

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



"CONTRIBUCION DE LAS POBLACIONES CELULARES
ADYACENTES AL EXTREMO CAUDAL DEL CORAZON EN
TUBO RECTO (st. 9-) EN EL DESARROLLO DEL ASA
BULBOVENTRICULAR (st. 12) ESTUDIO
EXPERIMENTAL EN EL EMBRION DE POLLO"

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a:

ROCIO GEORGE TELLEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

Agosto de 1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	2
III.- ANTECEDENTES HISTORICOS	9
IV.- HIPOTESIS	11
V.- OBJETIVO	11
VI.- MATERIAL Y METODO	12
VII.- RESULTADOS	18
VIII.- DISCUSION	22
IX.- CONCLUSIONES	28
X.- APENDICE	29
XI.- BIBLIOGRAFIA	37
XII.- ILUSTRACIONES	47

Al personal del Departamento de Biología del desarrollo y Teratogenesis

Experimental:

Biol. Victor Coffe, por su apoyo técnico y moral en el desarrollo del trabajo.

M. en C. Ricardo Moreno, Por su apoyo en la computación y por haber revisado el trabajo escrito.

Araceli, por su apoyo en las correcciones del escrito

Mario, por su apoyo en la impresión de las fotos

A Jesus Vega y Homero George, por su apoyo artistico

A Ariel Alarcón por sus muy inteligentes y constructivas criticas en todo el trabajo.

RESUMEN

Con el propósito de investigar si las poblaciones celulares extracardíacas, contribuyen en la formación del primordio de las cámaras de entrada ventriculares, se realizaron experimentos de marcaje *in vivo* en el corazón del embrión de pollo. El marcaje se inició en el estadio de tubo recto (estadio 9 HH) y las marcas fueron rastreadas hasta la etapa de asa bulboventricular (estadio 12 HH). Se usaron como marcas partículas de óxido de hierro, una mezcla de gelatina/tinta china y partículas de carbón. También se llevaron a cabo estudios anatómicos e histológicos con microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. Nuestros resultados demuestran que dicho primordio se desarrolla en el estadio 12 debido a la contribución de la migración en sentido caudo-cefálico de poblaciones celulares extracardíacas adyacentes al extremo caudal derecho e izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9-); dichas poblaciones celulares extracardíacas se localizan desde el extremo caudal del corazón en tubo recto hasta una distancia entre 150 y 250 micrómetros caudal a dicho extremo. Además las poblaciones celulares extracardíacas del lado izquierdo del corazón en tubo recto, contribuyen a la formación del (estadio 9), de la pared ventral del primordio de las cámaras de entrada ventriculares y las del lado derecho a su pared dorsal y se confirma, que el primordio de las cámaras de entrada ventriculares aparece en la etapa de asa bulboventricular (estadio 12). La nueva información obtenida en este trabajo, enriquece los conocimientos que poseemos sobre las regiones cardíacas primitivas y apoya la teoría epigenética respecto al desarrollo del corazón.

INTRODUCCION

El huevo o cigoto de las aves una vez fecundado, comienza una serie de divisiones mediante un mecanismo que recibe el nombre de segmentación. Este proceso da como resultado un embrión (blastodermo) formado por dos capas celulares: el hipoblasto y el epiblasto; entre ellas se localiza la cavidad subgerminal. En este estadio del desarrollo conocido como blástula, el embrión consta de dos regiones: una central denominada zona pelúcida, por ser delgada y transparente y otra periférica llamada área opaca, más gruesa y compacta. La primera, da origen al embrión y la segunda desarrolla el saco vitelino (Harrisson, et al, 1988). En esta etapa, el epiblasto extraembrionario del área opaca es adyacente a la membrana vitelina y se continúa con el epiblasto de la zona pelúcida. Por debajo del epiblasto extraembrionario, se encuentra el endodermo vitelino, constituido por una capa laxa de células con un alto contenido de vitelo que durante la gastrulación, se mueven lateralmente teniendo como sustrato la membrana basal del epiblasto extraembrionario (Eyal-Giladi and Kochav, 1976). A partir de la décima hora de incubación y durante el primer día de la misma, las células del epiblasto extraembrionario cercanas a su borde, migran activamente y se adhieren a la superficie interna de la membrana vitelina (New, 1959). Este grupo de células migratorias, denominado borde celular (Downie and Pegrum, 1971) o margen de proliferación (Bellairs and New, 1962), crece alrededor del vitelo y termina por rodearlo después del cuarto día de incubación. Este fenómeno de epibolia, es el responsable de la tensión radial ejercida en el área pelúcida, indispensable para que ocurra el desarrollo embriológico normal (Kucera and Burnand, 1987). En las primeras horas de incubación, no se

observan cambios morfológicos significativos en la zona pelúcida del blastodisco. La primera reacción a la temperatura de incubación, es el movimiento centripeto de las células del endodermo vitelino, cuyo resultado es la condensación de la zona pelúcida, debida a la formación del hipoblasto (Harrisson, et al, 1988), que se origina principalmente por poli- ingesión de células del epiblasto (Kochav, et al, 1980; Eyal-Giladi, 1984; Weinberg, et al, 1984).

En la etapa de blástula (estadio 3 HH), existen en el embrión grupos celulares con una ubicación específica, que darán origen a sus diferentes órganos; dichas regiones se denominan preáreas órgano-formadoras (Spratt, 1946), porque las células que las constituyen tienen la capacidad de cambiar su destino final (destino prospectivo) según el tipo de células que las rodean (Spratt, 1960, 1965; Eyal-Giladi and Spratt, 1965) y las características fisicoquímicas del medio en que se encuentran (Khaner, 1989; Elis, et al, 1993). En esta etapa, existen en el epiblasto, dos preáreas cardiogénicas, ubicadas una a cada lado de la línea primitiva a nivel de su tercio medio (Spratt, 1946; Rosenquist and DeHaan, 1966).

Continuando con el desarrollo, las células del epiblasto, mediante un proceso de proliferación y migración muy activo, sufren un reordenamiento y forman un embrión constituido por tres capas blastodérmicas: ectodermo, mesodermo y endodermo. Este estadio se conoce con el nombre de gástrula y en él, la migración celular es el proceso básico del desarrollo que juega un papel preponderante. Dicho proceso probablemente es regulado por las características fisicoquímicas de la matriz extracelular (Boucat, et al, 1984; Harrisson, 1990) y por las interacciones célula-célula y célula-sustrato que se establecen entre los diferentes grupos celulares que constituyen el embrión (Harrisson, et al, 1988).

Los movimientos morfogenéticos que ocurren en el área pelúcida durante la gastrulación, dan como resultado la organización de la línea primitiva, el establecimiento de la simetría bilateral (Eyal-Giladi, 1984; Bellairs, 1986) y la formación del mesodermo (Sanders, 1986a), el hipoblasto y el endodermo definitivo (Bellairs, 1982; Eyal-Giladi, 1984). Es importante señalar, que recientemente Low y McClugage (1993), mediante estudios de microscopía electrónica de barrido, concluyeron que el endodermo primitivo tiene un triple origen: el hipoblasto y células del margen y de la región ventral del área pelúcida. Estos movimientos morfogenéticos, también crean una nueva relación entre las distintas poblaciones celulares lo que permite su interacción normal, indispensable para que se lleve a cabo la determinación de las células. Además en esta etapa, se establece el patrón general del desarrollo embriológico y ocurren cambios en la actividad metabólica de las células, medidos por el consumo de oxígeno y la utilización de glucógeno. También es la fase en la que comienzan a expresarse los genes del embrión (Balinsky, 1981). Mediante los experimentos de aislamiento y explante de diferentes regiones del blastodermo, realizados en embriones de la etapa de gástrula, se han descrito los mapas de destino prospectivo o áreas órgano-formadoras y se demostró que sus células ya están determinadas para dar origen a un tipo celular específico (Rawles, 1936; Rosenquist, 1966; Rosenquist and DeHaan, 1966; Eyal-Giladi, 1984).

En el embrión en la etapa de gástrula (estadio 4 HH), existen en el mesodermo, dos áreas cardiogénicas localizadas una a cada lado de la línea primitiva y que se extienden desde el Nódulo de Hensen hasta el tercio anterior de la línea primitiva. Dichas áreas tienen una forma oval y se encuentran separadas en su extremo cefálico por una zona medial, no cardiogénica, de

aproximadamente 0.4 mm (Rawles, 1943; DeHaan, 1963; Stalsberg and DeHaan, 1969) (Fig. 1). En la etapa de gástrula tardía (estadio 5 HH), el mesodermo se separa en dos láminas, el somático relacionado con el ectodermo y el esplácnico en contacto con el endodermo. En este último, se localizan las células cardiogénicas, que inmediatamente después del proceso de separación de las dos capas mesodérmicas, migran en dirección cefalomedial, convergen en la superficie medioventral del embrión y forman la creciente o placa cardiogénica (DeHaan, 1963) (Fig. 2a,b). Dicha creciente tiene la forma de una U invertida y se ubica en posición cefálica al pliegue subcefálico. Linask, et al, (1988) encontraron mediante estudios en el embrión de pollo, que en las etapas tempranas del desarrollo, las células del mesodermo precardiaco, tienen una vía de migración constituida principalmente por fibronectina y otros componentes de matriz extracelular. Estos autores también detectaron un gradiente de fibronectina a nivel de las áreas cardiogénicas. Dicha sustancia es más abundante en la región cefálica y se encuentra en menor cantidad en la región caudal. Es importante señalar, que a pesar de que el papel primordial de la fibronectina en los tejidos en desarrollo, parece ser la asociación de las células al sustrato, controlando de ésta manera la migración celular (Boucaut, et al, 1984; Sanders, 1989), puede ser que también actúe directamente en la diferenciación celular.

Poco antes de que finalice la gastrulación, se inicia el proceso de tubulación en el que las capas germinales del embrión se pliegan y forman estructuras tubulares. En este estadio, debido al desarrollo del intestino portal anterior y a los cambios morfológicos que ocurren en el sistema nervioso cefálico, la creciente cardiogénica se desplaza de su posición cefálica, adquiere una posición ventral con respecto al intestino anterior y forma los primordios

cardíacos (Fig. 2b). Esta es la primera vez que se expresa morfológicamente el corazón (Manasek, 1976). Inmediatamente después, en el estadio 8 HH, ambos primordios cardíacos empiezan a fusionarse en la región media ventral del embrión y en el estadio 9^o forman un canal abierto dorsalmente, cuya pared dorsal es la pared ventral del intestino anterior (Fig. 2c). Esta estructura se ha denominado incorrectamente, tubo cardíaco primitivo o corazón en tubo recto. Este estadio corresponde a la etapa de preasa (De la Cruz y Cayré, 1986) y el el corazón está constituido exclusivamente por el primordio de la porción trabeculada de ambos ventrículos (De la Cruz, et al, 1989).

En estadios subsiguientes de la cardiogénesis (estadios 10-12 HH), además de que se forma el tubo cardíaco por la fusión del borde derecho e izquierdo del corazón en forma de canal (Fig. 2e-g), aparecen nuevas regiones en el corazón (De la Cruz, et al, 1989) y ocurren cambios morfológicos importantes en el tubo cardíaco. En la etapa de asa temprana (estadio 12 HH) (De la Cruz y Cayré, 1986), surgen el cono o primordio de los infundíbulos ventriculares (De la Cruz, et al, 1977), el primordio de las cámaras de entrada ventriculares (De la Cruz, et al, 1987; Sánchez-Gómez, 1990) y los atrios primitivos (Castro-Quezada, et al, 1972). Además, en esta etapa del desarrollo (estadios 10-12 HH), el tubo cardíaco se tuerce a la derecha y adquiere la forma de un asa, convexa a la derecha y cóncava a la izquierda, denominada asa bulboventricular. Dicha asa se encuentra ubicada entre el cono y los atrios, posee una pared dorsal y una pared ventral y está formada por dos ramas, una ascendente que se continúa con el cono y es convexa a la derecha (primordio de la porción trabeculada del ventrículo derecho) (De la Cruz, et al, 1977, 1989) y una rama descendente, cóncava e izquierda, constituida por el primordio de la porción

trabeculada del ventrículo izquierdo cefálicamente y el de las cámaras de entrada ventriculares caudalmente (De la Cruz, et al, 1989; Sánchez-Gómez, 1990).

El proceso de torción del asa bulboventricular ha sido explicado de muy diversas maneras, sin que en la actualidad exista un conocimiento preciso a este respecto. Por ejemplo, Patten (1922) consideró que la causa de la flexión del asa bulboventricular a la derecha, es el crecimiento mayor del tubo cardíaco con respecto a la cavidad pericárdica que lo rodea. Esta hipótesis se ha rechazado, debido a que se demostró que el corazón en etapa de tubo recto, cultivado "in vitro" o como trasplante aislado intracelómico, es capaz de curvarse a la derecha (Butler, 1952; Sánchez-Gómez, 1972). Davis (1927) mediante las técnicas de la embriología descriptiva en el embrión humano, consideró que el corazón se tuerce a la derecha debido a un crecimiento diferencial de las distintas regiones que constituyen el tubo cardíaco. DeHaan (1959), OrtsLlorca (1967) y VanPraag and DeHaan (1967), postularon la dominancia de potencialidades morfogenéticas del primordio cardíaco izquierdo sobre el derecho como la causa de la torción del asa a la derecha. También se ha considerado que en el tubo cardíaco, existen diferentes índices de proliferación celular que determinan la torción del asa bulboventricular hacia la derecha (Sissman, 1966; Stalsberg, 1969; Sánchez-Gómez, 1972). Finalmente los resultados obtenidos, mediante los estudios realizados implantando la región caudal o cefálica del área cardiogénica de un embrión de codorniz de los estadios 5-7 en el mesodermo precardiaco de embriones de pollo de los mismos estadios, permitieron proponer la existencia de dos sustancias morfógenas cuyas concentraciones regulan el proceso de torción del asa bulboventricular. Una de ellas producida en la región anterior (cefálica) de las áreas cardiogénicas,

promueve la formación del asa a la derecha, la otra, secretada en la región posterior (caudal) de las áreas cardiogénicas, inhibe la formación del asa bulboventricular (Easton, et al, 1992).

La siguiente etapa de la cardiogénesis, es la de postasa, que comprende a su vez dos subestadios, el de postasa temprana y el de postasa tardía (De la Cruz y Cayré, 1986), en los que se concluye el desarrollo embriológico del corazón.

ANTECEDENTES HISTORICOS

Davis (1927) estableció mediante las técnicas de la embriología descriptiva, que el corazón del embrión humano en el estadio de tubo recto, está constituido por zonas separadas por surcos incompletos, cada una de las cuales da origen a una cavidad cardíaca definitiva completa por lo que las denominó cavidades cardíacas primitivas. Dichas regiones en sentido cefalocaudal son: el bulbo aórtico, el bulbus cordis, el ventrículo primitivo y los atrios (Fig.3) que darán origen respectivamente a las grandes arterias, al ventrículo derecho, al ventrículo izquierdo y los atrios derecho e izquierdo. Posteriormente DeVries and Saunders (1962) modificaron la nomenclatura propuesta por Davis (1927), pero mantuvieron el concepto de cavidades cardíacas primitivas.

Estudios realizados con las técnicas de la embriología descriptiva en el embrión de pollo (Patten, 1929; Stalsberg and DeHaan, 1969; De la Cruz, et al, 1972), describieron las mismas cavidades cardíacas, con el mismo destino prospectivo que en 1927 Davis había establecido en el hombre.

El concepto de cavidades cardíacas primitivas fue cuestionado, debido a los resultados obtenidos mediante las técnicas de la embriología experimental en el corazón del embrión de pollo (Rychter and Leméz., 1965; Castro-Quezada, et al., 1972; Argüello, et al., 1975; De la Cruz, et al., 1977, 1987, 1989). Usando estas técnicas, se demostró que en el corazón en tubo recto no están presentes los primordios de cada una de las cavidades cardíacas definitivas, por consiguiente no existen las cavidades cardíacas primitivas, en esta etapa del

desarrollo, sólo existe en el corazón el primordio de la porción trabeculada del ventrículo derecho cefálicamente y el de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo caudalmente (De la Cruz, et al, 1989) (Fig. 4A).

También se ha encontrado que en el estadio de asa (estadio 12), surge en el extremo cefálico del corazón, en posición cefálica al asa bulboventricular, el cono o primordio de los infundíbulos ventriculares (De la Cruz, et al, 1977), y en el extremo caudal del asa, el primordio de las cámaras de entrada ventriculares (De la Cruz, et al, 1987; Sánchez-Gómez, 1990). En este mismo estadio también aparecen los atrios primitivos en posición caudal al primordio de las cámaras de entrada ventriculares (Castro-Quezada, et al, 1972) (Fig.4B). Además se demostró que la región más cefálica del asa bulboventricular en el estadio 12, que corresponde al cono (De la Cruz, et al, 1977), se desarrolla por la incorporación de poblaciones celulares extracardiacas, adyacentes al extremo cefálico del corazón en tubo recto (Argüello, et al, 1975).

HIPOTESIS

Debido a que el extremo caudal del corazón en tubo recto (estadio 9'), corresponde al límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares, que aparece en el estadio de asa (estadio 12), formando el segmento caudal de su rama descendente (De la Cruz et al. 1987; Sánchez-Gómez 1990.); pensamos que las poblaciones celulares extracardiacas adyacentes a dicho extremo, contribuyen a la formación del primordio de las cámaras de entrada ventriculares. Además debido a que la línea de fusión ventral de los primordios cardíacos corresponden a la superficie convexa del asa (estadio 12) (Stalsber y DeHaan, 1969); suponemos que las poblaciones caudales derechas, participan en la formación de la pared dorsal del segmento y las poblaciones izquierdas a la pared ventral.

OBJETIVO

Investigar si las poblaciones celulares extracardiacas adyacentes al extremo caudal derecho e izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9' HH), contribuyen a la formación del primordio de las cámaras de entrada ventriculares, que aparece en el estadio 12 y constituye la región caudal de la rama descendente del asa bulboventricular.

MATERIAL Y METODO

Se usaron huevos fértiles de gallina *Gallus domesticus* de la raza Plymouth rock, incubados a una temperatura de 37.5°C y una humedad de 86-87%. La edad de los embriones se determinó usando la clasificación de Hamburger and Hamilton (HH) (1951), que relaciona la cronología con la morfología.

Los experimentos se realizaron en un cuarto de cultivo previamente esterilizado con radiaciones de luz ultravioleta y utilizando una campana de flujo laminar. El material de cristalería se esterilizó en una autoclave a 15 lb/pulg² durante 15 minutos y el material quirúrgico en una solución de benzal al 10%.

Con el propósito de estudiar, si poblaciones celulares extracardiácas adyacentes al extremo caudal izquierdo y derecho del corazón en tubo recto (estadio 9), contribuyen a la formación del primordio de las cámaras de entrada ventriculares, que constituyen el segmento caudal de la rama descendente del asa bulboventricular en el estadio 12; se realizaron experimentos de marcaje, estudios de anatomía microscópica, histología y micro-cinematografía, en embriones del estadio 9.

A.- Experimentos de Marcaje.

Se hicieron dos series de experimentos de marcaje (Tabla 1). La primera serie, está dirigida a establecer la relación entre el extremo caudal izquierdo y derecho del corazón en tubo recto (estadio 9) con la pared ventral y dorsal de la zona que corresponde al límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares en el asa bulboventricular (estadio 12). La segunda serie, se hizo con el propósito de buscar en las poblaciones celulares extracardíacas adyacentes al extremo caudal del corazón en tubo recto, el límite atrial de las cámaras de entrada ventriculares, para lo cual, se rastrearon estas células, hasta encontrarlas en el surco atrio-ventricular en el estadio de asa, que es el límite atrial de dichas cámaras.

Debido a que en los estadios tempranos de la cardiogénesis, el embrión se encuentra con su superficie ventral descansando sobre el vitelo, no es posible abordar el corazón con el embrión "in ovo", por lo que se utilizó la técnica de cultivo "in vitro" de New (1955) (2.1), que permite exponer el embrión con su superficie ventral hacia el observador (Fig. 5).

Se usaron como marcas, partículas de óxido de hierro (Stalsberg and DeHaan, 1969) (2.6.1), una mezcla de gelatina/tinta china (Seichert, 1965) (2.6.2) y partículas de carbón (Spratt, 1946). Los embriones se marcaron en el estadio 9 (corazón en tubo recto) y se reincubaron en una incubadora NARCO a 37.5°C, 95% de humedad y 5% de CO₂, hasta que alcanzaron el estadio 12. El corazón fue expuesto mediante la técnica de Castro-Quezada, et al., modificada

(1972) (2.5) (Fig. 6). Los embriones se fotografiaron al inicio y al final de los experimentos (2.8).

Serie I.

Esta serie se realizó para establecer la relación existente entre los extremos caudales derecho e izquierdo del corazón en tubo recto con la pared dorsal y ventral de la zona que corresponde al límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares en la etapa de asa bulboventricular (estadio 12). Esta serie se dividió en dos grupos:

Grupo 1.

Con el propósito de investigar si el extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9^o) corresponde a la pared dorsal o ventral de la región en que se encuentra el límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares del corazón en etapa de asa bulboventricular (estadio 12), a

veinticinco embriones del estadio 9^o se les colocó una partícula de óxido de hierro (marca a) en la zona media del extremo caudal izquierdo del corazón y se rastreó hasta el estadio 12 (Fig. 7). Tres embriones de ésta serie se filmaron durante 3 segundos a intervalos de 30 minutos (2.9).

Grupo 2.

Con el objeto de investigar si el extremo caudal derecho del corazón en tubo recto (estadio 9^o), corresponden a la pared dorsal o ventral de la región en

que se encuentra el límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares del corazón en etapa de asa bulboventricular (estadio 12), veinte embriones del estadio 9 se marcaron con una partícula de óxido de hierro (marca f) en el extremo caudal derecho del corazón y se cultivaron hasta el estadio 12 (Fig. 12).

Serie II.

Esta serie se realizó con el propósito de buscar en las poblaciones celulares extracardiacas adyacentes al extremo caudal del corazón en tubo recto, el límite atrial de las cámaras de entrada ventriculares, para lo cual, se rastrearon estas células, hasta encontrarlas en el surco atrio-ventricular en el estadio de asa, que es el límite atrial de dichas cámaras. 41 embriones del estadio 9 se marcaron en una región caudal extracardiaca, cada vez más alejada del extremo caudal izquierdo del corazón (marcas b, c, d, e) y se reincubaron hasta alcanzar el estadio 12 (Figs. 8; 9; 10; 11). Se usó como marca una mezcla de gelatina/tinta china (Seichert, 1965) (2.6.2) o partículas de carbón (Spratt, 1946).

La ubicación exacta de la marca al final de las dos series de experimentos, se logró transparentando los embriones y tiñendolos en bloque con verde luz (2.4).

B.- Estudios Anatómicos e Histológicos.

Se efectuó un estudio anatómico cuidadoso con microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido, para conocer los cambios morfológicos en el corazón de los embriones de los estadios del desarrollo que fueron objeto de este trabajo. Cinco embriones del estadio 9 y cinco del estadio 12, se prepararon para llevar a cabo el estudio del corazón completo con el microscopio electrónico de barrido (2.7) (Fig. 13). Cinco embriones del estadio 9 y cinco del estadio 12 fueron procesados para obtener cortes histológicos (2.2). Dichos embriones se fijaron en Bouin (1.2), se incluyeron en paraplast, se realizaron cortes de 7 micrómetros de espesor. Los cortes seriados de tres embriones de cada estadio, se tiñeron con hematoxilina/eosina (2.3.1);

las dos series restantes se desecaron por punto crítico, se recubrieron con oro y se observaron en el microscopio electrónico de barrido (Figs. 14; 15).

EXPERIMENTOS DE MARCAJE

Experimento		Num. de embriones	Inicio Estadio 9-
SERIE I	Gpo. 1	25	Extremo caudal izquierdo (marca a) (e.c.i.)
	Gpo. 2	20	Extremo caudal derecho (marca f) (e.c.d.)
SERIE II		3	100 - 200 micrometros del e.c.i (marca b)
		24	150 - 250 micrometros del e.c.i. (marca c)
		10	300 - 400 micrometros del e.c.i. (marca d)
		4	400 micrometros o mas del e.c.i. (marca e)

TABLA 1

RESULTADOS

A.- Experimentos de Marcaje.

Serie I.

Grupo 1.

Los 25 embriones a los cuales se les colocó la marca (a) en el extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9') (Fig. 7 A, C), dicha marca se encontró en la rama caudal (descendente) del asa bulboventricular, en su pared ventral, a una distancia promedio de 110 micrómetros del surco interventricular izquierdo, que corresponde al límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares (estadio 12), (Fig. 7 B, D). Además caudal a dicha marca y cefálico a los surcos atrio-ventriculares, aparece un nuevo segmento cardíaco (compare A con B en Fig. 7). Los embriones filmados presentaron los mismos resultados.

Grupo 2.

Los 20 embriones a los que se les colocó una partícula de óxido de hierro (marca f), en el extremo caudal derecho del corazón en tubo recto (estadio 9') (Fig. 12 A, C), la marca se encontró en el estadio 12, en la rama caudal (descendente) del asa bulboventricular, en su pared dorsal, en la zona que corresponde al límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada. La marca se observó por transparencia (Fig. 12 B, D). Además, caudal a dicha

marca y en posición cefálica respecto a los surcos atrio-ventriculares, aparece un nuevo segmento cardíaco (compare A con B en Fig. 12)

Serie II.

Los 41 embriones en los que se colocó una marca en las poblaciones celulares extracardiácas, adyacentes al extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9'), a diferentes distancias de dicho extremo, presentaron la marca con la siguiente localización:

Grupo a.- Los 3 embriones en los que se puso la marca (b) en el estadio 9' en las poblaciones celulares extracardiácas, adyacentes al extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto, a una distancia de 100 a 150 micrómetros (Fig.8 A, C), se encontró la marca en el estadio 12 en el primordio de las cámaras de entrada ventriculares en su pared ventral (Fig. 8 B; D).

Grupo b.- Los 24 embriones en los que se colocó la marca (c) en el estadio 9', en las poblaciones celulares extracardiácas a una distancia de 150 a 250 micrómetros, caudal al extremo caudal del corazón en tubo recto (Fig. 9 A, C), se encontró la marca en el estadio 12, en la superficie ventral de la región del surco atrioventricular derecho, que corresponde al límite atrial del primordio de las cámaras de entrada ventriculares (Compare B y D con A y C en Fig, 9).

Grupo c.- Los 10 embriones en los que se colocó la marca (d) en el estadio 9 en las poblaciones celulares extracardiacas, a una distancia de 300 a 400 micrómetros, caudal al extremo caudal del corazón en tubo recto (Fig. 10 A, C), dicha marca se encontró en el estadio 12 en la región atrial en la superficie ventral (Fig. 10 B, D).

Grupo d.- En los 4 embriones en los que la marca (e) se colocó a una más caudal de 400 a 600 micrómetros del extremo caudal del corazón en tubo recto (Fig. 11 A, C), dicha marca se encontró en el estadio 12 fuera del corazón (Fig. 11 B, D).

B.- Estudios Anatómicos e Histológicos

Las observaciones con el microscopio electrónico de barrido y los cortes seriados muestran:

Estadio 9:

En el corazón en tubo recto están presentes los surcos interventriculares derecho e izquierdo (Fig 13 A). Dichos surcos dividen al corazón en una región cefálica (porción trabeculada del ventrículo derecho) y otra caudal (primordio de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo). Además se observa la línea de fusión ventral de ambos primordios cardiacos (Fig. 13 A). Los estudios histológicos, evidencian que el corazón tiene la forma de una canal abierta dorsalmente, su pared dorsal está constituida por la pared ventral del intestino portal anterior (Fig. 14 A). Los cortes seriados observados con el microscopio

electrónico de barrido, mostraron la existencia de la cavidad pericárdica primitiva, (Fig. 14 A,B).

Estadio 12.

El corazón tiene la forma de un asa convexa a la derecha y cóncava a la izquierda y presenta una pared dorsal y una pared ventral (Fig. 13B; 15). Se hace evidente el surco interventricular izquierdo que divide al asa bulboventricular en dos ramas, una ascendente o cefálica y otra descendente o caudal y los surcos atrioventriculares, que son el límite entre la rama caudal del asa y los atrios primitivos (Fig. 13B). En este estadio, el corazón ya tiene la forma tubular (Fig. 13B; 15). Los cortes seriados muestran que se está iniciando la fusión de los bordes derecho e izquierdo del corazón (Fig. 15). Dicha fusión se inicia a nivel del surco interventricular izquierdo y se continúa cefálica y caudalmente.

DISCUSION

Las marcas (a) y (f) que se colocaron respectivamente en el extremo caudal izquierdo y derecho del corazón (estadio 9), se encontraron en la rama caudal del asa bulboventricular (estadio 12), en la zona correspondiente al límite ventricular de las cámaras de entrada ventriculares (De la Cruz, et al, 1987; Sánchez-Gómez, 1990) (Compare A con B en Figs 7, 12). Estos resultados demuestran que el extremo caudal del corazón en tubo recto (estadio 9) corresponde al límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares (estadio 12) y confirman el hallazgo de que dicho primordio aparece en el estadio 12 (corazón en etapa de asa bulboventricular) (De la Cruz et al, 1987; Sánchez-Gómez, 1990).

Además es importante señalar que no todas nuestras marcas fueron colocadas en los límites de la zona que constituye el extremo caudal derecho e izquierdo del corazón en tubo recto, sino aproximadamente en el centro del mismo. Las marcas que se colocaron en el lado izquierdo (marca a), quedaron en la zona límite ventricular de las cámaras de entrada ventriculares en su pared ventral y las que se colocaron en el lado derecho (marca f), quedaron al mismo nivel que la marca a, pero en su pared dorsal.

Lo anterior nos permite concluir que las poblaciones celulares del lado izquierdo, contribuyen a la formación de la pared ventral y las del lado derecho a la formación de la pared dorsal.

Los resultados de la Serie experimental II (marcas b,c,d,e), nos permitieron establecer el límite atrial (caudal) del primordio de las cámaras de entrada ventriculares en las poblaciones celulares extracardiacas, adyacentes al

extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9'). La marca (c) que se colocó en las poblaciones celulares extracardiácas a una distancia de 150 a 250 micrómetros del extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9'), se encontró en la región posterior del surco atrioventricular izquierdo, límite atrial del primordio de las cámaras de entrada ventriculares (estadio 12) (Sánchez-Gómez, 1990) (Fig. 9). Los resultados obtenidos con las marcas (a) y (f) (Figs. 7, 12) y en la filmación de los embriones comprueban, que en el estadio 12 aparece en el corazón un nuevo segmento caudal a dicha marca y cefálico a los surcos atrio-ventriculares, que es el primordio de las cámaras de entrada ventriculares, nos permite concluir que las poblaciones celulares extracardiácas, caudales al extremo caudal izquierdo y derecho del corazón en tubo recto (estadio 9'), contribuyen a la formación del primordio de las cámaras de entrada ventriculares..

Los resultados de las marcas (d y e) colocadas en las poblaciones celulares extracardiácas, muestran que dichas poblaciones contribuyen en el desarrollo de los atrios primitivos, que igualmente surgen en el estadio 12.

Por consiguiente las poblaciones celulares extracardiácas que contribuyen a la formación del primordio de las cámaras de entrada ventriculares, se encuentran entre las marcas (a) y (c), los que en el estadio 9 se localizan desde el extremo caudal del corazón en tubo recto hasta una distancia entre 150 y 250 micrómetros caudal a dicho extremo.

Se sabe que en las etapas tempranas del desarrollo, las células precardiácas migran activamente, teniendo como sustrato el endodermo (De Haan, 1964). Existe una controversia respecto a si las células cardiogénicas se mueven en pequeños grupos aislados (Stalsberg and DeHaan, 1969), o bien como una capa continua de células (Rosenquist and DeHaan, 1966).

Alternativamente se ha propuesto que las células cardiogénicas miocárdicas, se encuentran organizadas formando una capa celular, mientras que las células del endocardio, que probablemente se originan a partir del mesodermo precardiaco (Rosenquist and DeHaan, 1966; Dracke and Jacobson, 1988), migran independientes, en forma de grupos aislados (Drake and Jacobson, 1988). Nuestras observaciones con el microscopio electrónico de barrido y los resultados de los experimentos de marcaje que mostraron que las marcas de gelatina tinta/china migran de manera compacta sin disgregarse, están de acuerdo con la afirmación que propone la existencia de una capa celular continua. Sin embargo cuando usamos como marca partículas de carbón, mucho más pequeñas, observamos cierta dispersión de las marcas.

Desconocemos el mecanismo preciso mediante el cual, las poblaciones celulares extracardiacas, caudales al extremo caudal del corazón en tubo recto, migran para incorporarse al corazón. Investigaciones recientes en embriones en etapa de gástrula, han sugerido que la fibronectina contenida en la matriz extracelular de las áreas cardiogénicas, puede dirigir la migración de las células precardiacas durante la formación del tubo cardiaco primitivo (Linask and Lash, 1986; Lash, et al, 1987), posiblemente mediante un mecanismo haptotáxico (Linask and Lash, 1988). Es importante señalar que en estos trabajos, no se considera la organización de las células cardiogénicas, es decir si son grupos o forman una capa continua de células. Existen múltiples investigaciones respecto a la matriz extracelular presente en las áreas cardiogénicas en diferentes estadios de desarrollo. Se han analizado las concentraciones relativas de diferentes componentes de la matriz, tales como la fibronectina (Linask and Lash, 1986; Drake and Jacobson, 1988; Drake et al 1990), el ácido hialurónico (Vanroelen et al, 1980b), la colágena y la laminina (Drake et al, 1990), en diferentes etapas de

la cardiogénesis temprana. Se ha demostrado que dicha matriz es secretada tanto por las células del mesodermo precardiaco como por las células del endodermo que les sirven como sustrato. También se han encontrado diferentes isotipos de la molécula de fibronectina y se han identificado sus receptores que se localizan en la membrana de las células cardiogénicas aún antes de que se secrete la fibronectina. Además se han aislado los genes de la fibronectina y de sus receptores. A pesar de toda esta nueva información proporcionada por la biología molecular, no sabemos cómo se encuentran organizadas las células cardiogénicas en las diferentes etapas del desarrollo temprano del corazón; incluso no se conoce con seguridad el origen de las células endocárdicas. Pensamos que para conocer los mecanismos mediante el cual las células del mesodermo esplácnico precardiaco se mueven sobre el endodermo que también se mueve, es necesario demostrar como están organizadas dichas células en los diferentes estadios de la cardiogénesis temprana e integrar esos hallazgos con la nueva información obtenida mediante las técnicas de la embriología experimental, la bioquímica y la biología molecular.

Nuestros resultados de los estudios de anatomía microscópica, están de acuerdo con los descritos previamente (De la Cruz, et al, 1989; Sánchez-Gómez, 1990) y muestran que el corazón en el estadio 9° es un canal abierto dorsalmente, cuya pared ventral es la pared dorsal del intestino portal anterior.

En el estadio 12, el proceso de tubulación del corazón ha avanzado considerablemente. Además, otros autores mediante las técnicas de marcaje *in vivo*, usando timidina tritiada (Rosenquist and DeHaan, 1966, Stalsberg and De Haan, 1969) y partículas de óxido de hierro (Stalsberg and Dehaan, 1969), demostraron que el destino prospectivo de la línea de fusión ventral de ámbos primordios cardíacos, es formar el borde derecho del asa en el estadio 12, por

consiguiente el borde derecho del corazón en tubo recto, no corresponde con el borde derecho del asa bulboventricular. Todos estos hechos, permitieron a De la Cruz y colaboradores (1989), proponer que el tubo cardíaco se forma debido a que el borde derecho e izquierdo del corazón en forma de canal, se fusionan y dan origen al borde izquierdo del asa. Los resultados obtenidos con las marcas (a) y (f) previamente descritos, también apoyan esta afirmación.

Debido a la nueva información obtenida mediante las técnicas de la embriología experimental proporcionada en este trabajo y a los resultados logrados por otros investigadores, utilizando las mismas técnicas (Castro-Quezada, et al, 1972; Argüello, et al, 1975; De la Cruz, et al, 1977, 1987, 1989; Sánchez-Gómez, 1990), es importante discutir acerca de la formación y torción del tubo cardíaco, pensamos que están implicados 4 fenómenos que se llevan a cabo simultáneamente:

- 1.- La incorporación de poblaciones celulares extracardiacas.
- 2.- la formación de la pared dorsal del corazón, ó tubulación del corazón, debida a la fusión de ambos bordes del corazón en forma de canal.
- 3.- la aparición de nuevas regiones en el corazón primitivo (tubo recto), el cono cefálicamente y el primordio de las cámaras de entrada ventriculares y los atrios primitivos caudalmente.
- 4.- el proceso de torción del asa bulboventricular con su convexidad hacia la derecha, cuyo mecanismo es aún no conocido y que no hemos discutido, por no ser objeto de este trabajo.

La información proporcionada por este trabajo, enriquece el conocimiento que poseemos sobre las regiones cardíacas primitivas (De la Cruz, et al, 1989) y cuestiona lo dicho respecto al proceso de formación del asa bulboventricular. También sirve como base para abordar el estudio sobre la constitución embriológica de las aurículas primitivas y el seno venoso.

CONCLUSIONES

Las poblaciones celulares extracardiácas, que contribuyen a la formación del primordio de las cámaras de entrada ventriculares, se encuentran desde el extremo caudal del corazón en tubo recto (estadio 9'), hasta una distancia entre 150 - 250 micrómetros caudal a dicho extremo.

Las poblaciones celulares del lado derecho del corazón en tubo recto (estadio 9'), contribuyen a la formación de la pared dorsal del primordio de las cámaras de entrada ventriculares y las poblaciones celulares izquierdas a la pared ventral.

Esta nueva información enriquece el conocimiento que poseemos sobre las regiones cardíacas primitivas y cuestiona lo dicho respecto al proceso de formación del asa bulboventricular.

A P E N D I C E

1.- SOLUCIONES

1.1.- Solución Ringer Para Aves.

NaCl _____ 14 gr.
KCl _____ 0.840 gr.
CaCl₂ _____ 0.480 gr.
H₂O destilada _____ 2000 ml.

1.2.- Bouín acuoso.

Solución acuosa de ácido pícrico _____ 70 ml.
Formol comercial _____ 25 ml.
Acido acético glacial _____ 5 ml.

1.3.- Solución acuosa de verde Luz

Verde Luz _____ 5 gr.
H₂O destilada _____ 100 ml.
Acido acético glacial _____ 2 ml.

1.4.- Amortiguador de Cacodilato de sodio 0.16M pH 7.2

Cacodilato de sodio _____ 3.42 gr.
H₂O destilada _____ 100 ml.
Ajustar el pH con HCl 0.1 M

1.5.- Acido Clorhídrico.

HCl _____ 0.85 ml.

H₂O destilada _____ 100 ml.

1.6.- Glutaraldeido 2.5% en Amortiguador de Cacodilato 0.16 M pH 7.2.

Glutaraldehído 25% _____ 10 ml.

H₂O destilada _____ 90 ml.

1.7.- Solución Madre de Tetraóxido de Osmio (Sol. acuosa 2%).

Tetraóxido de Osmio ----- 1 gr.

H₂O destilada ----- 50 ml.1.8.- Tetraóxido de Osmio 1% en Amortiguador de Cacodilato
0.16M pH 7.2 (Solución de trabajo).

Sol. madre de tetróxido de osimio-----50%

Sol. Amortiguador cacodilato 0.32M ph 7.2-----50%

1.9.- Medio de Cultivo para Microcine.

Sol. 1.9.1: 30 cc de ringer + 450 mg. de agar

Sol. 1.9.2: 50 cc de ringer + 0.5 mg. de rojo fenol.

Las soluciones 1.9.1 y 1.9.2 se esterilizan en un autoclave durante 15 minutos a 15 lb/pulg². Una vez estériles, se dejan enfriar hasta una temperatura de 50°C aproximadamente, se mezclan en una proporción de 1:1 (30 cc de c/u) y se agrega la albúmina fluída de dos huevos. El medio, se vierte en cajas de Petri

estériles de 6 cm. de diámetro, se tapa inmediatamente, se deja enfriar a temperatura ambiente y se guarda en el refrigerador.

2.- TECNICAS

2.1 - Técnica de Cultivo "in vitro" (New, 1955).

En un cristalizador con solución ringer para aves (1.1), se vierte el huevo incubado manteniendolo completamente sumergido, para evitar que se cree una tensión superficial y se rompa la membrana vitelina o se deteriore el embrión. Las membranas secundarias que recubren al huevo incubado, (albúmina y chalazas) se retiran con una pinza curva. Posteriormente, con la ayuda de una tijera curva, se realiza un corte ecuatorial en la membrana vitelina; se debe tener un cuidado especial al separar dicha membrana del vitelo, para evitar que el blastodermo se despegue. Este paso se hace tomando el borde libre de la membrana vitelina con una pinza sin dientes y realizando movimiento ondulantes suaves.

La membrana vitelina con el blastodermo adherido, se coloca sobre un vidrio de reloj y se extiende con la ayuda de una pinza y una pipeta pasteur. Enseguida se coloca encima un anillo de vidrio de 2.5 cm. de diámetro, procurando que el embrión quede en el centro del mismo. A continuación se realiza la limpieza del blastodermo, retirando con una pipeta pasteur el exceso de vitelo.

Finalmente los bordes de la membrana vitelina se doblan hacia arriba y hacia adentro del anillo, cubriendo sus paredes para mantener tensa la membrana vitelina, lo cual favorece la migración celular.

2.2.-Técnica histológica

Los embriones son fijados con Bouin acuoso (1.2) durante 12 hrs.

2.2.1.-Lavar con alcohol 70% hasta que se elimine el ácido pícrico.

2.2.2.-Deshidratar con alcoholes graduales.

alcohol 50%	-----	30 min.
alcohol 70%	-----	30 min.
alcohol 85%	-----	30 min.
alcohol 96%	-----	30 min.
alcohol absoluto (2 cambios)	-----	30 min. c/u

2.2.3.- Preinclusión.

aceite de cedro/alcohol abs.	1:1-----	30 min.
aceite de cedro puro	-----	toda la noche
aceite de cedro/cloroformo	1:1-----	1 hr.
cloroformo/parafina	1:1-----	1 hr.
parafina I	-----	1 hr.
parafina II	-----	1 hr.

2.2.4.- Inclusión en paraplast.

2.2.5.- Desparafinar en xilol.

2.2.6.- Rehidratar en alcoholes graduales 10 min. c/u.

2.2.7.- Teñir con hematoxilina/eosina.

2.3.- Técnicas de Tinción.

2.3.1.- Hematoxilina - eosina

- Teñir con hematoxilina de Harris, 5 min.
- Virar con agua de la llave
- Lavar con agua destilada, para detener el viraje
- Deshidratar con alcoholes graduales de 50° y 70°, por 3 min. en cada uno.
- Teñir con Eosina alcoholica, 5 min.
- Deshidratar con alcoholes graduales de 96° (dos cambios) y absoluto (dos cambios), durante 5 min. en cada alcohol.
- Aclarar en xilol, durante 10 minutos.
- Cubrir los cortes con balsamo de Canada.

2.4.- Técnica de tinción en Bloque. Verde luz.

Los embriones son fijados en bouin (1.2) de 2 a 24 hrs., posteriormente son lavados en alcohol 70% hasta que es eliminado el ácido pícrico, a continuación los embriones son rehidratados hasta agua destilada, en este momento los embriones estan listos para ser teñidos con una solución acuosa de verde luz (1.3) durante 8 min.

Una vez realizada la tinción las muestras son deshidratadas:

H2Odestilada-----	10 min.
Acohol 35%-----	10 min.
Acohol50%-----	10min.
Alcohol 70%-----	15 min.

Alcohol 85%-----	15 min.
Alcohol 96%-----	30 min.
Alcohol absoluto (2 cambios)-----	30 min c/u
Salicilato de metilo/alcohol absoluto 1:1-----	30 min.
Salicilato puro -----	toda la noche.
Salicilato de metilo/xilol 1:1-----	10 min.
Xilol(2cambios)-----	15 min. c/u.

Finalmente los embriones son montados en unas cámaras con bálsamo de Canadá.

2.5.- Técnica quirúrgica de Castro-Quezada (1972).

Esta técnica se utiliza para descubrir el corazón; se hacen dos cortes paramediales en la membrana del saco vitelino desde el pliegue subcefálico hasta el nivel del primer par de somitas, posteriormente se realiza un corte perpendicular a los anteriores y paralelo, adyacente y caudal al pliegue subcefálico, mediante el cual la membrana es replegada caudalmente.

2.6.-Técnicas Para Preparar Las Marcas:

2.6.1.-Marcas de óxido de hierro.

Las marcas se prepararon de acuerdo a una modificación de la técnica de Stalsberg y DeHaan (1969). En una caja de petri se vierte una solución alcoholica de óxido de hierro, se coloca en el horno de esterilización seca a una temperatura constante de 60°C durante 20 minutos. Se espera a que se evapore el alcohol y se formen pequeños granulos de óxido de hierro que se depositan en el fondo de la caja de petri, los cuales son utilizados como marcas.

2.6.2.- Marcas de gelatina/tinta china.

Se fabrican filamentos de vidrio de aproximadamente 10 micrómetros de espesor, calentando con un mechero una varilla de vidrio de 5 mm. de diámetro, en el momento en que la varilla se encuentra al rojo vivo, se procede a estirarla con fuerza. Estos filamentos se recubren con una mezcla de gelatina/tinta china en la siguiente proporción: 15 gotas de tinta china (Colorante) por cada mililitro de solución de gretina al 10% (Seichert 1965).

2.7.-Preparación de muestras para microscopia electrónica de barrido.

Los embriones que fueron sometidos a éste estudio, fueron fijados con glutaraldehído al 2% en una sol. buffer de cacodilato, posteriormente se postfijan con tetraóxido de osmio al 1% durante dos horas; para no alterar las características químicas del tetraóxido de osmio, se debe utilizar pipetas completamente limpias. Una vez postfijadas las muestras, se procede a colocarlas en alcohol 70% y a partir de este alcohol, se comienza una deshidratación con alcoholes graduales 70%, 80%, 96% y absoluto (2 cambios de 15 minutos en cada uno).

Desecar la muestra en un desecador por punto crítico SAMDRI 780A, una vez que la muestra está seca se monta en un portamuestras y se recubre con una capa de oro de 30-50 nm. en el evaporador de iones Denton Vacuum Desk-1.

2.8.-Técnicas fotográficas.

Se tomaron fotografías del inicio y del final de cada experimento. Se usó un microscopio óptico con un adaptador para cámara fotográfica Cannon F 150 utilizando película Kodak Plus X Pan asa 125. Las fotografías fueron tomadas en tiempos de exposición de 1/2 y 1/4 de seg; las impresiones se hicieron sobre papel Kodrabromide F-2 y F-3 con una amplificadora Amplimat.

2.9.-Técnica de filmación.

Los embriones fueron filmados utilizando la técnica de cultivo para microcine de Castro-Quezada (1972). Dicha técnica es una combinación de las técnicas de cultivo de New y de Spratt y permite mantener el embrión en óptimas condiciones durante la filmación. En esta técnica, el embrión se monta en un anillo de vidrio, como se describió en la técnica de New y la albumina se sustituye por un medio semisólido de agar/albumina (Spratt).

La filmación se realizó a intervalos de 30 minutos durante 5 seg. a lo largo del desarrollo del corazón desde el estadio 9' (HH) hasta el estadio 12 (HH).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Argüello, C.; De La Cruz, M.V.; Sánchez-Gómez, C. (1975). Experimental study of formation of the heart tube in the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 33, 1-11.
- 2.- Balinsky, B.I. (1981). *Introduction to embryology*, 5th reviseded. London: Saunders.
- 3.- Bellairs, and New, D.A.T. (1962). Phagocytosis in the chick blastoderm. *Exp. Cell. Res.* 26, 275-279.
- 4.- Bellairs, R. (1982). Gastrulation processes in the chick embryo. In: *Cell Behaviour. A tribute to Michael Abercrombie*, eds. R. Bellairs. A. Curtis and G. Dunn (Cambridge University Press, Cambridge). pp.395-427.
- 5.- Bellairs, R. (1986). The primitive streak. *Anat. Embryol.* 174, 1-14.
- 6.- Boucat, J.C. et al. (1984). Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: A competitive peptide inhibitor of FN function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos. *J. Cell Biol.* 99, 1822-1830.

- 7.- Butler, J. K. (1952). An experimental analysis of cardiac loop formation in the chick. M.A. Thesis Univ. of Texas, Austin Texas.
- 8.- Castro-Quezada, A.; Nadal-Ginard, B. and De la Cruz, M.V. (1972). Experimental study of the formation of the bulboventricular loop in the chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27, 623-637.
- 9.- Davis, C.L. (1927). Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Contributions to Embryology.* 19, 24-248.
- 10.- DeHaan, R. L. (1959). Cardia bifida and the development of pacemaker function in the early chick heart. *Develop. Biol.* 1, 245-284.
- 11.- DeHann, R.L. (1963). Organization of the cardiogenic plate in the early chick embryo. *Acta Embriologicae et Morphologiae Experimentalis.* 6, 26-38.
- 12.- DeHaan, R.L. (1964). Cell interactions and oriented movements during development. *J. Exp. Zool.* 157, 127-138.
- 13.- DE Jong, F. et al. (1990). Isomyosin expression pattern during formation of the tubular chicken heart: A three-dimensional immunohistochemical analysis. 226, 213-227.

14.- De la Cruz, M.V.; Muñoz-Armas, S. and Muñoz Castellanos, L. (1972). Development of the chick heart. Baltimore: Johns Hopkins Press.

15.- De la Cruz, M.V.; Sánchez-Gómez C.; Arteaga, M. and Argüello, C. (1977). Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J. Anat.* 123, 651-686.

16.- De la Cruz, M.V. and Cayré, R. (1986). Desarrollo embriológico del corazón y de las grandes arterias. En: *Cardiología pediátrica. Clínica y Cirugía.* (ed. P.A. Sánchez), Barcelona. Salvat. vol 1, pp. 10-18.

17.- De la Cruz, M.V.; Sánchez-Gómez C.; Robledo Tov, J.L. (1987). Experimental study of the development of the ventricular inlets in the chick embryo. *Embryologische Hefte*, 1, 25-37.

18.- De la Cruz, M.V.; Sánchez-Gómez, C. and Palomino, M.A. (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, 121-131.

- 19.- DeVries, P.A. and Saunders, J.B. (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. *Contributions to Embryology*. 256, 89-114.
- 20.- Downie, R.J. and Pegrum, M.S. (1971). Organization of the chick blastoderm edge. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 26, 623-635.
- 21.- Drake, C., and Jacobson, A. (1988). A study by scanning electron microscopy of the extracellular matrix and endothelial components of the primordial chick heart. *Anat. Rec.*, 222, 391-400.
- 22.- Drake, C., Davis, L.A., Walters, L., and Little, C.D. (1990). Avian vasculogenesis and the distribution of collagens I, IV, laminin, and fibronectin in the heart primordia. *J. Exp. Zool.* 255, 309-322.
- 23.- Easton, H., Veini, M. and Bellairs Ruth. (1992). Cardiac looping in the chick embryo: the role of the posterior precardiac mesoderm. *Anat. Embryol.* 185, 249-258.
- 24.- Ellis, C.L. et al. (1993). Monoclonal antibodies identifying subsets of ectodermal, mesodermal and endodermal cells in gastrulating and neurulating avian embryos. *Anat. Rec.* 235, 591-603.

- 25.- Eyal-Giladi, H., and Spratt, N.T. (1965). The embryo- forming potency of the young chick blastoderm. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 13, 267-273.
- 26.- Eyal-Giladi, H. and Kochav, S. (1976). From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev. Biol.* 49, 321-337.
- 27.- Eyal-Giladi, H. (1984). The gradual establishment of cell commitments during the early stages of chick development. *Cell Differ.* 14, 245-255.
- 28.- Hamburger, B. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.
- 29.- Harrison, F.; Andries, L. and Vakaet, L. (1988). The chicken blastoderm: current views on cell biological events guiding intercellular communication. *Cell Differ.* 22, 83-106.
- 30.- Harrison, F. (1990). The extracellular matrix and cell surface, mediators of cell interactions in chicken gastrulation. *Int. J. Dev. Biol.* 33, 407-428.
- 31.- Khamer, O. and Eyal-Giladi, H. (1989). The chick's marginal zone and primitive streak formation. I. Coordinative effect of induction and inhibition.

- 32.- Kochov, S., Ginsburg, M. and Eyal-Giladi, H. (1980). From cleavage to primitive streak formation: a complementary noemal table and a new look at the first stages of the development of the chick. II Microscopic anatomy and cell population dynamics. *Dev. Biol.* 79, 269-308.
- 33.- Kucera, P. and Burnand, B.M. (1987). Mechanical tension and movement in the chicken blastoderm as studied by real-time image analysis. *J. Exp. Zool. Suppl.* 1, 329-339.
- 34.- Linask, K.K. and Lash, J. W. (1987). Precardiac cell migration: Fibronectin localization at mesoderm-endoderm interface during directional movement. *Dev. Biol.* 114, 87-101.
- 35.- Linask, K.K. and Lash, J.W. (1988). A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells. II. Rotation of the heart-forming region during different stages and its effects. *Dev. Biol.* 129, 324-329.
- 36.- Lash, J. W., Linask, K.K., and Yamada K. (1987). Synthetic peptides that mimic the adhesive recognition signal of fibronectin: Differential effects on cell-cell and cell-substratum adhesion in embryonic chick cells. *Dev. Biol.* 123, 411-420.
- 37.- Low, N.F. and McClugage G.S. (1993). Scanning Electron microscopy of developing primary endoderm during first 6 hours of incubation in the chick. *Anat. Rec.* 235, 151-164.

- 38.- Manasek, E.J. (1976). Heart development: interactions involved in cardiac morphogenesis. In: *The cell surface in animal embryogenesis and development*. Poste and Nicolcon (eds). Elsevier, North Holland Biomedical Press. vol. 1, cap. 11, pp. 545-598.
- 39.- New, D.A.T. (1955). A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 3, 326-331.
- 40.- New, D.A.T. (1959). The adhesive properties and expansion of the chick blastoderm. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 7, 146-164.
- 41.- Orts-Llorca, F., and Gil, D. R. (1967). Causal analysis of the heart curvatures in the chick embryo. *Roux'arch Entwicklungsmech. Organ.* 158, 52-63.
- 42.- Patten, B.M. (1922). Formation of the cardiac loop in the chick. *Am. J. Anat.* 30, 373-397.
- 43.- Patten, B.M. (1929). *The early embryology of the chick*. 1st. ed. 184-190. The Blakiston Co. Philadelphia.
- 44.- Rosenquist, G.C. (1966). A radiographic study of labeled grafts in the chick blastoderm. Development from primitive streak stages to stage 12. *Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol.* 38, 71-110.

- 45.- Rosenquist, G.C.; DeHann, R.L. (1966). Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study. *Carnegie. Washington Contrib. Embryol.* 38, 111-121.
- 46.- Rawles, M.E. (1936). A study in the localization of organ-forming areas in the chick blastoderm of the head-process stage. *J. Exp. Zool.* 72, 271-315.
- 47.- Rawles, M.E. (1943). The heart forming areas of the early chick blastoderm. *Physiol. Zool.* 16, 22-42.
- 48.- Rychter, Z. and Lemez, L. (1965). Markierung morphogenetisches Bewegungen während der Truncusscheidewandbildung des Herzens beim Hühnerembryo. VIIIth. International Congress of Anatomy, Wiesbaden. p. 104.
- 49.- Sánchez-Gómez, C. (1972). Contribución de los experimentos de supresión del tubo cardíaco al estudio de la formación del asa bulboventricular. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México
- 50.- Sánchez-Gómez, C. (1990). Desarrollo embriológico de las cámaras de entrada ventriculares (Inlets). Estudio experimental en el embrión de pollo. Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- 51.- Sanders, E.J. (1986). Mesoderm migration in the early chick embryo. In: *Developmental Biology. A Comprehensive Synthesis. Vol. 2*, ed. L. Browder (Plenum Pub. Corp., New York) pp. 449-480.
- 52.- Sanders, E.J. (1989). Invasion of a basement membrane matrix by chick embryo primitive streak cells in vitro. *J. Cell Sci.*, 185, 394-398.
- 53.- Seichert, V. (1965). Study of the tissue and organ anlage shifts by the method of plastic linear marking. *Folia morphologica*. 13, 228-238.
- 54.- Sissman, N.J. (1966). Cell multiplication rates during development of the primitive cardiac tube in the chick embryo. *Nature*. 210, 504-507.
- 55.- Slack, J.M.W. (1991). *From egg to embryo. Regional specification in early development*. Second edition. Cambridge university press. Cambridge N.Y.
- 56.- Spratt, N.T. Jr. (1946). Formation of the primitive streak, in the explanted chick with carbon particles. *J. Exp. Zool.* 103, 259-304.
- 57.- Spratt, N.T. and Haas, H. (1960). Integrative mechanisms in development of the early chick blastoderm. I. Regulative potentiality of separated parts. *J. Exp. Zool.* 145, 97-137.
- 58.- Spratt, N.T. and Haas, H. (1965). Germ layer formation and the role of the primitive streak in the chick. *J. Exp. Zool.* 158, 8-38.

- 59.- Stalsberg, H. (1969). The origin of the heart asymetry: Ryght and left contributions to the early chick embryo heart. *Dev. Biol.* 19, 109-159.
- 60.- Stalberg, H. and DeHaan, R.L. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev. Biol.* 19, 128-159.
- 61.- VanPraag, R., and DeHaan, R. L. (1967). Morfogenesis of the heart: MEcanisms of curvature. In Annual report of the Director. Dto of Embryo. Cornegie Inst. of Wash. Carbook. 65, 536-537
- 62.- Vanroelen, Ch., Vakaet, L. and Andries, L. (1980). Distribution and turnover of testicular hyaluronidase sensitive macromolecules in the primitive streak stage chick blastoderm as revealed by autoradiography. *Anat. Embryol.* 159, 361-367.
- 63.- Weinberg, C.; Penner, L.P. and Brick, I. (1984). Polyngression, an important morphogenetic movement in chick gastrulation. *Am. Zool.* 24, 545-555.

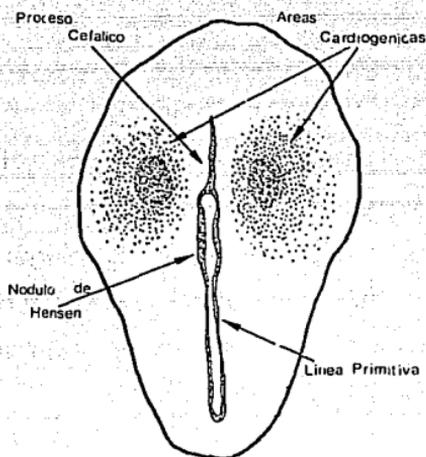
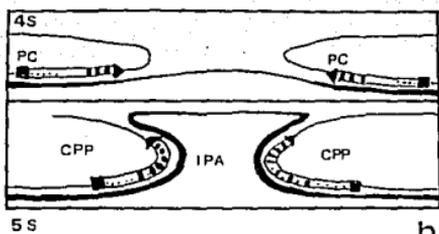
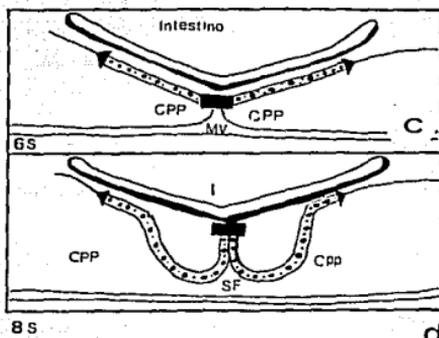


Fig. 1. Esquema de un blastodermo de pollo en etapa de gástrula (estadio 4 HH), mostrando las áreas cardiogénicas. (Modificado de Rosenquist y DeHaan, 1966)

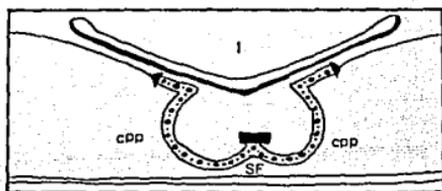
Fig. 2. Esquemas de cortes histológico transversales de embriones de pollo desde el estadio 7HH al 12 HH, que representa la formación del tubo cardíaco a partir del mesodermo esplácnico de las áreas cardiogénicas. (Tomado de DE Jong et al. 1990). (a) Estadio 7, 4 pares de somitas. (b) Estadio 8+, 5 pares de somitas. (c) Estadio 9, 6 pares de somitas. (d) Estadio 9+, 8 pares de somitas. (e) Estadio 10, 10 pares de somitas. (f) Estadio 11, 13 pares de somitas. (g) Estadio 12, 16 pares de somitas. CPP= cavidad pericárdica primitiva; IPA= intestino portal anterior; MV= mesocardio ventral; SF= surco de fusión; MD= mesocardio dorsal.



a

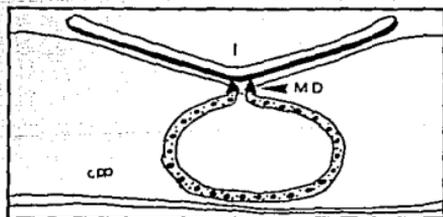


d



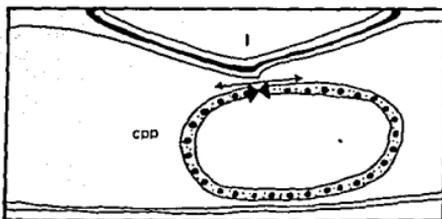
10 s

e



13 s

f



16 s

g

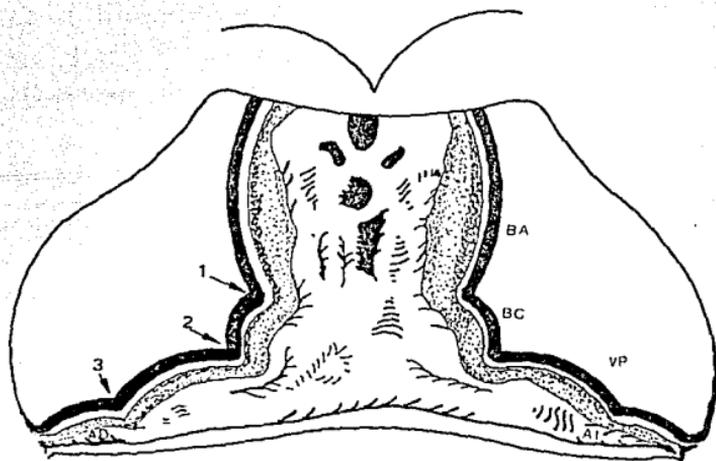


Fig. 3. Diagrama del corazón en tubo recto del embrión humano descrito por Davis, en el que se muestran las cavidades cardíacas primitivas. BA= bulbo aórtico; BC= bulbus cordis; VP= ventrículo primitivo; AD= atrio derecho; AI= atrio izquierdo; 1,1'= surcos interbulbares; 1,2'= surcos bulboventriculares; 3,3'= surcos atrioventriculares.

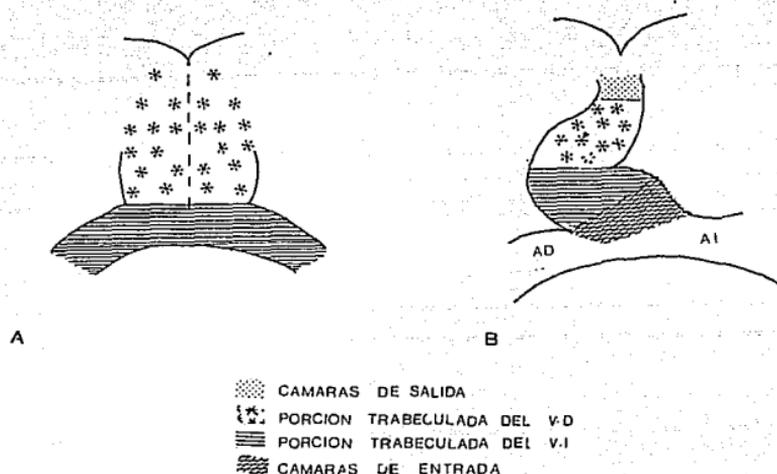


Fig. 4. Representación esquemática de la constitución embriológica del corazón del embrión de pollo. (A) Corazón en tubo recto (estadio 9). (B) Corazón en etapa de asa bulboventricular (estadio 12). AD= atrio primitivo derecho; AI= atrio primitivo izquierdo; VD= ventrículo derecho; VI= ventrículo izquierdo.

TECNICA DE NEW

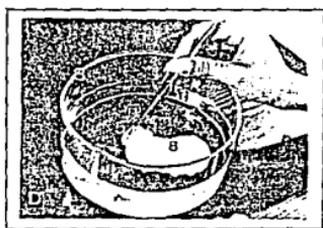
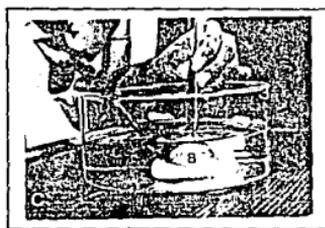
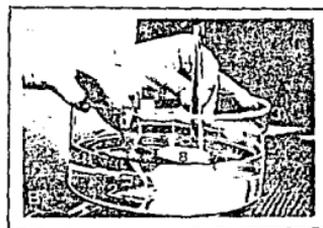
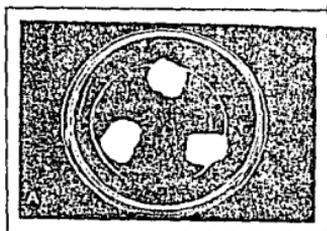
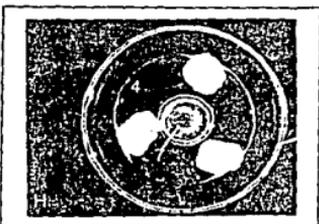
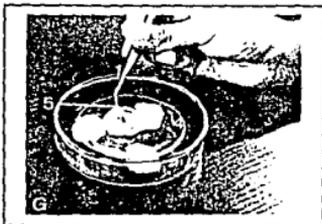
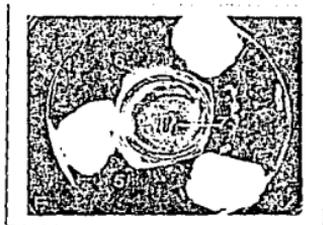
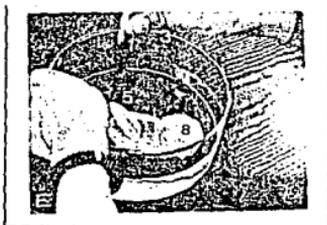


Fig. 5. Fotografías que muestran la secuencia en la que se realiza la técnica de cultivo "in vitro" de New. (A) Cámara húmeda de cultivo. (B) Separación de la albúmina y chalazas adheridas a la membrana vitelina. (C) Corte ecuatorial de la membrana vitelina. (D) Separación del blastodermo adherido a la membrana vitelina del vitelo.



(E) Paso del blastodermo adherido a la membrana vitelina a un vidrio de reloj. (F) Colocación de un anillo de vidrio sobre la membrana vitelina con el blastodermo adherido. (G) Montaje de la membrana vitelina sobre las paredes del anillo de vidrio. (H) Embrión dentro de la cámara húmeda, listo para continuar su desarrollo en una incubadora de cultivo. 1= pinza recta de disección; 2= chalasa ; 3= cristalizador con solución Ringer; 4= vidrio de reloj; 5= membrana vitelina con el blastodermo adherido; 6= anillo de vidrio; 7= cuerpo del embrión, 8= vitelo.

TÉCNICA QUIRÚRGICA

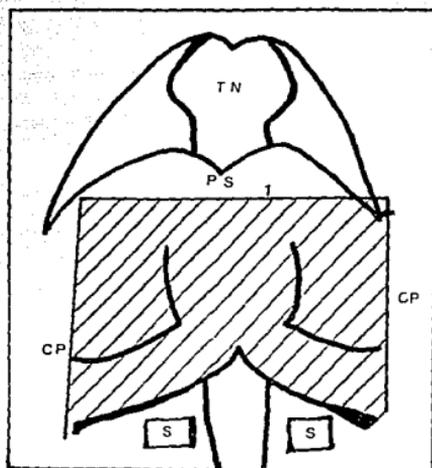


Fig. 6. Esquema de una vista ventral de un blastodermo de pollo del estadio 9, en el que se muestra la técnica quirúrgica descrita por Castro-Quezada (1972), mediante la que se retiró la pared del cuerpo y se dejó el corazón al expuesto para colocar las marcas. TN= tubo neural; PS= pliegue subcefálico; CP= cortes paralelos; S= somitas; 1= corte transversal.

Fig. 7. Experimento de marcaje *in vivo*, el cual muestra que el extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9^o), corresponde a la pared ventral de la zona que corresponde al límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares (estadio 12). A.- Embrión en el estadio 9^o con la marca (a) colocada en el extremo caudal izquierdo del corazón. X32; C.- esquema. B.- El mismo embrión en el que la marca (a) quedó en la zona que corresponde al límite ventricular del primordio de las cámaras de entrada ventriculares (estadio 12) X32; D.- esquema.

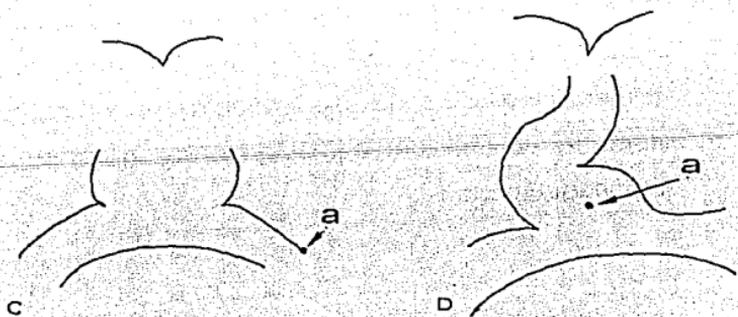
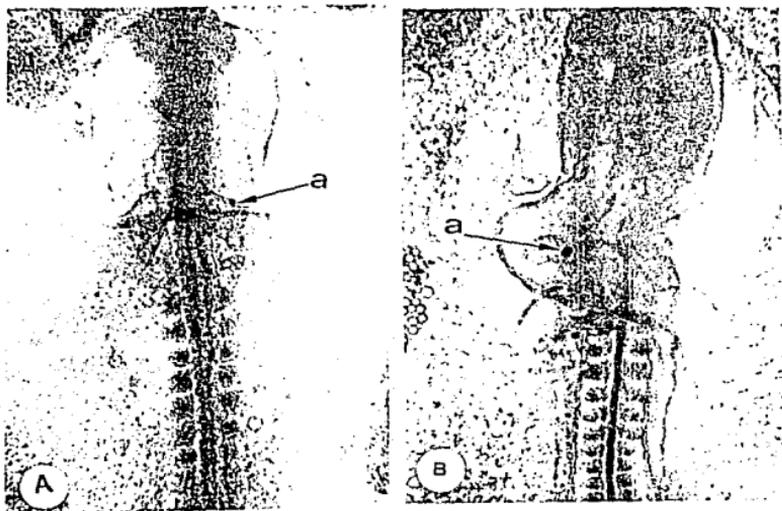
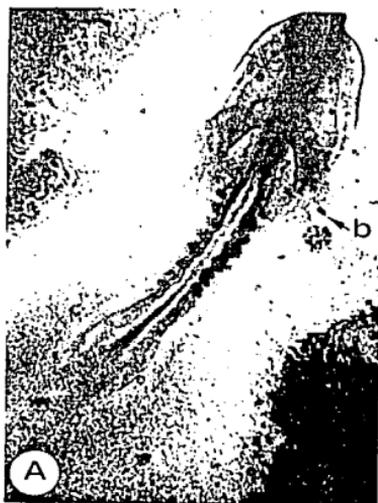


Fig. 7

Fig. 8. Experimento de marcaje *in vivo*, que muestra que las poblaciones celulares extracardiácas adyacentes al extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9^o), que se encuentran a una distancia de 100 a 150 micrometros caudal a dicho extremo, contribuyen a la formación del primordio de las cámaras de entrada ventriculares (estadio 12). A.- Embrión en el estadio 9^o con la marca (b), colocada en las poblaciones celulares extracardiácas a una distancia de 100 a 150 micrometros caudal al extremo caudal izquierdo del corazón. X32; C.- esquema. B.- El mismo embrión en donde la marca (b) en el estadio 12, se encontró en el primordio de las cámaras de entrada ventriculares, en su pared ventral X32; D.- esquema.

Estadio 9^o



Estadio 12

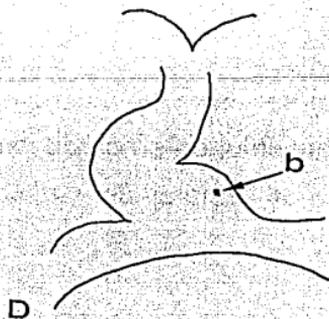
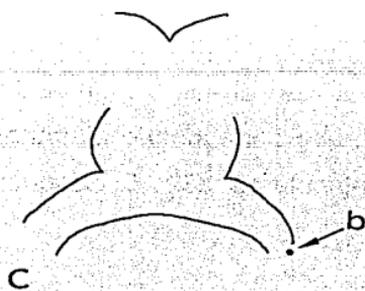


Fig. 8

Fig. 9. Experimento de marcaje *in vivo* en el que se muestra que las poblaciones celulares extracardiácas adyacentes al extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto, que se encuentran a una distancia de 150 a 250 micrometros caudal a dicho extremo, corresponden a la zona del surco atrio-ventricular en su pared ventral, que es el límite atrial del primordio de las cámaras de entrada ventriculares (estadio 9'). A.- Embrión en el estadio 9' con la marca (c), colocada en las poblaciones celulares extracardiácas a una distancia de 150 a 250 micrómetros caudal al extremo caudal del corazón. X32; C.- esquema. B.- El mismo embrión en el que la marca (c) se encontró en el estadio 12 en el surco atrio-ventricular izquierdo, en su pared ventral, que corresponde al límite atrial de las cámaras de entrada ventriculares. X32; D.- Esquema.

Estadio 9



Estadio 12

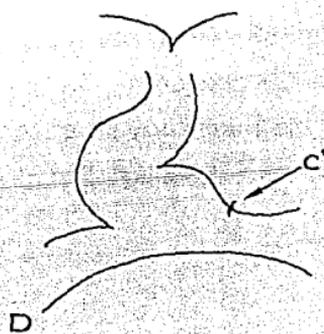
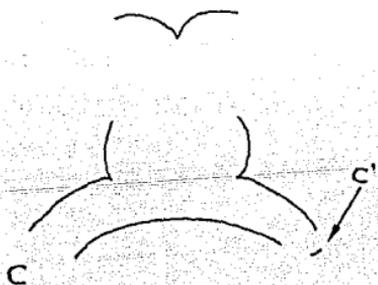
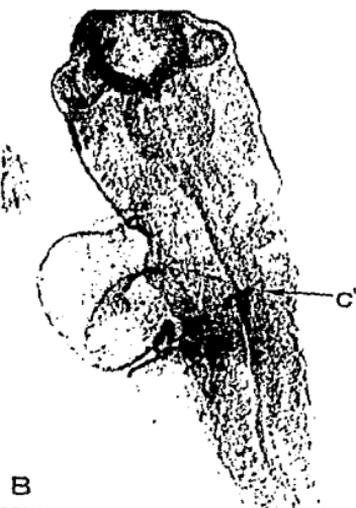


Fig. 9

Fig. 10. Experimento de marcaje *in vivo*, en donde se muestra que las poblaciones celulares extracardíacas que se encuentran a una distancia de 250 a 350 micrometros, caudales al extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9^o), contribuyen a la formación de la región atrial del corazón en etapa de asa bulboventricular (estadio 12). A.- Embrión en el estadio 9^o con la marca (d), colocada en las poblaciones celulares extracardíacas una distancia de 250 a 350 micrómetros caudal al extremo caudal del corazón X32; C.- esquema. B.- El mismo embrión en el que se muestra que la marca (d) se encontró en el estadio 12 en la región atrial . X32; D.- esquema.

Estadio 9



Estadio 12

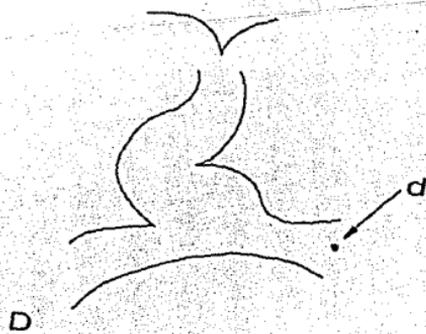


Fig. 10

Fig. 11. Experimento de marcaje *in vivo* en el que se muestra que las poblaciones celulares extracardiácas que se localizan a una distancia de 400 micrometros, caudales al extremo caudal izquierdo del corazón en tubo recto (estadio 9), ya no se incorporan al corazón en el estadio 12. A.- Embrión en el estadio 9 con la marca (e), colocada en las poblaciones celulares extracardiácas a una distancia de 400 micrómetros o más caudal al extremo caudal del corazón. X32; C.- esquema. (B) El mismo embrión en el que la marca (e) ya no se incorpora al corazón en el estadio 12. X32; D.- esquema.

Estadio 9

Estadio 12

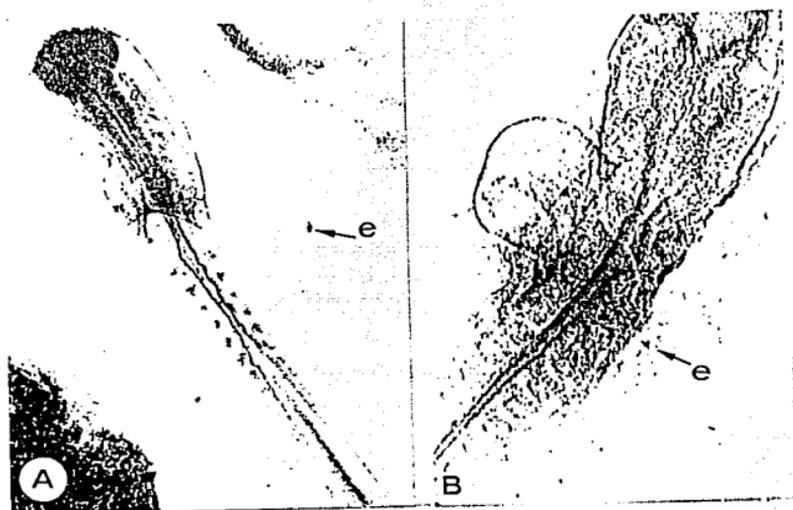


Fig. II

Fig. 12. Experimento de marcaje *in vivo*, en el que se muestra que el extremo caudal derecho del corazón en tubo recto (estadio 9), corresponde a la zona del límite ventricular de las cámaras de entrada ventriculares en su pared dorsal, en el estadio de asa bulboventricular. A.- Embrión del estadio 9 con la marca (f) colocada en el extremo caudal derecho del corazón. X32; C.- Esquema. B.- El mismo embrión en el estadio 12, en donde por transparencia se observa que la marca (f), se encuentra en la zona que corresponde al límite ventricular de las cámaras de entrada ventriculares X32; D.- Esquema.

Estadio 9



Estadio 12

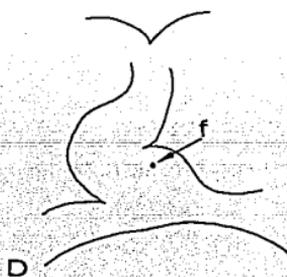
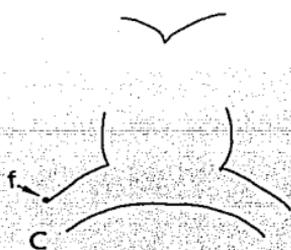


Fig. 12

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 13. Fotomicrografías con microscopio electrónico de barrido del corazón de embrión de pollo. A.- corazón en tubo recto (estadio 9') X150. B.- corazón en estadio de asa bulboventricular (estadio 12) X150. PTVD= primordio de la porción trabeculada del ventrículo derecho; PTVI= primordio de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo; SIVD= surco interventricular derecho; SIVI= surco interventricular izquierdo; ECD= extremo caudal derecho del corazón; ECI= extremo caudal izquierdo del corazón; IPA= intestino portal anterior; C= cono; PCE= primordio de las cámaras de entrada ventriculares; SIV= septum interventricular; SAV= septum atrioventricular; A= atrio primitivo derecho 1= surco conoventricular; *= línea de fusión; MD= mesocardio dorsal.

Estadio 9

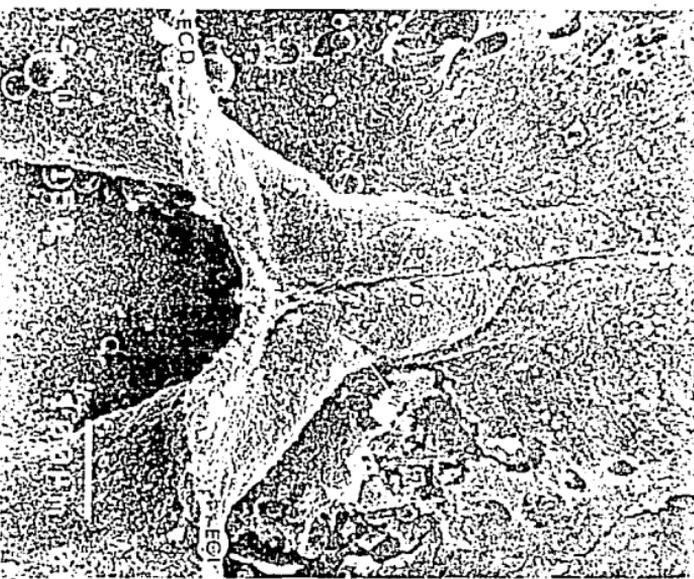


FIG. 13

Estadio 12

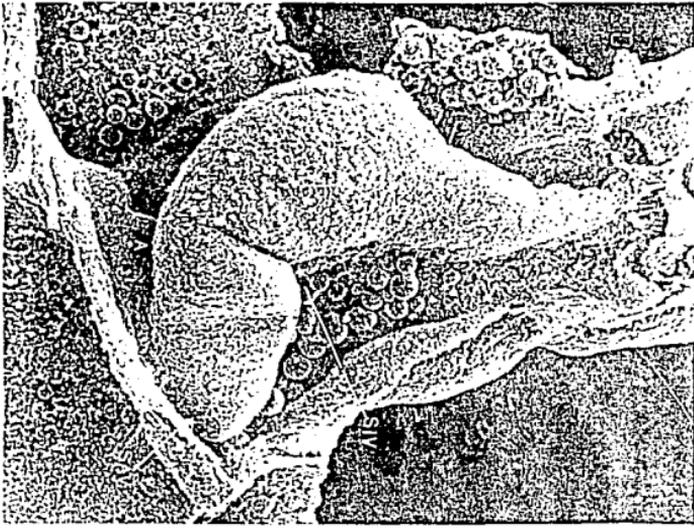
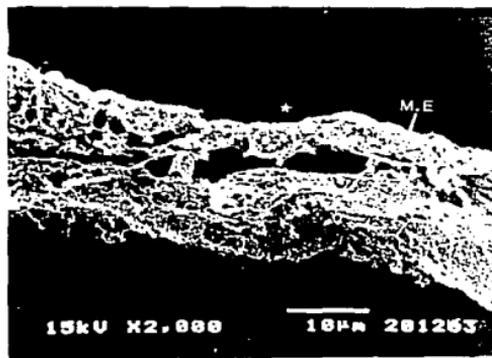
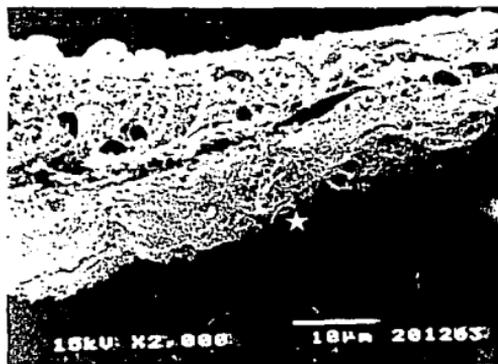
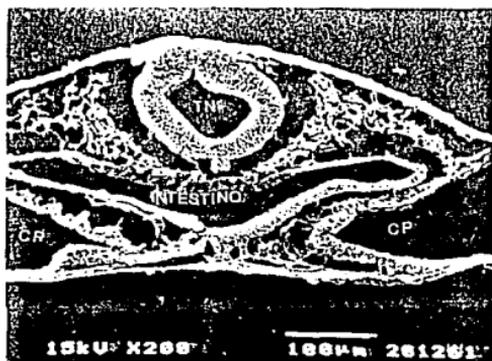


Fig. 14. Cortes histológicos transversales de la región caudal al extremo caudal del corazón en tubo recto de un embrión de pollo del estadio 9, vistos con el microscopio electrónico de barrido. A.- Vista panorámica X200. Obsérvese que el corazón tiene la forma de una canal abierta dorsalmente. (B,C,D) = Acercamientos que muestran las células con capacidad cardiogénica (estrella) en el mesodermo esplácnico (ME). (B) X500, (C) X2000, (D) X 2000.

CCP= cavidad pericárdica primitiva; TN= tubo neural; N= notocorda.



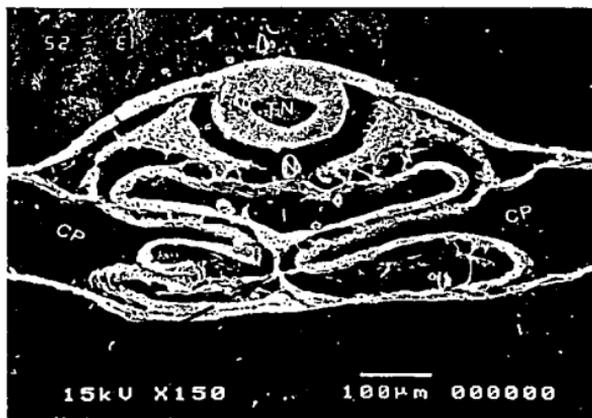


Fig. 15. Corte histológico transversal de un embrión de pollo del estadio 12, visto con el microscopio electrónico de barrido X200. Observe que el borde derecho e izquierdo del corazón (flechas) están muy cercanos entre sí, a punto de formar un tubo. CCP= cavidad pericárdica primitiva; TN= tubo neural; N= notocorda; I= intestino.

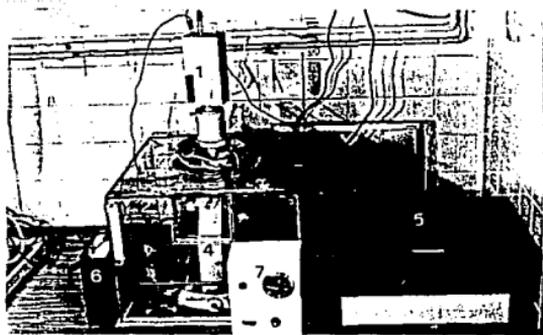


Fig 16. Fotografías que muestran el sistema de micro-filmación. (A) Vista panorámica. 1= cámara de video; 2= cámara de incubación; 3= termómetro; 4= microscopio; 5= videograbadora; 6= fuente de poder de la cámara de video; 7= termostato; 8= cámara de cultivo con el embrión.