdica, ubicado entre el tracto de salida de los ventrículos y la región proximal de la arteria pulmonar y la aorta, en su interior están presentes los aparatos valvulares pulmonar ó aórtico, según sea el caso (Fig. 16A). Estos últimos están compuestos por un anillo de inserción muy amplio, pero mejor definido que en el estadio 30HH y las sigmoideas (Fig. 16A). La marca cefálica se halló muy dispersa en el borde ventricular del anillo de inserción y la caudal dentro del ventrículo. La pared que rodea tanto al anillo de inserción como a las sigmoideas está compuesta por miocitos cortos, bien diferenciados, con un núcleo relativamente grande y uno ó dos nucleolos. Están mezclados con fibroblastos

grandes claros con un núcleo más oscuro que el de los miocitos (Fig. 16C). Estos fibroblastos son similares a los que forman las sigmoideas, en este caso, se organizan formando un tejido mesenquimatoso laxo; la matriz en la que están inmersos es de tipo fibrilar (Fig. 16D). El cono anterior ya se ha transformado en el tracto de salida (infundíbulo) del ventrículo derecho, cuyo límite con la región apical trabeculada correspondió a la marca caudal, inicialmente colocada al nivel de los surcos cono-ventriculares. La pared del tracto de salida del ventrículo derecho mantiene una organización de pequeñas trabéculas gruesas y cortas, todas cubiertas por endocardio (Fig. 16E), cuyos miocitos son iguales a los de las trabéculas ventriculares. Las crestas conales se han transformado en las estructuras anatómicas que les corresponde.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los resultados de los estudios morfológicos e histológicos, así como el rastreo de las marcas desde el estadio 22HH hasta el 36HH, confirman lo señalado por De la Cruz y cols.¹¹ que el cono anterior da origen al tracto de salida del ventrículo derecho y niegan que el tronco da origen a la región proximal ó tronco de las grandes arterias y que los miocitos de su pared se transforman en músculo liso.

Respecto al cono, su pared anterior siempre fue de tipo miocárdico, las marcas que se colocaron para delimitar este segmento nos permitieron observar, tanto en los estudios anatómicos como histológicos, que el cono anterior se integra al ventrículo derecho debido al crecimiento diferencial de este último, siendo muy evidente en los resultados de los estudios histológicos que su pared ventral adquiere características trabéculares (Figs. 7C, 16E). Estos resultados concuerdan con lo señalado por Sánchez Gómez y Cols. respecto al desarrollo del infundíbulo del ventrículo derecho³³. Además encontramos que la marca colocada en el extremo cefálico de las crestas conales señala el límite entre esta estructura y el tronco, ya que siempre la hallamos ubicada entre las crestas del cono y el tronco. Por lo tanto, podemos concluir que el extremo cefálico de las crestas del cono es un buen parámetro para delimitar estos dos segmentos del corazón embrionario. Es importante señalar que si bien es cierto en el estadio 22HH este límite coincide con el sitio en que el tubo cardiaco cambia de una dirección caudocefalica a una ventrodorsal, en los demás estadios analizados tanto con el microscopio electrónico de barrido como en los cortes histológicos no sucedió así (Figs. 1-6), por consiguiente el cambio de dirección del tubo cardiaco no es un buen parámetro para distinguir al cono del tronco, además hay que tomar en cuenta que en los estadios tempranos (12HH-16HH) solo está presente el cono^{11,22}.

Hallamos que a partir del estadio 24HH aparece en el extremo cefálico del corazón una nueva estructura -el saco aórtico- con características histológicas distintas al tronco y además carece de crestas, lo que nos permitió diferenciar al tronco del saco aórtico (Fig. 8A), por esta razón

consideramos al tronco como el segmento del corazón embrionario que se encuentra entre el extremo cefálico de las crestas del cono y el saco aórtico (Fig. 10A).

Basados en estos límites encontramos que la pared del tronco siempre se mantuvo rodeada por miocitos y que a partir del estadio 28HH los miocitos adyacentes al tejido mesénquimal de las crestas perdieron sus uniones celulares comenzando a invadir este tejido, en este caso sus mío-fibrillas fueron menos evidentes (Figs. 12C,D, 13B). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Argüello³⁵ que señala que las células miocárdicas del tronco se transforman en fibroblastos; pensamos que la matriz extracelular de las crestas es un factor importante en este proceso. Además encontramos al igual que Qayum y cols.³⁰ que en la región cefálica del tronco existen tres crestas y que ellas participan en el desarrollo de las sigmoideas (Fig. 11A). Estos hechos nos permiten concluir que los fibroblastos producto de la transformación de los miocitos, conjuntamente con el mesénquima de la región proximal de las crestas del tronco (cercana al cono) forman el anillo de inserción de las válvulas pulmonar y aórtica, mientras que en la región más cefálica participan en las sigmoideas. Por consiguiente, los miocitos de la pared del tronco tienen un doble destino: los adyacentes al epicardio no se transforman y rodean el anillo de inserción y las sigmoideas, mientras que los adyacentes al tejido mesenquimal de las crestas se transforman en fibroblastos.

Los estudios histológicos del corazón embrionarios de los estadios 30HH y 36HH mostraron que el aparato valvular de la arteria pulmonar y el de la aorta está formado por un anillo de inserción y tres sigmoideas. Estas estructuras están comprendidas entre la marca colocada al nivel del extremo cefálico de las crestas del cono (límite tronco-conal) y el saco aórtico. Es importante señalar que tanto en los estudios morfológicos como en los histológicos observamos que en estos estadios el anillo de inserción es una estructura amplia, inicialmente poco delimitada en su extremo caudal (límite tronco-conal). Estas observaciones son congruentes con nuestra idea sobre la transformación del tronco en el anillo de inserción (Figs. 5,6,14A, 16A).

El hecho de que hayamos encontrado que en el estadio 24HH aparece el saco aórtico, constituido por tejido mesenquimatoso y la aparición de células de músculo liso a partir del estadio 30HH en la pared de los conductos derivados del saco aórtico, nos permite concluir que esta región es la que da origen al tronco de las grandes arterias, lo que concuerda con lo reportado por Waldo y cols.³² quienes concluyen que el saco aórtico es dividido por el septum aórtico pulmonar en dos conductos que corresponden al tronco de la aorta y el de la arteria pulmonar.

Algunos autores entre ellos Ya y cols³⁴ no están de acuerdo con esta idea, ellos sugieren que los miocitos de la porción distal del tracto de salida del corazón embrionario, (al que denominan “outflow” en inglés) y que corresponde a la región que nosotros estudiamos como tronco, pierde su fenotipo miocárdico y se convierten en células de músculo liso, dando origen a la región proximal ó tronco de la aorta y de la arteria pulmonar. También señalan que la región distal de estos vasos (ramas principales de las grandes arterias) se desarrolla del saco aórtico. Esta propuesta no concuerda con nuestros resultados ya que hallamos que la pared del tronco siempre fue de tipo muscular cardiaco y participa en el desarrollo del anillo de inserción de las sigmoideas aórticas y pulmonares. Estos hechos nos permiten concluir que el saco aórtico es la estructura que da origen al tronco de las grandes arterias.

Debido a que el tronco del corazón embrionario no da origen al tronco de las grandes arterias como lo han señalado diversos autores^{17,28}, nosotros sugerimos que es necesario cambiar esta denominación, por estar basada en un destino equivocado. Proponemos al igual que Pexieder³¹ llamar al Cono bulbus proximal y al tronco bulbus distal y para evitar confusiones, llamar saco aórtico pulmonar al segmento que da origen a la región proximal ó tronco de las grandes arterias.

Actualmente a la región del corazón embrionario que conecta los ventrículos con los arcos aórticos (polo arterial) se le denomina genéricamente y en todas las etapas de la cardiogénesis “outflow”²⁶, sin distinguir los segmentos que la constituyen. Esto se debe a la dificultad que existe para diferenciar al Cono, Tronco y saco aórtico y a que la mayoría de los investigadores toman como un hecho que el tronco del

corazón embrionario da origen a la región proximal ó tronco de las grandes arterias. Sin embargo recientemente se ha demostrado que estos segmentos aparecen progresivamente a través del desarrollo embrionario^{39,40}, también mediante el marcaje en vivo en el embrión de pollo, se ha señalado que el cono aparece en el estadio 12HH¹¹, respecto al tronco se sabe que surge en el estadio 16HH²².

Basados en estos hechos, conjuntamente con nuestros hallazgos, a continuación proponemos un nuevo modelo del desarrollo de la región del corazón embrionario que conecta a los ventrículos con los arcos aórticos, señalando la etapa en que aparece cada uno de los segmentos, sus límites y su destino prospectivo.

El cono surge en el estadio 12HH¹¹, en el estadio 22HH aparecen en su interior las crestas endocardicas que lo dividen en un cono anterior y otro posterior¹¹. El anterior da origen al tracto de salida del ventrículo derecho¹¹. Respecto al tronco surge en el estadio 16HH²² y da origen al anillo de inserción y a las sigmoideas aórticas y pulmonares. El saco aórtico comienza a aparecer en el estadio 24HH participa en el desarrollo de la región proximal o tronco de la arteria pulmonar y de a aorta.

Este modelo y nuestros hallazgos serán útiles para distinguir los segmentos que constituyen el extremo cefálico del corazón embrionario, información indispensable para interpretar correctamente los resultados obtenidos de los estudios a nivel ultraestructural, genético y molecular, tanto en aves como en mamíferos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- El extremo cefálico de las crestas del cono señala el límite entre estas crestas y las del tronco y es un buen parámetro para poder distinguir estas estructuras.
- 2.- El tronco del corazón embrionario es el segmento comprendido entre el extremo cefálico de las crestas del cono y el saco aórtico.
- 3.- Basados en los límites del Cono y el Tronco encontramos que sus paredes siempre se mantuvieron rodeadas de células miocárdicas.
- 4.- El tronco embrionario no da origen a la región proximal (troncos) de la arteria Pulmonar y la Aorta. Esta región de las grandes arterias se forma a partir del saco Aórtico que se proyecta a la cavidad pericárdica hacia el estadio 26HH.
- 5.- El tronco embrionario solo da origen al aparato valvular de la arteria pulmonar y de la aorta y la pared miocárdica que los rodea, no forma pared arterial.
- 6.- Los miocitos adyacentes a las crestas del tronco pierden sus uniones intercelulares e invaden la matriz extracelular.
- 7.- Los fibroblastos producto de la transformación de los miocitos, conjuntamente con el mesénquima de la región proximal de las crestas del tronco (cercanas al cono), forman el anillo de inserción de las válvulas pulmonares, mientras que la región más cefálica participa en el desarrollo de las sigmoideas.
- 8.- Nuestros resultados apoyan la propuesta de Argüello sobre la transformación de los miocitos del tronco en fibroblastos de tejido conectivo.

LITERATURA CITADA

- 1.- Withers CP. 1995. Comparative Animal Physiology. Saunders College Publishing Fort Worth, Philadelphia, San Diego, New York, Orlando, Austin, San Antonio, Toronto, Montreal, London, Sydney, Tokyo. 665-725.
- 2.- Goor DA, Lillehei CW. 1975. Congenital malformations of the heart. The Anatomy of the heart. En: Embryology, anatomy and operative considerations. New York. Grune and Stratton. p 1-37
- 3.- Anderson RH, Becker A. 1981. Atlas fotográfico de anatomía cardíaca. Ediciones Doyma S. A. Barcelona. p 3. 2 - 4.19
- 4.- De la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Palomino MA. 1989. The primitive cardiac regions in the straight tube heart (Stage 9-) and their anatomical expression in the mature heart: an experimental study in the chick embryo. J Anat 165: 121-31
- 5.- De la Cruz MV, Sánchez-Gómez C. 1998. Straight tube heart . Primitive cardiac cavities vs. Primitive cardiac segments. En: de la Cruz MV and Markwald R, editores. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin Birhäuser. p. 85-98.
- 6.- Cayré R, Valencia-Mayoral P, Coffe - Ramírez V, Sánchez Gómez C, Angelini P, de la Cruz MV. 1993. The right atrioventricular valvular apparatus in the chick heart. Acta Anat 148: 27-33
- 7.- De la Cruz MV y Markwald R. 1998. Embryological developmen of the ventricular inlets. Septation and atrioventricular valve apparatus. En: de la Cruz MV

and Markwald R, editores. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. p 131-155.

8.- De la Cruz MV. 1998. Embryological development of the outlet of each ventricle. En: de la Cruz MV and Markwald R, editores. Living Morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. p 157-168.

9.- De la Cruz MV. 1998. Primitive Cardiac Segment, Normal Heart and Congenital Heart Diseases. En: de la Cruz MV and Markwald R, editores. Living Morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. p 219-229

10.- De la Cruz MV, Cayré R, Arista Salado O, Sadowinski S, Serrano A. 1992. The infundibular interrelationships and the ventriculo-arterial connection in double outlet right ventricle. Clinical and surgical implications. Int J Cardiol. 35: 153-164.

11.- De la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Arteaga M, Argüello C. 1977. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. J Anat. 23: 651-86.

12.- Testud-Latarjed 1933. Tratado de anatomía humana, Tomo II. Salvat, Barcelona. p 28- 35

13.- Fawcett DW. 1995. Histología. Duodécima edición. Editorial Interamericana; McGraw-Hill; p 447-453

14.- Van Mierop LHS. 1969. Embryology. In Ciba Collection of Medical Illustration, vol V, The heart. Netter FH, Yonkman FF, editors. New York. Ciba Foundation. p112-120.

15.- Geneser F. 2000. Histología. Tercera edición, Editorial Médica Panamericana p 378-380

16.-. Davis CL. 1927. Development of the human heart from its appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. Carnegie Inst Wash Contrib Embryol. 19: 245-284.

17.-Kramer TC. 1942. The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the interventricular septum in the human heart. Am J Anat. 71: 343-370.

18.- De la Cruz MV y Markwald R. 1998. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. pp. 228.

19.- Doménech JM. 1986. Desarrollo del corazón. En: Cardiología; Soler J, Bayés A. Ediciones Doyma. Barcelona . p 3-13

20. De la Cruz MV. 1998. Torsion and looping of the cardiac tube and primitive cardiac segments. Anatomical manifestations. En: de la Cruz MV and Markwald R, editores. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. p 99-120.

21.-De la Cruz MV; Sánchez Gómez C, Cayré R. 1991. The Developmental components of the ventricles: their significance in congenital cardiac malformations. Cardiol Young. 1:123-8

22.- García Peláez I; Arteaga M. 1993. Experimental study of the development of the truncus arteriosus of the chick embryo heart. Anat Rec. 227:378-384.

23.-. De la Cruz MV, Giménez-Ribotta M, Saravalli O, Cayré R. 1983. The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to the development of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. Am J Anat 166: 63-72.

24.- De la Cruz MV, Quero-Jiménez M,Arteaga M,Cayré R. 1982.Morphogénese du septum interventriculaire. *Coeur* 13:443-8

25.- Goor DA Diseche R and Lillehei CW. 1972. The conotruncus. I. Its normal inversion and conus absorption. *Circulation*. 46:375-384.

26.- Thompson RP. 1987. Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: movements of autoradiographic tattoos during septation. *Anat Rec*. 218:437-440.

27.- Watanabe M, Choudhry A, Berlan M, Singal A, Siwik E, Mohr S, Fisher SA. 1998. Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development*. 125: 3809-3820.

28.- De Vries PA and Saunders JB. 1962. Development of the ventricles and spiral outflow tract in the human heart. A contribution to the development of the human heart from age group IX to age group XV. *Carnegie Inst Wash Contrib Embryol*. 37: 89-114.

29.- Tongue M. 1869. Observations on the development of the semilunar valves of the aorta and pulmonary artery of the heart of the chick. *Philos Trans R Soc Lond* 159:387-412

30.- Qayyum RS, Weeb S, Anderson RH, Verbeek FJ, Brown NA. 2001.Septation and valvar formation in the outflow tract of the embryonic chick heart. *Anat Rec* 264:273-283.

31.- Pexieder T. 1978. Development of the outflow tract of the embryonic heart. In: Rosenquist GC, Bergsma D, editors. Morphogenesis and malformation of the cardiovascular system. Birth defects: Original Article Series, Vol. XV. New York. Alan R Liss Inc. p 29-68.

32.- Waldo KL, Kirby ML. 1993. Cardiac neural crest contribution to the pulmonary artery and sixth aortic arch artery complex in chick embryos aged 6 to 18 days. *Anat Rec* 237: 385- 399.

33.- Sánchez Gómez C, Contreras A, Pliego P, L. 2002. Desarrollo Embrionario del tracto de salida del ventrículo derecho. Estudio de marcaje en vivo en embrión de pollo. *Bol Med Hosp Infant Méx.* Vol. 59 : 592.

34.- Ya J, Van den Hoff MJB, de Boer PAJ, Tesink-Taekena S, Franco D, Moorman AFM, Lamers WH.1998. Normal development of the outflow tract in the rat. *Circ Res* 82: 464-472.

35.- Argüello C, de la Cruz MV, Sánchez Gómez C. 1978. Ultrastructural and experimental evidence of myocardial cell differentiation into connective tissue cells in embryonic chick heart. *J Mol Cell Cardiol.* 10:307-315.

36.-Hamburger B, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 88: 49-92.

37.- Sánchez Gómez C. 1990. Desarrollo embriológico de las cámaras de entrada ventriculares (inlets). Estudio experimental en el embrión de pollo. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias. Facultad de Ciencia UNAM. p 25-28.

38.- Sánchez Gómez C, Pliego L, Contreras A. 2002. Establecimiento de una técnica para el procesamiento de corazón embrionario para obtener cortes histológicos de corazón de embrión de pollo en el estadio 22HH. *Memorias del Congreso de Histología , Oaxaca de Juárez.* p 27

39.- Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodríguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR. 2001. The outflow of the head is recruited from a novel heart-forming field . *Dev Biol* 238: 97-109.

40.- Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML. 2001. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 128: 3179-3188.

41.- Seichert V. 1965. Study of the tissue and organ angle shifts by the method of plastic linear marking. *Fol. Morpho.* 13:228-238.

ANEXOS

ANEXOS

1.-Técnica de Marcaje en vivo

Una vez desinfectado el cascarón del huevo, limpiándolo con alcohol al 70%, se abre una pequeña ventana de aproximadamente 1cm². Para exponer el corazón, se retiran la membranas coriónica, vitelina y pericárdica. A 20 embriones del estadio 22HH se les colocaron dos marcas de distinto color, una negra y otra roja, preparadas con una modificación de la técnica de Seichert⁴¹. La primera se ubicó en la pared anterior del cono al nivel de los surcos cono-ventriculares y la segunda se colocó en la región del tubo cardiaco que cambia de una dirección caudocefálica a una dirección ventrodorsal, al nivel del extremo cefálico de las crestas del cono. Una vez marcado el corazón, la ventana en el cascarón del huevo se recubre con un papel autoadhesivo. Los embriones se reincuban y se sacrifican en diferentes etapas, hasta alcanzar el estadio 36HH (corazón maduro), en el que es posible conocer la expresión anatómica de las estructuras embrionarias del corazón. Se toman fotografías al inicio y al final del experimento, para tener un registro gráfico de la ubicación de las marcas. Todo este procedimiento se lleva a cabo en un cuarto de cultivo en condiciones de esterilidad.

Los embriones obtenidos en los estadios deseados se sacrifican y se fijan para observar la ubicación precisa de las marcas y procesarlos para llevar a cabo los estudios anatómicos e histológicos.

2.- FIJACIÓN POR PERFUSIÓN

Una vez que se corroboró que los embriones estuvieran en el estadio de interés, se retiró la cinta adhesiva de la ventana y dentro del huevo se colocó un anillo de papel filtro sobre el saco vitelino que rodeaba al embrión, esto con la finalidad de no dañarlo. Con una tijera curva se cortó la membrana vitelina alrededor del anillo, se extrajo el embrión adherido al anillo y se lavó con una solución de Ringer, evitando que se desprendiera del anillo, para facilitar su manipulación, ya que en los estadios 22HH y 26HH los embriones son muy pequeños y frágiles. El corazón se fijó por perfusión, inyectando a través del seno venoso, con la ayuda de una

pipeta Pasteur de punta muy delgada. Para los estudios histológicos se utilizó el Bouin alcohólico, mientras que para los anatómicos se usó el glutaraldehído al 2.5%. El procedimiento quirúrgico y la inyección se llevaron a cabo bajo un microscopio estereoscópico Zeiss.

SOLUCIONES

1.-Solución amortiguadora de fosfatos (PBS 2X)

Cloruro de sodio	11.94 g
Fosfato de sodio	8.51 g
Fosfato de potasio	3.48 g
Aforar con agua destilada hasta un volumen de	500 ml

2.- Solución de Ringer

Para preparar 9 litros:

Cloruro de sodio	90 g
Cloruro de potasio	3.75 g
Cloruro de calcio	2.16 g

3.- Solución de Bouin alcohólico

Para preparar 100 ml:

Solución saturada alcohólica al 70% de ácido pícrico	75 ml
Formol 37- 40 %	25 ml
Ácido acético glacial	5 ml

Soluciones para la tinción de Hematoxilina – Eosina

- HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina en Cristales	2.5 g
Alcohol 96%	25 ml
Alumbre de amonio y potasio	50 g
Oxido rojo de mercurio	1.25 g
Agua destilada	500 ml

Procedimiento

Disolver la hematoxilina en el alcohol, calentando ligeramente y separando el recipiente. Disolver el alumbre en 100 ml de agua destilada, calentando ligeramente, se mezclan las dos soluciones y se lavan los dos recipientes con los restantes 100 ml de agua. Hervir lo más rápidamente posible y cuando se inicia el hervor, retirar del fuego, añadir el óxido rojo de mercurio, seguir calentando a fuego muy lento hasta que la solución tome color rojo púrpura. Se enfría rápidamente con agua corriente de la llave. Filtrar diez veces para eliminar residuos de amonio. A cada 100 ml de la solución de hematoxilina añadir de 4 a 5 ml de ácido acético glacial, la mitad al acabar la preparación y la otra mitad al usarla.

- EOSINA CARNEGIE

Eosina amarillenta ó azulosa	4 g
Alcohol etílico 96 %	100 ml
Agua destilada	300 ml

Procedimiento

Disolver primero la eosina en agua y añadir después el alcohol. Dejar madurar durante tres semanas, a la luz y en frasco claro. Guardar en el mismo frasco. Si se usa eosina amarillenta, para lograr una tinción adecuada, añadir tres gotas de ácido acético glacial por cada 100 ml de colorante.

Método de tinción H - E

1.- Meter los cortes montados en portaobjetos de vidrio a la estufa a 58-60° durante una hora.

2.- Desparafinar. 2 cambios de xileno de 5 minutos cada uno.

3.- Hidratar:

Alcohol absoluto	2 min
Alcohol 96%	2 min
Alcohol 85%	2 min

Alcohol 70%	2 min
Alcohol 50%	2 min
Alcohol 35%	2 min
Agua destilada	5 min
4.- Hematoxilina de Harris	5 min
5.- Agua destilada	3 min
6.- Alcohol al 70%+ 5 gotas de HCL	Paso rápido
7.-Agua de la llave + 1 gota de amoniaco	3 min
8.- Agua destilada	5 min
9.- Eosina Carnegie	5min
10.- Alcohol 96%	Rápido
11.- Alcohol 96%	Rápido
12.- Alcohol absoluto	Rápido
13.- Alcohol absoluto	3 min
14.- Xileno III	5 min
15.- Xilol IV	5 min
16.- Montar en medio resinoso	