

120
00287



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESARROLLO EMBRIOLOGICO DE LAS CAMARAS DE ENTRADA
VENTRICULARES (INLETS). ESTUDIO EXPERIMENTAL EN EL
EMBRION DE POLLO.

T E S I S

Para obtener el Grado Académico de
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

Presentada por la

M. EN C. CONCEPCION SANCHEZ GOMEZ



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



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.

I N D I C E .

RESUMEN.....	I
1. BREVES COMENTARIOS SOBRE EL DESARROLLO EMBRIOLOGICO DEL CORAZON.....	1
2. ANTECEDENTES HISTORICOS.....	10
3. HIPOTESIS.....	13
4. OBJETIVO.....	14
5. MATERIAL.	
5.1. <u>Material Biológico</u>	14
5.2. <u>Cristalería</u>	14
5.3. <u>Instrumental Quirúrgico</u>	15
5.4. <u>Reactivos y Soluciones.</u>	
5.4.1. <u>Reactivos</u>	16
5.4.2. <u>Soluciones.</u>	
5.4.2.1. Solución Ringer para aves.....	17
5.4.2.2. Bouin Acuoso.....	17
5.4.2.3. Solución de Verde Luz.....	18
5.4.2.4. Amortiguador de Cacodilato 0.16 M pH 7.2.....	18
5.4.2.5. Acido Clorhídrico 0.1 M.....	18
5.4.2.6. Glutaraldehído 2.5% en amortiguador de Cacodilato 0.16 M pH 7.2.....	18
5.4.2.7. Amortiguador de Cacodilato 0.32 M pH 7.2.....	18
5.4.2.8. Solución Madre de Tetróxido de Osmio....	18

5.4.2.9. Solución de Trabajo de Tetróxido de Osmio.....	19
5.5. <u>Materiales Varios</u>	19
5.6. <u>Equipos</u> .	
5.6.1. <u>Equipos de Incubación</u>	19
5.6.2. <u>Equipos de Esterilización</u>	20
5.6.3. <u>Equipos Opticos</u>	20
5.6.4. <u>Equipos para Preparación de Muestras de Microscopía Electrónica de Barrido</u>	21
5.6.5. <u>Equipos Fotográficos</u>	21
5.6.6. <u>Equipos Varios</u>	21
6. <u>TECNICAS</u> .	
6.1. <u>Técnicas de Cultivo</u> .	
6.1.1. <u>Técnica de cultivo in vitro</u>	22
6.1.2. <u>Técnica de cultivo in ovo</u>	23
6.2. <u>Técnicas para Preparar las Marcas</u> .	
6.2.1. <u>Marca de Oxido de Hierro</u>	23
6.2.2. <u>Marca de gelatina-tinta china</u>	23
6.3. <u>Técnica de Tinción en Block (Verde Luz)</u>	24
6.4. <u>Técnica para Preparar Muestras para Microscopía Electrónica de Barrido</u>	25
6.5. <u>Técnica para Preparar Cajas para Microdisecciones</u> ..	25
6.6. <u>Técnicas de Fotografía</u> .	
6.6.1. <u>Técnica de registro fotográfico para cultivo in vitro</u>	26

6.6.2. <u>Técnica de registro fotográfico para</u> <u>cultivo in ovo</u>	26
7. METODO.....	27
<u>Experimentos de marcaje</u>	27
Serie I.....	28
Serie II.....	31
<u>Estudios de anatomía microscópica</u>	32
8. RESULTADOS.	
<u>Experimentos de marcaje</u>	33
Serie I.....	33
Serie II.....	34
<u>Estudios de anatomía microscópica</u>	34
9. DISCUSION.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	42
TABLA 1.....	48
ILUSTRACIONES.....	49

RESUMEN

Se estudió mediante las técnicas de marcaje *in vivo* el desarrollo de las cámaras de entrada ventriculares (inlets) en el embrión de pollo. Se usaron como marcas, partículas de óxido de hierro y una mezcla de gelatina-tinta china. El marcaje se inició en el estadio 9⁻ (corazón en etapa de preasa) y las marcas se rastrearon hasta corazón maduro (estadio 35). También se hizo un estudio anatómico cuidadoso con microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido del corazón de embriones de pollo de los estadios 12, 14, 18 y 35. Los resultados de este trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones: 1) El estadio de aparición del **primordium** de las cámaras de entrada ventriculares es el estadio 12 (etapa de asa). 2) El **primordium** de las cámaras de entrada ventriculares cuando aparece (estadio 12), es único y se encuentra ubicado en la rama caudal del asa a 110 μm del surco interventricular izquierdo, siendo su límite cefálico (ventricular) el **primordium** de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo y el caudal (atrial) los atrios primitivos. Por consiguiente ambas aurículas primitivas se comunican con el **primordium** de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo a través del **primordium** de las cámaras de entrada ventriculares. 3) Mediante los procesos de torsión del asa bulboventricular, la pared anterior del **primordium** de las cámaras de entrada ventriculares del estadio 12, da origen en el corazón maduro (estadio 35) a la pared izquierda del ventrículo izquierdo y el surco atrioventricular derecho del estadio

12 a la región del surco atrioventricular izquierdo próxima a la cruz del corazón. 4) Se confirma lo dicho por de la Cruz, et al, (1983) de que en el estadio 18, cuando se inicia la septación del corazón el **primordium** de las cámaras de entrada ventriculares que era único, queda dividido en cámara de entrada ventricular derecha e izquierda por los cojines dorsal y ventral del canal atrioventricular, que forman parte de un primer **septum** cardiaco que está constituido además por el **septum primum** y el tabique interventricular primitivo, sin que exista un límite de demarcación entre estas estructuras. Las características anatómicas peculiares de este **septum**, permiten que cada una de las aurículas se comunique con su ventrículo correspondiente.

La información obtenida en este trabajo amplía los conocimientos que tenemos respecto a las regiones cardiacas primitivas y su expresión anatómica en el corazón maduro y nos lleva a cuestionar el concepto preformista que existe respecto a la morfogénesis normal del corazón. Además se proporciona una base embriológica sólida a la división anatómica de los ventrículos propuesta por Anderson et al, (1978) y Anderson y Becker (1981). Estos nuevos conocimientos nos permiten explicar la existencia de las cardiopatías congénitas complejas e inferir que la complejidad de estas cardiopatías, depende del estadio del desarrollo en que ocurre la acción teratogénica.

1.- BREVES COMENTARIOS SOBRE EL DESARROLLO EMBRIOLOGICO DEL CORAZON.

La embriogénesis del corazón del pollo será estudiada dentro del contexto de un organismo en desarrollo y siguiendo una secuencia cronológica.

El desarrollo ontogenético del pollo se realiza mediante la reproducción sexual, en ella se producen nuevos individuos a partir de células sexuales especiales denominadas gametos que difieren de las otras células del organismo debido a que mediante un proceso de maduración nuclear (meiosis) y citoplasmática se convierten en células haploides altamente especializadas para llevar a cabo la fertilización (Balinsky, 1981). La fertilización es el proceso mediante el cual dos células sexuales (gametos) se fusionan y dan origen a una célula huevo o cigoto, célula totipotencial a partir de la cual se desarrollará un nuevo individuo, con características genéticas derivadas de ambos progenitores. Este proceso, lleva implícitas dos actividades independientes: una actividad sexual (la combinación de los genes derivados de ambos progenitores) y una actividad reproductora (la creación de un nuevo organismo). En la primera función se realiza la transmisión de genes de los progenitores al nuevo individuo y en la segunda se activa el ovocito para que inicie su desarrollo. La siguiente etapa de la embriogénesis es la segmentación, que consiste en una serie de divisiones mitóticas que se suceden en forma muy ordenada y con gran rapidez. En este periodo el cigoto unicelular, se transforma en un complejo pluricelular que no aumenta de tamaño y cuyas células

las mantienen una baja síntesis de proteínas principalmente implicadas en el proceso de multiplicación celular, además la actividad transcripcional es escasa. A medida que el cigoto se segmenta las células (blastomeros) son más pequeñas y se disponen en una capa celular epitelial de tres a cuatro células de espesor y forman la blástula o blastodisco. En los estadios previos a la blástula no se ha podido identificar la existencia de células con capacidad para desarrollar tejido cardíaco.

La blástula está constituida por dos capas de células (capas blastodérmicas), el epiblasto y el hipoblasto y una cavidad que se llama blastocele. En este estadio están presentes los grupos celulares que darán origen a diferentes órganos (Spratt, 1946). Dichos grupos celulares denominados preáreas órgano formadoras están formados por células morfológicamente semejantes entre sí con una localización topográfica precisa por lo que su identificación y localización en el embrión se ha realizado mediante las técnicas de marcaje *in vivo*, rastreando las marcas hasta su ubicación final en un órgano específico. Las células de las preáreas órgano formadoras aún no están determinadas para dar origen a un tipo celular específico, es decir pueden cambiar su destino final normal (destino prospectivo) según el tipo de células y las características fisicoquímicas de la matriz extracelular que las rodean. Si una preárea se injerta en otra zona del embrión que normalmente no le corresponde, sus células dan origen al tejido característico de la preárea en la que

fue injertada. Por ejemplo, un injerto de la preárea cardiaca en la preárea del riñón, da origen a tejido renal y no a tejido cardiaco. Rosenquist y DeHaan (1966) estudiaron las preáreas Órgano formadoras en el embrión de pollo, ellos usaron como marcador timidina tritiada y describieron en la blástula del embrión de pollo dos preáreas cardiacas localizadas en la zona mesodermal del epiblasto y ubicadas a ambos lados de la línea primitiva, a nivel de su tercio medio.

La gastrulación, es la siguiente etapa del desarrollo embrionario y se caracteriza por presentar una serie de movimientos de poblaciones celulares denominadas movimientos morfogénéticos que originan a la gástrula, formación triblastica compuesta por: ectodermo, mesodermo y endodermo. Los movimientos morfogénéticos, crean una nueva relación entre las distintas poblaciones celulares que permite su interacción normal, indispensable para que se lleve a cabo la diferenciación celular. Esta etapa es muy importante, porque es cuando se establece el patrón general del desarrollo embrionario y ocurren cambios en la actividad metabólica de las células medida por el consumo de oxígeno y la utilización de glucógeno. Además es la fase en que los genes del embrión comienzan a expresarse. Al inicio de la gastrulación las células precardiacas que son mesodermales, emigran desde el epiblasto através de la línea primitiva hasta quedar ubicadas entre el ectodermo y el endodermo y se desplazan en dirección cefálica y paramedial.

El embrión en la etapa de gástrula está constituido por pequeños grupos de células que tienen una localización topográfica específica y que darán origen a los diferentes órganos. Dichos grupos celulares se denominan áreas órgano formadoras porque a pesar de que sus células aún son morfológicamente semejantes entre sí, ya están determinadas, es decir, no pueden cambiar su destino final normal (destino prospectivo) pues debido a las interacciones celulares que se establecieron en la etapa precedente, la expresión genética de las células ya ha sido seleccionada y se ha iniciado su diferenciación bioquímica, por lo tanto, la identificación y localización de las áreas órgano formadoras se ha realizado usando las técnicas de explantes, marcaje *in vivo* y recombinación de grupos celulares. De esta manera, si el área de un órgano se injerta en el área de otro órgano que no le corresponde, sus células darán origen al tejido específico del órgano que corresponde al área de donde ellas procedían, pues, no pueden cambiar su destino prospectivo. Así por ejemplo, si se injerta el área de corazón en el área que corresponde a riñón, dichas células dan origen a tejido cardíaco y no a tejido renal.

Rawles (1936) estudió la localización de las áreas órgano formadoras durante la gastrulación del embrión de pollo, mediante el cultivo de pequeños grupos celulares provenientes de regiones específicas del embrión sobre la membrana corioalantoidea. El análisis histológico de los injertos le permitió elaborar un mapa de distribución de las diferentes áreas órgano formadoras incluyen

do la existencia de dos áreas cardiogénicas (Rawles 1943). Estas últimas tienen una forma oval y están localizadas a cada lado de la línea primitiva y separadas en su extremo cefálico por una zona medial no cardiogénica de un tamaño aproximado de 0.4 mm . DeHaan (1963) en un trabajo en que usó microcinematografía espaciada, encuentra lo mismo que había descrito Rawles (1943). Posteriormente Rosenquist y DeHaan (1966) al investigar la ubicación del mesodermo cardiaco en el embrión de pollo del mismo estadio en que los había estudiado Rawles (1943), pero usando técnicas de recombinación de tejidos, marcando los injertos con timidina tritiada, concluyeron que ambas áreas cardiogénicas se encontraban unidas cefálicamente y formaban una estructura con la forma de una creciente. Finalmente Stalsberg y DeHaan (1969) hicieron un estudio más fino de las áreas cardiogénicas del embrión del estadio 5 y llegaron a la conclusión que la descripción de Rawles (1943) es la correcta, es decir, que las áreas cardiogénicas no están unidas en su extremo cefálico. En la etapa de gástrula tardía (estadio 7), las áreas cardiogénicas migran cefalomedialmente y convergen en la parte media constituyendo la placa cardiogénica que tiene forma de una "U" (DeHaan, 1963).

Terminada la etapa de gástrula, se inicia el proceso de tubulación mediante el cual, las capas germinales del embrión tienden a plegarse formando estructuras tubulares. Al mismo tiempo, ocurre la segmentación del mesodermo: en mesodermo somítico, mesodermo intermedio y mesodermo de las láminas laterales. Estas últimas, se dividen en dos hojas, una que se

asocia al ectodermo y dan origen a la somatopleura y otra que se une al endodermo, y forman la esplacnopleura.

En el embrión de pollo el corazón se manifiesta anatómicamente cuando se ha formado el primer par de somitas (estadio 7) y en el humano, al iniciarse el desarrollo del primer par de somitas (horizonte IX, 20 días). Este embrión presenta en el mesodermo esplácnico, una placa denominada placa cardiogénica, que tiene forma de una "U" y circunscribe al pliegue neural. Debido a la formación del pliegue limitante cefálico, con el consiguiente desarrollo del intestino anterior y a los cambios importantes que ocurren en el sistema nervioso cefálico, la placa cardiogénica se desplaza de su posición cefálica a una posición ventral y se ubica por debajo del epitelio del intestino anterior primitivo. Los dos primordios cardíacos se unen por su parte media y forman una canal, denominada incorrectamente tubo cardíaco primitivo o corazón en tubo recto, cuya pared dorsal la forma la pared ventral del intestino anterior. El corazón en tubo recto corresponde a lo que actualmente se denomina estadio de preasa (de la Cruz y Cayr6, 1986). Davis (1927) propuso la existencia de las cavidades cardíacas primitivas desde etapas tempranas de la formación del corazón y las defini6 como regiones específicas del corazón en tubo recto que al desarrollarse daban origen cada una de ellas a una cavidad cardíaca definitiva completa. Más tarde usando las técnicas de marcaje *in vivo* que son más adecuadas para conocer a qué regiones anatómicas dan origen las distintas estructuras

embriológicas del corazón de embrión de pollo (destino final), se encontró que en etapa de preasa (estadio 9[~]) sólo existen dos regiones: una cefálica que dará origen a la porción trabeculada del ventrículo derecho (primordium de la porción trabeculada del ventrículo derecho) y otra caudal a partir de la cual se desarrollará la porción trabeculada del ventrículo izquierdo (primordium de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo) (Palomino-Garibay, 1987 y de la Cruz, et al 1989).

En los estadios siguientes del desarrollo, el corazón presenta cambios morfológicos importantes: las paredes miocárdicas que constituyen el corazón en estadio de preasa se aproxima entre si y forman una estructura tubular que además se tuerce a la derecha y adquiere la forma de un asa convexa a la derecha y cóncava a la izquierda que se denomina asa bulboventricular y que corresponde al estadio de asa (de la Cruz y Cayré, 1986). Palomino-Garibay (1987) describió que, el corazón del embrión de pollo en el estadio de asa (estadio 12), está constituido por tres segmentos: uno cefálico, el cono, otro caudal, los atrios y un segmento intermedio, el asa bulboventricular que está separada del segmento conal por los surcos conoventriculares derecho e izquierdo y de los atrios primitivos por los surcos atrioventriculares derecho e izquierdo. El asa tiene dos porciones (ramas), la ventricular derecha o ascendente y la ventricular izquierda o descendente, ambas separadas por el surco interventricular izquierdo, además está presente el mesocárdio dorsal. En esta etapa del desarrollo

la aurícula primitiva se comunica con la rama ventricular izquierda, ésta se continúa con la rama ventricular derecha y ésta última se relaciona con el cono, de modo que las cavidades cardiacas quedan espacialmente en continuidad. Al avanzar el desarrollo del asa, su rama ascendente se hace más ventral y derecha y su rama descendente más dorsal e izquierda, el mesocardio dorsal dejar de ser evidente y surge el espacio retrocardiaco. A pesar de los múltiples trabajos experimentales realizados para conocer cuáles son los procesos básicos del desarrollo, causantes de la torsión del asa bulboventricular (Butler, 1952; Sissman, 1966; DeHaan, 1967; Lepori, 1967; Orts-Llorca y Ruano-Gil, 1967; Stalsberg, 1969a, b, 1970; Stalsberg y DeHaan, 1969; Castro-Quezada, et al, 1972; Manasek y Monroe, 1972; Sánchez-Gómez, C., 1972), aún carecemos de evidencias suficientes que nos permitan explicar dicho proceso. No obstante, es probable que el crecimiento diferencial de regiones específicas del corazón y los movimientos celulares sean los procesos más importantes involucrados en la formación del asa bulboventricular (DeHaan, 1967; Stalsberg, 1970).

La siguiente etapa del desarrollo del corazón, corresponde al estadio de post-asa. Este estadio comprende dos subestadios: el de post-asa temprana y el post-asa tardía (de la Cruz y Cayré, 1986). En el estadio de post-asa temprana (horizonte XIV de Streeter en el humano y estadio 18 en el pollo), las regiones cardiacas mediante los procesos de torsión, adquieren la posición

que tendrán en el corazón maduro, de tal manera que las aurículas primitivas ocupan una posición dorsal, la rama ascendente del asa se vuelve más derecha y la descendente más izquierda, además se inicia la septación cardiaca cuyo resultado final será un corazón constituido por cuatro cavidades independientes (dos aurículas y dos ventrículos). El primer septum que se forma está constituido por tres componentes: el septum primum que separa parcialmente ambas aurículas primitivas, los cojines dorsal y ventral del canal atrioventricular, que dividen a este canal en orificio auriculoventricular izquierdo y derecho y el tabique interventricular primitivo que separa las porciones trabeculadas de ambos ventrículos (DeVries y Saunders, 1962 y de la Cruz, et al, 1983). Este septum que en su conjunto tiene la forma de un antifaz presenta dos orificios, el foramen primum y el foramen interventricular primitivo (ver figs. 16A-D y 17B). Debido a que esta unidad septal está constituida por las tres regiones antes mencionadas, la aurícula derecha se comunica con la porción trabeculada del ventrículo derecho a través del orificio auriculoventricular derecho (tricuspide) y la aurícula izquierda con la porción trabeculada del ventrículo izquierdo mediante el orificio auriculoventricular izquierdo (mitral) (DeVries y Saunders, 1962; de la Cruz, et al, 1983).

El estadio de post-asa tardía, se caracteriza porque el cono posteromedial que se encontraba en el ventrículo derecho, se incorpora al ventrículo izquierdo, y participa en el desarrollo de

su infundíbulo además se forman otros septa cardiacos que con los antes mencionados, constituyen los tabiques cardiacos definitivos, también ocurre el desarrollo del sistema valvular auriculoventricular y de las valvulas aórtica y pulmonar. Es importante señalar que en estadios tardios del desarrollo mediante los procesos de histodiferenciación aparecen en el corazón la inervación nerviosa (sistema de conducción) (Argüello, et al, 1988) y el sistema de arterias y venas coronarias (Conte y Pellegrini, 1984).

2.- ANTECEDENTES HISTORICOS.

Los primeros conocimientos sobre la constitución embriológica del corazón en tubo recto (etapa de preasa), se obtuvieron a través de la embriología descriptiva. El trabajo más notable a este respecto es el de Davis (1927), que estudió embriones humanos de diferentes edades y estableció que en el corazón en tubo recto (etapa de preasa) (embrión 3709 de la colección Carnegie), aparecen diferentes regiones separadas por surcos externos, con sus correspondientes crestas entales y que cada una de estas regiones da origen a una cavidad cardiaca definitiva completa y las denominó cavidades cardiacas primitivas. Estas cavidades cardiacas primitivas son en sentido céfalo-caudal: el bulbo aórtico, el bulbus cordis, el ventrículo primitivo y los atrios primitivos derecho e izquierdo y dan origen en el corazón maduro a las grandes arterias, al ventrículo derecho, al ventrículo izquierdo y a los atrios derecho e izquierdo respectivamente.

DeVries y Saunders (1962) estudiaron también, mediante las técnicas de la embriología descriptiva el desarrollo de los ventrículos y de sus tractos de salida en el corazón maduro y a pesar de que modificaron la nomenclatura de Davis (1927), conservaron el concepto de cavidades cardiacas primitivas de este autor. Ellos denominaron tronco arterioso al bulbo aórtico, al *bulbus cordis* lo dividieron en dos regiones, una proximal, el *primordium* del ventrículo derecho trabeculado y otra distal, el *primordium* del infundíbulo y además al ventrículo primitivo le llamaron ventrículo izquierdo.

Patten, (1929); Romanoff, (1960); Stalsberg y DeHaan (1969); de la Cruz, et al, (1972); Dor y Corone, (1973) y Virágh et al (1989), estudiaron el desarrollo normal del corazón del embrión de pollo, con las técnicas de la embriología descriptiva y describieron en el corazón en etapa de preasa (estadio 9⁻) las mismas cavidades cardiacas primitivas y les atribuyeron el mismo destino propectivo que había establecido Davis (1927), en el corazón del embrión humano de morfología similar a la del embrión de pollo.

Los resultados obtenidos mediante el uso de las técnicas de marcaje *in vivo*, en el estudio del corazón en etapa de preasa (estadio 9⁻) en el embrión de pollo, negaron el concepto de "cavidades cardiacas primitivas", porque demostraron que el corazón en etapa de preasa está constituido exclusivamente por dos regiones, una cefálica que dará origen solamente a la porción trabecu

lada del ventrículo derecho y que por lo tanto denominamos **primordium** de la porción trabeculada del ventrículo derecho, y otra caudal que únicamente formará la porción trabeculada del ventrículo izquierdo y que llamamos **primordium** de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo (de la Cruz, et al, 1989). Este nuevo conocimiento se pudo lograr porque las técnicas de marcaje **in vivo** permiten rastrear en forma continua y en un mismo embrión las diferentes regiones que constituyen el corazón hasta su expresión anatómica en el corazón maduro (estadio 35). Además mediante estas mismas técnicas, se ha encontrado que el cono que da origen al infundíbulo del ventrículo derecho (**primordium** del infundíbulo del ventrículo derecho) (de la Cruz, et al, 1977) y los atrios primitivos (Castro-Quezada, et al, 1972), aparecen en el estadio de asa (estadio 12), también se demostró que el **primordium** de las grandes arterias, surge en la etapa de post-asa (estadio 13-22) (Richter & Lemez, 1965; de la Cruz, et al, 1977).

Todos estos hechos demuestran que durante el desarrollo del corazón desde el estadio de preasa (estadio 9^o) hasta el de post-asa temprana (estadio 13-22), aparecen diferentes zonas (primordios) que dan origen cada una de ellas a un a región anatómica específica de una cavidad cardiaca definitiva en el corazón maduro por lo que las denominamos "regiones cardiacas primitivas" (de la Cruz, et al, 1989). Estos nuevos conocimientos logrados mediante las técnicas de marcaje **in vivo** también están apoyados por los resultados obtenidos usando las técnicas de registro de potenciales eléctricos intracelulares en el estudio del desarrollo normal del cora-

zón del embrión de pollo (Argüello, et al, 1986).

Anderson et al , (1978) y Anderson y Becker, (1981) propusieron una división anatómica regional de los ventrículos que identifica en cada una de estas cavidades tres regiones: la cámara de entrada (inlet), la región trabeculada y la cámara de salida (outlet). Mediante las técnicas de la embriología experimental hemos demostrado en el corazón embrionario la existencia de regiones (primordios) a partir de las cuales se desarrollan las cámaras de salida (de la Cruz, et al, 1977) y las regiones trabeculadas de ambos ventrículos y las denominamos "regiones cardíacas primitivas" porque cada una de ellas da origen a una región específicas de una cavidad cardíaca definitiva (De la Cruz, et al, 1989). Esta nueva información es aún incompleta porque no sabemos si existe una región cardíaca primitiva que dé origen a las cámaras de entrada ventriculares (inlets) y en qué estadio de la morfogénesis del corazón aparece.

3.- HIPÓTESIS.

Debido a que el corazón en tubo recto (estadio 9⁻) está constituido exclusivamente por los primordia de la porción trabeculada de ambos ventrículos (de la Cruz, et al, 1989) y que los atrios aparecen en el estadio de asa (estadio 12) (Castro-Quezada, et al, 1972), es de esperar que el primordium de las cámaras de entrada ventriculares surja en el estadio de asa (estadio 12).

Esta hipótesis la verificaremos mediante las técnicas de marcaje *in vivo* porque permiten rastrear una estructura embriológica

hasta su expresión anatómica, método adecuado para investigar el origen embriológico de las estructuras anatómicas. También se realizarán estudios de anatomía microscópica con microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido.

4.- OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es investigar si existe una región cardíaca primitiva que de origen a las cámaras de entrada ventriculares (primordium de las cámaras de entrada ventriculares) y además conocer en qué estadio del desarrollo aparece. Con esta información tendremos una idea más clara acerca de las diferentes regiones cardíacas primitivas y se proporcionará una base embriológica sólida a la división anatómica regional de los ventrículos propuesta por Anderson et al, (1978) y Anderson y Becker (1981).

5.- MATERIAL.

5.1. Material Biológico.

Huevos fértiles de gallina (Gallus domesticus) de la raza Plymouth Rock.

5.2. Cristalería.

- Asas de vidrio.
- Varilla de vidrio de 5 mm de diámetro.
- Frascos transparentes de vidrio con tapón esmerilado de 250 ml para los alcoholes y fijadores.
- Frascos ámbar de vidrio con tapón esmerilado de 250 ml para los

colorantes.

- Probetas de 100 ml Pyrex.
- Probetas de 250 ml Pyrex.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Tubos capilares.
- * Vidrios de reloj de 9 cm de diámetro Pyrex.
- * Cristalizadores de 15 cm de diámetro y 7 cm de altura Pyrex.
- * Matraces Erlenmeyer de 125 ml Pyrex.
- * Matraces Erlenmeyer de 50 ml Pyrex.
- * Vasos de precipitado de 250 ml Pyrex.
- * Cajas de Petri con diámetro de 5 cm Pyrex.
- * Cajas de Petri con diámetro de 15 cm Pyrex.
- * Pipetas Pasteur.
- * Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 ml Pyrex.
- * Anillos de vidrio Pyrex con diámetro interno de 5 mm para la técnica de New.

5.3. Instrumental Quirúrgico.

- Pinzas de punta recta sin dientes para estrabismo.
- Pinzas de punta recta de relojero del No. 5
- Pinzas curvas para iris de 1.0 mm sin dientes.
- Tijeras rectas para enucleación
- Tijeras curvas para enucleación.
- Aguja de disección de acero inoxidable.
- Aguja de disección de vidrio.

* Material estéril.

- Sierra de acero fina para hacer las ventanas en la cáscara del huevo.
- Cucharilla para extracción de embriones (espumadera).

5.4. Reactivos y Soluciones.

5.4.1. Reactivos.

- Acido acético glacial.
- Acido clorhídrico (HCl).
- Acido pícrico.
- Agua destilada.
- Alcoholes graduales.
- Benzal.
- * Bióxido de carbono (CO₂) líquido.
- ** Carbógeno al 5 %
- *** Carbón activado.
- *** Parafina histológica con punto de fusión de 58 a 60° C.
- **** Cátodo de oro.
- Cacodilato de Sodio.
- Cloruro de Calcio (CaCl₂)
- Cloruro de Potasio (KCl).
- Cloruro de Sodio (NaCl).
- Extrán neutro.

* Para desecar las muestras.

** Para cultivar los embriones.

*** Para preparar las cajas de microdissección.

**** Para recubrir las muestras para su observación con el microscopio electrónico de barrido.

- Formol.
- Grenetina.
- Glutaraldehído al 25%.
- Oxido de Hierro.
- Resina Sintética.
- Salicilato de Metilo.
- Tetróxido de Osmio (OsO_4).
- Tinta China.
- Verde Luz.
- Xilol.
- Revelador Kodak Microdol X
- Revelador Kodak HC-110.
- Revelador Kodak Dektol.
- Revelador Kodak Ektaflo tipo 1.
- Fijador rápido Kodak.

5.4.2. Soluciones.

5.4.2.1. Solución Ringer para aves.

NaCl.....	14 g.
KCl.....	0.840 g.
CaCl ₂	0.480 g.
H ₂ O destilada.....	2000 ml.

5.4.2.2. Bouin Acuoso.

Solución acuosa de ácido pícrico (saturada).....	70 ml.
Formol comercial.....	25 ml.
Acido acético glacial.....	5 ml.

5.4.2.3. Solución de Verde Luz (acuosa).

Verde Luz.....	5 g
H ₂ O destilada.....	100 ml
Acido acético glacial.....	2 ml

5.4.2.4. Amortiguador de Cacodilato 0.16 M pH 7.2.

Cacodilato de sodio.....	3.42 g
H ₂ O destilada.....	100 ml
Ajustar pH con HCl 0.1 M	

5.4.2.5. Acido Clorhídrico 0.1 M.

HCl.....	0.85 ml
H ₂ O destilada.....	100 ml

5.4.2.6. Glutaraldehído 2.5 % en amortiguador de Cacodilato
0.16 M pH 7.2.

Glutaraldehído 25%.....	10 ml
H ₂ O destilada.....	90 ml

5.4.2.7. Amortiguador de Cacodilato 0.32 M pH 7.2.

Cacodilato de sodio.....	6.84 g
H ₂ O destilada.....	100 ml
Ajustar pH con HCl 0.1 M	

5.4.2.8. Solución Madre de Tetróxido de Osmio
(Solución Acuosa 2%).

Tetróxido de Osmio.....	1 g
H ₂ O destilada.....	50 ml

5.4.2.9. Tetróxido de Osmio 1% en amortiguador de Cacodilato 0.16 M pH 7.2 (Sol. de trabajo).

Sol. Madre de Tetróxido de Osmio..... 50%
Sol. Amortiguador Cacodilato 0.32 M pH 7.2..... 50%

5.5. Materiales Varios.

- Algodón.
- Gasa.
- Papel filtro.
- Papel parafina.
- * Papel Autoadherente transparente.
- Película Kodak Flux X Pan.
- Placas de película fotográfica Kodak Kodalith.
- Papel fotográfico Kodak Kodabromide F-3.
- Papel fotográfico Ilford Ilfabrom F-4.

5.6. Equipos.

5.6.1. Equipos de Incubación.

- Una incubadora ranchera para incubar los embriones hasta que alcanzan la edad requerida para el inicio de cada experimento, con control de temperatura, humedad, ventilación y volteo automático.

* Para cubrir las ventanas en la cáscara del huevo.

- Una estufa de cultivo marca NARCO para la reincubación de los embriones después de los experimentos de marcaje; equipada con control de temperatura, humedad y CO_2 .
- Cámaras húmedas de cultivo, constituidas por una caja de Petri con 3 algodones humedecidos en agua destilada y un vidrio de reloj (Fig. 1).

5.6.2. Equipos de Esterilización.

- Campana de Flujo laminar marca VECO para esterilizar el campo de experimentación.
- Lámparas de luz ultravioleta para la esterilización del laboratorio de cultivo.
- Autoclave marca METRO para esterilizar el material de cristalería y las soluciones utilizadas en los experimentos de marcaje.
- Estufa de esterilización en seco marca RIOS-ROCHA para esterilizar el material quirúrgico.

5.6.3. Equipos Ópticos.

- Microscopio óptico marca Zeiss con objetivos de 4x, 10x, 40x y 100 x.
- Microscopio estereoscópico marca Zeiss, con un intervalo de aumento de 0.8x a 5x.
- Microscopio Multiphot marca Nikon, equipado con cámara fotográfica integrada.
- Microscopio electrónico de barrido marca JEOL.
- Ovoscopio para observar por transiluminación a través de la cáscara la posición del embrión en el interior del huevo.

5.6.4. Equipos para preparación de muestras de Microscopía Electrónica de Barrido.

- Desecador por punto crítico SAMDRI 780 A.
- Sombreados DENTON VACUM DESK-1 con cátodo de oro.

5.6.5. Equipos fotográficos.

- Cámara fotográfica Cannon F 150.
- Adaptador de Cámara fotográfica para microscopio óptico marca Zeiss.
- Cámara Nikon con adaptador para microscopio Multiphot marca Nikon.
- Amplificadora marca Amplimat.
- Cronómetro automático.
- Lámpara de seguridad con filtro rojo.
- Secadora de Papel fotográfico.
- Tanque de revelado Paterson.
- Charolas para revelado.
- Pinzas metálicas para fotografía.
- Magazines fotográficos.
- Guillotina.

5.6.6. Equipos Varios.

- Agitador Magnético.
- Balanza Analítica.
- Balanza Granataria.
- Horno para parafina.
- Mechero de Bunsen.
- Potenciómetro.

- Refrigerador.
- Soporte tripie de fierro.
- Tela de alambre con asbesto.

6.- TECNICAS.

6.1. Técnicas de Cultivo.

6.1.1. Técnica de cultivo in vitro (New, 1955)

El huevo incubado se vierte en un cristalizador que contiene solución Ringer para aves (5.4.2.1.), se procura que la yema quede totalmente sumergida en la solución, para evitar que se genere tensión superficial y el embrión se deteriore (Fig. 2). Las chala- zas y la albúmina que recubre la yema se retiran con la ayuda de una pinza recta (Fig. 3).

La membrana vitelina se corta ecuatorialmente con una tijera curva (Fig. 4), con una pinza curva sin dientes se toma el borde libre de esta membrana y con movimientos suaves, se separa del vitelo, se tiene cuidado de que el embrión no se desprenda de ella, después se introduce en el cristalizador un vidrio de reloj y el embrión adherido a la membrana vitelina se desliza sobre él (Fig. 5). La membrana vitelina con el embrión se extiende sobre el vidrio de reloj, utilizando una pipeta Pasteur (Fig. 6) y se coloca sobre ella un anillo de vidrio, se procura que el embrión quede en el centro del anillo (Fig. 7). El exceso de vitelo se retira con una pipeta Pasteur y los bordes de la membrana vitelina se doblan hacia arriba y hacia adentro del anillo cubriendo sus paredes (Fig. 8).

La albúmina fluida que sirve como medio de cultivo al embrión, se coloca por debajo de la membrana vitelina (Fig. 9).

6.1.2. Técnica de cultivo in ovo.

La cáscara de los huevos incubados se limpia con alcohol al 70%, los huevos una vez limpios se colocan en posición horizontal y con una aguja de disección se les hace un orificio en la cámara de aire, con la finalidad de evitar que el embrión se adhiera a la membrana de la cáscara, después mediante el uso de un ovoscopio se observa la posición del embrión dentro del huevo y se señala su localización exacta. Se abre en el cascarón una ventana de 1 cm² que enmarca al embrión (Fig. 10). Para reincubar el embrión, la ventana se cubre con una tira de papel autoadhesivo transparente (Fig. 11).

6.2. Técnicas para Preparar las Marcas.

6.2.1. Marca de Oxido de Hierro.

Se prepara de acuerdo a una modificación de la técnica de Stalsberg y DeHaan (1969). Se vierte una solución alcohólica de óxido de hierro en el fondo de una caja de Petri estéril; se coloca en el horno de esterilización seca a una temperatura constante de 60° C durante 20 minutos y se espera que se evapore el alcohol para obtener pequeños granulos de óxido de hierro, que se utilizan como marcas.

6.2.2. Marca de gelatina-tinta china.

Se preparan de acuerdo a la técnica propuesta por Seichert (1965). La tinta china (colorante) se usa en una proporción de 15

gotas por un mililitro de solución de grenetina estéril al 3%, ésta solución sirve para adherir la tinta china al filamento de vidrio de un grosor aproximado de 10 micrómetros, que se prepara al calentar con un mechero de Bunsen un fragmento de varilla de vidrio de 5 mm de diámetro y cuando está al rojo vivo, se estira rápidamente con una fuerza adecuada para obtener los filamentos. Estos filamentos se recubren con la solución de gelatina-tinta china, mediante el uso de una asa de vidrio que se fabrica en forma similar a la de una asa microbiológica.

6.3. Técnica de Tinción en Block (Verde Luz).

Fijador Bouin (5.4.2.2.).....	2-24 hrs.
Alcohol 70%.....	Hasta eliminar el exceso de ácido pícrico.
Rehidratar hasta H ₂ O destilada.	
H ₂ O destilada.....	10 min.
Solución acuosa de verde luz (5.4.2.3.).....	5 min.
H ₂ O destilada.....	5 min.
Alcohol 35%.....	5 min.
Alcohol 50%.....	10 min.
Alcohol 70%.....	15 min.
Alcohol 85%.....	15 min.
Alcohol 96%.....	30 min.
Alcohol absoluto (2 cambios).....	30 min. c/u
Salicilato de Metilo: Alcohol absoluto 1:1.....	30 min.
Salicilato de Metilo puro.....	Toda la noche.
Salicilato de Metilo: Xilol 1:1.....	10 min.

Xilol I..... 15 min
Xilol II..... 15 min
Montar en resina sintética.

6. 4. Técnica para Preparar Muestras para Microscopía

Electrónica de Barrido.

Amortiguador de Cacodilato
0.16 M pH 7.2 (5.4.2.4)..... 5 min
Glutaraldehído 2.5% en amorti-
guador de Cacodilato 0.16 M
pH 7.2 (5.4.2.6)..... 2 a 12 hrs
Amortiguador de Cacodilato
0.05 M pH 7.2 (5.4.2.4) (2 cambios)..... 15 min c/u
Tetróxido de Osmio 1% en -
amortiguador de Cacodilato
0.16 M pH 7.2 (5.4.2.9)..... 2 hrs
Alcohol 70%..... 15 min
Alcohol 80%..... 15 min
Alcohol 96%..... 30 min
Alcohol 100% (3 cambios)..... 30 min c/u
Desecar las muestras en el desecador por punto crítico.
Montar las muestras en los portamuestras.
Recubrir las muestras con una capa de oro de 30-50 nm en el eva-
porador de iones.

6.5. Técnica para Preparar Cajas para Microdisecciones.

La parafina se coloca en un vaso de precipitados y se di-
suelve en un horno para parafina a una temperatura constante de
60° C, se mezcla con el carbón activado en una proporción 1:1,
se vierte en una caja de Petri de 5 cm de diámetro y se deja so-
lidificar a temperatura ambiente.

6.6. Técnicas de Fotografía.

Se hicieron dos técnicas de registro fotográfico, correspondiendo cada una de ellas al tipo de técnica empleada para el cultivo del embrión.

6.6.1. Técnica de registro fotográfico para cultivo in vitro.

Las fotografías fueron tomadas al inicio y final de cada experimento en un microscopio óptico con adaptador para la cámara fotográfica Cannon F 150, con aumento de 40x, apertura del diafragma de 2.8 y tiempo de exposición de 1/2 segundo.

La película utilizada fue Kodak Plus X Pan 125 ASA, procesada en un tanque Paterson con revelador Microdol X en una proporción 1:3, 12 minutos y fijador rápido Kodak 2 minutos.

Las impresiones fueron hechas con una amplificadora marca Amplimat, en papel Kodabromide F-3 e Ilfabrom F-4, revelado con Dektol o Ektaflo diluido 2:1 y fijado con fijador rápido Kodak.

6.6.2. Técnica de registro fotográfico para cultivo in ovo.

Las fotografías del inicio del experimento fueron tomadas en un microscopio estereoscópico con adaptador para cámara fotográfica Cannon F 150, a un aumento de 28x, apertura del diafragma de 4 y tiempo de exposición de 2 segundos. El registro fotográfico de las microdisecciones fue realizado en un microscopio Nikon Multiphot con cámara fotográfica integrada, objetivo 65 mm, diafragma 4 y tiempo de exposición de un segundo.

La película, el papel fotográfico y el proceso de revelado fueron semejantes a los descritos para marcaje **in vitro**.

7.- METODO.

Se hicieron experimentos de marcaje **in vivo** con el propósito de investigar en qué estadio del desarrollo del corazón aparece la región cardiaca primitiva que da origen a la cámara de entrada ventricular (Fig. 12). Una vez que se identificó esta región, se realizaron estudios de anatomía microscópica.

Se utilizaron huevos fértiles de gallina de la raza Plymouth Rock que se incubaron a una temperatura de 37.5° C - 38° C y una humedad relativa de 85 %, el tiempo necesario para obtener embriones de los estadios requeridos para los experimentos. La edad de los embriones se determinó usando la clasificación de los estadios del desarrollo de Hamburger & Hamilton (1951) que relaciona la cronología con la morfología.

Experimentos de marcaje.

Se hicieron dos series de experimentos de marcaje, la primera destinada a conocer el estadio de aparición del primordium de la cámara de entrada ventricular y a la vez precisar su límite ventricular (Figs. 12, 13). La segunda serie se hizo para investigar el límite auricular del primordium de la cámara de entrada ventricular, tabla 1 (Figs. 12, 14).

Debido a que en los estadios tempranos del desarrollo, el embrión descansa con su superficie ventral sobre el vitelo, los embriones de los estadios 9⁻ y 12 se cultivaron **in vitro** con la

con la técnica de New (1955), que mantiene al embrión con su superficie ventral hacia el observador (6.1.1). A partir del estadio 14 los embriones se cultivaron in ovo (6.1.2) porque en este estadio se inicia la circulación de la sangre y las técnicas de cultivo in vitro producen trastornos hemodinámicos que dan como resultado un desarrollo anormal del corazón.

Los embriones cultivados in vitro se marcaron con partículas de óxido de hierro (6.2.1) porque en los estadios tempranos del desarrollo las paredes del corazón son muy friables y no permiten el empleo de las marcas de gelatina-tinta china. Los embriones cultivados in ovo se marcaron con una mezcla de gelatina-tinta china (6.2.2), ya que las paredes del corazón son menos friables y es posible introducir la marca sin interferir con el desarrollo normal del corazón.

Los embriones de las dos series de experimentos fueron rein cubados en una estufa de cultivo a 37.5° C, 90% de humedad y una tensión de CO₂ de 5%.

También se cultivaron embriones controles que se incubaron bajo las mismas condiciones que los embriones marcados, además los corazones marcados de las dos series de experimentos, fueron comparados con corazones normales de la misma edad.

Serie I.

Este experimento se realizó para investigar si en el estadio 12 (asa) aparece el primordium de las cámaras de entrada ventriculares y a la vez establecer sus límites con el primordium de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo (Figs.

12, 13). Elegimos el estadio 12 (asa) porque sabemos que en el corazón en preasa (estadio 9⁻) existe solamente el **primordium** de la porción trabeculada de ambos ventrículos. Con este propósito colocamos una marca (a) en el extremo caudal del corazón en preasa (estadio 9⁻) (Figs. 12A, 13A), la estudiamos en estadio 12 (asa) (Figs. 12B, 13B) y continuamos con el rastreo hasta corazón maduro (estadio 35) (Figs. 12D, 13F). Por las razones de orden técnico antes mencionadas, tanto de cultivo como de marcaje *in vivo*, este experimento se realizó en tres etapas.

En la primera etapa a cuarenta y cinco embriones del estadio 9⁻ cultivados *in vitro* (6.1.1), se les colocó una partícula de óxido de hierro (marca a) en el extremo caudal del corazón y se rastreo hasta el estadio 12 (estadio de asa) (Figs. 12A, B; 13A, B). Para colocar esta marca fue necesario dejar expuesto el corazón mediante la técnica de Castro-Quezada, et al (1972), que consistió en lo siguiente: se hicieron dos cortes paramediales en la membrana del saco vitelino que se extendían desde el pliegue subcefálico hasta el nivel del primer par de somitas. Posteriormente se hizo un corte perpendicular a los anteriores y paralelo, adyacente y caudal al pliegue subcefálico para poder plegar la membrana hacia la región caudal. Se tomó una pequeña partícula de óxido de hierro con una aguja de vidrio, se colocó en el extremo caudal del corazón y se verificó que quedara bien incrustada en las paredes cardiacas para evitar que se desprendiera.

La segunda etapa de este experimento se realizó como un paso *in termedio* para rastrear la marca (a) desde el estadio 12 al 14

porque como ya se había mencionado, las técnicas de cultivo *in vitro* no permiten el desarrollo normal del corazón después del estadio 14. En esta etapa, cuarenta y cinco embriones del estadio 12 fueron marcados en el mismo sitio donde se encontró la marca (a) al final de la etapa anterior, es decir en la rama caudal del asa a 110 micrómetros del surco interventricular izquierdo (Compare C con B en Fig. 13). Esta marca se rastreó hasta el estadio 14 (Figs. 12C, 13D). Las técnicas de cultivo y marcaje fueron iguales a las descritas en la primera etapa.

La tercera etapa se hizo para continuar el rastreo de la marca (a) hasta corazón maduro (estadio 35). Cuarenta y cinco embriones del estadio 14 se marcaron con gelatina-tinta china y se cultivaron *in ovo* (6.1.2), se colocó la marca (a) en el mismo lugar en el que se encontró al final del experimento de la segunda etapa, o sea en la superficie cóncava del asa en su rama caudal a 135 micrómetros del surco interventricular izquierdo (Compare E con D en Fig. 13). Para colocar la marca de gelatina-tinta china, se expuso el corazón diseccionando la membrana vitelina, la pared ventral del cuerpo y la membrana pericárdica, se tomó un fragmento de filamento de vidrio de aproximadamente 5 mm de largo cubierto con gelatina-tinta china (marca a), se introdujo en la pared del corazón en la región a marcar y se dejó durante 15 minutos, después se retiró el filamento de vidrio quedando una película de gelatina-tinta china incrustada en el tejido. Una vez terminado el marcaje, los embriones se reincubaron hasta alcanzar el estadio 35 (corazón maduro) (Figs. 12D, 13F).

Al final de este experimento, los embriones fueron fijados y se disecó el corazón para conocer la ubicación definitiva de la marca (a).

Serie II.

Este experimento se hizo para investigar si el surco atrioventricular del estadio 12 corresponde al surco atrioventricular del corazón maduro (estadio 35) y de esta manera establecer el límite atrial del primordium de las cámaras de entrada ventriculares (Figs. 12, 14). Con este propósito, se colocó una - marca (b) en el surco atrioventricular derecho en el estadio 12 y se rastreó hasta corazón maduro (estadio 35) (Figs. 12, 14). Por las razones de orden técnico antes mencionadas este experimento se tuvo que realizar en dos etapas.

En la primera etapa en cuarenta y cinco embriones del estadio 12 se colocó una marca (b) en el surco atrioventricular derecho y se rastreó hasta el estadio 14 (Figs. 12B, C; 14A, B). Estos embriones fueron cultivados con su superficie ventral hacia arriba usando la técnica de New (1955) (6.1.1) y fueron disecados con la técnica de Castro-Quezada (1972). La marca que se colocó fue una partícula de óxido de hierro usando la técnica descrita en - la etapa 1 de la Serie I.

La segunda etapa se llevó a cabo para continuar rastreando la marca b hasta corazón maduro (estadio 35) (Figs. 12C, D; 14C,D). Cuarenta y cinco embriones del estadio 14 fueron marcados en el mismo sitio donde la marca (b) se encontró al final del experi--

mento de la etapa anterior, o sea en el surco atrioventricular derecho (Compare C con B en Fig. 14). El marcaje en esta serie fue hecho in ovo (6.1.2), usando una mezcla de gelatina-tinta china y siguiendo la misma técnica descrita para el marcaje en la etapa 3 de la Serie I. Una vez colocada la marca, los embriones se reincubaron hasta alcanzar la etapa de corazón maduro (estadio 35) (Figs. 12D, 14D). Al final del experimento, los embriones fueron fijados y el corazón fue disecado para buscar la ubicación final de la marca (b).

Estudios de anatomía microscópica.

Se estudiaron los cambios morfológicos en el corazón de los embriones de los estadios 12, 14, 18 y 35, se puso especial énfasis en la relación topográfica que guardan la diferentes estructuras embriológicas que integran el corazón en estos estadios. Con este propósito se hicieron microdisecciones, tinciones en block y estudios de microscopía electrónica de barrido.

Los corazones disecados, se fijaron en alcohol al 70% y se fotografiaron con un microscopio Nikon Multiphot. Los embriones teñidos en block, se fijaron en Bouin (5.4.2.2), se tiñeron con verde luz (5.4.2.3) y se transparentaron con salicilato de metilo-xilol (6.3). Para realizar los estudios de microscopía electrónica de barrido, los embriones se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguados de cacodilato 0.16 M (5.4.2.6), se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1% (5.4.2.9), se deshidrataron con alcoholes graduales y se desecaron por punto crfti

co con CO₂, en un desecador Samdri 780 A. Las muestras se cubrieron con una capa de oro de 35 nm de espesor en un sombreador - Denton-Vacuum Desk 1A y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol (6.4). A los embriones de los estadios 18 y 35 se les hizo una disección previa de las cavidades cardíacas para poder estudiar con mayor precisión su estructura anatómica.

8.- RESULTADOS.

Experimentos de marcaje.

Serie I.- Esta serie se realizó en tres etapas, en la primera, en los cuarenta y cinco embriones en que se colocó la marca (a) en el extremo caudal del corazón en etapa de preasa (estadio 9⁻) (Figs 12A, 13A), la marca se halló en el estadio 12 en la superficie ventral o anterior del asa, en su rama caudal a una distancia promedio de 110 micrómetros del surco interventricular izquierdo (Figs. 12B, 13B). En la segunda etapa los cuarenta y cinco embriones en los que se colocó la marca (a) en el estadio 12 en el mismo sitio en que se encontró dicha marca (a) al final de la etapa anterior (Compare C con B en Fig. 13), ésta marca fue encontrada en el estadio 14 en la superficie ventral o anterior del asa, en su rama caudal a 135 micrómetros del surco interventricular izquierdo (Figs. 12C, 13D). En la tercera etapa en los cuarenta y cinco embriones del estadio 14 en los que se colocó la marca (a) en el mismo lugar en que apareció al final de la etapa anterior (Compare E con D en Fig. 13), dicha marca (a) se

halló en el corazón maduro (estadio 35) en la pared libre del ventrículo izquierdo, en el límite entre la porción lisa y trabeculada (Fig. 13F).

Serie II.- Esta serie se realizó en dos etapas, en la primera, los cuarenta y cinco embriones en que se colocó la marca (b) en el surco atrioventricular derecho en el estadio 12 (asa) (Figs. 12B, 14A) presentaron la marca en el estadio 14 en este mismo surco (Figs. 12C, 14B). En la segunda etapa en los cuarenta y cinco embriones en que se colocó la marca (b), en el estadio 14 en el mismo sitio en que se encontró al final de la etapa anterior o sea en el surco atrioventricular derecho (Compare C con B en Fig. 14), dicha marca se encontró en el corazón maduro (estadio 35) en 20 casos en el surco atrioventricular izquierdo en la proximidad de la cruz del corazón y en 25 en la inserción septal de la valva anterior de la mitral (Figs. 12D, 14D).

Estudios de anatomía microscópica.

Las microdisecciones, tinciones en block y observaciones con el microscopio electrónico de barrido muestran que: En el estadio 12 se ha terminado la fusión de los primordios cardiacos, el corazón tiene forma tubular y ha comenzado el proceso de torsión, aparece el asa bulboventricular que es convexa a la derecha y cóncava a la izquierda y tiene una pared anterior o ventral y otra posterior o dorsal (Fig. 15A). Esta asa tiene dos ramas, la ascendente que es derecha y cefálica y la descendente que es caudal e izquierda, ambas ramas están separadas por el surco interventricular izquierdo (Fig. 15A). Además se observa que

el surco atrioventricular derecho es más pronunciado que el izquierdo (Figs. 13B, C; 14A). Durante este estadio se termina el proceso de torsión del corazón en el plano frontal y se inicia en el plano sagital. Al mismo tiempo, la parte convexa del asa comienza a hacerse más caudal. No se encuentra alguna estructura anatómica mediante la cual se pudiera establecer el límite entre el primordium de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo y el de las cámaras de entrada de ambos ventrículos (Fig. 15A).

En el estadio 14 desaparece el mesocardio dorsal a nivel del surco interventricular izquierdo, la rama ascendente o cefálica además de ser derecha se vuelve ventral y la rama descendente o caudal además de izquierda se torna dorsal, y se origina un asa con su superficie convexa ventral y derecha y la concava dorsal e izquierda (Fig. 15B). En este estadio ambos surcos auriculoventriculares están bien definidos y no existe una estructura anatómica que permita establecer el límite entre el primordium de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo y el de las cámaras de entrada ventriculares (Fig. 15B). Aún no se ha iniciado la septación cardiaca.

En el estadio 18 las cavidades cardiacas ocupan la posición que se observa en el corazón maduro y se inicia la septación del corazón (Fig. 16). La cámara de entrada ventricular que era única, queda dividida en cámara de entrada del ventrículo derecho y cámara de entrada del ventrículo izquierdo por los cojines inferior (dorsal) y superior (ventral) del canal atrioventricular, los cuales forman parte de un septum que esta constituido

además por el *septum primum* y el tabique interventricular primitivo (Fig. 16).

En el estadio 35 se ha terminado la septación cardíaca, por consiguientes se ha cerrado el foramen interventricular (Figs. 13F, 14D, 15C). Cuando se diseccionan las paredes libres de las cavidades izquierdas, se encuentra que la aurícula izquierda se comunica con el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral y que de este ventrículo surge la aorta (Figs. 13F, 14D, 15C). Además se observa que en el ventrículo izquierdo tanto en su pared libre como en la pared septal, existe una clara delimitación entre una zona lisa, que corresponde a la cámara de entrada y otra trabeculada, que es la porción trabeculada de este ventrículo (Figs. 13F, 14D, 15C, flecha).

9.- DISCUSION.

En el estadio 12 (asa) aparece un nuevo segmento en la rama descendente del asa bulboventricular, caudal a la marca (a) (Figs. 12B, 13B) que fue colocada en el extremo caudal del corazón en tubo recto (estadio 9^o) el cual corresponde al límite entre la porción lisa y trabeculada del ventrículo izquierdo en el corazón maduro (estadio 35) (Compare F con A en Fig. 13) (de la Cruz, et al, 1959). Este hecho nos permite concluir que el *primordium* de las cámaras de entrada ventriculares, aparece en el estadio 12 (Fig. 12). Además la marca (a) fue rastreada hasta corazón maduro y se encontró en el límite entre la por--

ción lisa (cámara de entrada) y la porción trabeculada del ventrículo izquierdo (Figs. 12, 13). Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos previos obtenidos por nosotros (de la Cruz, et al, 1989) en el estudio de la constitución embriológica del corazón en tubo recto (estadio 9⁻, preasa).

La marca (b) que se colocó en el surco atrioventricular derecho en el estadio 12 (asa), fue encontrada en el corazón maduro (estadio 35) en el surco atrioventricular izquierdo, límite atrial de la cámara de entrada de este ventrículo (inlet) (Compare D con A en Fig. 14). Este resultado nos permite concluir que el surco atrioventricular derecho del corazón en el estadio 12 (asa) corresponde al límite atrial del primordium de las cámaras de entrada ventriculares (inlets). Además se comprueba que los surcos atrioventriculares y los atrios primitivos aparecen en el estadio de asa (estadio 12), como había señalado Castro-Quezada, et al, (1972). Estos resultados, unidos a los obtenidos con la marca (a), nos permiten no solamente establecer que el primordium de las cámaras de entrada ventriculares aparece en el estadio 12 (asa), sino también precisar sus límites (Fig. 12).

La marca (a) siempre se encontró en el corazón maduro (estadio 35) en la pared izquierda (pared libre) del ventrículo izquierdo, en el límite entre el inlet y la porción trabeculada, nunca la encontramos en la pared derecha del ventrículo derecho. Esto se debe a que mediante el proceso de torsión del tubo car-

diaco, la pared anterior del primordium de las cámaras de entrada ventriculares del estadio 12 será su pared izquierda en el estadio 18 y la pared posterior, su pared derecha (Compare B con A en Fig. 17). Por consiguiente la marca (a) que se encontró en el estadio 12 en la pared anterior en el límite entre el primordium de las cámaras de entrada ventriculares y el de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo (Fig. 13B), aparecerá en el mismo límite en la pared libre o izquierda del ventrículo izquierdo en el corazón maduro (estadio 35) (Fig. 13F). Es importante señalar que en el estadio 18, el primordium de las cámaras de entrada ventriculares que era único queda dividido en cámara de entrada ventricular derecha e izquierda por los cojines dorsal y ventral del canal atrioventricular que forma parte de un tabique que está constituido además por el **septum primum** y el tabique interventricular primitivo (Fig. 16). Las características anatómo-embriológicas peculiares de este **septum**, permiten que cada una de las aurículas se comuniquen con su ventrículo correspondiente (Figs. 16, 17B) (de la Cruz, et al, 1983).

La marca (b) que se colocó en el surco atrioventricular derecho en el estadio 12 (Figs. 12B, 14A), se encontró en el corazón maduro (estadio 35) en el surco atrioventricular izquierdo (límite atrial del inlet) (Figs. 12D, 14D), en la zona próxima a la cruz del corazón en 20 casos y en la inserción septal de la valva anterior de la mitral en 25 casos (Fig. 14D). Esto se debe a que mediante el proceso de torsión del tubo cardiaco, el surco atrioventricular derecho del estadio 12 (Fig. 17A flecha),

ocupa en el estadio 18 una posición inferior (Fig. 17B flecha) y además en esta región aparece el cojín inferior o dorsal del canal atrioventricular (de la Cruz, et al, 1983) (Figs. 16, 17B). Por consiguiente el surco atrioventricular derecho del estadio 12 (Fig. 14A) da origen en el corazón maduro (estadio 35) a la región del surco atrioventricular izquierdo próxima a la cruz del corazón y el cojín inferior o dorsal del canal atrioventricular a la porción de la valva anterior de la mitral que se inserta en el tabique interventricular (Fig. 14D) (de la Cruz, et al, 1983). Esto explicaría la ubicación final de la marca (b) en el corazón maduro (estadio 35).

Argüello, et al, (1986) estudiando los potenciales eléctricos intracelulares en el corazón del embrión de pollo, encontró en el estadio 12 un nuevo tipo de potencial en la región que él denominó canal atrioventricular y que corresponde en nuestro material a la región del **primordium** de los inlets que aparece también en esta estadio. Estos hallazgos apoyan nuestros resultados obtenidos con las técnicas de marcaje **in vivo**.

En el años de 1989 de la Cruz, et al, demostraron que el corazón en tubo recto está constituido exclusivamente por el **primordium** de la porción trabeculada del ventrículo derecho y el del izquierdo, lo cual niega la existencia de las cavidades cardíacas primitivas, es decir, que durante el desarrollo embriológico del corazón, aparecen los **primordia** de las diferentes regiones anatómicas en que están divididos los ventrículos: cámara de entrada, porción trabeculada y cámara de salida (Anderson, et

al, 1978 y Anderson y Becker 1981) (Fig. 18B, C). Previamente en 1977 se había encontrado el primordium de los infundíbulos ventriculares (de la Cruz, et al, 1977) pero desconocíamos en qué estadio del desarrollo aparece el primordium de los inlets ventriculares. La información dada en este trabajo al demostrar que el primordium de las cámaras de entrada ventriculares surge en el estadio 12, amplía los conocimientos que tenemos respecto a las regiones cardíacas primitivas y su expresión anatómica en el corazón maduro (Fig. 18).

Debido a la gran similitud anatómica y embriológica que existe entre el corazón humano y el del pollo, pensamos que la nueva información obtenida con las técnicas de la embriología experimental en el estudio del desarrollo normal del corazón del embrión de pollo, es indispensable para evaluar los resultados obtenidos en el hombre mediante las técnicas de la embriología descriptiva, ya que es obvio que las técnicas experimentales no se pueden aplicar en el humano. Por consiguiente los resultados experimentales sobre el origen embriológico de las diferentes regiones anatómicas que constituyen el corazón maduro, proporcionan una base embriológica sólida a la división anatómica de los ventrículos en el hombre propuesta por Anderson et al, (1978) y Anderson y Becker (1981) (Fig. 18).

Los conocimientos obtenidos con el uso exclusivo de las técnicas de la embriología descriptiva condujeron a un concepto eminentemente preformista del desarrollo embriológico normal del corazón, un ejemplo al respecto es el haber establecido que

en el corazón en tubo recto están presentes los **primordia** de cada una de las cavidades que constituyen el corazón maduro. A estas cavidades se les denominó "cavidades cardíacas primitivas". El empleo reciente de las técnicas de la embriología experimental: de cultivo y de marcaje **in vivo** y los registros de potenciales eléctricos intracelulares en el estudio del desarrollo embriológico normal del corazón, demostraron que no existen las cavidades cardíacas primitivas sino que lo que ocurre durante el desarrollo del tubo cardíaco es que desde el estadio 9⁻ al 13-22 aparecen las regiones cardíacas primitivas. Esta gran discrepancia entre los conocimientos clásicos y los recientes se debe a que las técnicas de la embriología descriptiva no son adecuadas para investigar el destino prospectivo de las estructuras embriológicas porque no permiten rastrearlas de una manera continua desde que aparecen hasta su expresión anatómica en el corazón maduro, lo que impide conocer su destino prospectivo.

El conocer que durante la morfogénesis del corazón del embrión de pollo las regiones cardíacas primitivas no aparecen simultáneamente, sino que lo hacen en diferentes estadios del desarrollo y dan origen a zonas específicas de las cavidades ventriculares en el corazón maduro y no a una cavidad ventricular completa, nos permite explicar la existencia de las cardiopatías congénitas complejas en las que están presentes múltiples malformaciones cardíacas y además podemos inferir que la complejidad de una cardiopatía congénita tanto en el hombre como en el pollo, depende del estadio del desarrollo en que actúa un teratogéno.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, R.H., Macartney, F.J., Shinebourne, E.A. and Tynan, M.J. (1978). Definitions of cardiac chambers. In Paediatric Cardiology 1977 cap 2 (ed. Anderson, R.H. and Shinebourne, E.A.) pp 5-14. Edinburgh, London and New York: Churchill Livingston.
- Anderson, R.H. and Becker, A.E. (1981). Atlas Fotográfico de Anatomía Cardíaca, 1a. Edición. Barcelona: Doyma.
- Argüello, C., Alanís, J., Pantoja, O. and Valenzuela, B. (1986). Electrophysiological and ultrastructural study of the atrioventricular canal during the development of the chick embryo. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 18, 449-510.
- Argüello, C., Alanís, J. and Valenzuela, B. (1988). The early development of the atrioventricular node and bundle of His in the embryonic chick heart. An electrophysiological and morphological study. Development. 102, 623-637.
- Balinsky, B.I. (1981). Introduction to Embryology, 5th revised ed. London: Saunders.
- Butler, J.K. (1952). An experimental analysis of cardiac loop formation in the chick. Master of Arts Thesis, University of Texas, Austin.
- Castro-Quezada, A., Nadal-Ginard, B. and De la Cruz, M.V. (1972). Experimental study of the formation of the bulboventricular loop in the chick. Journal of Embryology and Experimental Morphology. 27, 623-637.
- Conte, G. and Pellegrini, A. (1984). On the development of the coronary arteries in human embryos, stages 14-19. Anatomy and Embryology. 169, 209-215.

- Davis, C.L. (1927). Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Contributions to Embryology*. 19, 245-284.
- DeHaan, R.L. (1963). Organization of the cardiogenic plate in the early chick embryo. *Acta Embryologicae et Morphologiae Experimentalis*. 6, 26-38.
- DeHaan, R.L. (1967). Development of form in the embryonic heart: an experimental approach. *Circulation*. 35, 821-833.
- De la Cruz, M.V., Muñoz-Armas, S., and Muñoz Castellanos, L. (1972). *Development of the Chick Heart*. Baltimore: Johns Hopkins Press.
- De la Cruz, M.V., Sánchez-Gómez, C., Arteaga, M. and Argüello, C. (1977). Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *Journal of Anatomy*. 123, 651-686.
- De la Cruz, M.V., Giménez-Ribotta, M., Saravalli, O. and Cayré, R. (1983). The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. *American Journal of Anatomy* 166, 63-72
- De la Cruz, M.V. and Cayré, R. (1986). *Desarrollo embriológico del corazón y de las grandes arterias*. En: *Cardiología Pediátrica. Clínica y Cirugía*. (ed. P. A. Sánchez), vol. 1, pp. 10-18. Barcelona: Salvat.

- De la Cruz, M.V., Sánchez-Gómez, C. and Palomino, M.A. (1989). The primitive cardiac regions in the straight tube heart (Stage 9⁻) and their anatomical expression in the mature heart: an experimental study in the chick embryo. *Journal of Anatomy*. 165, 121-131.
- DeVries, P.A. and Saunders, J.B. (1962). Development of the ventricles and spiral outflow tract in the human heart. A contribution to the development of the human heart from - age group IX to age group XV. *Contributions to Embryology*. 256, 89-114.
- Dor, X. and Corone, P. (1973). Role du conus dans la morphogenese cardiaque. Essai d'étude sur l'embryon de poulet. *Coeur*. 4, 207-307.
- Hamburger, B. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*. 88, 49-92.
- Lepori, N.G. (1967). Research on heart development in chick embryo under normal and experimental conditions. *Monitore Zoologie Italiana*. 1, 159-183.
- Manasek, F.J. and Monroe, R.G. (1972). Early cardiac morphogenesis is independent of function. *Developmental Biology*. 27, 584-588.
- New, D.A.T. (1955). A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 3, 326-331.

- Orts-Llorca, F. and Ruano-Gil, D.R. (1967). A casual analysis of the heart curvatures in the chicken -- embryo. Roux' Arch. Entwicklunqsmech. Organ. 158, 52-63.
- Palomino-Garibay, M.A. (1987). Constituci6n embriol6gica del coraz6n en tubo recto. Estudio experimental en el embri6n de pollo. Tesis. Universidad Nacional Aut6noma, M6xico.
- Patten, B.M. (1929). The early embryology of the chick. 1st. ed. pp. 184-190. Philadelphia: The Blakiston Co.
- Rawles, M.E. (1936). A study in the localization of organ-forming areas in the chick blastoderm of the head-process stage. Journal experimental Zoology. 72, 271-315.
- Rawles, M.E. (1943). The heart-forming areas of the early chick blastoderm. Physiological Zoology. -- 16, 22-42.
- Romanoff, A.L. (1960). The Avian Embryo. 680-780. New York: Macmillan.
- Rosencuist, G.C. and DeHaan, R.L. (1966). Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study. Carnegie Contributions to Embryology. 38, 111-121.
- Rychter, Z. and Lemez, L. (1965). Markierung morphogenetischer Beweuncen w6hrend der Truncusscheidewandbildung des Herzens beim H6hnerembryo. VIIth International Congress of Anatomy, Wiesbaden. p. 104.

- Sánchez-Gómez, C. (1972). Contribución de los experimentos de supresión de tubo cardiaco al estudio de la formación del asa bulboventricular. Tesis, Universidad Nacional -- Autónoma, México.
- Seichert, V. (1965). Study of the tissue and organ anlage shifts by the method of plastic linear marking. *Folia - morphologica*. 13, 228-238.
- Sissman, N.J. (1966). Cell multiplication rates during development of the primitive cardiac tube in the chick embryo. *Nature* 210, 504-507.
- Spratt, N.T. JR. (1946). Formation of the primitive streak, in the explanted chick blastoderm marked with carbon particles. *Journal experimental Zoology*. 103, 259-304.
- Stalsberg H. and DeHaan, R.L. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Developmental Biology*. 19, 128-159.
- Stalsberg, H. (1969a). The origin of heart asymmetry: right and left contributions to the early chick embryo heart. *Developmental Biology*. 19, 109-127.
- Stalsberg, H. (1969b). Regional mitotic activity in the precardiac mesoderm differentiating heart tube in the chick embryo. *Developmental Biology*. 20, 18-
- Stalsberg, H. (1970). Mecanisms of dextra looping of the embryonic heart. *American Journal of Cardiology*. 25, 265-271.

- Streeter, G.L. (1942). Development horizons in human embryos. Description of age group XII, 21 to 29 somites. Carnegie Contributions to Embryology. 30, 211-
- Streeter, G.L. (1945). Development horizons in human embryos. Description of age group XIII, embryos of about 4 or 6 millimeters long and age group XIV, period of indentation of the lens vesicle. Carnegie Contributions to Embryology. 31, 27-63.
- Virágh, Sz., Szabó, E. and Challice, C.E. (1989). Formation of the primitive Myo and Endocardial tubes in the chick embryo. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 21, 123-137.

TABLA 1
EXPERIMENTOS DE MARCAJE

EXPERIMENTO	ESTADIO DE MARCAJE Y NUMERO DE EMBRIONES OPERADOS		
SERIE I	1a. ETAPA (ESTADIO 9-12)	2a. ETAPA (ESTADIO 12-14)	3a. ETAPA (ESTADIO 14-35)
	45	45	45
SERIE II	1a. ETAPA (ESTADIO 12-14)	2a. ETAPA (ESTADIO 14-35)	
	45	45	

ILUSTRACIONES

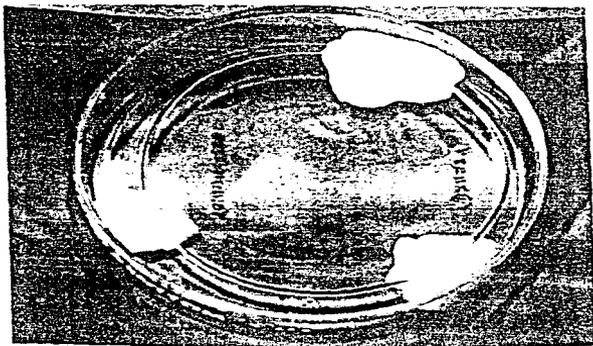


Fig. 1. Micrografia de la câmara humală (câ-
mara de salină) a ochiului omului.

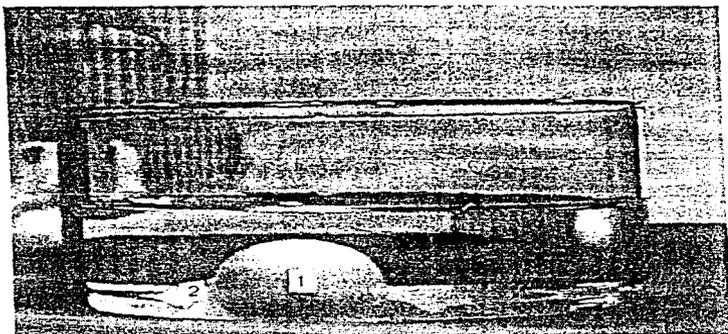


Fig. 2. Micrografia de la câmara humală (câ-
mara de salină) a ochiului omului. 1. Leziune
de tip "leucocel" și 2. leziune de tip "leucocel".

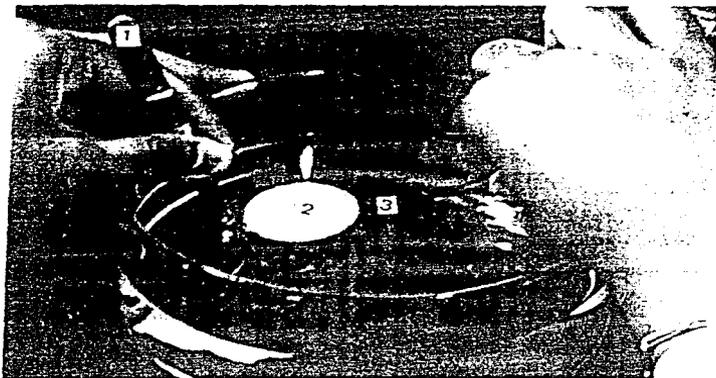


Fig. 3. Fotografía que muestra la posición de la pinza para separar las chalaças y la albúmina de la yema. 1, pinza; 2, yema; 3, chalaça.

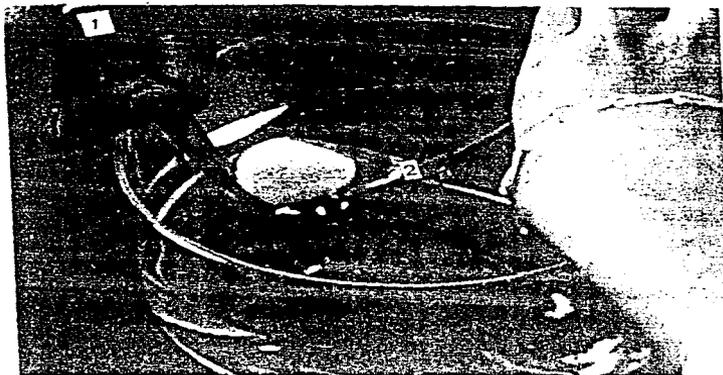


Fig. 4. Fotografía que muestra la posición de la pinza y la tijera para realizar el corte ecuatorial de la membrana vitelina. 1, pinza recta; 2, tijera curva.

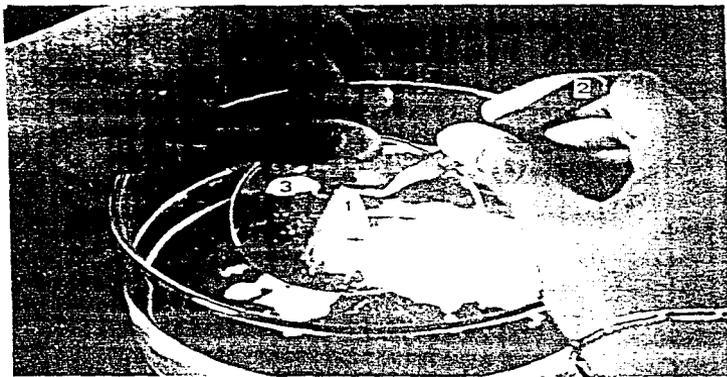


Fig. 4. Fotografía en que se muestra la membrana vitelina con el embrión (flacha) sujeta con la pinza para colocarlo en el vidrio de reloj, el cual debe introducirse en el cristalizador y su mergarse en la solución Ringer. 1, membrana vitelina; 2, pinza; 3, vidrio de reloj.

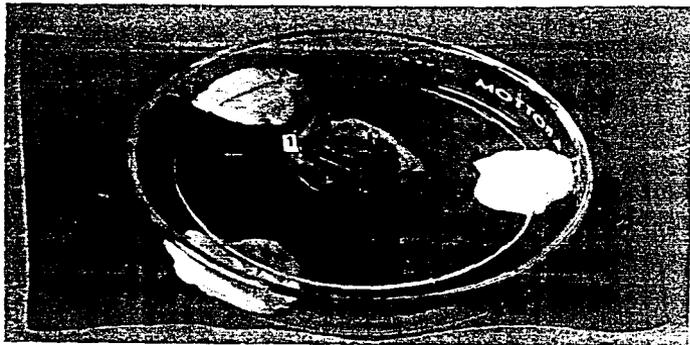


Fig. 6. Fotografía en la que se observa la membrana vitelina y el embrión (flecha) extendidos sobre el vidrio de reloj. Este último, ya está colocado en la cámara húmeda. 1, membrana vitelina.

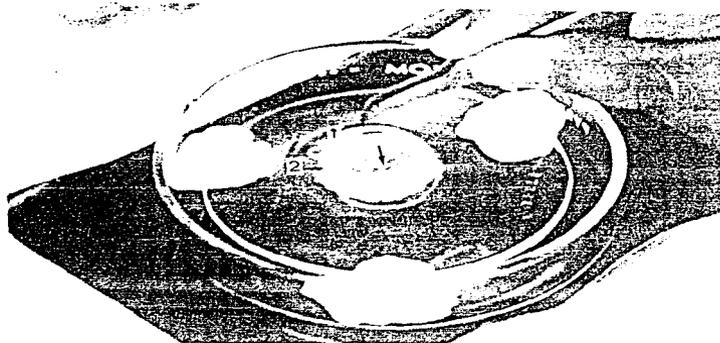


Fig. 7. Fotografía en que se muestra cómo se coloca el anillo de vidrio sobre la membrana vitelina. El embrión (flecha) se observa en el centro.

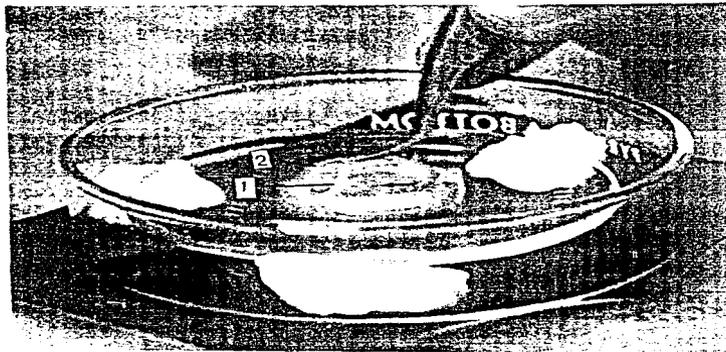


Fig. 1. Montaje para cultivo vivo mediante el uso de una jeringa, en el interior superior de la membrana vitelina con el objetivo (flecha), sobre la pared del cultivo de cultivo. 1, membrana vitelina; 2, anillo de vidrio.

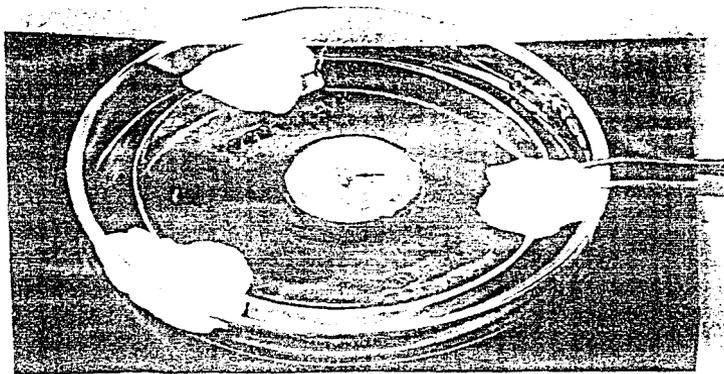


Fig. 2. Montaje para cultivo vivo mediante el uso de una jeringa de Koch, en el interior superior de la membrana vitelina con el objetivo (flecha) en el interior superior de la membrana vitelina. El montaje está montado en el anillo de vidrio que se coloca sobre el vidrio de reloj dentro de la cámara de cultivo.

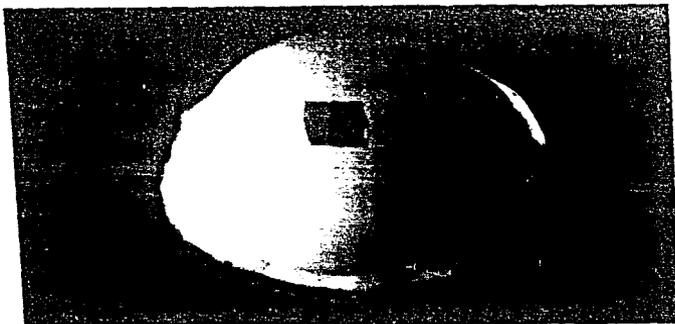


Fig. 10. Fotografía de un huevo de gallina incubado; colocado sobre un algodón dentro de una caja de Petri. observe la ventana abierta en la cáscara a través de la cual se realiza el marcaje *in vivo*.

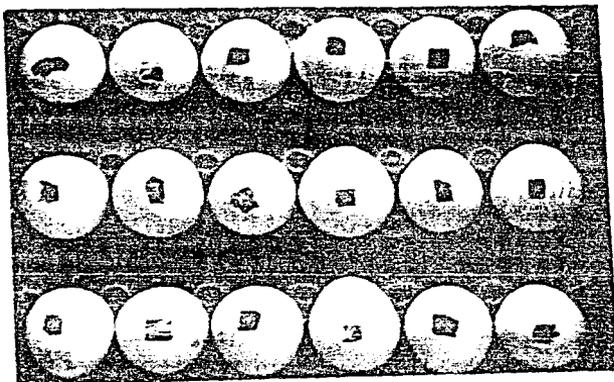
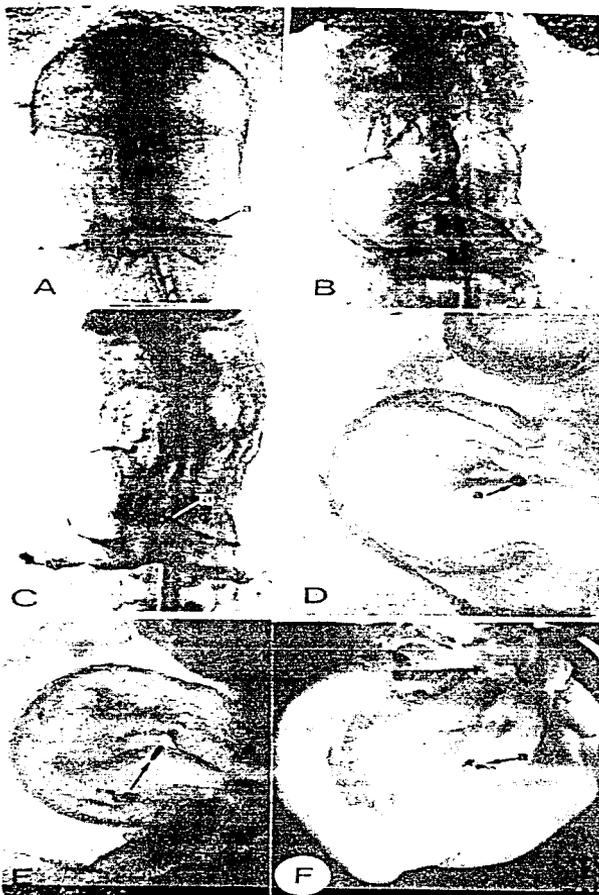


Fig. 11. Huevos de gallina listos para ser incubados después de haber marcado el embrión *in vivo*. la ventana de la cáscara, está cubierta con una tira de papel autoadherible transparente.



Fig. 12. Representación diagramática de los experimentos de marcaje **in vivo** en el embrión de pollo que demuestran que el primordium de la cámara de entrada ventricular (inlet) aparece en el estadio 12. La región sombreada corresponde al primordium de la cámara de entrada ventricular en los estadios 12 y 14 y su manifestación anatómica en el estadio 35. (A) Etapa de preasa; (B) Etapa de asa temprana; (C) Etapa de asa tardía; (D) Corazón maduro. a, límite ventricular; b, límite auricular.

Fig. 13. Experimento de marcaje **in vivo** realizado para investigar el estadio de aparición del primordium de la cámara de entrada ventricular (inlet) y conocer su límite ventricular. (A) Embrión en el estadio de corazón en tubo recto (estadio 9) con una marca (a) colocada en el extremo caudal del corazón x32. (B) El mismo embrión en el estadio 12 x 32. (C, D) Paso intermedio para rastrear la marca (a) del estadio 12 (C) al estadio 14 (D) x32. (E) Embrión del estadio 14 en el que se colocó una marca (a) de gelatina-tinta china en el mismo lugar en que se encontró la marca de óxido de hierro x32. (F) El mismo embrión en el estadio 35 (corazón maduro) mostrando la marca (a) en el límite entre la porción lisa y trabeculada del ventrículo izquierdo x25.



TA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

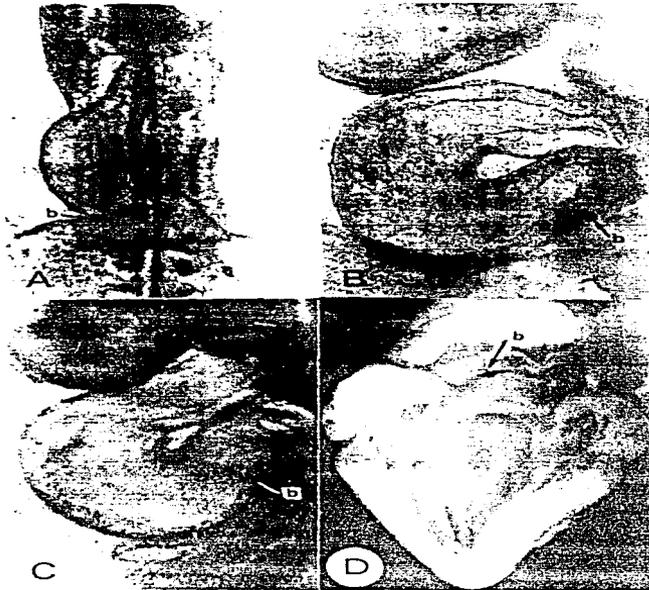


Fig. 14. Experimento de marcado in vivo que muestra que el surco atrioventricular del estadio 12 corresponde al límite atrial del primordium de la cámara de entrada ventricular. (A) Embrión del estadio 12 con una marca (b) colocada en el surco atrioventricular derecho x32. (B) El mismo embrión en el estadio 14 x 32. (C) Embrión del estadio 14 con una marca (b) de gelatina-tinta china colocada en el mismo lugar en que se encontró la marca de óxido de hierro x32. (D) El mismo embrión en el estadio 35 (corazón maduro) la marca (b) se observa en la inserción septal de la valva anterior de la mitral.

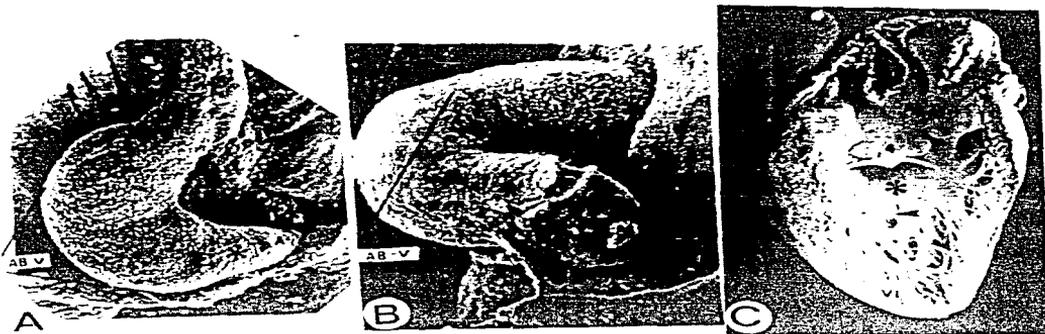


Fig. 16. Micrografía con microscopio electrónico de barrido del corazón del embrión de pollo de los estadios 12, 14 y 35. (A) Vista ventral del corazón del embrión de pollo del estadio 12 x 94. (B) Vista lateral izquierda del corazón del embrión de pollo del estadio 14 x 111. (C) Microdissección de las cavidades izquierdas del corazón del embrión de pollo del estadio 35 x 22. AB-V, asa bulboventricular; C, cono; A, atrio; AI, aurícula izquierda; VI, ventrículo izquierdo; 1, rama ascendente (cefálica); 2, rama descendente (caudal); 3, surco atrioventricular izquierdo; 4, valva septal (anterior) de la mitral. El asterisco señala el primordium del inlet en (A) y (B) y su expresión anatómica en (C). Flecha, límite entre la zona lisa (inlet) y trabeculada del ventrículo izquierdo.

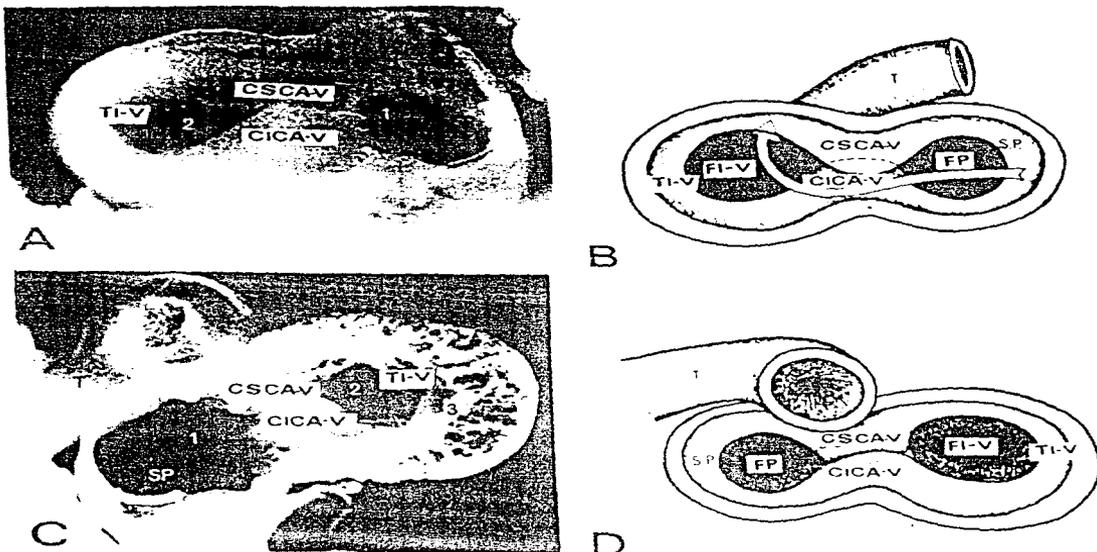


Fig. 16. Fotografías y esquemas del inicio de la septación cardíaca. (A) Microdissección de las cavidades cardíacas iz quierdas del corazón del embrión de pollo del estadio 19. (B) Esquema de la microdissección. (C) Microdissección de las cavidades cardíacas derechas del corazón del embrión de pollo del estadio 22. (D) Esquema de la microdissección. Observe cómo el cojín superior del canal atrioventricular (CSCAV-V) y el inferior (CICA-V) dividen a este canal en orificio aurículoventricular izquierdo (mitral) y derecho (tricuspidé). Además estos cojines forman conjuntamente con el septum primum (SP) y el tabique interventricular primitivo (TI-V) un septum cardíaco que permite a cada aurícula comunicarse con su ventrículo correspondiente a través de su propio inlet (flecha). FP y 1, foramen primum. FI-V y 2, foramen interventricular primitivo.

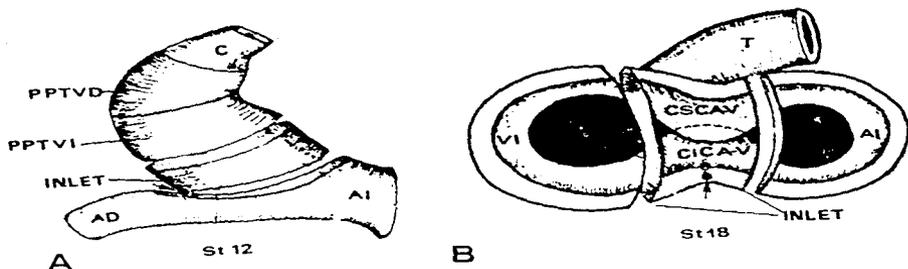


Fig. 17. Representación esquemática de los cambios topográficos del primordium del inlet del estadio 12 al 18. (A) Esquema de la superficie ventral del corazón del estadio 12 en el que se ha separado el primordium del inlet (zona sombreada). (B) Esquema de una microdissección de las cavidades cardiacas izquierdas del corazón del embrión de pollo del estadio 18, la zona sombreada señala el primordium del inlet. Observe cómo debido a los procesos de torsión del asa bulboventricular, el surco atrioventricular derecho del estadio 12 (flecha) corresponde al surco atrioventricular izquierdo del estadio 18 (flecha), donde además se desarrolla el cojín inferior del canal atrioventricular (CICA-V). C, cono; PPTVD, primordium de la porción trabeculada del ventrículo derecho; PPTVI, primordium de la porción trabeculada del ventrículo izquierdo; INLET, primordium de las cámaras de entrada ventriculares; AD, aurícula primitiva derecha; AI, aurícula primitiva izquierda; VI, ventrículo izquierdo; T, tronco; CSCA-V, cojín superior del canal atrioventricular.

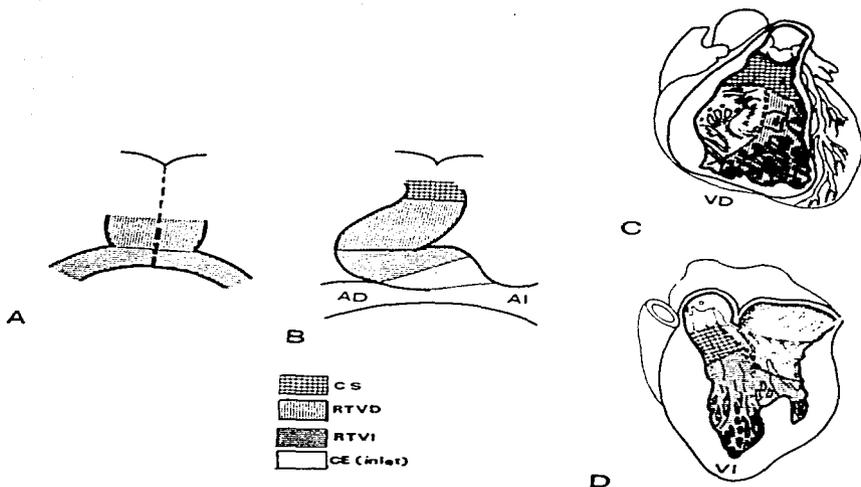


Fig. 18. Esquemas representativos de la constitución embriológica y división anatómica de los ventrículos maduros. (A) Corazón en preasa. (B) Corazón en etapa de asa temprana. En ambos se señalan las distintas regiones cardíacas primitivas que los constituyen. (C) Ventrículo derecho (VD). (D) Ventrículo izquierdo (VI). CS, cámara de salida; RTVD, región trabeculada del ventrículo derecho; RTVI, región trabeculada del ventrículo izquierdo; CE, cámara de entrada (inlet).