

0038/30  
2y.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONTRIBUCIÓN DEL COJÍN INFERIOR DEL CANAL  
ATRIOVENTRICULAR EN LA SEPTACIÓN  
CARDIACA Y EN EL DESARROLLO DE LAS  
VÁLVULAS ATRIOVENTRICULARES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. en C. RICARDO ALBERTO MORENO  
RODRIGUEZ.

DIRECTORES DE TESIS: Dr. Edward L. Krug Grounds  
Dra. María V. de la Cruz Toyos.

MÉXICO, D.F.  
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

250012

1998



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 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.

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Edward L. Krug de la Medical University of South Carolina, Charleston, U.S.A. y de la Dra. María V. de la Cruz del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". México D.F.

Durante la realización de la presente tesis se contó con la ayuda económica de:  
Medical University of South Carolina,  
Secretaría de Salud.  
y de Teléfonos de México, S.A.

Con todo mi agradecimiento a:

A los miembros del comité tutorial y Jurado por sus críticas, comentarios, sugerencias y por su apoyo incondicional en el desarrollo ésta tesis.

Med. Cir. María V. de la Cruz Toyos.  
Dr. Edward L. Krug Grounds.  
Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin.  
Dra. Concepción Sánchez Gómez.  
Dra. Patricia Ramos Morales.  
Dra. María Genoveva González Moran.  
Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Con un gran respeto y admiración a mis padres que me han impulsado a alcanzar nuevas metas y que con su ejemplo, me han enseñado a seguir siempre adelante.

**Miguel Angel Moreno Castellanos**

y

**Alicia Rodríguez Fernández**

## **A Leticia Reyes Angeles,**

mi gran compañera, amiga y esposa, por su amor, paciencia, comprensión, ayuda y apoyo incondicional e invaluable que me permite seguir adelante y por lo que hemos compartido y que compartiremos.

A mis hermanos y hermanas:

**Silvia Martha, José Antonio, Luis  
Fernando, Mario Alberto, Rosa Elena,  
Carlos Felipe y Miguel Martín.**

Por sus consejos y apoyo y por todos esos momentos  
agradables y desagradables que hemos y seguiremos  
compartiendo.

A la Dra. de la Cruz por su apoyo y enseñanzas; por permitirme ser partícipe, como su alumno y colaborador, de su sagacidad en el análisis científico.

A Edward Krug por su amistad, paciencia, sensibilidad, amabilidad y enseñanza "si se observa con detenimiento se puede encontrar su significado".

Al Dr. Roger Markwald que con su claridad científica me ha proporcionado los elementos de análisis que se requieren en este campo de la investigación.

A Esperanza de la Cruz por su calides, su amistad y sinceridad.

Al Dr. Jorge Espino Vela por su apoyo moral, interés en el bienestar de toda persona cercana a él y en especial por su rectitud y honorabilidad que es para mi un acicate como ejemplo a seguir y a la Dra. Hayde Mariel por su amistad sincera, amabilidad y disponibilidad de ayudar.

A todos mis amigos en la Medical University of South Carolina Edward Krug, Roger Markwald, Anthony Capehart, Robert Thompson, R. Fitzharris, Corey Mjaatvedt, Deborah Tunner, Ann Ramsdell, Vladimir M., Susan Hill, Mariane, Michael Kern, Tania, Hiro Tazaka, Hide, Yukiko Sugi, Keitaro Isokawa, M. Rezaee, Cataline, Rob Gourdie, Andy W, Diddy, René, Matt Wienecke, Yuyi Nakajima, Larry Litke, Len y Carol Eisenberg, Drake, Tom Trusk, Brenda Rongish, Sue Tjepkema-Burrows, Joshua Spruill, y todos aquellos que se escapan de mis recuerdos.

A todos los bibliotecarios que siempre están prestos al auxilio de los usuarios.

A mis compañeros de cada día del laboratorio, Leticia, Laura, Marcela, Conchita, Sra. Lilia, Sra. María, Mario, Adriana, Loomen, Cecilia, Martha, Lila, con quienes comparto intereses comunes.

A todas aquellas personas que de alguna manera están y estuvieron relacionadas con mi formación académica.

A todo el pueblo de México que a través de las Instituciones de educación básica, media, superior y postgrado, como es la Universidad Nacional Autónoma de México, nos permite caminar en el conocimiento científico

# INDICE

|  |    |
|--|----|
| Summary  | 1  |
| Resumen.   | 4  |
| I.- Introducción.  | 8  |
| 1. Organogénesis temprana.   | 9  |
| 1.1. Áreas precardiacas.   | 9  |
| 1.2. Formación del tubo cardiaco primitivo o corazón en tubo recto.                                  | 11 |
| 1.3. Torsión y formación del asa cardiaca (looping).   | 11 |
| 2. Organogénesis tardía.   | 13 |
| 2.1. Septación del corazón.  | 13 |
| A) El septum primum y el septum interatrial.   | 14 |
| B) Los cojines inferior y superior del canal atrioventricular y el septum atrioventricular           | 15 |
| C) El septum interventricular primitivo y el definitivo.   | 16 |
| 2.2. Aparato valvular atrioventricular.  | 16 |
| 2.3. Incorporación del cono y desarrollo de los tractos de salida ventriculares                      | 18 |
| II.- Antecedentes.   | 20 |
| 1. Embriología descriptiva y experimental.   | 20 |
| 2. Antígenos ES en la transformación epitelio-mesenquima   | 21 |
| III.- Planteamiento de la hipótesis.   | 22 |
| IV.- Objetivos.  | 23 |
| Objetivo general y particulares  | 23 |
| V.- Procedimientos experimentales.   | 24 |
| 1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines del canal atrioventricular.            | 24 |
| 1.1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines normales del canal atrioventricular. | 24 |
| 1.2. Modelo experimental de perturbación del mesenquima en los cojines del canal A-V.                | 26 |
| 2. Distribución de ES/130.   | 27 |
| 2.1 Producción y purificación de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra ES/130.             | 27 |
| 2.1.1. Producción de anticuerpos contra ES/130.  | 27 |
| 2.1.2. Inmunopurificación de anticuerpos antipeptidos de ES/130.                                     | 35 |
| 2.2. Inmunolocalización de antígenos ES/130 en tejido  | 36 |
| 2.3. Análisis de ES/130 en miocardio y endocardio.   | 39 |
| 3. Estudio de la acción de los anticuerpos ES/130 "in vivo".   | 40 |
| 3.1 Cultivo del embrión.   | 40 |
| 3.2. Estudio prospectivo del cojín inferior  | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 3.3. Purificación de las IgG totales de sueros producidos, contra antígenos ES.                      | 42 |
| 3.4. Dosificación de los anticuerpos.  | 43 |
| VI.- Resultados.   | 50 |
| 1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines del canal atrioventricular.            | 50 |
| 1.1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines normales del canal atrioventricular. | 50 |
| 1.2. Modelo experimental de cojín hipoplástico del canal A-V.  | 51 |
| 2. Distribución de ES/130.   | 52 |
| 2.1 Producción de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra ES/130.                            | 52 |
| 2.2. Inmunolocalización de antígenos ES/130 en tejido.   | 53 |
| 2.3. Análisis de ES/130 en miocardio y endocardio.   | 54 |
| 3. Estudio de la acción de los anticuerpos ES/130 <i>"in vivo"</i> .                                 | 55 |
| 3.1 Cultivo del embrión  | 55 |
| 3.2. Dosificación de los anticuerpos.  | 55 |
| VII. Discusión.  | 89 |
| VIII. Conclusiones.  | 95 |
| VIII. Referencias.   | 98 |

## Summary.

The superior and inferior cushions of the atrioventricular (AV) canal of the heart have an important role in its transformation from a unicavitary to tetracavitary organ. However, the following facts remain unknown: 1) the peculiar contribution of each cushion to cardiac septation, 2) the cellular interaction in each cushion, and 3) the molecular factors involved in the epithelial mesenchymal transformation.

The seeding of mesenchymal cell in the extracellular matrix on the inferior and superior atrioventricular cushions are considered as the beginning of septation. Markwald and Krug's group has shown the mesenchyme cell is originated from an endothelial subpopulation as a result of myocardial signaling. The biochemical studies and "*in vitro*" culture system show that the extracellular protein solubilized by EDTA (EDTA extracts) from chick (14-17HH) embryo heart, has the capacity of substituting the myocardium as a inducer of epithelial-mesenchymal transformation. These experiment has been support by immune assay, i. e. the addition of IgG against EDTA extract in tissue culture, blocks the mesenchymal transformation. This antibody was used for screening an expression library and some clones with novel cDNA were obtained. Krug's group is interested to known the role of each clone, whether the protein is the inducer, wheter it is produced by myocardium and wheter its expression is at place and time when the epithelial-mesenchymal transformation occurs.

De la Cruz's group, with labeling experiments in chick embryos show, that the inferior cushion of the AV contribute to development of: 1) the atrioventricular septum, 2) the interatrial septum and the interventricular septum adjacent to the atrioventricular septum, and 3) the basal region of the anteroseptal leaflet of the mitral valve, while the superior cushion of the AV canal participates in: 1) the septal wall of the left ventricular outlet, and 2) the mitro-aortic continuity. This information shows that the prospective fate of each cushion is different and we thought this could be due to the initial seeding of mesenchymal cell. In this way we study the potential spatial and temporal asymmetries in the inferior and superior atrioventricular cushion in normal and abnormal chick heart. In addition, we studied the distribution of ES/130 as inducer candidate to the epithelial-mesenchymal transformation.

The temporal and spatial asymmetries were studied in optical section of heart embedded in polyacrilamide and the cell nuclei stained with propidium iodide; cells count were determined within the cardiac jelly of the atrioventricular cushion by laser confocal microscopy in coronal planes spanning the entire length of the chick embryo heart. We determined: 1) the epithelial-mesenchymal transformation begins between at stages 16 y 17HH at the inferior cushion of the atrioventricular canal and appear next to the atrium; 2) in contrast in the superior cushion this process starts between 17-18HH next to ventricle; 3) from 16HH to stage 20HH the mesenchymal cell number is higher at the inferior cushion than at the superior; 4) from stages 18HH to 20HH, the inferior cushion shows two mesenchymal cells accumulation, one next to atrium and the other one next to the apical trabecular region, this peculiar distribution was designate as bimodal; 5) from stages 18HH to 20HH, the superior cushion shows a increasing gradient of mesenchymal cells along the longitudinal axis from atrium to the ventricle. The hair implant which void the flexure of the head, induced an increase of

mesenchymal cell at stage 16HH; this effect disappeared at stage 20HH and later stages the atrioventricular cushion was hypoplastic.

We know that the ES protein (Markwald and Krug group's) induces the epithelial-mesenchymal transformation and antibodies against this factor block that transformation "*in vitro*". These antibodies were used for screening an expression library and found several clones, which are currently under study. In this report we complete the information about ES/130 in special with respect to heart distribution. We used the cDNA reading frame in order to choose regions of the putative protein to make regional-specific polyclonal antibodies. We obtain 4 antibodies with the following features: a) all of them recognize a band of 130 KDa in Western blot; b) this protein is present in myocardium and endocardium extract of 14 and 17HH stages and it is more abundant at endocardium extract at 17HH stage; c) in chick heart sections the antibody anti-II recognized only the intracellular endocardium. By hybridacion "*in situ*", we found the expression of ES/130 where the epithelial-mesenchymal transformation occurs in the heart at 18HH stage. In functional essay "*in vitro*" our antibodies do not block the epithelial-mesenchymal transformation, for this reason we don't use the antibodies for "*in vivo*" assay.

Our results show that each cushion have its particular epithelial-mesenchymal transformation and may be affect the prospective fate for each atrioventricular cushion. We suggests different hypothesis for the temporal and spatial asymmetries for each cushion: 1) the distribution of the inducer in similar fashion as mesenchymal cell; 2) the extracellular matrix has a regional distribution and 3) the endocardium is heterogeneous with respect to transformation capacity. This information a base for understand the prospective fate for each cushion.

## Resumen.

El cojín inferior y el superior del canal atrioventricular (A-V) participan en la transformación del corazón en tubo recto unicavitario en un corazón tetracavitario, no obstante se desconoce: 1) el grado de contribución de cada uno de estos cojines, 2) los mecanismos de interacción celular en cada cojín y 3) los factores moleculares involucrados.

La invasión de mesénquima en la matriz extracelular en los cojines inferior y superior del canal A-V, marca el inicio de la septación cardiaca. El grupo de Markwald y Krug muestra que el mesénquima se origina de una subpoblación de células endoteliales, bajo la acción de inductores secretados por el miocardio subyacente. Los estudios bioquímicos y de cultivo "*in vitro*" demuestran que proteínas extracelulares de corazones de embriones de pollo del estadio 14-17HH, solubilizadas con EDTA (extractos ES), pueden sustituir al miocardio, como inductor de la transformación endotelio-mesénquima. La posibilidad de que existan moléculas inductoras en el extracto ES, ha sido apoyada, porque anticuerpos producidos contra el extracto ES, bloquean la transformación del endotelio en mesénquima. Estos anticuerpos se han utilizado para analizar una librería de expresión y se han obtenido clones que presentan un inserto de cDNA novedoso. Los productos de estas clonas se están analizando para conocer si son inductores de la transformación epitelio-mesénquima, si el miocardio los produce y si su expresión es en el estadio del desarrollo y en el lugar donde ocurre la transformación del endotelio.

El grupo de De la Cruz con técnicas de marcaje "*in vivo*" en el embrión del pollo, demostró que el cojín inferior del canal A-V participa en el desarrollo de: 1) el septum atrioventricular, 2) el septo interatrial y el septum interventricular

adyacentes al septum A-V y 3) en la porción basal de la valva anteroseptal de la válvula mitral. El cojín superior del canal A-V participa en el desarrollo de: 1) la pared septal del tracto de salida del ventrículo izquierdo y 2) la continuidad mitro-aórtica que es la otra pared de este tracto. Esta información muestra que el destino prospectivo de cada cojín es diferente. Con base en estos hechos, se investigaron las asimetrías potenciales en la distribución de células mesénquimatosas en el cojín inferior y superior del canal A-V en el corazón normal del embrión del pollo y se compararon con un modelo de un cojín hipoplástico, que por consiguiente, presenta una malformación congénita. Además, se estudio la molécula ES/130 como posible inductor en la transformación epitelio-mesénquima.

La distribución temporal y espacial de las células mesénquimatosas, en el cojín inferior y en el superior de canal A-V, fue estudiada con microscopía confocal y se determinó que: 1) la transformación epitelio-mesénquima se inicia en el cojín inferior entre los estadios 16 y 17HH; las primeras células se observan en la región contigua al atrio; 2) El inicio de la transformación epitelio mesénquima en el cojín superior sucede entre los estadios 17-18HH en la región contigua al ventrículo; 3) del estadio 16 al 20HH el número de células mesenquimatosas en el cojín inferior siempre es mayor que en el cojín superior; 4) entre los estadios 18-20HH el cojín inferior mostró dos conglomerados mesenquimatosos, uno cercano al atrio y otro cercano a la región apical trabeculada; 5) en el estadio 18-20HH el cojín superior presentó un gradiente de células creciente hacia la región distal del canal atrioventricular. Por consiguiente, los resultados mostraron que existe un gradiente atrio-ventricular en el cojín superior, mientras que en el cojín inferior la distribución celular es bimodal, es decir existen dos regiones donde estan concentradas las células mesenquimales. En el modelo del cojín hipoplástico, pudimos observar en el estadio 16HH, un incremento de células mesenquimatosas en el cojín inferior respecto al corazón

normal, mientras que en el estadio 20HH el número de células fué más o menos similar comparado con el testigo. Männer informó que los cojines del canal AV son hipoplásticos después del estadio 26 en adelante, y en este trabajo se encontró que son hiperplásticos entre los estadio 16HH al 20HH no obstante porque Männer denominó a este modelo hipoplástico, lo seguiremos denominando de esta manera.

Conocíamos de los datos del grupo de Markwald y Krug ue los antígenos ES inducen la transformación epitelio-mesénquima en cultivo y que los antisueros ES y OJ2 bloquean la transformación epitelio-mesénquima "*in vitro*". Estos anticuerpos se utilizaron para buscar en una librería de expresión a que genes podrían corresponder, uno de ellos es el denominado ES130. Con el propósito de conocer la distribución en el embrión y su participación en la transformación epitelio-mesénquima, generamos anticuerpos contra cuatro regiones de la secuencia deducida del cDNA. Sabemos que ellas reconocen, en Western blot, a una banda de 130 KDa del miocardio y endocardio de embriones del estadio 14 y 17HH. En el estadio 17HH, el endocardio presenta una banda de mayor intensidad de ES/130 que en el miocardio. En inmunohistoquímica el anticuerpo contra ES/130 reconoció exclusivamente a nivel intracelular al endocardio, al epicardio y a la notocorda.

El análisis de ES/130 por hibridación "*in situ*", mostró que el corazón de embriones del estadio 18HH, posee gran cantidad de mensajeros para esta molécula, sin embargo, no pudimos demostrar una distribución específica de su expresión. En pruebas funcionales, los antisueros ES no bloquearon la transformación epitelio mesénquima "*in ovo*" o "*in vitro*" por lo que no pudimos comprobar su papel de inductor en la transformación epitelio-mesénquima.

Nuestros resultados en las etapas tempranas del desarrollo del mesénquima en los cojines inferior y superior del canal A-V demuestran que cada uno de los cojines tienen su propia evolución, respecto a la formación de mesénquima. Esta nueva información sugiere diferentes hipótesis: 1) la distribución del inductor o de su receptor es similar a la de las células mesenquimatosas, 2) la matriz extracelular tiene una regionalización específica y 3) el endocardio es heterogéneo respecto a la capacidad de transformarse en mesénquima.

La información obtenida en este trabajo proporciona bases para explicar el destino prospectivos diferente para cada uno de los cojines atrioventriculares.

# I. INTRODUCCIÓN.

Durante el desarrollo embrionario ocurren cambios moleculares, bioquímicos, morfológicos y fisiológicos de las células que se diferencian formando parte de un todo y son influenciadas por factores intra y extracelulares. Estas características de la morfogénesis señalan que el problema central de la biología del desarrollo es la identificación y la caracterización de los factores intrínsecos y los extrínsecos que controlan a las células durante los procesos básicos del desarrollo, tales como la multiplicación, movimientos y diferenciación celular. Además, es necesario esclarecer el mecanismo de regulación de la expresión genética por el cual esos factores intervienen en los procesos intracelulares y cómo repercuten en el medio extracelular (Grobstein 1964). Durante la formación de un organismo ocurren procesos de crecimiento, adhesión, migración, diferenciación celular, cambios metabólicos, fisiológicos y electrofisiológicos específicos de cada estirpe celular. Estos eventos celulares son regulados por la actividad de los genes implicados y por acontecimientos epigenéticos concomitantes que intervienen en diferentes etapas del desarrollo embrionario, como acontece durante la fertilización, la segmentación, la gastrulación y la organogénesis. La organogénesis cardíaca es de particular interés, por la diversidad de procesos básicos del desarrollo que participan. El embrión de pollo es un modelo utilizado por su facilidad de manejo, en este trabajo nos referiremos principalmente a su desarrollo embriológico del corazón, sólo por motivos de exposición dividiremos su desarrollo en: 1) organogénesis temprana que incluye, 1.1) áreas precardiaca, 1.2) formación del tubo cardíaco primitivo o corazón en tubo recto y 1.3) torsión y formación del asa cardíaca (looping), 2) organogénesis tardía, que comprende: 2.1) septación del corazón, 2.2) desarrollo del aparato valvular atrioventricular y 2.3) incorporación del cono y desarrollo de los tractos de salida ventriculares.

## 1. ORGANOGÉNESIS TEMPRANA.

**1.1. Áreas precardiacas.** El embrión del pollo en el huevo recién puesto está en estadio de blástula, constituido por sólo dos capas celulares: el epiblasto y el hipoblasto. Estas dos capas celulares están separadas por una cavidad denominada blastocele, que contiene gran cantidad de material extracelular, como ácido hialurónico, laminina (Vanroelen et al., 1980), colágena (Martínez-Palomo, 1970) y fibronectina (Mitrani y Farberov, 1982). Las dos capas celulares y el blastocele forman la blástula. En esta etapa, las células con capacidad de formar tejido cardíaco están distribuidas en todo el epiblasto, ya que cuando se cultivan fragmentos de blastodermo sobre la membrana corioalantoidea de embriones, en etapas más avanzadas del desarrollo, se producen vesículas contráctiles (Rawles, 1943). Durante la gastrulación, parte de las células del epiblasto se transforman en células migratorias que invaden el blastocele a través de la línea primitiva y se transforman en células del mesodermo (Rosenquist y De Haan 1966). Las células precursoras del mesodermo al invaginarse, se desplazan sobre el material extracelular que se encuentra en el blastocele en estrecho contacto con el endodermo (Trelstad et al., 1967). Al finalizar la gastrulación en el estadio 4 de Hamburger-Hamilton (Hamburgen y Hamilton, 1951), la línea primitiva ha alcanzado su longitud máxima, en este estadio, las células del mesodermo con capacidad de formar tejido cardíaco se han agrupado formando dos áreas ovaladas, situadas una a la derecha y otra a la izquierda del nódulo de Hensen. Entre el estado 5HH y el estadio 6HH, las células precardiacas se mueven de una manera caótica, es decir su movimiento no está orientado hacia un punto específico. Entre los estadios 6 y 6<sup>+</sup>HH o de pliegue cefálico, las células precardiacas se dirigen hacia la parte más anterior o cefálica del embrión. Posteriormente, en el estadio 8HH o de 4 somitas, las células precardiacas se establecen en el margen anterior del intestino primitivo (De Haan, 1964), en este

lugar las células se organizan y forman el futuro canal cardíaco (Steding and Seidl, 1980). De Haan en 1964, demostró que las áreas presuntivas del corazón del estadio 6 al 7HH, cultivadas sobre agar, forman una vesícula contráctil en la parte más cefálica del tejido explantado; basado en este hecho, De Haan sugirió que el mesodermo precardiaco conserva el movimiento direccional en cultivo. El grupo de Lash (Linash and Lash, 1986) basados en la existencia de un gradiente de fibronectina de dirección caudo-cefálico, proponen que las células precardiacas se mueven siguiendo este gradiente.

Simultáneamente con la migración de las células precardiacas, el mesodermo se separa en mesodermo esplácnico y somático, aparentemente este proceso se lleva a cabo por medio de la creación de vesículas que finalmente al fusionarse, dividen al mesodermo en dos capas (Linash, 1992). Por otra parte, se ha visto que el tratamiento de los blastodermos con 5-bromodesoxiuridina entre los estadios 6 y 7HH inhibe la formación de tejido cardíaco pulsátil (Chacko y Joseph 1974 y Montgomery et al., 1994), esta observación sugiere que el programa de diferenciación de las células cardíacas se inicia entre los estadios 6 y 7HH, durante su migración direccional. Sugi y Lough (1995) presentan evidencias de que la Activina-A y el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF-2) inducen a la parte posterior del blastodermo del estadio 6HH a formar tejido contráctil, lo que sugiere que estas moléculas participan en la inducción de tejido contráctil. Se han identificado factores que estimulan la producción de proteínas contráctiles como: el SRF (serum response factor), que estimula a la producción de  $\alpha$  actina (McQuinn y Schartz, 1995) y el factor de maduración de cardiocitos (CMF-1), que estimula la producción de miosina (Edmodson et al., 1994). Es importante hacer énfasis que la ruta de diferenciación del músculo esquelético y del cardíaco es diferente, así Kern et al., (1995) proponen que la cascada de

factores transcripcionales que regulan la diferenciación de músculo cardiaco son diferentes a los que participan en la diferenciación del músculo esquelético.

### **1.2. Formación del tubo cardiaco primitivo o corazón en tubo recto.**

Las células precardiacas llegan a su posición final y se organizan dando origen a una estructura acanalada que tiene como pared dorsal al intestino primitivo y que está constituida por endocardio recubierto por miocardio (Davis, 1927). Linask y Lash (1993) sugieren que el miocardio y el endocardio se originan de un progenitor común. Este corazón acanalado y recto está constituido sólo por la porción trabeculada de ambos ventrículos (De la Cruz et al., 1989) y comienza a latir espontáneamente en el estadio 10HH (Ramanoff 1960).

**1.3. Torsión y formación del asa cardiaca (looping).** Entre el estadio 10HH (corazón en tubo recto) y el estadio 12HH o asa en "C", suceden dos eventos muy importantes: A) la adición de poblaciones celulares caudales al tubo cardiaco que constituirán las cámaras de entrada ventriculares, donde se desarrollaran los cojines del canal AV y la región atrial (George 1989) y poblaciones cefálicas que darán origen al tracto de salida de ambos ventrículos (De la Cruz et al., 1977) y B). La formación del asa dirigida hacia la derecha, se ha tratado de explicar por medio de diferentes mecanismos: 1.- crecimiento diferencial (Stasberg 1969a y b y Sissman 1966), 2.- contracción del miocardio (Manasek y Monroe 1972), 3.- factores hemodinámicos, 4.- depósito diferencial de ácido hialurónico, que al hidratarse ejercería una presión asimétrica (Manasek, 1981). 5.- citoesqueleto, como el caso del arreglo de miofibrillas agrupadas preferencialmente en la cara convexa del asa (Manasek, 1972) y también a una disposición circunferencial de actina en todo el perímetro del corazón (Itasaki et al., 1991), 6.- morfógenos, se ha propuesto que la región cefálica del área precardiaca sintetiza un morfógeno que regula el tipo de asa en "C" (Easton et al.,

1992), un posible morfógeno es el ácido retinoico que regula por lo menos dos genes (Osmond et al., 1991, Hoyle et al., 1992 y Yost, 1992) y 7.- factores inductores, Levin et al. (1995) mostraron que moléculas similares a la activina, sonic hedgehog, o el producto aún no caracterizado del gene relacionado con el nodo de Hensen (cNR-1), participan en el establecimiento del asa tipo "C".

En este trabajo llamaremos Asa al periodo comprendido desde el estadio 12HH, estadio en el cual existen por primera vez en el corazón todos los segmentos cardíacos primitivos (De la Cruz et al., 1989), hasta el estadio 16HH cuando los segmentos cardíacos primitivos de la región apical trabeculada de cada uno de los ventrículos se encuentran lado a lado y en posición caudal con respecto a las aurículas primitivas (De la Cruz et al 1983 y Villavicencio, 1997). El corazón en el estadio 12HH es un corazón en serie y está constituido en sentido cefalo-caudal por: el segmento cardíaco primitivo denominado cono o primordio del tracto de salida ventricular, que aparece en este estadio, por el asa bulboventricular, que tiene dos partes, una cefálica constituida por el segmento cardíaco primitivo de la región apical trabeculada del ventrículo derecho y la otra caudal, constituida por dos segmentos, uno adyacente al surco interventricular que es el primordium de la región apical trabeculada del ventrículo izquierdo y el otro el primordio de las cámaras de entrada ventriculares que aparece en este estadio y está separado por los surcos atrioventriculares de ambos atrios primitivos, que también aparecen en este estadio del desarrollo. En el estadio 14HH esta disposición cambia; el borde mayor del asa cardíaca ya no es derecha sino ventral, el borde convexo es dorsal y aparece el espacio retrocardíaco, además las aurículas se han desplazado hacia una posición más cefálica y dorsal con respecto a su posición inicial. Finalmente, en el estadio 16HH, las futuras regiones apicales trabeculares ventriculares se encuentran lado a lado, la futura región apical trabeculada del ventrículo derecho a la derecha y la izquierda a la izquierda y caudales con respecto a las aurículas primitivas (Villavicencio, 1997).

Los mecanismos de la formación del asa cardiaca han sido poco estudiados, no obstante, se ha descrito que la inhibición o retardo en la flexión cervical induce malformaciones congénitas, no así cuando se impide la flexión cefálica (Mannér et al 1993 y 1995). Durante el estadio 16HH existe un incremento en el depósito de material extracelular en la región del canal atrioventricular, el cual está constituido por colágenas tipo I, II, III, IV, V, VI y VIII, heparán sulfato proteoglicano, dermatán sulfato proteoglicano, condroitín sulfato proteoglicano, ácido hialurónico, fibronectina, fibulina-2, fibilina, laminina, citotactina, entactina, BM-90, fibrilina, familia de proteínas ES, tenasina, factores de crecimiento (derivado de plaquetas, de fibroblastos, de transformación tipo- $\beta$ , factor epidérmico, tipo insulina) citocininas, metaloproteasas, serin-proteasas, cisteina proteasas e inhibidores del activador del plasminógeno, entre otros (revisado por Borg et al. 1995 y Little y Rongish 1995). La mayoría de estas moléculas han sido relacionadas con los eventos de la morfogénesis cardiaca, no obstante la forma de participación de cada componente se desconoce.

## **2. ORGANOGÉNESIS TARDÍA.**

**2.1. Septación del corazón.** En el embrión del pollo, el primer septum cardiaco aparece en el estadio 17HH y está constituido, en la región atrial por el septum primum rudimentario, en la región del tracto de entrada ventricular por los cojines inferior y superior del canal atrioventricular y en la región apical trabeculada de ambos ventrículos, aún incipiente, por el tabique interventricular primitivo muy pequeño (de la Cruz et al 1997). Este septum presenta un orificio, el foramen primum en la región atrial y otro en la región ventricular, el foramen interventricular primitivo. Este septum cardiaco tiene la forma de un número ocho, divide al corazón en cuatro cavidades y lo denominamos septum cardiaco primitivo (de la Cruz et al. 1997). Es importante señalar que el septum primum

está constituido por músculo cardíaco compacto, los cojines del canal atrioventricular están formados por tejido mesenquimatoso y el tabique interventricular primitivo por músculo cardíaco trabeculado. Se estudiará cada uno de los componentes embriológicos del tabique cardíaco primitivo por separado y su expresión anatómica correspondiente en el corazón maduro.

**A) El Septum primum y el septum interatrial.** Como hemos señalado, el septum primum aparece en el estadio 17HH; forma parte del primer septum cardíaco, separa la cavidad atrial derecha de la izquierda y corresponde externamente al surco interatrial. Este septum crece en dirección hacia los cojines superior e inferior del canal atrioventricular y conjuntamente con ellos forma el borde de un orificio entre ambos atrios que se denomina foramen primum (Patten, 1922 en Morse et al., 1984). El septum primum conjuntamente con tejido proveniente del cojín inferior del canal atrioventricular, como se ha demostrado por medio de experimentos de marcaje "*in vivo*" de este cojín, cierran el foramen primum. En las últimas etapas del cierre del foramen primum aparecen múltiples orificios en la zona media del septum primum, mediante las cuales continúa el flujo sanguíneo desde la aurícula derecha hacia la izquierda, estas perforaciones se sugiere son debidas a muerte celular o a un incremento de la presión originada por el cierre del foramen primum (Morse et al., 1984). Es importante señalar que desconocemos como se cierran estos orificios después de la eclosión, ya que en el corazón maduro no existen. En los mamíferos existe otro septum denominado septum secundum, el cual es esencial en el periodo prenatal. El mecanismo de la formación de foramen secundum se desconoce, de la Cruz et al. (1972) considera que en la etapa postnatal la presión sanguínea ejercida por el funcionamiento de los pulmones, es la causa del cierre del foramen secundum. Hay que hacer notar

que se conoce poco acerca de los elementos celulares y eventos subcelulares de la septación atrial.

**B) Los cojines inferior y superior del canal atrioventricular y el septum atrioventricular.** El cojín inferior y el superior del canal atrioventricular, desde su aparición en el estadio 17HH, dividen al flujo sanguíneo en dos corrientes una de la aurícula derecha al ventrículo derecho y otra de la aurícula izquierda al ventrículo izquierdo. Los cojines inferior y superior del canal atrioventricular comienzan a fusionarse en el estadio 26HH, adquieren la forma de un arco con la superficie convexa mirando a la aurícula derecha y la cóncava a la cámara de entrada del ventrículo izquierdo. En el extremo cefálico de este arco emerge una evaginación izquierda que da origen a la porción de la valva anterior de la mitral que se inserta en el tabique y en el extremo caudal una evaginación derecha que participa en el desarrollo de la valva septal de la tricúspide. Esta masa mesenquimatosa en forma de arco separa la cavidad auricular derecha de la cámara de entrada del ventrículo izquierdo y su expresión anatómica es el septum atrioventricular. Es importante señalar que este tabique al comienzo de su desarrollo, está formado por tejido mesenquimal, que más tarde es invadido por tejido muscular como se ha descrito en el humano por Wessels et al., (1995), por consiguiente, actúa como sustrato para la emigración de las células musculares cardíacas. Los experimentos de marcaje "*in vivo*" del cojín inferior del canal atrioventricular demuestran que este cojín forma el septum atrioventricular y divide al orificio atrioventricular común en los orificios tricúspideo y mitral, también como ya hemos señalado contribuye en el cierre del foramen primum.

Los experimentos de marcaje "*in vivo*" del cojín superior del canal atrioventricular (de la Cruz et al., 1982 y 1983 y García-Pelaez et al., 1984), demuestran que contribuye en la formación de la porción libre de la valva anterior

de la mitral que constituye la continuidad mitro-aórtica y también en la pared septal del tracto de salida del ventrículo izquierdo.

**C) El septum interventricular primitivo y el definitivo.** El primordium del tabique interventricular primitivo aparece en el corazón en tubo recto y está localizado en la línea ventral de fusión entre el primordium de la porción apical trabeculada del ventrículo derecho y el del izquierdo (De la Cruz et al., 1997). En el estadio 17HH cuando ha finalizado el periodo de torsión y el desarrollo del asa cardiaca (looping), el tabique interventricular primitivo hace su primera expresión morfológica en el apex del corazón, formando parte del primer septum cardiaco. Es importante señalar que el septum interventricular primitivo corresponde externamente al surco interventricular. Este septum crece en dirección a los cojines del canal atrioventricular y cierra el foramen interventricular primitivo conjuntamente con tejido que proviene del cojín inferior del canal atrioventricular, como se ha demostrado por experimentos de marcaje "*in vivo*" de este cojín. Anatómicamente, el septum interventricular primitivo forma el tercio medio y apical del tabique interventricular definitivo, mientras que el tercio basal de este tabique, en la región de los tractos de entrada ventriculares, proviene del cojín inferior del canal atrioventricular y la zona del tracto de salida del ventrículo izquierdo se origina del cojín superior del canal atrioventricular.

**2.2 Aparato valvular atrioventricular.** El aparato valvular tricúspide y mitral está constituido por el anillo de inserción, los velos valvulares o valvas, las cuerdas tendinosas y los músculos papilares. El límite atrial corresponde al anillo de inserción de la válvula tricúspide y su límite con la región apical trabeculada de cada uno de los ventrículos corresponde a la base de los músculo papilares. La válvula tricúspide está constituida por tres velos valvulares o valvas, la septal, la anterior y la posterior, la primera se origina del cojín inferior del canal

atrioventricular como se ha demostrado por experimentos de marcaje "*in vivo*" (de la Cruz et al., 1983), la anterior, probablemente se origina del pliegue ventrículo infundibular y la posterior posiblemente del cojín lateral derecho del canal atrioventricular. Es muy factible que en cada una de estas válvulas participen las paredes ventriculares, pero aún desconocemos cuál es su verdadera contribución. La válvula mitral tiene dos valvas, la anterior que presenta dos regiones, la porción con inserción septal y la porción libre que se ha denominado continuidad mitro-aortica, que es una de las paredes del tracto de salida del ventrículo izquierdo. Respecto al origen embriológico de cada una de estas porciones, en la septal contribuye el cojín inferior como lo han demostrado los experimentos de marcaje "*in vivo*" y en la porción libre o continuidad mitro-aortica, el cojín superior del canal atrioventricular, también probado por experimentos de marcaje "*in vivo*" pero aún desconocemos cuál es la contribución de las paredes ventriculares (De la Cruz et al., 1983 y Van Mierop, et al., 1962). La valva posterior o mural de la mitral se origina en parte del cojín lateral izquierdo pero también participa la pared libre ventricular, mediante un proceso morfogénético que aún desconocemos. Respecto a las cuerdas tendinosas y los músculos papilares de los dos aparatos valvulares, aún no sabemos su morfogénesis.

Chin et al., (1992) sugieren que el tejido de cojín da origen al aparato valvular atrioventricular (mitral y tricuspideo) y que la base de los velos valvulares se origina de la desdiferenciación de tejido muscular (Argüello et al., 1978). Van Mierop y Kutsche (1985), sugieren que la pared ventricular tiene un papel crítico en el desarrollo del aparato valvular atrioventricular. No obstante, el grado de participación de la pared muscular permanece desconocido.

**2.3. Incorporación del cono y desarrollo de los tractos de salida ventriculares.** Los tractos de salida ventriculares son los segmentos subarteriales ventriculares, subpulmonar en el ventrículo derecho y subaórtico en el izquierdo.

El segmento cardiaco primitivo denominado cono aparece en el estadio 12HH, es el segmento más cefálico del corazón y se continua caudalmente con el primordium de la región apical trabeculada del ventrículo derecho (de la Cruz et al. 1989). En el cono, en el estadio 22HH aparecen las crestas dextrodorsal y sinistroventral y dividen al cono en un cono anterolateral y otro posteromedial (Netter y Van Mierop 1969). Las crestas se forman por células mesenquimatosas que provienen de la transformación del endocardio que invaden la matriz extracelular (Thompon y Fitzharris, 1979). El cono esta conectado, en su extremo caudal, con la región apical trabeculada del ventrículo derecho y en su extremo cefálico está conectado con el tronco, el cual ha aparecido en el estadio 17-18HH (García-Peláez y Arteaga 1993) . En el estadio 27HH, el cono anterolateral se ha incorporado al ventrículo derecho (de la Cruz et al., 1977) pero aún desconocemos como ocurre esta incorporación. Respecto al cono posteromedial, se supone que se incorpora al ventrículo izquierdo y contribuye en el desarrollo de su tracto de salida.

El proceso de septación del tronco da origen a las dos grandes arterias: la pulmonar y la aorta, que han sido objeto de estudio del grupo de Kirby et al. (1987) quienes muestran evidencias de que en este proceso participan las células de la cresta neural cardiaca. Las válvulas de las grandes arterias son el límite entre estas arterias y los tractos de salida ventriculares.

En este trabajo estamos interesados en estudiar la transformación mesenquimatosas que tiene lugar en los cojines inferior y superior del canal atrioventricular.

## II.- ANTECEDENTES.

El conocimiento de la participación del tejido del cojín inferior y superior del canal atrioventricular en la formación de las válvulas atrioventriculares y de los tabiques del corazón maduro han requerido por su complejidad de una investigación multidisciplinaria, mediante la cual se ha logrado obtener información importante pero aún incompleta. A continuación se presenta dicha información, que nos permite plantear el objetivo principal de esta investigación. La información se expone en dos secciones: 1) estudios de la embriología descriptiva y experimental y 2) antígenos ES y su participación en la transformación epitelio mesénquima en los cojines inferior y superior del canal atrioventricular (AV).

**1. Embriología descriptiva y experimental.** Grant (1962), Wenink y Gittenber-de Groot (1986) y Anderson (1990) sugieren que los cojines inferior y superior del canal A-V contribuyen muy poco en la septación cardiaca y en el desarrollo de los velos valvulares. Estos autores consideran que el tejido epicárdico y el miocárdico forman la mayor parte del velo valvular. Chin et al. (1992) utilizando la fibronectina como marcador del tejido de cojín, concluyeron que la mayor parte del aparato valvular A-V (mitral y tricuspideo) deriva de los cojines endocárdicos y que la base de los velos valvulares proviene de la desdiferenciación del miocardio, este señalamiento se apoya en los hallazgos de Argüello et al. (1978) quienes observaron que el músculo cardíaco se transforma en tejido conectivo. Los trabajos de de la Cruz et al. (1982) muestran que el cojín inferior del canal AV contribuye al desarrollo del septum atrioventricular, los septos interatrial e interventricular adyacentes al septum A-V, en la porción basal de la valva septal de la tricúspide y en la porción de la valva anterior de la mitral que se inserta en el septo. De la Cruz et al. (1983) y García-Pelaez et al. (1984) demuestran que el cojín superior participa en el desarrollo de la porción septal del

tracto de salida del ventrículo izquierdo y en la continuidad mitro-aórtica. Por consiguiente, los experimentos de marcaje "*in vivo*" de De la Cruz et al. 1983 y García-Pelaes et al., 1984, demuestran la participación de los cojines del canal AV, como estructuras importantes en la transformación del corazón tubular a un órgano de cuatro cámaras. Sin embargo, los procesos biológicos que intervienen en la formación de los velos valvulares y de los septos cardiacos aún se desconocen.

**2. Antígenos ES en la transformación epitelio-mesénquima.** El hecho que marca el inicio de la septación cardiaca es la transformación de una subpoblación de células endoteliales en células mesenquimatosas, que recubren los cojines inferior y superior del canal AV. Esta transformación epitelio-mesénquima es inducida por factores secretados por el miocardio subyacente (Markwald et al., 1977). Las células mesenquimatosas manifiestan cambios en su forma (Icardo, 1989a,b), adhesión célula-célula y asociación célula-matriz extracelular, posteriormente invaden por migración la matriz extracelular y ocupan el espacio entre el miocardio y el endocardio. Con el propósito de estudiar los mecanismos de transformación de las células endoteliales en mesénquima, en el corazón del embrión de pollo, los investigadores Krug et al. (1985a,b), Markwald et al. (1977) y Runyan y Markwald (1983) crearon un sistema de cultivo "*in vitro*"; mediante el cual concluyeron que dicho evento es dependiente de factores secretados por el miocardio. Los estudios bioquímicos demostraron que las proteínas extracelulares extraídas con EDTA (extractos ES) y proteínas del medio condicionado de cardiocitos, pueden sustituir al miocardio como fuente del inductor de la transformación epitelio-mesénquima. También se encontró que un antisuero (ES1) generado contra las proteínas presentes en el extracto con EDTA, bloquea la transformación del endotelio cardiaco a mesénquima (Krug, et al., 1985a,b). Estudios "*in vivo*" han mostrado que las proteínas reconocidas por el

antisuero ES1 se asocian con la fibronectina y otros componentes de la matriz extracelular y constituyen partículas complejas denominadas adherones (Sinning et al., 1992). Otras investigaciones informaron que algunos de los componentes identificados por los anticuerpos ES1 son proteínas de 180, 109, 93, 46 y 28 Kilodaltones (kD)(Krug et al, 1985a,b, 1987), no obstante, se desconoce el papel de cada uno de ellas "*in vivo*" e "*in vitro*". Estudios inmunohistoquímicos indican que los antígenos ES se expresan de una manera temporal en el corazón, aunque no se ha demostrado si ellos se encuentren localizados en las regiones del canal A-V donde ocurre la transformación epitelio-mesénquima. Estos anticuerpos se emplearon para seleccionar de una librería de expresión de miocardio sólo a aquellas clonas positivas y se encontraron 6 (Krug et al., 1987). El análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones, reveló que dos son secuencias novedosas, lo que hace interesante analizar su capacidad como inductores de la transformación epitelio-mesénquima "*in vivo*" e "*in vitro*" e investigar si su distribución en el corazón corresponde con los sitios de transformación. De las seis clonas en este trabajo se presenta lo referente a una de ellas, que corresponde a una proteína de 130 Kd.

### III. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS.

Sabemos que el cojín inferior del canal AV participa en el desarrollo de la región basal de la valva anterior de la mitral y de la septal de la tricúspide, el septum atrioventricular, las regiones adyacentes del septo interventricular y del interatrial, mientras que el cojín superior participa en la región septal del tracto de salida del ventrículo izquierdo y la continuidad mitro-aórtica. El destino prospectivo diferente de los cojines inferior y superior del canal AV sugiere que pueda deberse a distintos factores tales como: 1) un diferente programa de diferenciación, 2) la distribución asimétrica de las células mesenquimatosas en

antisuero ES1 se asocian con la fibronectina y otros componentes de la matriz extracelular y constituyen partículas complejas denominadas adherones (Sinning et al., 1992). Otras investigaciones informaron que algunos de los componentes identificados por los anticuerpos ES1 son proteínas de 180, 109, 93, 46 y 28 Kilodaltones (kD)(Krug et al, 1985a,b, 1987), no obstante, se desconoce el papel de cada uno de ellas "*in vivo*" e "*in vitro*". Estudios inmunohistoquímicos indican que los antígenos ES se expresan de una manera temporal en el corazón, aunque no se ha demostrado si ellos se encuentran localizados en las regiones del canal A-V donde ocurre la transformación epitelio-mesénquima. Estos anticuerpos se emplearon para seleccionar de una librería de expresión de miocardio sólo a aquellas clonas positivas y se encontraron 6 (Krug et al., 1987). El análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones, reveló que dos son secuencias novedosas, lo que hace interesante analizar su capacidad como inductores de la transformación epitelio-mesénquima "*in vivo*" e "*in vitro*" e investigar si su distribución en el corazón corresponde con los sitios de transformación. De las seis clonas en este trabajo se presenta lo referente a una de ellas, que corresponde a una proteína de 130 Kd.

### III. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS.

Sabemos que el cojín inferior del canal AV participa en el desarrollo de la región basal de la valva anterior de la mitral y de la septal de la tricúspide, el septum atrioventricular, las regiones adyacentes del septo interventricular y del interatrial, mientras que el cojín superior participa en la región septal del tracto de salida del ventrículo izquierdo y la continuidad mitro-aórtica. El destino prospectivo diferente de los cojines inferior y superior del canal AV sugiere que pueda deberse a distintos factores tales como: 1) un diferente programa de diferenciación, 2) la distribución asimétrica de las células mesenquimatosas en

cada uno de los cojines y 3) las relaciones diferentes en el tiempo y en el espacio de los cojines con otras estructuras embriológicas.

Suponemos que la participación diferencial de los cojines superior e inferior en la formación de los velos valvulares y septos cardiacos, se debe entre otros factores posibles a que existen importantes diferencias entre ambos cojines con respecto a la cantidad y distribución topográfica de las células mesenquimatosas y a la mayor expresión de los antígenos ES en los sitios donde las células endoteliales se transforman en mesénquima.

## **IV. OBJETIVOS.**

Nuestros objetivos los dividimos en general y particulares.

Objetivo general: Estudiar la distribución de las células mesenquimatosas en los cojines inferior y superior del canal A-V, su relación con la distribución del antígeno ES/130 y sus variaciones en diferentes estadios del desarrollo.

Objetivos particulares: 1.- Determinar la cantidad, la distribución y el lugar de células mesenquimatosas en el cojín inferior y en el superior del canal A-V en embriones normales y en un modelo hipoplástico de estos cojines, en diferentes estadios del desarrollo mediante microscopia confocal. 2.- Investigar la relación que existe entre los sitios de transformación endotelio-mesénquima y la distribución del antígeno ES/130, por inmunohistoquímica e inmunoblot. 3.- basados en los resultados obtenidos, discutir las causas posibles que determinan que cada uno de estos cojines tenga un destino prospectivo diferente.

## V. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

Elegimos como modelo biológico el corazón del embrión de pollo por su similitud anatómica, histológica y embriológica con el humano y porque además, permite hacer una intervención selectiva en una estructura embriológica específica "*in vivo*", lo cual no puede realizarse en mamíferos, por producirse el aborto.

Se usaron huevos fértiles de gallina, White Leghorn (Gallus domesticus), que se incubaron a 37 °C, 86 % de humedad relativa y utilizamos para el estudio del desarrollo del embrión del pollo, la clasificación de Hamburger y Hamilton (HH) que utiliza el tiempo de incubación y la morfología. Los estadios que se utilizaron fueron del 16 al 20 HH.

De acuerdo con los objetivos de nuestra investigación, el estudio se dividió en 3 secciones. 1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines superior e inferior del canal atrioventricular, 2. Distribución de ES/130 y 3. Estudio de la acción de los anticuerpos ES/130 "*in vivo*".

### **1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines del canal atrioventricular.**

1.1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines normales del canal atrioventricular. Los embriones se colectaron en solución de Earle (Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), Gibco BRL). El corazón se perfundió inyectando EBSS con una micropipeta a través del seno venoso para eliminar los eritrocitos, posteriormente se perfundieron con una solución de paraformaldehído

al 4% en PBS y se transfirieron a solución de paraformaldehído por 2 horas. Los embriones se lavaron exhaustivamente con PBS con azida de sodio 0.05% (PBS-A), se conservó el corazón y una porción del cuerpo del embrión. Cada corazón se incluyó en poliacrilamida, siguiendo el protocolo utilizado por Germroth et al (1995) con ligeras modificaciones. Los corazones fijados se infiltraron durante 8 hrs a temperatura ambiente (TA), en una mezcla de acrilamida (5 ml de acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8 %, 100  $\mu$ l de TEMED, 2 ml de 5X PBS y 2.9 ml de agua). Posteriormente cada corazón se transfirió a un criomolde de 15 mm x 15 mm x 5 mm (Miles Inc.), los cuales contenían en su base, un gel de poliacrilamida de 1.5 mm de grosor. El corazón se colocó sobre el gel, se adicionaron 400  $\mu$ l de solución de poliacrilamida y con el auxilio de un microscopio estereoscópico, fue orientado para hacer cortes transversales, utilizando pequeñas agujas de vidrio, con las cuales se sujetó la porción del cuerpo del embrión al gel de poliacrilamida. Una vez orientadas las muestras, se adicionó a cada molde, 10  $\mu$ l de persulfato de amonio al 2%, el molde se cubrió con un cubreobjeto durante 6 hrs y el gel polimerizó a temperatura ambiente. Los bloques con el corazón, se retiraron del molde y se pegaron con cemento de cianoacrilato (Krazy Glue, Borden Inc, Columbus, OH) al portamuestras de un vibrátomo marca Lanser (Serie 1000, Sherwood Medical, St, Louis, MO). Se obtuvieron secciones de 100  $\mu$ m y se colectaron con el auxilio de un pincel y una pinza de relojero. Las secciones se sumergieron en HCl 1 N por 1 hr para hidrolizar el ARNm, se lavaron con PBS, hasta que el pH fuera de 7, se tiñeron con yoduro de propídido 0.01 mg/ml por 2 hrs y se lavaron exhaustivamente con PBS. Las muestras se transfirieron a PBS/glicerol (1:1) y se colocaron sobre el portaobjetos, se cubrieron con el cubreobjeto y se sellaron con barniz para uñas. Estas muestras se analizaron en un microscopio confocal Bio-Rad modelo MRC-1000 (Bio-Rad, Inc., Hercules, CA), usando filtro standard para yoduro de propidido, la información se almacenó para PC-AT en formato TIFF.

Con el propósito de contar todas las células mesenquimatosas a lo largo de todo el corazón, se realizaron 12 cortes transversales gruesos (paquetes) que iniciaban en la región atrial y terminaban en la ventricular, cada paquete tenía 18  $\mu$  de grosor y estaba constituido por 3 secciones ópticas adyacentes, los paquetes estaban separados entre sí por 10  $\mu$  (fig. 1). Se seleccionaron las células mesenquimatosas cuyos núcleos estuvieran bien definidos y separados al menos 10  $\mu$  del endocardio. En cada estadio (16-20HH) se tomó como grado de invasión la distancia entre el endocardio y cada célula mesenquimatosa, para lo cual se utilizó el programa Photofinish versión 3 para Windows. Los datos se analizaron por medio de la "t de student", por análisis de regresión lineal y polinomial en el programa SigmaStat 1.0 para Windows.

1.2. Modelo experimental de cojín hipoplástico del canal A-V. Männer et al (1993) señalaron que existe relación entre la flexión de la región cefálica del cuerpo del embrión y el desarrollo cardíaco, que afecta la torsión del corazón y a la vez altera el desarrollo embriológico normal de los cojines y los transforma en hipoplásticos. Nosotros pensamos que este es un buen modelo experimental para investigar la relación de la transición epitelio-mesénquima de los cojines del canal A-V y su expresión anatómica, además podría ser útil para investigar la expresión de las moléculas reguladoras de este proceso. Reproducimos el modelo introduciendo un cabello en el tubo neural de embriones del pollo del estadio 10-11HH. Con este propósito el cabello se lavó con los siguientes reactivos y en el orden siguiente: 1) extran (Sigma Co, MO) al 5% en agua, 2) agua, 3) etanol al 70%, 4) alcohol absoluto y se dejó secar. El cascarón se desinfectó con Rocal al 0.14% y posteriormente con etanol al 70%. En el área de la cámara de aire del huevo se adhirió cinta transparente, para evitar que el cascarón se rompiera durante el proceso de corte. Con el auxilio de una tijera curva, se procedió a cortar el cascarón en la región donde se fijó la cinta adhesiva, se retiró la

membrana de la cáscara y el embrión quedo expuesto. Los embriones del estadio 10-11HH se tiñeron con 5 µl de rojo neutro al 0.2% en PBS, se localizó la cabeza y con una pinza de relojero se practicó una pequeña incisión en la membrana vitelina cercana al neuroporo anterior. Se seleccionó un cabello delgado y se introdujo a través del neuroporo hasta después del último somite (fig. 2). A los embriones testigo, sólo se les colocó un cabello en la región cefálica y a otros se les introdujo el cabello e inmediatamente se les retiró. Una vez terminada la operación, el orificio del cascarón se recubrió con parafilm (American Nat, Geenwich, CT), el huevo se invirtió para evitar que la evaporación dañara al embrión y se incubó a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. La evaluación del número de células mesenquimatosas y el grado de invasión, se realizó con la misma metodología que se utilizó en los embriones normales. Se puso especial énfasis en el estadio en que se inicia la transformación endotelio-mesénquima, es decir estadios 16HH, 18HH y 20HH.

## **2. Distribución de ES/130.**

### **2.1. Producción y purificación de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra ES/130.**

**2.1.1. Producción de anticuerpos contra ES/130.** Debido a que se conoce la secuencia del cDNA de la proteína ES/130 (Rezaee et al 1993), es posible deducir la secuencia primaria de la proteína a la que codifica. Se eligieron regiones de la secuencia primaria de la proteína que cumplieran con las siguientes características: 1) longitud aproximada de 20 aminoácidos, 2) inmunogénicas, 3) hidrofílicas lo que incrementa la probabilidad de que existan en la superficie de la molécula, 4) sin homología con otras proteínas. Es importante señalar que se eligieron dos secuencias que también existen en la proteína

recombinante ES2.1a, subclona de ES/130, que se ha utilizado para obtener anticuerpos, esto con el propósito de aumentar las probabilidades de obtener anticuerpos específicos contra ES/130. Estas características se analizaron en el programa PEPTIDESTRUCTURE (GCG package, BRC).y se eligieron 4 de ellas (fig. 3).

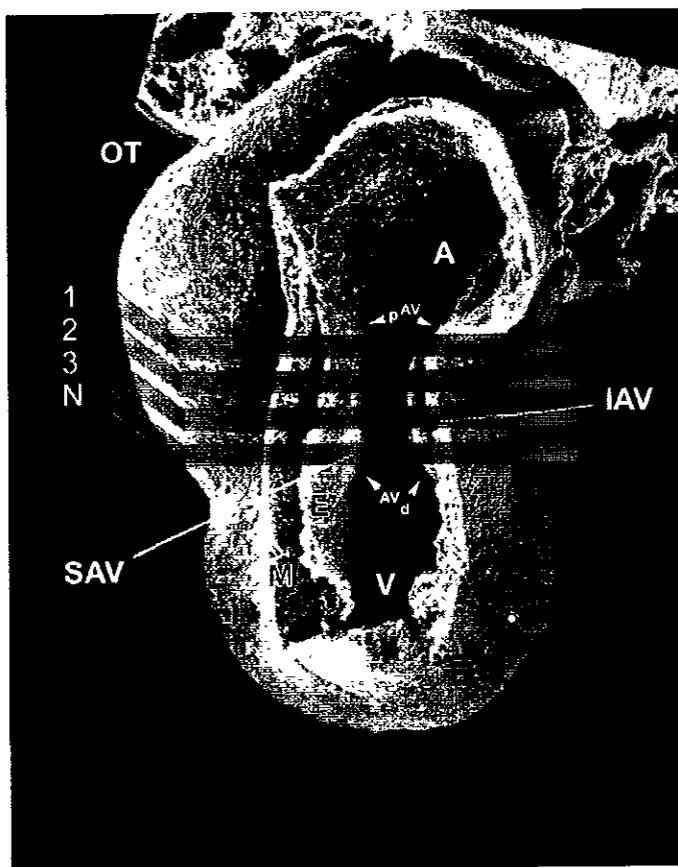


Fig 1. Representación del protocolo de corte en el corazón. Se realizaron paquetes (1,2..n) de 18 micras, separados cada uno por 10 micras. Cada paquete está constituido por 3 secciones separadas cada una por 6 micras. A, atrio; OT, tracto de salida; SAV, cojín superior del canal A-V; IAV, cojín inferior del canal A-V; V, ventrículo; E, endocardio; M, miocardio; pAV, región proximal; dAV, región distal. El corazón fué fotografiado a 100X en un microscopio electrónico de barrido.

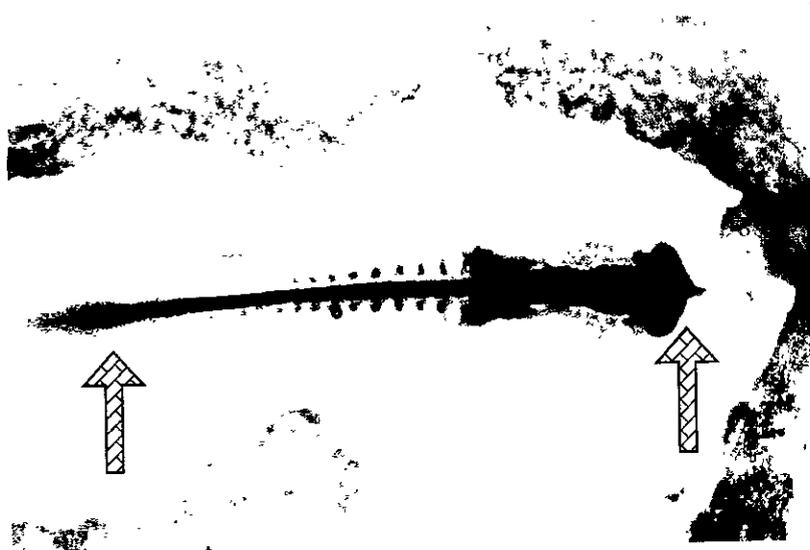


Figura 2. Implante del Pelo. El embrión del estadio 10HH muestra un pelo en el tubo neural señalado por las flechas.

D**KIPEQQVTQEVTDSSK**VVVEPAVVPEPIAVESPIAAVSVPPQEKEKPALSPKEKRKKEK  
KVAKVEPAPSPALASPPASVPKGSPVLEVTPKEVPVVAVPPVGTQQSAPVVSSVPIKKPE  
ALPTHEEQKH**DGPVKKKSASKKKAEPAPADSDGP**LYLPYKTLVSTISSMAFSEGEAQQLI  
EILTERAGIVQDTWHTATQKGDPAVLKRQLEEKEKQLTAEQEDAAAARNKLRELSKELA  
 AEKAKAAASESKLKEQLVTREREITAVQARMQASYQDHVNETQQLOGKIRALQEQLNGP  
 NTQLARLQQENSILRDALNQATSQTESKQNAELAKLRQECNKLKELSEKSEVLQQEEQQ  
 KKSWEIKAAASEKQIEQLQTSQREMEATLQ **KRLDEVSDLRKTOTSY**RSLVADA EKAKGQ  
 QQSIAELQAKLLSSETEVSKLLELDSLKGKLEASSENTRLLERIKSIEALLEAGRMREA  
 EEDRDLQAANEAEKQLQLRLQEKTQLLSLEREAELR **EAMEQQKTKNNDLREKNWK**  
 AVEALTTVEKACEEKLLAATKAKEELAHQLDVLQTRTKETLLSALPEVTVSQQDYEAWLQE  
 FKEAVNVLKQHTVMTEPVDSALKLKEAEEAQSTLQAECEQYRAILAETEGMLRDLQKSV  
 EEEQVWKAKLTVSEEELQKSQLQLKSLEDMIEKKAELQSTDQLKEYISLLEAQLDKSL  
 ADSQL

Figura 3. Antígeno ES/130. Secuencia de aminoácidos en código de una letra deducida del cDNA para ES/130. Las letras en negritas indican la secuencia que se eligió para producir los anticuerpos y las letras subrayadas indican la secuencia de la proteína recombinante utilizada para la producción de otros anticuerpos contra ES/130. Las letras subrayadas, indican la secuencia de la clona que se utilizó para realizar las hibridaciones.

Las 4 secuencias seleccionadas de aminoácidos, fueron enviadas al Dr. Cristian Schwabe del departamento de Bioquímica de la **Medical University of South Carolina (MUSC)**, para sintetizarlas por el método denominado fase sólida. Debido a que durante el proceso de síntesis se producen impurezas, fue necesario eliminarlas, con este propósito se utilizaron, columnas de exclusión molecular de 1800 daltones (Bio-Gel P2, BioRad). Se hicieron tres procesos de purificación por exclusión molecular para cada péptido, la primera retiró la mayor parte de los contaminantes de bajo peso molecular, la segunda los remanentes y la tercera se hizo para asegurar su pureza. Entre cada proceso de purificación, los péptidos se liofilizaron para concentrar la muestra. La figura 4 muestra los diferentes perfiles de cada uno de los pasos de purificación. El péptido obtenido después de la última purificación, se envió al departamento de Bioquímica (MUSC) para el análisis de su composición de aminoácidos por medio, de hidrólisis ácida y cromatografía de alta presión. Los datos obtenidos mostraron que el número de aminoácidos fue el esperado para cada péptido (Tabla I).

Los péptidos fueron acoplarlos a KLH (keyhole limpet hemocyanin) según las indicaciones del fabricante (Pierce), con el propósito de que los elementos celulares que participan en la respuesta inmune los pudieran reconocer como inmunógenos. El protocolo que se utilizó se esquematiza en la figura 5 y los resultados de cada reacción con la KLH se presentan en la figura 6. Usamos el valor de la absorbancia de la KLH para calcular la concentración de proteína requerida para inmunizar a los conejos de la raza Nueva Zelanda.

El protocolo de inmunización fue el siguiente:

Día -7 (una semana antes). Se colectó sangre de los diferentes conejos y se dejó coagular durante 1 hr a temperatura ambiente (TA). El coágulo se

almacenó a 4 °C durante toda la noche. Después se centrifugó a 360 xg durante 30 min. El sobrenadante (suero) se dividió en muestras alícuotas de 500 µl y se almacenó a -20 °C hasta su empleo. Este suero preinmune se utilizó como control para todos los ensayos.

Día 0. Se eligieron cuatro zonas en la espalda del conejo, en cada una se inyectó subcutáneamente una emulsión de 125 µg del inmunógeno en 25 µl PBS y 25 µl de adyuvante completo de Freund's.

Día 14. Se colectaron 50 ml de sangre de cada conejo, para obtener suero inmune (sueros X.1). Los sueros se utilizaron para analizar la respuesta inmunológica de cada conejo. Los conejos se inmunizaron nuevamente con 250 µg del péptido-KLH en 100 µl de PBS.

Día 21. Se inmunizó subcutáneamente a los conejos con 200 µg del inmunógeno con 4 mg de hidróxido de aluminio en PBS.

Día 28 y 35. Se colectaron 10 ml de sangre de cada conejo y se procesó para obtener el segundo y tercer suero inmune (sueros X.2 y X.3, respectivamente). La respuesta inmunológica se valoró por el método de ELISA(**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno-**S**orbent **A**ssay).

Día 63: Se inyectó a cada conejo 200 µg del inmunógeno con 4 mg de hidróxido de aluminio en PBS.

Día 66: Se obtuvo el 4° Sangrado (suero X.4) y se analizó su reactividad por el método de ELISA.

El método de ELISA se describe brevemente a continuación: Los pozos de la caja de poliestireno para ELISA (Corning, NY), se recubrieron con 100  $\mu$ l de péptido (1  $\mu$ g/ml) y se dejaron 8 hrs a 4°C. Los pozos se lavaron con amortiguador de tris (20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) con el detergente Tween-20 (0.05%) (TBS-Tween) y se bloquearon de 2 a 3 horas a TA con 1 mg/ml de albúmina sérica de bovino (BSA) en amortiguador de carbonatos (50 mM, pH 9.6). Los pozos se lavaron 4 veces, con TBS-Tween y se agregaron 100  $\mu$ l del suero inmune diluido 1/25, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000 y 1/10000, en una solución de BSA al 1% en TBS-Tween y se dejaron interaccionar por 2 horas a TA. Los pozos se lavaron 4 veces con TBS-Tween y se adicionaron 100  $\mu$ l de anti IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina diluido, 1/3000 en BSA 1% en TBS-Tween, se incubó por 2 horas a TA. Se lavó 4 veces con TBS-Tween, se adicionó a cada pozo 200  $\mu$ l de una solución de p-nitrofenil-fosfato (1 mg/ml) en amortiguador de dietanolamina 10 mM con MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, pH 9.5 y se dejó a TA hasta que desarrollara color (aproximadamente 1 hrs). Posteriormente se midió la densidad óptica (absorbancia) a 405 nm en un lector para ELISA (ICN, MS2 reader).

El tercer sangrado (suero X.3) a una dilución de 1/5000 dió una lectura de aproximadamente 0.1 en 2 horas, lo cual nos indicó que nuestros sueros estaban listos para ser utilizados. En experimentos de competencia no se observó reacción cruzada entre los diferentes péptidos. Hay que hacer notar que todos los sueros reconocieron a la KLH, lo cual era de esperarse, sin embargo esta reactividad no afectó los experimentos de competencia.

2.1.2. Inmunopurificación de anticuerpos antipeptidos ES130. Los anticuerpos se purificaron empleando la siguiente metodología:

A) Obtención de las inmunoglobulinas (IgG) totales del suero. A cada ml de suero se le adicionó, gota a gota, 1 ml de sulfato de amonio saturado (4.1 M pH 7) y se agitó por inversión durante 30 min. a TA. Se centrifugó a 3000 xg durante 15 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 1 ml de sulfato de amonio 2.05 M, se centrifugó a 3000 xg por 15 min. La pastilla se disolvió en 0.5 ml de PBS y se dializó contra PBS, toda la noche a 4 °C. La concentración de las IgGs se determinó midiendo su Absorbancia a 280 nm y utilizando el coeficiente de extinción de 0.75 mg/ml o por el método de micro BCA (Pierce).

B) Adsorción de los péptidos en papel de nitrocelulosa. En cajas de petri de 3.5 cm de diámetro (Falcon), se pusieron discos de nitrocelulosa de 3.2 cm de diámetro (8 cm<sup>2</sup>). Se adicionaron 2 mg de péptido disuelto en 500 µl de PBS y se dejó secar al aire a TA. Las membranas de nitrocelulosa se lavaron con TBS-Tween y se bloquearon con albúmina de bovino 5% en TBS-Tween por 2 horas a 25 °C. Las membranas se lavaron 4 veces con TBS-Tween.

C) Purificación de los anticuerpos anti ES130. Las IgGs (10 mg/ml) cuya purificación se describió en el inciso A, se incubaron con los discos de nitrocelulosa que contenían el péptido adsorbido (ver inciso B), a 4 °C por 8 hrs en agitación constante. Las membranas se lavaron 4 veces (5 min por lavado) con TBS-Tween y se incubaron por 5 min a TA con 0.5 ml de glicina 50 mM/NaCl 150 mM, pH 2.6, para separar las IgGs de sus péptidos. Las inmunoglobulinas se neutralizaron, adicionando 60 µl de tris 1 M pH 9.5. Las IgGs se dializaron y se concentraron en un centriprep-10 (10,000 daltons peso molecular de exclusión, Amicon). La concentración de las IgGs se determinó por el ensayo de micro BCA

(Pierce) y se obtuvo de 0.1 a 5  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{l}$ . Estos anticuerpos se denominaron anti-1, 2, 3 y 4, que indican el número del péptido contra el cual fueron producidos.

2.2. Inmunolocalización de antígenos ES/130 en el tejido. Los sueros se usaron a una dilución de 1/100 y 1/500 y los anticuerpos inmunopurificados a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se utilizaron embriones del estadio 14 y 18HH, se fijaron con diferentes métodos, con el propósito de encontrar el mejor, para preservar y exponer los sitios antigénicos.

A) Fijación con paraformaldehído en PBS. Los embriones se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 hr, se lavaron 3 veces con PBS y los grupos aldehídos libres fueron bloqueados durante 24 hr con albúmina bovina al 2% en PBS con azida de sodio al 0.2% (PBS-A). Posteriormente los especímenes fueron lavados y almacenados en PBS-A.

B) Fijación con paraformaldehído Hepes-Calcio. Para evitar extraer la matriz extracelular, en especial las proteínas solubilizadas con EDTA (antígenos ES), el tejido se fijó 1 hr en paraformaldehído al 4 % en amortiguador de Hepes 0.1 M,  $\text{CaCl}_2$  2 mM.

C) Fijación con etanol a -20 °C. Los embriones se fijaron en etanol a -20 °C por 2 hr y posteriormente se almacenaron a -20 °C.

D) Fijación con acetona a -20 °C. El tejido se fijó con acetona a -20 °C por 2 hrs, posteriormente se transfirió a etanol y se almacenó a -20 °C.

E) Fijación con etanol-Dimetil sulfoxido (DMSO). Las muestras se fijaron en una solución de etanol-DMSO (relación 4:1), durante 2 hrs a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se transfirieron a etanol y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

F) Fijación con solución de Carnoy's sin cloroformo. Los embriones se sumergieron en solución de Carnoy's sin cloroformo (etanol:ácido acético:agua 6:1:3) a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 hr y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

G) Fijación con Omnifix. El OmniFix (An-Con Genetic, Inc) es un fijador constituido de etanol al 36%, etilen glicol, ácido acético, cloruro de sodio y cloruro de zinc. Las muestras se fijaron 1 hr en omnifix y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

H) Fijación por congelación (criopresevación, Kitten et al., 1987). Los corazones se colectaron en PBS y se transfirieron a freón enfriado con nitrógeno líquido, inmediatamente después se pasaron a nitrógeno líquido y finalmente sobre alcohol absoluto previamente solidificado por nitrógeno líquido. Las muestras sobre el alcohol absoluto se almacenaron durante una semana a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A medida que el alcohol se descongela, el hielo de las muestras es sustituido por el alcohol. Después las muestras se transfirieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por una semana y por último dos días a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras fijadas, se almacenaron por un periodo no mayor de 3 días. Unas se procesaron para secciones en parafina y otras para congelación, ambas técnicas se describen a continuación.

Las muestras para cortar en microtomo de parafina, se transfirieron a PBS y se deshidrataron gradualmente en etanol (15% al 100%). El tejido se transfirió a xileno, xileno-cloroformo (1:1), cloroformo y cloroformo-parafina (1:1). Las

muestras se colocaron en un molde que contenía parafina (Paraplast, Oxford, St Louis, Mo. USA) a 55 °C y se dejaron a esta temperatura por 2 hrs y en vacío. Posteriormente las muestras se orientaron bajo un microscopio de disección. La parafina líquida que contenía el tejido se dejó solidificar y la muestra se seccionó a 5  $\mu$  de grosor. Los cortes se colectaron en cubreobjetos limpios y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La parafina fue retirada del tejido, sumergiendo los cortes en xileno y el tejido se rehidrató con alcoholes graduales decrecientes (100%-agua) y finalmente se transfirieron a PBS.

Los corazones procesados para cortar en criotomo se transfirieron a PBS y se trataron con sacarosa al 5, 10 y 15%. La muestra se colocó en un criomolde que contenía Tissutex (Miles) y se congeló en nitrógeno líquido. Se almacenó a -70 °C hasta su uso, momento en el que se retiró del criomolde y se colocó sobre el portamuestras del criostato para ser seccionada a 10  $\mu$ . Cada sección se depositó sobre portaobjetos limpios y recubiertos con polilisina. Los cortes se secaron al aire por 10 min y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Reacción inmunohistoquímica. Los cortes histológicos se bloquearon con una solución de BSA al 1% y suero normal de cabra (NGS) al 5% en PBS por 2 hrs a TA o 8 hrs a 4 °C. El tejido se incubó durante 2 horas a TA con el primer anticuerpo (suero diluido 1/100 o anticuerpo inmunopurificado 2-10  $\mu$ g/ml) en PBS con NGS 5% y BSA 1%. Las secciones se lavaron 3 veces con PBS, 5 min cada vez y se incubaron con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo marcado con fluoresceína (Cappel), diluido 1:200 en PBS con NGS 5% y BSA 1%, se incubó durante 2 hrs a TA. El tejido se lavó 5 veces con TBS-Tween y 5 veces con PBS, cada lavado por 5 min. Las secciones se cubrieron con PBS/glicerol (1:9) con DABCO 1% (1,4diazabicyclo(2.2.2)octane por Zigma, Co.), para evitar que la fluorescencia se pierda (quenching). Se realizaron observaciones en un

microscopio de epifluorescencia marca Carl Zeiss modelo Axioskop. Las fotografías fueron tomadas con película Tri-X-pan, asa 400 y exposición automática.

2.3. Análisis de ES/130 en miocardio y endocardio. 50 corazones de embriones del estadio 14HH y 50 del estadio 17HH, fueron lavados con EDTA (5 mM) en solución salina (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 7.2) por 5 min a 4 °C. Este tratamiento facilitó la separación del miocardio y del endocardio, la cual se realizó utilizando micropipetas capilares de aproximadamente 50  $\mu$  de diámetro. El miocardio de los corazones de embriones del estadio 17HH, se dividió en miocardio de la región del canal A-V y miocardio ventricular. Por razones técnicas, en embriones del estadio 14HH no se pudo separar el miocardio ventricular del miocardio del canal A-V. Los tejidos se fijaron con solución de Carnoy's durante 1 hr a TA, se lavaron 5 veces con etanol durante 5 min cada vez y el remanente de etanol se dejó evaporar a TA. Las muestras se solubilizaron en amortiguador para electroforesis, sin DTT y sin azul de bromofenol y el glicerol se substituyó por urea 6 M. La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit micro-BCA. Posteriormente a cada una de las muestras se les adicionó 1 vol. de amortiguador de muestra que contenía 8 mg/ml de DTT (dithiothreitol, Sigma, Co.) y 0.05% de azul de bromofenol. El patrón protéico de cada muestra se obtuvo por electroforesis en minigeles de poliacrilamida de 1.5 mm de grosor, a 100 volts y 35 mA según el método de Laemmli (1970). Después de la separación electroforética, algunos geles se tiñeron con azul de coomassie o con nitrato de plata (Oakley et al, 1980), otros se transfirieron a una membrana de immobilon-P de 0.45  $\mu$  de poro (Millipore), en una cámara de electrotransferencia Bio Rad (Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell) a 190 mA por 2 hrs. El carril que contenía los marcadores de peso molecular en la membrana de immobilon-P, fue cortado y teñido con azul de coomassie por 10 min, se destiñó con isopropanol 25% /ácido acético 10%, hasta

encuentra adherida a la membrana vitelina, se colocó un anillo de papel Whatman (5 cm de diámetro externo y 3 de diámetro interno) sobre la membrana vitelina, procurando que el embrión quedara en el centro y con una tijera de disección se cortó la membrana vitelina alrededor del anillo externo del papel (Flamme et al. 1991); se sujetó con unas pinzas y se separó del huevo. El exceso de vitelo se retiró adicionando EBSS sobre la superficie ventral del embrión. El embrión adherido a la membrana vitelina se colocó con su pared dorsal descansando sobre el fondo de una caja de petri de 6 cm de diámetro que contenía 1 ml de EBSS. A cada embrión se le retiró la pared ventral del cuerpo, quedando expuesto el corazón. Los embriones así tratados, se depositaron ventralmente en el pozo central de cajas de cultivo (6 cm diámetro externo y 3 cm diámetro interno, Falcon) que contenían medio de cultivo (albúmina de huevo 20%, glucosa 0.1%, bicarbonato de sodio 0.22% en EBSS) y se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5% y humedad relativa a saturación (fig. 7). Bajo estas condiciones, los embriones del estadio 12HH alcanzaron el estadio 16HH en 24 horas con un porcentaje de viabilidad del 70% y los embriones del estadio 14HH se pueden incubar hasta alcanzar el estadio 22HH (2 días de cultivo) con un 40 % de viabilidad.

3.2. Estudio prospectivo del cojín inferior. Tomando como base los datos obtenidos por de la Cruz y col. (1989 y 1991), que muestran 1) que el corazón del estadio 9<sup>-</sup>HH (tubo recto), está constituido solamente por el primordio de la región trabeculada ventricular y que las regiones restantes se adicionan posteriormente al corazón embrionario, 2) que en el estadio 12HH, el corazón está constituido por todos los segmentos cardíacos primitivos, 3) que el cojín inferior se encuentra en el surco atrioventricular derecho; nosotros realizamos experimentos de marcaje del surco derecho del corazón y de la zona adyacente al mismo, en embriones del

estadio 12HH, utilizando gelatina tinta china y la rastreamos hasta el estadio 16HH.

Marcaje con gelatina tinta china. El surco derecho de embriones de estadio 12HH fue marcado con un filamento de 10-30  $\mu$  de diámetro, recubierto con una mezcla de gelatina-tinta china (Seichert, 1965). Este filamento se introdujo en el área de interés durante 1-2 minutos y se retiró, dejando la marca en el tejido. El embrión se cultivó durante 24 horas como se describió anteriormente. El desplazamiento de la marca fue registrado, mediante la filmación de cada embrión, dicho registro se realizó cada hora durante 15 seg, por un periodo de 24 horas, bajo un microscopio de disección (Olimpus serie SH), una videocámara Altec (CA2063-10 RGB), y una videograbadora SONY (S-VHS SVD-9500 MD). Las imágenes fueron digitalizadas por medio de una tarjeta Miro DC-10 y el programa Adobe Premiere en una computadora Pentium-90 y se imprimieron en una impresora Epson Stylus a 720 DPI o se tomaron fotografías directamente del monitor con película Plus X pan, asa 125.

3.3. Purificación de las IgG totales de sueros producidos, contra antígenos ES. Se utilizaron los sueros inmunes (ES1) y (OJ2) obtenidos por Rezaee et al. (1993). Ambos sueros bloquean la transformación epitelio-mesénquima "*in vitro*" y reconocen proteínas de la matriz extracelular, así como de las células del miocardio de los cojines inferior y superior del canal atrioventricular. Las IgGs se purificaron al pasar los sueros a través de una columna de afinidad, agarosa-proteína G. La columna se lavó con PBS y las IgGs se eluyeron adicionando glicina 0.1 M pH 2.5. Las fracciones obtenidas se neutralizaron con Trizma base 1 M. y la proteína se determinó por su absorbancia a 280 nm. Las muestras se concentraron por centrifugación en concentradores centriprep-30 con membrana de exclusión de 30,000 daltones; este procedimiento también nos sirvió para

dializar las IgGs con PBS. Las muestras se almacenaron en PBS, con y sin azida de sodio 0.2% (PBS-A).

3.4. Dosificación de los anticuerpos. Debido a que necesitábamos un método de dosificación de los anticuerpos, decidimos utilizar micro-acareadores por su fácil manejo, porque queda señalado el sitio de implante y porque pueden absorber moléculas cargadas positiva o negativamente. La elección de los microacarreadores se hizo tomando en consideración que no afectaran el desarrollo del embrión; que absorbieran anticuerpos y que potencialmente los pudieran liberar a su medio circundante. Utilizamos microesferas DEAE-agarosa (Waters, Millipore Co.). Para demostrar que los anticuerpos o que los fragmentos Fab de los anticuerpos son retenidos por la DEAE, se hicieron experimentos de adsorción. Estos experimentos se realizaron poniendo a interaccionar 4 µg de IgGs, parcialmente hidrolizadas con papaína (Porter, 1959), con 250 µl de DEAE-agarosa, en Tris 20 mM y sacarosa 200 mM a los pHs de 7.5 y 10. La interacción se llevó a cabo en microcolumnas, las cuales se lavaron 3 veces con 2 ml de solución de pegado (Tris 20 mM y sacarosa 200 mM), posteriormente se lavó con 0.8 ml de PBS y finalmente las IgGs se eluyeron con 0.1 ml de amortiguador de muestra. Las diferentes muestras se concentraron utilizando microconcentradores con membrana de exclusión de 10,000 daltones (Millipore, Bedford, MA) y se recuperaron de los concentradores lavándolos con 20 µl de amortiguador de muestra. Como experimento control, 4 µg de IgGs se incubaron con agarosa a los dos pHs. Las diferentes muestras se corrieron en geles de poliacrilamida y se tiñeron con nitrato de Plata-coomassie. Los geles se digitalizaron a 1200 DPI con un digitalizador (UMAX power look, data System Inc, Hsinch) en una computadora Power Macintosh modelo 8100/80AV. Las imágenes fueron analizadas con el programa NIH versión 1.1, con la finalidad de conocer en qué porcentaje se unieron las IgGs a la resina.

Es importante señalar que debido a que la adsorción de las inmunoglobulinas a la DEAE se realizó en Tris 20 mM, solución tóxica para las células, decidimos sustituir el Tris por amortiguador de Hepes 20 mM, sacarosa 200 mM pH 7.5 (HS), solución no tóxica. Tomando ésta consideración se repitió el experimento y se encontró que también las IgG se unen a la DEAE en HS. Teniendo conocimiento del porcentaje de IgGs absorbidas por las perlas de DEAE, se pusieron anticuerpos OJ2 y como controles, albúmina de suero bovino (BSA) y suero preinmune, cada una por separado. Ya adsorbidas las moléculas de interés, se procedió a introducir las perlas en la zona del cojín inferior de embriones del estadio 14HH, para ello el embrión con el corazón expuesto se lavó con EBSS y después con HS para evitar que la proteína (IgG) unida a la perla, se liberara prematuramente. Con el auxilio de una microaguja de vidrio, se hizo un pequeño orificio en el miocardio de la parte central del cojín. Con una micropipeta capilar de 20-50  $\mu$  de diámetro, se aspiró una esfera de DEAE-agarosa, previamente incubada con la molécula de interés. La esfera se depositó muy cercana al sitio inicial de punción y con la ayuda de otra microaguja se introdujo en la zona del cojín inferior, de tal manera que quedó entre el endocardio y el miocardio. Los embriones se cultivaron en las condiciones antes mencionadas, hasta que alcanzaron el estadio 18HH. Se fijaron en paraformaldehído al 4% en Hepes 100 mM con  $\text{CaCl}_2$  2 mM por 10-30 min, se lavaron 3 veces con PBS-azida de sodio 0.02% (PBS-A) y se almacenaron en PBS-A, hasta su uso. El análisis del efecto del anticuerpo sobre la transformación epitelio-mesénquima, se realizó en 30 embriones a los cuales se les introdujo una o más esferas con OJ2, 30 con BSA y 15 con IgG preinmune. El porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio 18HH fue del 60%. En algunos embriones se pusieron 2 esferas para estudiar el efecto dosis-respuesta. El análisis se realizó por microscopía confocal, como se mencionó anteriormente. La ventaja del uso de las esferas fué que se

pudo observar el sitio de microimplantación. El implante de un máximo de 4 esferas de 25  $\mu$ , no afectó el desarrollo del embrión.

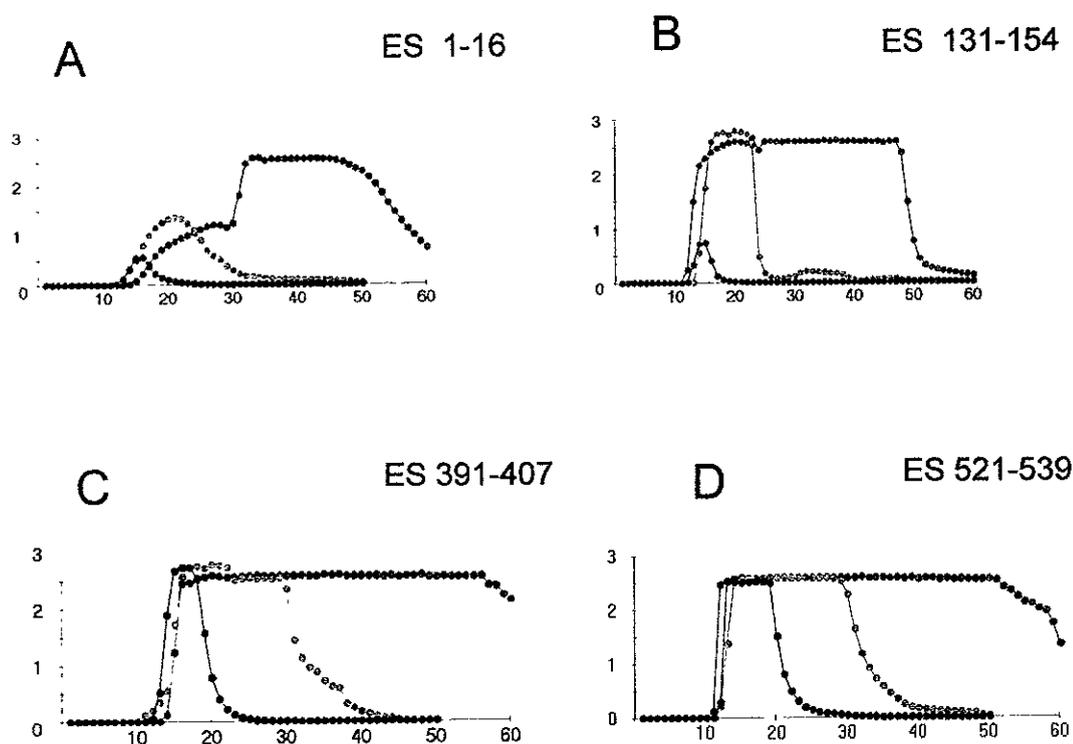


Figura 4. La gráfica muestra los perfiles de purificación de los péptidos. A. ES1-16 o péptido 1, de secuencia KIPEQQUTQEVTSSK, peso molecular 1817 daltones y su hidrofobicidad 77.87. B. ES131-154 o péptido 2, de secuencia DGPVKKKSASKKKAEPAPADSDGP, peso molecular 2409 daltones e hidrofobicidad 77.87. C. ES391-407 o péptido 3, de secuencia KRLDEVSDLRKTSY, peso molecular 2068 daltones e hidrofobicidad 77.87. D. ES521-539 o péptido 4, de secuencia EAMEQQKTKNNDLREKNWK, peso molecular 2391 daltones e hidrofobicidad 77.87. La purificación se realizó utilizando columnas de exclusión molecular de 1800 (P2). Cada fracción (eje x) fue de 1 ml. El eje corresponde a la absorbancia a 280 nm. Se hicieron 3 separaciones y el péptido obtenido de la tercera corrida se utilizó para acoplarla a KLH. primera purificación;  segunda purificación;  tercera purificación. 

| AA    | pep 1 |      | pep 2 |      | pep 3 |      | pep 4 |      |
|-------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
|       | teo   | exp  | teo   | exp  | teo   | exp  | teo   | exp  |
| asp   | 1     | 1.06 | 3     | 2.78 | 2     | 1.94 | 4     | 4    |
| glu   | 5     | 4.66 | 1     | 1.13 | 3     | 3.14 | 5     | 4.4  |
| ser   | 2     | 1.85 | 3     | 2.49 | 2     | 1.7  | 0     | 0    |
| gly   | 0     | 0    | 2     | 2.04 | 0     | 0    |       |      |
| his   | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    |
| arg   | 0     | 0    | 0     | 0    | 2     | 1.87 | 1     | 1.01 |
| thr   | 2     | 1.85 | 0     | 0    | 2     | 1.96 | 1     | 0.87 |
| ala   | 0     | 0    | 4     | 4.27 | 0     | 0    | 1     | 0.95 |
| pro   | 1     | 0.97 | 4     | 4.46 | 0     | 0    | 0     | 0.12 |
| UK0   | 0     | 0    | 0     | 0    | 0.02  | 0    | 0     |      |
| tyr   | 0     | 0.23 | 0     | 0    | 1     | 1.06 | 0     | 0.01 |
| UK    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    |
| val   | 2     | 2.35 | 1     | 0.95 | 1     | 0.95 | 0     | 0    |
| met   | 0     | 0.25 | 0     | 0.21 | 1     | 0.97 | 0     | 0    |
| cys   | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0.02 |
| ile   | 1     | 0.85 | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    |
| leu   | 0     | 0.01 | 0     | 0    | 2     | 2.23 | 1     | 1.14 |
| phe   | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    |
| UK    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    |
| UK    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    |
| lys   | 2     | 1.92 | 6     | 5.88 | 2     | 1.84 | 4     | 3.94 |
| UK    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    |
| total | 16    | 16   | 24    | 24   | 17    | 17   | 18    | 17   |

Tabla 1. Hidrólisis ácida de los péptidos seleccionados. Los péptidos obtenidos de la tercera fase de limpieza se sometieron a hidrólisis ácida y cromatografía de alta presión, para obtener su composición de aminoácidos. Observe que los valores teóricos (teo) y los obtenidos por hidrólisis ácida (exp) son iguales, lo que indica que cada uno de los péptidos son los esperados. Para el péptido 4, el valor teórico es 18 y sólo se obtuvieron 17, esta discrepancia se debe a que durante la hidrólisis ácida el triptófano (Trp) es destruido por lo que el valor teórico esperado es 17 más 1 (Trp) = 18.

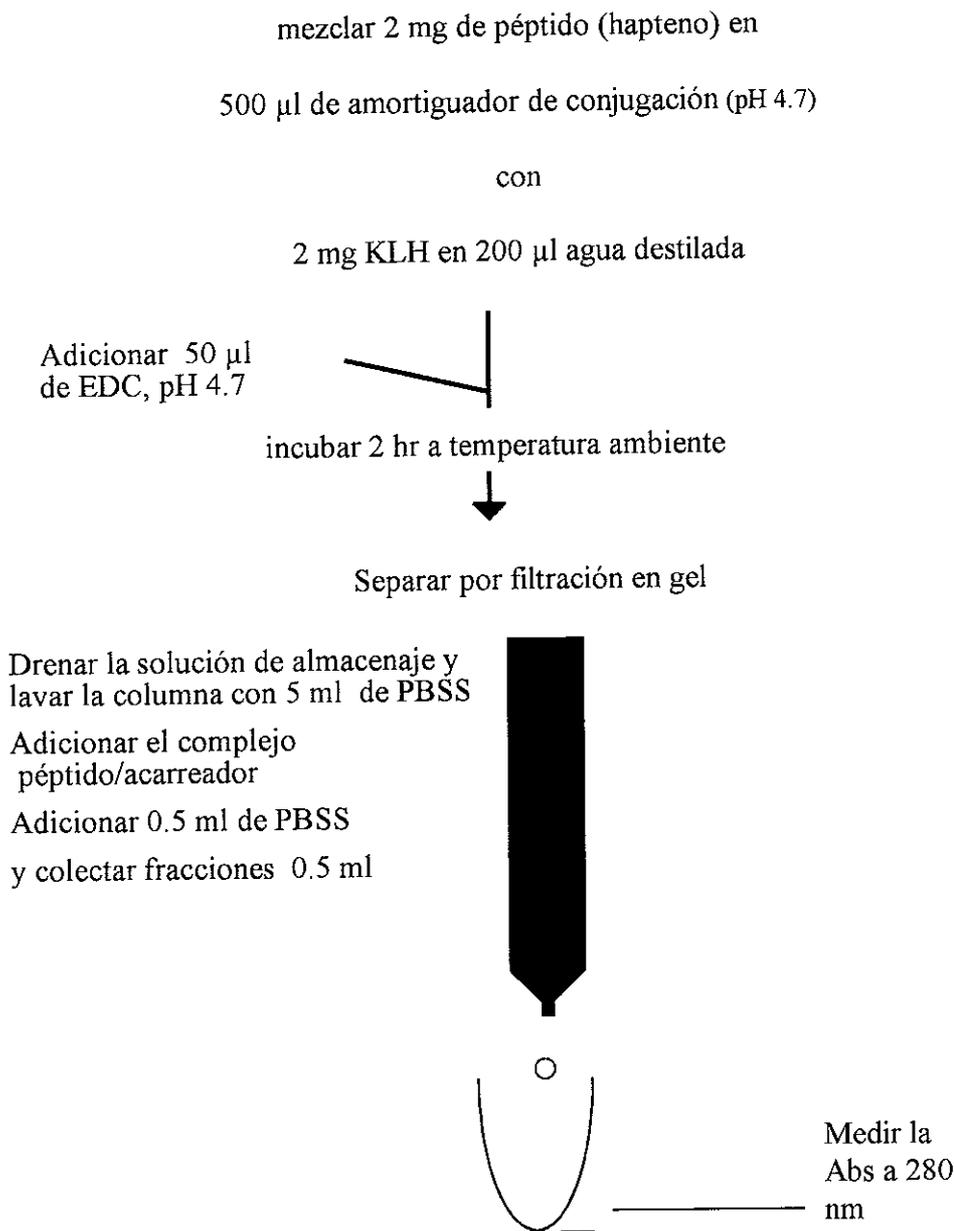


Figura 5. El diagrama muestra el protocolo usado para acoplar el péptido y el acarreador Hemocianina de Heyhole Limped (KLH). El inmunógeno se obtuvo de la columna de filtración a una concentración de 0.6-1 mg/ml. Amortiguador de conjugación 0.1 M MES, 0.9 M NaCl, 0.2% NaN<sub>3</sub>, pH 4.7. EDC (1-ethyl 3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride), este compuesto a pH 4.7, reacciona con aminas o carboxilos (Lisina, Glutamina, Arginina, Histidina, Asparagina, Acido glutámico, Acido aspártico).

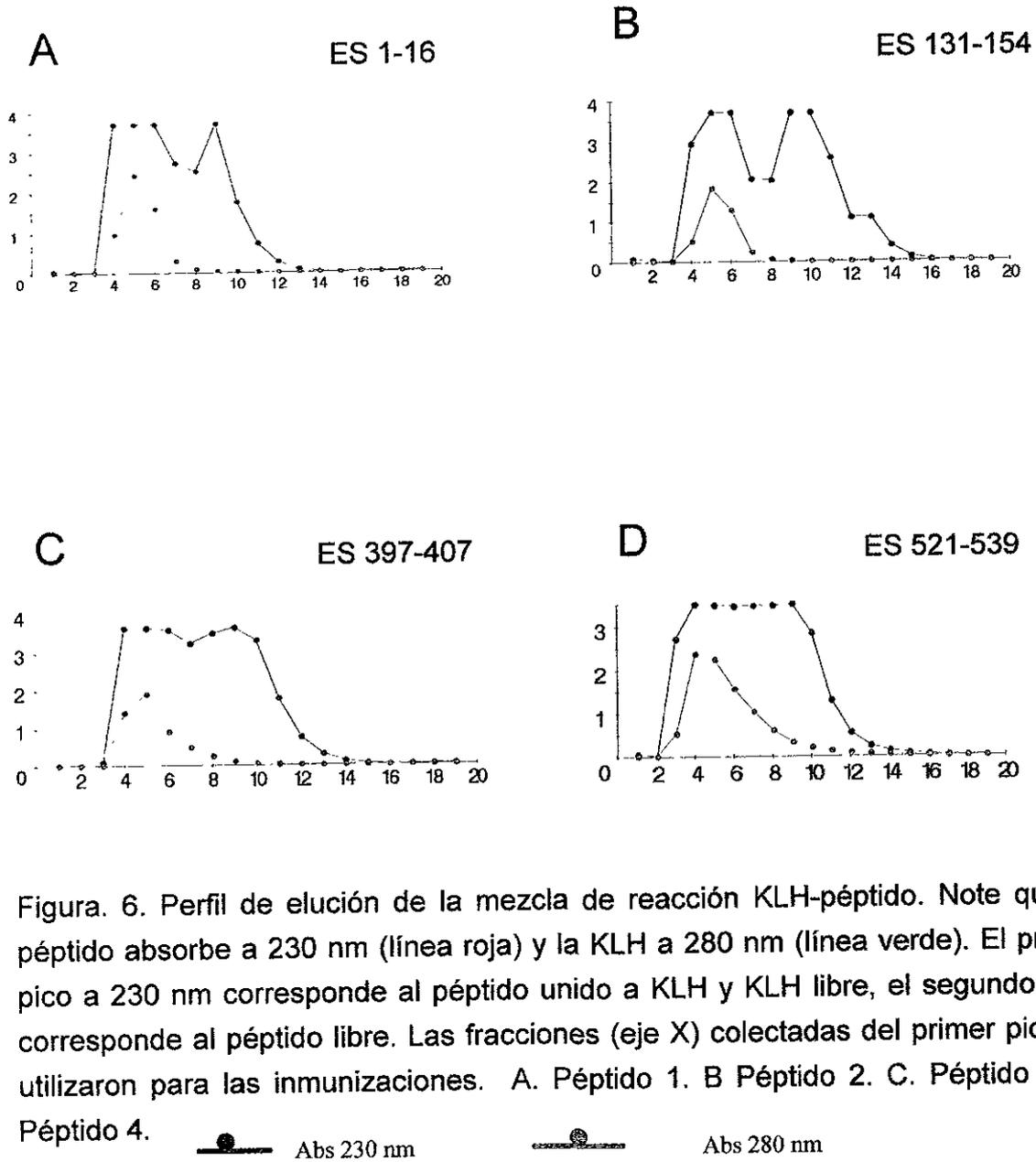


Figura. 6. Perfil de elución de la mezcla de reacción KLH-péptido. Note que el péptido absorbe a 230 nm (línea roja) y la KLH a 280 nm (línea verde). El primer pico a 230 nm corresponde al péptido unido a KLH y KLH libre, el segundo pico corresponde al péptido libre. Las fracciones (eje X) colectadas del primer pico se utilizaron para las inmunizaciones. A. Péptido 1. B Péptido 2. C. Péptido 3 D. Péptido 4.

## VI. RESULTADOS.

### 1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines del canal atrioventricular.

1.1. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines normales del canal atrioventricular. Con el auxilio del microscopio confocal, se investigó en el cojín inferior y en el superior del canal A-V de embriones normales, en qué estadio del desarrollo aparecen las células mesenquimatosas, su distribución topográfica y su número durante el desarrollo. Nuestros datos indican que la transformación epitelio-mesénquima se inicia en el cojín inferior en el estadio 16HH (figs. 8, 11, 12 y tabla II) y en el cojín superior entre los estadios 17HH y 18HH (figs. 9, 11, 12 y tabla II). La tabla II y las figuras 8-10 muestran la cantidad de células mesenquimatosas en la matriz extracelular en el cojín inferior y en el superior del canal atrioventricular en cada estadio del desarrollo investigado (16HH-20HH). En la tabla se observa que el cojín inferior en los estadios estudiados posee más células mesenquimatosas que el superior, así en el estadio 17HH tiene 11 veces más, en el 18HH 2.4, en el 19HH 1.6 y en el 20HH 1.8. El índice de crecimientos de cada uno de los cojines se muestra en la figura 11, este índice es mayor en el cojín superior respecto al inferior entre los estadios 17HH y 18HH y es similar entre los estadios 18HH a 20HH.

La distribución del mesénquima en los cojines superior e inferior del canal atrioventricular en los estadios 16HH, 18HH y 20HH, a partir del surco atrioventricular se muestra en las figuras 8-10 y sus gráficas correspondientes en las figuras 12-14. Estas fotografías y gráficas muestran también que en el estadio 16HH en que aparecen por primera vez las células mesenquimatosas en el cojín inferior, se observan en la región próxima o contigua al atrio (figs. 8A,B y 12);

posteriormente en el estadio 18HH aparecen también en la región distal (figs. 9E-H y 13) y en el estadio 20HH presentan una distribución bimodal (figs. 10A-D,G-J y 14). En el cojín superior, las primeras células mesenquimatosas aparecen en el estadio 17HH en su región distal (figs. 9F-H y 12), y en el estadio 20HH se encuentran principalmente ubicadas en dicha región del cojín (figs. 10G-J y 14). La cantidad de células mesenquimatosas en el cojín inferior y superior del canal atrioventricular, decrece al alejarse del endocardio (tabla III, fig. 15), es decir se encuentran concentradas en las cercanías del endocardio.

### 1.2. Modelo experimental de cojín hipoplástico del canal A-V.

Los embriones con el pelo implantado después de 36 hrs alcanzaron el estadio 16HH (fig. 16), con un 80% de viabilidad, la cual decrece a un 65% al tercer día, cuando el embrión alcanza el estadio 20HH (fig. 17) y aun 30% al sexto día, cuando los embriones se encuentran en el estadio 32-34HH. En los embriones a los que se introdujo un pelo en el tubo neural en el estadio 10HH, el número total de células mesenquimatosas en el cojín inferior y superior del canal atrioventricular en el estadio 16HH fue mayor en ambos cojines, comparado con los embriones testigo ( $P < 0.005$ ) (compare figs. 8 vs 18; fig. 20 y tabla IV). En el estadio 20HH el cojín inferior del canal A-V del modelo experimental tiene aproximadamente el mismo número de células mesenquimatosas que el grupo testigo ( $P = 0.8$ ) (figs. 19, 20 y tabla IV), mientras que el cojín superior del modelo experimental presenta más células mesenquimatosas que el testigo ( $0.05 \geq P < 0.1$ ) (figs. 19, 20 y tabla IV).

Al comparar la distribución de las células mesenquimatosas a lo largo del eje longitudinal, en los cojines inferior y superior del canal atrioventricular, encontramos que su distribución es muy similar en ambos grupos, testigo y

experimental (compare figs. 8 vs 18, figs. 10 vs 19, 12 vs 21 y 14 vs 22). Además, el volumen de los cojines inferior y superior del canal atrioventricular en el modelo experimental, es mayor que en el grupo testigo; en los estadios 26-30HH estos cojines disminuyen de volumen, por esto último Männer (1993) lo denominó cojines hipoplásticos.

La invasividad de las células mesenquimatosas en el cojín inferior y superior del canal atrioventricular, también presenta la misma relación que se observa en los embriones testigo, es decir, mientras más lejos del endocardio menos células mesenquimatosas. El cojín inferior y superior del canal atrioventricular, en los embriones del grupo experimental del estadio 16HH, presentaron más células mesenquimatosas en todos los niveles, que los observados en ambos cojines de los embriones testigos (fig. 23). En éste estadio el cojín inferior de los embriones experimentales presentó a 35  $\mu$  del endocardio, menos células mesenquimatosas que el testigo (fig. 23A) y a otras distancias del endocardio, un número discretamente mayor que el testigo (fig. 23A). En el estadio 20HH, el cojín superior en el grupo experimental, presentó más células mesenquimatosas en todas las distancias comparadas con el testigo (23B).

## **2. Distribución de ES/130.**

### **2.1. Producción de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra ES/130.**

Empleando el método de ELISA encontramos que la reactividad del anticuerpo contra el péptido-I (anti-pep-1) fue muy baja y en Western blot el reconocimiento de la proteína ES/130 fue pobre; el anticuerpo contra ES2.1a (fig. 3), que contiene la secuencia del péptido-I, reconoció en Western blot la proteína

ES2.1a (fig. 24). El anti-pep-II que tiñó endocardio (figs. 25A y 26), en experimentos de competencia, fue desplazado sólo por el péptido II (fig. 26B), este suero en Western blot reconoció una molécula de 130 KDa (fig. 27). El suero inmune anti-pep-III, reconoció exclusivamente el miocardio y el miotomo, reactividad que no fue bloqueada por el péptido III. El anti-pep-IV tuvo respuesta pobre contra su péptido correspondiente. El suero inmune III reconoció proteínas del miocardio y el miotomo en embriones del estadio 14 y 18HH, ésta reactividad se observó únicamente a nivel intracelular, éste suero en Western blot, reconoció una molécula de 280 KDa, que no corresponde a la miosina, cuyo peso molecular es de 200 Kda (no mostrado). El péptido III en experimentos de competencia, no desplazó a la inmunoreactividad del anti-péptido III.

## 2.2. Inmunolocalización de antígenos ES/130 en tejido.

La tabla V muestra un resumen de los diferentes tratamientos y resultados que se obtuvieron con cada suero y podemos indicar lo siguiente: A.- El suero inmunopurificado contra el péptido IV, no reconoció tejido cardíaco, pero cuando se trató con hialuronidasa, la inmunoreactividad se encontró en el órgano proepicárdico (no mostrado). B.- Las globulinas inmunopurificadas contra el péptido II, reconocieron al endocardio de embriones del estadio 14 (fig. 25) y 17HH (fig. 26), únicamente cuando éste tejido se desnaturalizó con Carnoy's y se cortó con el criotomo o si el tejido se trató 1 hr con hialuronidasa (2.5 mg/ml en 50 mM de Acetato de sodio, pH 5.6). Esta reactividad fue bloqueada por el péptido II (fig. 26B) y no por los péptidos I, III o IV. La tinción del endocardio es intracelular en los estadios 14HH y 17HH (figs. 25 y 26) y en el estadio 18HH está restringida a la región del canal atrioventricular (fig. 26A). Además, el anticuerpo fue incapaz de precipitar proteínas de matriz extracelular, enriquecidas de adherones y no bloqueó la transformación epitelio-mesénquima del endocardio en cultivo (no

mostrado). Los anticuerpos OJ2 y ES1, tiñeron la matriz extracelular de embriones del estadio 18HH (fig. 28).

### 2.3. Análisis de ES/130 en miocardio y endocardio.

Los sueros inmunopurificados anti I y II, además de reconocer a la banda de 130 KDa, reconocen a la proteína recombinante ES1.A (fig. 24). En el endocardio del estadio 17HH, se reconoció una banda de 130 KDa, la cual fue teñida más intensamente que en el endocardio del estadio 14HH (fig. 27 carril 5 vs 6). Esta banda de 130 KDa fue reconocida con menor intensidad en las proteínas del miocardio que en las del endocardio en los estadios antes mencionados (fig. 27 carriles 2 y 4 vs 5 y 6). El miocardio de la región del canal A-V, en embriones del estadio 17HH, presentó ligeramente mayor tinción de ES/130, con respecto a la región ventricular constituida exclusivamente por miocardio y endocardio. El miocardio de embriones del estadio 14HH presentó menos tinción de ES/130, con respecto al miocardio del estadio 17HH. Además, observamos la reactividad del anticuerpo anti-II con otras bandas (fig. 27). En experimentos de hibridación "*in situ*" la sonda antisentido para ES/130 (fig. 3), hibridó con ES/130 sólo en el corazón (figs. 29 y 30) y su control (sonda con el mismo sentido) no tiñó ningún tejido (fig. 29). En el estadio 18HH la sonda anti-sentido tiñó con mayor intensidad el mesénquima del área de los cojines inferior y superior del canal A-V (fig. 30).

### **3. Estudio de la acción de los anticuerpos ES/130 "in vivo".**

**3.1 Cultivo del embrión.** La nueva técnica de cultivo "*in vivo*" que se presenta en este trabajo (fig. 7), reúne las condiciones óptimas para que los embriones del estadio 12HH y 14HH se desarrollen hasta el estadio 16HH y 24HH respectivamente y además, posee los requisitos indispensables para lograr una filmación adecuada. Con este sistema, encontramos que la marca que se colocó en el estadio 12HH, en el surco atrioventricular derecho, se encontró en el estadio 18HH en el cojín inferior del canal A-V (fig. 31).

**3.2. Dosificación de los anticuerpos.** Los anticuerpos OJ2 y ES1 (tabla V), tiñeron la matriz extracelular de embriones del estadio 17HH (fig. 28). El análisis densitométrico del gel con los eluatos (fig. 32) demostró que el 35% del fragmento Fab, se adhiere a la DEAE-agarosa a un pH de 7.5 o 10, el PBS despega aproximadamente el 55% de la proteína adherida, y el amortiguador de muestra para electroforesis, retira el 45% restante. A la agarosa o resina testigo, se adhirió menos del 2% del fragmento Fab.

Las microesferas que se inyectaron en el sitio prospectivo del cojín inferior del canal A-V en el estadio 12HH, aparecieron en el cojín inferior del estadio 18HH (figs. 33 y 34). El implante de 1, 2, ó 3 microesferas (15  $\mu$  de diámetro) con albúmina sérica de bovino o con las inmunoglobulinas del suero OJ2 o ES1, en el sitio prospectivo del cojín inferior de embriones del estadio 12HH o 14HH, no afectó el desarrollo embrionario del corazón, ni tampoco, aparentemente, la invasión de células mesenquimatosas en el estadio 18HH (fig. 33).

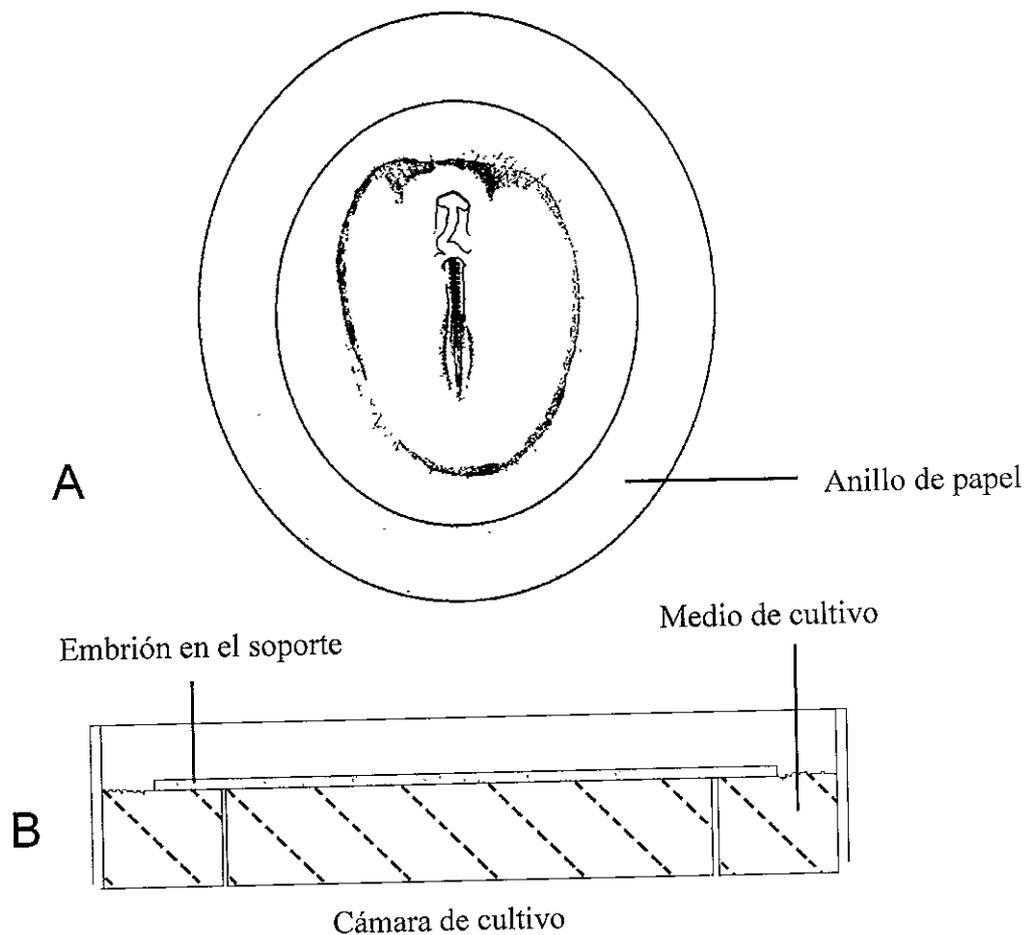


Figura 7. Cultivo del embrión. En A se muestra el diagrama de un embrión adherido a un anillo de papel (vista superior). En B se muestra una cámara de cultivo para los embriones, observe la caja de petri (vista lateral) con un pozo central. El medio de cultivo consistió de albúmina 20%, glucosa 1%, bicarbonato de sodio 0.22 gr por 100 ml en EBSS.

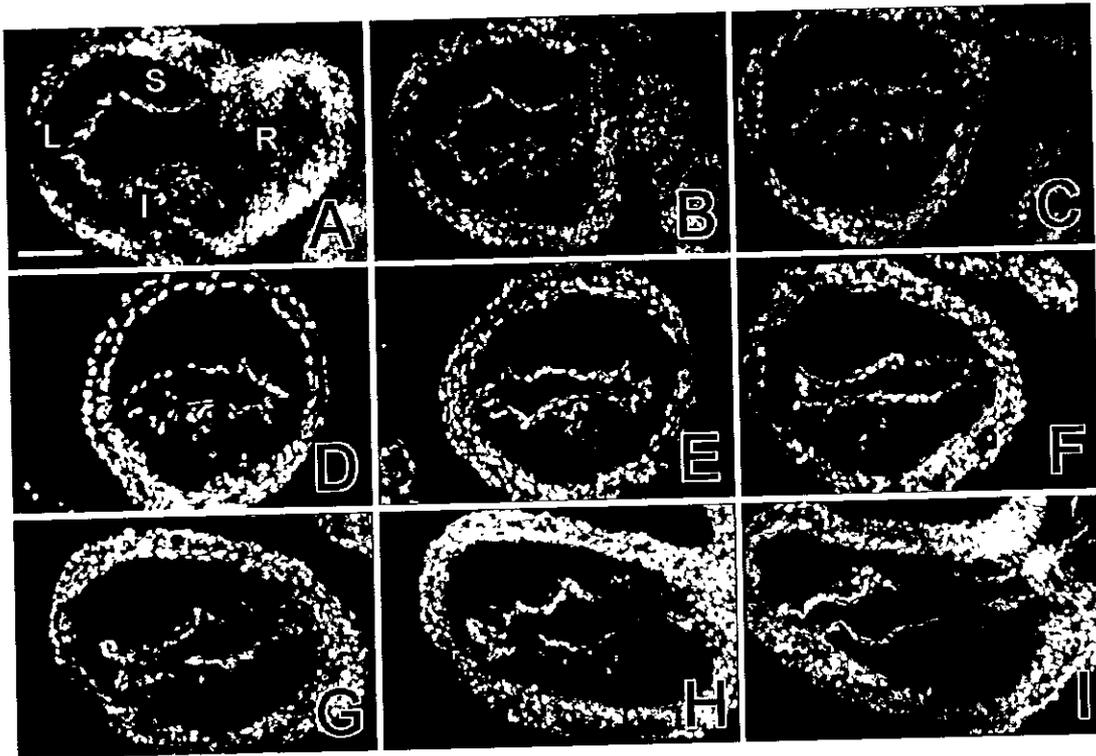


Figura 8. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines inferior y superior del canal atrioventricular de un corazón del embrión del pollo del estadio 16HH. El corazón se tiñó con yoduro de propidio y se hicieron cortes ópticos transversales en el microscopio confocal. Cada sección representa 18 micras. El recuadro A es una sección contigua a la aurícula (pAV) y el recuadro I es la contigua a la region apical trabeculada (dAV). La barra indica 100 micras. Note que sólo hay células mesenquimatosas en el cojín inferior, en especial en los recuadros A-E, es decir en la región pAV. El cojín superior no presenta células mesenquimatosas.

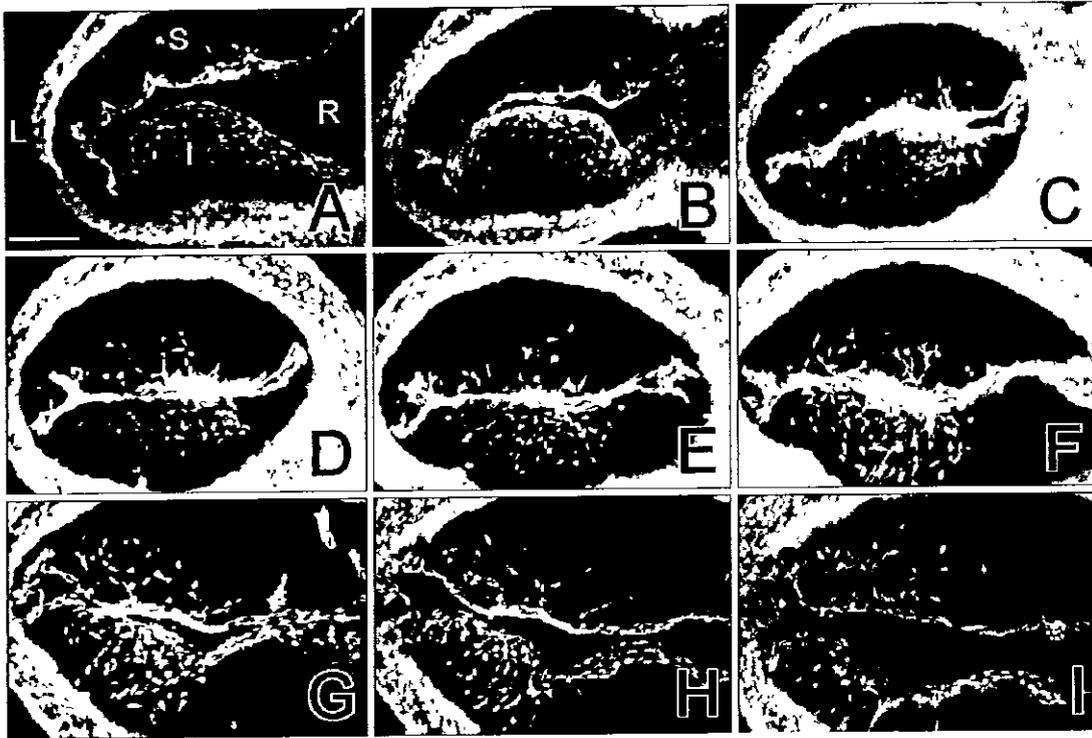


Figura 9. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines inferior y superior del canal atrioventricular del corazón del embrión del pollo del estadio 18HH. El recuadro A es una sección contigua a la aurícula (pAV) y el recuadro I es la contigua a la región apical trabeculada (dAV). La barra indica 100 micras. Note que en todos los recuadros el cojín inferior contiene más células mesenquimatosas que el cojín superior. Observe que la mayoría de las células mesenquimatosas en el cojín inferior, se encuentran en los recuadros A-C después disminuyen (D-E), posteriormente vuelven a aumentar (F-H). En el cojín superior las células mesenquimatosas se encuentran formando un gradiente creciente de A-G.

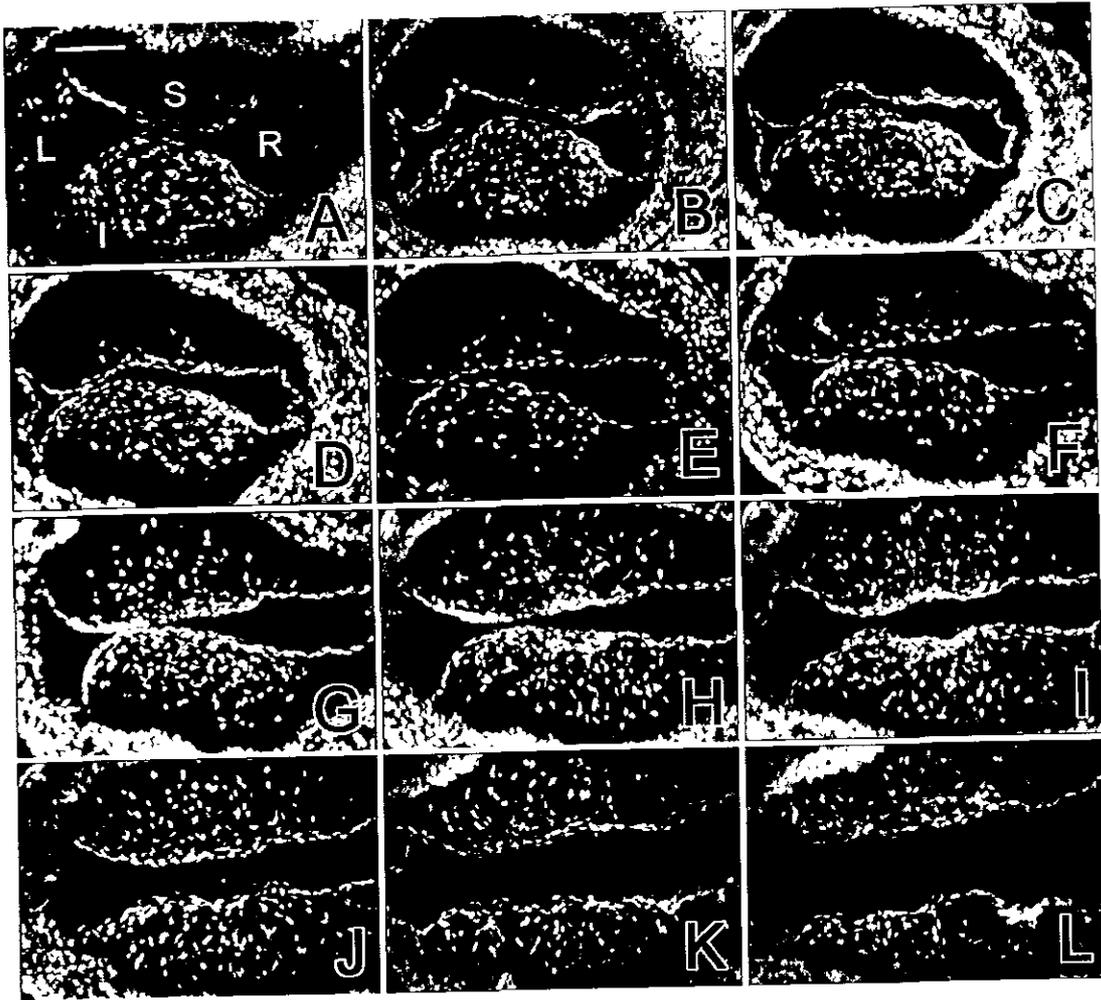


Figura 10. Distribución de las células mesenquimatosas en los cojines inferior y superior del canal atrioventricular del corazón del embrión del pollo del estadio 20HH. El recuadro A es una sección contigua a la aurícula (pAV) y el recuadro L es la contigua a la región apical trabeculada (dAV). Note que en todos los recuadros el cojín inferior contiene más células mesenquimatosas que el cojín superior. Observe que la mayoría de las células mesenquimatosas en el cojín inferior, se encuentran en los recuadros A-D después disminuyen (E-F), posteriormente vuelven a aumentar (G-I), esta distribución celular la hemos denominado bimodal. En el cojín superior las células mesenquimatosas se encuentran formando un gradiente creciente de A-I. La barra indica 100 micras.

| Estadio <sup>a</sup> | IAV <sup>b</sup> | SAV <sup>b</sup> | IAV / SAV <sup>c</sup> |
|----------------------|------------------|------------------|------------------------|
| 16HH                 | 60± 30           | 3± 2             | 20                     |
| 17HH                 | 131± 31          | 12± 10           | 11                     |
| 18HH                 | 633± 66          | 264± 8           | 2.4                    |
| 19HH                 | 1040±230         | 636±160          | 1.6                    |
| 20HH                 | 1474±48          | 827±146          | 1.8                    |

Tabla II. Número de células mesenquimatosas en el cojín inferior (IAV) y superior (SAV) del canal atrioventricular en cada estadio estudiado. Note que la relación de células entre el IAV y el SAV decrece con respecto al estadio de incubación. <sup>a</sup>20 corazones fueron utilizados en total. <sup>b</sup> Promedio +/- la desviación estándar. <sup>c</sup> relación de células entre IAV y SAV.

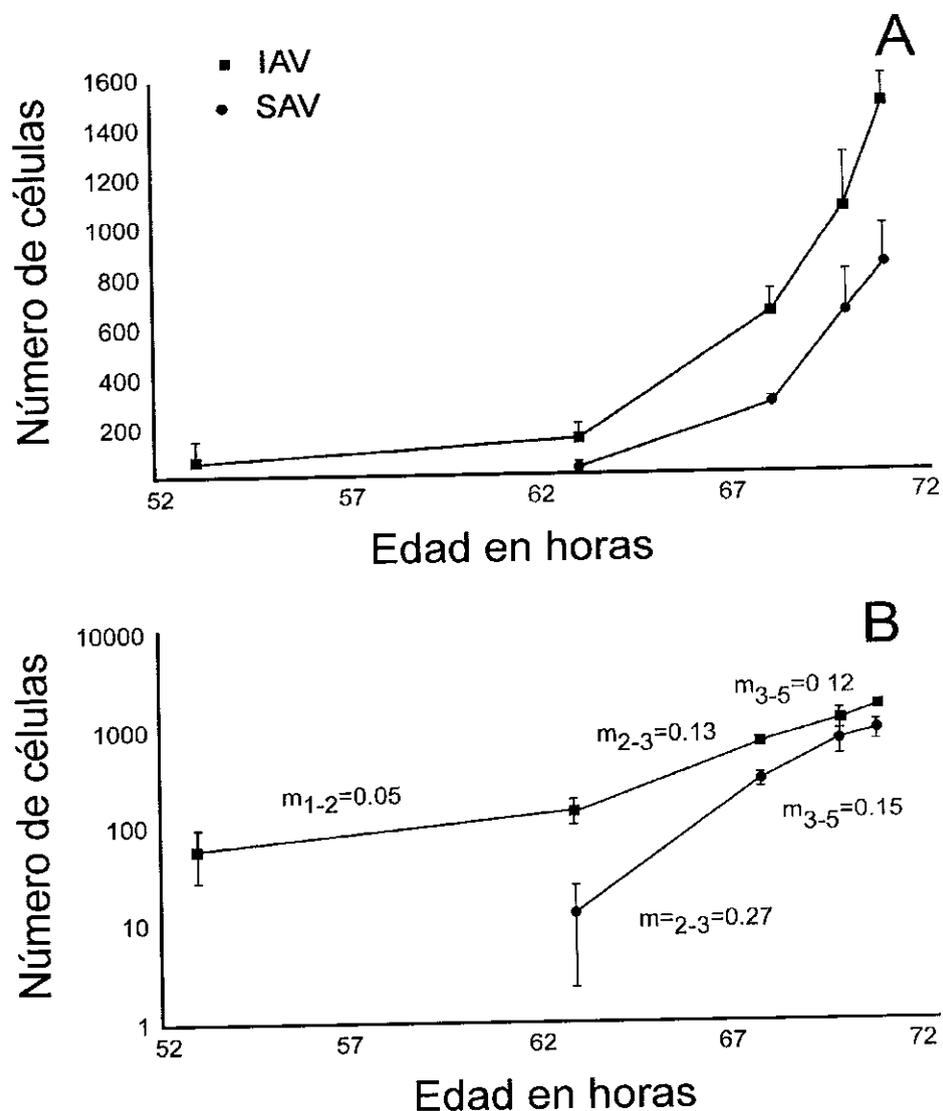


Figura 11. Cinética de invasión de las células mesenquimatosas en el cojín inferior (IAV) y superior (SAV) del canal atrioventricular. A) Cantidad de células mesenquimatosas en el IAV y en el SAV por horas de incubación. B) log de células mesenquimatosas contra horas de incubación. Las horas se calcularon a partir del estadio de desarrollo, utilizando el tiempo promedio de incubación informado por Hamburger-Hamilton (1951) (16HH=53 h.; 17HH=63 h.; 18HH=68 h.; 19HH=70 h y 20HH=71 h). Los índices de multiplicación,  $m_{n-z}$  se calcularon por regresión lineal. Cada punto representa el promedio de cuatro lecturas individuales. Note que el cojín inferior en todos los estadios estudiados presenta más células que el cojín superior. El mesénquima aparece en el cojín inferior, no obstante la tasa de multiplicación del mesénquima es mayor en el cojín superior.

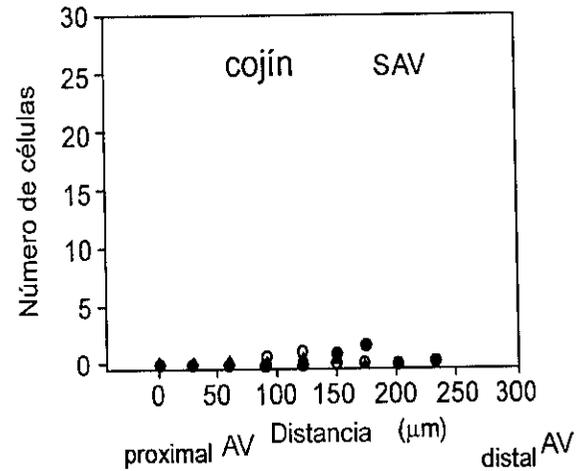
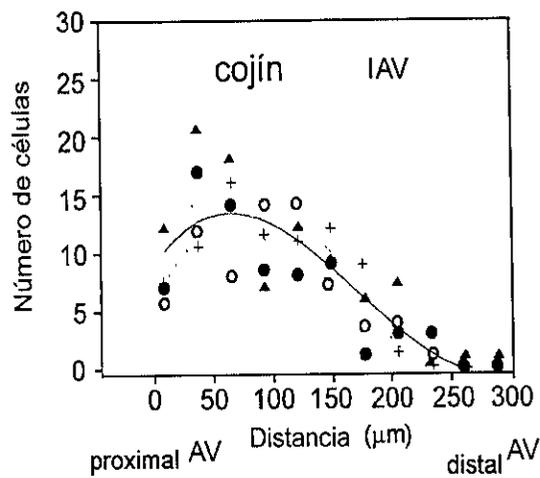


Figura 12. Distribución longitudinal de células mesenquimatosas en el cojín inferior (IAV) y el superior del canal atrioventricular (SAV), desde su región proximal (pAV) hacia la distal (dAV), del corazón del embrión de pollo del estadio 16HH. La línea continua representa la mejor ecuación de regresión ( $P < 0.0001$ ) y las líneas punteadas el intervalo al 95% de confianza. La ecuación de regresión para el IAV es:  $8.98 + 0.148d - 1.48 \times 10^{-3}d^2 + 2.72 \times 10^{-6}d^3$ . Los datos para el SAV no fueron analizados. Cada serie de datos (un corazón) están representados con un símbolo diferente.

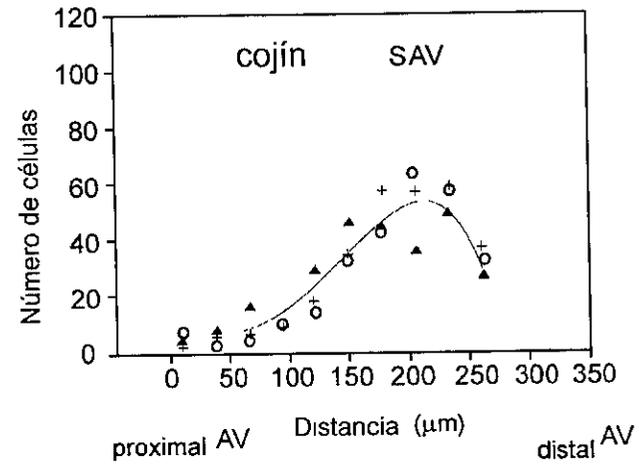
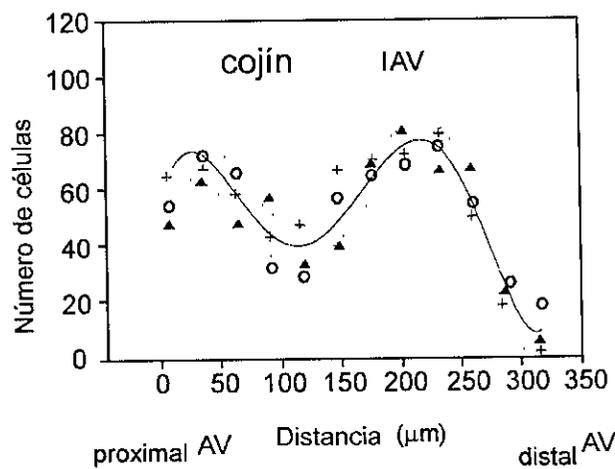


Figura 13. Distribución longitudinal de células mesenquimatosas en el cojín inferior (IAV) y el superior (SAV) del canal atrioventricular, desde su región proximal (pAV) hacia la distal (dAV), del corazón del embrión de pollo del estadio 18HH. La línea continua representa la mejor ecuación de regresión ( $P < 0.0001$ ) y las líneas punteadas el intervalo al 95% de confianza. La ecuación de regresión para el IAV es:  $55.1 - 1.55d - 0.392d^2 + 2.81 \times 10^{-4}d^3 - 4.9 \times 10^{-7}d^4 + 1.25 \times 10^{-9}d^5 + 3.38 \times 10^{-12}d^6$ . La ecuación de regresión para el SAV es:  $10.8 - 0.65d + 0.0213d^2 - 2.86 \times 10^{-4}d^3 + 2.02 \times 10^{-5}d^4 - 6.69 \times 10^{-9}d^5 + 8.07 \times 10^{-12}d^6$ . Cada serie de datos (un corazón) están representados por un símbolo diferente.

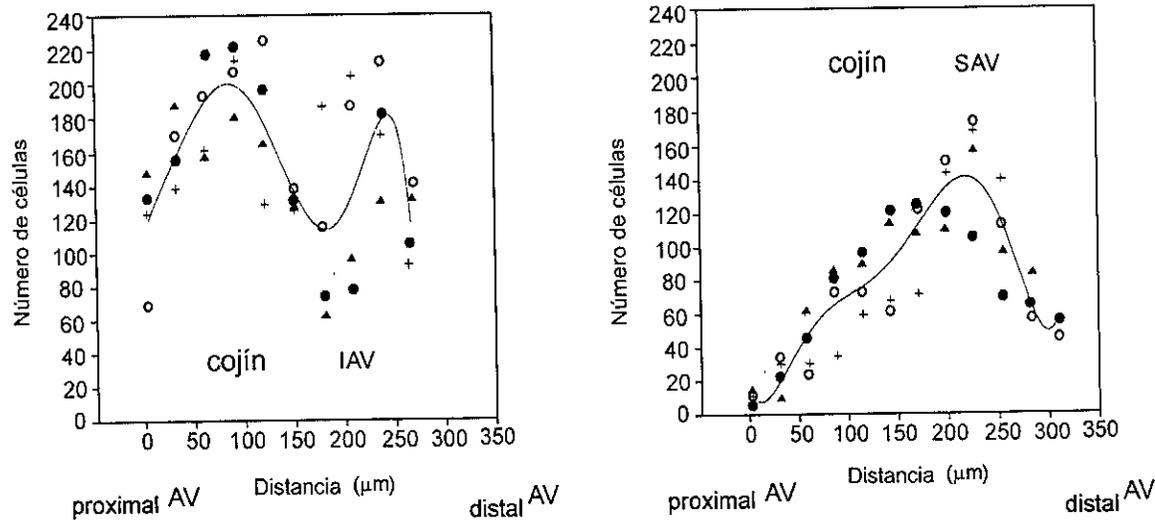


Figura 14. Distribución longitudinal de células mesenquimatosas en el cojín inferior (IAV) y del superior (SAV) el canal atrioventricular, desde su región proximal (pAV) hacia la distal (dAV), del corazón del embrión de pollo del estadio 20HH. La línea continua representa la mejor ecuación de regresión ( $P < 0.0001$ ) y las líneas punteadas el intervalo al 95% de confianza. La ecuación de regresión para el IAV es:  $54.2 - 2.78d + 0.107d^2 - 1.22d^3 + 6.06 \times 10^{-6}d^4 - 1.35 \times 10^{-8}d^5 + 1.08 \times 10^{-11}d^6$ . La ecuación de regresión para el SAV es:  $46.1 - 5.47d + 0.198d^2 - 2.49 \times 10^{-3}d^3 + 1.46 \times 10^{-5}d^4 - 4.03 \times 10^{-8}d^5 + 4.2 \times 10^{-11}d^6$ . Cada serie de datos (un corazón) está representado por un símbolo.

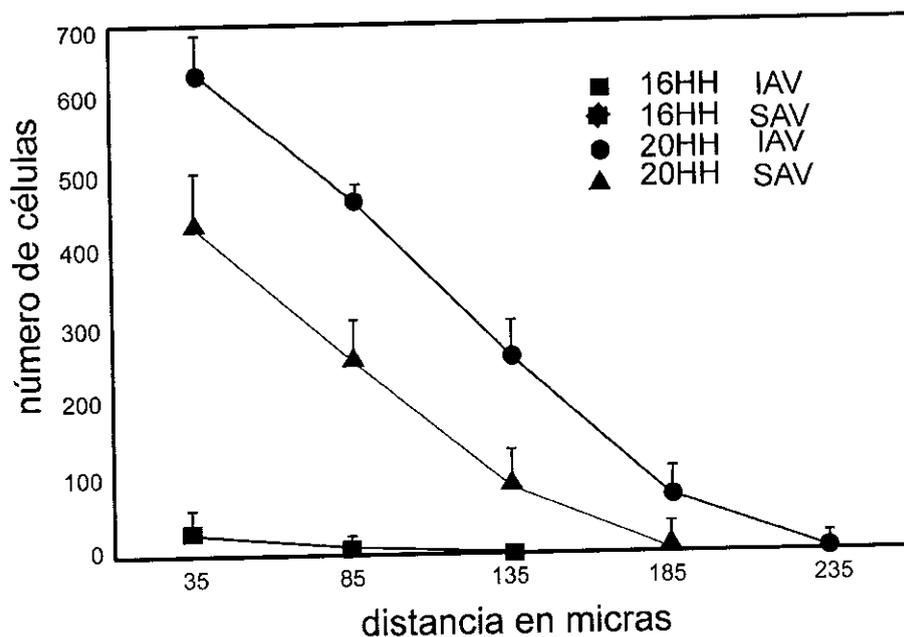


Figura 15. Distribución de las células mesenquimatosas del endocardio hacia el miocardio. Se analizó el cojín inferior (IAV) y el superior (SAV) del canal atrioventricular, de corazones de embriones de pollo del estadio 16HH y 20HH. Se estudiaron cuatro corazones de cada estadio de desarrollo y se encontró que las células mesenquimatosas decrecen gradualmente al alejarse del endocardio. No existieron células mesenquimatosas en el cojín superior en el estadio 16 HH por lo que no se graficaron.

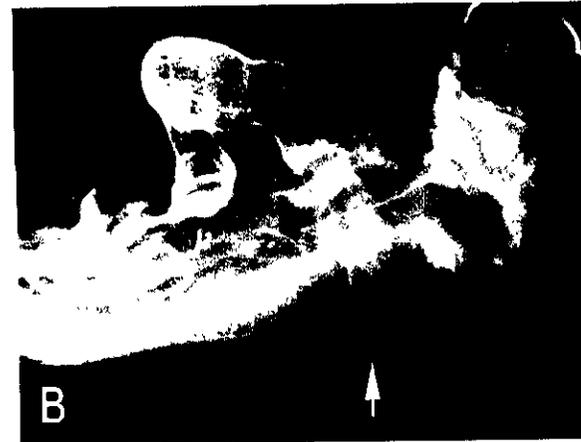


Figura 16. Efecto del Implante de Pelo. A cada embrión se le implantó un pelo en el tubo neural en el estadio 10 HH y se permitió desarrollar hasta el estadio 16 HH. A) Embrión al que sólo se le implantó un pelo en el area cefálica. B). Embrión al que se le implantó el pelo hasta la última somita, en el estadio 10 HH. La flecha señala el pelo. Note que el corazón del embrión experimental es anormal (A) comparado con el del embrión control (A).



Figura 17. Efecto del Implante de Pelo. A cada embrión se le implantó un pelo en el tubo neural en el estadio 10 HH y se permitió desarrollar hasta el estadio 20 HH. A) Embrión al que sólo se le implantó un pelo en el área cefálica. B). Embrión al que se le implantó hasta la última somita en el estadio 10 HH. Note que el corazón del embrión experimental es anormal (B) comparado con el del embrión control (A).

cojín inferior

cojín superior



Figura 18. Efecto mecánico del implante de pelo sobre la transformación endotelio-mesénquima. El pelo se implantó en el tubo neural del embrión en el estadio 10HH que se dejó desarrollar hasta el estadio 16HH. El corazón se tiñó con Ioduro de propodio y se realizaron secciones ópticas transversales en un microscopio confocal. Cada sección representa 18 micras. La barra indica 100 micras.

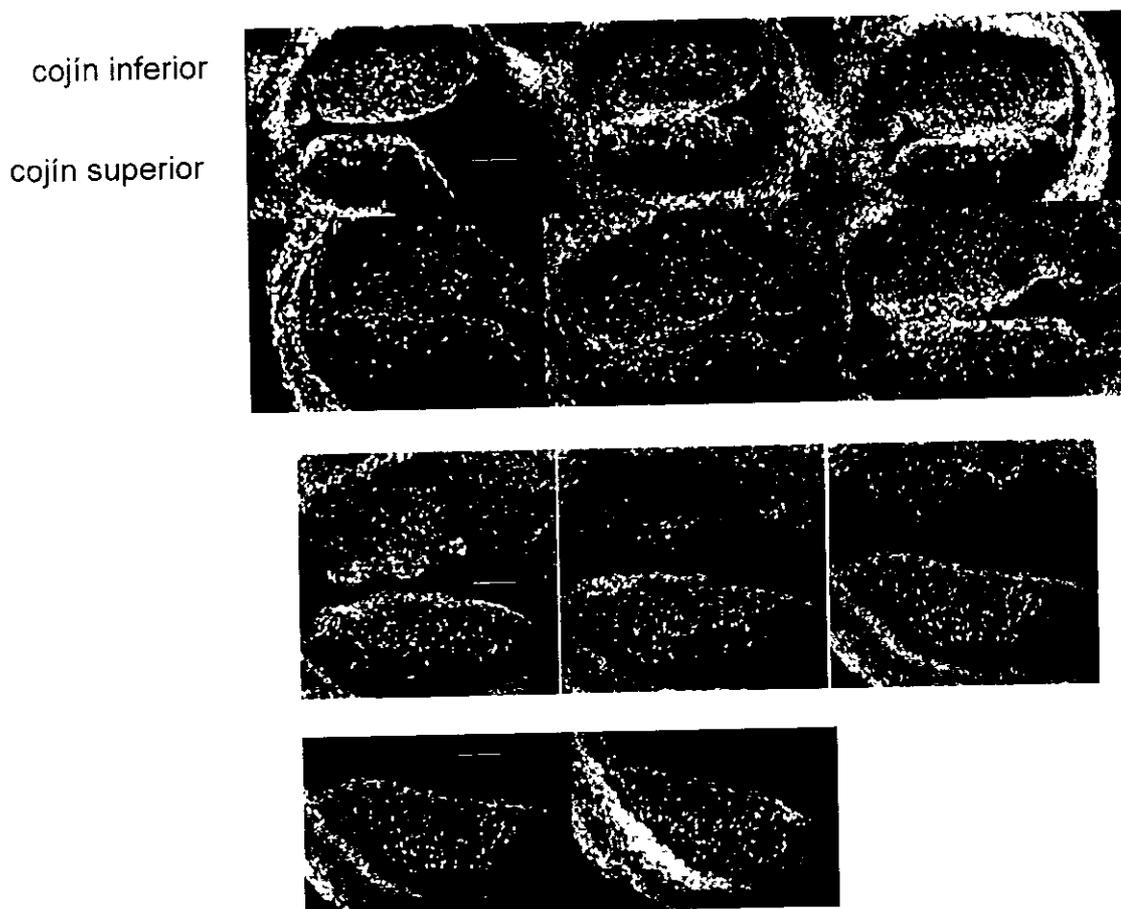


Figura 19. Efecto mecánico del implante de pelo sobre la transformación endotelio mesénquima. El pelo se implantó en el tubo neural del embrión en el estadio 10HH que se dejó desarrollar hasta el estadio 20HH. La barra indica 100 micras.

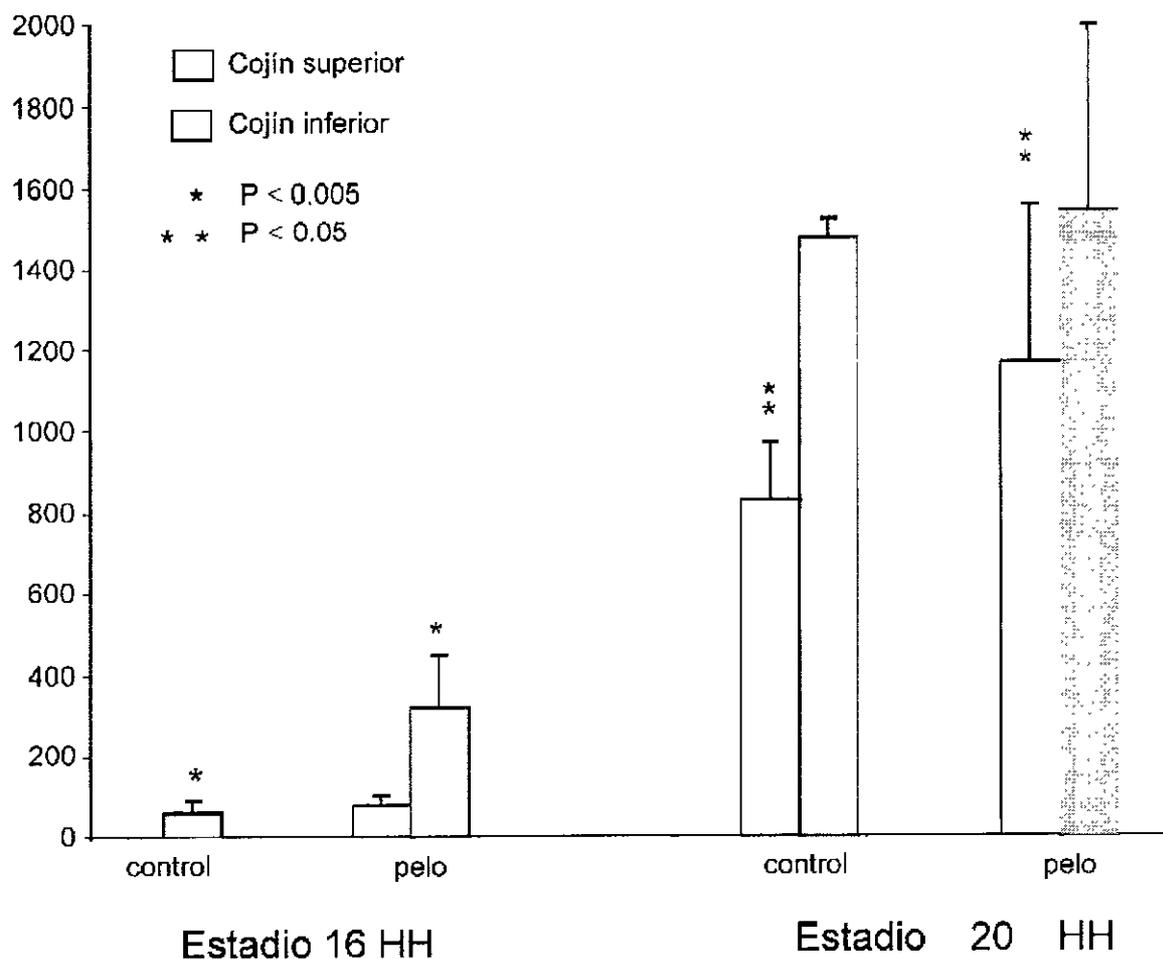


Figura 20. Efecto mecánico sobre la transformación epitelio-mesénquima. A embriones del estadio 10HH se les implantó un cabello en el tubo neural y los embriones reincubados se sacrificaron en el estadio 16HH y 20HH. Note que en el estadio 16 HH el efecto sobre el incremento de mesénquima es muy notorio y en el estadio 20 HH, éste sólo se nota en el cojín superior.

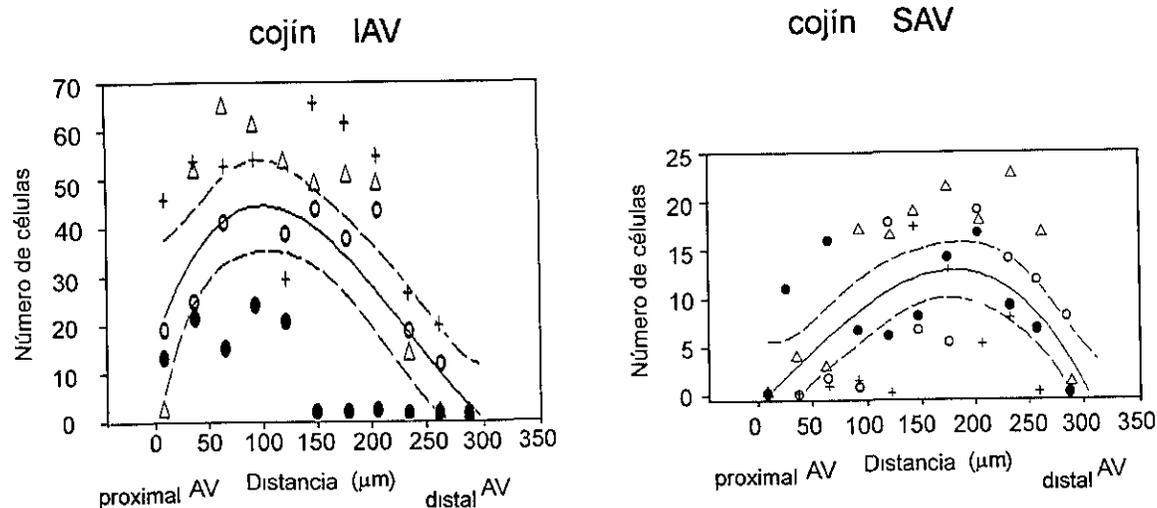


Figura 21. Efecto mecánico del implante del pelo sobre la distribución longitudinal de las células mesenquimatosas en el cojín inferior (IAV) y el superior (SAV) del cana atrioventricular desde su región proximal (pAV) hacia la distal (dAV), del corazón del embrión de pollo del estadio 16HH. A embriones del estadio 10HH se les implantó un pelo en el tubo neural y se dejaron desarrollar hasta el estadio 20HH. La línea continua representa la mejor ecuaciones de regresión ( $P < 0.0001$ ) y las líneas punteadas, el intervalo al 95% de confianza. Cada símbolo representa los valores para cada embrión.

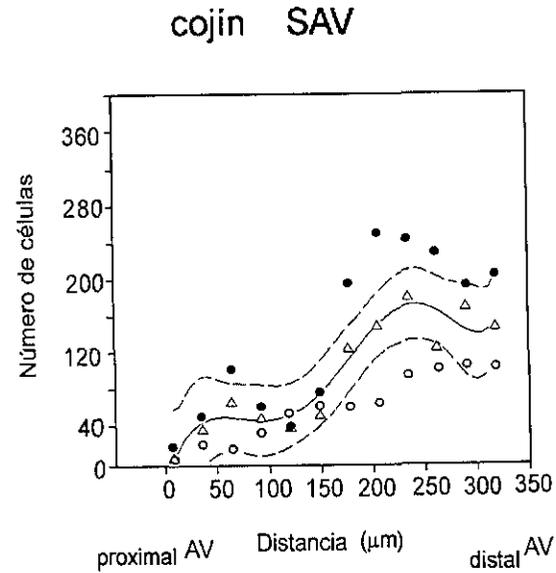
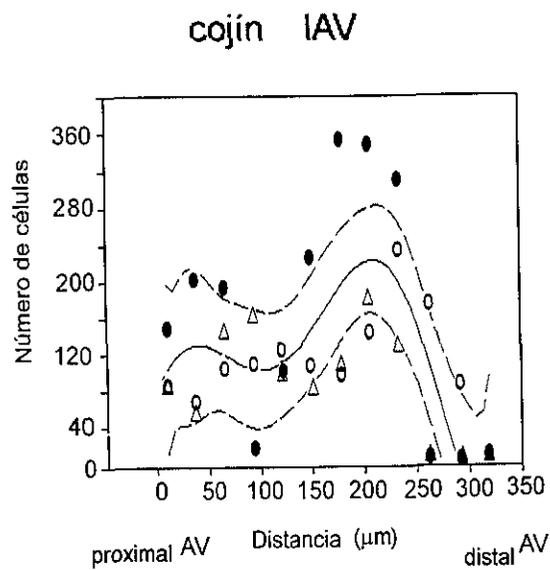


Figura 22. Efecto mecánico del implante del pelo sobre la distribución longitudinal de células mesenquimatosas en el cojín inferior (IAV) y el superior (SAV) del cana atrioventricular, desde su región proximal (pAV) hacia la distal (dAV), del corazón del embrión de pollo del estadio 20HH. A un embrión del estadio 10HH se le implantó un pelo en el tubo neural y se dejó desarrollar hasta el estadio 20HH. La línea continúa representa la mejor ecuación de regresión ( $P < 0.0001$ ) y las líneas punteadas, el intervalo al 95% de confianza. Note la distribución bimodal en el cojín inferior y la distribución creciente hacia la región apical trabeculada en el cojín superior.

| Estadio <sup>a</sup> | distancia al endocardio |                      |                       |                       |                       |
|----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                      | 10-60 $\mu\text{m}$     | 60-110 $\mu\text{m}$ | 110-160 $\mu\text{m}$ | 160-210 $\mu\text{m}$ | 210-260 $\mu\text{m}$ |
| 16HH SAV             | 2 $\pm$ 0               | 0                    | 0                     | 0                     | 0                     |
| 16HH IAV             | 32 $\pm$ 23             | 12 $\pm$ 12          | 0                     | 0                     | 0                     |
| 20HH SAV             | 436 $\pm$ 65            | 263 $\pm$ 48         | 100 $\pm$ 38          | 23 $\pm$ 15           | 5 $\pm$ 9             |
| 20HH IAV             | 633 $\pm$ 48            | 470 $\pm$ 20         | 268 $\pm$ 21          | 86 $\pm$ 32           | 18 $\pm$ 14           |

Tabla III. Distribución de las células mesenquimatosas en el espacio entre el endocardio y el miocardio. Se analizó el cojín inferior (IAV) y el superior (SAV) del canal atrioventricular, de corazones de embriones de pollo del estadio 16HH y 20HH. Note que las células mesenquimatosas se encuentran cercanas al endocardio.

<sup>a</sup> Se analizaron cuatro corazones de cada estadio de desarrollo.

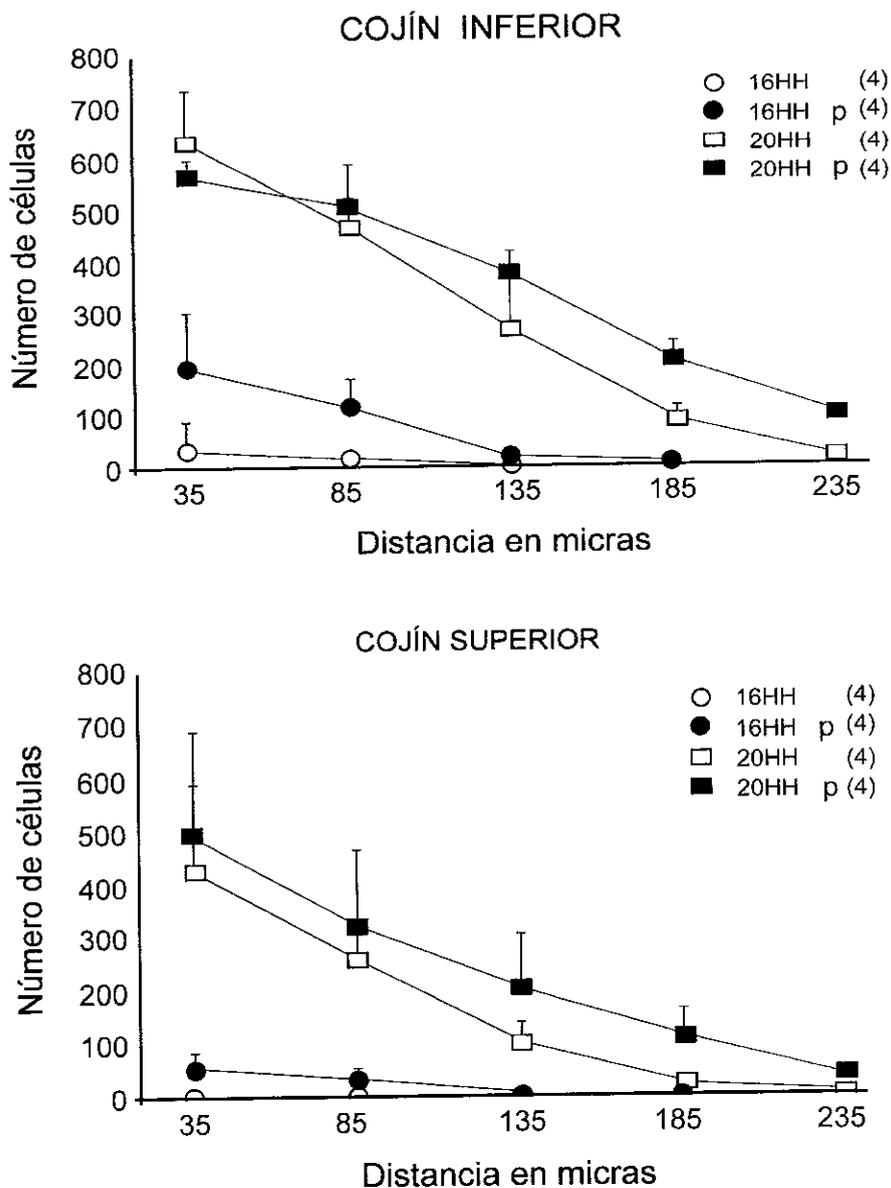


Figura 23. Efecto del implante de cabello sobre la distribución de células mesenquimatosas del endocardio hacia el miocardio. A embriones del estadio 10HH se les implantó un cabello en el tubo neural (p) y los embriones se sacrificaron en el estadio 16HH o 20HH. Note la anomalía en la distribución de células mesenquimatosas cercanas al endotelio en el cojín inferior del canal atrioventricular del corazón de embriones experimentales.

| Estadio           | IAV                 | SAV                 |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| <b>16 HH (8)</b>  | <b>60.3 ± 30</b>    | <b>2.7 ± 2</b>      |
| <b>16 pHH (4)</b> | <b>319.5 ± 131</b>  | <b>76.2 ± 28</b>    |
| <b>20 HH (4)</b>  | <b>1473.5 ± 48</b>  | <b>862.5 ± 146</b>  |
| <b>20 pHH (3)</b> | <b>1532.2 ± 459</b> | <b>1165.6 ± 390</b> |

Tabla IV. Efecto del implante del cabello sobre el número total de células mesenquimatosas en el cojín inferior (IAV) y en el cojín superior (SAV) del canal atrioventricular. A embriones del estadio 10HH se les implantó un cabello en el tubo neural y se sacrificaron en el estadio 16HH y en el 20HH. La letra p antes de HH indica al embrión experimental. Entre paréntesis se indica el número de corazones utilizados por estadio de desarrollo de Hamburger & Hamilton (HH). Los valores son la media +/- la desviación estándar. Para significancias estadísticas ver figura 20.

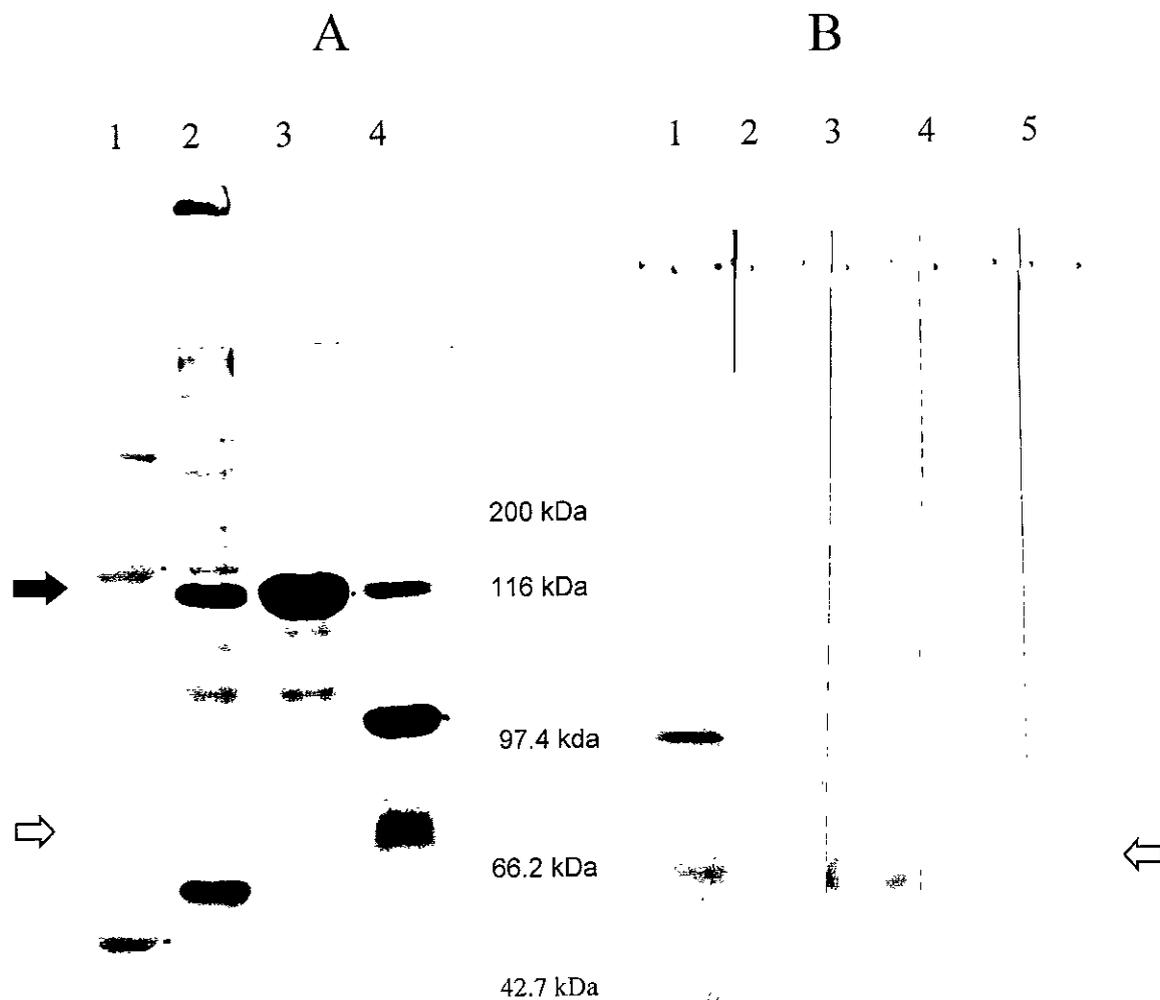


Figura 24. Proteína de fusión ES2.1a. (A) gel teñido con azul de coomassie. El carril, 1 muestra los marcadores de bajo peso molecular; el carril 2, fue cargado con proteína recombinante (glutaciona-transferasa-ES2.1a); el carril 3, contiene proteína retenida por la columna de glutaciona-Agarosa; el carril 4, proteína recombinante cortada por trombina, la flecha negra señala a la proteína de fusión y la inferior (vacía) el péptido ES2.1a. (B) Inmunoblot. Carril I, marcadores de bajo peso molecular, teñidos con azul de coomassie. Los carriles 2,3,4 y 5 fueron cargados con proteína recombinante cortada con trombina e incubada con suero normal (carril 2), con anti-péptido II (carril 3); con anti-péptido I (carril 4) y con anti-IgG de conejo (carril 5). La

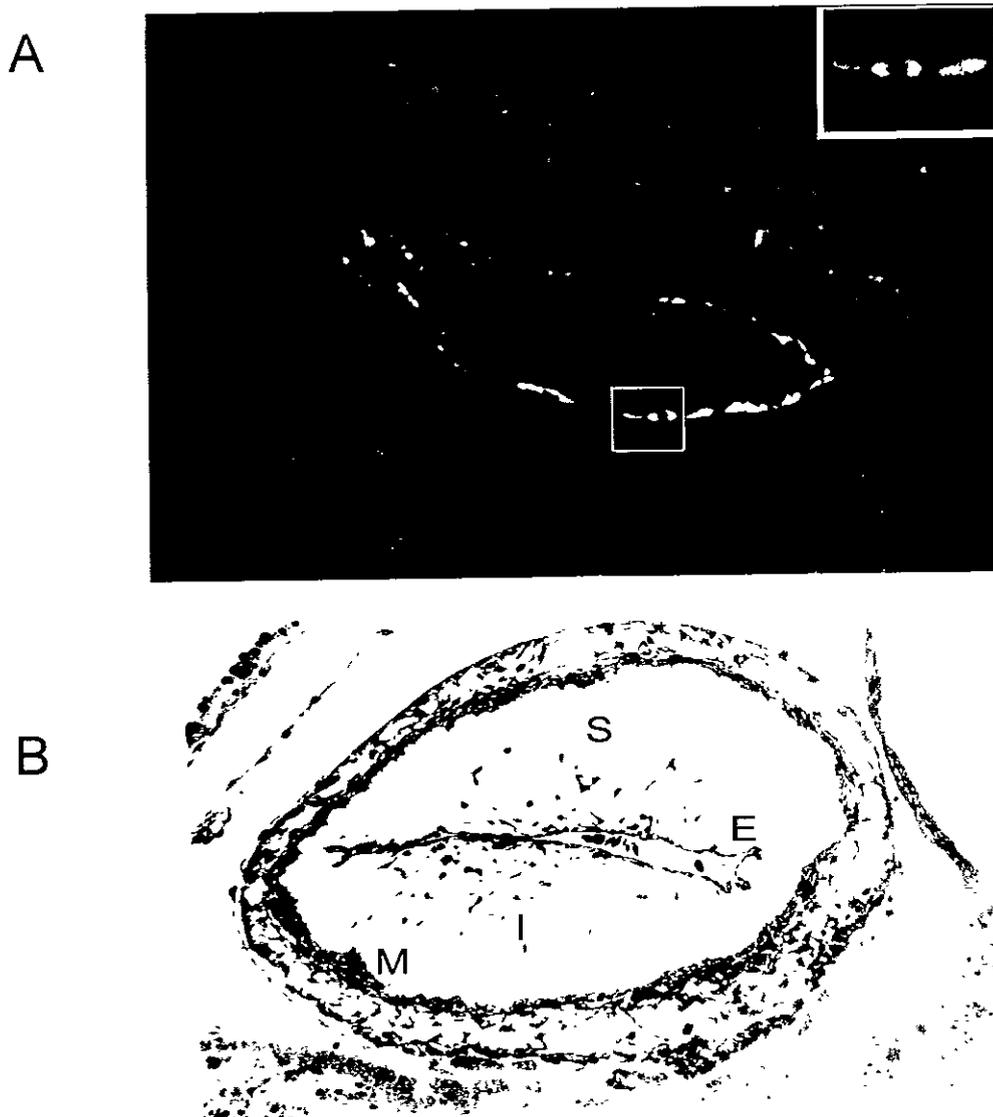


Figura 25. Inmunolocalización de ES/130 en el corazón del embrión del pollo. A). El corazón del embrión del pollo del estadio 14-HH, se fijó en Carnoy's y se cortó en un criostato a  $10\ \mu$ . El tejido se bloqueó con albúmina de suero de bovino y suero de chivo. Al tejido se le adicionó anticuerpo inmunopurificado anti-péptido II. Note que sólo se tiñó el endocardio a nivel intracelular (note el uso mitótico en la amplificación en el recuadro). B). Corte transversal semifino de  $1\ \mu$  a nivel del canal atrioventricular, equivalente al corte superior (A). M=miocardio, E=endocardio, I=cojín inferior del canal atrioventricular, S=cojín superior del canal atrioventricular. Note que en el recuadro en A, existe una célula con huso mitótico y en B, que el cojín inferior posee más células

A



B

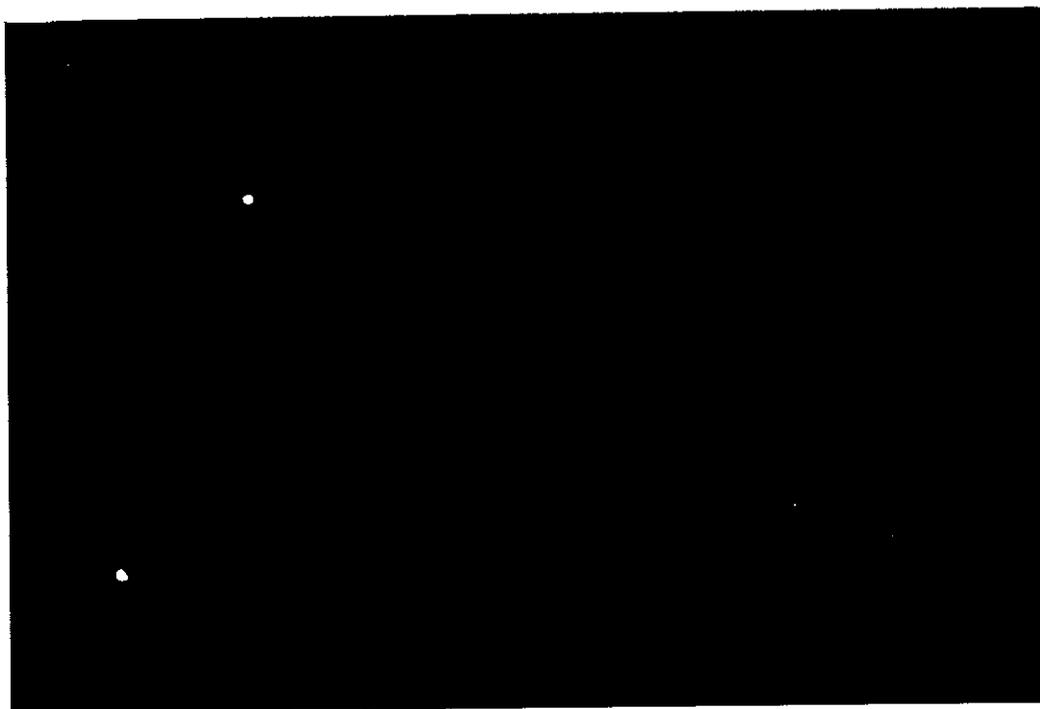


Figura 26. Inmunolocalización de ES/130 en el corazón del embrión del pollo del estadio 17HH. El corazón se fijó en Carnoy's y se cortó en un criostato a 10  $\mu$ . El tejido se bloqueó con albúmina de suero de bovino y suero de chivo. Al tejido en A, se le adicionó anticuerpo inmunopurificado, anti-péptido II y en B se incubó con anti-péptido II más péptido II. Note que el endocardio del canal atrioventricular es el único tejido positivo al anticuerpo anti-péptido II, el panel inferior muestra que el péptido II bloquea esta tinción. El anticuerpo, anti-péptido II no fue bloqueado por otro péptido.

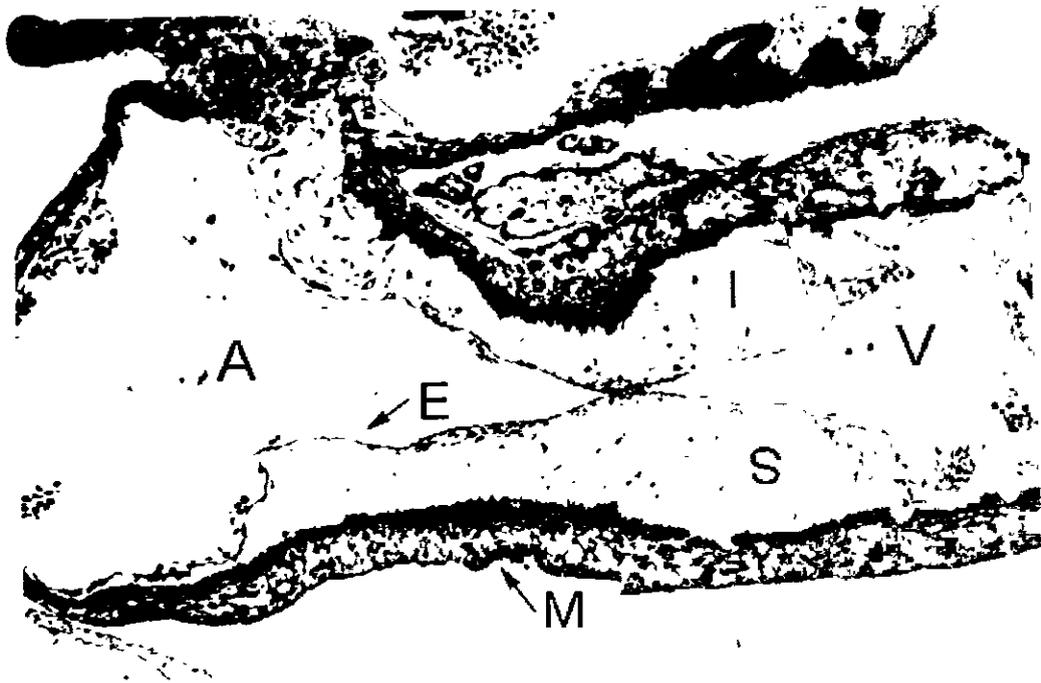


Figura 26. Corte transversal de un corazón de pollo del estadio 17HH. El corazón se fijó en formaldehído, se incluyó en epón, se cortó a  $1\ \mu$  y se tiñó con azul de toluidina. El corte es equivalente al realizado en el criostato de la figura 26A. M=miocardio, E=endocardio, V=ventrículo, A=atrio. I=cojín inferior, S= cojín superior del canal AV

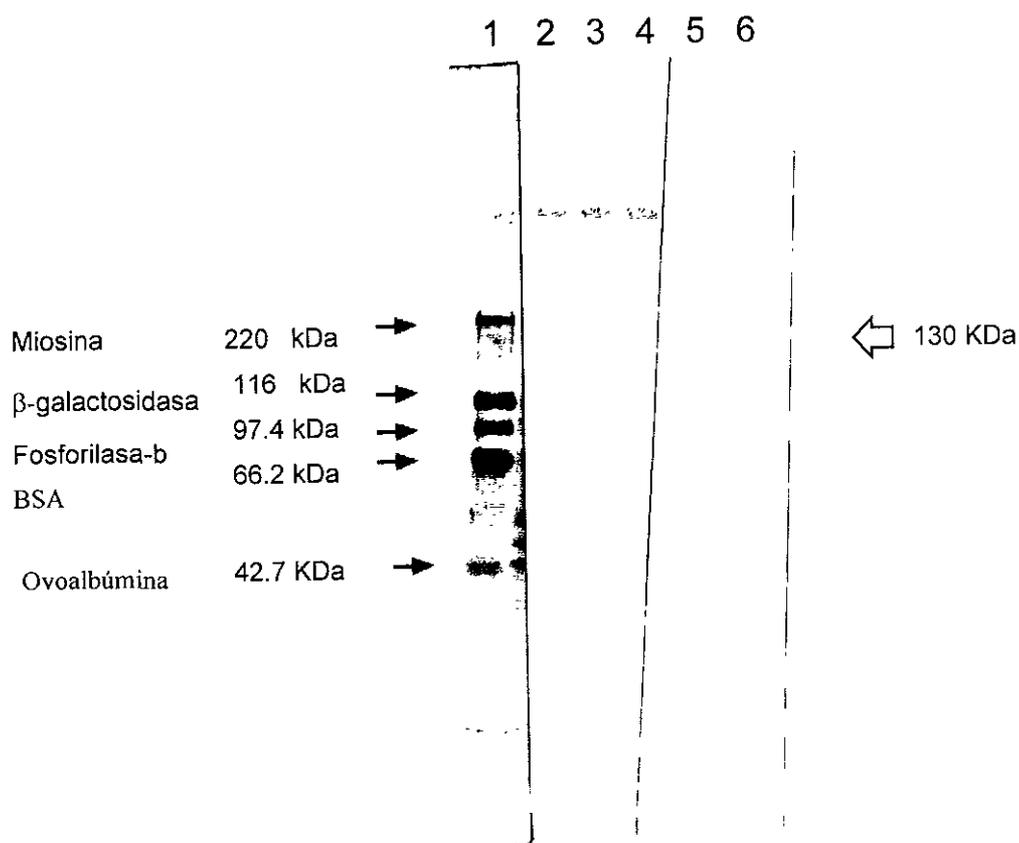


Figura 27. Inmunolocalización de ES/130 en el miocardio y endocardio. 10  $\mu$ g de proteína total proveniente de miocardio (carriles 2-4) o de endocardio (carriles 5 y 6) fue separada en un gel de poliacrilamida al 7.5 % y se electrotransfirió a inmobilón-p. La membrana se bloqueó con leche y se incubó con anti-péptido II (2  $\mu$ g/ml), con anti IgG de conejo-fosfatasa alcalina y se reveló con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitro azul de tetrasolio (BCIP/NBT). Carril 1 marcadores de alto peso molecular (4  $\mu$ g), teñidos con azul de coomassie. Carril 2, proteína del miocardio del canal AV del estadio 17 HH. Carril 3, proteína del miocardio ventricular del corazón, estadio 17 HH. Carril 4, proteína del miocardio del estadio 14 HH. Carril 5, proteína del endocardio del estadio 17 HH y carril 6, endocardio del estadio 14 HH.

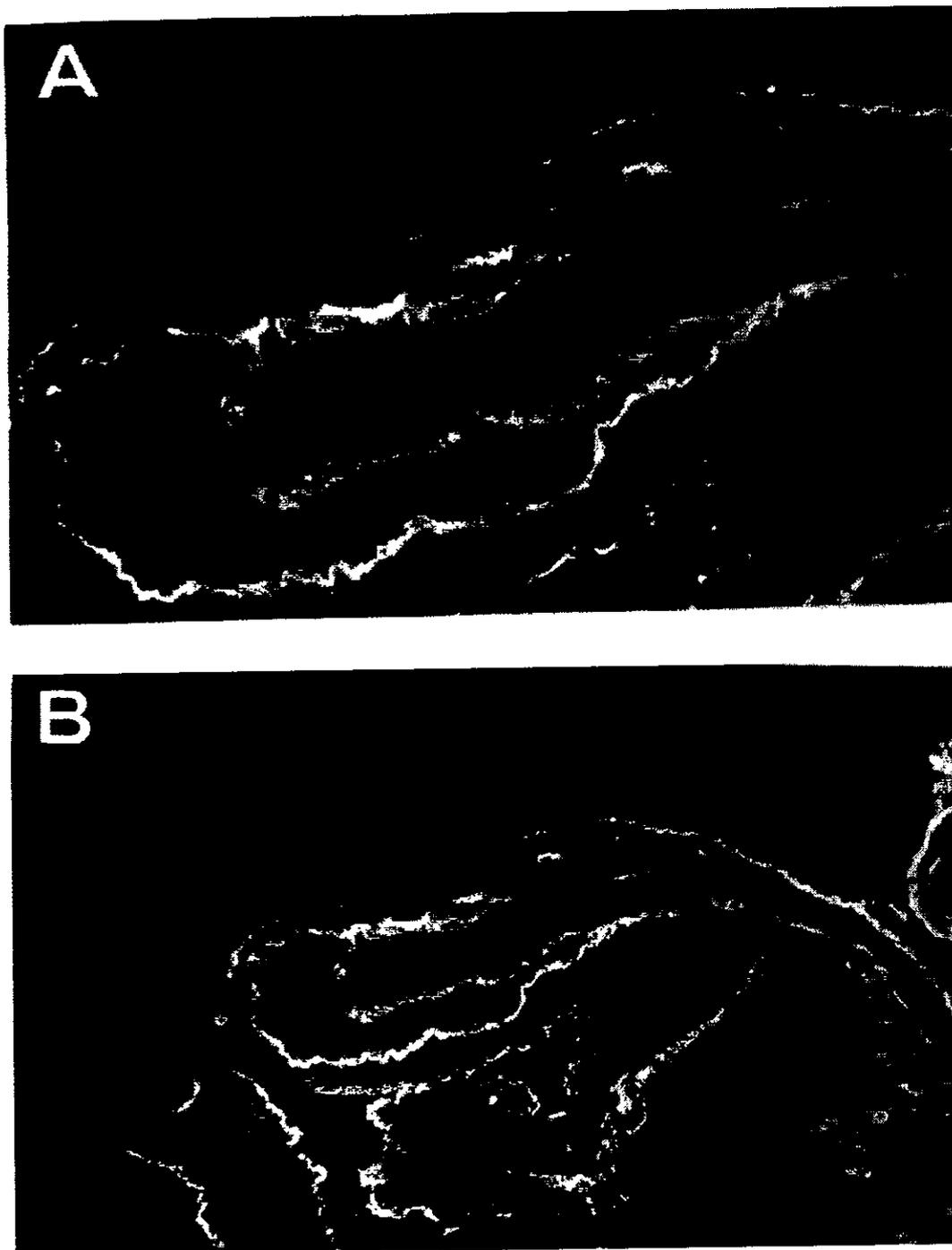


Figura 28. Distribución de los antígenos ES1(A) y OJ2(B). Los embriones del estadio 17 HH se fijaron con formaldehído en PBS y se realizaron cortes por congelación a 10  $\mu$ . Note que la reactividad sólo está localizada en la matriz extracelular.

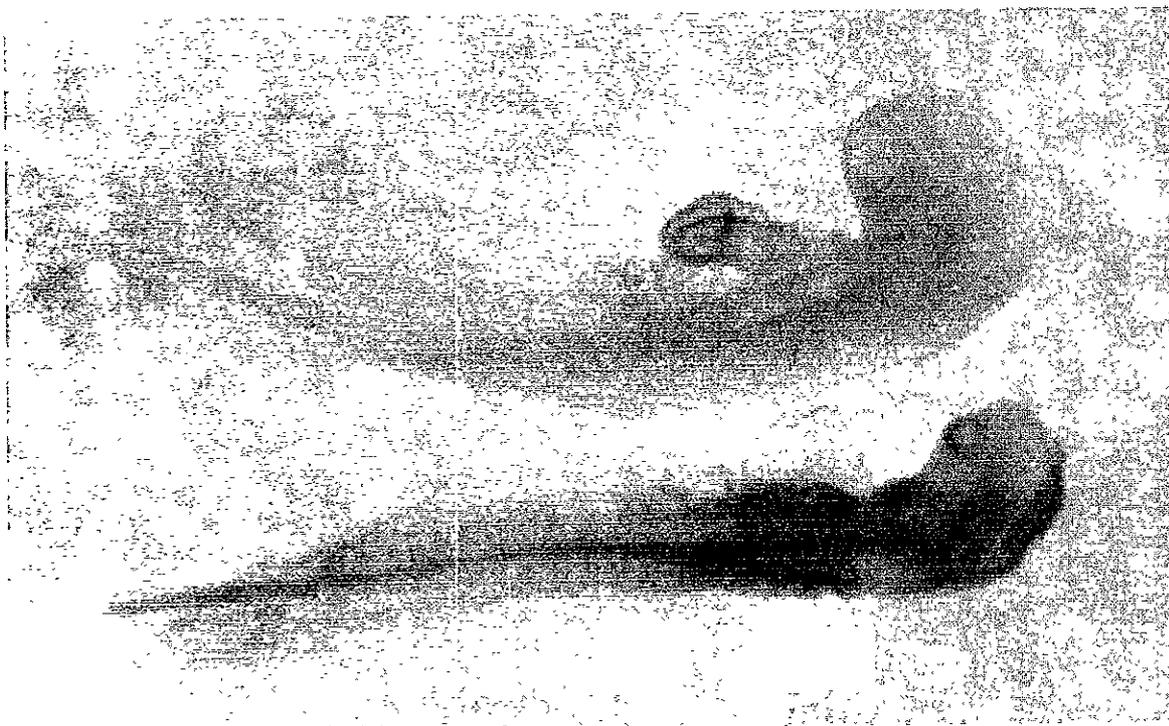


Figura 29. Localización de ES/130 por Hibridación "in situ" en embriones estadio 14 HH. El embrión de la parte superior fue incubado con la sonda antisentido y el de la inferior, con la sonda con sentido. Ambas sondas se marcaron con digitonina, la cual se reconoció por un anticuerpo anti-digitonina conjugado con fosfatasa-alcalina, que fue revelada con NBT/BCIP. Note que la sonda antisentido sólo hibridó con el tejido cardiaco, miocardio y endocardio del corazón (en colaboración con D. Turner).

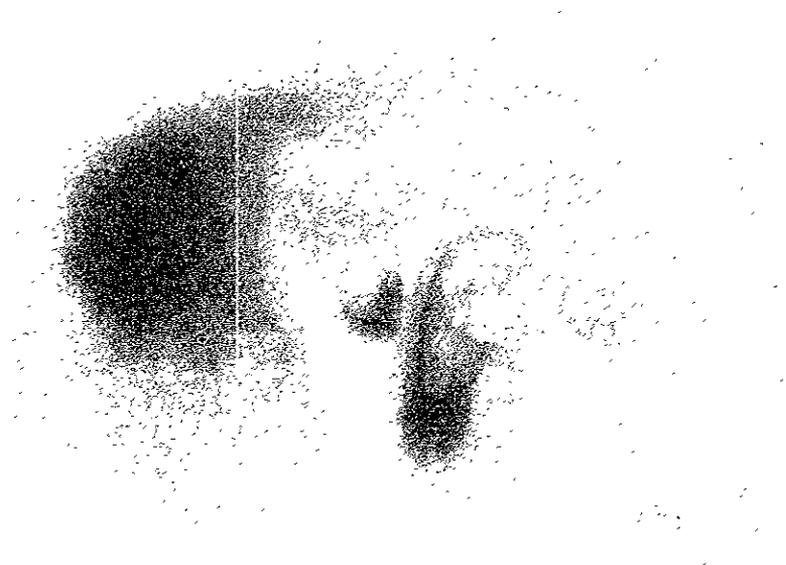


Figura 30.-Localización de ES/130 por hibridación “in situ” en embriones del estadio 18 HH. Note que la sonda antisentido ES/130, hibridó sólo en las regiones del canal A-V, donde se realiza la transformación del endocardio en mesénquima (en colaboración con D. Turner).

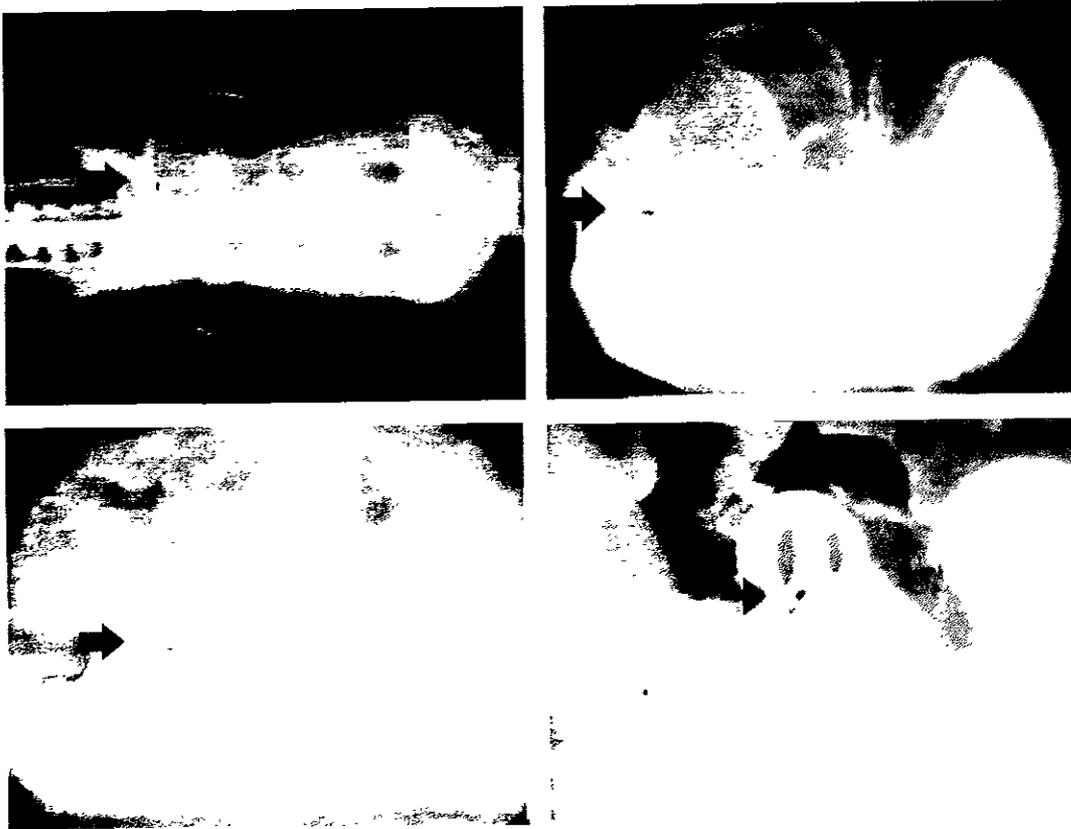


Fig. 31. Región prospectiva del cojín inferior. En el embrión del estadio 12HH, se puso una marca de gelatina tinta china en el surco derecho (flecha) y se siguió hasta el estadio 18HH. El desarrollo del embrión se filmó en el estadio 12, 14, 16 y 18HH. Cada recuadro es una imagen digitalizada.

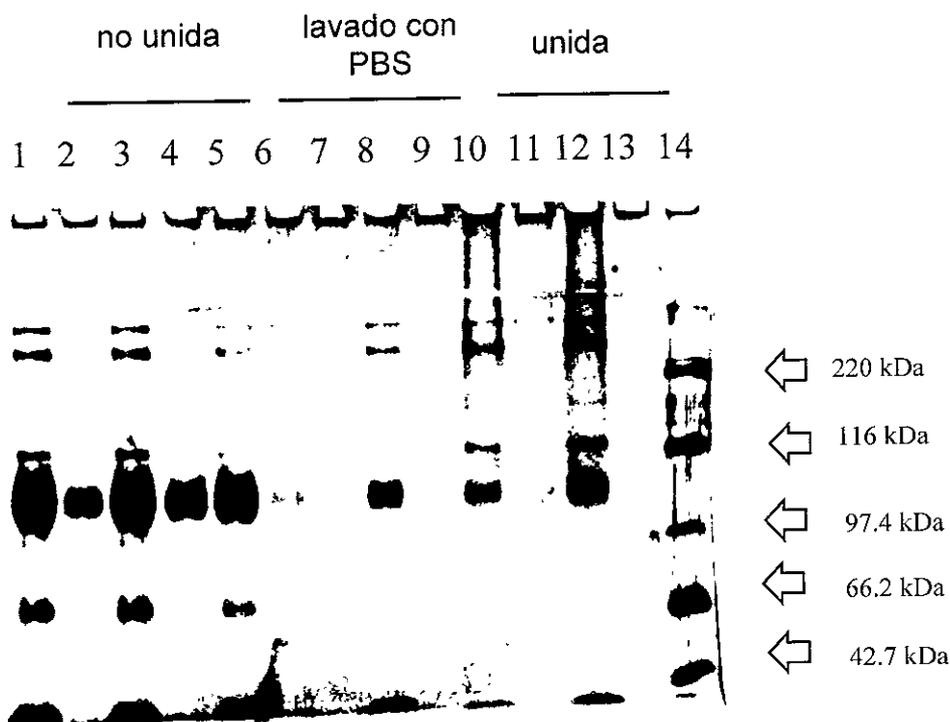


Figura 32. Adsorción de las IgGs a DEAE-Agarosa ó Agarosa, a dos pHs diferentes. Gel de poliacrilamida al 12%, teñido con plata-coomassie. Carril 1, IgG parcialmente hidrolizada (8  $\mu$ g). Carriles 2-5, proteína no unida a las columnas. Carriles 6-9, proteínas no unida a la columna, lavada con 800  $\mu$ l de PBS. Carriles 10-13, proteína unida y eluida de las columnas, con 100  $\mu$ l de amortiguador de muestra. Carriles 2, 6 y 10, columna de DEAE-agarosa a pH de 7.5. Carriles 3, 7 y 11, columna de Agarosa a pH 8. Carriles 4, 8 y 12, columna de DEAE a pH 10. Carriles 5, 9 y 13, columna de Agarosa a pH 10. Carril 14 marcadores de alto peso molecular.

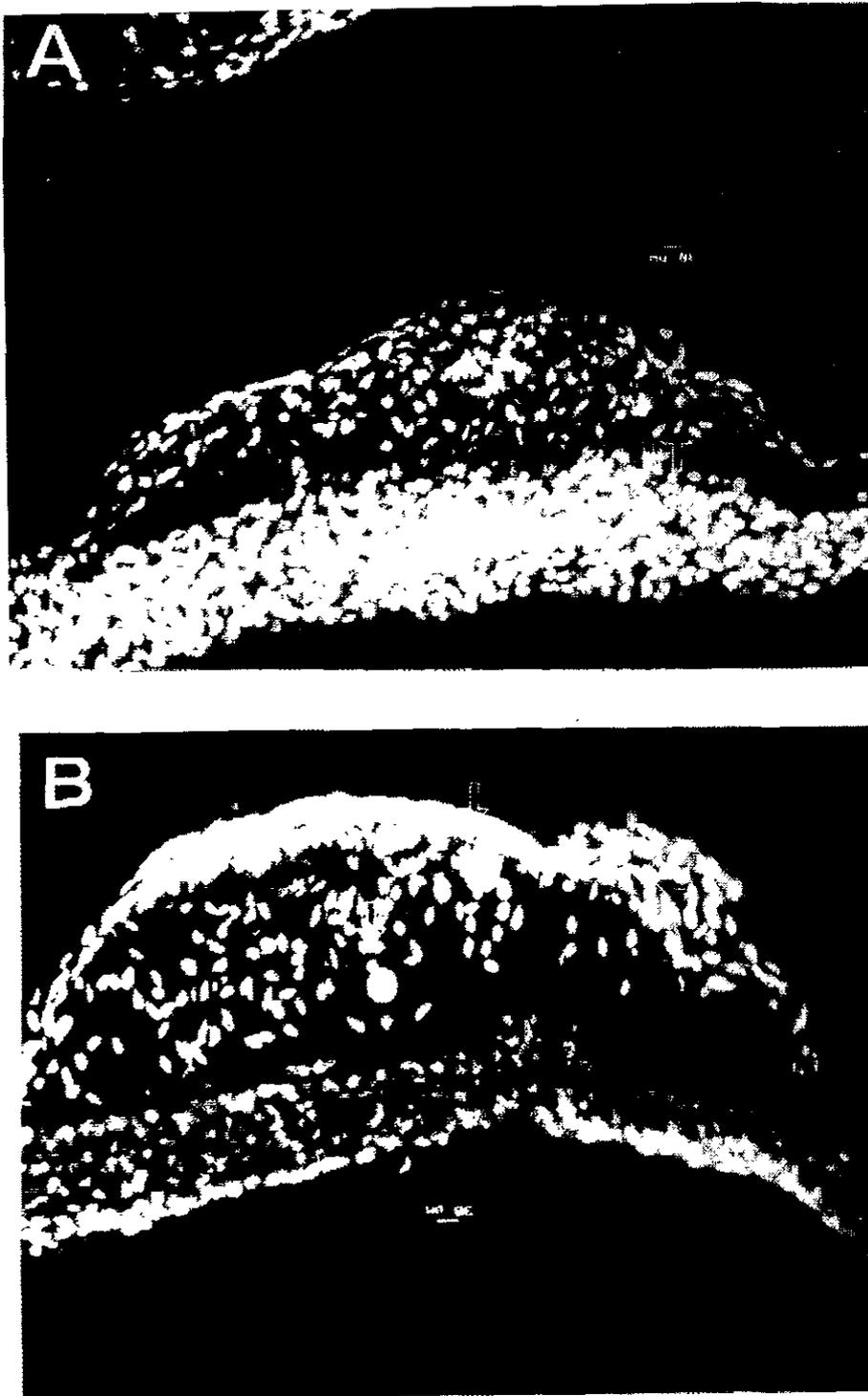


Figura 33. Efecto del microimplante de DEAE-agarosa (microesferas de  $15\ \mu$  de diámetro) con BSA (A) y OJ2 (B), en la distribución de las células mesenquimatosas. En el estadio 14HH, se microimplantaron, en la región del cojín inferior, 2 esferas con BSA (A) o con OJ2 (B) y el embrión se sacrificó en el estadio 18HH. El núcleo celular se tiñó con yoduro de propidio y se observó en el microscopio confocal. Note que alrededor de las esferas con OJ2 (B), aparentemente existen menos células que en las que interaccionaron con BSA (A). Las flechas señalan el sitio donde se localizaron las microesferas de agarosa.

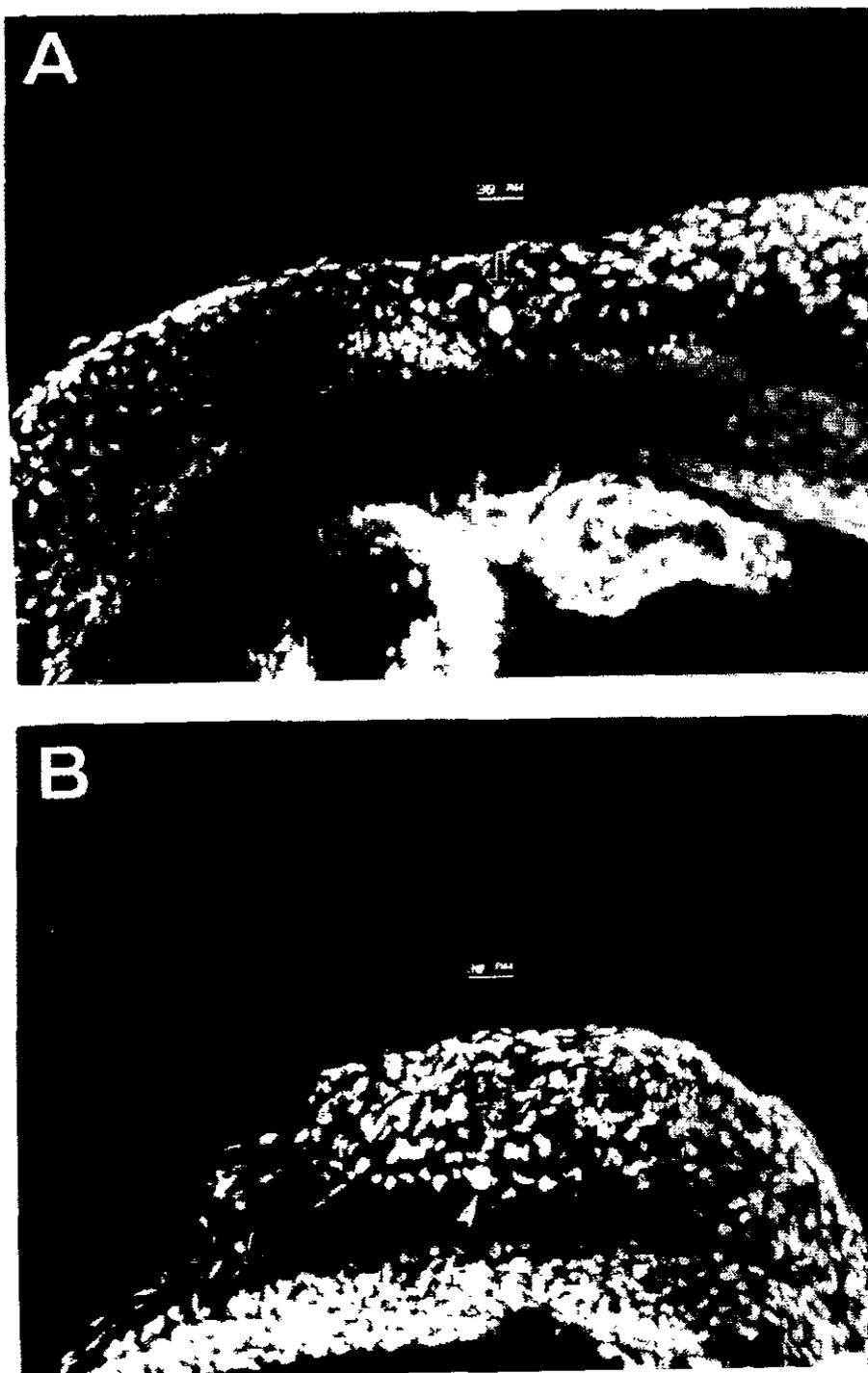


Figura 34. Localización de las microesferas de DEAE-agarosa ( $15 \mu$  de diámetro) con BSA. En el estadio 14HH, se microimplantó una microesfera de DEAE-agarosa con BSA en el área del cojín inferior y el embrión se sacrificó en el estadio 18HH. El núcleo celular se tiñó con yoduro de propidio y se observó en el microscopio confocal. Note que los sitios donde se encontraron las microesferas, no son áreas equivalentes entre los dos cojines (compare A contra B). Las flechas señalan el sitio del cojín inferior donde se localizó la microesfera de agarosa.

Tabla V. Inmunolocalización de los sueros obtenidos en este trabajo. Resultados de los diferentes tratamientos utilizados.

| anticuerpo                | Fijador utilizado     | procesamiento        | tratamiento adicional                         | tejido tenido           |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|---|-------------------------|
| anti-I, anti-II y anti-IV | Paraformaldehído      | Parafina             | ninguno, Tripsina (1 mg/ml)*                  | Ninguno                 |
| anti-II                   | Carnoy's              | Tisutex (criostato)  | ninguno                                       | Endocardio              |
| anti-II                   | Paraformaldehído      | Parafina             | Hialuronidasa 60 min                          | Endocardio              |
| anti-IV                   | Paraformaldehído      | Parafina             | Hialuronidasa Testicular (1 mg/ml)*           | Epicardio extracardiaco |
| anti-I, anti-II, anti-IV  | Paraformaldehído      | Tissutex (criostato) | ninguno, Tripsina (32 µg/ml), Hialuronidasa.* | Ninguno                 |
| anti-I, anti-II, anti-IV  | DMSO-etanol o Acetona | Tissutex (criostato) | ninguno                                       | Ninguno                 |
| anti-I, anti-IV           | Carnoy's              | Tisutex (criostato)  | ninguno                                       | Ninguno                 |
| OJ2 y ES1                 | cualquiera            | cualquiera           | ninguno                                       | Matrix extracelular     |

La hialuronidasa se utiliza a 1 o 2.5 mg/ml en amortiguador de oxaloacetato de sodio 50 mM a pH de 5.6. Los tratamientos enzimáticos fueron de 5min -1 hrs

## VII. DISCUSIÓN.

Existe una diferencia notable entre el cojín inferior y superior del canal atrioventricular, respecto a la distribución temporal y espacial de sus células mesenquimatosas, como lo demuestran nuestros resultados: 1) la transformación epitelio-mesénquima comienza 10 hr antes en el cojín inferior respecto al superior, 2) entre los estadios 16-17HH el 90% de las células mesenquimatosas, se encuentran localizadas en el cojín inferior, porcentaje que disminuye al 66% en el estadio 20HH. Wienecke et al. (1995), observaron que ésta diferencia persiste entre los estadios 20-24HH, 3), además existe una distribución del mesénquima, diferente entre el cojín inferior y el superior del canal atrioventricular, en el cojín inferior las células mesenquimatosas se distribuyen en forma bimodal, porque constituyen dos conglomerados mesenquimatosos, uno en la región contigua al atrio y el otro en la adyacente a la región apical trabeculada ventricular, mientras que el superior presenta un gradiente ventrículo-atrial porque la mayor cantidad de células mesenquimatosas están confinadas a la región del cojín contigua a la región apical trabeculada ventricular.

La aparición de células mesenquimales en el cojín inferior del canal atrioventricular (16HH) antes que en el superior (17-18HH) y el hecho que su población sea más numerosa en el primero, probablemente se debe a que el primordio del cojín inferior del canal atrioventricular aparece en el estadio 12HH, en el surco atrioventricular derecho como se demostró mediante el marcaje "*in vivo*" de éste surco (de la Cruz et al., 1987), mientras que en éste estadio no existe ningún signo morfológico que indique la presencia del surco atrioventricular izquierdo, el cual se observa por primera vez en el estadio 16HH, en la unión entre la curvatura menor y los atrios y también ahí se observa por primera vez, el cojín superior del canal atrioventricular. (fig. 35a). Además, Rosenquist y DeHaan

(1966) y Thompson (comunicación personal, 1996) señalan que el cojín inferior del canal atrioventricular, recibe una contribución importante del área cardiogénica derecha del embrión del pollo del estadio 7HH. También la mayor población celular en el cojín inferior del canal AV, puede ser debida a una mayor secreción del inductor por el miocardio de ésta región (fig. 35B), con un retardo de 10 hrs respecto al cojín superior del canal atrioventricular. Entre los posibles inductores de la transformación epitelio-mesénquima se encuentran el antígeno ES/130 (Krug et al., 1985a,b, Rezaee et al., 1993), la proteína BMP-4 (bone morphogenetic protein-4), el factor de transformación del crecimiento tipo- $\beta$ 2 (Jones et al., 1991; Dickson et al., 1993, Akhurst et al., 1990; Potts et al., 1991; Nakajima et al., 1994), el receptor tipo II para el factor de transformación del crecimiento tipo- $\beta$  (Brown et al., 1996) y el antígeno JB3 (Wunsch et al., 1994). También conocemos que los componentes de la matriz extracelular participan en la migración celular (Hashimoto et al., 1987, Linash y Lash, 1986, Heasman et al., 1981, Nakatsuj et al., 1984), por consiguiente podemos suponer que los patrones asimétricos del mesénquima de los cojines, pueden ser debidos a la diferente constitución de la matriz extracelular, tanto en su aspecto cuantitativo como cualitativo, el retardo en la aparición de mesénquima en el cojín superior con respecto al inferior puede estar relacionado con un retardo en la síntesis de los componentes de matriz extracelular, por ejemplo Hiltgen et al. (1996) informó que el retardo en la síntesis de fibronectina tiene cierta relación con un retardo en la formación de mesénquima en el embrión de ratón trisómico. Estudios recientes establecen que existe una relación entre el miocardio y el endocardio, no sólo respecto a la formación de mesénquima, sino también al desarrollo de trabeculas musculares cardiacas (región apical trabeculada ventricular), como se ha encontrado en el embrión "knock out" del ratón, en que la ausencia de neuregulin, producida por el endocardio o su receptor miocárdico (erbB4), dan origen a una inhibición en el desarrollo de trabeculas en la región apical trabeculada ventricular (Meyer y Birchmeier, 1995; Gassmann et al., 1995). Otra posible

explicación en relación a los patrones mesenquimales asimétricos, es que el endocardio sea heterogéneo respecto a su capacidad de transformarse en mesénquima (fig. 35C), y que éstas células se concentren principalmente en las áreas donde se observa mayor cantidad de mesénquima, posibilidad basada en los experimentos de Runyan y Markwald (1983), que encuentran que el endotelio de la región apical trabeculada ventricular no es apto para transformarse en mesénquima, a pesar de que se le agreguen los factores que inducen la transformación endotelio-mesénquima en el endotelio de la región de los tractos de entrada.

El grupo de de la Cruz, ha demostrado que el cojín inferior contribuye en el desarrollo del tracto de entrada de ambos ventrículos, es decir da origen al septum atrioventricular, a la región adyacente del septum interatrial e inventricular y participa en la formación de la valva septal de la tricúspide y en la porción de la valva anterior de la mitral que se inserta en el tabique, mientras que el superior contribuye en el desarrollo del tracto de salida del ventrículo izquierdo, por intervenir en el desarrollo de sus dos paredes, es decir la septal y la constituida por la valva anterior de la mitral denominada, continuidad mitro-aortica. Queda por investigar si los destinos prospectivos diferentes para cada cojín están relacionados con las diferencias en las poblaciones celulares de los cojines inferior y superior del canal atrioventricular.

Los embriones en los que se colocó un pelo dentro del tubo neural en el estadio 10HH, nos dieron la siguiente información. El número total de células en los cojines inferior y superior del canal atrioventricular en el estadio 16HH fue mayor comparado con el testigo, mientras que en el estadio 20HH la cantidad total de células en cada uno de éstos cojines fue muy similar en ambos grupos o ligeramente mayor en los embriones experimentales. Estos resultados

posiblemente se deben, a que la transformación epitelio-mesénquima ocurre antes en el embrión experimental respecto al testigo o bien, a que los índices de multiplicación celular (crecimiento diferencial) sean mayores en el embrión experimental o ambas posibilidades; el efecto seguramente desaparece en el estadio 20HH. Observamos que en los embriones experimentales, estadios 16H y 20HH, los cojines inferior y superior del canal A-V, son hiperplásicos, resultados que complementan a los obtenidos por Männer et al (1993, 1995), que describen que ambos cojines son hipoplásticos en el estadio 24HH. Posiblemente la diferencia entre los resultados de Männer y los nuestros, es debida a que él usó embriones de edades más tardías. Además, nuestros resultados indican que en el estadio 20HH la transformación epitelio-mesénquima es menor en el embrión experimental, inhibición que puede ser aún mayor en estadios posteriores, dando origen a un cojín hipoplástico. El efecto del incremento, en el número de células mesenquimatosas, posiblemente es debida a una mayor síntesis de inductores de la transformación epitelio-mesénquima, lo cual por alguna razón desconocida no ocurre en el estadio 20HH.

Los anticuerpos (excepto el anti-III) que fueron producidos contra polipéptidos sintéticos, basados en la secuencia del DNA complementario (cDNA) de ES/130, son específicos como lo demuestra la competencia con sus polipéptidos; en Western Blot reconocen a una proteína de 130 KDa y a la proteína recombinante ES1.A; no precipitan a los adherones en extractos de matriz extracelular y no bloquean la transformación epitelio mesénquima en cultivo. Estos anticuerpos en el tejido embrionario, reconocen componentes intracelulares sólo cuando el tejido fue desnaturalizado con Carnoy, por lo que suponemos que el epítopo es intramolecular. El anticuerpo anti-pep-II reconoce al endocardio de la región del canal atrioventricular, en el estadio 18HH y en Western blot a una banda 130 KDa, teñida más intensamente en el endocardio del estadio 14HH. En todos los estadios analizados, el miocardio

presentó menor tinción de ES/130. El miocardio de los embriones del estadio 14HH, presentó menos ES/130 que el miocardio del estadio 17HH, localizada principalmente en la región del canal A-V. Además, al estudiar el área prospectiva del cojín inferior mediante la hibridación "*in situ*" de ES/130, no pudimos observar una distribución, de ES/130, restringida al área prospectiva de cojín en ninguna de las etapas estudiadas (12-16HH), ni tampoco observamos un gradiente de distribución de ES/130, que corresponda con la distribución de células mesenquimatosas. Estos resultados no apoyan la idea que ES/130 tenga un papel inductor, pero no niega la posibilidad de que ésta molécula participe en la transformación epitelio-mesénquima.

Resultados no publicados de experimentos recientes indican que ES/130 es 79% homologa a la proteína RRp (ribosome receptor protein), pero carece de la región de unión a los ribosomas; además, otra proteína con la que comparte homología es la Kinectin, la cual es un receptor para las proteínas motores tipo kinesin. Con base en estos hechos, Krug (comunicación personal) considera que ES/130 puede participar en asociación con los microtúbulos y con el retículo endoplásmico rugoso, en el tráfico de productos de secreción (Yu et al., 1995 y Toyoshima et al., 1992). Este dato explicaría nuestro dato preliminar de que se tiñó el uso mitótico (fig. 25).

Debido a que conocíamos que los anticuerpos ES1 y OJ2 tiñen la matriz extracelular, que precipitan preparaciones enriquecidas de adherones y que bloquean la transformación epitelio-mesénquima "*in vitro*", los utilizamos en los experimentos del implante de microacarreadores. La introducción de hasta 3 microesferas con OJ2 o ES1, en el cojín inferior, no afectó el desarrollo del corazón, ni tampoco la invasión de células mesenquimatosas. Las posibles explicaciones de estos resultados son: i) una dosis baja, ii) un efecto breve,

debido a la hidrólisis por las proteasas existentes en la matriz extracelular, iii) a la no saturación del ligando, iv) la heterogeneidad de la distribución celular en el cojín inferior, v) la heterogeneidad del lugar de implante, que resulte en una amplia distribución de las esferas, en el cojín inferior del estadio 18HH, con lo cual se tendría una variedad de efectos posibles, vi) un título insuficiente para inhibir la transformación epitelio-mesénquima vii) mecanismos de regulación en el embrión, que contrarresten el efecto del anticuerpo.

La transformación epitelio mesénquima acontece entre los estadios 16-17HH en el cojín inferior del canal atrioventricular y entre el 17-18HH en el superior. Estos hechos indican la necesidad de conocer con precisión, la región prospectiva de los cojines inferior y superior, desde etapas muy tempranas de su desarrollo (estadio 12HH) hasta los estadios en que están poblados por las células mesenquimatosas (estadio 18HH). Esta información permitirá diseñar y elegir los experimentos de inhibición de la síntesis de proteínas, involucradas en la inducción de la transformación epitelio-mesénquima, en el embrión del pollo. Obviamente, se desconoce el lugar y estadio del desarrollo en el que se inicia la síntesis de los antígenos ES, lo que hace aun más importante investigar los cambios morfológicos, histológicos y de posición de la región prospectiva del cojín inferior y estudiar si estos cambios se correlacionan con la distribución de los antígenos ES. Por otra parte, es necesario producir otros anticuerpos policlonales o monoclonales mono-específicos que cumplan con las siguientes características: a) que tñan matriz extracelular, b) que sean capaces de inmunoprecipitar a los adherones, c) que inhiban "*in vitro*" la transformación epitelio-mesénquima, d) que se expresen restrictivamente en el área de los cojines del canal A-V, donde se realiza la transformación epitelio-mesénquima e) que se expresen transitoriamente y e) que sean altamente específicos.

## VII. CONCLUSIONES.

I. Modelo de corazón normal. Existe una diferencia notable entre el cojín inferior y superior del canal atrioventricular, respecto a la distribución temporal y espacial de sus células mesenquimatosas. 1) La transformación epitelio-mesénquima comienza 10 hr antes en el cojín inferior respecto al superior. 2) Entre los estadios 16-17HH el 90% de células mesenquimatosas se encuentran localizadas en el cojín inferior, porcentaje que disminuye al 66% en el estadio 20HH. 3) En el cojín inferior, las células mesenquimatosas se distribuyen en forma bimodal, es decir, en la región contigua al atrio y en la adyacente a la región apical trabeculada ventricular, mientras que el superior presenta un gradiente ventrículo-atrial i. e. la mayor cantidad de células mesenquimatosas están confinadas a la región del cojín contigua a la región apical trabeculada ventricular.

II. Modelo del cojín hipoplástico. El número total de células en el cojín inferior y en el superior del canal atrioventricular, en el estadio 16HH, fue mayor en el embrión experimental respecto al testigo, mientras que en el estadio 20HH, la cantidad total de células en cada uno de estos cojines fue muy similar o ligeramente mayor con respecto a los embriones testigo.

III. Los anticuerpos producidos contra polipéptidos sintéticos (excepto el II), basados en la secuencia del DNA complementario (cDNA) de ES/130, son específicos y reconocen a una proteína de 130 KDa y a la proteína recombinante ES1.A, no precipitan a los adherones, en extractos de matriz extracelular y no bloquean la transformación epitelio mesénquima en cultivo. Los anticuerpos reconocen componentes intracelulares del tejido embrionario. Debido a las condiciones desnaturalizantes consideramos que el epítipo que se reconoce es intramolecular. El endocardio del corazón del embrión del estadio 18HH, presentó

más tinción que el del estadio 14HH. En todos los estadios estudiados, el miocardio presentó menor tinción a ES/130 que el endocardio. El miocardio de embriones del estadio 14HH, presentó menos ES/130 que el miocardio del estadio 17HH, localizada principalmente en la región del canal A-V. ES/130 no presentó una distribución restringida al área prospectiva de cojín, en ninguna de las etapas estudiadas (12-16HH), ni tampoco observamos un gradiente de distribución de ES/130, en la misma forma de la distribución de células mesenquimatosas.

VI. No obtuvimos inhibición de la transformación epitelio-mesénquima "*in vitro*" con los anticuerpos de este trabajo ni con OJ2 o ES1 "*in vivo*", estos últimos si bloquean la transformación mesenquimatosas "*in vitro*".

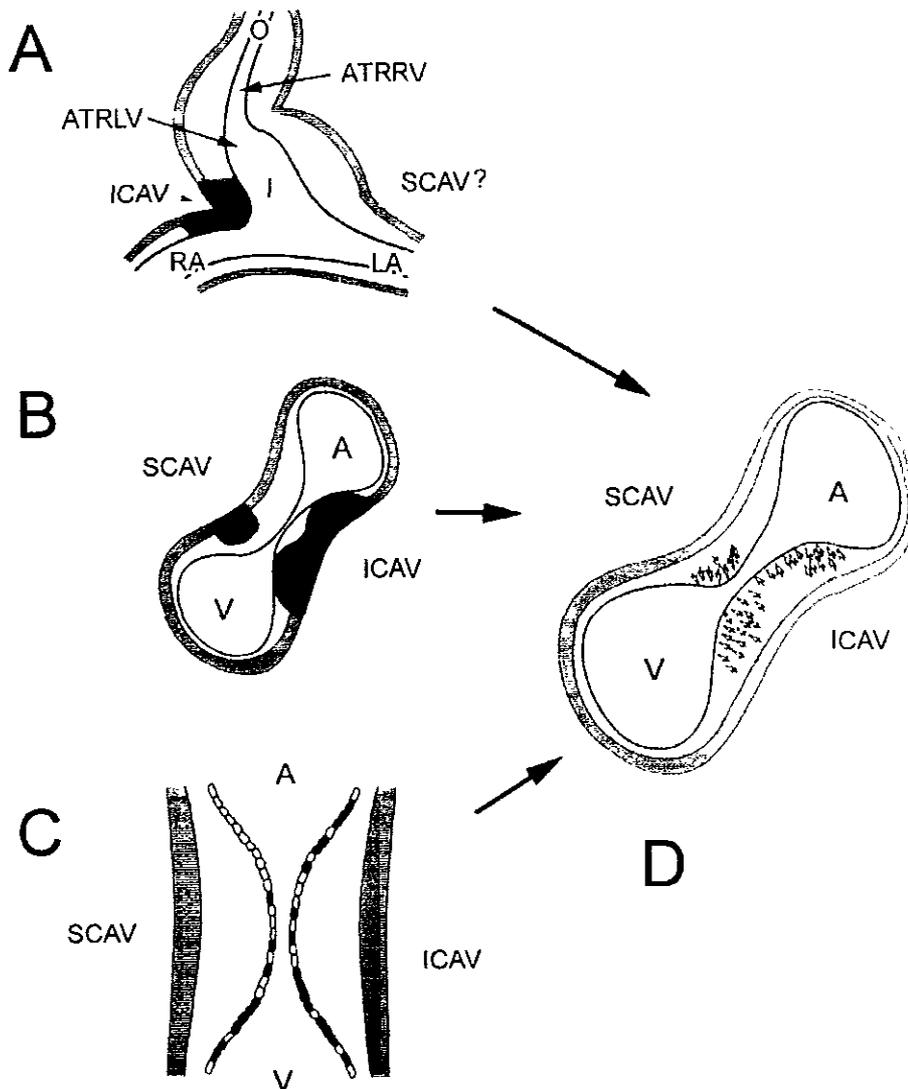


Fig. 35. Hipótesis que explican las diferencias entre el cojín inferior y superior del canal atrioventricular. A. diferencias causadas por diferenciación más temprana del cojín inferior. B. Secreción asimétrica del inductor, receptor o diferencias en la composición de la matriz extracelular. C. diferencias en el endocardio, debido a un origen no común entre los dos tipos. D. esquematiza los resultados obtenidos en este trabajo

## VIII.- REFERENCIAS.

- Akhurst, R. J., Lehnert, S. A., Faissnier, A., and Duffie, E. (1990). TGF-beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development* 108: 645-656.
- Argüello, C., De la Cruz, M. V., and Sánchez C. (1978). Ultrastructural and experimental evidence of myocardial cell differentiation into connective tissue cells in embryonic chick heart. *J. Mol. Cardiol.*, 10:307-315.
- Borg, T.K., Nakagawa, M. and Terracio, L. (1995). Overview: extracellular matrix, receptors, and heart development. In: *Developmental Mechanism of Heart Disease*. Clark, E.D., Marwald, R.R. and Takao, A.. ed. Futura. New York. Cap. 17, pp 175-184.
- Brown, C. B., Boyer, A. S., Runyan, R. B., and Barnett, J.V. (1996). Antibodies to the type II tgf-beta receptor block cell activation and migration during atrioventricular cushion transformation in the heart. *Dev. Biol.*, 174: 248-257.
- Chacko, S. and Joseph, X. (1974). The effects of 5-bromodeoxyuridine (BrdU) on cardiac muscle differentiation. *Dev. Biol.* 40:340- 354.
- Chin, C, Gandour-Edwards, R, Oltjen, S and Choy, M. (1992). Fate of the atrioventricular endocardial cushion in the developing chick heart. *Pediatric Res* 32:390-393.
- Davis, C.L. (1927). Development of the human heart from its appearance to the stage found in embryos of 20 paired Somites. *Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol.* 19:245-248
- De Haan, R.L. (1964). Cell interactions and oriented movements during development. *J. Exp. Zool.* 157:127-133.
- De la Cruz MV, Sánchez C, Arteaga M, Arguello C. (1977). Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J Anat* 123:661-686.

De la Cruz MV, Muñoz-Armas S, Muñoz Castellanos L. 1972. Development of the chick heart. Baltimore. Johns Hopkins University Press.

De la Cruz MV, Castillo MM, Villavicencio L., Valencia A, Moreno-Rodriguez RA. 1997. Primitive interventricular septum, its primordium, and its contribution in the definitive interventricular septum: *In vivo* labelling study in the chick embryo heart. *Anat Rec* 247:512-520.

De la Cruz, M. V., Giménez-Ribota, M., Saravally, O., and Cayré, R. (1983). The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to development of the atrioventricular valves: Study in the chick embryo. *Am J Anat* 166:63-72.

De la Cruz, M. V., Quero-Jiménez, M., Arteaga, M., and Cayré, R. (1982). Morphogenes du septum interventriculaire. *Coeur*, 13: 443-448.

De la Cruz, M. V., Sánchez-Gómez, C., and Cayré, R. (1991). The developmental components of the ventricles: their significance in congenital cardiac malformations. *Cardiol. Young*, 1: 123-128.

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.

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

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

Dickson, M. C., Slager, H. G., Duffie, E., Mummery, C. L., and Akhurst, R. J. (1993). RNA and protein localization of TGF b-2 in the early mouse embryo suggest an involvement in cardiac development. *Development*, 117:625-639.

- Easton, H., Veini, M. and Bellairs, R. (1992). Cardiac looping in the chick embryo: the role of the posterior precardiac mesoderm. *Anat. Embryol.* 185:249-258.
- Edmondson, D.G., Lyons, G.E., Martin, J.F. and Olson, E.N. (1994). Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development*, 120:1251-1263.
- Eisenberg, L. M., and Markwald, R. R. (1995). Molecular regulation of valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.*, 77: 1-6.
- Flamme, I., Albach K., Müller, S., Christ, B. and Jacob, H.J. (1991) Two-phase in vitro culture of explanted chick embryos. *Anat Rec.* 229:427-433.
- García-Peláez and Arteaga-Martínez, M. (1993). Experimental Study of the development of the truncus arteriosus of the chick embryo heart. I. Time of appearance. *Anat. Rec.* 237:378-384.
- García-Peláez, I., Díaz-Góngora, G., Arteaga-Martínez, M. (1984). Contribution of the superior atrioventricular cushion to the left ventricular infundibulum. *Acta Anat.* 118: 224-230.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, C. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*, 378:390-394.
- George, T. R. (1993) Contribución de las poblaciones celulares adyacentes al extremo caudal del corazón en tubo recto (st 9<sup>HH</sup>) en el desarrollo del asa bulboventricular (st 12<sup>HH</sup>). Estudio experimental en el embrión de pollo. Tesis de licenciatura, Facultad de ciencias, UNAM, México.
- Germroth, P., Gourdie, R.G., and Thompson, R.P. (1995). Confocal microscopy of thick sections from acrylamide gel embedded embryos. *Microsc. Res. Technique* 30:25-33.
- George, T. R. (1993). Contribución de las poblaciones celulares adyacentes al extremo caudal del corazón en tubo recto (st.9) en el desarrollo del asa

- bulboventricular (st. 12). Estudio experimental en el embrión de pollo. Tesis profesional de licenciatura en Biología. Facultad de ciencias, UNAM, México.
- Ghosh, S., and Brauer, P. (1996). Latent TGF- $\beta$  is present in the extracellular matrix of embryonic hearts in situ. *Dev. Dynamics*, 205:00-00.
- Grant, R.P. (1962). Embryology of ventricular flow pathways in man. *Circulation* 25:756-779.
- Grobstein, C. (1964). Cyto differentiation and its control: Intrinsic and extrinsic cellular controls intimately interact in differentiative synthesis. *Science* 143:643-650.
- Hamburger, B., and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.
- Hashimoto, H., Fujimoto, H. and Nakatsuji, N. (1987). An ECM substratum allows mouse mesoderm cells isolated from the primitive streak to exhibit motility similar to that inside embryo and reveals a deficiency in the T/T mutant cells. *Development* 100:587-
- Heasman, J., Hynes, R.O., Swan, A.P., Thomas, U.A., and Wylie, C.C. (1981). Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: the role of fibronectin in their adhesion during migration. *Cell* 27:437- 447.
- Hiltgen, G. G., Markwald, R. R., and Litke, L. L. (1996). Morphogenetic alterations during endocardial cushion development in the trisomy 16 (Down syndrome) mouse. *Pediatr. Cardiol.*, 17:21-30.
- Hoyle, C., Brown, N.A. and Wolpert, L. (1992). Development of left/right handedness in the chick heart. *Development*. 115:1071-1078.
- Icardo, J. M. (1989a). Changes in endocardial cell morphology during development of endocardial cushions. *Anat. Embryol*, 179: 443-448.

- Icardo, J. M. (1989b). Endocardial cell arrangement: Role of hemodynamics. *Anat. Rec.*, 225: 150-155.
- Itasaki, N., Nakamura, H., Sumida, H., and Yasuda, M., (1991) Actin bundles on the right side in the caudal part of the heart tube play a role on dextro-looping in the embryonic chick heart. *Anat Embryol.* 183:29-39.
- Jones, C. M., Lyons, K. M., and Hogan, B. L. M. (1991). Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development*, 111: 531-542.
- Kern, M.J., Argoa E.A. and Potter. S.S. (1995). Homeobox genes and heard development. *Trends. Cardiology Med.* 5:47-54.
- Kinsella, M. G., and Fitzharris, T. P. (1980). Origin of cushion tissue in the developing chick heart: Cinematographic recordings of in situ formation. *Science*, 207: 1359-1360.
- Kirby, M.L., Gale, T.F. and Stewart, D.E. (1987) Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science.* 220:1059-1061.
- Kitten, G.T., Markwald, R.R. and Bolender, D.L. (1987). Distribution of basement membrane antigens in cryopreserved early embryonic hearts. *Anat. Rec.* 217:379-390.
- Krug EL, Mjaatvedt CH, Markwald RR. 1987. Extracellular matrix from embryonic myocardium elicits an early morphogenetic event in cardiac endothelial differentiation. *Dev Biol* 120:348-355.
- Krug, E. L., Rezaee, M., Isokawa, K., Turner, D. K., Litke, L. L., Wunsch, A. M., Bain, J. L., Riley, D. A., Capehart, A. A., and Markwald, R. R. (1995). Transformation of cardiac endothelium into cushion mesenchyme is dependent upon ES/130: temporal, spa
- Krug, E. L., Runyan, R. R., and Markwald, R. R. (1985a). Protein extracts from early embryonic hearts initiate cardiac endothelial cytodifferentiation. *Dev. Biol.*, 112, 414-426.

- Manasek, F.J. and Monroe, R.G. (1972). Early cardiac morphogenesis is independent of function. *Dev. Biol.* 27:584-588.
- Männer, J., Seidl W., and Steding, G. (1993) Correlation between the embryonic head flexures and cardiac development. An experimental study in chick embryos. *Anat Embryol* 188:269-285
- Männer, J., Seidl, W., and Steding, G. (1995) The role of extracardiac factors in normal and abnormal development of the chick embryo heart cranial flexure and ventral thoracic wall. *Anat Embryol* 191:61-72.
- Markwald, R. R., Fitzharris, T. P., and Adams-Smith, W. N. (1975). Structural analysis of endocardial cytodifferentiation. *Dev. Biol.*, 42:160-180.
- Markwald, R. R., Fitzharris, T. P., and Manasek, F. J. (1977). Structural development of endocardial cushions. *Amer. J. Anat.*, 748:85-120.
- Markwald, R.R., Fitzharris, T.P., and Adams-Smith, W. N. (1975). Structural analysis of endocardial cytodifferentiation. *Dev. Biol.* 42:160-180.
- Martínez-Palomo A. (1970). The surface coats of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 29:29-76.
- McQuinn, T.C. and Schwartz, R.J. (1995). Positive and negative promoter elements regulating  $\alpha$ -smooth muscle actin gene expression in embryonic cardiac myocytes. In *Developmental Mechanism of heart disease*. Clarck, E.B., Markwald, R.R. and Takao, A. (eds). Armonk, N.Y. Futura Pub. p.p. 47-56
- Meyer, D., and Birchmeier, C. (1995). Multiple essential function of neuregulin in development. *Nature*, 378:386-390
- Mitrani, E. and Farberov, A. (1982). Fibronectin expression during the processes leading to axis formation in the chick embryo. *Dev. Biol.* 91:197-201.

- Mjaatvedt, C.H., Krug, E.L., and Markwald, R.R. (1991) An antiserum (ES1) against a particulate form of extracellular matrix blocks the transition of cardiac endothelium into mesenchyme in culture. *Dev Biol.* 145:219-230.
- Mjaatvedt, C.H. and Markwald, R.R. (1989) Induction of an epithelial-mesenchymal transition by an in vivo adheron-like complex. *Dev. Biol.* 136:118-128
- Montgomery, M.O., Litvin, J., Gónzales-Sánchez, A. and Bader, D. (1994) Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes. *Dev. Biol.* 164:63-71.
- Morse, D.E., Rogers, C.S. and McCann, P. S. (1984). Atrial septation in the chick and rat: a review. *Submicrosc. Cytol.* 16:259-272.
- Nakajima, Y., Krug, E. L., and Markwald, R. R. (1994). Myocardial regulation of transforming growth factor- $\beta$  expression by outflow tract endothelium in the early embryonic chick heart. *Dev. Biol.*, 165:615-626.
- Nakatsuj, N. (1984). cell locomotion and contact guidance in amphibian gastrulation. *Amer. Zool.* 24:615-627.
- Netter FH and Van Mierop LHS. 1969. Embryology. In CIBA Collection of Medical Illustrations, (ed. F.H. Netter), CIBA Pharmaceutical Co, New Jersey, Vol. 5, pp. 119-125
- Odgers PNB. 1935. The formation of the venous valves, the foramen secundum and the septum secundum in the human heart. *J Anat* 69:412-425
- Oakley, B. R., Kirsch, D. R., and Morris, R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105:361-363.
- Olson, E. N., and Srivastava, D. (1996). Molecular pathways controlling heart development. *Science* 272: 761-676.

- Osmond, M.K., Butler, A.J. Voon, F.C.T. and Bellairs R. (1991). The effects of Retinoic acid on heart formation in the early chick embryo. *Development* 113:1405-1417.
- Patten, M.B., (1964). *Foundations of embryology*. Chapter 23: The development of the circulatory system. pp 545-572. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Porter, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit  $\alpha$ -globulin and antibodies with crystalline papaine. *Biochem. J.* 73:119-127.
- Potts, J. D., Dagle, J. M., Walder, J. A., Weeks, D. L., and Runyan, R. B. (1991). Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta-3.
- Rawles, M. F. (1943). The heart-forming areas of the early chick blastoderm. *Physiol. Zool.*, 6:22-44.
- Rezaee, M., Isokawa, K., Halligan, N., Markwald, R. R., and Krug, E. L. (1993). Identification of an extracellular 130-KDa protein involved in early cardiac morphogenesis. *J. Biol. Chem.*, 268:14404-14411.
- Romanoff, A.L. (1960). *The avian embryo: Structural and functional development*. New York: The Macmillan Company. pp 681-780.
- Rosenquist, G. C., and De Haan, R. L. (1966). Migration of precardiac cells in the chick embryo: A radioautographic study. *Carnegie Inst. Washington, Contrib. Embryol*, 38:111-121.
- Runyan, R. B., and Markwald, R. R. (1983). Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: A regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue. *Dev. Biol.*, 95: 108-114.
- Runyan, R.B., Potts, J.D., Sharma, R.V., Loeber, C.P., Chiang, J.J. and Bhalla, R.C. (1990). Signal transduction of a tissue interaction during embryonic heart development. *Cell. Reg.* 1:301-313.

- Seichert, V, (1965). Study of the tissue and organ anlage shifts by the method of plastic linear marking. *Folia morphologica* 13:
- Sinning AR. Krug EL. Markwald RR. (1992) Multiple glycoproteins localize to a particulate form of extracellular matrix in regions of the embryonic heart where endothelial cells transform into mesenchyme. *Anat. Re.* 232:285-92.
- Sissman, N.J. (1966). Cell multiplication rates during development of the primitive cardiac tube in the chick embryo. *Nature, Lond.* 210:504-507.
- Stalsberg, H. S. (1969)b. Regional mitotic activity in the precardiac mesoderm and differentiating heart tube in the chick embryo. *Dev. Biol.* 20:18-45.
- Stalsberg, H.S. (1969)a. The origin of heart asymmetry: Right and left contribution to early chick embryo heart. *Dev. Biol.* 19:109-127.
- Steding, G. and Seidl, W. (1980). *Contribution to the development of the heart. Part I: Normal development.*
- Sugi Y. and Lough J. (1995) Activin-a and fgf-2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis *in vitro*. *dev. biol.* 168:567-574.
- Sugi, Y., and Markwald, R. R. (1996). Formation and early morphogenesis of endocardial endothelial precursor cells and the role of endoderm. *Dev. Biol.*, 175: 66-83.
- Toyoshima, Y., Yu, H., Steuer, R. and Sheetz, P. (1992). Kinectin, mayor Kinesin-binding protein on ER. *J. Cell. Biol.* 118:1121-1131
- Thompson, R. and Fitzharris, T.P. (1979). Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: the formation and migration of mesenchymal tissue. *Am. J. Anat.* 154:545-556.
- Tresltad, R. L., Hay, E. D. and Revel, J. P. (1967). Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Develop. Biol.* 16:78-106.

- Van Mierop, L. H. S., Alley R. D., Kausel H. W., and Stranahan, A. (1962). The anatomy and embryology of endocardial cushion defects. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 43: 71-83.
- Van Mierop, L. H. S., and Kutsche, L. M. (1985). Development of the ventricular septum of the heart. *Heart and Vessels*, 1: 114-119.
- Vanroelen, Ch., Vakaet L. and Tries, L. (1980). Localization and characterization of acid mucopolysaccharides in the early chick blastoderm. *J. Embryol. Exp. Morph.* 56:169-175.
- Villavicencio, G. L. (1997). Torsión del tubo cardiaco embrionario y regiones cardiacas primitivas. Tesis profesional de licenciatura en Biología. Facultad de ciencias, UNAM, México.
- Wenning, A.C.G., Gittenber-de Groot, A.C. (1986) Embryology of the mitral valve. *Int J Cardiol* 11:75-84.
- Wessels, A., Markman, M. W. M., Vermeulen, J. L. M., Anderson, R. H., Path, F. R. C., and Moorman, A. F. M. (1995). The development of the atrioventricular junction in the human heart. *Cir. Res.*, 78:110-117.
- Wessels, A., Markman, M. W. M., Vermeulen, J.L.M., Anderson, R.H., Path, F.R.C. and Moorman, A.F.M. (1995). The development of the atrioventricular junction in the human heart. Submitted to *Cir. Res.*
- Wienecke, M. M., Thompson, R. P., and Germroth, P. G. (1995) Asymmetry of the inferior and superior atrioventricular endocardial cushions. In: *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. (Clark E. B., Markwald R. R., and Takao A. eds.) pp. 309-314, Futura,
- Wunsch, A. M., Little, C. D., and Markwald, R. R. (1994). Cardiac endothelial heterogeneity defines valvular development as demonstrated by the diverse expression of JB3, an antigen of the endocardial cushion tissue. *Dev. Biol.* 165, 585-601.

Yost, H.J. (1992). Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix. *Nature*. 357:158-161.

Yu, H., Nicchitta, C. V., Kumar, J., Becker, M., Toyoshima I. and Sheetz. M.P. (1995). Characterization of Kinectin, a kinesin-binding protein: Primary sequence and N-terminal topogenic signal analysis. *Mol. Biol. Cell*. 6:171-183.