

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"LA VALVA MURAL DE LA MITRAL: LA CONTRIBUCION
DE LA PARED LIBRE VENTRICULAR EN SU DESARROLLO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

BIOL. LAURA VILLAVICENCIO GUZMAN

DIRECTOR DE TESIS: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

2000



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“LA VALVA MURAL DE LA MITRAL: LA CONTRIBUCIÓN DE LA
PARED LIBRE VENTRICULAR EN SU DESARROLLO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)**

P R E S E N T A

BIOL. LAURA VILLAVICENCIO GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

COORDIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO ALBERTO MORENO RODRÍGUEZ

LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. HORACIO MERCHANT LARIOS DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNAM Y EL DR. RICARDO ALBERTO MORENO RODRÍGUEZ DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO " FEDERICO GÓMEZ" (S.S.A.). FORMA PARTE DEL CONVENIO DE COLABORACIÓN PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UNA UNIDAD DE ONTOGENIA NORMAL Y PATOLÓGICA FIRMADO CON EL PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD (PUIS-UNAM)

RECIBIÓ APOYO ECONÓMICO DEL CONACYT Y DE LA FUNDACIÓN TELMEX.

AGRADECIMIENTOS

A LOS DOCTORES HORACIO MERCHAN LARIOS
Y RICARDO A. MORENO RODRÍGUEZ POR LA
ATENCIÓN Y TIEMPO PRESTADOS DURANTE LA
DIRECCIÓN DE ESTA TESIS.

A LOS DOCTORES GERARDO HEBERT VAZQUEZ
NIN, MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO, NORMA
ANGELICA MORENO MENDOZA, MARIA DEL
CARMEN URIBE ARANZABAL Y LUIS FELIPE
JIMENEZ GARCÍA, MIEMBROS DEL COMITÉ
TUTORIAL Y JURADO, POR LA REVISIÓN DE LA
PRESENTE TESIS Y SUS SUGERENCIAS.

**AGRADEZCO A LA Q.F.B. MARCELA SALAZAR
GARCÍA POR SUS CONSEJOS Y EL APOYO
MORAL Y TECNICO QUE ME BRINDÓ PARA LA
REALIZACIÓN DE ESTA TESIS**

**A LA BIOLOGA LETICIA REYES ANGELES POR SU
PACIENCIA Y ORIENTACIÓN ACADÉMICA
DURANTE TODA LA MAESTRÍA**

**AL TÉCNICO JOSÉ GPE. BALTAZAR POR SU
APOYO Y ADIESTRAMIENTO EN LAS TÉCNICAS
DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE
TRANSMISIÓN**

**A SERGIO A. MAVIL CORTÉS Y MARIO JAUREGUI
POR EL TRABAJO FOTOGRÁFICO DE LA
PRESENTE TESIS**

A MIS SOBRINOS

**JAZMÍN LAURA Y MARISOL ÁLVAREZ
VILLAVICENCIO,
ROCÍO DE GUADALUPE Y BERENICE
VILLAVICENCIO MARES,
MARCO ANTONIO Y SAMANTA VILLAVICENCIO
GARCÍA Y A
NOHEMI Y NAYELLI VILLAVICENCIO DIAZ**

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS

**NORMA ANGÉLICA MORENO, ALEJANDRO
MARMOLEJO, LEDA JIMÉNEZ, JOSÉ GPE.
BALTAZAR, NAYELLI NAJERA Y FRANCISCO
JIMÉNEZ DEL INSTITUTO DE BIOMÉDICAS DE LA
UNAM.**

Y

**SERGIO MAVIL CORTÉS, LETICIA REYES
ANGELES, MARCELA SALAZAR GARCÍA, LIDIA
BLANCAS, ADRIANA VALENCIA, CONCEPCIÓN
SÁNCHEZ, ALEJANDRA CONTRERAS, MIGUEL
ANGEL MUNGUÍA Y CARMEN M. AHUMADA DEL
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO
GÓMEZ"**

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Anatomía e histología de las válvulas atrioventriculares	4
2.2 Desarrollo embrionario de las válvulas atrioventriculares	6
3. ANTECEDENTES	9
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
6. OBJETIVOS	14
7. MATERIAL Y MÉTODO	15
7.1 Obtención y procesamiento de tejidos	15
7.2. Microscopía fotónica de alta resolución	16
7.3. Microscopía electrónica de transmisión	16
8. RESULTADOS	17
8.1 Microscopía fotónica de alta resolución	17
8.2 Microscopía electrónica de transmisión	19
9. RESUMEN DE RESULTADOS	39
10. DISCUSIÓN	41
11. CONCLUSIONES	48
12. BIBLIOGRAFÍA	50
13. APÉNDICE	56

1. RESUMEN

Existen diversas propuestas sobre el origen y desarrollo del aparato valvular atrioventricular (AV), de las cuales las más aceptadas son dos. La primera señala que los cojines endocárdicos atrioventriculares superior e inferior contribuyen en la formación de las valvas y la segunda propone que las valvas AV y su aparato tensor se originan del miocardio de la pared libre ventricular. Por técnicas de marcaje "in vivo" con gelatina-tinta china, en corazón de embrión de pollo, se demostró que los cojines endocárdicos inferior y superior, contribuyen en la formación de las valvas septales de ambas válvulas AV (de la Cruz et al., 1983 y García-Peláez et al., 1984) y por técnicas de inmunohistoquímica se observó que la pared libre ventricular también contribuye en el desarrollo de estas estructuras (Lamers et al., 1995). Sin embargo, se sabe poco sobre la contribución de los cojines laterales y el origen del aparato tensor de las valvas AV. En el presente estudio suponemos que las valvas murales AV y su aparato tensor poseen un origen embrionario mixto, los cojines laterales AV dan origen a las valvas murales y la pared libre ventricular contribuye en la formación de las cuerdas tendinosas y músculos papilares. Con el objeto de estudiar la contribución de la pared libre del ventrículo izquierdo en el desarrollo de la valva, cuerdas tendinosas y músculo papilar de la valva posterior o mural de la mitral, en el corazón de embrión de pollo, se realizaron observaciones en microscopía electrónica de transmisión (MET). El área estudiada fue la capa subendocárdica de la pared libre ventricular, adyacente al cojín lateral izquierdo. Este estudio se llevó a cabo en diferentes estadios del desarrollo embrionario, desde que inicia el desarrollo el cojín lateral izquierdo, hasta el corazón maduro.

Observamos que la formación de la valva mural de la válvula mitral y su aparato tensor comienza con el desarrollo del cojín lateral izquierdo y con el proceso de delaminación de la pared libre ventricular, este último proceso da origen a la formación de una capa subendocárdica y a otra subepicárdica. El proceso de delaminación se inicia en el estadio 21 (Hamburger and Hamilton,

1951) (HH). En este estudio se observó que la delaminación de ambas capas es el resultado de una invasión de células endoteliales procedentes de la luz del corazón, durante esta invasión se abren gran cantidad de espacios que coalescen entre sí y separan las dos capas. La capa subendocárdica siempre participó en la formación del velo mural y su aparato tensor. Al final del desarrollo la capa subendocárdica presentó en su porción cefálica, una gruesa capa de fibroblastos embebidos en grandes haces de fibras de colágena. En la región media, correspondiente a la cuerda tendinosa, el tejido conectivo se encontró entretejido con un estrato de células musculares, aunado a esto se observaron células de transición con características de fibroblastos y con miofibrillas. En la porción caudal del aparato tensor se localizó el músculo papilar formado por un gran empaquetamiento de células de miocardio procedentes de la región apical trabeculada del ventrículo izquierdo. Por lo tanto, el cojín endocárdico lateral izquierdo participa en la formación de la porción atrial de la valva mural de la válvula mitral, mientras que la capa subendocárdica de la pared libre del ventrículo izquierdo contribuye en el desarrollo de sus cuerdas tendinosas y su músculo papilar. Este último evento atraviesa por diferentes procesos de citodiferenciación entre los que se pueden considerar la transdiferenciación y la apoptosis.

2. INTRODUCCIÓN

El corazón de aves y mamíferos está constituido por cuatro cámaras, dos aurículas y dos ventrículos, cada ventrículo está conformado por tres segmentos, su cámara de entrada, su porción apical trabeculada y su tracto de salida (Goord and Lillehei, 1975).

Las cámaras de entrada ventriculares se caracterizan por la presencia del aparato valvular atrioventricular (AV). Los límites atriales de las cámaras de entrada ventriculares son, el anillo de la válvula atrioventricular derecha en el ventrículo derecho y el anillo de la válvula atrioventricular izquierda en el ventrículo izquierdo. El límite caudal de ambas cámaras de entrada ventriculares en la región apical trabeculada de los ventrículos es la base de los músculos papilares. Un límite más preciso en el ventrículo izquierdo se ubica entre la porción lisa ventricular (cámara de entrada ventricular) y la región trabeculada (de la Cruz and Markwald, 1998).

En el humano la válvula AV derecha se denomina tricúspide por presentar tres valvas (la anterior o mayor, la septal o medial y la posterior, menor o mural), mientras que la válvula AV izquierda se denomina mitral, esta última consta de dos valvas (la anteroseptal o aórtica y la posterolateral o mural). En el pollo existe una valva AV derecha que no es una tricúspide característica porque varía la morfología y la constitución histológica de sus valvas (Cayré et al., 1993) y también existe una valva AV izquierda muy parecida a la mitral del hombre (Ranganathan et al., 1970).

La función de las válvulas en el sistema circulatorio de los vertebrados es evitar el reflujo de la sangre, asegurando la conducción del líquido sanguíneo en una dirección. En el corazón de aves y mamíferos existen dos válvulas AV que permiten el paso de la sangre de las aurículas a los ventrículos. Ambas válvulas se abren de manera alterna durante el proceso conocido como diástole (Netter, 1993), de esta manera, los ventrículos correspondientes se llenan de sangre en cada contracción. Durante la sístole los ventrículos se contraen y las válvulas AV se cierran soportando toda la presión que se genera dentro del ventrículo, en este

momento se abren otro tipo de válvulas las sigmoideas o semilunares de las grandes arterias (Aorta y Pulmonar) (Candell et al., 1985). Las sigmoideas aórticas permiten que la sangre impulsada desde el ventrículo izquierdo pase a todo el organismo mientras que la válvula de la arteria pulmonar permite el paso de la sangre del ventrículo derecho a los pulmones para ser oxigenada. A su vez, la sangre que pierde oxígeno a través de su paso por el cuerpo es conducida a la aurícula derecha, mientras que la recién oxigenada se conduce de los pulmones a la aurícula izquierda. Al disminuir la presión en los ventrículos, las válvulas de las grandes arterias se cierran y las válvulas AV se vuelven a abrir cediendo el paso de la sangre de las aurículas a los ventrículos, completando así un ciclo de recorrido (Candell et al., 1985). Como el corazón está compuesto de dos circuitos sanguíneos aislados con su correspondiente atrio, aparato valvular AV y ventrículo, se dice que el corazón funciona como si fuera una doble bomba.

2.1 Anatomía e histología de las válvulas atrioventriculares

Las válvulas AV están constituidas por cuatro componentes: a) El anillo fibroso, b) las valvas o velos valvulares, c) las cuerdas tendinosas y d) los músculos papilares, estos dos últimos componentes constituyen el aparato tensor del aparato valvular AV (Netter., 1993).

a) Anillo fibroso valvular, existe uno en cada válvula (tricúspide y mitral) y se localizan en la unión o canal atrioventricular. Cada anillo fibroso corresponde en la superficie exterior a los surcos AV. La función que tienen los anillos fibrosos es el soporte del aparato valvular AV, estos anillos están formados por diversas capas de tejido de fibras de colágena.

b) En general, las valvas están constituidas por un centro de haces de fibras de colágena cubiertas por endocardio en ambas caras, una que da hacia el atrio y otra hacia las paredes ventriculares. En las valvas de ambas válvulas AV se pueden reconocer dos capas: La capa esponjosa hacia su lado atrial formada por una red laxa de fibras delgadas de colágena sin ninguna orientación aparente y la capa fibrosa que se encuentra hacia el lado ventricular formada por haces de

colágena que se asocian en capas de forma ondulada. La organización de estos haces es diferente en cada valva (Icardo and Colvee, 1995). La válvula AV derecha (Cayré et al., 1993) en el corazón de pollo está constituida por un conjunto de microvalvas septales que hacen la función de la valva septal de la tricúspide humana y una gran valva mural que por su músculo papilar puede ser dividida en dos valvas, una anterolateral y otra posteromedial o mural (Cayré et al., 1993), esta gran valva mural es muscular. En el corazón de pollo la válvula mitral está constituida por una valva anteroseptal que se divide en dos partes, una que se inserta en el septo interventricular y una porción libre que constituye la continuidad mitroaórtica (Ranganathan et al., 1970) y una valva posterolateral o mural, sus velos presentan un centro de haces de colágena revestidos de endotelio como se verá en el presente trabajo, de manera similar a como se observa en el humano.

c) Las cuerdas tendinosas, unen a las valvas AV con los músculos papilares y se clasifican de acuerdo a la posición en que se insertan en las valvas AV (Morse et al., 1984): De primer orden, las que se unen a la línea de cierre de las cúspides. De segundo orden las que se insertan en la cúspide de las valvas, a pocos milímetros de la línea de cierre sobre el lado ventricular. De tercer orden las que se extienden desde los músculos papilares hasta la pared ventricular. Las cuerdas están constituidas por haces de colágena cubiertos de endotelio. En secciones histológicas, en la unión entre las cuerdas y los músculos papilares, se observan miocitos intercalados entre las capas de tejido conectivo. En el humano, las cuerdas tendinosas de la válvula tricúspide son de menor grosor que las de la mitral.

d. Los músculos papilares. En el corazón de pollo, el ventrículo derecho tiene dos grupos de músculos papilares incipientes y el ventrículo izquierdo dos grupos de músculos papilares muy desarrollados, uno anterior y el otro posterior (de la Cruz et al., 1972). En el humano, la válvula tricúspide posee dos músculos papilares, uno medio y otro anterior, y en ocasiones se observa uno posterior o uno medial. El músculo papilar anterior se une a través de sus cuerdas con las cúspides

anterior y mural, mientras que el músculo papilar medio se conecta a partir de sus cuerdas tendinosas con las cúspides anterior y septal de la tricúspide. Los músculos papilares posterior y medial cuando existen, se unen por medio de sus cuerdas a las valvas mural y septal. En lo referente a la válvula mitral del humano, existe un par de músculos papilares bien desarrollados, uno anterolateral y otro posteromedial situados por debajo de las comisuras del mismo nombre. En lo concerniente a la histología, en el ratón se ha reportado que las células miocárdicas de los músculos papilares de la válvula tricúspide son elongadas y presentan extremos en forma cónica, las fibras de colágena se unen a la superficie de estos miocitos (Icardo and Colvee, 1995). En el pollo los músculos papilares se describen como paquetes de células musculares provenientes de la pared libre ventricular.

2.2 Desarrollo embrionario de las válvulas atrioventriculares

El inicio del desarrollo de los aparatos valvulares se considera con la incorporación de nuevos segmentos al tubo cardiaco recto, de manera simultánea con el proceso de torsión de este tubo. La primera etapa de la torsión cardiaca se denomina "asa en C" por la forma que asume el tubo cardiaco, en el embrión de pollo, corresponde a los estadios de desarrollo 11-12 (Hamburger and Hamilton, 1954) (HH). El corazón en asa en forma de "C" consta de dos ramas, en la rama cefálica están presentes el cono y el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo derecho y en la rama caudal se encuentran en su posición más cefálica el primordio de la porción apical trabeculada del ventrículo izquierdo, seguida por el primordio de las cámaras de entrada ventriculares de reciente incorporación y los atrios primitivos. En lo que respecta al primordio de las cámaras de entrada ventriculares su límite caudal está demarcado por el surco atrioventricular derecho y cefálicamente limita con el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo derecho aunque morfológicamente no existe un punto que demarque este límite cefálico (de La Cruz et al., 1989). De la Cruz et al. (1987, 1989), demostraron por experimentos de marcaje "in vivo" que el aparato valvular AV se

desarrolla a partir del segmento denominado primordio de las cámaras de entrada ventriculares, este segmento está constituido por miocardio y endocardio y entre ambos tejidos se encuentra matriz extracelular. Posteriormente, con el proceso de "Torsión del tubo cardíaco", en el estadio 16 HH, el primordio de las cámaras de entrada ocupa una posición dorso-ventral, cefálica al primordio de la porción apical trabeculada del ventrículo izquierdo y caudal a ambos atrios, derecho e izquierdo (Villavicencio, L. 1997).

Una vez que el primordio de las cámaras de entrada ventriculares ocupa su posición espacial definitiva, de acuerdo a la posición que ocupa en el corazón maduro, comienza el proceso de "Septación cardíaca" (estadio 17 HH), en este momento el primordio de las cámaras de entrada comienza a dividirse con el desarrollo de un par de estructuras abultadas que se desarrollan hacia la luz del tubo cardíaco, los cojines endocárdicos superior ó ventral y el inferior ó dorsal (de la Cruz and Markwald, 1998), estos cojines están constituidos por miocardio, endocardio y abundante matriz extracelular que gradualmente es invadida por células de mesénquima de origen endocárdico (Markwald et al., 1977; Krug et al., 1987). Los cojines endocárdicos superior e inferior se localizan en el canal AV y se extienden muy poco en una pequeña zona adyacente de la pared atrial y ocupan prácticamente dos tercios de la cavidad ventricular (estadio 18 HH) (Moreno-Rodríguez et al., 1997). En estadios más tardíos los cojines endocárdicos superior e inferior, se fusionan dando origen a dos cámaras de entrada, una derecha y otra izquierda (estadio 26 HH) (de la Cruz and Markwald, 1998). En la primera se desarrollará la válvula tricúspide y en la izquierda la mitral. Previo al evento de fusión de ambos cojines endocárdicos se desarrollan otro par de cojines, los denominados cojines endocárdicos laterales (o murales) derecho e izquierdo (estadio 24 HH), que se han estudiado poco. Los cojines laterales derecho e izquierdo, se observan bien desarrollados en el estadio 26 HH (de la Cruz et al., 1972 y de la Cruz and Markwald, 1998) mismos que se localizan en las inmediaciones de los surcos AV derecho e izquierdo respectivamente, a ambos lados de los cojines endocárdicos superior e inferior. Patten, en 1964,

describe los cojines laterales como gruesas capas que se proyectan hacia la cavidad ventricular, constituidos de tejido conectivo, similar al tejido de los cojines superior e inferior del canal AV y que posteriormente se diferenciaran en parte del aparato valvular AV.

3. ANTECEDENTES

Sobre el origen y desarrollo embrionario del aparato valvular AV, existen en la actualidad cuatro propuestas que surgen de los resultados obtenidos por diferente abordaje experimental.

La primer propuesta es la de Oosthoek et al. (1997), quienes señalan que tanto las valvas AV como las cuerdas tendinosas derivan de los cojines endocárdicos, este estudio se realizó con técnicas de inmunohistoquímica y marcaje "in vivo" con gelatina-tinta china e indica que el tejido de cojín entre los huecos de miocardio da origen a las cuerdas tendinosas. La segunda propuesta considera que el miocardio da origen a las valvas AV y a su aparato tensor y que la contribución de los cojines endocárdicos es prácticamente nula. Estos estudios son básicamente descriptivos (Van Mierop and Gessner, 1972; Van Mierop et al., 1977; Mandarin, 1991). Mandarin (1991) realizó una evaluación cuantitativa de tejido de cojín y miocardio con el que descarta la participación de los cojines en el desarrollo de los aparatos valvulares AV. Morse en 1984 señala que las cuerdas tendinosas se originan de tejido muscular de la pared libre ventricular a partir de un proceso de transdiferenciación. La tercera propuesta sugiere que las valvas AV se derivan del tejido del sulcus AV (tejido epicárdico) que penetra e invade por el canal AV para dar origen a las valvas, y que un proceso adicional de "delaminación" de la pared miocárdica da origen al aparato tensor. Los trabajos que apoyan esta hipótesis son de tipo morfológicos (Wenink and Gittenberger-de Groot, 1982, 1986a, Wenink et al., 1986b, Wenink, 1992; Wenink et al., 1994). La cuarta propuesta y la más aceptada sugiere que los cojines endocárdicos superior e inferior así como los laterales, participan en la formación de las valvas AV, la mayor parte de estos trabajos se apoyan en estudios morfológicos y entre sus principales seguidores se encuentran: Odgers, 1939, Van Mierop et al., 1962, Patten, 1964; Ugarte et al., 1976; Van Gils, 1979; Chin et al., 1992, Lamers et al., 1995 y Wessels et al., 1996. Chin et al., en 1992, proponen que el tejido de cojín participa en la formación de la mayor parte de las valvas, mientras que su base se deriva del músculo cardíaco por un proceso de "desdiferenciación". Lamers et

al. (1995) y Wessels et al. (1996) mediante el empleo de técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para tejido de cojín (endotelio, mesénquima y miocardio) sugieren que los cojines y el miocardio adyacente contribuyen al desarrollo del aparato valvular.

Por experimentos de marcaje "in vivo" en embrión de pollo, de la Cruz et al., en 1983 mostraron que el cojín endocárdico inferior del canal AV, participa en la septación del corazón y contribuye en la formación de la región basal de la valva anteroseptal de la válvula mitral y en la formación de las microvalvas septales del aparato atrioventricular derecho. También por técnicas de marcaje "in vivo" se demostró que el cojín AV superior participa formando la continuidad mitro-aórtica de la valva septal de la mitral (García-Peláez et al., 1984), en este sentido se desconoce lo que ocurre con las valvas posterolaterales (murales) y la valva anterior de la tricúspide.

A continuación se enumeran las propuestas existentes sobre el desarrollo embrionario de las valvas atrioventriculares y su aparato tensor:

- 1) Tanto las valvas como las cuerdas tendinosas se originan de los cojines endocárdicos (Oosthoek et al., 1997).
- 2) El Aparato valvular AV se origina por un proceso de delaminación de la pared ventricular (Van Mierop and Gessner, 1972; Van Mierop et al., 1977; Mandarim, 1991).
- 3) El desarrollo de las valvas AV se realiza por un proceso de invasión del tejido del sulcus AV (epicardio), que penetra y se proyecta hacia la luz del corazón, mientras que el aparato tensor se origina por delaminación de la pared libre ventricular (Wenink and Gittenberger-de Groot, 1982, 1986a, Wenink et al., 1986b, Wenink, 1992; Wenink et al., 1994).
- 4) Las valvas AV se desarrollan a partir de los cojines endocárdicos AV mientras que su aparato tensor se origina del miocardio por un proceso de delaminación. (Odgers, 1939; Van Mierop et al., 1962, Patten, 1964; Ugarte et al., 1976; Van Gils, 1979; Chin et al., 1992; Lamers et al., 1995 y Weels et al., 1996).

4. JUSTIFICACIÓN

El interés de investigar el origen y desarrollo de los aparatos valvulares AV radica en que la mayor parte de las cardiopatías congénitas se presentan en el canal AV involucrando a las válvulas atrioventriculares. El conocer los procesos básicos del desarrollo así como las interacciones celulares que se presentan durante el desarrollo embrionario normal y anormal de los aparatos valvulares AV, nos permitirá conocer el origen de las malformaciones cardiacas, referidas como "cardiopatías congénitas del canal AV".

Pese a la gran cantidad de estudios realizados hasta el momento, tanto de embriología descriptiva con estudios postmortem como de embriología experimental y tatuaje "in vivo" con gelatina-tinta china, no ha sido posible demostrar cual es el proceso de formación de las valvas AV y de su aparato tensor. Así se desconocen los procesos celulares y moleculares involucrados en la delaminación de la pared ventricular, su participación en la formación de los velos, cuerdas y músculos papilares y cómo contribuyen los diferentes tipos celulares de la pared libre ventricular en el desarrollo de las valvas y sus aparatos tensores.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los datos presentados por Patten (1964) y en nuestras observaciones iniciales (Fig. 1), encontramos en la pared libre ventricular, caudal al cojín lateral izquierdo, la presencia de múltiples espacios (Fig. 1A,B). Conforme avanza el desarrollo embrionario, en la región donde se localizaran las valvas AV, los espacios en la pared libre ventricular se hacen más grandes y finalmente parecen dividirla en dos capas, una subepicárdica y otra subendocárdica (Fig. 1C), esta última posiblemente esté implicada en el desarrollo de la valva mural de la mitral y de su aparato tensor (Fig. 1D). De este hecho desconocemos: a) La contribución de la pared libre ventricular en el desarrollo del aparato valvular AV, b) si la capa subendocárdica de la pared libre ventricular participa en el desarrollo de parte de la valva mural de la válvula mitral, sus cuerdas tendinosas y su músculo papilar, c) si estos espacios son espacios intercelulares o espacios delimitados por epitelio, en este último caso si este epitelio se origina "in situ" o proviene de otro lugar, d) si estos espacios coalescen dando por resultado la separación de la pared libre del ventrículo izquierdo en dos capas, e) los procesos de desarrollo que están implicados en su coalescencia, f) los procesos celulares implicados en la diferenciación de las valvas AV, así como de su aparato tensor.

En el presente trabajo planteamos para el caso de la valva mural de la mitral y su aparato tensor, un origen mixto (cuarta propuesta presentada en los antecedentes). Proponemos que el cojín lateral contribuye en la formación de la parte atrial del velo mural y la pared libre del ventrículo izquierdo por un proceso de delaminación participa en la porción ventricular de la valva mural y su aparato tensor.

Se eligió trabajar con el corazón de embrión de pollo como modelo experimental por las ventajas técnicas que ofrece este modelo biológico; fácil adquisición, rápido desarrollo, resistente a contaminación y por permitir disponer de lotes grandes. De las valvas AV se decidió trabajar con la valva mural de la mitral porque la zona en que se desarrolla no está en relación de proximidad con

otras estructuras en desarrollo, como sucede con la valva mural del aparato valvular derecho, este último se relaciona con el tracto de salida del ventrículo izquierdo por su cercanía con la cresta sinistroventral del cono, con el pliegue ventrículo infundibular, y con la cresta supraventricular del ventrículo derecho.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Contribuir al esclarecimiento de la participación de la pared libre del ventrículo izquierdo en el desarrollo embrionario del aparato valvular mitral, en el corazón del embrión de pollo.

6.2 Objetivos particulares

1. Conocer el estadio del desarrollo embrionario en el que se originan los espacios relacionados con el proceso de delaminación de la pared libre del ventrículo izquierdo, durante el desarrollo del aparato valvular AV izquierdo.
2. Determinar si los espacios que participan en la delaminación son espacios intercelulares o cavidades con recubrimiento epitelial.
3. Caracterizar el proceso de delaminación de la capa subendocárdica de la pared libre del ventrículo izquierdo durante el desarrollo de la valva mural de la válvula mitral, sus cuerdas tendinosas y su músculo papilar.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Los estadios de desarrollo del embrión de pollo se establecieron con base en la nomenclatura de Hamburger and Hamilton (1954) que establece una relación entre la morfología del embrión y el tiempo de incubación.

Se adquirieron huevos fértiles de *Gallus domesticus* de la raza Plymouth rock, éstos se incubaron en una incubadora de tipo gabinete, con volteo automático cada hora. La temperatura de incubación fue de 37-38 °C y la humedad se mantuvo a saturación. El tiempo de incubación vario dependiendo del estadio a estudiar.

El número de embriones empleado por estadio estudiado fue de cinco, se eligieron solo embriones con desarrollo normal. Para cumplir el primer objetivo se trabajó con estadios del 21 al 26 HH, etapas en que da inicio el desarrollo de los cojines endocárdicos laterales. Para cubrir los otros dos objetivos se trabajó con los estadios 27 (inicio de la delaminación) al 42 HH (formación del velo y su aparato tensor).

7.1 Obtención y procesamiento de tejidos

Todos los corazones de embrión de pollo en los estadios utilizados, se fijaron por perfusión vía seno-venoso con una solución de Karnosky modificada (ver apéndice), en amortiguador de cacodilato al 0.16M (pH 7.2). Los corazones se fijaron antes de extraerlos de la cavidad torácica, posteriormente se colocaron en una caja de petri para ser disecados y obtener el ventrículo izquierdo, evitando dañar el área de desarrollo del velo mural de la válvula mitral. Para lo anterior, se realizó un corte transversal del corazón ligeramente cefálico a los anillos fibrosos AV y se retiraron las aurículas, posteriormente se realizó un segundo corte sagital al corazón, pasando por el septo interventricular para separar ambos ventrículos, de esta manera se obtuvo sólo el ventrículo izquierdo que se continuó fijando por una hora a 6°C. El material biológico se procesó para ser incluido en resina epóxica (ver apéndice).

7.2 Microscopía fotónica de alta resolución

Con el fin de conocer el estadio del desarrollo en que aparecen los espacios involucrados en la separación de las capas de la pared libre ventricular, adyacente al cojín lateral izquierdo y determinar si estos espacios presentan endotelio o no, un grupo de embriones de los estadios 21 al 26 HH se procesó para ser incluidos en epón (ver apéndice), posteriormente se delimitó el área a estudiar tallando una pirámide sobre el epón polimerizado y se realizaron cortes semifinos (1-3 μm de grosor). Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo marca RMC con cuchilla de diamante, se tiñeron por flotación con azul de toluidina, se observaron en un microscopio óptico Olympus y se fotografiaron.

Por otra parte, para estudiar la participación de la pared libre del ventrículo izquierdo en el desarrollo de la valva mural de la válvula mitral, también se procedió a incluir el material biológico, correspondiente a los estadios del 27 al 42 HH, en epón y obtener cortes semifinos para observarlos en microscopía de luz de alta resolución.

7.3 Microscopía Electrónica de Transmisión

Posteriormente se procedió a estudiar con microscopía electrónica de transmisión (MET), la ultraestructura de los tipos celulares presentes en la capa subendocárdica adyacente al cojín lateral izquierdo. Los estadios seleccionados fueron 21, 24, 26, 28, 30, 32, 34 y 42 HH. Los cortes semifinos sirvieron como referencia para poder hacer una delimitación más precisa del área de interés, sobre los bloques de epón que contenían las muestras. La delimitación se realizó tallando una segunda pirámide sobre la existente. En esta nueva pirámide se realizaron cortes finos entre 60 a 90 nm de grosor aproximadamente, estos cortes se procesaron para ser observados en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (ver apéndice).

8. RESULTADOS

Se presentan los cortes semifinos y finos de los estadios 21 al 42, divididos en dos grupos. El primer grupo de cortes corresponde a los estadios 21 al 26 HH (Fig. 2), del desarrollo del cojín lateral izquierdo y comienzo del proceso de delaminación de la pared ventricular izquierda. El segundo grupo incluye los cortes semifinos de los estadios seleccionados para ser observados en el MET los que se encuentran entre el estadio 27 al 42 HH.

8.1 Microscopía fotónica de alta resolución

-Estadios 21-22 HH (Fig. 2A,B), en la pared libre ventricular adyacente al surco AV izquierdo, se observó una delgada capa de células de miocardio, posiblemente bilaminar, sin detectarse células endoteliales en su interior. Se encontró que en estos estadios se inicia el desarrollo del cojín lateral izquierdo, éste se observa como un delgado engrosamiento de matriz extracelular entre la capa de tejido endocárdico hacia la luz del corazón y la de miocardio. El cojín lateral izquierdo se extiende desde la región AV hasta la región caudal del ventrículo izquierdo. En la capa de miocardio adyacente a la región caudal del cojín lateral se observa la formación de una pequeña muesca hacia su capa endotelial.

-Estadios 23-24 HH (Fig. 2C,D). En estos estadios se observó un mayor grosor de la pared libre ventricular, con algunos espacios en la región caudal contigua al cojín lateral izquierdo cubiertos por endotelio. El cojín lateral izquierdo se vio ligeramente más grande que en los estadios anteriores y ya hay células de mesénquima embebidas en la matriz extracelular. En 24 HH las células de mesénquima se encuentran en mayor cantidad. En la región caudal del cojín lateral izquierdo del canal AV, en su unión con la región apical trabeculada del ventrículo izquierdo, se observó una zona de invaginación (Fig. 2C,D).

- Estadios 25-26 HH (Fig. 2E,F). En la pared libre del ventrículo izquierdo, adyacente a la región caudal del cojín lateral izquierdo en su porción caudal, prácticamente toda la capa de miocardio está invadida por células endoteliales,

cubriendo la mayoría de los espacios intercelulares de esta pared (Fig. 2f). El cojín lateral izquierdo presentó un mayor volumen y en su matriz extracelular se presentó una gran cantidad de células de mesénquima.

Los estadios 27HH al 42HH proporcionaron la siguiente información:

- Estadio 27 HH (Fig. 3A). La pared libre ventricular en la región limítrofe al surco AV izquierdo se presenta dividida en dos capas, una subepicárdica y una subendocárdica, esta última en estrecha relación de vecindad con el cojín lateral izquierdo.

- Estadio 30 HH (Fig. 3B). En la zona del canal AV prácticamente se ha perdido la continuidad de la capa de miocardio entre el atrio izquierdo y el ventrículo izquierdo y se observa una entremezcla entre células epiteliales y de mesénquima. En la zona caudal del cojín lateral izquierdo se presenta una zona de transición con la presencia de los anteriores tipos celulares y algunas células de miocardio. El cojín lateral izquierdo se observa concentrado más hacia el canal AV, con poca extensión a la región apical trabeculada del ventrículo izquierdo (Fig. 3B).

- Estadio 32 HH (Fig. 3C). El cojín lateral izquierdo se encuentra muy desarrollado y muy próximo a los cojines endocárdicos superior e inferior. En la región caudal de este cojín se observa la separación de la pared ventricular en dos capas, quedando la capa de miocardio subendocárdica colindante con la porción caudal del cojín lateral izquierdo. Los espacios que separan ambas capas de miocardio se encuentran recubiertos por endocardio y en su interior se observaron eritrocitos.

- Estadio 34 HH (Fig. 3D). La capa subepicárdica de la pared libre ventricular se observa muy compacta y estratificada, ésta se encuentra separada de la capa subendocárdica por espacios recubiertos de endotelio. A su vez, la capa subendocárdica se encuentra adyacente a la región caudal de éste. En la región caudal del cojín (Fig. 3D), se observa una zona de transición entre células de mesénquima y células musculares que se eligió para ser observada en el MET.

- Estadio 42 HH (Fig. 3E). La pared libre ventricular colindante con la parte caudal

del cojín lateral izquierdo, se divide en dos capas una subepicárdica y una subendocárdica a consecuencia de la apertura de un gran espacio. La capa subendocárdica se encuentra participando en el desarrollo de la valva mural y su aparato tensor, esta valva esta prácticamente formada. La zona seleccionada para observar en el MET fue la caudal al velo mural en su unión con la cuerda tendinosa.

8.2 Microscopía electrónica de transmisión

Al realizar las observaciones en MET de los cortes de corazón de pollo en la zona de pared libre del ventrículo izquierdo, adyacente a la parte caudal del cojín lateral izquierdo, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Estadio 21 HH. En el MET la pared libre del ventrículo izquierdo contigua a la región en donde se desarrollará el cojín lateral izquierdo, se encuentra constituida por una pared exclusivamente de células de miocardio y en la superficie que da hacia la luz del corazón por una capa unilaminar de células de endotelio que se caracterizan por presentar una forma aplanada y con grandes núcleos (Fig. 4A). Las células endoteliales se encuentran unidas entre sí por desmosomas y emiten procesos celulares que semejan filopodios (Fig. 4B), las células musculares subyacentes tienen formas irregulares (Fig. 4A), en su citoplasma se observan miofibrillas organizadas en largos haces con diversas orientaciones (Fig. 4A,B), hay gran cantidad de glucógeno, ribosomas libres y abundantes mitocondrias. Las células de miocardio establecen contacto entre sí por medio de uniones desmosómicas (Fig. 4B). En el interior de la pared de miocardio no se observa la presencia de células endoteliales. Por otra parte, al observar en MET la región de la hendidura en la capa de endotelio de la porción caudal del cojín lateral izquierdo (Fig. 5A), encontramos una zona de invasión en que las células endoteliales se comienzan a invaginar sobre la capa de miocardio (Fig. 5A), estas células endoteliales de carácter invasor son conocidas como células de punta y van separando el tejido de miocardio por la emisión de múltiples procesos citoplasmáticos de tipo filopodios (Fig. 5A,B). La capa de endotelio que se

invagina va dejando en su parte posterior una luz delimitada por células endoteliales (Fig. 5A). Los procesos celulares que emiten las células endoteliales están muy próximos a las células de miocardio con las que prácticamente establecen contacto (Fig. 5B). También se observó que las células endoteliales de punta presentan mitosis (Fig. 5A,B), al igual que las células de miocardio (Fig. 5A,C).

- En el estadio 24 HH, la zona de estudio presenta hacia la luz del corazón un endotelio poco estratificado, con células mesenquimatosas de origen endotelial desprendiéndose y penetrando en la matriz extracelular. La pared endotelial se encuentra separada de la pared de miocardio por una abundante matriz extracelular (Fig. 6). Por su parte, la región de miocardio está delimitada por una lámina basal bien definida que se distribuye a lo largo de la capa de miocardio.

- En el estadio 26 HH (Fig. 7), observamos en la zona de estudio una gran invasión de células endoteliales al miocardio (Fig. 7), en este estadio existen grandes espacios que presentan formas tubulares y delimitados por endotelio. Las células endoteliales se encuentran en estrecha proximidad a las células de miocardio a partir de procesos citoplasmáticos tipo filopodio (Fig. 7). Se pueden ver células de miocardio que se encuentran como empaquetamientos celulares rodeados de endotelio.

Por otra parte, para estudiar la contribución de la capa subendocárdica en el desarrollo de la valva mural de la mitral y su aparato tensor, se realizaron cortes semifinos de diferentes estadios entre el 27 al 42 HH, que posteriormente fueron vistos en el MET. A continuación se describen las observaciones realizadas en los diferentes estadios de desarrollo seleccionados.

- Estadio 27 HH. Se eligió el estadio 27 HH por presentar un esbozo más claro de las capas subendotelial y subepicárdica de la pared libre ventricular, adyacente al cojín lateral izquierdo del canal AV (Fig. 3A). Se encontró que en la zona de estudio hay abundantes células embebidas en la matriz extracelular, estas células son de tres tipos: endoteliales, mesenquimatosas y musculares (Fig. 8). Las células endoteliales que delimitan la luz del corazón mantienen sus

características fenotípicas comunes y se encuentran estableciendo contacto con células de mesénquima (Fig. 9A). Las células de mesénquima, presentan formas irregulares y su retículo endoplásmico no está muy organizado (Fig. 8 y 9A,B), éstas llegan a establecer contacto con células de miocardio (Fig. 8 y 9B) que invaden la matriz extracelular. Las células de miocardio se localizan muy dispersas pero mantienen puntos de contacto con otras células de miocardio (Fig. 9B).

- Estadio 30 HH. En el MET se observó la misma zona de transición en la región de la pared libre ventricular adyacente a la región caudal del cojín lateral izquierdo (Fig. 3B), con un patrón de distribución celular similar al que se ha venido observando en estadios más jóvenes (ver Fig. 8). Algunas de las células presentaron características de fibroblastos inmaduros con formas irregulares y largos procesos celulares. En la zona de formación de las trabéculas se observaron empaquetamientos celulares de miocardio rodeados por células endoteliales procedentes de la luz del corazón (Fig. 10) y no se encontraron zonas de transición en que se mezclen diferentes tipos celulares.

- Estadio 32 HH. En la capa subendocárdica de la pared libre ventricular, aledaña a la región caudal del cojín lateral izquierdo (Fig. 3C), se observaron células de miocardio, embebidas en la matriz extracelular (Fig. 11), algunas de estas células presentan mitosis. En las regiones que muestran desprendimiento de células de miocardio se pierde la continuidad de la lámina basal.

- Estadio 34 HH. Se detectó una zona de transición entre el área de la porción caudal del cojín lateral izquierdo y la pared subendocárdica adyacente (Fig.3D), al observar esta zona en MET se encontró una mezcla de tres tipos de células embebidas en la matriz extracelular:

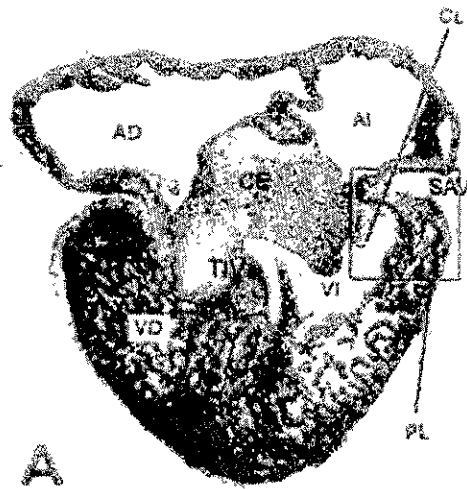
El primer tipo celular se trata de fibroblastos con formas irregulares y grandes núcleos, caracterizados por un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, distribuido de manera regular en todo el citoplasma y con las paredes de sus cisternas dispuestas en forma paralela (Fig. 12), los fibroblastos emiten proyecciones tipo filopodio que pueden llegar a tocar a células de

miocardio (Fig. 12). El segundo tipo es células de miocardio con uniones intercelulares comunes. El tercer tipo de células en esta zona fue el de un fenotipo intermedio que designamos "células de transición" (Fig. 13A,B).

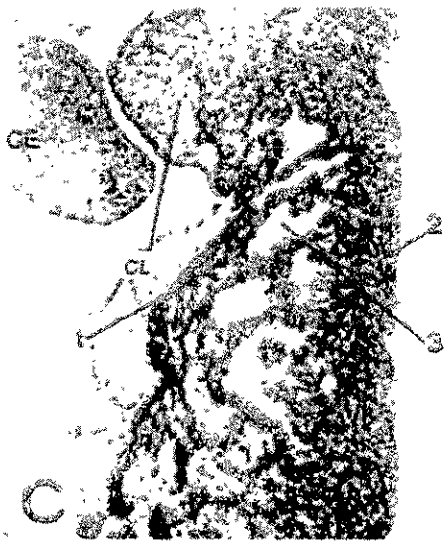
En las células de transición se conjugan las características de dos tipos celulares diferentes; por una parte presentan en su citoplasma zonas con retículo endoplásmico rugoso cuyas cisternas tienen un arreglo regular, característico de los fibroblastos y por otro lado, también tienen estructuras fibrilares características de las células miocárdicas, haces de miofibrillas que presentan áreas claras y oscuras (Fig. 13A,B). Existen células que presentan diferentes grados de transición, unas presentan un gran retículo endoplásmico de forma muy regular y pocas miofibrillas organizadas en complejos haces (Fig. 13A), mientras que otras presentan gran cantidad de miofibrillas distribuidas irregularmente en el citoplasma y poco retículo endoplásmico (Fig. 13B). Las células de transición observadas se encontraron libres en la matriz extracelular o estableciendo contacto entre sí por desmosomas o con fibroblastos por contigüidad (Fig. 13A) al igual que con células de miocardio (Fig. 13B).

- Estadio 42 HH Al realizar las observaciones correspondientes en la zona de transición donde se está desarrollando la cuerda tendinosa en unión con la valva mural (Fig. 3E), se observaron en el MET básicamente dos estratos celulares, el primero hacia la luz del corazón delimitado por células endoteliales, este estrato consiste de una gruesa capa de fibroblastos (Fig. 14), embebidos en abundantes haces de fibras de colágena que se encuentran arreglados en formas onduladas en la matriz extracelular. El segundo estrato se localiza en la parte posterior de la valva mural y consiste en una gruesa capa de células de miocardio embebidas en el estrato de fibroblastos (Fig. 15). En el caso del estrato de células de miocardio, este no presentó los densos haces de colágena excepto en las zonas de imbricación. En la zona de unión se detectó la presencia de células de transición (Fig. 15,16), con características de fibroblasto y con fibrillas semejantes a las observadas en el estadio 34 HH (Fig.13).

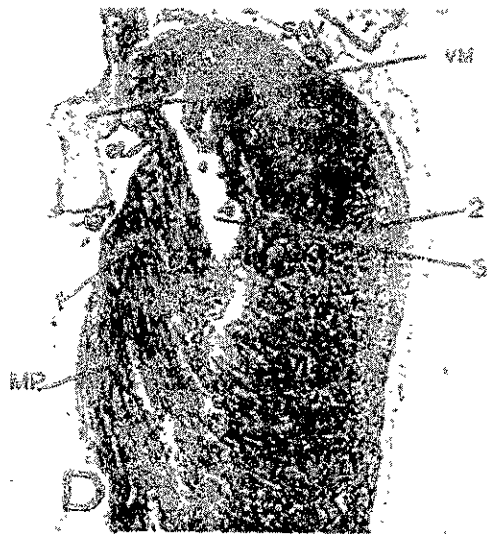
Fig.1. Desarrollo embrionario de la valva mural de la mitral en el corazón de pollo. Cortes frontales teñidos con la técnica tricrómica de Masson. A. Vista frontal del corazón en cuatro cámaras, en el recuadro se señala el área de desarrollo del velo mural y su aparato tensor. B, D y C son diferentes etapas del desarrollo de la valva mural, su cuerda y su músculo papilar. A. B) Estadio 28 HH, C) Estadio 30 HH y D) Estadio 39 HH. **AI.** Aurícula izquierda; **AD.** Aurícula derecha; **VD.** Ventrículo derecho; **VI.** Ventrículo izquierdo; **CL.** Cojín lateral; **CE.** Cojines endocárdicos; **SAV.** Surco AV; **PL.** Pared libre ventricular; **TIV.** Tabique interventricular primitivo 1. Capa subendocárdica; 2. Capa subepicárdica; 3. Espacios entre la pared libre ventricular; **VM.** Velo mural; **ct.** Cuerda tendinosa; **MP.** Músculo papilar.



Estadio 28



Estadio 30



Estadio 39

Fig.2. Desarrollo del cojín endocárdico lateral izquierdo (**CL**) y origen de espacios (*) que participan en la separación de la pared libre del ventrículo izquierdo en la capa subepicárdica (**CSEp**) y la subendocárdica (**CSEn**). Microscopía de alta resolución de cortes frontales de 1.5 μ m de la pared libre del ventrículo izquierdo del corazón de embrión de pollo. a) Estadio 21 HH, b) Estadio 22 HH, c) Estadio 23 HH, d) Estadio 24 HH, e) Estadio 25 HH, f) Estadio 26 HH. **AI**. Aurícula izquierda; **VI**. Ventrículo izquierdo; **CE**. Cojines endocárdicos; **SAV**. Surco AV; **E**. Endocardio; **M**. Miocardio; Flecha, inicio de invasión.

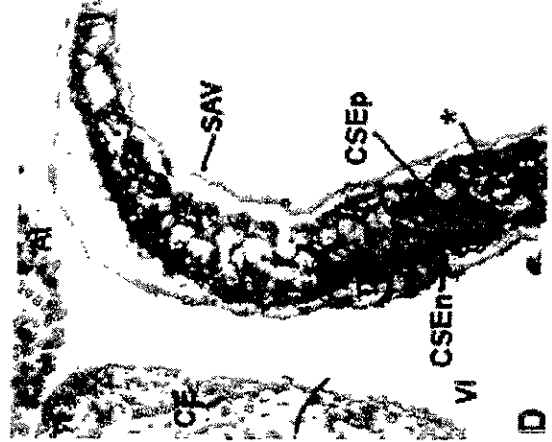
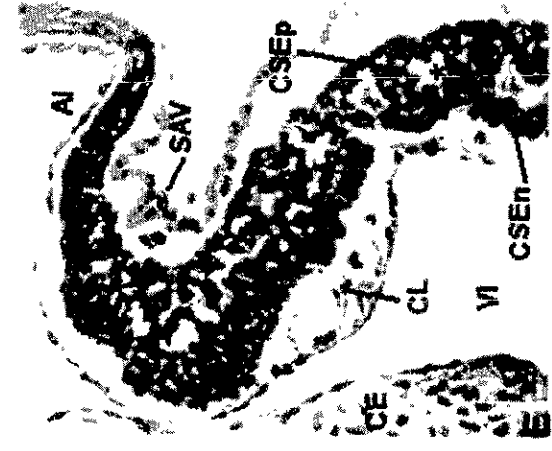
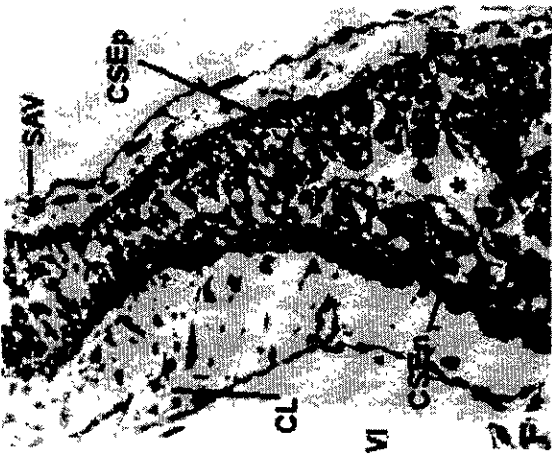
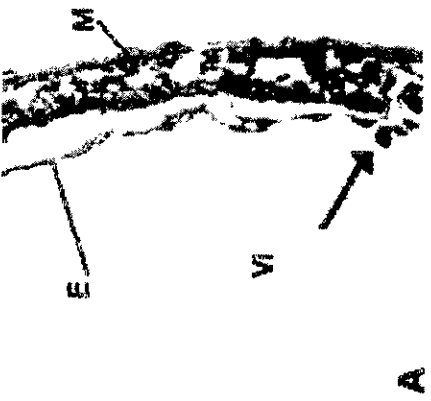
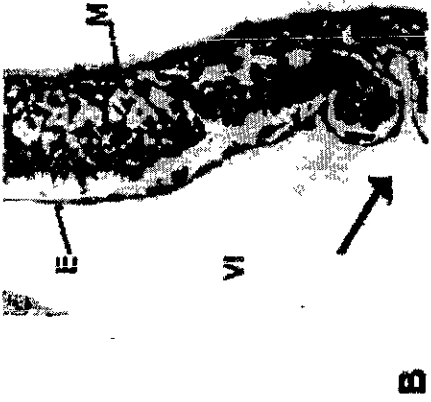
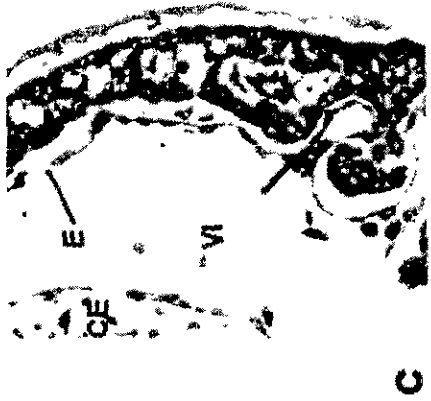


Fig.3. Desarrollo de la valva mural de la válvula mitral y su aparato tensor. Microscopía de alta resolución de cortes frontales de 1.5µm de la pared libre del ventrículo izquierdo del corazón de embrión de pollo. Observe la separación gradual de las capas subepicárdica **CSEp** y subendocárdica **CSEn**, así como la estrecha asociación de esta última con el cojín lateral izquierdo **CL**. a. Estadio 27 HH; b. Estadio 30 HH; c. Estadio 32 HH; d. Estadio 34 HH; e. Estadio 42 HH. **AI**. Aurícula izquierda; **VI**. Ventrículo izquierdo; **SAV**. Surco AV; **Vm**. Valva mural; **ct**. Cuerda tendinosa; **mp**. Músculo papilar; * espacios en pared libre del ventrículo izquierdo que separan la **CSEp** de la **CSEn**.

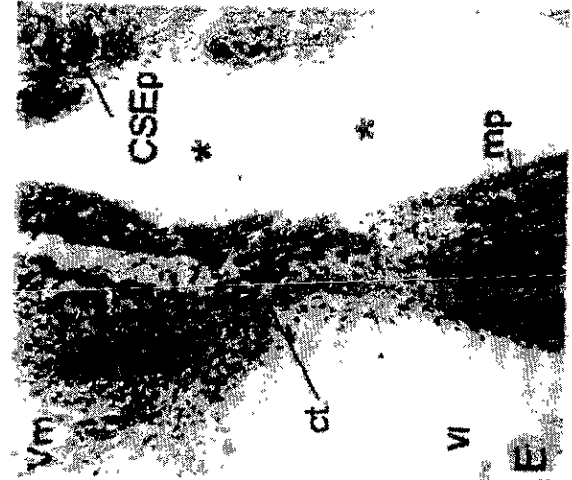
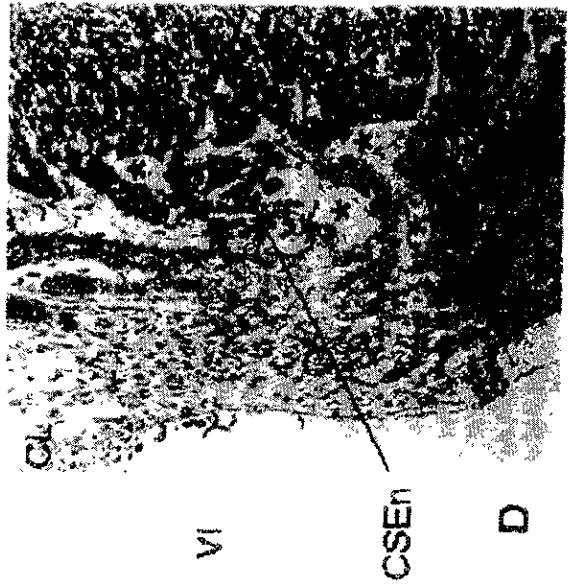
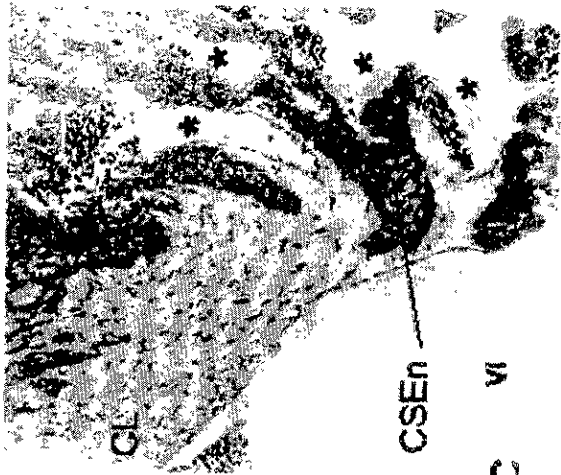
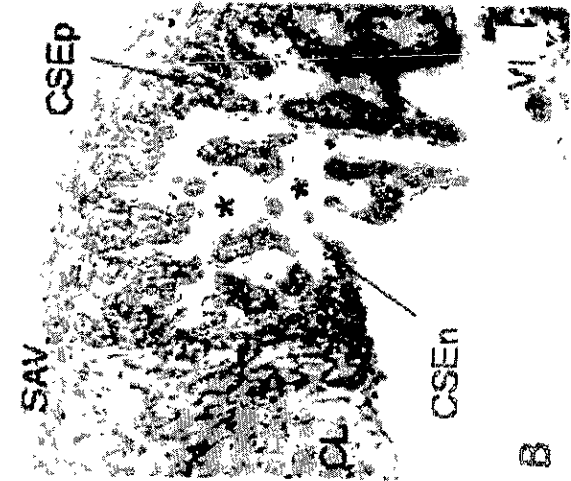
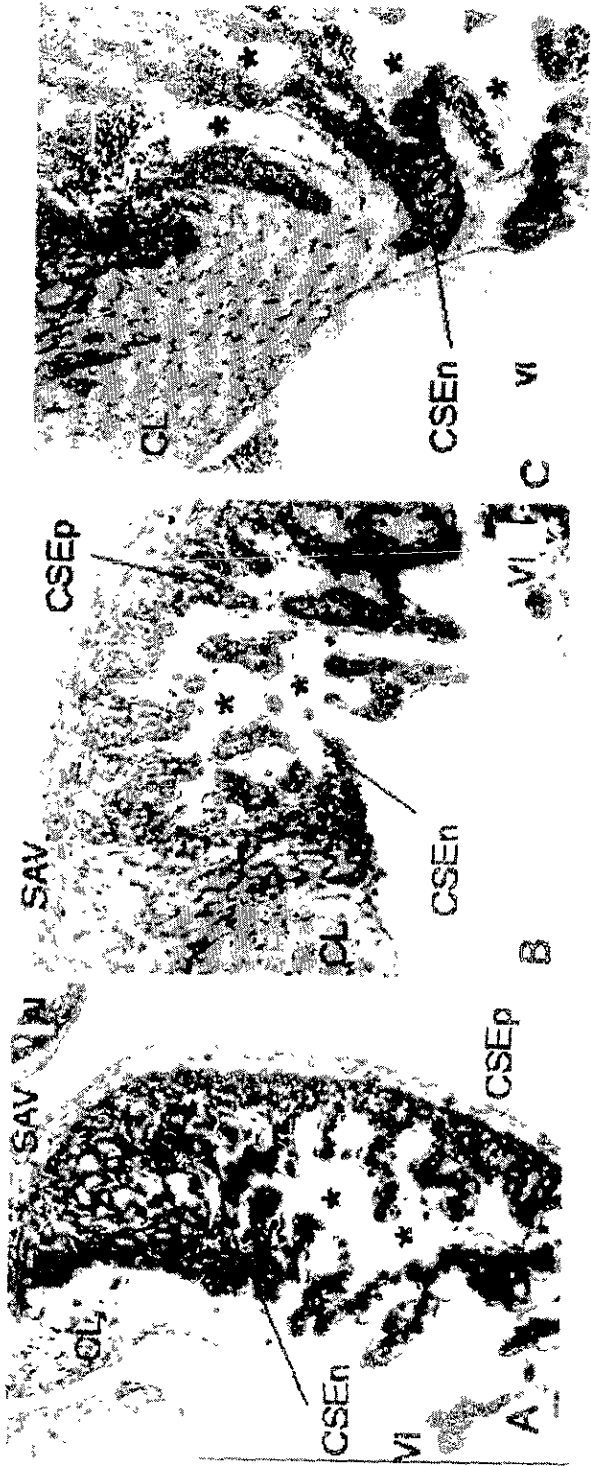


Fig. 4. Tipos celulares presentes en la pared libre del ventrículo izquierdo adyacente al surco atrioventricular en el estadio 21 HH. Se muestra la relación y ultraestructura de las células endoteliales (**E**) con respecto a las células de miocardio (**M**). Micrografía electrónica de transmisión. A. Capa de miocardio con espacios intercelulares sin cubierta epitelial, con miofibrillas (**mf**) dispuestas en diferente orientación, abundantes depósitos de glucógeno (**gu**) y uniones celulares tipo desmosoma (**d**). La capa de endocardio es unilaminar con células alargadas y grandes núcleos (**N**), estas células presentan uniones intercelulares tipo desmosoma. B. Detalle de una célula de endocardio en estrecha proximidad con células de miocardio, observe los procesos celulares emitidos por las células de miocardio (flecha).

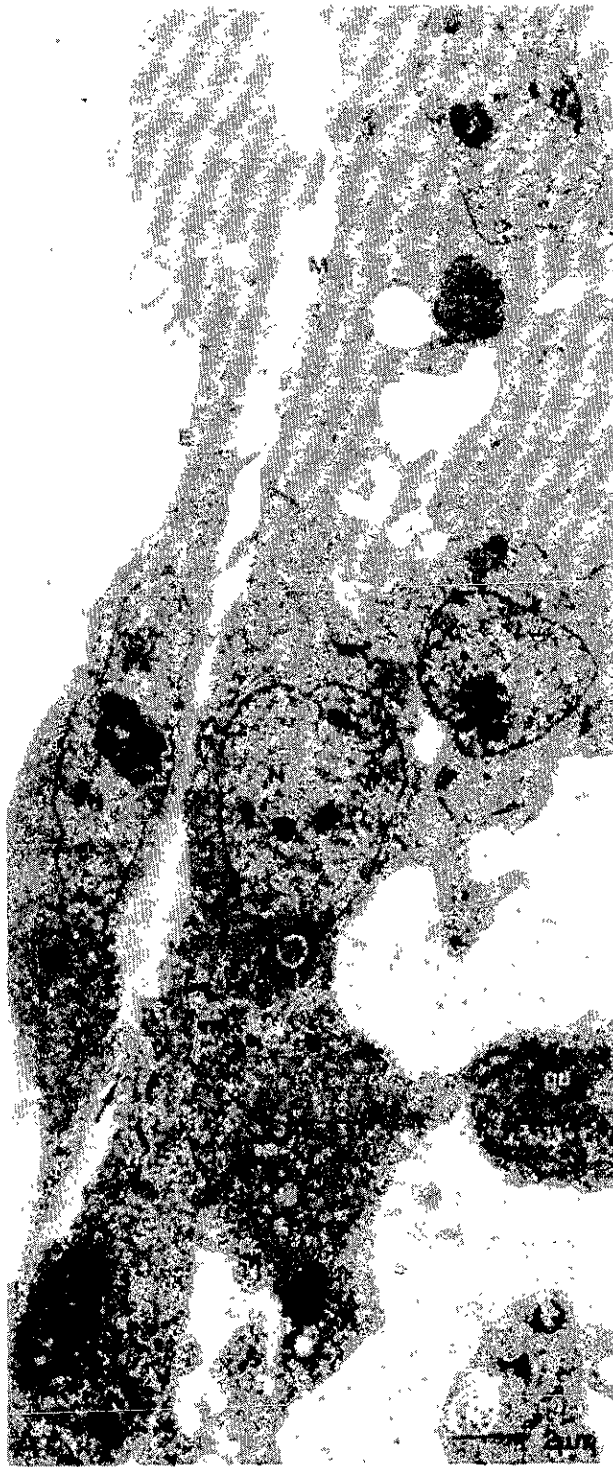


Fig. 5. Proceso de invasión de las células endoteliales (**E**) a la pared libre del ventrículo izquierdo, durante el inicio de la delaminación. Micrografías electrónicas de transmisión del estadio 21 HH. A. Se observa la transformación de células endoteliales al invadir el miocardio (**M**). Note que existen múltiples filopodios (flecha delgada) que sugieren puntos de reconocimiento entre el endocardio y el miocardio. B. Detalle de la célula endotelial de punta (invasora) en mitosis. C. Una célula de miocardio en mitosis. **cr.** Cromosomas; **mf.** Miofibrillas; **N.** Núcleo; flecha gruesa invaginación de la capa de células endoteliales.

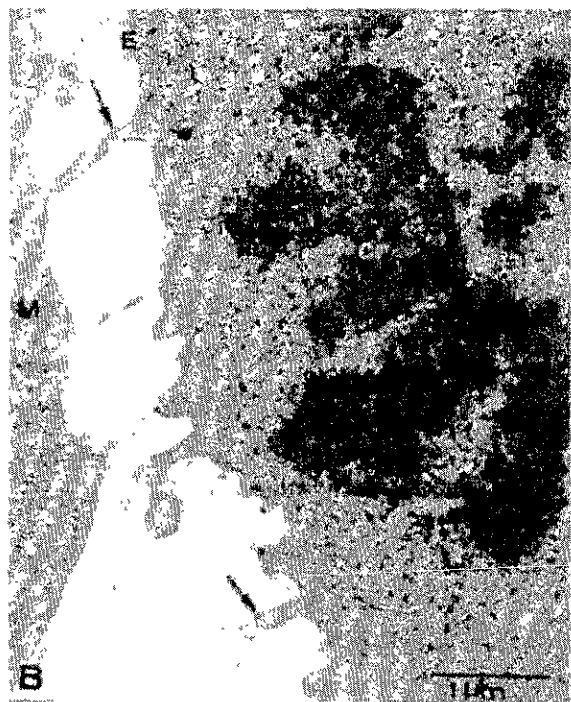
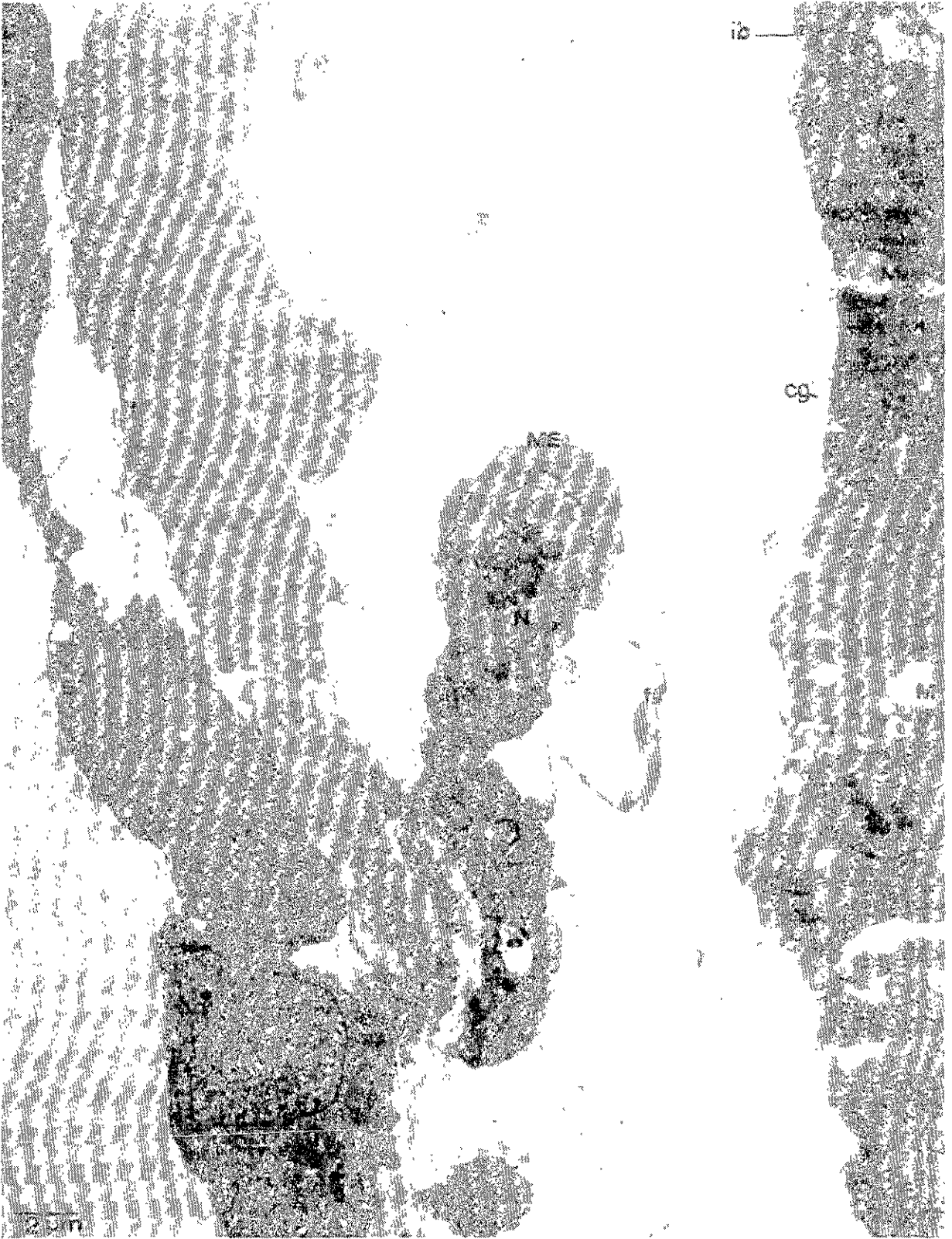


Fig. 6. Transformación epitelio-mesénquima en la región de la pared libre ventricular, caudal al cojín lateral izquierdo. Micrografía electrónica de transmisión de la pared libre del ventrículo izquierdo, estadio 24 HH. La capa de endocardio (**E**) con algunas células de mesénquima (**ME**). La capa de miocardio (**M**) con su lámina basal (**lb**) bien definida; **N**. Núcleo; **cg**. Colágena; **fi**. filopodio.



ib

cg

207

Fig. 7. Invasión de la pared libre del ventrículo izquierdo adyacente al cojín lateral izquierdo por células endoteliales previo al proceso de delaminación, estadio 26 HH. Micrografía electrónica de transmisión. Se presentan la capa de miocardio (M) invadida por células endoteliales (E) que van abriendo grandes espacios. N. Núcleo; Flecha, invasión de endotelio.

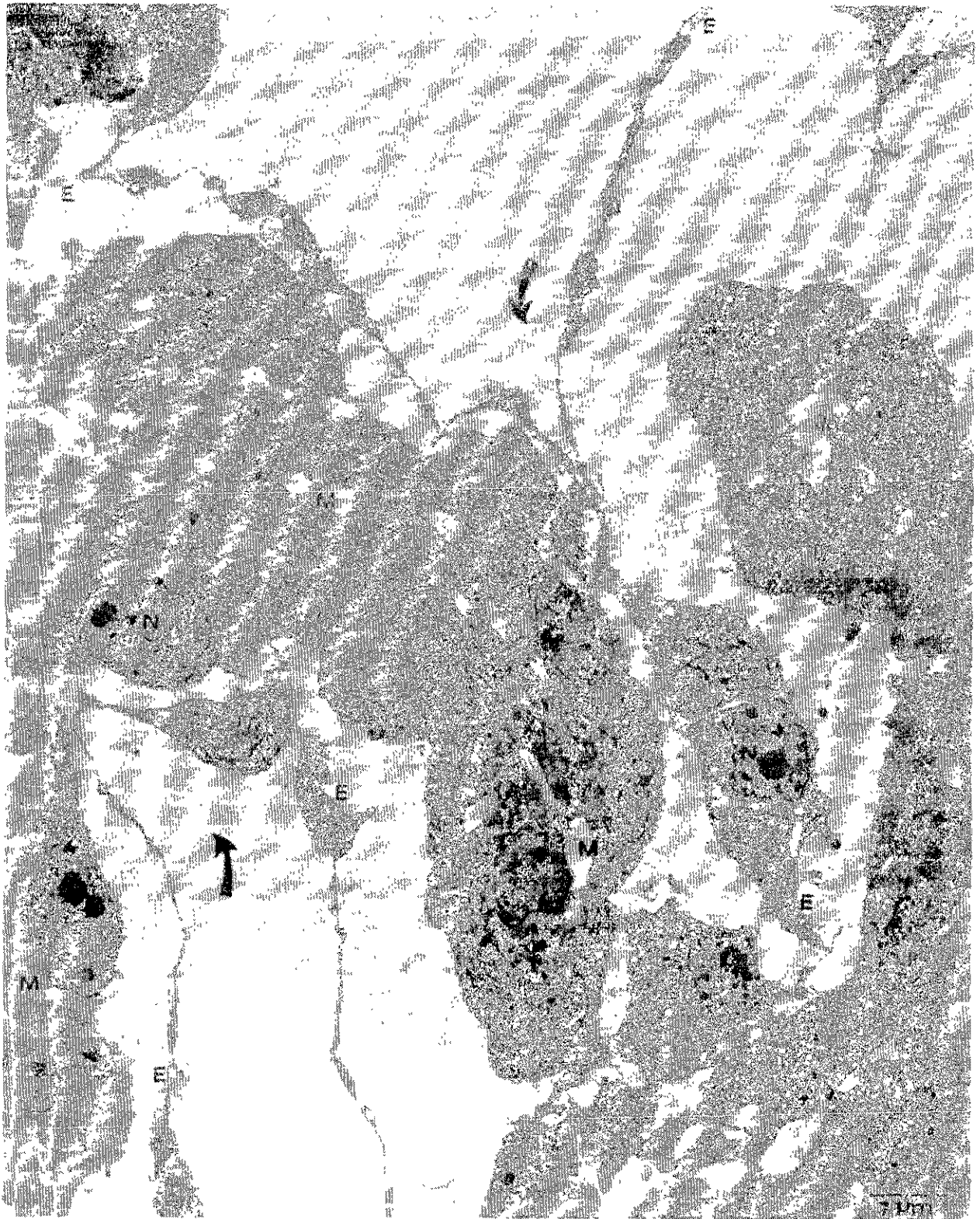


Fig. 8. Región de transición en la porción caudal del cojín lateral izquierdo del estadio 27 HH. Micrografía electrónica de transmisión. Observe la diversidad de tipos celulares y su proximidad A. Endocardio-endocardio, endocardio-mesénquima, mesénquima-mesénquima, B. Mesénquima-miocardio, miocardio-miocardio. **M.** Miocardio; **ME.** Mesénquima; **E.** Endocardio; **N.** Núcleo; mf. miofibrillas; d. desmosomas.



Fig. 9. Amplificaciones de los recuadros de la figura 8. A. Uniones intercelulares entre endotelio-endotelio (**E**) y endotelio-mesénquima (**ME**). B. Estrecha interacción entre células de miocardio (**M**) y células de mesénquima (ver las flechas con cabeza). **N.** Núcleo; **mf.** miofibrillas; **mi.** mitocondria.



Fig. 10. Desarrollo de trabéculas en la región caudal de la pared libre del ventrículo izquierdo. Micrografía electrónica de transmisión del estadio 30 HH. Observe el empaquetamiento de células de miocardio (**M**) por células de endotelio (**E**) procedentes de la luz del corazón durante la formación de las trabéculas (**flechas**). gl. glucógeno; N. Núcleo.



Fig. 11. Célula de miocardio (**M**) embebida en la matriz extracelular presenta mitosis. Micrografía electrónica de transmisión en el estadio 30 HH. **N.** Núcleo; **mf.** miofibrillas; **cr.** cromosomas en metafase; **d.** desmosomas.



Fig. 12. Fibroblasto (**FB**), en la región superior de la foto, embebida en la matriz extracelular. Micrografía electrónica de transmisión del estadio 34 HH. Observe el retículo endoplásmico rugoso (**rer**) bien desarrollado, con las paredes de sus cisternas dispuestas en formas paralelas. Se puede ver la emisión de apéndices posiblemente de reconocimiento (**flechas**) entre el fibroblasto y una célula de miocardio (**M**); N. Núcleo; **mf.** miofibrillas; **cg.** colágena.



Fig. 13. Células de transición fibroblasto-miocardio (**CTr**) en diferentes etapas de desarrollo. Micrografía electrónica de transmisión, estadio 34 HH. Observe que ambos cuadros presentan células con características de fibroblasto y con miofibrillas. A. célula de transición con retículo endoplásmico rugoso (**rer**) muy desarrollado y grandes empaquetamientos de miofibrillas (**mf**). B. Célula de transición con retículo endoplásmico escaso y con miofibrillas libres en el citoplasma. **M.** Miocardio; **N.** Núcleo.



Fig. 14. Región de formación de la cuerda tendinosa en la zona de la capa subendocárdica que da hacia la luz del corazón. Micrografía electrónica de transmisión del estadio 42 HH. Observe la cantidad de fibroblasto (**FB**) embebidos en la matriz extracelular rica en fibras de colágena (**cg**). N. Núcleo; rer. Retículo endoplásmico rugoso.

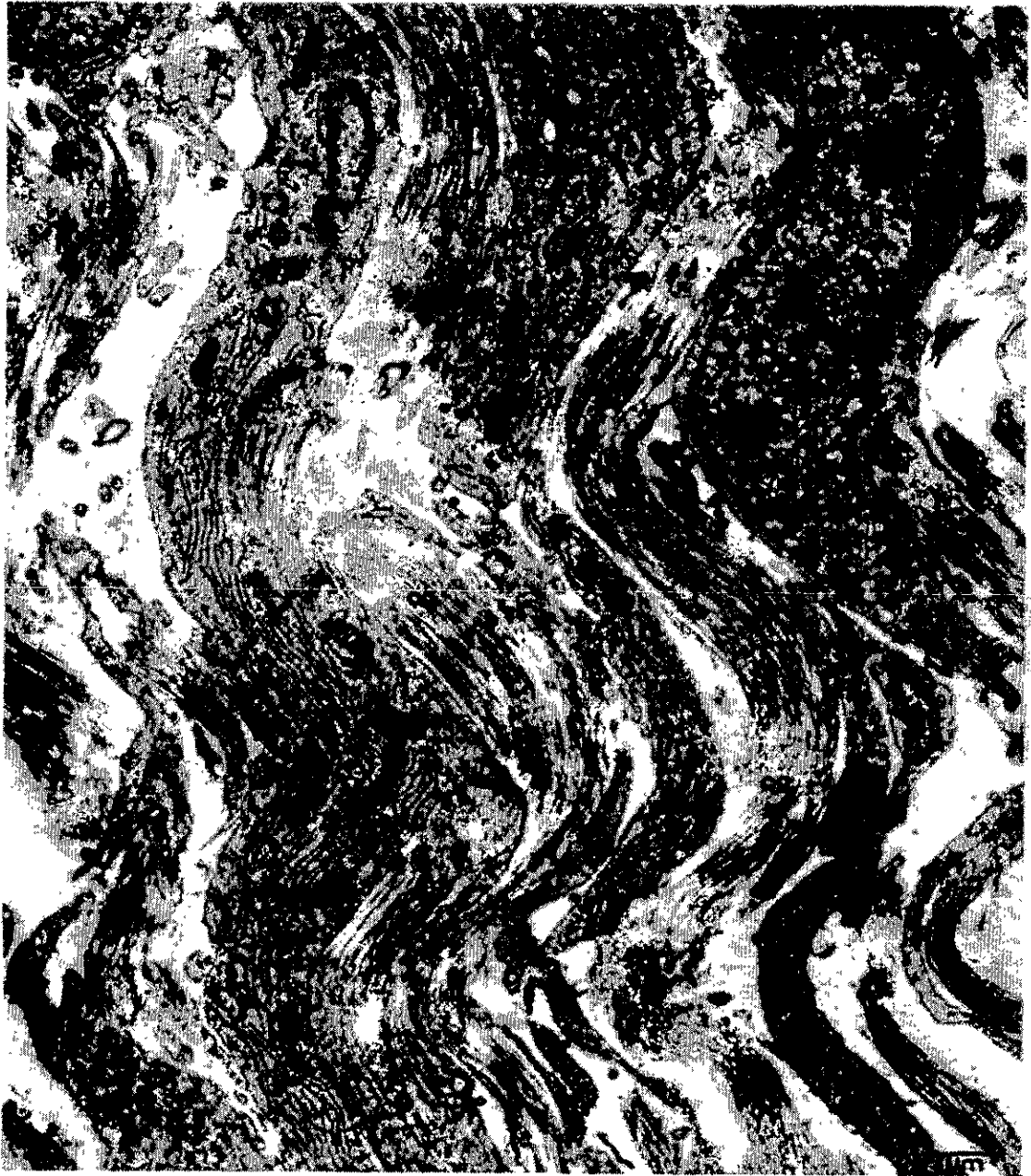


Fig. 15. Área de formación de la cuerda tendinosa en la capa subendocárdica que da hacia la pared libre del ventrículo izquierdo. Micrografía electrónica de transmisión, estadio 42 HH. Observe las células de miocardio (**M**) reminiscentes imbricadas en la densa capa de fibras de colágena (**cg**). El recuadro indica una célula de transición (**CTr**). FB. Fibroblasto; N. Núcleo; d. desmosoma; mf. miofibrillas; rer. retículo endoplásmico rugoso.



Fig. 16. Aumento del recuadro de la figura 15 en que se muestra una célula de transición (**Ctr**) con características de fibroblasto y con miofibrillas (**mf**). Observe como esta célula se encuentra imbricada entre fibroblastos (**FB**); **cg.** colágena; **mt.** mitocondrias; **rer.** retículo endoplásmico rugoso.



9. RESUMEN DE RESULTADOS

Podemos dividir el desarrollo del velo mural de la válvula mitral y su aparato tensor en tres etapas; la primera involucra el desarrollo del cojín lateral izquierdo y la invasión de células endoteliales al miocardio de la pared libre del ventrículo izquierdo, limítrofe con la región caudal del cojín lateral. Los resultados obtenidos revelan que entre los estadios 21 y 22 HH los cojines endocárdicos laterales del canal AV, inician su desarrollo. Los primeros signos que se observan son una ligera acumulación de matriz extracelular entre el endocardio y el miocardio del surco AV izquierdo, lo mismo sucede en el surco AV derecho (datos no mostrados) y la presencia de algunas células de mesénquima en el interior de los cojines (estadios 22-23 HH). La microscopía electrónica de transmisión reveló que células endoteliales de la región caudal del cojín lateral izquierdo se transforman en células de punta e invaden el tejido de miocardio (se infiere que lo mismo ocurre en la pared libre del ventrículo derecho). Durante el proceso de invasión endotelial se van abriendo gran cantidad de espacios en la pared libre del ventrículo izquierdo, que van ocupando gradualmente áreas cada vez más cefálicas en dirección al surco AV izquierdo (estadio 26 HH). Conforme las células endoteliales van abriendo los espacios en la pared libre ventricular, éstos van quedando recubiertos por epitelio (endotelio).

La segunda etapa de delaminación, consiste en la separación de la pared libre ventricular, dando origen a dos capas: una subendocárdica (que participa en la formación del velo mural y su aparato tensor) y la otra subepicárdica (que permanece como pared libre ventricular), ambas capas separadas por grandes espacios abiertos durante la invasión de las células endoteliales.

El proceso de delaminación inicia con el desarrollo de espacios en la pared libre del ventrículo izquierdo, que gradualmente se hacen más grandes, producto de la invasión de células endoteliales al miocardio. La coalescencia de estos espacios, toma gran importancia durante la delaminación. En este proceso de coalescencia los espacios generados por el endocardio durante la invasión se

fusionan con los espacios intercelulares preexistentes en la pared libre ventricular. De esta manera se generan los grandes espacios recubiertos por células endoteliales que separan la pared libre ventricular en dos capas, la capa subendocárdica y la subepicárdica, siendo la capa subendocárdica la que participa en el desarrollo embrionario de la valva mural de la mitral, sus cuerdas tendinosas y su músculo papilar.

La tercera etapa consiste en la citodiferenciación del velo mural y su aparato tensor. En esta etapa de citodiferenciación de la valva mural y su aparato tensor, las células fibroblásticas del cojín lateral izquierdo contribuyen en la formación del tejido fibroso de la región atrial del velo mural mientras que la capa subendocardica generada de la pared libre ventricular participa en la formación de la parte ventricular de la valva mural, sus cuerdas tendinosas y su músculo papilar. La presencia de la capa subendocardica en un lugar que posteriormente se presenta como tejido fibroso para dar origen a la valva mural y a sus cuerdas tendinosas, así como la presencia de células de transición en el estadio 34 HH, con características de fibroblastos y con miofibrillas, nos sugieren la posibilidad de un proceso de transdiferenciación celular, entendiendo por transdiferenciación celular al proceso por el cual una célula diferenciada presenta una serie de cambios morfológicos y estructurales que implican una desdiferenciación celular para adquirir un fenotipo diferente.

10. DISCUSIÓN

El presente estudio sienta las bases celulares para explicar el proceso de delaminación de la pared libre ventricular, durante la formación de los velos valvulares AV y su aparato tensor, proceso al que hacen referencia una gran cantidad de investigadores sin llegar a explicarlo. De esta manera, a partir de este trabajo podemos explicar la delaminación de la pared libre ventricular como el proceso por el cual las células endoteliales, de la región caudal del cojín lateral izquierdo, invaden y separan la pared libre ventricular en dos capas: La subendocárdica y la subepicárdica. Las células endoteliales que van invadiendo progresivamente la pared libre ventricular se van generando por mitosis.

El inicio del proceso de invasión es específico, inicia entre los estadios 21-22 HH en el embrión de pollo, en la región caudal del cojín lateral izquierdo, lo que nos hace pensar en la existencia de interacciones moleculares específicas entre el miocardio y el endocardio de esta región. En el ámbito molecular, estas interacciones no han sido estudiadas, no obstante se sabe que existe una estrecha interacción molecular entre el endotelio de los cojines endocárdicos superior e inferior con el miocardio del canal AV, interacción de la que hablaremos más adelante pero que nos conduce a pensar en un mecanismo similar entre el endotelio de la región caudal del cojín lateral izquierdo y la capa subendocárdica de la pared libre ventricular. Así, los cambios que presentan las células endoteliales que se transforman en células migratorias con la adquisición de filopodios y su capacidad para desprenderse de la capa endotelial e invadir tejido muscular, nos indican la presencia de mecanismos moleculares específicos que las señalan para su transformación de epitelio de recubrimiento a epitelio invasor para la separación de tejido. Cabe aclarar que este mecanismo de interacción miocardio-endocardio para la separación de tejido no ha sido estudiado y es diferente al que se da durante la transformación de endotelio-mesénquima en los cojines endocárdicos del canal AV y en la zona del cono. Este proceso de interacción endotelio y miocardio, también es diferente al proceso de

recubrimiento y esculpimiento de trabéculas en la región apical trabeculada de ambos ventrículos, en este último caso no se da una separación de tejido de miocardio por la coalescencia de espacios. Podemos decir que se trata de un tipo de interacción no descrito antes, entre endocardio y miocardio durante el proceso de delaminación de la pared libre ventricular en el desarrollo embrionario del aparato valvular AV.

La invasión de células endoteliales es en principio similar a la que se ha descrito para el proceso de angiogénesis, en este caso los tubos endoteliales en formación penetran en la pared miocárdica, por medio de la transformación de células endoteliales a células endoteliales invasoras o de punta con la adquisición de procesos celulares de tipo filopodio, que posiblemente funcionan como estructuras de reconocimiento. Para dar inicio a su migración es necesario que estas células endoteliales de alguna forma marcadas pierdan su adhesión con el resto de células endoteliales no predestinadas a la transformación. Lo anterior es muy probable que suceda como ocurre en el endotelio que se transforma y migra en los cojines endocárdicos, en este caso, existe una inducción del miocardio del canal AV al endotelio de los cojines endocárdicos. Durante la inducción miocárdica se desencadenan una serie de cambios en la expresión de genes y proteínas en las células endoteliales por transformarse, en esta cascada se incluye una subregulación de la molécula de adhesión neuronal (NCAM) (Mjaatvedt and Markwald, 1989). Estas células endoteliales pierden capacidad de adhesión, también se registra una sobre regulación de serin y metaloproteinasas que se correlaciona con la pérdida de asociación célula a célula y con el inicio de la transformación endotelial (Alexander et al., 1997). La pérdida de la polaridad celular se hace evidente con el rearrreglo del aparato de Golgi y los filamentos de actina del citoesqueleto (Krug et al., 1987 y De Ruyter et al., 1997). Por otro lado, el inicio de la delaminación de la pared libre ventricular en la formación de velos y aparato tensor, es muy similar al inicio del esculpimiento de trabéculas, en este trabajo no podemos decir que son procesos independientes porque no contamos con límites anatómicos o marcadores moleculares específicos para ambos

fenómenos.

En el proceso de delaminación, la apertura de espacios cubiertos por células endoteliales es de gran importancia ya que por su coalescencia dan origen a la separación y formación de la valva mural de la mitral y su aparato tensor. A estos espacios no se les ha prestado la atención debida y es posible que en el interior de estos espacios se encuentren inductores que propicien la invasión de células endoteliales y su coalescencia.

Conforme avanza el proceso de delaminación de la pared libre del ventrículo izquierdo, nos encontramos con una estrecha aproximación de células de diferentes linajes, algunas de ellas no muy comunes como lo son las interacciones miocardio-fibroblastos y fibroblastos-endocardio, lo que nos sugiere posibles puntos de reconocimiento entre estos diferentes tipos celulares. Este tipo de interacciones se observan en el trabajo de Argüello et al. (1978) durante el desarrollo del cono y el tronco pero no han sido estudiados.

Por otra parte, sobre las cuatro propuestas de origen y desarrollo de las valvas atrioventriculares y su aparato tensor, la que considera un origen exclusivo de tejido de cojín (Oosthoek et al., 1997), durante el desarrollo de los velos valvulares puede ser descartada, porque la capa subendocárdica está constituida de diferentes tipos celulares (miocardio, fibroblastos, mesénquima y endotelio), como observamos en los cortes semifinos realizados en este trabajo, así como por los cambios ultraestructurales registrados con el microscopio electrónico de transmisión, participan en su formación y diferenciación. En cuanto a la segunda propuesta, sobre un origen exclusivo del miocardio (Van Mierop and Gessner, 1972; Mandarim, 1991; Wenink et al. 1994), es una propuesta que no se puede sostener puesto que diversos investigadores (de la Cruz et al., 1983 y García-Peláez et al., 1984) por técnicas de marcaje "in vivo" han demostrado la participación del tejido de cojín en el desarrollo de las valvas AV. En nuestro estudio pudimos observar como el cojín lateral está involucrado en el desarrollo del velo mural de la válvula mitral en una estrecha asociación con la capa subendocárdica de la pared libre del ventrículo izquierdo. Por lo que concierne a

la tercera propuesta que considera un aporte extracardiaco de epicardio en el surco AV izquierdo (tejido del sulcus) durante el desarrollo de los velos valvulares (Wenink and Gittenberger-de Groot, 1982, 1986a, Wenink et al., 1986b, Wenink, 1992; Wenink et al., 1994), podemos mencionar que por inmunohistoquímica se ha demostrado que tal aporte no existe (Oosthoek et al., 1997) no obstante, el trabajo aquí desarrollado no es capaz de descartar una posible contribución del tejido del sulcus en el desarrollo de la valva mural de la mitral. En cuanto a la cuarta propuesta, sobre un origen mixto de las valvas y su aparato tensor (Odgers, 1939; Van Mierop et al., 1962, Van Mierop et al., 1977; Patten, 1964; Ugarte et al., 1976; Van Gils, 1979; Chin et al., 1992; Lamers et al., 1995 y Weels et al., 1996), nuestros resultados la apoyan. El desarrollo y participación del cojín lateral izquierdo en estrecha interacción con la capa subendocárdica de la pared libre ventricular sugiere que el primero contribuye en el desarrollo de la región atrial del velo mural de la válvula mitral, mientras que la capa subendocárdica de la pared libre ventricular interviene al menos en el desarrollo de sus cuerdas tendinosas y su músculo papilar. Por otra parte, para comprobar la contribución de la capa subendocárdica en el desarrollo de la porción ventricular de la valva mural es necesario realizar alguna técnica de marcaje "in vivo" o inmunohistoquímica.

El origen mixto de la valva mural de la válvula mitral y su aparato tensor nos indica que el aparato valvular atrioventricular se origina tanto del segmento embrionario denominado "Primordio de las cámaras de entrada ventriculares" (de la Cruz and Markwald, 1998), como del segmento conocido como "Primordio de la porción apical trabeculada de ambos ventrículos", segmento que no se considera al describir el desarrollo embrionario de los aparatos valvulares AV. La presencia de miocardio reminiscente en la región contigua a la porción ventricular del velo mural nos sugiere que el miocardio esta participando en el desarrollo de este velo. Una tercera observación realizada y que apoya la idea de la participación de la capa subendocárdica de la pared libre ventricular en el desarrollo del velo mural de la válvula mitral y su aparato tensor es la presencia de células de

transición en esta capa. Este hecho nos conduce a sugerir un posible proceso de transdiferenciación en el que células de miocardio se transforman en fibroblastos.

En cuanto al proceso de transdiferenciación, existen muy pocos ejemplos de ella en la naturaleza, se han reportado algunos casos que la apoyan, éstos básicamente se refieren a que los fibroblastos tienen la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares de la misma familia (Alberts et al 1994), así, la familia de las células de tejido conjuntivo tiene la capacidad de ser interconvertibles, esta familia incluye fibroblastos, condrocitos y osteocitos, todas ellas células especializadas en la secreción de la colágena de la matriz extracelular, los adipocitos y las fibras musculares lisas parecen tener un origen común con las anteriores (Alberts et al., 1994). Un ejemplo de transdiferenciación se ha observado en un grupo de células de endotelio de bovino adulto cultivadas "in vitro", que fueron capaces de transdiferenciarse a células de músculo liso, (Arciniegas et al., 1992), en este trabajo se demostró que el TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante β 1) es capaz de inducir la expresión de α -actina de músculo liso en células del endotelio aórtico

En procesos patológicos, también se habla de procesos de transdiferenciación, diversos autores han especulado que las células endoteliales pueden dar origen a una población de células subendoteliales, como es el caso de la arterioesclerosis por engrosamiento de la íntima, capa más interna de las paredes de las arterias (Beranek, 1995), y en lesiones plexiformes en la hipertensión pulmonar primaria (Tuder et al., 1994).

En el corazón, durante el desarrollo embrionario del tracto de salida, Argüello et al. en 1978, describieron el proceso de transdiferenciación de células de miocardio a fibroblastos, en su trabajo señalan la presencia de células de transición con características fibroblásticas y con miofibrillas en un tejido que originalmente es muscular y posteriormente pasa a ser tejido conectivo. También se ha reportado transdiferenciación de células endocárdicas (endoteliales) a células de mesénquima para posteriormente diferenciarse en fibroblastos en la región de los cojines endocárdicos del canal AV (Markwald et al., 1977, 1990. y

Wunsch et al., 1994). Este último proceso ha sido ampliamente estudiado y se propone que un complejo de glicoproteínas, llamado interferón, es secretado por el miocardio y transportado a través de la matriz extracelular hasta el endocardio, en donde induce a algunas células, células receptoras, a transformarse en mesénquima. No todas las células endoteliales del corazón tienen la capacidad de transformarse en mesénquima, las células de la zona trabecular no forman mesénquima ni son capaces de responder en cultivo al extracto de matriz extracelular del canal AV. Además, no todas las células endoteliales en los cojines AV se transforman en células de mesénquima, solo aquellas que presentan el antígeno JB3 (Wunsch et al., 1994). Lo anterior apoya la idea de una heterogeneidad endotelial en la superficie interna del corazón (Wunsch et al., 1994). En el ámbito molecular se ha visto que la transformación endotelio-mesénquima en cojines endocárdicos está regulada por la proteína ES130 (Krug et al., 1987; Krug et al., 1995, Eisenberg and Markwald, 1995). TGF- β 1 se considera un factor candidato en la iniciación o regulación de la transformación y que promueve la diferenciación de células endoteliales en células de tipo músculo liso (Arciniegas et al., 1992). En la actualidad se está trabajando para determinar si JB3 (Wunsch et al., 1994), Fibulina (Spence et al., 1992) y ES130 están involucrados en la inducción de la transformación de endotelio a mesénquima (Krug et al., 1995, Eisenberg and Markwald, 1995), ya que estas moléculas se expresan simultáneamente durante esa transformación celular.

De Ruiter et al., en 1997 trabajando con embrión de codorniz, dan la primera evidencia "in vivo" sobre el proceso de transformación celular, en el cual, células de endotelio en la aorta dorsal y en el canal AV se transdiferencian a células de mesénquima expresando α -actina de músculo liso.

En el presente trabajo, la detección de células de transición entre fibroblastos y miocardio no muestra el sentido en que se realiza la transformación, esto es, si las células de transición provienen de fibroblastos que a su vez derivan de endocardio, o si provienen de células de miocardio de la capa subendocárdica de la pared libre del ventrículo izquierdo, contigua a la porción caudal del cojín

lateral (Fig. 17). Si el problema lo abordamos desde el punto de economía de energía, resulta más fácil considerar que las células de miocardio, de estructuras complejas, se desdiferencian desmontando toda su maquinaria fibrilar, para dar origen a fibroblastos. De otra manera, los fibroblastos invertirán una gran cantidad de energía en montar todo un complejo sistema de síntesis de proteínas, de formación de miofibrillas y su empaquetamiento para posteriormente desmontarlo y quedar como fibroblasto y constituir valvas y cuerdas tendinosas. Si las células de transición implican transdiferenciación del miocardio de la capa subendocárdica de la pared libre del ventrículo izquierdo entonces la valva mural de la mitral presentaría por un lado una contribución de fibroblastos derivados de la transformación de miocardio de la capa subendocárdica del ventrículo izquierdo (Fig. 17) y por otro lado presentaría fibroblastos procedentes de la transformación de endotelio-mesénquima en el cojín lateral.

Por otra parte, podemos señalar que el estudio del desarrollo embrionario de la valva mural de la válvula mitral, puede servir de base para el estudio de los procesos de desarrollo de la valva mural de la válvula AV derecha y su aparato tensor. Cabe hacer mención que la valva mural de la válvula mitral, así como su aparato tensor presentan una gran homología con la valva mural del humano (Ranganathan et al., 1970).

11. CONCLUSIONES

1º. El presente trabajo apoya la consideración de un doble origen embrionario del aparato valvular AV, en que el cojín lateral izquierdo contribuye en la formación de parte de la valva mural de la válvula mitral, mientras que la pared subendocárdica de la pared libre ventricular participa en la formación de la región ventricular de esta valva, sus cuerdas tendinosas y sus músculos papilares.

2º. Lo anterior indica que el aparato valvular AV se desarrolla a partir de dos segmentos cardiacos embrionarios, El primordio de las cámaras de entrada y el primordio de la porción apical trabeculada de ambos ventrículos.

3º. El presente trabajo también muestra que los cojines laterales AV se originan entre los estadios 21 y 22 HH del desarrollo embrionario del corazón.

4º. La separación de la capa de miocardio subendocárdica por el proceso de delaminación permite la liberación del tejido implicado en la formación de la valva mural de la mitral y su aparato tensor, además de ofrecer cierto soporte durante la formación de la valva y su aparato tensor.

5º. El epitelio que divide la pared libre del ventrículo izquierdo en dos capas, una subendocárdica y una subepicárdica proviene del endotelio que se encuentra en la luz del corazón, en la parte caudal del cojín lateral izquierdo.

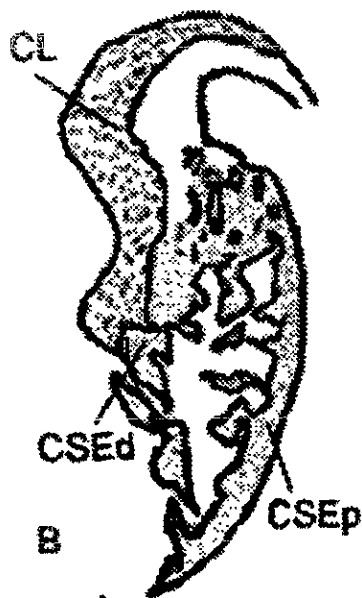
6º. Los espacios que gradualmente dividen la pared miocárdica de la pared libre del ventrículo izquierdo, coalescen dando lugar a espacios cada vez más grandes cubiertos por células endoteliales.

7º. La presencia de células de transición entre miocardio y fibroblastos indican una posible transdiferenciación durante el desarrollo de la valva mural de la mitral y de sus cuerdas tendinosas, el proceso involucrado en la transdiferenciación queda todavía por establecerse.

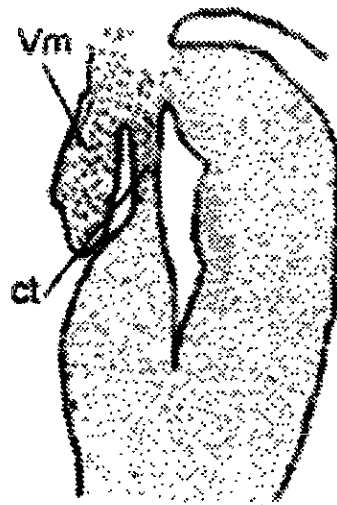
Figura 17. Modelo hipotético de formación de la valva mural de la válvula mitral, sus cuerdas tendinosas y su músculo papilar. A. Inicio de la formación del cojín lateral izquierdo (**CL**) y comienzo de la delaminación de la pared libre del ventrículo izquierdo (**PV**) por el proceso de invasión de células endocárdicas. B. Desarrollo del cojín lateral izquierdo y separación de la pared libre del ventrículo en una capa subendocárdica (**CSEn**) y una subepicárdica (**CSEp**), por la coalescencia de espacios (*) durante la invasión de endotelio. C. Formación de la valva mural (**Vm**) y su aparato tensor. La pared atrial de la valva se forma a partir de tejido de cojín, la pared ventricular de la valva y su cuerda tendinosa (**ct**) conformadas por células procedentes tanto del cojín lateral como de la pared libre ventricular. D. Rutas de transdiferenciación propuestas para la formación del tejido conectivo de la valva mural y su cuerda tendinosa. **1**. Endocardio de cojín desdiferenciándose a mesénquima y dando origen a fibroblastos. **11**. Células de miocardio transdiferenciándose a fibroblastos. **mp**. músculo papilar.



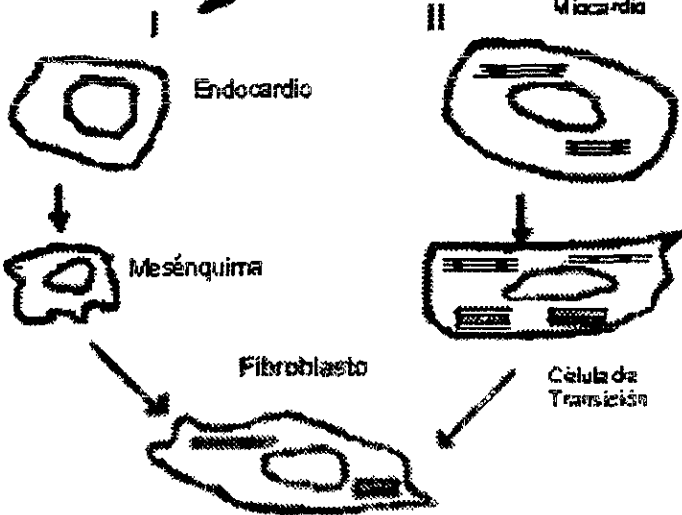
A



B



C



12. BIBLIOGRAFIA.

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. Molecular biology of the cell. 3 ed., Garland Publishing. New York. 1262-1263 pp.
- Alexander SM, Jackson KJ, Bushnell KM, McGuire PG. Spatial and temporal expression of the 72-kDa type 1V collagenase (MMP-2) correlates with development and differentiation of valvas in the embryonic avian heart. *Dev Dyn* 1997;209:261-268.
- Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor β 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* 1992; 103: 521-529.
- Arguello C, de la Cruz MV, Sánchez. Ultrastructural and experimental evidence of myocardial cell differentiation into connective tissue cells in embryonic chick heart. *J Mol Cardiol* 1978; 10: 307-315.
- Beranek JT, Vascular endothelium-derived cells containing smooth muscle actin are present in restenosis. *Lab Invest* 1995; 72: 771.
- Candell Riera J., Ferre JA, Doménech Mateu Ma. 1985. Anatomía clínica del corazón. En: Soler-Soler J, Bayes de Luna. Cardiología Ed. Doyma. Barcelona. 14-27pp.
- Cayré R, Valencia P, Coffe V, Sánchez C, Angelini P, de la Cruz MV. The right atrioventricular valvular apparatus in the chick heart. *Acta Anat* 1993; 148: 27-33.
- Chin C, Gandour-Edwards R, Oltjen S, Choy M. Fate of the atrioventricular endocardial cushions in the developing chick heart. *Pediatr Res*1992; 32: 390-393.

- de la Cruz MV, Muñoz-Armas S, Muñoz-Castellanos L. 1972. Development of the chick heart. The Johns Hopkins University Press. London 80 pp.
- de la Cruz MV, Giménez-Ribota M, Saravalli O, Cayré R. The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to the development of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. **Am J Anat** 1983; 166: 63-72.
- de la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Robledo Tovi JL. Experimental study of the development of the ventricular inlets in the chick embryo. **Embryologische Hefte** 1987; 1: 25-37
- de la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Palomino MA. The primitive cardiac regions in the straight tube heart (Stage 9-) and their anatomical expressions in the mature heart: an experimental study in the chick embryo. **J Anat** 1989; 165: 121-131.
- de la Cruz MV, Markwald RR. 1998. Living Morphogenesis of the heart Birkhauser. USA. 233 pp.
- De Ruiter, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de Groot AC. Embryonic endotelial cell transdifferentiated into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. **Cir Res** 1997; 80: 444-451.
- Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. **Cir Res** 1995; 77: 1-6.
- García-Pelaez I, Diaz-Gongora G, Arteaga, Martínez M. Contribution of the superior atrioventricular cushion to the left ventricular infundibulum. experimental study on the chick embryo. **Acta anat (Basel)** 1984; 118: 224-230.

- Goor DA, Lillehei CW. 1975. Congenital malformations of the heart. The Anatomy of the Heart. In: Embryology, anatomy and operative considerations. New York. Grune and Stratton. 1-37 pp.
- Hamburguer B and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951; **88**: 49-92.
- Icardo JM, Colvee E. Atrioventricular valves of the mouse II. A Light and transmission electron microscopy study. *Anat Rec* 1995; **241**: 491-400.
- Krug EL, Mjaatvedt CH, Markwald RR. Induction of embryonic cardiac endothelial differentiation in to mesenchyme by myocardially derived extracellular proteins. *Dev Biol* 1987; **120**: 348-355.
- Krug EL, Razaee M, Isokawa K, Turner DK, Litke LL, Wunsch AM, Bain JL, Riley DA, Capehart AA, Markwald RR. Transformation of cardiac endothelium into cushion mesenchyme is dependent of ES/130: temporal, spatial, and functional studies in the early chick embryo. *Cell Mol Biol Res* 1995; **41**:263-77.
- Lamers WH, Viragh S, Wessels A, Moorman AF, Anderson RH. Formation of the tricuspid valve in the human heart. *Circulation*. 1995; **91**(1): 111-121.
- Mandarim CA. A multivariate analysis of cardiac growth in human embryos: endocardial cushions and ventricular myocardium. *Cardiovas Res* 1991; **25**: 855-860.
- Markwald RR, Fitzharris TP, Manasek FJ. Structure and developmen of endocardial cushions. *Am J Anat* 1977; **148**: 85-120.
- Markwald, Mjaatvedt C, Krug E, Sinning A. Inductive interactions in heart development. Role of cardiac adherons in cushion tissue formation. Embryonic origing of defective heart. Development. *Annals of the NY Acad of Science* 1990;**588**:13-25

- Mjaatvedt CH, Markwald RR. Induction of epithelial-mesenchymal transition by an in vivo adhesion-like complex. *Dev Biol* 1989;136:118-128.
- Moreno-Rodríguez RA, de la Cruz MV, Krug EL. Temporal and spatial asymmetries in the initial distribution of mesenchyme cells in the atrioventricular canal cushions of the developing chick heart. *Anat Rec* 1997;284:84-92.
- Morse DE, Hamlett W Noble CW. Morphogenesis of chordae tendineae. I: Scanning electron microscopy. *Anat Rec* 1984; 210: 629-638.
- Netter FH. 1993. Anatomía. En: Netter, F.H. Corazón. Tomo 5. Ciba. Barcelona. pp. 4-12.
- Odgers PNB. The development of the atrio-ventricular valves in man. *J Anat* 1939; 73: 643-657.
- Oosthoek PW, Wenink ACG, Wrolijk BCM, Wisse LJ, De Ruiter MC, Poleman RE, Gittenberger de Groot A.C. Development of the atrioventricular valve tension apparatus in the human heart. 1997
- Patten BM. 1964. Foundations of embryology. 2a.Ed. International Student Edition. New York. pp. 545-563.
- Ranganathan N, Lam JHC, Wigle DE, Silver MD. Morphology of the human mitral valve. II. The valve leaflets. *Circulation* 1970; 41:459-467.
- Spence SG, Argraves WS, Walters L, Hungerford JE, Little CD. Fibulin is localized at sites of epithelial-mesenchymal transitions in the early embryo. *Dev Biol* 1992; 151: 73-84.
- Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994; 144: 275-285.

- Ugarte M, Enriquez de Salamanca F, Quero M. Endocardial cushion defects an anatomical study of 54 specimens. **British Heart Journal** 1976; **38**: 674-682.
- Van Gils FAW. The developmen of the human atrioventricular heart valves. **J Anat** 1979; **128**: 427 (abstr).
- Van Mierop LHS, Alley RD, Kausel HW, Stranahan Abany MD. The anatomy and embryology of endocardial cushion defects. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1962; **43**: 71-83.
- Van Mierop LHS, Gessner IH. Pathogenetic mechanisms in congenital cardiovascular malformations. **Prog Cardiovasc Dis** 1972; **15**: 67-85.
- Van Mierop LHS, Patterson DF, Schnar WR. Hereditary conotruncal septal defects in Keeshond dogs: Embriologic studies. **Am J Cardiol** 1977; **40**: 936-950.
- Wenink ACG, Gittenberger-de Groot AC, Straddling mitral and tricuspid valves. Morphological differences and developmental backgrounds. **Am J Cardiol** 1982b; **49**: 1959-1971.
- Wenink ACG, Gittenberger de Groot AC. Embryology of the mitral valve. **Int J Cardiol** 1986a; **11**: 75-84
- Wenink ACG, Gittenberger de Groot AC, Brom AG. Developmental considerations of mitral valve anomalies. **Int J Cardiol** 1986b; **11**: 85-98.
- Wenink ACG. Quantitative morphology of the embryonic heart: an approach to development of the atrioventricular valves. **Anat Rec** 1992; **234**: 129-135.
- Wenink ACG, Wisse BJ, Groenendijk PM. Developmen of the inlet portion of the right ventricle in the embryonic rat heart: The basic for tricuspid valve development. **Anat Rec** 1994; **239**: 216-223.

- Wessels A, Markman MWM, Vermeulen JLM, Anderson RH, Moorman AFM, Lamers WH. The development of the atrioventricular junction in the human heart. *Cir Res* 1996; 78: 110-117.
- Villavicencio GL. 1997.. Torsión del Tubo Cardíaco Embrionario y regiones cardíacas primitivas. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias, UNAM. México.
- Wunsch A, Little CD, Markwald RR. Cardiac endothelial heterogeneity is demonstrated by the diverse expression of JB3 antigen, a fibrillin-like protein of the endocardial cushion tissue. *Dev Biol* 1994; 165: 585-601.

13. APÉNDICE

13.1. SOLUCIONES:

1. AMORTIGUADOR DE CACODILATO DE SODIO

Se prepara una solución de cacodilato de sodio 0.1 M disuelta en agua destilada. El pH se debe ajustar entre 7.2-7.4 con ácido clorhídrico (0.1N).

2. FIJADORES

a. FIJADOR DE KARNOVSKY MODIFICADO, pH 7.3 (100 ml)

SOLUCIONES

Glutaraldehído al 2.5%

Paraformaldehído al 1.0%

Cacodilato de sodio al 0.1M

Procedimiento

Se disuelve el paraformaldehído en agua bidestilada (aproximadamente 25 ml) calentando entre 60 a 70 °C. Se puede agregar 0.1 ml de una solución de hidróxido de sodio al 1N para que la solución se aclare. Posteriormente se agrega 50 ml de una solución de cacodilato de sodio al 0.2M, 10 ml de glutaraldehído al 25% y 15 ml de agua bidestilada. El pH se debe ajustar a 7.3 con ácido clorhídrico ó con hidróxido de sodio.

b. TETRAOXIDO DE OSMIO EN AMORTIGUADOR DE ZETTERQVIST

(Rhodin, 1954 y Zetterqvist, 1956).

Para la preparación de este fijador se requiere de cuatro soluciones:

-SOLUCIÓN "A"

Veronal sódico (barbital) 0.16M

Acetato de sodio 1M

Se preparan 50 ml de esta solución empleando agua bidestilada:

-SOLUCION "B"

Ácido clorhídrico	0.1N
-------------------	------

-SOLUCION "C"

1. Cloruro de sodio	1.37M
---------------------	-------

2. Cloruro de potasio	0.05M
-----------------------	-------

3. Cloruro de calcio	0.02M
----------------------	-------

Se prepara 50 ml de solución disolviendo los anteriores reactivos en agua bidestilada

SOLUCIÓN "D"

Se obtiene una solución del 2% de tetróxido de osmio en agua bidestilada. Los cristales de este reactivo se dejan disolver por un espacio de 12 a 24hrs.

Procedimiento

Se toman 20 ml de la solución "A" y se mezclan con 6 ml de la solución "C". Se agregan 22 ml de la solución "B" (0.1N de ácido clorhídrico) y 52 ml de la solución de tetróxido de osmio. El pH se ajusta a pH 7.2-7.4 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. Este fijador se mantiene en obscuridad a una temperatura de 6°C.

3. MEDIO DE INCLUSION

El medio de inclusión seleccionado fue EPON 812, una resina hidrofóbica. Para su preparación primero se obtienen dos mezclas una de la resina y otra de la resina con su endurecedor, a la combinación de estas mezclas se les adiciona el catalizador. Las concentraciones que se usan para las diferentes mezclas son:

Mezcla "A"

Epon 812	50ml
----------	------

Anhídrido dodecenil succinico (DDSA)	81ml
--------------------------------------	------

Mezcla "B"

Epon 812	50ml
----------	------

Endurecedor anhídrido metil nadico (NMA)	44ml
--	------

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE INCLUSIÓN

La mezcla "A" se combina con la mezcla "B" en una proporción de 7:3, una vez combinadas se adicionan 0.15 ml del acelerador 2,4,6-Tri(dimetilaminometil)-fenol (DMP-30) por cada 10 ml de la mezcla compuesta (mezcla A y mezcla B). La mezcla final se tapa y agita lentamente aproximadamente 20 min.

4. COLORANTE PARA CORTES SEMIFINOS

-AZUL DE TOLUIDINA

Azul de ortotoluidina 0.5%

Tetraborato de sodio 4.0%

Para preparar un litro de colorante, se disuelve el azul de ortotoluidina en 300 ml de agua destilada, se agrega el tetraborato de sodio, se mezclan bien y se afora a 1lt. La solución se pone a hervir durante 15 minutos y posteriormente se filtra.

5. CONTRASTADORES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

-ACETATO DE URANILO

Se prepara acetato de uranilo al 2.5% disuelto en agua bidestilada y posteriormente se filtra.

-CITRATO DE PLOMO

Se prepara un volumen de 10 ml de una solución de citrato de plomo al 0.3% disuelto en agua bidestilada fría, previamente hervida. Posteriormente se agrega 0.1ml de hidróxido de sodio 1 N. Esta solución se debe proteger de la luz, durante y después de la preparación. No se debe aspirar cerca de esta solución.

13.2. PROCESAMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

a. FIJACIÓN

El material biológico se fija a una temperatura de 4 °C en una solución de Karnovsky modificada (libre de calcio) en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.16M a pH 7.2. 1hr

Se lava en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.16 M a pH 7.2 1hr

Se postfija con tetróxido de osmio al 1% (Zetterqvist, 1956) 1hr

Se lava tres veces con agua destilada.

b. DESHIDRATACIÓN

El Material se deshidrata durante 10 minutos en alcoholes graduales del 70,80,90,95 %.

En el alcohol de 100% el material se deja por 20 minutos, este paso se repite dos veces.

El material se coloca en oxido de propileno por 20 minutos, dos veces.

c. IMPREGNACIÓN

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La preinclusión se realiza en tres pasos incrementando la concentración de epon, como sigue:

1. Preinclusión en resina epóxica y óxido de propileno (1:1) 1hr

2. Preinclusión en resina epóxica y óxido de propileno (2:1) 1hr

3. Preinclusión en resina epóxica pura, el tiempo de impregnación varía según el tamaño de la muestra, en nuestro caso se dejó impregnar durante 8 hrs.

d. INCLUSIÓN

La inclusión se hace en moldes de polietileno planos, de diferentes tamaños según la muestra y se polimeriza en una estufa a 60°C durante 24hrs.

e. CORTES EN ULTRAMICROTOMO Y CONTRASTE:

Se realizaron cortes semifinos de 1 a 3 μm de grosor de las muestras incluidas en epon. Los cortes se manipularon con una asa para poder teñirlos y montarlos. Una vez obtenidos los cortes se tiñeron por flotación en azul de toluidina, se lavaron en agua destilada. Se pasaron a alcohol para quitar el exceso de colorante y se volvieron a lavar en agua destilada. Los cortes se observaron con microscopía de luz para localizar la región de interés. Posteriormente se hicieron cortes finos (80-90 nm) del área a estudiar, tallando una segunda pirámide. Los cortes finos se montaron en rejillas metálicas de cobre de 100 mesh.

Una vez montados, los cortes se contrastaron con acetato de uranilo por 10 minutos, se lavaron con agua corriente, se dejaron secar a la intemperie y se tiñeron con citrato de plomo por 1 minuto, se volvieron a lavar con agua corriente y se dejaron secar. Los cortes montados y contrastados se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol-1010.