

152  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

REGISTRO FOTOMICROGRÁFICO DEL DESARROLLO DE LA  
VALVULA MITRAL

Tesis para obtener el Grado de Licenciado en Biología

que presenta la alumna

ARACELI RODRIGUEZ GOMEZ

Director de Tesis: Dr. Manuel Arteaga Martínez

Coasesora de Tesis: Dra. Isabel García Peláez

Tutor por la Fac. Ciencias: M. en C. Alejandro Martínez Mena

México, D.F., 1993

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# REGISTRO FOTOMICROGRAFICO DEL DESARROLLO DE LA VALVULA MITRAL.

## INDICE

	pag.
1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCION .....	4
2.1. GENERALIDADES Y REVISION HISTORICA .....	5
2.2. ANATOMIA NORMAL DEL CORAZON .....	9
2.2.1. SITUACION ESPACIAL Y RELACIONES DEL CORAZON .....	9
2.2.2. ESTRUCTURA DEL CORAZON .....	10
2.2.3. UNION ATRIOVENTRICULAR .....	11
2.2.4. VALVULA ATRIOVENTRICULAR IZQUIERDA .....	12
2.3. ESTADO ACTUAL Y JUSTIFICACION DEL TEMA .....	14
2.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
3. HIPOTESIS .....	22
4. OBJETIVOS .....	24
5. MATERIAL Y METODO .....	26
5.1. MATERIAL .....	27

5.1.1. COMUN PARA LAS DIFERENTES TECNICAS UTILIZADAS .....	27
5.1.1.1. BIOLOGICO .....	27
5.1.1.2. APARATOS .....	27
5.1.1.3. PARA MICRODISECCION .....	27
5.1.1.3.1. CRISTALERIA .....	27
5.1.1.3.2. INSTRUMENTAL .....	28
5.1.1.3.3. VARIOS .....	28
5.1.2. PARA MICROSCOPIA FOTONICA .....	29
5.1.2.1. FOTONICA ESTEREOSCOPICA .....	29
5.1.2.2. FOTONICA CONVENCIONAL (HISTOLOGIA) .....	29
5.1.2.2.1. APARATOS .....	29
5.1.2.2.2. REACTIVOS .....	29
5.1.2.2.3. VARIOS .....	30
5.1.3. PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO ..	31
5.1.3.1. APARATOS .....	31
5.1.3.2. REACTIVOS .....	31
5.1.3.3. VARIOS .....	31
5.2. METODO .....	32
5.2.1. ANATOMIA MICROSCOPICA TRIDIMENSIONAL .....	34
5.2.1.1. MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA .....	34
5.2.1.1.1. TECNICA DE DISECCION DE LA VIA DE ENTRADA VENTRICULAR IZQUIERDA .....	36

5.2.1.1.2.	TECNICA DE DISECCION DE LA VIA DE SALIDA VENTRICULAR IZQUIERDA .....	36
5.2.1.1.3.	TECNICA DE DESINSERCIÓN DE LA VALVULA MITRAL .....	37
5.2.1.1.4.	TECNICA DEL CORTE 'CUATRO CAMARAS' .....	37
5.2.1.1.5.	TECNICA DEL CORTE TRANSVERSAL .....	38
5.2.1.1.6.	TECNICA FOTOMICROGRAFICA ....	39
5.2.1.2.	MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO .....	40
5.2.1.2.1.	TECNICA FOTOMICROGRAFICA ....	41
5.2.1.3.	PREPARACION DE SOLUCIONES .....	42
5.2.1.3.1.	SOLUCION RINGER PARA AVES ...	42
5.2.1.3.2.	BUFFER DE CACODILATO .....	42
5.2.1.3.3.	SOLUCION DE KARNOVSKY .....	43
5.2.1.3.4.	TETRAOXIDO DE OSMIO .....	43
5.2.2.	ANATOMIA MICROSCOPICA BIDIMENSIONAL CON CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS .....	44
5.2.2.1.	DESHIDRATACION .....	44
5.2.2.2.	INCLUSION .....	45
5.2.2.3.	CORTE Y MONTAJE .....	46
5.2.2.4.	DESPARAFINACION .....	46
5.2.2.5.	TINCION .....	47
5.2.2.5.1.	HEMATOXILINA-EOSINA .....	47
5.2.2.5.2.	TRICROMICO DE MASSON .....	48

5.2.2.6.	TECNICA FOTOMICROGRAFICA	49
5.2.2.7.	PREPARACION DE SOLUCIONES	50
5.2.2.7.1.	COLORANTE VERDE LUZ	50
5.2.2.7.2.	HEMATOXILINA DE WEIGERT	50
5.2.2.7.3.	MASSON ROJO	51
5.2.2.7.4.	FORMOL BUFFER	51
6.	RESULTADOS	52
6.1.	ESTADIO 28	53
6.2.	ESTADIO 29	55
6.3.	ESTADIO 30	55
6.4.	ESTADIO 31-32	57
6.5.	ESTADIO 35	57
6.6.	ESTADIO 37	58
6.7.	ESTADIO 38	59
6.8.	ESTADIO 39	61
6.9.	ESTADIO 40	62
6.10.	ESTADIO 41	63
6.11.	ESTADIO 42-43	63
6.12.	ESTADIO 46	64
7.	DISCUSION	66
8.	CONCLUSIONES	87
9.	FIGURAS	90
10.	BIBLIOGRAFIA	124

# 1. RESUMEN

## 1. RESUMEN

Con el objeto de conocer la etapa precisa y cambios morfológicos que ocurren en el proceso de formación de la válvula mitral, y la participación de las distintas estructuras embrionarias en las diferentes porciones de la válvula, se realizó un estudio morfológico en corazones de embriones y fetos de pollo desde el estadio 28 (5  $\frac{1}{4}$  - 6 días) hasta el estadio 46 (21 días) de Hamburger y Hamilton; los especímenes fueron estudiados con microscopía fotónica estereoscópica, microscopía electrónica de barrido y cortes histológicos seriados; se hizo el registro fotomicrográfico de los cambios más importantes observados con las tres técnicas.

Los primordios de los músculos papilares fueron detectados desde el estadio 28 mediante microscopía electrónica de barrido y se observaron claramente conformados antes del estadio 46 (etapa de eclosión). Se encontró que este modelo presenta tres músculos papilares: uno anterior, uno posterior y el otro lateral (izquierdo).

Los primordios de los velos valvulares fueron también detectados desde el estadio 28 con microscopía electrónica de barrido, pero aún en el momento de la eclosión no mostraban la constitución histológica de los corazones post-natales, lo que nos indica que esta porción de la válvula mitral no concluye su morfogénesis sino hasta la etapa post-natal.



Los primeros esbozos de formación de las cuerdas tendíneas fueron detectados en el estadio 30 (6  $\frac{1}{2}$  - 7 días), aunque no fue sino hasta el estadio 38 (12 días) en que se observaron las primeras fenestraciones que conducirían a la liberación de las cuerdas tendíneas; para el momento de la eclosión aún se vieron cuerdas tendíneas en proceso de formación, que nos indica que también esta porción de la válvula mitral concluye su morfogénesis hasta la etapa post-natal. El desarrollo de las cuerdas tendíneas de la valva anterior o septal de la mitral siempre estuvo más avanzada que el de las cuerdas tendíneas de la valva posterior o parietal.

Este trabajo nos permite concluir que la válvula mitral en el embrión de pollo se desarrolla del estadio 28 (5  $\frac{1}{2}$  - 6 días) hasta después del estadio 46 (21 días), es decir de la etapa embrionaria a la etapa post-natal. También nos permite afirmar que la expresión anatómica final de esta válvula es ligeramente diferente a la del hombre, que ha sido considerada semejante por todos los autores. Para clarificar la semejanza o diferencia de la morfogénesis de la válvula mitral del corazón del pollo y de los mamíferos, sería necesario realizar un estudio semejante en el corazón de algún mamífero (que podría ser la rata o idealmente el hombre); de igual manera sería necesario diseñar estudios específicos para determinar con precisión los mecanismos básicos del desarrollo involucrados en todo este evento de la cardiogénesis.

## 2. INTRODUCTION

## 2. INTRODUCCION

### 2.1. GENERALIDADES Y REVISION HISTORICA

La válvula mitral es una porción del corazón que regula el paso de la sangre del atrio izquierdo al ventrículo izquierdo, e impide su reflujo durante la sistole ventricular. Anatómicamente esta válvula está constituida por un anillo fibroso (de sostén), dos velos valvulares (que ocluyen el orificio valvular durante la sistole ventricular) y un complejo músculo - tendinoso (que une a los velos valvulares con el miocardio ventricular e impide el prolapso de aquellos hacia la cavidad atrial). Embriológicamente, todos los autores consideran que esta válvula se desarrolla a partir de la región del corazón embrionario denominada como "canal atrioventricular" y del miocardio del ventrículo primitivo.

La morfogénesis del corazón ha sido y continúa siendo un tema de interés entre los embriólogos y morfólogos en general, dada la gran trascendencia que este órgano tiene no sólo para su desarrollo en sí, sino también para los restantes órganos y sistemas de la economía.

Los primeros estudios sobre el desarrollo embriológico del corazón datan del siglo XVII, en que VESLING (1664), haciendo uso de un microscopio rudimentario, hizo una descripción detallada del corazón del embrión de pollo; también en esa época, MALPIGHI (1673) hizo un minucioso estudio sobre el desarrollo temprano del

corazón, utilizando técnicas de observación "in vitro" y el microscopio como instrumento de rutina. Es a VON HALLER (1758) a quien se atribuye la primera descripción correcta del desarrollo cardíaco del embrión de pollo, y la existencia de la porción del corazón que separa la aurícula común del ventrículo primitivo, a la cual denominó "canal auricularis"; a ésta porción, la casi totalidad de los embriólogos posteriores a VON HALLER la han designado como canal atrioventricular.

MALL (1912), FRAZER (1916) y WATERSTON (1917) describieron en el hombre en el interior del canal atrioventricular dos engrosamientos mesenquimales recubiertos de endocardio, a los que designaron como cojines endocárdicos superior e inferior del canal atrioventricular, resaltando el papel que éstos tenían en la septación del corazón y en la formación de las válvulas aurículoventriculares. ODGERS (1937) señaló la importante participación que tienen dichos cojines endocárdicos en la formación de la porción membranosa del septo interventricular, mientras KRAMER (1942) y STREETER (1945), además de remarcar la importante participación de dichas estructuras embrionarias en la septación del corazón, atribuyeron a ellas un papel crucial en la conexión de la aorta al ventrículo izquierdo. En 1962, VAN MIEROP Y Cols. hicieron una seria revisión del tema, recapitulando la importante participación del canal atrioventricular embrionario en el desarrollo normal y anormal del corazón, en general, y de las válvulas tricúspide y mitral, en especial. Hasta ese momento, el estudio de esta estructura embrionaria había sido hecho por los diferentes autores utilizando las técnicas clásicas de la

embriología descriptiva (cortes histológicos seriados y/o reconstrucciones en cera), habiéndose empleado diferentes modelos (pollo y hombre, fundamentalmente), y extrapolando sus observaciones de una especie a otra en forma indiscriminada.

A partir de la década de los 70's, se incorporaron nuevas técnicas en el estudio de la formación del corazón, tales como la microscopía electrónica de transmisión y barrido, y las técnicas experimentales de marcaje selectivo "in ovo", estas últimas obviamente sólo factibles en embriones de pollo. Así, HAY (1972) y LOS y Cols. (1973) utilizaron la microscopía electrónica de transmisión para estudiar el proceso de fusión de los cojines endocárdicos del canal atrioventricular; DE LA CRUZ y Cols. (1983) y GARCIA-PELAEZ y Cols. (1984) estudiaron el desarrollo de dichas estructuras utilizando marcaje selectivo "in ovo" en embriones de pollo; NOBLE y Cols. (1983) y MORSE y Cols. (1984) utilizaron la microscopía electrónica de barrido para estudiar la formación de las cuerdas tendíneas de la válvula mitral en el embrión de pollo; ARTEAGA y Cols. (1988) y ARGUELLO y Cols. (1988) estudiaron el proceso de fusión y desarrollo de los cojines del canal atrioventricular con microscopía electrónica de barrido, ambos en embrión de pollo. Todas estas contribuciones han permitido un avance notable en el conocimiento sobre el desarrollo de esta región, fundamentalmente en el proceso de fusión de los cojines endocárdicos superior e inferior y en las estructuras anatómicas en que participa. Muchos otros autores han contribuido en uno u otro aspecto al conocimiento sobre este tema, utilizando diferentes técnicas (MARKWALD, 1977;

VAN GILS, 1978; NOBLE, 1983; MORSE, 1984; WENINK, 1985; MAGOVERN, 1986).

Sin embargo, aunque se ha avanzado en forma considerable quedan aún grandes lagunas que impiden la comprensión real del proceso. Dos son las causas fundamentales a las que se debe esto: 1) La mayoría de estos estudios han abarcado sólo hasta el momento en que termina la fusión de los cojines endocárdicos, etapa en la cual la válvula mitral es aún rudimentaria, representada por un engrosamiento difuso del borde libre del orificio atrioventricular izquierdo (que durante la sístole ventricular ocluye a manera de " un diafragma " el orificio, e impide el retorno de la sangre al atrio izquierdo), especulándose que ocurre entre este momento y cuando la válvula ya está constituida con todos sus elementos; y 2) La extrapolación indiscriminada de las observaciones de un modelo a otro y/o las diferentes técnicas empleadas en los estudios, han provocado gran confusión y controversia, ya que aunque aparentemente hasta el momento de la fusión de los cojines el proceso parece ser similar en todas las especies estudiadas, en nuestras observaciones preliminares hemos notado algunas diferencias en la morfología final de la válvula mitral del embrión de pollo y del hombre, que han sido los dos modelos más estudiados a este respecto.

Por todas estas razones, no sorprende el hecho de que todos los libros de texto y artículos que tocan lo referente a la morfogénesis de la válvula mitral, describan en forma superficial y ambigua este tan importante evento de la cardiogénesis; por

ello, nos pareció de gran interés y trascendencia estudiar la morfogénesis de la válvula mitral a partir de la fusión de los cojines endocárdicos del canal atrioventricular hasta que todos los componentes de dicha válvula queden expresados anatómicamente, utilizando como modelo el embrión de pollo.

## 2.2. ANATOMIA NORMAL DEL CORAZON

La válvula mitral [valva mitral según la NOMINA ANATOMICA (PINO NUNEZ, 1970)] es una estructura intracardiaca ampliamente conocida en el hombre, fundamentalmente en lo referente a su anatomía y fisiología; en otras especies no existen descripciones tan detalladas sobre este tópico, y en general es aceptado por casi todos o todos los autores, de que la expresión morfológica final de la mitral es igual en todos los vertebrados superiores. Por ello se hará una breve descripción de la anatomía normal de la válvula mitral del hombre, y de las estructuras intracardiacas con ella relacionada, que facilitará la mejor comprensión de los cambios que sufre durante su desarrollo embriológico y fetal, hasta su expresión morfológica final en el corazón definitivo.

### 2.2.1. SITUACION ESPACIAL Y RELACIONES DEL CORAZON

El corazón, órgano central del aparato circulatorio, es un músculo hueco que actúa como una bomba aspirante e impelente de la sangre. Está ubicado en el tórax, ocupando la porción

inferior del mediastino anterior, situándose sobre el diafragma, entre los pulmones y por delante de la columna vertebral, esófago y aorta descendente; por detrás y arriba, está relacionado con la tráquea y brónquios principales. La mayor parte del corazón ocupa el hemitórax izquierdo, apreciándose sólo un tercio de su masa en el hemitórax derecho.

### 2.2.2. ESTRUCTURA DEL CORAZÓN

El corazón es un órgano que consta de tres capas principales: una interna, en contacto directo con la sangre, el endocardio; una externa o capa visceral del pericardio, el epicardio; y una intermedia, que es la capa contráctil, el miocardio. En los mamíferos está constituido por dos atrios y dos ventrículos.

Los atrios debido a la situación espacial que ocupan son designados como atrio derecho (venoso) y atrio izquierdo (sistémico), y los ventrículos como ventrículo derecho (venoso) y ventrículo izquierdo (sistémico). Ambos atrios se sitúan por arriba y detrás de los ventrículos. Los atrios están separados entre sí por el septo interatrial, mientras que los ventrículos están separados por el septo interventricular.

El atrio y el ventrículo derecho se continúan entre sí a través de un orificio, denominado orificio atrioventricular derecho, resguardado por una válvula - válvula tricúspide - que



regula el paso de la sangre del atrio al ventrículo e impide su reflujo en dirección inversa; lo mismo ocurre en el lado izquierdo donde el atrio y el ventrículo se continúan por un orificio denominado orificio atrioventricular izquierdo que está resguardado por una válvula - válvula mitral - que regula el paso de la sangre del atrio al ventrículo e impide su reflujo en dirección inversa.

Externamente los septos interatrial e interventricular están señalados por depresiones o surcos que cruzan los segmentos atrial y ventricular, tanto en su cara anterior como en la posterior, denominados surcos interatrial e interventricular, respectivamente. De igual manera la unión entre el atrio y el ventrículo derecho, y entre el atrio y el ventrículo izquierdo están señalados por unas depresiones denominadas surcos atrioventricular derecho e izquierdo, respectivamente. Alojados en estos surcos se encuentran las arterias y venas coronarias (sistema de irrigación propio del corazón), envueltas en tejido graso.

### 2.2.3. UNION ATRIOVENTRICULAR

Como ya se ha mencionado, la unión entre los atrios y los ventrículos se realiza a través de los orificios atrioventriculares derecho e izquierdo, los cuales alojan en su interior una válvula que regula el paso de la sangre. Anatómicamente estas válvulas están formadas por un anillo

fibroso (de sostén), velos valvulares o valvas (que ocluyen el orificio valvular durante la sistole ventricular), y un aparato músculo-tendinoso (que une a los velos valvulares con el miocardio ventricular e impide el prolapso de aquéllos hacia la cavidad atrial) (Figs. 1 y 2).

Las válvulas atrioventriculares están separadas entre sí por una porción septal, el septo atrioventricular, que se continúa con los septa intratrial e interventricular en dirección dorso-cefálica y ventro-caudal (Figs. 1C, 2C).

Los anillos valvulares atrioventriculares se unen al septo atrioventricular a un diferente nivel, el izquierdo más alto que el derecho; ésto determina que esta porción septal quede separando al atrio derecho del ventrículo izquierdo, de lo que deriva su nombre de septo atrioventricular (Figs. 1C, 2C).

#### 2.2.4. VALVULA ATRIOVENTRICULAR IZQUIERDA

La válvula atrioventricular izquierda o mitral está situada entre el atrio y el ventrículo izquierdo, quedando alojado su aparato tensor músculo-tendinoso en la cámara de entrada de este último (Figs. 1B, C y 2B, C). Se ubica la izquierda y detrás de la válvula atrioventricular derecha, y detrás de la válvula aórtica (Figs. 1A y 2A). Normalmente presenta dos valvas: una anteroseptal o aórtica y la otra posterolateral o mural. Las valvas están separadas entre sí por dos comisuras, una

anterolateral y la otra posteromedial.

La valva anteroseptal o aórtica es la más grande de las dos, tiene una forma cuadrilátera de gran anchura (Figs. 1B y 2B), y se inserta aproximadamente en un tercio de la circunferencia total del anillo; consta de una pequeña porción, en situación posterior, que se inserta directamente en el septo, y de otra porción, anteriormente colocada, que está en continuidad fibrosa con la válvula aórtica; ambas porciones están unidas al cuerpo fibroso central. La valva posterolateral o mural es más estrecha pero más larga, insertándose aproximadamente en las dos terceras partes de la circunferencia del anillo valvular; usualmente tiene un borde festoneado, pudiéndose distinguir tres festones, separados por hendiduras incompletas denominadas posteromedial, medial y ánterolateral. En algunos casos se pueden encontrar dos pequeñas valvas situadas en las comisuras, llamadas valvas comisurales.

El aparato tensor de la válvula atrioventricular izquierda está formado por dos grupos de músculos papilares situados justo por debajo de las comisuras: uno en posición posteromedial y el otro ánterolateral (Fig. 1B). Hay una considerable variación en la morfología de los músculos papilares particularmente en el posteromedial, pudiendo ser únicos o constituir un grupo de varias cabezas de diferentes tamaños. Cada uno de estos músculos papilares da inserción a las comisuras correspondientes y a la mitad vecina de cada una de las valvas.

En cuanto a las cuerdas tendinosas, cabe distinguir fundamentalmente dos clases, las valvulares y las comisurales. Las valvulares se insertan en la zona rugosa de ambas valvas y en las hendiduras de la valva posterolateral; las comisurales son dos una para cada comisura.

Las cuerdas tendinosas se clasifican de acuerdo al sitio de sujeción al velo valvular en tres tipos u órdenes: las cuerdas de primer orden están unidas al borde libre del velo valvular; las de segundo orden lo hacen a unos pocos milímetros del borde libre por la cara ventricular del velo valvular; y las de tercer orden se extienden desde los músculos papilares a la pared ventricular.

### 2.3. ESTADO ACTUAL Y JUSTIFICACION DEL TEMA

Los estudios clásicos señalan que el canal atrioventricular está ya presente desde el periodo de pre-asa (tubo recto), uniendo a los atrios con el ventrículo primitivo (DAVIS, 1927; DE VRIES y SAUNDERS, 1962). Experimentalmente ha sido demostrado que en este periodo del desarrollo, el tubo cardíaco primitivo sólo está formado por los primordia del ventrículo primitivo y de la porción proximal del bulbus cordis, no estando aún presentes el tronco-cono, los atrios, ni el canal atrioventricular (STALSBERG y DE HAAN, 1969; CASTRO-QUEZADA y Cols., 1972; ARGUELLO y Cols., 1975; DE LA CRUZ y Cols., 1977). Estos estudios experimentales han sido realizados en embrión de pollo, pero la gran similitud que existe con el hombre en la morfología cardíaca en

las diferentes etapas del desarrollo y en la expresión anatómica final, hace suponer que ésto también ocurra así en los mamíferos. Estos trabajos experimentales señalan que el canal atrioventricular aparece en la "etapa de asa", uniendo al asa bulboventricular con los atrios (Fig. 3A,B); tiene una forma ovoidea, con su eje mayor orientado en dirección céfalo-caudal. Externamente, el canal atrioventricular muestra dos surcos denominados surcos atrioventriculares derecho e izquierdo, que internamente se corresponden con dos crestas.

En la etapa de post-asa, el desarrollo del asa bulboventricular y la expansión de los atrios en dirección cefálica, cambian la orientación del canal atrioventricular a dorso-ventral, con los atrios en situación dorsal y el ventrículo primitivo en posición ventral (Fig. 3C,D,E,F). En el interior del canal atrioventricular, en su borde ventrosuperior y dorsoinferior, aparecen dos grandes masas de tejido mesenquimal, los cojines endocárdicos del canal atrioventricular (Figs. 4 y 5), los cuales vistos desde su aspecto ventricular, tiene una forma más o menos cuadrilátera, continuándose, sin línea de demarcación, con los incipientes septa atrial y ventricular. Estos cojines endocárdicos crecen progresivamente hacia la luz del canal aproximándose entre sí, y, aunque aún no fusionados, dividen el canal en un orificio derecho y otro izquierdo (Figs. 4B y 5B). Los cojines al principio son acelulares, estando constituidos por un mesenquima laxo denominado "tejido de cojín". El extremo atrial de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior se continúa con las astas del "septum primum" atrial, delimitando

el "foramen primum". El extremo ventricular del cojín dorsoinferior se continúa con el extremo dorsal del septo interventricular primitivo, mientras que el cojín ventrosuperior lo hace con el extremo ventral del septo interventricular primitivo y con la cresta sinistroventral del cono (GARCIA-PELAEZ y Cols. , 1989; ARTEAGA y Cols. , 1988). El cojín ventrosuperior inicia un proceso de remodelación, adelgazándose y acanalándose, con su concavidad dirigida hacia la derecha (Fig. 4C).

Finalmente, los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular se fusionan entre sí (Figs. 4D y 6A), proceso que ha sido estudiado por varios autores (HAY y LOW, 1972; HAY, 1978; ARGUELLO y Cols., 1988; ARTEAGA y Cols., 1988). Dicha fusión comienza por su extremo atrial, progresando en dirección a los ventrículos; conforme progresa la fusión los cojines endocárdicos ventrosuperior y dorsoinferior desarrollan unas protuberancias en su borde libre denominadas tubérculos derecho e izquierdo (Fig. 4C). Mientras esto está ocurriendo, el cono es incorporado al segmento ventricular y se divide en dos mitades: un cono posteromedial y un cono anterolateral. El cono posteromedial se aloja en la canaladura formada por el cojín ventrosuperior y de esta forma el ventrículo izquierdo adquiere su vía de salida. El cojín dorsoinferior del canal atrioventricular se curva hacia la izquierda, de tal forma que su tubérculo derecho queda a un nivel más bajo que el izquierdo (Fig. 4D); del primero se originará la valva septal de la tricúspide y del segundo parte de la valva aórtica de la mitral

(NETTER y VAN MIEROP, 1969). Esta diferencia de nivel entre los dos tubérculos determina la existencia de un diferente nivel en la inserción de la valva septal de la tricúspide y de la valva aórtica de la mitral y, a la vez, la existencia de una porción septal que separa al atrio derecho del ventrículo izquierdo y que es conocida con el nombre de septum atrioventricular (Fig. 4E). Cuando los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular terminan su fusión se borra toda línea de demarcación entre ellos, impidiendo su identificación en etapas posteriores (DE LA CRUZ y Cols., 1983; GARCIA-PELAEZ y Cols., 1984; ARTEAGA y Cols., 1988). De esta forma el canal atrioventricular queda dividido en un orificio derecho, donde se desarrollará la válvula tricúspide, y un orificio izquierdo, donde se desarrollará la válvula mitral (Fig. 6B).

Al mismo tiempo que ocurre la división del canal atrioventricular, en las paredes laterales del mismo aparecen dos protuberancias de tejido mesenquimático denominadas cojines laterales derecho e izquierdo. Estos son más pequeños que los cojines ventrosuperior y dorsoinferior y van a intervenir en el desarrollo de las valvas laterales de las válvulas atrioventriculares (VAN MIEROP y Cols., 1962; NETTER y VAN MIEROP, 1969).

Prácticamente todos los autores están de acuerdo que los anillos valvulares atrioventriculares y parte de los velos valvulares mitral y tricuspídeo derivan del tejido de cojines que rodea a cada uno de los orificios atrioventriculares: el anillo

atrioventricular derecho (tricuspídeo) se formará a partir de los cojines lateral derecho y dorsoinferior del canal atrioventricular, y por la cresta dextrodorsal del cono; mientras que el anillo atrioventricular izquierdo (mitral) lo hará a partir de los cojines lateral izquierdo, dorsoinferior y ventrosuperior del canal atrioventricular (VAN MIEROP y Cols., 1962; NETTER y VAN MIEROP, 1969; ARTEAGA y Cols., 1987). Sin embargo, no hay un consenso del como se forman los componentes de las válvulas, ni de la participación que tiene el mesenquima que rodea a los orificios atrioventriculares, los cojines endocárdicos propiamente dichos y el miocardio ventricular. Con respecto al aparato músculo-tendinoso se ha dicho que deriva del miocardio ventricular por un proceso de diverticulización y socavamiento. En su conjunto, los velos valvulares, las cuerdas tendinosas y los músculos papilares inicialmente son gruesos y carnosos. Los velos valvulares y las cuerdas tendinosas más tarde se adelgazan y transforman a tejido fibroso, mientras que los músculos papilares conservan su naturaleza muscular durante toda la vida pre- y postnatal. En el embrión de pollo se ha visto mediante microscopía electrónica de barrido que el desarrollo de las cuerdas tendinosas no es independiente del de los velos valvulares, y que el mecanismo de formación de las cuerdas tendinosas parece similar al observado en otras regiones embrionarias tales como la formación del "foramen secundum" atrial, la ruptura del mesocardio dorsal y la perforación de la membrana bucofaringea (NOBLE y Cols., 1983; MORSE y Cols., 1989).



Con respecto a la válvula mitral se ha dicho que inicialmente está formada de cuatro velos valvulares, pero que dos de ellos se hacen cada vez más prominentes para dar lugar a los velos valvulares anterior (aórtico) y posterior (mural), mientras que los otros dos - ubicados en las comisuras - entre las dos valvas antes señaladas, permanecen muy pequeñas y reciben el nombre de valvas comisurales, que en ocasiones no son siquiera identificables en el corazón postnatal. Los músculos papilares son inicialmente cuatro: dos anteriores y dos posteriores; los dos anteriores se fusionan entre si y los mismo ocurre con los dos posteriores, quedando finalmente dos músculos papilares - uno anterior y el otro posterior -.

Se ha especulado mucho sobre la participación que tienen los cojines ventrosuperior, dorsoinferior y lateral izquierdo en la formación de las diferentes porciones de los velos valvulares de la mitral, pero hasta el momento actual no ha sido demostrado en forma fehaciente. Experimentalmente se ha demostrado mediante técnicas de marcaje en el corazón del embrión de pollo que del cojín ventrosuperior se origina la mitad anterior de la valva anterior (aórtica) (GARCIA-PELAEZ y Cols., 1984) y del cojín dorsoinferior se origina la mitad posterior de esta misma valva (DE LA CRUZ y Cols, 1983); respecto a la valva posterior se infiere que deriva del cojín lateral izquierdo.

Esta breve revisión sobre el desarrollo de las válvulas atrioventriculares hace patente que, a pesar de que se han estudiado desde hace mucho tiempo utilizando diferentes técnicas

y distintos modelos, hay múltiples lagunas en el conocimiento sobre este tema. Si bien es cierto que está más o menos clarificado lo referente a la aparición y septación del canal atrioventricular, no lo es así en cuanto a la formación de los velos valvulares, cuerdas tendíneas, ni músculos papilares. La falta de conocimiento preciso de estos eventos morfogénéticos ha llevado a que las descripciones de la formación de las válvulas mitral y tricuspídea dada por todos los autores en la literatura sea en extremo confusa y/o superficial, y como una consecuencia de ésto, en las publicaciones acerca de estos procesos, no se encuentran fotomicrografías que ilustren los eventos que supuestamente están ocurriendo, siendo ésto sustituido por representaciones esquemáticas en donde la especulación e imaginación del autor son determinantes.

## 2.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien es cierto que la válvula mitral ha sido ampliamente estudiada, alcanzándose un conocimiento muy preciso sobre su anatomía y fisiología postnatal, el conocimiento que se tiene sobre su morfogénesis en la etapa prenatal es confuso y superficial, y su registro fotográfico es prácticamente nulo. Hasta ahora se han utilizado como modelos de estudio de la morfogénesis de la válvula mitral tanto embriones humanos como embriones de pollo, partiendo de la premisa que la expresión anatómica final es igual en ambos, e infiriendo por tanto que su morfogénesis debe ser también similar; consciente o

inconscientemente los autores han extrapolado sus observaciones de un modelo a otro dando descripciones del proceso más especulativas que reales.

Observaciones preliminares realizadas en nuestro grupo de investigación nos hicieron cuestionar la validez de la total extrapolación de los hallazgos encontrados en la válvula mitral en desarrollo en el hombre y en el pollo, por lo que nos pareció de gran interés estudiar, como una primera fase, los cambios morfológicos que presenta esta estructura desde sus etapas iniciales del desarrollo hasta su expresión anatómica final, utilizando como modelo el embrión de pollo y aplicando diferentes técnicas como la microscopía fotónica - con cortes histológicos seriados y con estereomicroscopía - y la microscopía electrónica de barrido, obteniendo el registro fotomicrográfico de dichos cambios.

### 3. HIPOTESIS

### 3. HIPOTESIS

1. En el pollo la morfogénesis de la válvula mitral no termina sino hasta la etapa fetal, uno o dos días antes de la eclosión.
2. La maduración histológica de la válvula mitral no concluye sino hasta después de la eclosión.
3. La morfología final de la válvula mitral en el pollo muestra algunas diferencias respecto a las que se describen en el corazón humano.

## 4. OBJETIVOS

#### 4. OBJETIVOS

1. Conocer la etapa precisa y cambios morfológicos que ocurren en el proceso de formación de la válvula mitral del pollo.
2. Conocer la participación de los cojines endocárdicos en la formación de los velos valvulares y del complejo músculo - tendinoso en este modelo.
3. Obtener el registro fotomicrográfico de todo este proceso.

# 5. MATERIAL Y METODOS



## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1. MATERIAL

#### 5.1.1. COMUN PARA LAS DIFERENTES TECNICAS UTILIZADAS

##### 5.1.1.1. BIOLÓGICO

- Huevos fértiles de gallina White Leghorn (400).

##### 5.1.1.2. APARATOS

- Ampliadora fotográfica Beseler.
- Balanza analítica Mettler H 10T.
- Estufa Lipshau electric laboratory.
- Incubadora de huevo con volteo automático y ventilación marca IAMEX.
- Microscopio estereoscópico Zeiss (Fig. 7A)
- Refrigerador.

##### 5.1.1.3. PARA MICRODISECCION

###### 5.1.1.3.1. CRISTALERIA (Fig. 7A)

- Cajas de Petri de 6 cm de diámetro.
- Frascos ámbar de 250 ml (4).
- Frascos de penicilina vacíos.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Pipetas Pasteur.

- Vasos de precipitado.

### 5.1.1.3.2. INSTRUMENTAL (Fig. 7A)

- Aguja histológica.
- Espumadera.
- Pinzas de disección sin dientes con punta fina de 5 cm de longitud.
- Pinzas de punta extrafina recta del No.5 (2).
- Pinza-tijera de Vannas.
- Tijeras de Mayo.
- Tijeras de Iris recta

### 5.1.1.3.3. VARIOS

- Agua destilada.
- Algodón.
- Bolsas de plástico.
- Bulbos para pipeta Pasteur
- Jeringa de 1 ml con aguja hipodérmica del número 27.
- Carbón activo.
- Ovoscopio.
- Papel parafilm.

### 5.1.1.4. MATERIAL FOTOGRAFICO

- Fijador ácido Kodak.
- Papel fotográfico Kodabrome II RC F2 o F3.
- Revelador DeKtol Kodak.

- Revelador HC-110 Kodak .
- Solución Photo-Flo 200 Kodak.
- Tanque de revelado Paterson completo.
- Termómetro.

## 5.1.2. PARA MICROSCOPIA FOTONICA

### 5.1.2.1. FOTONICA ESTEREOSCOPICA (Fig. 7B)

- Cámara fotográfica Nikon F3 de 35 mm.
- Equipo Multiphot Nikon para fotomicro-macrografía.
- Película Ilford Pan F-135 mm

### 5.1.2.2. FOTONICA CONVENCIONAL (HISTOLOGICA)

#### 5.1.2.2.1. APARATOS

- Afilador de cuchillas American Optical.
- Baño de flotación para histología.
- Fotomicroscopio Docuval Carl Zeiss Jena.
- Histokinette Wax Bath.
- Microtomo de rotación 820 American Optical.

#### 5.1.2.2.2. REACTIVOS

- Acido acético.
- Acido fosfotúngstico.
- Eosina.
- Hematoxilina Harris.

- Hematoxilina de Weigert.
- Masson Rojo.
- Parafina paraplast
- Verde luz.
- Xilol.

### 5.1.2.2.3. VARIOS

- Abrasivos para afilador de cuchillas.
- Batería de tinción
- Canastillas.
- Cubreobjetos.
- Cuchilla de acero inoxidable para microtomo 820.
- Escuadras para bloques de parafina.
- Formol.
- Gasa.
- Gelatina bacteriológica.
- Mechero de alcohol.
- Navajas.
- Película Technical Pan Film 2415 de 35 mm.
- Pincel.
- Portaobjetos.
- Reloj de laboratorio
- Resina sintética.

### 5.1.3. PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

#### 5.1.3.1. APARATOS (Fig. 8)

- Campana de extracción de gases
- Desecador punto crítico Samdri-780 A Tousimis (Fig. 8A).
- Microscopio electrónico de barrido Jeol JM-35 CF (Fig. 8 C).
- pHmetro.
- Recubridor de oro Jeol FineCoat Ion Sputter JFC-1100 (Fig. 8B).

#### 5.1.3.2. REACTIVOS

- Acido clorhídrico.
- Glutaraldehido.
- Sal sódica de ácido cacodílico.
- Tetraóxido de osmio.

#### 5.1.3.3. VARIOS

- Acetona.
- Canastilla portamuestras.
- Papel filtro.
- Placas fotográficas Ilford Film HP5 de 10 x 12.5 cm.
- Portamuestra.
- Sílica gel
- Thinner.
- Tintura de plata.
- Varillas de madera de 2 mm de diámetro.

## 5.2. METODOS

Con el objeto de investigar los cambios morfológicos que sufre la válvula mitral durante su desarrollo se estudiaron embriones y fetos de pollo entre 6 y 21 días de incubación; la edad exacta de los embriones y fetos fue determinada de acuerdo a la clasificación de Hamburger y Hamilton (1951).

Se eligió como modelo de estudio al pollo ya que éste ha sido el más utilizado en los trabajos sobre desarrollo prenatal y en consecuencia el modelo en que se tiene mayor experiencia y conocimiento. Se seleccionó la raza White Leghorn ya que se sabe es la que presenta menor incidencia de malformaciones cardíacas espontáneas.

Los huevos fértiles se colocaron en una incubadora con volteo automático a  $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y 86 - 87 % de humedad, durante el tiempo necesario para que el embrión o el feto de pollo alcanzara la edad apropiada. Una vez completado el tiempo de incubación se sacaron los huevos de la incubadora y se observaron en un ovoscopio, marcándose en el cascarón la ubicación exacta del embrión o feto (Fig. 9A). Se colocó el huevo en la base de una caja de Petri en cuyo fondo se puso un fragmento de algodón (Fig. 9B), y con una aguja histológica se hizo un pequeño orificio en la cámara de aire del huevo, con objeto de que el embrión o feto descendiera y no quedara pegado a la superficie interna del cascarón. Se hizo una perforación en

la zona donde se había localizado al embrión o feto dejando expuesto a éste (Fig. 9C); se cortaron las membranas que cubrían al producto y ayudándonos de una espumadera y/o pinzas de disección pequeñas de puntas curvas se extrajo del huevo al embrión o feto, colocándolo en una placa de disección (Fig. 10A). Se colocó éste en posición decúbito dorsal y observando a través de un microscopio estereoscópico se incidió longitudinalmente la pared ántero-medial del tórax mediante unas tijeras de iris rectas, dejando expuesto el corazón (Fig. 10B,C). Con el corazón aún "in situ", se perfundió éste con una jeringa hipodérmica a través del ventrículo derecho con solución Ringer para aves, con objeto de lavar el interior de las cavidades cardíacas y minimizar la formación de coágulos intracardiacos. A partir de este momento y dependiendo de si el corazón iba a ser procesado para su estudio con microscopía fotónica estereoscópica y electrónica de barrido, o si iba a ser sometido a cortes histológicos seriados y estudiado con microscopía fotónica convencional, el procesado fue diferente.

Todos aquellos embriones o fetos en que se detectó algún tipo de anomalía (externa o interna) y/o con un retraso significativo en su desarrollo (en relación a las horas de incubación) fueron eliminados del estudio, dejando para analizar sólo aquellos productos con fenotipo normal.

## 5.2.1. ANATOMIA MICROSCOPICA TRIDIMENSIONAL

La anatomía microscópica tridimensional del corazón fue realizada utilizando dos técnicas diferentes: 1) Microscopía fotónica estereoscópica y 2) Microscopía electrónica de barrido. Ambas técnicas fueron utilizadas en las mismas muestras, aplicando primero la microscopía fotónica estereoscópica y, finalmente, la microscopía electrónica de barrido. Se emplearon un mínimo de 5 embriones o fetos de cada estadio para las diferentes disecciones o cortes de estudio.

### 5.2.1.1. MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA

Para la realización de esta técnica, una vez que el corazón fue perfundido con la solución Ringer, con una jeringa con aguja hipodérmica del No. 27 se hace una segunda perfusión con solución Karnovsky, también a través del ventrículo derecho, teniendo especial cuidado de hacerlo lentamente para evitar distorsión de las estructuras internas. En ningún caso se retira el pericardio antes de la fijación para evitar, en lo posible, alteraciones en la morfología cardíaca - durante o después de la perfusión -. Dependiendo del tipo de corte o disección que se vaya a realizar se procede a continuar de la siguiente forma:

- 1) Si se pretende realizar la disección de la vía de entrada ventricular izquierda, la disección de la vía de salida ventricular izquierda o la desinserción de la válvula mitral



(ver más adelante), se coloca al corazón en decúbito lateral derecho, de tal forma que podamos observar su borde izquierdo, y con las pinzas-tijeras de Vannas se procede a realizar la disección, siempre observando a través del microscopio estereoscópico. Una vez hecha la disección, se separa al corazón del cuerpo del embrión o feto y se coloca en frascos de cristal con solución de Karnovsky, manteniéndose inmersos en el fijador por 24 horas a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . Pasado este tiempo se colocan las muestras en solución buffer de cacodilato 0.1 M, se estudian cuidadosamente bajo el microscopio estereoscópico y se fotografían aquellos especímenes representativos. Se colocan nuevamente los corazones en solución buffer de cacodilato 0.1 M, manteniéndose a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  para su ulterior procesado para microscopía electrónica de barrido.

- 2) Si se pretende realizar corte de "4 cámaras" o corte transversal del corazón (ver más adelante), se separa con sumo cuidado al corazón del embrión o feto, y se coloca en frascos de cristal con solución de Karnovsky, manteniéndose inmersos en el fijador por 24 horas a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . Pasado este tiempo se coloca al corazón en solución buffer de cacodilato 0.1 M y se procede a realizar el corte observando a través del microscopio estereoscópico. Se estudian los fragmentos del corte, también bajo el microscopio estereoscópico, y se fotografían aquellos especímenes representativos. Se colocan los fragmentos de los cortes en solución buffer de cacodilato 0.1 M, manteniéndose a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  para su ulterior procesado para microscopía electrónica de barrido.

#### 5.2.1.1.1. TECNICA DE DISECCION DE LA VIA DE ENTRADA VENTRICULAR IZQUIERDA

Este corte se realiza en embriones y fetos de los estadios 28 al 46 (5½ a 21 días). Se inicia en el techo del atrio izquierdo, llegando hasta el ápex ventricular izquierdo (Fig. 11A), teniendo cuidado de no desgarrar ninguno de los componentes valvulares. Una vez hecha la incisión, mediante unas pinzas de disección ultrafinas se separaran las paredes ventriculares, observando en el interior la estructura valvular. Con una pipeta Pasteur se pone fijador en el interior de la disección, manteniendo separadas las paredes ventriculares durante aproximadamente 60 segundos; pasado este tiempo se reseca la pared libre ventricular derecha y parte del ápex.

#### 5.2.1.1.2. TECNICA DE DISECCION DE LA VIA DE SALIDA VENTRICULAR IZQUIERDA

Este corte también se realiza en embriones y fetos de los estadios 28 al 46 (5½ a 21 días). Se coloca el corazón de tal forma que se visualice su borde izquierdo, y con las pinzas-tijeras de Vannas se hace una pequeña incisión en el ápex ventricular izquierdo; con sumo cuidado de no cortar ninguna de las estructuras internas se amplía la incisión en la pared hasta el nivel de la válvula aórtica (Fig. 11B). Con las pinzas de disección se mantienen separadas las paredes ventriculares observando en el interior a la válvula mitral y la continuidad

mitroaórtica, y mediante una pipeta Pasteur se procede a realizar la fijación del interior de la disección con solución de Karnovsky, manteniéndose separados los bordes de la disección por aproximadamente 60 segundos. Finalmente se reseca la pared libre ventricular derecha, el ápex ventricular y una parte del atrio.

### **5.2.1.1.3. TECNICA DE DESINSERCIÓN DE LA VALVULA MITRAL**

Esta disección se realiza en productos de la etapa fetal, es decir del estadio 33 al 46 (7½ a 21 días). El abordaje a la válvula mitral es similar a lo realizado en la disección de la vía de entrada ventricular izquierda (Pag. 33). Una vez visualizada la válvula mitral se identifican todos sus componentes, y mediante unas pinzas de disección ultrafinas y las pinzas tijeras de Vannas se cortan los músculos papilares lo más alejado posible de las cuerdas tendíneas (es decir, pegado al miocardio ventricular) (Fig. 11C). Finalmente, se cortan los velos valvulares del anillo fibroso valvular y se retira todo el conjunto valvular del corazón, colocándolo extendido en una caja de Petri con solución de Karnovsky por 30 minutos para que el tejido no se contraiga.

### **5.2.1.1.4. TECNICA DEL CORTE DE "4 CAMARAS"**

Este corte se realiza en embriones y fetos de los estadios 28 al 46 (5½ a 21 días). Para la ejecución de este corte se

utilizan unas pinzas-tijeras de Vannas (para los corazones más pequeños) o unas tijeras de iris rectas (para los corazones más grandes). Se sujeta suavemente el corazón con unas pinzas de disección finas y se colocan las tijeras con sus ramas abiertas en el ápex ventricular; las ramas de las tijeras deben de pasar por las paredes laterales de ambos ventrículos y ambos atrios, a nivel donde se calcula están situadas las válvulas atrioventriculares (Fig. 11D). Se cierran las tijeras con suavidad pero a la vez con firmeza, progresando el corte del ápex ventricular hacia el techo de los atrios, procurando que el corte se complete en un único movimiento de cierre de la tijera. Se separan las dos mitades del corte y se pone en su interior solución de Karnovsky con una pipeta Pasteur.

#### 5.2.1.1.5. TECNICA DEL CORTE TRANSVERSAL

Este corte se realiza en embriones y fetos de los estadios 26 al 46 (5½ a 21 días). Se utilizan unas pinzas-tijeras de Vannas (para los corazones más pequeños) o unas tijeras de iris rectas (para los corazones más grandes). Se sujeta suavemente el corazón con unas pinzas de disección finas y se colocan las tijeras con sus ramas abiertas con una orientación ventro-dorsal inmediatamente debajo del plano de las válvulas atrioventriculares; las ramas de las tijeras deben de pasar por las paredes laterales de ambos ventrículos. Se cierran las tijeras con suavidad, pero a la vez con firmeza, progresando el corte de la superficie ventral a la superficie dorsal

ventricular; a ser posible el corte debe realizarse en un único movimiento de cierre de la tijera. Se separan las dos mitades del corte (la superior o atrial y la inferior o apical) y se pone en el interior de ambas solución de Karnovsky con una pipeta Pasteur.

### 5.2.1.1.6. TECNICA FOTOMICROGRAFICA

Los especímenes a ser fotografiados deben ser cuidadosamente manipulados con las pinzas de disección adecuadas. Se colocan las muestras en la base de una caja de Petri, cuyo fondo está recubierto con una mezcla de parafina y carbón (para tener fondo negro uniforme que contraste con las muestras), y se coloca solución buffer de cacodilato 0.1 M hasta que ésta cubra totalmente el espécimen (con objeto de evitar reflejos molestos en la fotografía). El registro fotomicrográfico se realiza con un equipo MULTIPHOT NIKON, con cámara NIKON F-3 de 35 mm (Fig. 7B). La exposición se realiza en "automático" o manual, poniendo la sensibilidad de la película utilizada).

Ampliación. Dependiendo del tamaño de la muestra y de la ampliación que se desee obtener de ella, se elige el objetivo apropiado (de 19, 35, 65 ó 120 mm) y se aumenta o disminuye la distancia entre el plano de la película y el objetivo. Especial cuidado debe de tenerse en la apertura del diafragma del objetivo, debiendo realizarse la exposición con el diafragma lo mas cerrado posible a fin de aumentar la profundidad de foco.

Iluminación. La iluminación de la muestra se realiza con dos epiluminadores universales de 9V 30W, cuya intensidad (dada por el voltaje del transformador), distancia y ángulo de la luz variará para obtener la mejor imagen posible.

Película y revelado. Para el registro fotográfico se emplea película ILFORD PAN F de 35 mm (aunque pueden emplearse otras películas pancromáticas de grano fino), procesándose manualmente con revelador HC-110 dilución B, a 20 °C durante 7 minutos, y utilizando fijador ácido Kodak.

Impresión. Los negativos son positivados en una ampliadora BESLER, utilizando papel fotográfico KODABROME II RC F2 ó F3, el cual se procesa manualmente con revelador DEKTOL dilución 1:3 y fijador ácido Kodak.

## 5.2.1.2. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Una vez hecho el estudio y fotomicrografía fotónica de las disecciones o cortes, se procesan éstos para su estudio y registro con el microscopio electrónico de barrido. Primeramente, las muestras se posfijan con tetraóxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato (0.1 M y pH 7.2) durante una hora; debe evitarse en todo momento el contacto directo con el tetraóxido de osmio, por lo que todo este paso es obligado ha realizarlo bajo la campana de extracción de gases y protegerse con guantes y cubrebocas desechables. Se lavan las muestras varias veces con tampón de

cacodilato y se procede a deshidratarlas. La deshidratación se realiza en concentraciones crecientes de etanol al 70%, 85%, y 96%, manteniendo las muestras 10 minutos en cada alcohol, y finalmente se pasan por tres baños de etanol absoluto de 10 minutos cada uno. Las muestra se desecan por el método del punto crítico del  $\text{CO}_2$ , en el desecador Samdri-780 (Fig. 8A) y, bajo el microscopio estereoscópico, se pegan a los portamuestras del microscopio electrónico con pintura conductora de plata, cuidando darles lo orientación apropiada y de no deteriorarlas en la manipulación, ya que desecadas son muy frágiles. Una vez pegadas las muestras, se procede a recubrirlas con oro, en un recubridor Jeol (Fig. 8B) y son observadas en la pantalla fluorescente del microscopio electrónico de barrido a 20 Kv (Fig. 8C).

#### 5.2.1.2.1. TECNICA FOTOMICROGRAFICA

El registro fotomicrográfico de las muestras se realiza a través de la pantalla fluorescente del microscopio electrónico. El contraste y brillo de la pantalla fluorescente ya había sido previamente establecido, y la exposición se realiza automáticamente con los controles fotográficos correspondientes.

**Magnificación.** Dependerá del tamaño de la muestra y de la magnificación que se deseé obtener de ella, controlándose con los botones de magnificación del microscopio.

**Película y revelado.** Para el registro fotográfico se emplean

placas ILFORD HPS de 10 x 12.5 cm, procesándose en un tanque de revelado manual con revelador HC-110 dilución B, a 20 °C durante 7½ minutos, y utilizando fijador ácido Kodak.

**Impresión.** Los negativos son positivados en una ampliadora BESLER, utilizando papel fotográfico KODABROME II RC F2 ó F3, el cual se procesa manualmente con revelador DEKTOL dilución 1:3 y fijador ácido Kodak.

### 5.2.1.3. PREPARACION DE SOLUCIONES

#### 5.2.1.3.1. SOLUCION RINGER PARA AVES

NaCl.....	7.000 g
KCl .....	0.420 g
CaCl <sub>2</sub> .....	0.240 g
H <sub>2</sub> O .....	1 lt.

#### 5.2.1.3.2. BUFFER DE CACODILATO

Se prepara una solución de cacodilato 0.2 M y pH 7.2 disolviendo 4.28 g de sal sódica de ácido cacodílico en 100 ml de agua destilada y se ajusta a un pH de 7.2 con ácido clorhídrico 0.2 N. Preparada la solución se disuelve 1:1 con agua destilada y se guarda en el refrigerador a ± 4 °C en un frasco ambar sellado con papel parafilm.



### 5.2.1.3.3. SOLUCION DE KARNOVSKY

En la campana de extracción se disuelven 2 g de paraformaldehído en polvo en 40 ml de agua destilada con agitación continua a 70 °C. Se agregan de 1-3 gotas de hidróxido sódico 0.1 N y se agita hasta que se aclare la solución; se enfría y se agregan 10 ml de glutaraldehído al 25% y se lleva a 100 ml con buffer de cacodilato al 0.2 M y pH 7.2. Finalmente se añade a la solución 25 mg de CaCl<sub>2</sub>, se agita muy bien y se guarda en el refrigerador a ± 4 °C en un frasco ámbar sellado con papel parafilm.

### 5.2.1.3.4. TETRAOXIDO DE OSMIO

Primero se prepara una solución acuosa de tetraóxido de osmio al 2% abriendo una ampolla de 100 mg de tetraóxido de osmio en cristales. La ampolla así abierta se deja dentro de un frasco ámbar en el que se añaden 15 ml de agua destilada. El tetraóxido de osmio tarda en disolverse, en el refrigerador a ± 4 °C, aproximadamente cuatro días. El frasco debe ser sellado con papel parafilm. Esta mezcla se puede guardar congelada y aislada de la luz durante varios meses. La solución de trabajo se prepara disolviendo 1:1 la solución de tetraóxido de osmio con el buffer de cacodilato 0.2 M y pH 7.2 y debe ser utilizado en el momento.

## 5.2.2. ANATOMIA MICROSCOPICA BIDIMENSIONAL CON CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS

Esta técnica se realizó en embriones y fetos de los estadios 28 al 46 (5½ a 21 días), utilizando mínimo 3 especímenes de cada estadio. Para la realización de este estudio, una vez que el corazón se perfundió con solución Ringer (Pag. 30), con una jeringa con aguja hipodérmica del No. 27 se hace una segunda perfusión con formol buffer al 10%, también a través del ventrículo derecho, teniendo precaución de hacerlo lentamente para evitar distorsión de las estructuras internas. Se dejan pasar de 5 a 10 minutos y se extrae el corazón, manteniéndose inmerso durante 72 horas en el mismo tipo de fijador. Pasado ese tiempo se sacan los corazones del formol, se lavan con agua corriente durante dos horas y se da un lavado final con agua destilada. Concluido este último se procede al procesado manual de las muestras siguiendo los pasos enumerados a continuación: a) deshidratación, b) inclusión, c) corte y montaje, d) desparafinación y e) Tinción. Obtenidas las laminillas histológicas, se estudian al microscopio fotónico convencional con campo claro y se fotografían aquellos cortes representativos.

### 5.2.2.1. DESHIDRATACION

Los especímenes son deshidratados utilizando alcoholes con diferente concentración de acuerdo a los siguientes pasos:

Alcohol I 85 % ..... 15 minutos

Alcohol II 85 %	15 minutos
Alcohol I 96 %	15 minutos
Alcohol II 96 %	15 minutos
Alcohol absoluto I	15 minutos
Alcohol absoluto II	15 minutos

### 5.2.2.2. INCLUSION

La inclusión de las muestras se realiza en parafina, siguiendo los siguientes pasos:

Alcohol absoluto + aceite de cedro	2 horas
Aceite de cedro puro	12 horas
Aceite de cedro + cloroformo	2 horas
Cloroformo puro I	1 hora
Cloroformo puro II	1 hora
Cloroformo + parafina 52 <sup>o</sup> -54 <sup>o</sup>	30 minutos
Parafina 52 <sup>o</sup> -54 <sup>o</sup>	1 hora
Parafina I 56 <sup>o</sup> -58 <sup>o</sup>	1 hora
Parafina II 56 <sup>o</sup> -58 <sup>o</sup>	1 hora

Concluido el último paso se colocan las escuadras para histología formando un recuadro de tamaño apropiado y se vierte en su interior un poco de parafina; se colocan en ella 1 ó 2 muestras, teniendo especial cuidado de orientarlas en forma conveniente y se vierte más parafina hasta cubrir el corazón. Se espera a que la parafina solidifique y se retira el bloque de las escuadras.

### 5.2.2.3. CORTE Y MONTAJE

Cada bloque se corta en forma de pirámide truncada y se pega en la platina del microtomo, teniendo especial cuidado de orientar el bloque de una manera apropiada (según se desee el plano de corte). Se hacen cortes seriados a 8  $\mu\text{m}$  de espesor en un microtomo de rotación, sacando tiras de 3 a 8 cortes (según sea el tamaño de éstos), los cuales se colocan en un baño de flotación que contiene gelatina bacteriológica disuelta. Finalmente, se colocan los cortes sobre portaobjetos limpios convenientemente marcados con lápiz de diamante, donde se dejan secar a temperatura ambiente; especial cuidado debe tenerse de no perder ningún corte y de orientarlos todos en los portaobjetos en la misma forma.

### 5.2.2.4. DESPARAFINACION

Una vez que los cortes se han secado y al mismo tiempo pegado a los portaobjetos, se colocan éstos en canastillas histológicas y se realizan los siguientes pasos:

Xilol I .....	20 minutos
Xilol II .....	20 minutos
Alcohol 100% .....	5 minutos
Alcohol 96% .....	5 minutos
Alcohol 70 % .....	5 minutos
Alcohol 50 % .....	5 minutos

## 5.2.2.5. TINCION

### 5.2.2.5.1. HEMATOXILINA-EOSINA

Los cortes ya desparafinados son teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina, siguiendo los siguientes pasos:

Xilol I .....	5 minutos
Xilol II .....	5 minutos
Xilol III .....	5 minutos
Alcohol 100% .....	3 minutos
Alcohol 96% .....	3 minutos
Alcohol 80% .....	3 minutos
Alcohol 70% .....	3 minutos
Agua destilada .....	lavado
Hematoxilina .....	3-5 minutos
Agua corriente .....	10 minutos
Agua destilada .....	lavado
Eosina .....	3-5 minutos
Agua destilada .....	lavado
Alcohol 70% .....	lavado
Alcohol 80% .....	lavado
Alcohol 96% .....	1-2 minutos
Alcohol 100% .....	5 minutos
Carboxilol .....	lavado
Xilol I .....	2 minutos
Xilol II .....	5 minutos
Xilol III .....	15 minutos

Se dejan escurrir los portaobjetos y se cubre la preparación con un cubreobjetos de tamaño apropiado utilizando resina sintética como medio de montaje.

### 5.2.2.5.2. TRICROMICO DE MASSON

Los cortes ya desparafinados son teñidos con la técnica de tricrómico de Masson, siguiendo los siguientes pasos:

Xilol .....	15 minutos
Alcohol I 100% .....	lavado
Alcohol II 100% .....	lavado
Alcohol I 96% .....	lavado
Alcohol II 96% .....	lavado
Agua destilada .....	lavado
Hematoxilina de Weigert .....	6-8 minutos
Agua corriente .....	5 minutos
Agua destilada .....	lavado a fondo
HCl 1% en alcohol al 70% .....	lavado
Mason rojo .....	6 minutos
Acido fosfotúngstico al 5% .....	3-4 minutos
Acido acético al 0.2 % .....	lavado
Verde luz .....	4-5 minutos
Acido acético 0.2 % .....	lavado
Alcohol I 96 % .....	lavado
Alcohol II 96 % .....	lavado
Alcohol I 100 % .....	lavado
Alcohol II 100 % .....	lavado

Alcohol III 100 % .....	lavado
Xilol .....	lavado

Se dejan escurrir los portaobjetos y se cubre la preparación con un cubreobjetos de tamaño apropiado utilizando resina sintética como medio de montaje.

### 5.2.2.6. TECNICA FOTOMICROGRAFICA

Una vez estudiadas las laminillas histológicas se seleccionan aquellas imágenes mas demostrativas o representativas de los cambios histológicos que sufre la válvula mitral en su desarrollo. Las fotomicrografías se realizan en un fotomicroscopio DOCUVAL, con cámara de 35 mm, realizándose la exposición en "automático" y poniendo una sensibilidad de 18 DIN (para la película utilizada de blanco y negro).

**Magnificación.** Según sea el tamaño de la imagen y la magnificación que se desee obtener de ella, se coloca el objetivo apropiado (de 1x, 3.2x, 10x, 25x, 63x ó 100x) y su condensador correspondiente.

**Iluminación.** Se realiza utilizando campo claro con una lámpara de halógeno de 12V 50W e intercalado un filtro verde en el momento de la fotografía. Especial cuidado debe tenerse de realizar adecuadamente la iluminación de Köhler antes de tomar la fotografía.

**Película y revelado.** Para el registro fotomicrográfico se emplea película Ilford Pan F de 35 mm, procesándose manualmente con revelador HC-110 dilución B, a 20<sup>o</sup> C durante 7 minutos, utilizando fijador Kodak.

**Impresión.** Los negativos son positivados en una ampliadora BESELER, utilizando papel fotográfico KODABROME II RC F2 ó F3, el cual se procesa manualmente con revelador DEKTOL dilución 1:3 y fijador ácido Kodak.

## 5.2.2.7. PREPARACION DE SOLUCIONES

### 5.2.2.7.1. COLORANTE DE VERDE LUZ

Verde luz .....	0.1 g
Acido acético glacial .....	0.2 ml
Agua destilada .....	100 ml

### 5.2.2.7.2. HEMATOXILINA DE WEIGERT

#### Solución A:

Hematoxilina .....	1 g
Alcohol 96 % .....	100 ml
(madurar durante 1 mes)	

#### Solución B:

Solución acuosa de cloruro férrico 29 % ...	4 ml
---	------



Agua destilada .....	100 ml
HCl .....	1 ml

Mezclar la solución A y B por partes iguales, vertiendo la solución B en la A.

### 5.2.2.7.3. MASSON ROJO

Ponceau xilidene .....	2 g
Fuchina ácida .....	1 g
Orange G .....	2 g
Acido acético 0.2% .....	300 ml

Para la tinción se disuelven 18 ml de la mezcla de Masson en 200 ml de ácido acético al 0.2%.

### 5.2.2.7.4. FORMOL BUFFER

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ .....	4.0 g
$\text{PO}_4\text{HNa}$ .....	6.5 g
Formol comercial al 10 % .....	1.0 l

## 6. RESULTADOS

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ESTADIO 26 (5½ - 6 días) (Figs. 12, 13, 14, 15 y 16)

#### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA

En este estadio se ha completado totalmente la fusión de los cojines endocárdicos ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular, no apreciándose ninguna evidencia morfológica de su zona de fusión, lo que impide precisar hasta donde llega el tejido de uno y del otro (Fig. 13 A,B). Vistos desde los ventrículos, los cojines fusionados forman una superficie cóncava, constituyendo el techo de la comunicación interventricular embrionaria (Fig. 13); el borde o tubérculo derecho de los cojines fusionados se alinea con el asta posterior del septo interventricular primitivo (en la cara dorso-inferior del corazón) y con el espolón bulbo-ventricular (en la cara ventro-superior del corazón) (Fig. 13 C). No se aprecian músculos papilares, cuerdas tendinosas, ni velos valvulares.

#### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

No obstante el poder de resolución obtenido mediante esta técnica, no fue posible observar, en ninguna de las proyecciones, el límite de fusión entre los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular (Figs. 14 y 15 ). Los cojines fusionados, además de formar una superficie cóncava hacia los ventrículos (que forma el techo de la comunicación interventricular embrionaria), en su porción más dorsal se curvan

también hacia la izquierda, quedando su borde o tubérculo derecho más abajo que el izquierdo (Fig. 14 A); en su porción ventral los cojines se adelgazan y se curvan hacia la derecha, alojando al cono posteromedial o aórtico en su concavidad, el cual sigue un curso oblicuo hacia arriba y a la derecha (Fig. 14 B). En los bordes laterales -derecho e izquierdo- del canal atrioventricular se pudieron apreciar los cojines laterales derecho e izquierdo, respectivamente (Fig. 14 A,B). El extremo ventricular de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior forman dos columnas adosadas a la pared ventricular ventral y dorsal, descendiendo en dirección al ápex ventricular y perdiéndose finalmente entre sus trabéculas (Fig. 15 A,C); dichas columnas daban la impresión de ser los primordia de los músculos papilares anterior y posterior. En el borde lateral izquierdo del canal atrioventricular se encontró una tercera columna muscular, que al igual que las anteriormente descritas se perdía entre las trabéculas musculares de la pared ventricular (Fig. 15 B,C), dando la impresión de corresponder a un tercer primordio de músculo papilar. El adelgazamiento del cojín lateral izquierdo y de la mitad ventral de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior daban la apariencia de velo valvular rudimentario (Fig. 14 B). No se apreció ningún tipo de evidencia de cuerdas tendinosas.

#### CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS

Con las tinciones utilizadas no fue posible identificar el límite de fusión de los cojines endocárdicos ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular, continuándose sin línea de demarcación al uno con el otro. La constitución histológica de

dichos cojines fusionados era similar a la observada en los cojines laterales derecho e izquierdo del canal atrioventricular: una fina capa endocárdica rodeando a un tejido mesenquimático denso, el cual se continúa sin línea neta de demarcación con el miocardio ventricular (Fig. 16).

## 6.2. ESTADIO 29 (6 - 6½ días)

MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA, MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO Y CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS

Tanto con microscopía fotónica como con microscopía electrónica de barrido se encontró más o menos la misma morfología de la válvula mitral que como descrita en el estadio 28, siendo más acusado el adelgazamiento del borde libre del cojín lateral izquierdo, y de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior fusionados. La comunicación interventricular era mucho más pequeña que en el estadio previo. Histológicamente, la morfología era también similar a la observada en el estadio 28.

## 6.3. ESTADIO 30 (6½ - 7 días) (Figs. 17 y 18)

MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA

Los cojines ventrosuperior y dorsoinferior fusionados hacían patente la incurvación de su porción dorsal, evidenciándose el nivel más bajo de su tubérculo derecho con respecto al izquierdo.

La comunicación interventricular se había cerrado ya en algunos especímenes y en los restantes era muy pequeña. Las astas ventral y dorsal del septo interventricular primitivo mantenían su relación con los cojines ventrosuperior y dorsoinferior, respectivamente. Es hasta este estadio en que pudimos evidenciar mediante esta técnica el cojín lateral izquierdo del canal atrioventricular. No se observaron imágenes sugestivas de músculos papilares, cuerdas tendinosas, ni velos valvulares.

#### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

El adelgazamiento e incurvación hacia la derecha de la porción ventral de los cojines fusionados era más evidente, observándose en el mesenquima de los cojines la terminación de fascículos musculares provenientes de los músculos papilares en desarrollo (Fig. 17). Los primordios de los músculos papilares anterior y posterior fueron, en esta edad, claramente identificados (Fig. 17 A y 18 B), al igual que el músculo lateral que se había observado desde etapas previas. Los cojines ventrosuperior y dorsoinferior fusionados se encontraron francamente adelgazados, fundamentalmente en su borde libre, formando ya un franco velo valvular anterior rudimentario (Fig. 17 A y 18 B); imágenes similares fueron observadas en el cojín lateral formando un velo valvular posterior rudimentario (Fig. 18 A,B y C). En esta edad se observaron depresiones del endocardio en el borde libre del velo valvular anterior de la mitral (Fig. 18 C,D). No se observaron evidencias de cuerdas tendinosas ni en el velo anterior ni en el posterior.

#### 6.4. ESTADIOS 31-32 (7 - 7½ días)

##### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA Y ELECTRONICA DE BARRIDO

Las observaciones realizadas en este lapso mostraron básicamente la misma morfología de la válvula mitral que en los estadios previos, tanto con microscopía óptica estereoscópica como con microscopía electrónica de barrido. Las depresiones del endocardio que se habían observado desde el estadio 30 en el borde libre del velo valvular anterior de la mitral eran en estos estadios más abundantes. El evento morfogenético del corazón más trascendente en esta etapa es el cierre de la comunicación interventricular embrionaria, lo cual ya había sido observado en algunos embriones del estadio 30; a partir del estadio 32 no se observó ningún embrión con dicha comunicación permeable.

#### 6.5. ESTADIO 35 (8½ - 9 días) (Fig 19)

##### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA Y ELECTRONICA DE BARRIDO

En este estadio los velos valvulares son ya muy evidentes recordando francamente la morfología de un velo valvular en la etapa post-natal, estando ya el velo valvular anterior en continuidad directa con las sigmoideas aórticas (Fig. 19). Los músculos papilares se ven más individualizados del miocardio que en las etapas previas, pero no se aprecian aún cuerdas tendinosas.

## 6.6. ESTADIO 37 (11 días) (Figs. 20, 21 y 22)

### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA

Las valvas anterior y posterior de la válvula mitral son claramente identificables y, aunque aún de un grosor considerable, recuerdan bastante a los velos valvulares de la etapa post-natal. De igual manera, los músculos papilares son claramente identificados y en número de tres (Fig. 20), tal como ya había sido detectado por microscopía electrónica de barrido en etapas previas. Mediante este sistema óptico se apreciaban a los músculos papilares continuarse directamente con los velos valvulares, no observándose en su zona de continuidad ninguna imagen que recordara a las cuerdas tendinosas (Fig. 20 A,B).

### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Los velos valvulares y los músculos papilares estaban casi totalmente individualizados del miocardio parietal (pared posterior o libre ventricular) y septal (septo inter-ventricular), pero aún era gruesa su unión con el anillo valvular. Las comisuras anterior y posterior (zona de continuidad anterior y posterior de las valvas) pudieron ser perfectamente identificadas, siendo éstas el punto de continuidad de los músculos papilares con los velos valvulares (Fig. 21 A). En el área comisural de algunas muestras se apreciaron "grietas" en el endocardio, que por su posición y dirección podrían corresponder al inicio del mecanismo de formación de las cuerdas tendinosas (Fig. 21 A,B).



#### CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS

Histológicamente los esbozos valvulares estaban constituidos por tejido mesenquimático denso, el cual se continuaba directamente con el tejido miocárdico de los músculos papilares en formación (Fig. 22 A,B); el borde libre de dichos esbozos valvulares se había adelgazado considerablemente, pero aún eran muy gruesos en su borde de unión al anillo valvular (Fig. 22 A,C). En el interior de la zona de transición del mesénquima de los esbozos valvulares con el miocardio de los músculos papilares se llegaban a apreciar espacios vacíos no recubiertos de endocardio, que posiblemente pudieran corresponder a un reordenamiento mesenquimal que precedería a la formación de las cuerdas tendíneas (Fig. 22 B). En la zona de unión de los esbozos valvulares con el miocardio ventricular se apreciaba ya un franco proceso de "despegamiento" de los primeros, produciendo un adelgazamiento de los velos valvulares a este nivel y, probablemente, una mayor movilidad de los mismos (Fig. 22 C).

#### 6.7. ESTADIO 38 (12 días) (Figs. 23 y 24)

##### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA

En varias de las muestras analizadas ya fue posible observar fenestraciones y/o pequeños orificios en el área de continuidad de los músculos papilares ántero-lateral y póstero-medial con el velo valvular anterior, que nos sugieren la presencia de cuerdas tendinosas rudimentarias; éste hallazgo no pudo ser observado en

la unión de ninguno de los músculos papilares con la valva posterior.

#### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Mediante esta técnica ya fue posible identificar con toda claridad las primeras cuerdas tendinosas en formación, hallazgo que fue observado en todas las muestras estudiadas, pero, como fue reseñado en el párrafo anterior, sólo en la unión de los músculos papilares ántero-lateral y póstero-medial con el velo valvular anterior (Fig. 23 A). Por la cara atrial (superior) las cuerdas tendinosas se vieron con toda claridad, formándose por la coalescencia de varias fenestraciones u orificios, en algunos de los cuales aún era posible observar cordones celulares - íntegros o rotos -, que nos sugieren que el mecanismo implicado en su formación fuera la muerte celular (Fig. 23). Por la cara ventricular (inferior), sólo fue posible observar algunas fenestraciones u orificios, de menor tamaño y en menor cantidad que los apreciados por la cara atrial de la valva, indicando que el proceso de formación de las cuerdas tendinosas por esta cara estuviera más atrasado que por la otra (Fig. 24).

En la unión de los músculos papilares con el velo valvular posterior no se encontraron todavía cuerdas tendinosas, aunque algunas pequeñas "grietas" y/o depresiones si pudieron ser apreciadas (Fig. 23 A). También se observó en todas las muestras analizadas una comisura lateral justo donde el velo valvular posterior se continuaba con el músculo papilar lateral.

## 6.6. ESTADIO 39 (13 días) (Fig. 25)

### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA

En todas las muestras, por la vía de entrada (cara atrial), fueron observadas cuerdas tendinosas bien formadas uniendo los músculos papilares - anterior y posterior - con el velo valvular anterior (septal) de la mitral; por la vía de salida (cara ventricular) las cuerdas tendinosas de la valva anterior (septal) de la mitral eran escasas y muy burdas. En el velo valvular posterior (parietal) no se encontraron aún cuerdas tendinosas por la cara atrial, uniéndola con los músculos papilares anterior, posterior y lateral; en esta zona sólo fueron observadas "grietas" más o menos bien formadas que pudieran corresponder a cuerdas tendinosas en periodo muy incipiente de formación.

### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Se corroboraron las observaciones hechas con microscopía fotónica, siendo perfectamente identificadas las cuerdas tendinosas de la valva anterior (septal) tanto por la vía de entrada (cara atrial) (Fig. 25 A) como por la vía de salida (cara ventricular) (Fig. 25 C). De igual manera, fue notorio que el proceso de formación de las cuerdas tendinosas progresaba de la cara atrial a la cara ventricular de la valva, observándose en la primera múltiples concavidades con cordones celulares con diferentes grados de ruptura o desintegración (Fig. 25 B), característica que en ninguna muestra se vió por la cara ventricular. En el velo valvular posterior (parietal), mediante

esta técnica, ya fue posible identificar cuerdas tendinosas rudimentarias por la cara atrial de la valva, aún muy cortas y que al parecer aún no se abrian a la cara ventricular (Fig. 25 A).

## 6.9. ESTADIO 40 (14 Días) (Figs. 26 y 27)

### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA Y ELECTRONICA DE BARRIDO

Mediante ambas técnicas se observaron mucho mejor desarrolladas las cuerdas tendinosas de ambos velos valvulares (Fig. 26). En el velo valvular posterior se encontró una amplia gama en la formación de las cuerdas tendinosas; en algunos especímenes las cuerdas estaban más avanzadas que en otros (compárese A y B con C y D en Fig. 26), pero en todos los casos el proceso de formación alcanzaba la cara ventricular de la valva en la mayoría de las fenestraciones vecinas al velo septal (Fig. 26 B), y estaba en diferentes grados de perforación en las zonas alejadas a la valva (Fig. 26 D). Esta última característica sugiere que el proceso progresa del velo valvular hacia el músculo papilar.

### CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS

El mesénquima de los velos valvulares sigue apreciándose denso, pero ya pudo ser observado claramente la individualización de las cuerdas tendíneas por la cara ventricular de las valvas, aunque todas ellas alejadas de su borde libre (Fig. 27). Los velos valvulares en su unión con el anillo fibroso de la válvula se observaban mucho más adelgazados que en etapas previas.

## 6.10. ESTADIO 41 (15 días) (Figs. 28 y 29)

### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA Y ELECTRONICA DE BARRIDO

Básicamente, la morfología de ambos velos valvulares por la vía de entrada (cara atrial) fue similar que en el estadio previo (Fig. 28 A). Por el contrario, por la vía de salida (cara ventricular) la valva anterior mostró ya un grado de desarrollo de las cuerdas tendinosas tan avanzado como por la otra cara, y apareció un reborde endocárdico que, a partir del borde libre, se dirigía en dirección al anillo valvular perdiéndose aproximadamente a la mitad de la distancia entre estos puntos (Fig. 28 B).

### CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS

A diferencia de lo que se observaba en los estadios previos, el mesénquima de los velos valvulares se observaba laxo, diferenciándose con claridad del tejido conectivo denso que se apreciaba en las cuerdas tendinosas (Fig. 29 A). Dichas cuerdas tendinosas se encontraron ya muy adelgazadas e individualizadas, aproximándose más al borde libre en ambos velos valvulares (Fig. 29).

## 6.11. ESTADIOS 42 y 43 (16 - 17 días) (Figs. 30 y 31)

### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOPICA Y ELECTRONICA DE BARRIDO

La morfología valvular fue similar a la observada en los

estadios previos, pero aún se pudieron apreciar múltiples zonas de cuerdas tendíneas en formación, tanto en la valva anterior como en la posterior (Fig. 30), pero siempre manteniéndose el mayor desarrollo de las cuerdas tendíneas de la valva anterior.

#### CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS

Histológicamente la morfología de los velos valvulares, cuerdas tendíneas y músculos papilares fue similar a los estadios previos (Fig. 31), apreciándose con mayor claridad los espacios internos precursores de nuevas fenestraciones, tanto en el extremo de unión a las valvas como en el extremo de unión a los músculos papilares (Fig. 31 B,C); en este último se pudo apreciar también un arreglo de tejido conectivo laxo alrededor de dichos espacios, que posiblemente sea el sitio donde se extenderán las nuevas fenestraciones (Fig. 31 B,C).

### 6.12. ESTADIO 46 (21 días) (Figs. 32 y 33)

#### MICROSCOPIA FOTONICA ESTEREOSCOFICA Y ELECTRONICA DE BARRIDO

Este estadio es en el cual el pollo eclosiona del huevo y por tanto el final de la etapa prenatal. Por la vía de entrada (cara atrial) se apreciaban los velos valvulares y las cuerdas tendinosas totalmente conformados, mostrando estas últimas la clásica imagen en forma de abanico surgiendo de los músculos papilares (Fig. 32 A,B). Aún se aprecian zonas de fenestración de nuevas cuerdas tendíneas, lo que indica que el proceso de

formación de cuerdas tendinosas no ha concluido (Fig. 32 B). Por la cara ventricular la valva anterior mostró ya cuerdas tendíneas terminando en el borde libre de la valva, a escasa distancia de éste, y en algunas zonas alcanzando el anillo valvular o zonas vecinas (Fig. 32 C,D). El reborde endocárdico observado en el estadio 41 en esta cara de la valva, fue apreciado todavía pero en forma muy incipiente (Fig. 32 C).

#### CORTES HISTOLOGICOS SERIADOS

La arquitectura histológica de los velos valvulares, cuerdas tendíneas y músculos papilares fue básicamente similar a la observada en los estadios previos (Fig. 33). Por la cara ventricular de los velos valvulares se apreciaban zonas de "desprendimiento" de células endocárdicas (Fig. 33 A,B), que podrían estar implicadas en el proceso de formación de nuevas cuerdas tendíneas y/o del adelgazamiento de los velos.

## 7. D I S C U S I O N



## 7. DISCUSION

En la literatura mundial se ha escrito mucho acerca de la válvula mitral dada la gran trascendencia que esta estructura tiene para el funcionamiento normal o anormal del corazón; en las últimas décadas se han multiplicado los artículos publicados sobre este tópico, fundamentalmente en lo referente a su patología -congénita o adquirida- y a su posible reparación quirúrgica. Sin embargo, llama la atención el hecho de que entre todos los artículos publicados sobre la válvula mitral, poca atención ha sido dada al proceso de formación de esta estructura, y la explicación que se da de dicho proceso es muy superficial y más especulativa que real, generalmente basada en dos o tres trabajos clásicos (ODGERS, 1938, VAN MIEROP y Cols, 1962, NETTER y VAN MIEROP, 1969, fundamentalmente). Si la explicación que se da al proceso de formación de la válvula mitral es tan incompleta como comentado antes, no sorprende el hecho de que en la literatura prácticamente no aparezcan imágenes directas que ilustren los diferentes pasos del desarrollo de la válvula mitral, y éstas sean substituidas por representaciones esquemáticas también basadas en los trabajos clásicos del tema. Por todo esto, nos pareció de gran interés y trascendencia realizar un estudio morfológico acerca de la formación de la válvula mitral utilizando la tradicional técnica de cortes histológicos seriados y técnicas de estudio tridimensional del corazón a base de microdisecciones y cortes vistos con microscopia fotónica y electrónica de barrido, captando con ambas

el registro fotomicrográfico del proceso; se seleccionó como modelo de estudio el corazón de pollo fundamentalmente por tres razones: 1º Es en este modelo y en el corazón humano en los que más se ha estudiado el desarrollo prenatal del corazón, y por ello en los que mayor experiencia y conocimiento se tiene del tema; 2º La fácil obtención y manejo de los embriones y fetos de pollo nos aseguraba el poder realizar el estudio en forma secuencial sin perder ninguna etapa del desarrollo, cosa que es prácticamente imposible de realizar si se utilizan embriones y fetos humanos; y 3º El obtener los embriones y fetos de pollo vivos, nos permite procesar óptimamente los corazones para su estudio con microscopía fotónica estereoscópica y, sobre todo, con microscopía electrónica de barrido.

Con respecto a la anatomía normal de la válvula mitral, ya los trabajos clásicos de la anatomía del corazón humano dan descripciones detalladas de sus características morfológicas cuali-cuantitativas, pero hay que resaltar el hecho de que las descripciones han sido hechas en corazones de adultos, y poca información hay acerca de como está esta estructura en el corazón del niño, aún menos en el neonato y prácticamente nada en el feto, especulándose que ya desde la etapa fetal están determinadas sus características cualitativas y, obviamente, sólo habrá cambios cuantitativos hasta llegar al corazón de la etapa adulta. LAM y RANGANATHAN, en 1970, y RANGANATHAN y LAM, también en 1970, hicieron una importante revisión sobre la anatomía normal de la válvula mitral en el hombre, haciendo hincapie en algunas características de vital importancia para la cirugía de

esta región del corazón; a partir de entonces dichos trabajos han sido tomados como puntos de referencia esenciales sobre este tema. ANDERSON y BECKER en su libro sobre Anatomía Cardíaca publicado en 1980, proporcionan imágenes del corazón humano de inigualable calidad, mostrando con toda claridad las características esenciales de la válvula mitral y sus relaciones con las restantes estructuras intracardiacas. DE LA CRUZ y Cols, en 1960 y ROWLATT y Cols, en 1963, hicieron importantes contribuciones sobre la anatomía cuantitativa del corazón en la etapa infantil, y sus tablas son consideradas en la literatura mundial; ALVAREZ y Cols, en 1987, hicieron uno de los pocos estudios cuantitativos del corazón publicados hasta ahora de la etapa fetal, aunque la mayoría de sus casos corresponden a la etapa fetal tardía. Referente a la anatomía normal del corazón del pollo, se ha aceptado ampliamente que en esencia es similar cualitativamente al del hombre, con excepción del tabique interatrial, del septo membranoso y del arco aórtico; la válvula mitral del pollo ha sido considerada casi por todos los autores como semejante morfológicamente a la del hombre.

En cuanto a las técnicas de estudio del corazón en la etapa prenatal para tratar de investigar su morfogénesis y procesos morfogenéticos involucrados, tradicionalmente ha sido empleado en todos los modelos biológicos los cortes histológicos seriados. Que duda cabe de la trascendencia de esta técnica y de los importantes hallazgos obtenidos en el desarrollo embriológico en general, y del corazón en particular, pero hay que tener en mente de los inconvenientes y limitaciones de esta técnica, entre las

cuales se pueden destacar el que produce en mayor o menor grado artefactos derivados del procesado de las muestras y que la imagen tridimensional es alcanzada de la suma o superposición de muchas imágenes bidimensionales captadas mental, fotográfica o diagramáticamente; son obvias las posibilidades de error de la técnica, pudiendo con suma facilidad perderse, invertirse o girarse algunos de los cortes, sobre todo en manos inexpertas, que llevaría a conclusiones erróneas, y además si la reconstrucción tridimensional es mental o diagramática la interpretación subjetiva del observador juega un papel crucial influido -conciente o inconcientemente- por ideas preconcebidas. En la última década se han intentado minimizar estos problemas introduciendo técnicas de reconstrucción tridimensional por computadora con analizadores de imagen, que seguramente permitirá importantes avances en el estudio de la embriología.

Además de esta técnica clásica de la embriología se han utilizado en las últimas décadas otras técnicas que permiten realizar estudios descriptivos y/o experimentales, que nos han venido proporcionando cada vez mayor y más completa información sobre el desarrollo embriológico y fetal. Entre las técnicas descriptivas hay que resaltar la microscopía estereoscópica utilizando el microscopio fotónico estereoscópico o el microscopio electrónico de barrido; ambas técnicas proporcionan directamente imágenes tridimensionales de las estructuras, con una mínima o nula distorsión de las relaciones, si se realizan las disecciones o cortes adecuados, y con la facilidad de captar fotográficamente dichas imágenes; una limitante que hay que tener

en cuenta de la microscopía fotónica estereoscópica es que su poder de resolución es bueno sólo con baja magnificación (menos de 30 aumentos), cosa que no ocurre con la microscopía electrónica de barrido en el que el poder de resolución es excelente con alta magnificación (500 ó incluso más aumentos), pero que requiere condiciones de procesado de las muestras muy específicas y laboriosas. Estas técnicas nos proporcionan importante información de las estructuras en cuanto a su forma, tamaño, textura y relaciones, pero no nos dan ninguna información de su función ni de su arquitectura a nivel celular, pudiéndonos orientar sobre los mecanismos morfogénéticos involucrados.

Por otro lado, las técnicas experimentales en la embriología si nos permiten estudiar la función y mecanismos morfogénéticos durante el desarrollo prenatal, pero sólo son aplicables en modelos animales, fundamentalmente en aquellos que tienen su desarrollo prenatal fuera del claustro materno, tales como las aves; es por ésto que la mayoría de los estudios experimentales realizados sobre el desarrollo prenatal del corazón han sido hechos en embriones de pollo y muy pocos en embriones o fetos de mamíferos.

Como fue referido, entre los trabajos clásicos sobre el desarrollo prenatal de la válvula mitral está el artículo de ODGERS (1938), quién hizo una descripción de ambas valvas atrioventriculares en corazones de embriones y fetos humanos, utilizando cortes histológicos seriados teñidos con hematoxilina-eosina o con tricrómico de Masson. Describe que en los

embriones de 12.5 mm C-R, la valva septal de la mitral está formada por los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular, ya fusionados, constituidos por "tejido de cojín" desprovisto de músculo. En embriones de 17 y 17.5 mm ya identificó al músculo papilar anterior unido a la valva septal de la mitral, la cual aún estaba constituida por "tejido de cojin"; la unión entre el músculo papilar anterior y la valva septal, refiere se realizaba por "cuerdas musculares". Ya en la etapa fetal señala que las valvas atrioventriculares han perdido su "tejido de cojin" y están constituidas por músculo y fibras de colágena.

VAN MIEROP y cols, en 1962, y NETTER y VAN MIEROP, en 1969, estudiaron el desarrollo del canal atrioventricular, utilizando también corazones de embriones humanos a los que realizaron cortes histológicos seriados. Observaron que los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular tienen una constitución mesenquimática antes y después de su fusión, y aunque no son verdaderas válvulas piensan debían funcionar como tales. Dan una descripción detallada de los cambios morfológicos que observaron y concluyen que las válvulas atrioventriculares definitivas derivan del mesénquima que rodea a el canal atrioventricular, del "tejido de cojin" y del miocardio ventricular. Estos importantes trabajos fueron ilustrados, fundamentalmente, con elegantes esquemas y dibujos en color que dan una falsa impresión de simplicidad del proceso.

WENINK Y GITTEBERGER-DE-GROOT, en 1982 y 1985, estudiaron embriones humanos de 3.6 a 25 mm de C-R, haciéndoles a los corazones cortes seriados. Señalan que los cojines endocárdicos del canal atrioventricular no tienen una contribución sustancial en los velos valvulares ni en su aparato tensor, sino que estas estructuras son el resultado de la invaginación del sulcus atrioventricular y del "socavamiento" del miocardio ventricular. También concluyen que al terminar la septación las áreas ocupadas por los cojines endocárdicos atrioventriculares están restringidas a los sitios de cierre final de las comunicaciones interatrial e interventricular. Similares conclusiones habían también sido alcanzadas por VAN GILS en 1978, también en embriones humanos.

MAGOVERN y cols. en 1986, estudiaron embriones humanos de los horizontes X a XXIII de STREETER (1951), utilizando las colecciones de cortes seriados de la Carnegie Embryological Collection de la Universidad de California y de la Hopkins Pathology Collection en Baltimore, he hicieron reconstrucciones de algunos especímenes. Describen, en el horizonte XVII, que ya pueden reconocer velos valvulares mitrales y tricuspídeos, y que los primeros están más desarrollados que los últimos. Es hasta el horizonte XXIII en que pudieron identificar cuerdas tendinosas.

Como puede verse, los trabajos de la literatura sobre la formación de la válvula mitral en el hombre son pocos, confusos y exclusivamente realizados mediante cortes histológicos seriados y algunas reconstrucciones. Con excepción del trabajo de MAGOVERN

(1986), todos los demás autores utilizan como criterio para determinar la edad embrionaria y fetal la longitud C-R (cráneo-rabadilla), la cual es una de las dimensiones que más puede variar como resultado del proceso de fijación del espécimen y por tanto pudiendo traer confusión en los hallazgos reportados por uno u otro autor en embriones o fetos de aparente similar longitud C-R. Por otra parte la técnica de cortes histológicos seriados y reconstrucción del corazón a partir de éstos, que fue la única técnica empleada en dichos estudios, permite obtener sólo observaciones estáticas que no dejan alcanzar conclusiones válidas del origen o destino de las estructuras a lo largo del desarrollo. Por ello, las observaciones hechas por todos estos autores son, que duda cabe, muy importantes, pero solo pueden ser consideradas como observaciones y no como conclusiones, y por supuesto servir como punto de referencia de nuevas investigaciones utilizando otras técnicas.

Se ha profundizado más en lo referente al desarrollo de esta válvula utilizando como modelo el pollo. Así, HAY en 1972 y en 1978, hizo estudios histológicos y ultraestructurales sobre el desarrollo y fusión de los cojines endocárdicos ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular. Refieren que el proceso de fusión de dichos cojines ocurre entre los estadios 27 y 28 de Hamburger y Hamilton, observando invasión paulatina de células endocárdicas al interior de los cojines. Este autor no aprecia muerte celular en la superficie de fusión de los cojines, por lo que sugiere que este mecanismo morfogénico no está involucrado en el proceso, y sí en cambio señala puede haber un proceso de



"desdiferenciación" celular. LOS, en 1973, realizó un estudio ultraestructural también en embrión de pollo analizando el proceso de fusión de los cojines del canal atrioventricular. ARGUELLO y Cols, en 1988, retomaron el tema de fusión de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior en embriones de pollo, utilizando microscopía electrónica de transmisión y de barrido, resaltando la importancia que tiene el íntimo contacto endocardio-endocardio de los cojines para el proceso de fusión, y que dicha fusión progresa desde el borde atrial de los cojines hacia el borde ventricular, y de más o menos la porción medial de los cojines hacia los lados.

MARCKWALD y Cols, en 1977, estudiaron histológicamente el desarrollo de los cojines endocárdicos comparando el proceso en el pollo y la rata, tratando de dilucidar el origen del mesénquima y la secuencia de cambios que ocurren en los cojines. Observaron que el desarrollo de los cojines endocárdicos fue similar en ambas especies. Estos autores señalan que no es sólo la proliferación del endocardio el origen de las células que van a poblar el mesénquima del cojín, sino también el miocardio, encontrando una gran similitud entre las células del cojín a todos los niveles, incluyendo aquellas que están en contacto con el miocardio.

Todos estos trabajos realizados en embriones de pollo han dado aportaciones importantes al tema, pero se han centrado exclusivamente a la etapa de formación de los cojines del canal atrioventricular y su fusión, no habiéndose continuado el estudio

de esta región hasta la constitución de las estructuras anatómicas definitivas, es decir, las válvulas mitral y tricúspide.

DE LA CRUZ y Cols, en 1983, y GARCIA-PELAEZ y Cols, en 1984, estudiaron experimentalmente el desarrollo de los cojines del canal atrioventricular en el embrión de pollo, utilizando técnicas de marcaje selectivo "in ovo" de esas estructuras embrionarias, rastreándolas hasta la etapa de corazón maduro (estadio 35 de Hamburger y Hamilton). De esta forma, pudieron concluir que en este modelo el cojín dorsoinferior participaba en el desarrollo de la porción de entrada de ambos ventrículos y en la formación de la mitad posterior de la valva septal de la mitral, mientras que el cojín ventrosuperior lo hace en la superficie izquierda del septo de salida ventricular y en la mitad anterior de la valva septal de la mitral. Ambos trabajos, sin embargo, no hacen hincapié en los cambios morfológicos que presenta la válvula, y en ambos sugieren que el desarrollo de estas estructuras embrionarias debe ser similar también en el hombre.

En la literatura sólo fueron encontrados dos artículos centrados específicamente al mecanismo de formación de las cuerdas tendíneas en el embrión de pollo, ambos del mismo grupo de investigadores. Así, NOBLE y Cols., en 1983 y MORSE y Cols., en 1984, estudiaron embriones de pollo entre 6 y 13 días de incubación (estadio 29 a 39 de Hamburger y Hamilton), utilizando microscopía electrónica de barrido. En el estadio 31 identifican

lo que ellos denominan "primordia de las cuerdas tendíneas", siendo éstas unas ligeras elevaciones del tejido que unen a los velos valvulares rudimentarios con la pared ventricular. Describen que en etapas posteriores estas elevaciones de tejido se hacen más prominentes en su base, constituyendo los músculos papilares (pero no especifican exactamente en qué estadio ocurre esto). Más tardíamente observan unas crestas alternadas con suaves depresiones o agujeros en la zona de los primordios de las cuerdas tendíneas, siendo las células endocárdicas muy prominentes en las depresiones, en contraste con las células aplanadas del resto de la región (aunque tampoco especifican en qué estadio encontraron estas observaciones). En el estadio 38 identifican las primeras perforaciones en la región de las cuerdas tendíneas en formación, las cuales van coalesciendo entre sí para formar perforaciones más grandes, y ya en el estadio 39 son bien aparentes las cuerdas tendíneas primarias y secundarias, y comienzan a aparecer las terciarias. Los autores concluyen que el desarrollo de las cuerdas tendíneas ocurre pues, entre los estadios 29 y 39 de Hamburger y Hamilton, estando íntimamente ligado su desarrollo al de los velos valvulares. Además sugieren que el mecanismo de formación de las perforaciones para formar las cuerdas tendíneas debe ser similar al observado en la formación del foramen secundum atrial, en la ruptura del mesocardio dorsal o en la perforación de la membrana bucofaringea, siendo un evento programado celular y hemodinámicamente.

## MUSCULOS PAPILARES

Nuestras observaciones indican que el primer esbozo o manifestación de los músculos papilares puede ser apreciado tan temprano como el estadio 28 (5½ - 6 días), no apreciable con microscopía fotónica estereoscópica pero si con microscopía electrónica de barrido; mediante esta última se observó en este estadio que el extremo ventricular de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior, ya fusionados entre sí, formaban dos columnas que descendían en dirección al ápex ventricular y que se perdían finalmente entre sus trabéculas (Fig. 15 A, C); en el borde lateral izquierdo del canal atrioventricular se observó una tercera columna muscular, alejada de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior, que al igual que las antes descritas descendía de la pared libre ventricular (Fig. 15 B, C).

En el estadio 30 (6½ - 7 días), los tres primordios de los músculos papilares eran mucho más evidentes (Figs. 17 y 18) y a nivel de la superficie de corte en los cojines atrioventriculares fusionados se podían ver imágenes sugestivas de fascículos musculares provenientes de los primordios de los músculos papilares (Fig. 17).

Del estadio 31 (7 días) en adelante, ya fue posible identificar los tres músculos papilares mediante microscopía fotónica estereoscópica, siendo ya muy patente para el estadio 37 (11 días) tanto con microscopía fotónica estereoscópica (Fig. 20), como con microscopía electrónica de barrido (Fig. 21), como

con cortes histológicos (Fig. 22).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

A partir del estadio 38 (12 días) los músculos papilares se vieron cada vez más prominentes e individualizados del miocardio ventricular (Figs. 23 en adelante), manteniendo entre sí sus proporciones relativas, siendo el más pequeño de los tres el músculo lateral, pero en ninguna de las muestras observadas se vio involución de éste. Para el momento de la eclosión (21 días) la forma y constitución histológica de los músculos papilares (Figs. 32 y 33) recordaban la observada en los corazones postnatales (compare Fig. 32 con Fig. 2)

Con respecto a los mecanismos morfogenéticos involucrados en la individualización o separación de los músculos papilares del miocardio ventricular, se ha descrito en los corazones humanos un proceso denominado delaminación y socavamiento (VAN MIEROP y Cols, 1962; NETTER y VAN MIEROP, 1969), siendo sugerido por algunos autores que podría estar implicado en esto un proceso de muerte celular. En nuestro estudio no apreciamos imágenes sugerentes de dicho proceso de muerte celular a nivel de los músculos papilares ni con el microscopio electrónico de barrido, ni en los cortes histológicos.

### VELOS VALVULARES

En relación a los velos valvulares, ya mediante microscopía electrónica de barrido fue posible observar en el estadio 28

(5½ - 6 días) un adelgazamiento del tubérculo izquierdo de los cojines septales atrioventriculares fusionados (fundamentalmente de su mitad ventral), que junto con el cojín lateral izquierdo daban la apariencia de velos valvulares rudimentarios (Fig. 14B); histológicamente estos primordios de los velos valvulares estaban constituidos de tejido mesenquimático denso que se continuaba directamente con el miocardio ventricular (Fig. 16). El adelgazamiento de los cojines se fue haciendo más evidente en los estadios posteriores (Figs. 17, 18 y 19) y ya en el estadio 37 (11 días) fue posible identificar mediante microscopía fotónica estereoscópica el velo valvular anterior y posterior de la mitral (Fig. 20).

En el estadio 41 (15 días) se pudo apreciar mediante microscopía electrónica de barrido un reborde endocárdico en la cara ventricular de la valva anterior (Fig. 28 B), a cuyo significado no encontramos explicación; en los cortes histológicos se observó un cambio radical en las valvas valvulares, ya que el mesénquima denso visto en los estadios anteriores se veía laxo, distinguiéndose con claridad del tejido conectivo denso de las cuerdas tendíneas en formación (Fig. 29)

En el estadio 46 (21 días) la morfología de los velos valvulares era ya más o menos semejante a la de los corazones postnatales (comparese Fig. 32 con Fig. 2), aunque notoriamente aún gruesa, observándose en los cortes histológicos por la cara ventricular de las valvas algunas zonas de "desprendimiento" de células endocárdicas (Fig. 33) que podrían estar implicadas en el

adelgazamiento de los velos valvulares, y que podemos deducir va a continuar durante algún tiempo en la etapa postnatal.

Es evidente que los primordios de los velos valvulares son los cojines mismos del canal atrioventricular, e incluso se ha dicho que éstos tienen una "función valvular" desde el momento de su aparición. Llama la atención el cambio brusco de mesénquima laxo a mesénquima denso que se apreció en el estadio 41 (15 días) y que indudablemente está indicando que está ocurriendo un proceso de diferenciación celular y probablemente también de migración celular, como sugerido por VAN GILS (1978) y WENINK y GITTENBERGER-DE GROOT (1982, 1985) en embriones humanos. De igual manera, es de resaltar el hecho que en el estadio 46 (21 días) - es decir justo antes de la eclosión - aún los velos valvulares no muestran la constitución histológica descrita en los corazones post-natales, además de que se ven imágenes de "desprendimiento" de células endocárdicas, que nos permiten deducir que la formación de los velos valvulares no concluye en la etapa prenatal, sino que continúa durante algún tiempo en la etapa post-natal.

#### CUERDAS TENDINOSAS

Referente a las cuerdas tendinosas, no se observaron imágenes ni siquiera sugestivas en los estadios iniciales de nuestro estudio. El primer cambio que podría sugerir el inicio del desarrollo de las cuerdas tendíneas fue observado en el

estadio 30 (6½ - 7 días), en el cual con el microscopio electrónico de barrido se observaron algunas "depresiones" de la superficie endocárdica en el borde libre del velo valvular anterior de la mitral (Fig. 18 C,D); sin embargo, en los cortes histológicos no se apreciaron modificaciones del mesénquima a nivel subendocárdico. Estas "depresiones" fueron más evidentes y numerosas en los estadios posteriores.

No fue sino hasta el estadio 37 (11 días) en que se detectaron claramente los primeros indicios de formación de las cuerdas tendíneas, observándose con el microscopio electrónico de barrido unas "hendiduras" o "grietas" en la superficie endocárdica de la cara atrial (superior) de la valva anterior de la mitral (Fig. 21 A,B); histológicamente, en este estadio 37, si fueron detectados cambios, consistentes en un aparente reordenamiento mesenquimal en la zona de transición de los velos valvulares con los músculos papilares, mostrando espacios vacíos rodeados de mesénquima sin cubierta endocárdica en el interior de los espacios (Fig. 22 B). Este cambio histológico si sugiere ser un cambio precedente a la formación de las cuerdas tendíneas y no parece corresponder a simples depresiones endocárdicas ya que, como comentado antes, no están los espacios recubiertos de endocardio.

En el estadio 38 (12 días) ya fueron observadas en algunos casos pequeñas fenestraciones y/o orificios con el microscopio estereoscópico, localizados en las zonas de continuidad de los músculos papilares anterior y posterior con el velo valvular



anterior o septal de la mitral; esto fue aún más evidente en las muestras vistas con el microscopio electrónico de barrido, pero únicamente en la zona de unión de los músculos con el velo anterior o septal, evidenciando ahora si las primeras cuerdas tendinosas; por la cara atrial (superior) estas primeras cuerdas tendinosas mostraban francas evidencias de coalescencia de dos o más fenestraciones y al parecer por un proceso de muerte celular (Fig. 23), siendo su grado de desarrollo mayor que el observado por la cara ventricular (inferior) en esta misma valva, en la que solo se ven pequeñas fenestraciones u orificios (Fig. 24). Por el contrario, en la unión de los músculos papilares anterior, posterior y lateral con el velo valvular posterior o parietal no se encontraron aún fenestraciones u orificios, pero si pudieron ser vistas "hendiduras" o "grietas" (Fig. 23 A). semejantes a las observadas en el estadio 37 en el otro velo valvular.

En el estadio 39 (13 días) es mayor el grado de desarrollo de las cuerdas tendíneas, ya apreciándose con el microscopio electrónico de barrido cuerdas tendinosas rudimentarias en la cara atrial del velo valvular posterior o parietal, aún muy cortas y que no se abrían a la cara ventricular de la valva (Fig. 25 A).

En el estadio 40 (14 días) ya se observan claramente las cuerdas tendíneas en ambos velos valvulares, pero siempre con menor grado de desarrollo las correspondientes al velo valvular posterior o parietal (Fig. 26), notándose también que el grado de desarrollo de las cuerdas tendíneas es mayor en las partes

cercanas al velo valvular, y menos en las porciones alejadas a éste.

En el estadio 41 (15 días), 42 (16 días) y 43 (17 días) ya se pudo observar que las cuerdas tendinosas tenían un grado de desarrollo prácticamente similar por ambas caras, si bien los correspondientes a la valva anterior o septal están más desarrolladas que las de la valva posterior o parietal (Figs. 28 y 30). Los cortes histológicos mostraron que las cuerdas tendinosas estaban constituidas por un tejido conectivo denso, que casi alcanzaban el borde libre de ambos velos valvulares (Fig. 29), observándose múltiples espacios internos en el mesénquima tanto en su extremo superior como en el inferior (Fig. 31), lo que indica una intensa actividad en el arreglo mesenquimal para formar y/o crear nuevas cuerdas tendíneas.

Finalmente en el estadio 46 (21 días) aún se apreciaron zonas de fenestración de nuevas cuerdas tendíneas, y en los cortes histológicos células endocárdicas desprendiéndose (Figs. 32 y 33) que indican que el proceso de formación de cuerdas tendíneas no ha concluido y por tanto sugiriendo que el proceso continúa aún en la etapa postnatal.

Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por NOBLE y Cols. (1983) y MORSE y Cols. (1984), en que las cuerdas tendíneas de la válvula mitral comienzan a formarse alrededor de los estadios 30-31, pero discrepan de estos autores en que el proceso termina en el estadio 39 (13 días), ya que observamos que

incluso en el estadio 46 (21 días) aún seguían formándose nuevas cuerdas tendíneas. Nuestros resultados también muestran con toda claridad que las cuerdas tendíneas correspondientes a la valva anterior o septal de la mitral se desarrollan más precozmente que las de la valva posterior o parietal, y que en ambas el proceso de perforación va de la cara atrial (superior) a la cara ventricular (inferior), y del extremo superior (de continuidad al velo valvular) al extremo inferior (de continuidad al músculo papilar). Respecto a los mecanismos morfogénéticos involucrados en la formación de las cuerdas tendíneas, nuestros hallazgos nos permiten sugerir que no solo la muerte celular está implicada, sino al parecer también existe una migración de las células mesenquimales y endocárdicas, evidenciadas por el reordenamiento mesenquimal visto a partir del estadio 37 (11 días).

La información obtenida con el empleo del microscopio electrónico de barrido es, sin lugar a duda, infinitamente mayor que la obtenida con microscopía fotónica estereoscópica, ya que nos permite detectar las características morfológicas de las estructuras cuando estas ni remotamente pueden ser visibles al microscopio fotónico. No por ello deja de ser de gran valor el estudio inicial de las estructuras con microscopio estereoscópico, ya que además de la información que da nos indica de los corte o disecciones que deben ser hechos para el estudio ulterior con microscopía electrónica de barrido. Finalmente la información alcanzada con éstas dos técnicas debe ser correlacionada con la obtenida de los cortes histológicos seriados, y en caso necesario con cortes semifinos o cortes finos

vistos al microscopio electrónico de transmisión.

No era el objetivo de este trabajo el investigar los mecanismos morfogenéticos que participan en la formación de la válvula mitral en el pollo, sino conocer los cambios morfológicos que van ocurriendo en las estructuras embrionarias o fetales involucradas y captar sus correspondientes imágenes aún desde sus etapas iniciales. Sería deseable el estudiar, con metodología semejante a la empleada en este trabajo, el desarrollo prenatal de la misma estructura en corazones de mamíferos - por ejemplo en rata - que nos permitiría comparar los resultados en ambas especies y nos permitiría ratificar o rectificar la tan socorrida extrapolación de los hallazgos de una especie a otra, que se hace comúnmente en la literatura. De igual manera, sería conveniente diseñar un estudio encaminado a investigar los procesos básicos del desarrollo que participan en la formación de la válvula mitral - tanto en aves como en mamíferos -, que tome como plataforma los hallazgos obtenidos en este trabajo, pero utilizando la metodología adecuada para los objetivos del estudio.

## 8. CONCLUSIONES

## 8. CONCLUSIONES

1. La válvula mitral en el embrión de pollo se desarrolla a partir del estadio 28 de Hamburger y Hamilton (5½ - 6 días), concluyendo hasta después de la eclosión.
2. En la formación de la válvula mitral participan los cojines ventrosuperior, dorsoinferior y lateral izquierdo del canal atrioventricular, así como el miocardio ventricular izquierdo.
3. Los velos valvulares y las cuerdas tendinosas se desarrollan a partir de los cojines ventrosuperior, dorsoinferior y lateral izquierdo del canal atrioventricular.
4. Los músculos papilares se desarrollan, fundamentalmente, del miocardio ventricular izquierdo.
5. La formación de las cuerdas tendíneas del velo valvular anterior o septal de la mitral comienza, progresa y probablemente también termina antes que las del velo valvular posterior o parietal.
6. El desarrollo de las cuerdas tendíneas de la válvula mitral progresa de la cara atrial (superior) a la cara ventricular (inferior) de los velos valvulares, y de su porción superior (en relación a los velos valvulares) a la inferior (en relación a los músculos papilares).

7. La muerte celular y la diferenciación celular parece ser que no son los únicos mecanismos morfogenéticos involucrados en la formación de la válvula mitral.
8. La metodología utilizada fue la apropiada para los objetivos del estudio. La microscopía electrónica de barrido permite detectar los cambios morfológicos mucho antes que la microscopía fotónica estereoscópica.
9. La morfología final de la válvula mitral en el pollo es diferente a la del hombre, presentando el primero tres músculos papilares a diferencia de los dos que se observan en el hombre. Esto nos obliga a cuestionar la validez de las extrapolaciones de un modelo a otro.
10. Este trabajo no es sino la "punta del ICEBERG" para conocer a fondo este tan importante evento de la cardiogénesis.

## 9. FIGURAS



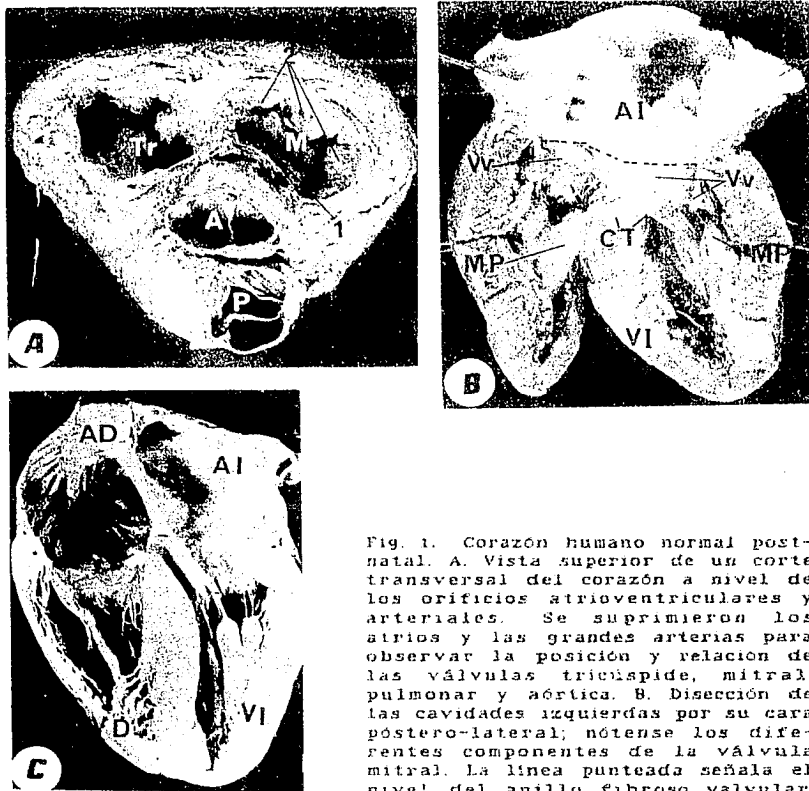


Fig. 1. Corazón humano normal postnatal. A. Vista superior de un corte transversal del corazón a un nivel de los orificios atrioventriculares y arteriales. Se suprimieron los atrios y las grandes arterias para observar la posición y relación de las válvulas tricúspide, mitral, pulmonar y aórtica. B. Disección de las cavidades izquierdas por su cara postero-lateral; nótese los diferentes componentes de la válvula mitral. La línea punteada señala el nivel del anillo fibroso valvular.

C. Corte de "cuatro cámaras", mitad dorsal (posterior) del corazón; observense los componentes de las válvulas tricúspide y mitral, y el diferente nivel de inserción de sus velos septales. La flecha señala el septo atrioventricular.

A = válvula aórtica; AD = atrio derecho; AI = atrio izquierdo; CT = cuerdas tendíneas; M = válvula mitral; MP = músculos papilares; P = válvula pulmonar; Tr = válvula tricúspide; VD = ventrículo derecho; VI = ventrículo izquierdo; Vv = velo valvular; I = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

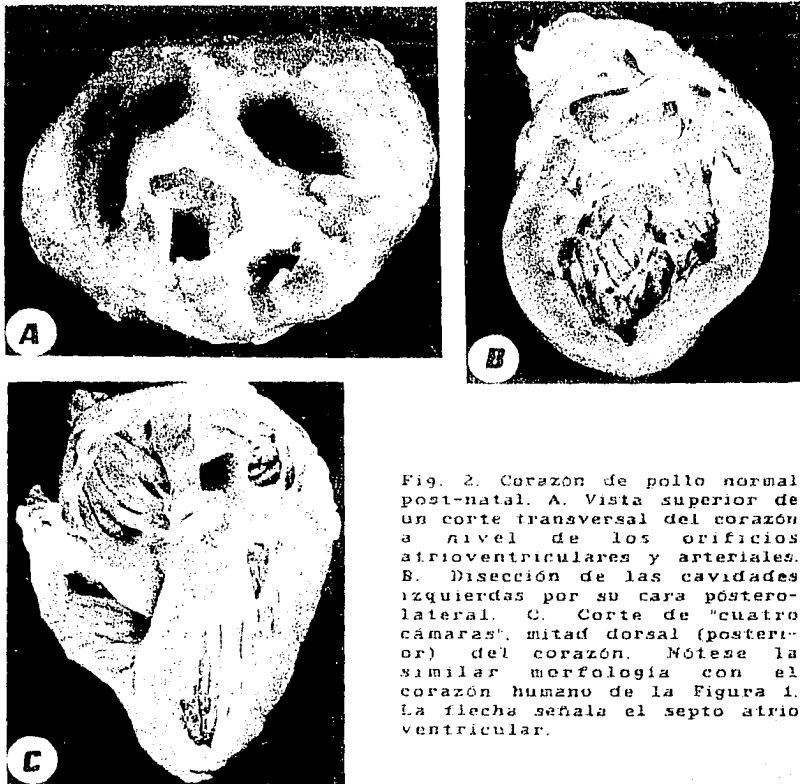
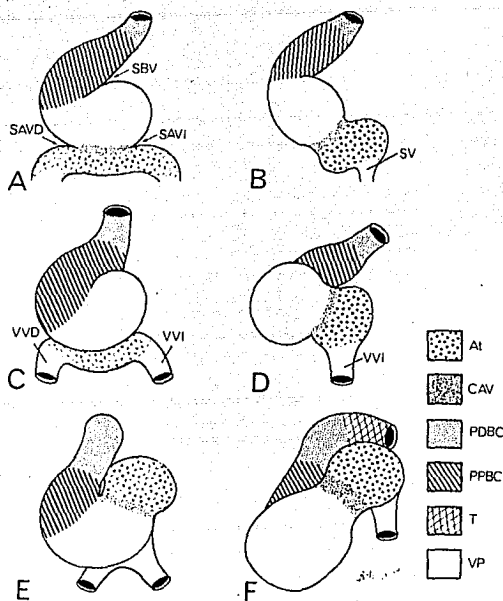
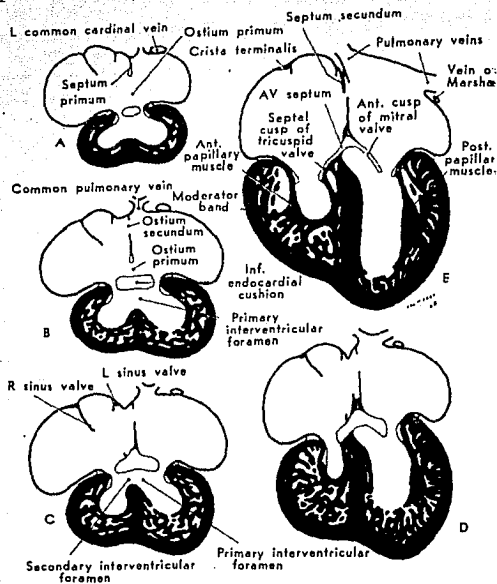


Fig. 2. Corazón de pollo normal post-natal. A. Vista superior de un corte transversal del corazón a nivel de los orificios atrioventriculares y arteriales. B. Disección de las cavidades izquierdas por su cara posterolateral. C. Corte de "cuatro cámaras", mitad dorsal (posterior) del corazón. Nótese la similar morfología con el corazón humano de la Figura 1. La flecha señala el septo atrioventricular.

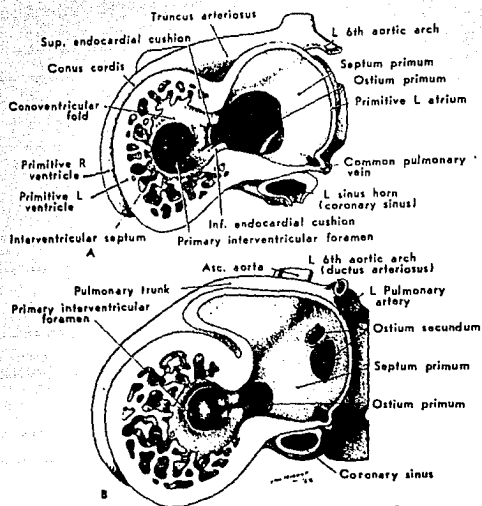


**Fig. 3. Representación esquemática de los cambios de posición espacial del canal atrioventricular durante la etapa de asa (A,B) y post-asa (C,D,E y F). A,C,E. Vista ventral del tubo cardiaco. B,D,F. Vista lateral izquierda del tubo cardiaco. At = atrios primitivos; CAV = canal atrioventricular; PDBC = porción distal del bulbus; PPBC = porción proximal del bulbus; SAVD = surco atrioventricular derecho; SAVI = surco atrioventricular izquierdo; SBV = surco bulboventricular; SV = seno venoso; T = tronco arterioso; VVD = vena vitelina derecha; VVI = vena vitelina izquierda; VP = ventriculo primitivo.**



**Fig. 4. Esquemas de secciones del corazón embrionario humano en diferentes estadios de desarrollo. A, embrión de 6 mm. B, embrión de 9 mm. C, embrión de 12 mm. D, embrión de 17 mm. E, embrión de 40 mm.**

**Esquema tomado de Van Mierop, 1976.**



**Fig. 5. Representación esquemática de secciones sagitales de corazones embrionarios humanos en diferentes estadios de desarrollo. Vista izquierda. A, embrión 6 mm. B, embrión 9 mm. Esquema tomado de Van Mierop, 1976.**

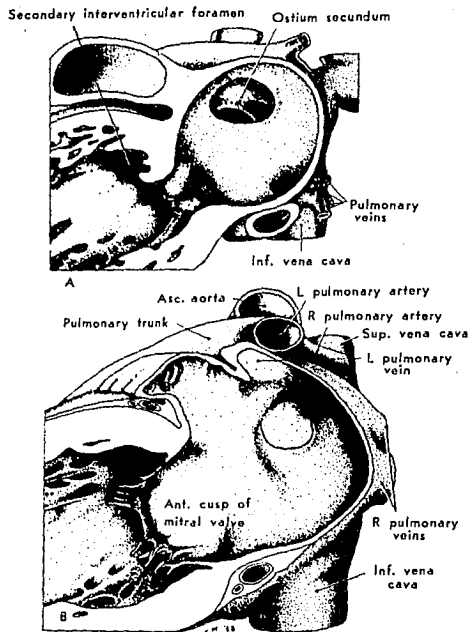


Fig. 6. Representación esquemática de secciones sagitales de corazones embrionarios humanos en diferentes estadios de desarrollo. Vista izquierda. A, embrión de 16 mm. B, corazón post-natal.

Esquema tomado de Van Mierop, 1976.

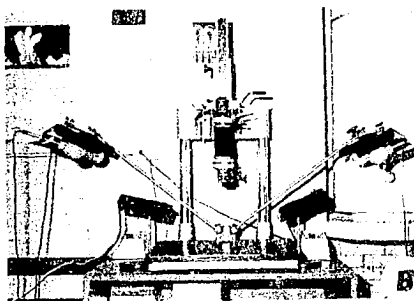
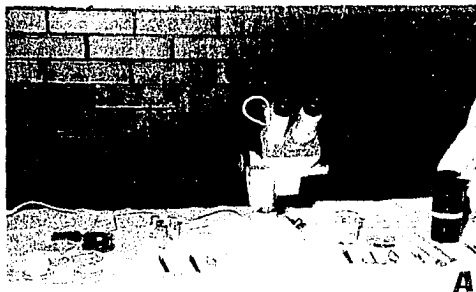


Fig. 7. Material y equipo utilizado para los estudios de microscopia fotónica. A. Microscopio estereoscópico binocular, instrumental de microcirugía y algunos otros de los materiales empleados. B. Equipo Multiphot de fotomicro-macrografía.

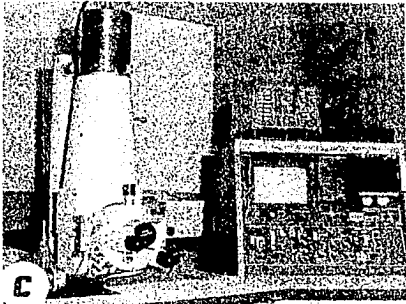
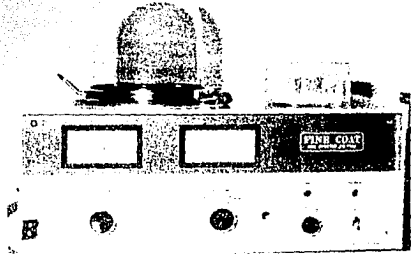
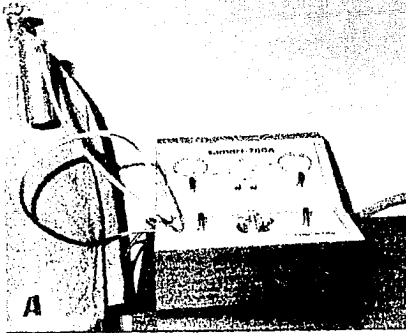
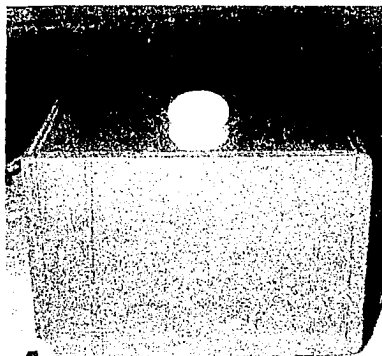
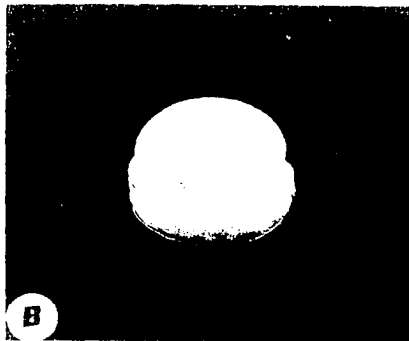


Fig. 8. Equipos utilizados para los estudios de microscopia electrónica de barrido. A. Deseccador de punto crítico. B. Recubridor de oro. C. Microscopio electrónico de barrido.

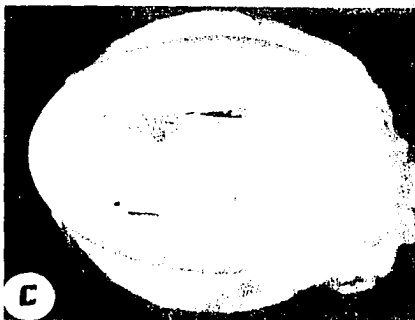




A



B



C

Fig. 9. Localización del embrión o feto de pollo dentro del huevo. A. Visualización del embrión mediante el ovoscopio. B. Señalamiento del lugar donde está ubicado el embrión y colocado el huevo en una caja de Petri. C. La ventana en el cascarón ha sido abierta apreciándose el embrión en el interior.

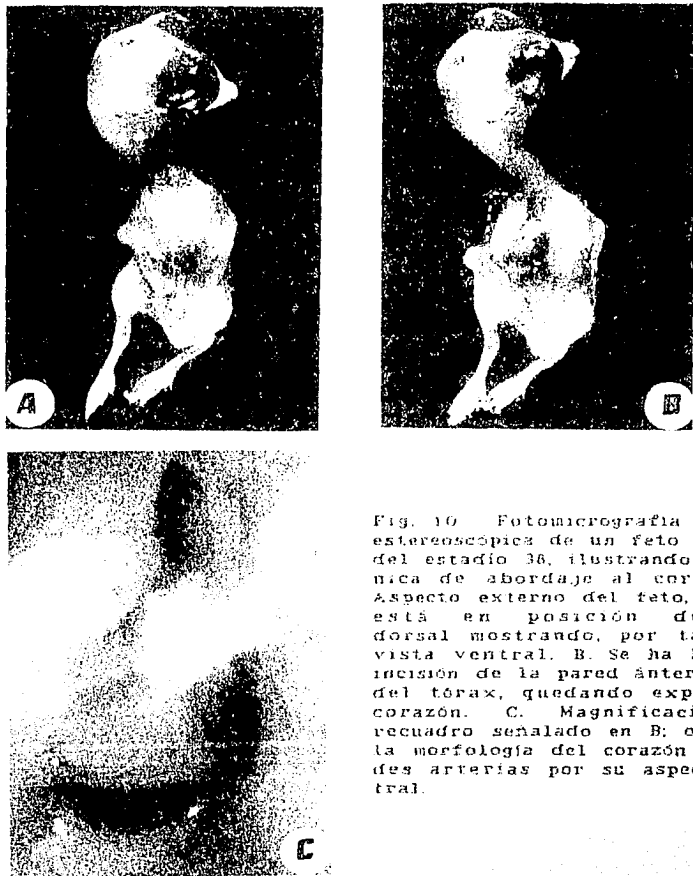


Fig. 10. Fotomicrografía fotónica estereoscópica de un feto de pollo del estadio 36, ilustrando la técnica de abordaje al corazón. A. Aspecto externo del feto, el cual está en posición decubitó dorsal mostrando, por tanto, su vista ventral. B. Se ha hecho la incisión de la pared ántero-medial del tórax, quedando expuesto el corazón. C. Magnificación del recuadro señalado en B; obsérvese la morfología del corazón y grandes arterias por su aspecto ventral.

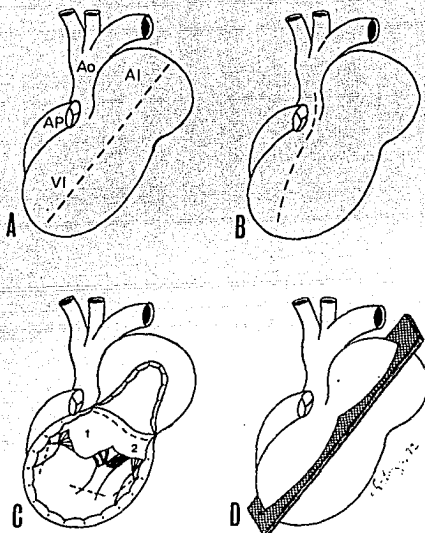


Fig. 11. Esquema representativo de los diferentes planos de corte para el abordaje de la válvula mitral. A. Plano de disección de la vía de entrada ventricular izquierda; la línea punteada señala la orientación y extensión de la incisión sobre la pared lateral del atrio y ventrículo izquierdo. B. Plano de disección de la vía de salida ventricular izquierda; la línea punteada señala la orientación y extensión de la incisión sobre la pared anterior del ventrículo hasta la válvula aórtica. C. Abordaje para la desinserción de la válvula mitral, habiéndose realizado previamente un corte de la pared lateral de las cavidades izquierdas como señalado en A; las líneas punteadas señalan el nivel de corte en los músculos papilares y en los velos valvulares. D. Plano del corte de " 4 cámaras ". AI = atrio izquierdo; Ao = aorta; AP = arteria pulmonar; VI = ventrículo izquierdo; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

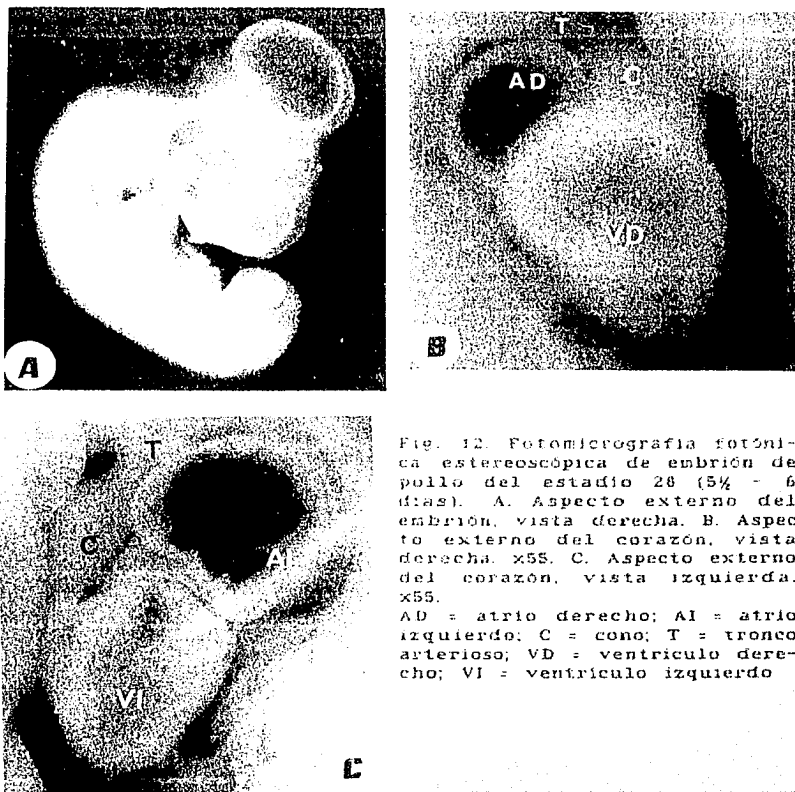


Fig. 12. Fotomicrografia fotónica estereoscópica de embrión de pollo del estadio 28 (5½ - 6 días). A. Aspecto externo del embrión, vista derecha. B. Aspecto externo del corazón, vista derecha. x55. C. Aspecto externo del corazón, vista izquierda. x55.

AD = atrio derecho; AI = atrio izquierdo; C = cono; T = tronco arterioso; VD = ventrículo derecho; VI = ventrículo izquierdo

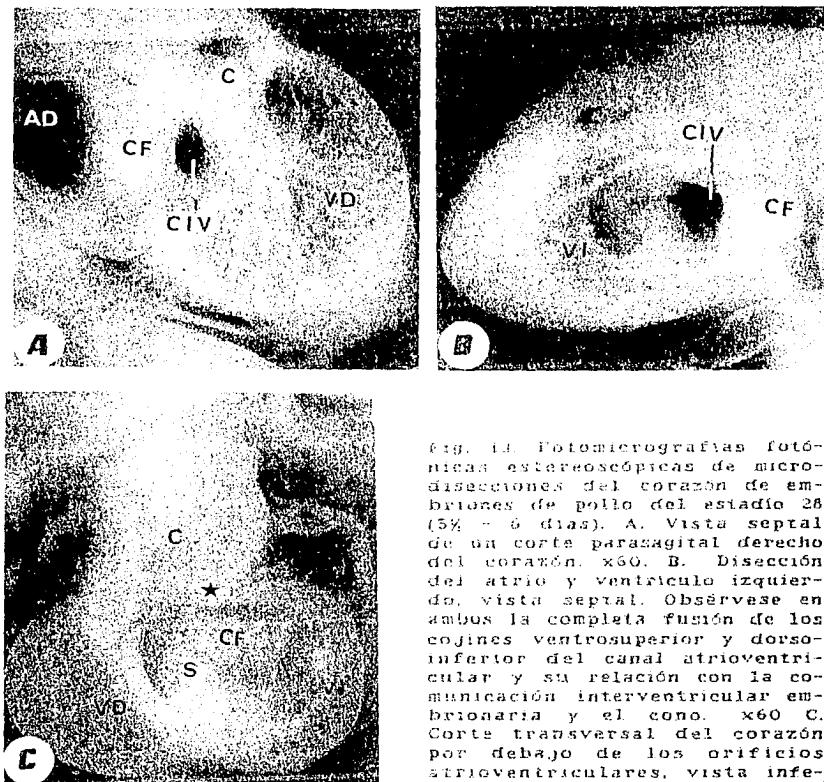


Fig. 13. Fotomicrografías fotónicas estereoscópicas de microdisecciones del corazón de embriones de pollo del estadio 28 (5 $\frac{1}{2}$  - 6 días). A. Vista septal de un corte parasagital derecho del corazón.  $\times 60$ . B. Disección del atrio y ventrículo izquierdo, vista septal. Obsérvase en ambos la completa fusión de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular y su relación con la comunicación interventricular embrionaria y el cono.  $\times 60$ . C. Corte transversal del corazón por debajo de los orificios atrioventriculares, vista inferior. Nótese la concavidad de los cojines fusionados y el allineamiento de su tubérculo derecho con el espón bulboventricular

(\*) y el septo interventricular primitivo.  $\times 70$ .

AD = atrio derecho; C = cono; CIV = comunicación interatrial; CF = cojines fusionados; S = septo interventricular; VD = ventrículo derecho; VI = ventrículo izquierdo

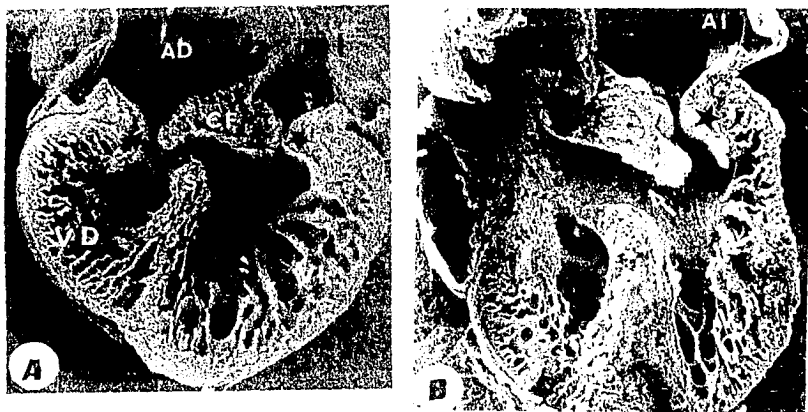


Fig. 14. Fotomicrografías electrónicas de barrido de microdisecciones de corazones de embriones de pollo del estadio 28 (5½ -6 días). A. Corte "cuatro cámaras", mitad dorsal; observe la morfología de los cojines fusionados y la relación de éstos con el septo interventricular primitivo y la comunicación interventricular embrionaria. Los cojines laterales derecho e izquierdo (\*) ya pueden ser observados. x80. B. Corte "cuatro cámaras" a nivel del infundíbulo aórtico (flecha) y la apariencia de velo valvular rudimentario del tejido de cojines. x86.

AD = atrio derecho; AI = atrio izquierdo; CF = cojines fusionados; S = septo interventricular; VD = ventrículo derecho; VI = ventrículo izquierdo

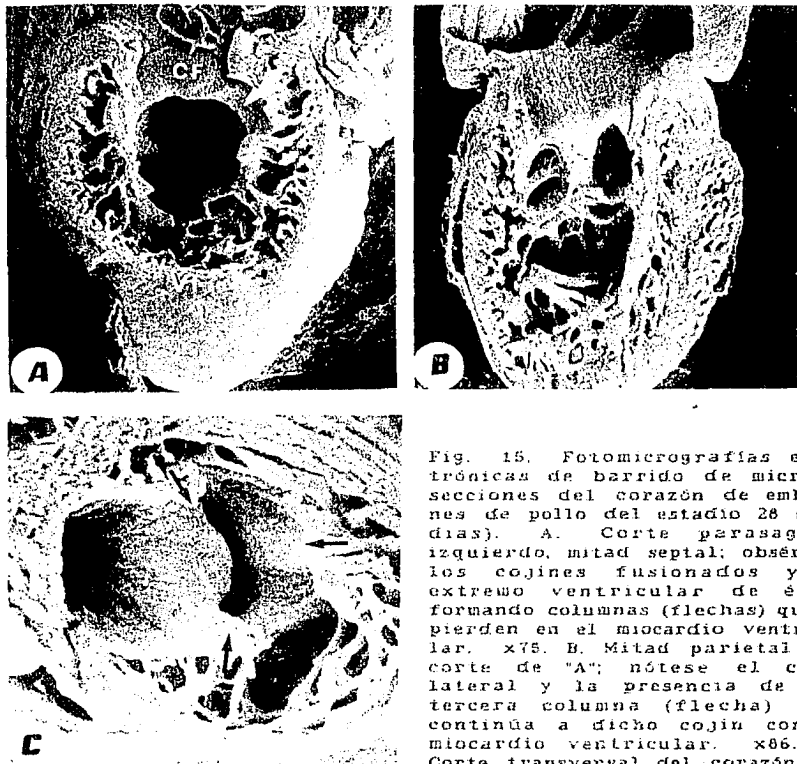


Fig. 15. Fotomicrografías electrónicas de barrido de microdi-  
secciones del corazón de embri-  
ones de pollo del estadio 28 (5½-6  
días). A. Corte parasagital  
izquierdo, mitad septal; obsérvese  
los cojines fusionados y el  
extremo ventricular de éstos  
formando columnas (flechas) que se  
pierden en el miocardio ventricu-  
lar. x75. B. Mitad parietal del  
corte de "A"; nótese el cojín  
lateral y la presencia de una  
tercera columna (flecha) que  
continúa a dicho cojín con el  
miocardio ventricular. x86. C.  
Corte transversal del corazón por  
debajo del orificio atrioventricu-  
lar izquierdo, vista inferior; obsérvese las tres columnas  
(flechas) de tejido de cojines adosadas al miocardio ventricular.  
x137.

lar izquierdo, vista inferior; obsérvese las tres columnas  
(flechas) de tejido de cojines adosadas al miocardio ventricular.  
x137.

CF = cojines fusionados; VI = ventrículo izquierdo

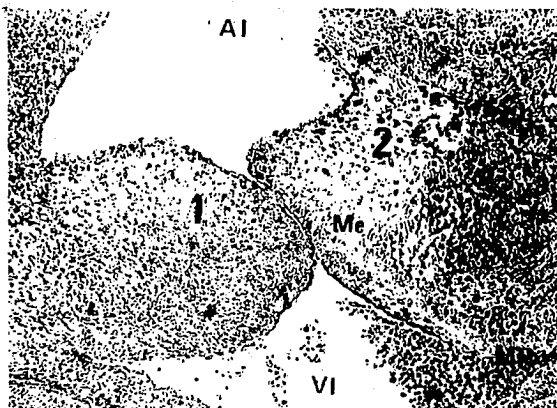


Fig. 16. Fotomicrografía óptica de un corte histológico del corazón de un embrión de pollo del estado 28 (5½ - 6 días), a nivel de los cojines mediales fusionados (ventrosuperior y dorsoinferior) y lateral izquierdo del canal atrioventricular. Corte seriado en el plano frontal, teñido con hematoxilina-eosina. Obsérvense la constitución histológica de los cojines y la continuidad del mesénquima de éstos con el miocardio ventricular. x187.

AI = atrio izquierdo; Me = mesénquima; MP = músculo papilar; VI = ventrículo izquierdo; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral



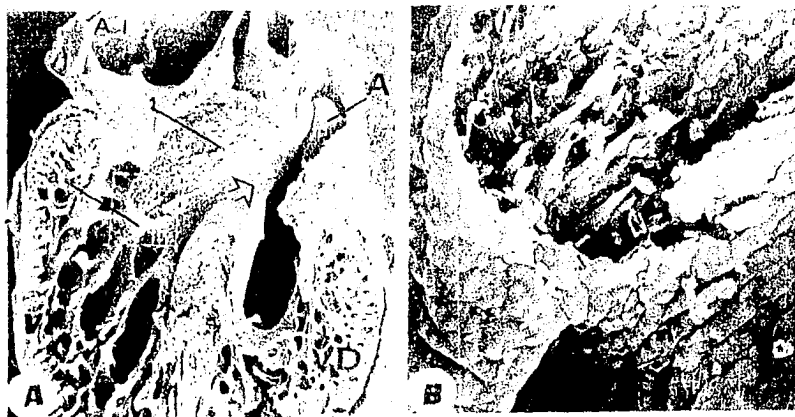


Fig. 17. Fotomicrografías electrónicas de barrido de una microdissección de corazón de embrión de pollo del estadio 30 (6 $\frac{1}{2}$  - 7 días). A. Corte "cuatro cámaras", mitad ventral; nótese el velo valvular anterior de la mitral, aún rudimentario, al igual que el primordio del músculo papilar Antero-lateral. La flecha indica el infundíbulo aórtico. x80. B. Magnificación del recuadro señalado en "A"; nótese las características del mesénquima del velo valvular anterior de la mitral y la terminación de fibras musculares, aparentemente provenientes del músculo papilar Antero-lateral. x496.

A = válvula aórtica; AI = atrio izquierdo; VD = ventrículo derecho; VI = ventrículo izquierdo; a = músculo papilar anterior

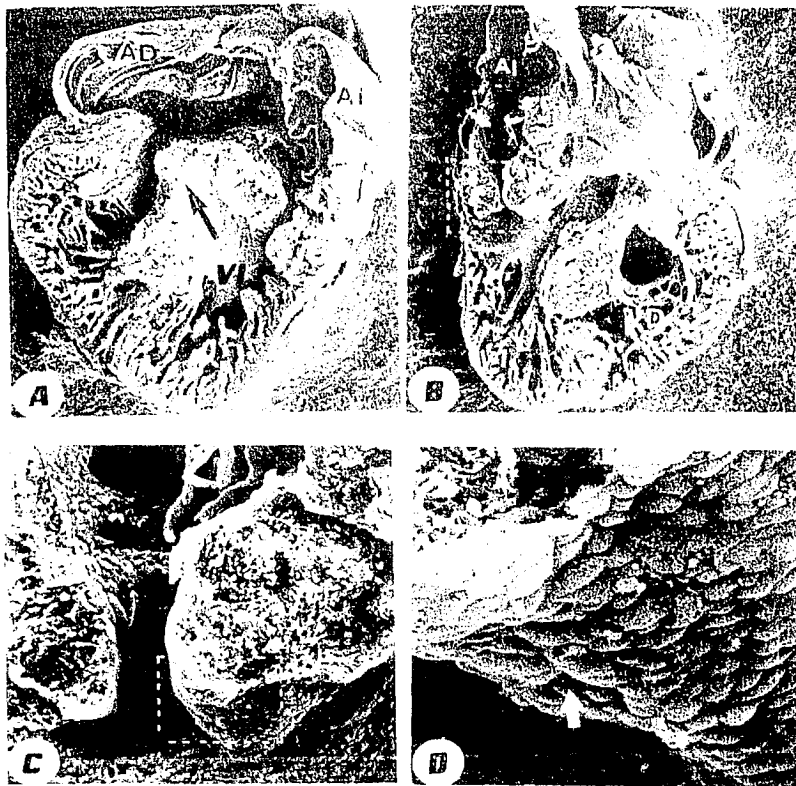


Fig. 18. Fotomicrografías electrónicas de barrido de microdisecciones de corazones de embriones de pollo del estadio 30 (6½ - 7 días). A,B. Corte "cuatro cámaras", mitades dorsal (x55) y ventral (x65), respectivamente. Obsérvese los velos valvulares anterior y posterior de la mitral, aún rudimentarios, y el primordio del músculo papilar antero-lateral. La flecha señala la dirección y posición del infundíbulo aórtico. C Magnificación del recuadro señalado en "B" (x246). D. Magnificación del recuadro señalado en "C" (x817); nótese las depresiones (flecha) que aparecen en el endocardio que recubre a los velos valvulares. AD = atrio derecho; AI = atrio izquierdo; VD = ventrículo derecho; VI = ventrículo izquierdo

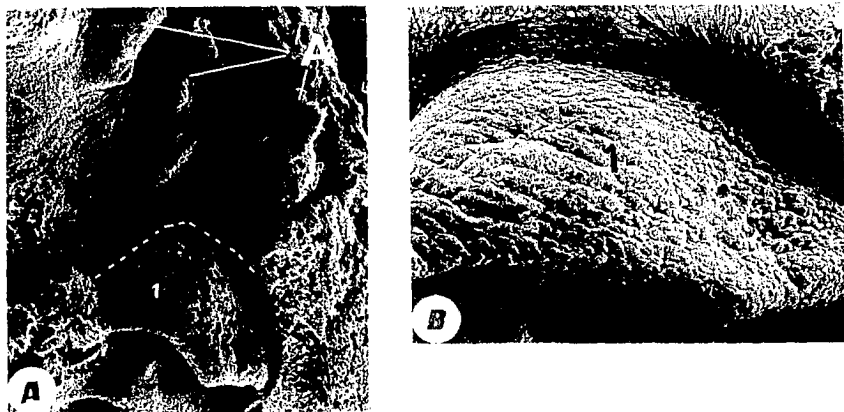


Fig. 19. Fotomicrografías electrónicas de barrido de una microdissección del corazón de embrión de pollo del estadio 35 (8½ - 9 días). A. Vista ventricular del velo anterior de la válvula mitral; obsérvese la continuidad mitro-aórtica (línea punteada blanca). x130. B. Magnificación del mismo velo valvular. apreciándose una superficie endocárdica prácticamente lisa. x319. A = válvula aórtica; i = velo septal mitral

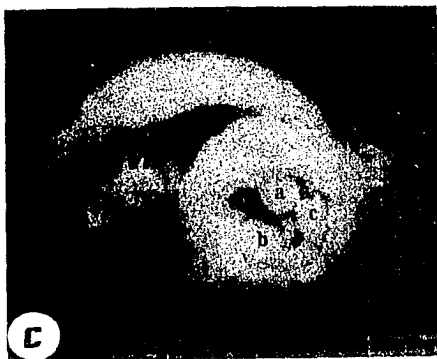
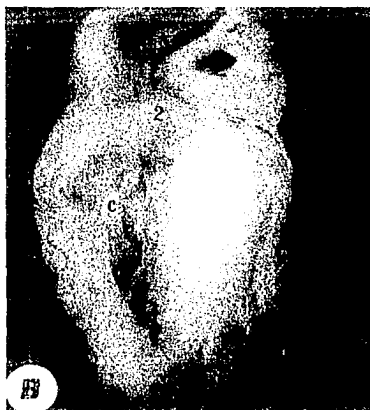


Fig. 20. Fotomicrografías fotográficas estereoscópicas de microdirecciones del corazón de fetos de pollo del estadio 37 (11 días). A. Corte parasagital izquierdo, mitad septal. B. Mitad parietal del corte "A". C. Corte transversal por debajo de los orificios atrioventriculares, vista anterior. Los velos valvulares septal y parietal de la mitral son claramente identificables, al igual que los tres músculos papilares.

AI = atrio izquierdo; VD = ventrículo derecho; VI = ventrículo izquierdo; a = músculo papilar anterior; b = músculo papilar posterior; c = músculo papilar lateral; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

anterior; b = músculo papilar posterior; c = músculo papilar lateral; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral



Fig. 21. Fotomicrografías electrónicas de barrido de una microdi-  
sección del corazón de un feto de pollo del estadio 37 (11 días).  
A. Vista atrial (superior) de la porción anterior de las valvas  
septal y parietal de la mitral y de su comisura Antero-lateral.  
x125. B. Magnificación del recuadro señalado en "A". Nótese las  
pequeñas "grietas" (flechas) que aparecen cerca de la zona  
comisural. x807.

1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

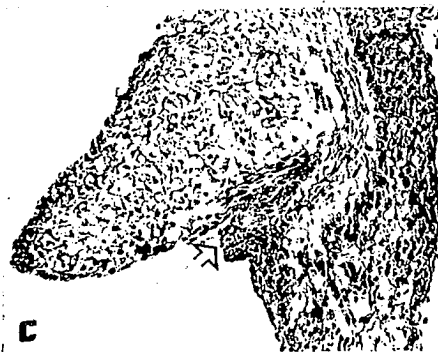
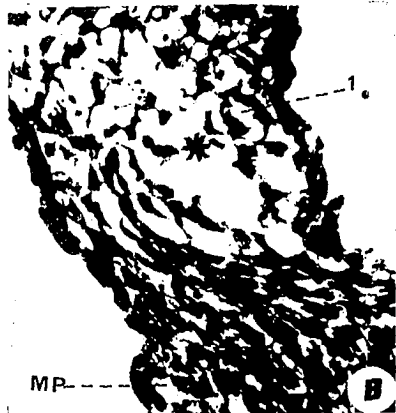
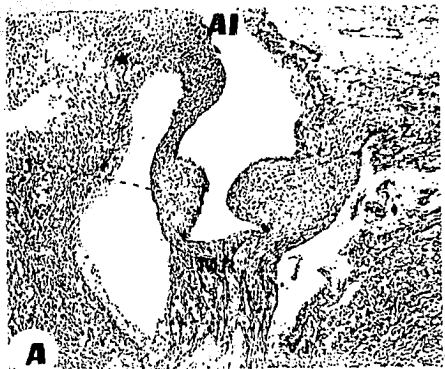


Fig. 22. Fotomicrografías ópticas de cortes histológicos del corazón de fetos de pollo del estadio 37 (11 días). A. Corte a nivel de la comisura pósteromedial de la válvula mitral. Obsérvense el mesénquima denso de los esbozos valvulares y su continuidad con el miocardio del músculo papilar posterior.  $\times 125$ . B. Magnificación del recuadro señalado en "A"; a este aumento se pueden apreciar espacios vacíos (\*) en la zona de transición de los esbozos valvulares con el músculo papilar.  $\times 125$ . C. Esbozo del velo valvular lateral de la mitral; nótese el

proceso de socavación o "despegamiento" del velo valvular de la pared ventricular.  $\times 200$ .  
 AI = atrio izquierdo; MP = músculo papilar; VI = ventrículo izquierdo; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

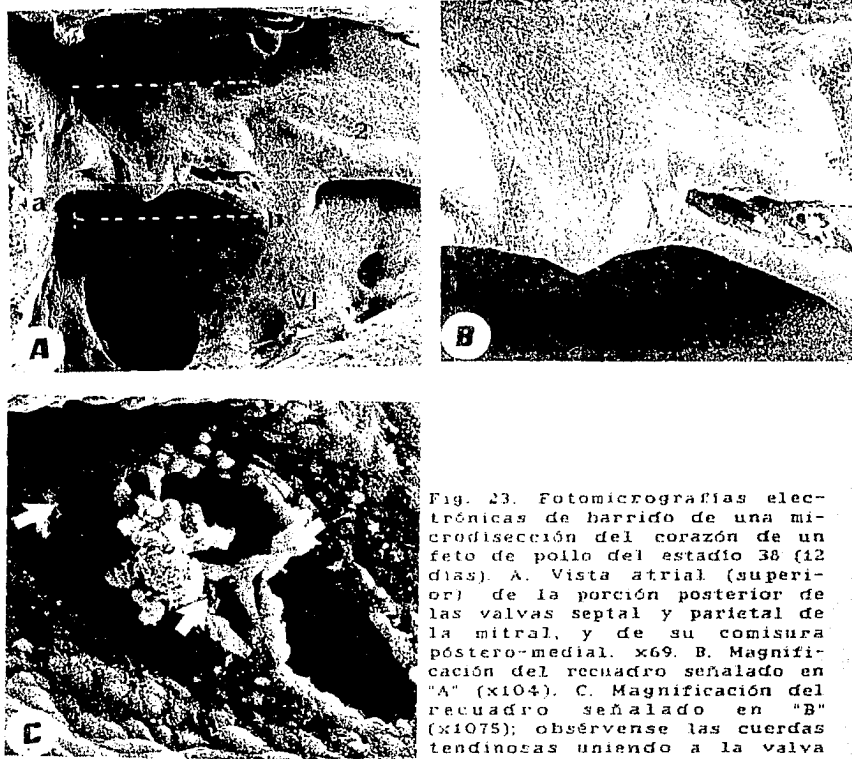


Fig. 23. Fotomicrografías electrónicas de barrido de una microdissección del corazón de un feto de pollo del estadio 38 (12 días). A. Vista atrial (superior) de la porción posterior de las valvas septal y parietal de la mitral, y de su comisura póstero-medial.  $\times 69$ . B. Magnificación del recuadro señalado en "A" ( $\times 104$ ). C. Magnificación del recuadro señalado en "B" ( $\times 1075$ ); obsérvense las cuerdas tendinosas uniendo a la valva septal con los músculos papilares, y aún la continuidad directa de la valva parietal con

los músculos papilares; nótese en "B" y "C" cordones celulares (flechas) atravesando las fenestraciones u orificios de las cuerdas tendinosas en formación.

VI = ventrículo izquierdo; a = músculo papilar anterior; b = músculo papilar posterior; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

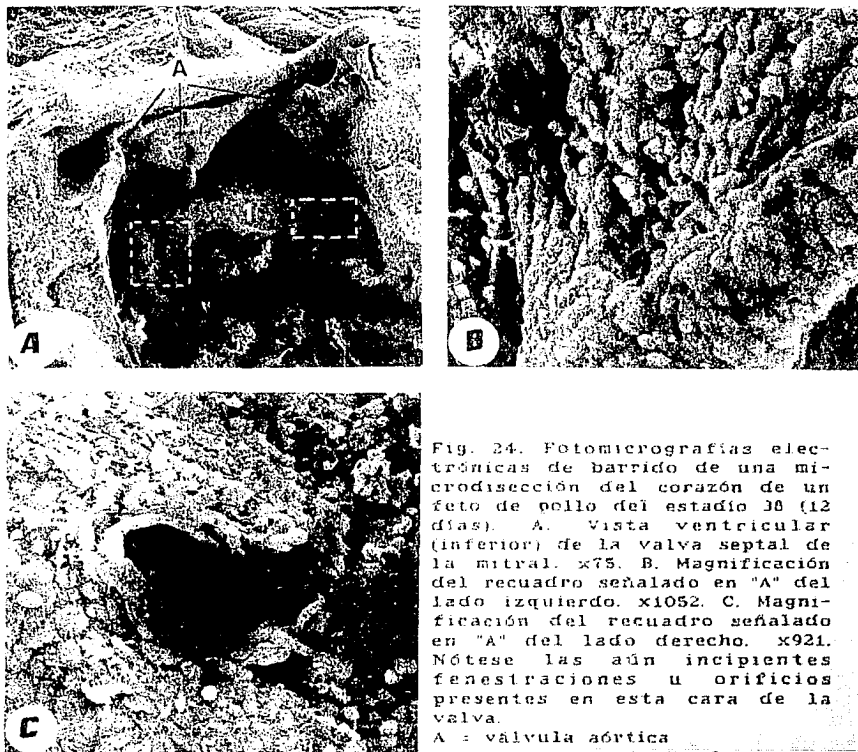


Fig. 24. Fotomicrografías electrónicas de barrido de una microdissección del corazón de un feto de pollo del estadio J8 (12 días). A. Vista ventricular (inferior) de la valva septal de la mitral. x75. B. Magnificación del recuadro señalado en "A" del lado izquierdo. x1052. C. Magnificación del recuadro señalado en "A" del lado derecho. x921. Nótese las aún incipientes fenestraciones u orificios presentes en esta cara de la valva.

A = valvula aórtica

□ = polo septal mitral



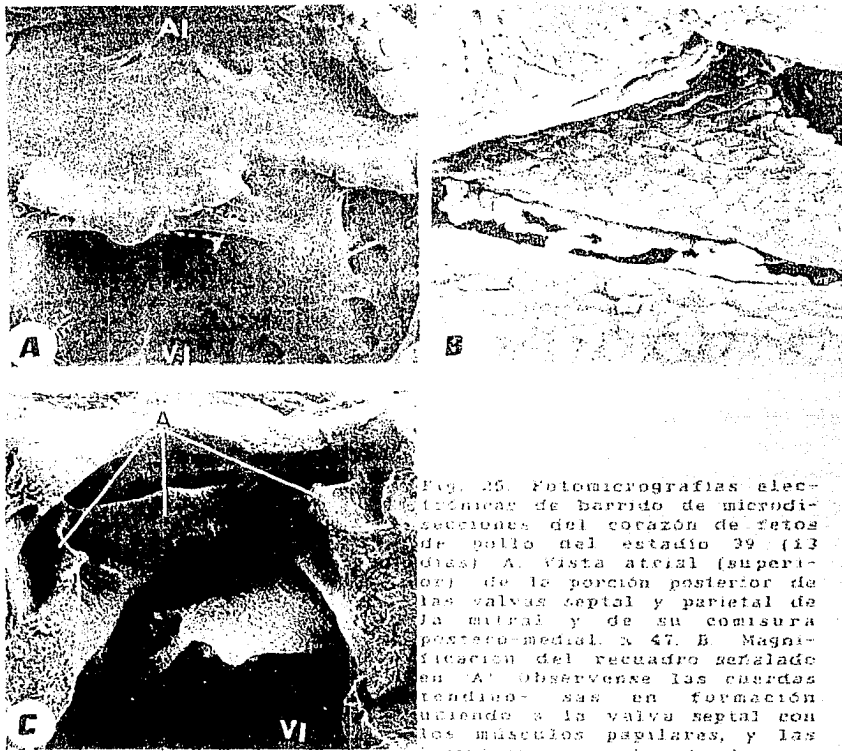


Fig. 25. Fotomicrografías electrónicas de barrido de microdisecciones del corazón de fetos de pollo del estadio 39 (13 días). A. Vista ataral (superior) de la porción posterior de las valvas septal y parietal de la mitral y de su comisura postero-medial.  $\times 47$ . B. Magnificación del recuadro señalado en A. Obsérvense las cuerdas tendinosas en formación uniéndose a la valva septal con los músculos papilares, y las incipientes cuerdas tendinosas de la valva parietal.  $\times 67$ . C. Vista ventricular (inferior) de la valva septal de la mitral. Obsérvese lo rudimentario de las cuerdas tendinosas por esta cara.  $\times 98$ .

A : válvula séptica; A1 : atrio izquierdo, a = músculo papilar anterior; B = músculo papilar posterior; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

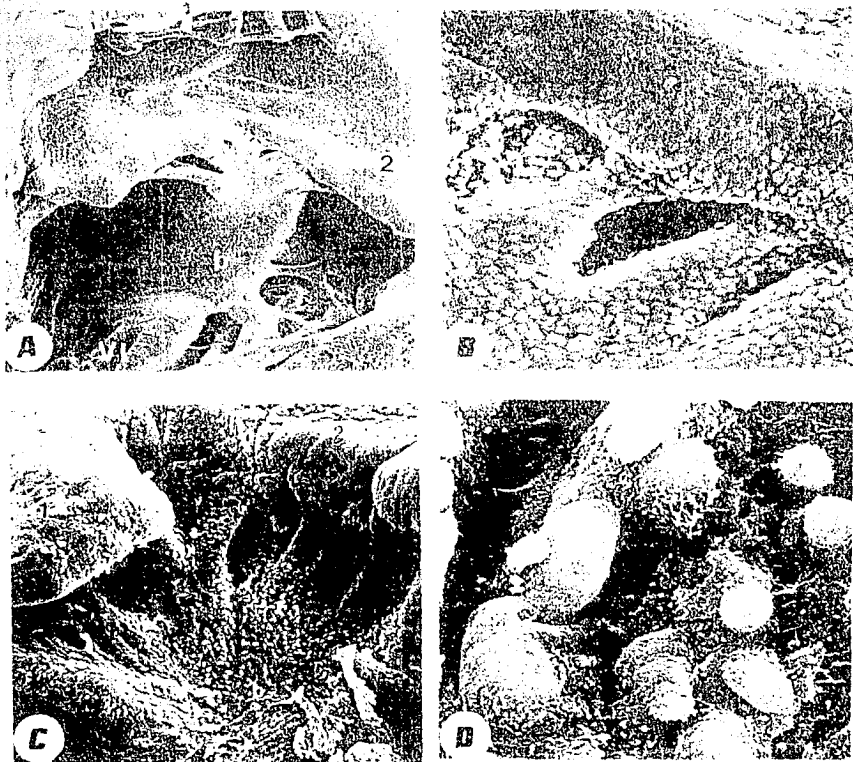


Fig. 26. Potamomyzopsis. Microfotografías de barrido de estructura interna del corazón de fotos de polvo del estudio 60 114. Dinos. A. Vista axial interna de la porción posterior de las valvas septal y parietal de la mitral, y de su conexión postero-septal.  $\times 56$ . B. Magnificación del cuadrado señalado en A.  $\times 506$ . C y D. Misma vista y composición de otro caso.  $\times 373$  y  $\times 2953$ . Obsérvese el diferente grado de desarrollo de las cuerdas tendinosas de la valva parietal. Vi = ventrículo izquierdo; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral.

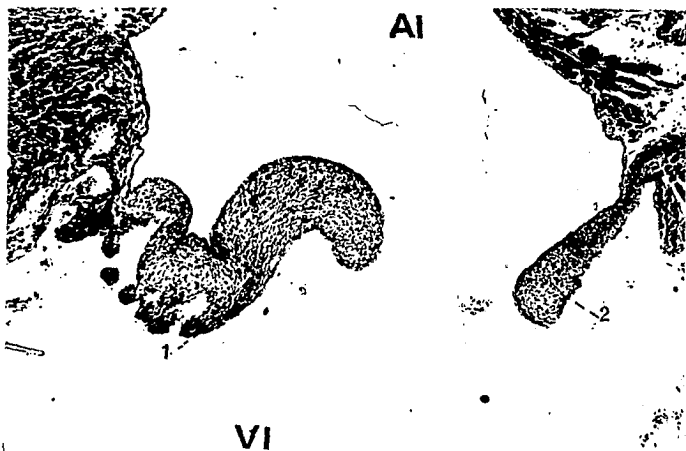


Fig. 27. Fotomicrografía óptica de un corte histológico del corazón de un feto de pollo del estadio 40 (14 días). Obsérvese las valvas septal y parietal de la mitral y las cuerdas tendíneas en formación por su cara ventricular, formando fenestraciones individualizadas(\*) recubiertas de endocardio. x147.  
 AI = atrio izquierdo; VI = ventrículo izquierdo; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

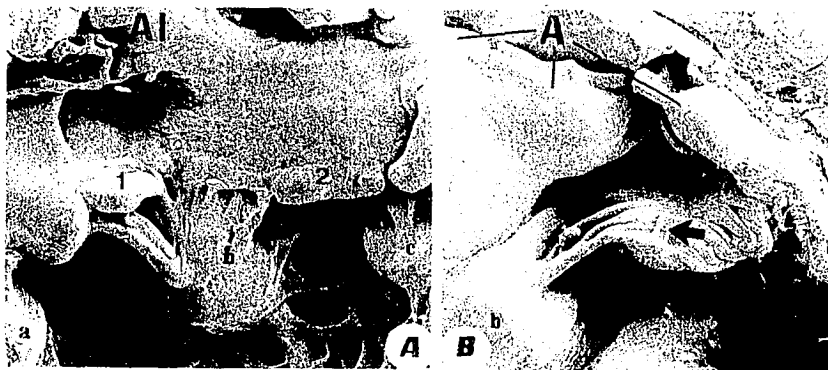


Fig. 28. Fotomicrografías electrónicas de barrido de microdisecciones del corazón de fetos de pollo del estado 41 (15 días). A. Vista atrial (superior) de las valvas septal y parietal de la mitral, y de su comisura pósteromedial. x36. B. Vista ventricular (inferior) de la valva septal de la mitral. x54. Obsérvese en A la morfología similar de la válvula por esta cara que en el estado previo. Por el contrario, nótese en "B" un cambio significativo de la morfología valvular respecto al estado previo, ya apreciándose claramente las cuerdas tendinosas y apareciendo un reborde o rafé fibroso (flecha) en la porción medio-inferior de la valva septal.

A = válvula aórtica; AI = atrio izquierdo; VI = ventrículo izquierdo; a = músculo papilar anterior; b = músculo papilar posterior; c = músculo papilar lateral; 1 = velo septal mitral; 2 = velo parietal mitral

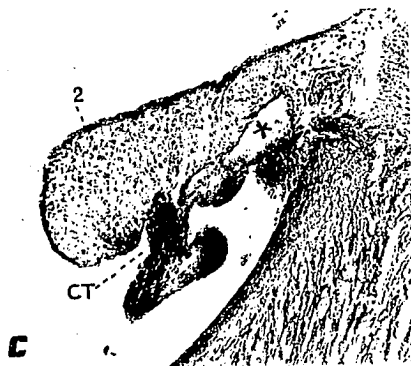
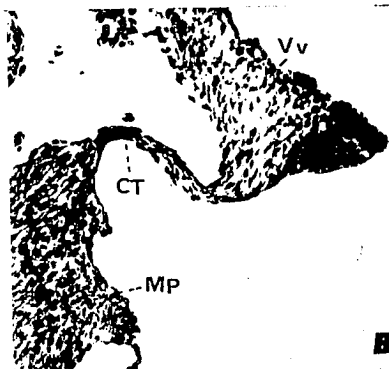
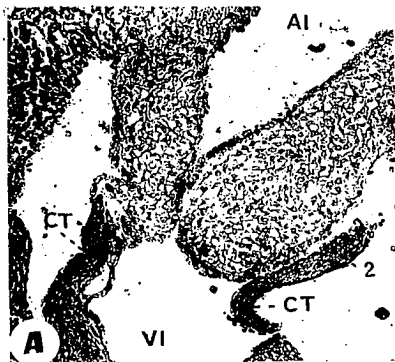


Fig. 29. Fotomicrografías ópticas de cortes histológicos de corazones de fetos de pollo del estadio 41 (15 días), teñidos con hematoxilina-eosina. A. Corte a nivel de ambos velos valvulares con sus correspondientes cuerdas tendíneas y músculos papilares. Nótese el tejido conectivo laxo de los velos valvulares y el tejido conectivo denso de las cuerdas tendíneas. x242. B. Cuerda tendinea muy adelgazada. x269. C. Velo valvular parietal mostrando las fenestraciones de su cara ventricular, en cuyo interior se observan células endocárdicas desprendiéndose. x200.

AI = atrio izquierdo; CT = cuerdas tendíneas; MP = músculo papilar; VI = ventrículo izquierdo; Vv = velo valvular; 2 = velo parietal mitral

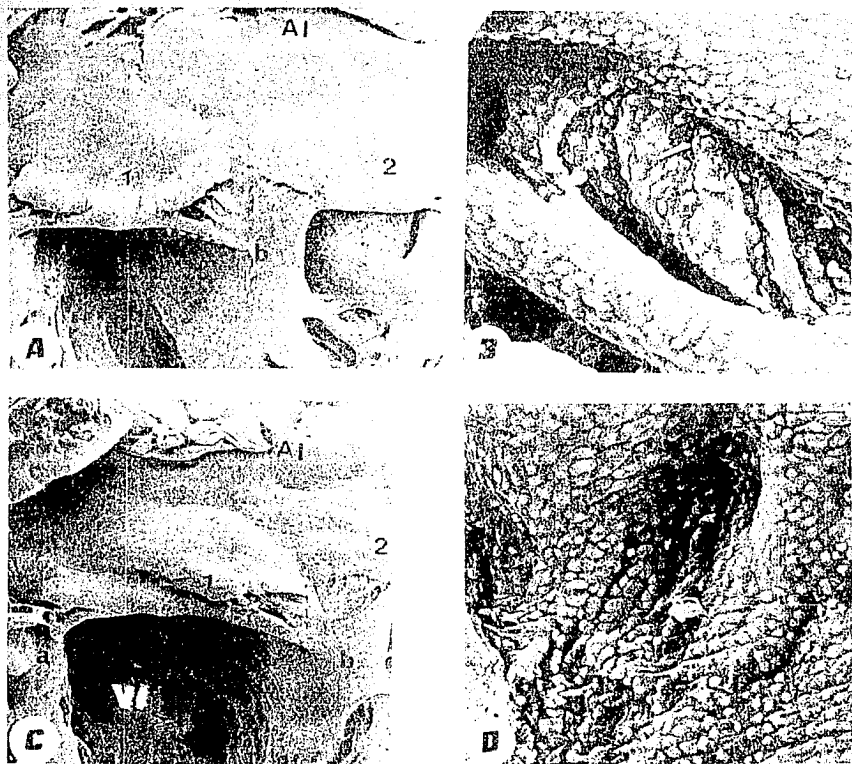


Fig. 30. Potenciogramas electroanatomicos de borrado de microregistra-  
ciones del corazón de perros de pelaje del estado 33 (36 días)  
(A,B) y 34 (17 días) (C,D); A y C: Vista mitral (superior) de las  
valvas septal y parietal de la mitral x40 y x25. B y D:  
Magnificación de los recuadros señalados en A y C, respectiva-  
mente. x750 y 540.

AJ = atrio izquierdo; VI = ventrículo izquierdo; a = músculo  
papilar anterior; b = músculo papilar posterior; 1 = velo septal  
mitral; 2 = velo parietal mitral

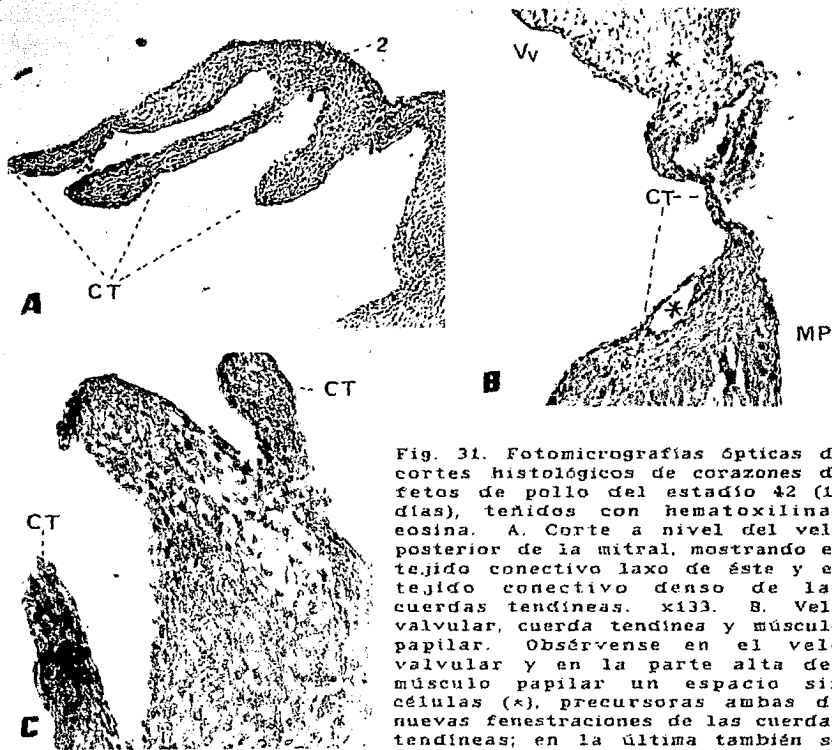


Fig. 31. Fotomicrografías ópticas de cortes histológicos de corazones de fetos de pollo del estadio 42 (16 días), teñidos con hematoxilina-eosina. A. Corte a nivel del velo posterior de la mitral, mostrando el tejido conectivo laxo de éste y el tejido conectivo denso de las cuerdas tendíneas. x133. B. Velo valvular, cuerda tendínea y músculo papilar. Obsérvanse en el velo valvular y en la parte alta del músculo papilar un espacio sin células (\*), precursoras ambas de nuevas fenestraciones de las cuerdas tendíneas; en la última también se aprecia un tejido conectivo laxo alrededor del espacio vacío. x216. C. Acercamiento de una cuerda tendínea de tejido conectivo denso y del músculo papilar correspondiente; en la base de la cuerda tendínea se aprecia tejido conectivo laxo. x1842.

CT = cuerdas tendíneas; MP = músculo papilar; Vv = velo valvular; 2 = velo parietal mitral

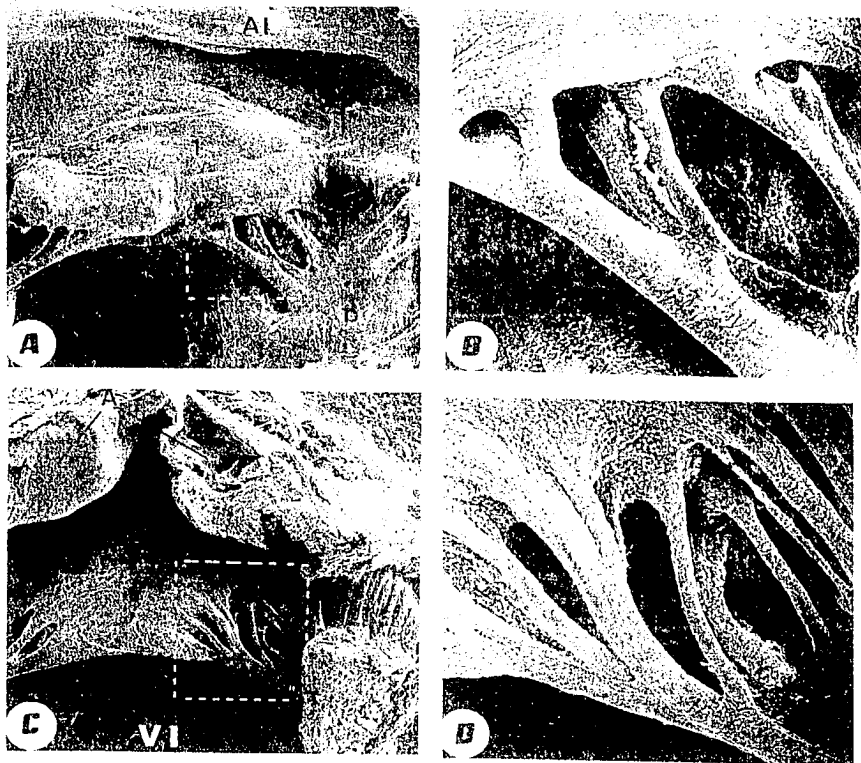


Fig. 33. Fotomicrográficas electrónicas de barrido de microdisecciones del corazón de fetos de pollo del estadio 46 (21 días). A. Vista atrial (superior) de la válvula septal de la mitral y de sus comisuras antero-lateral y póstero-medial.  $\times 59$ . B. Magnificación del recuadro señalado en "A".  $\times 240$ . C. Vista ventricular (inferior) de la válvula septal de la mitral.  $\times 64$ . D. Magnificación del recuadro señalado en "C".  $\times 293$ .

A = válvula aórtica; AI = atrio izquierdo; VI = ventrículo izquierdo; b = músculo papilar posterior; i = velo septal mitral



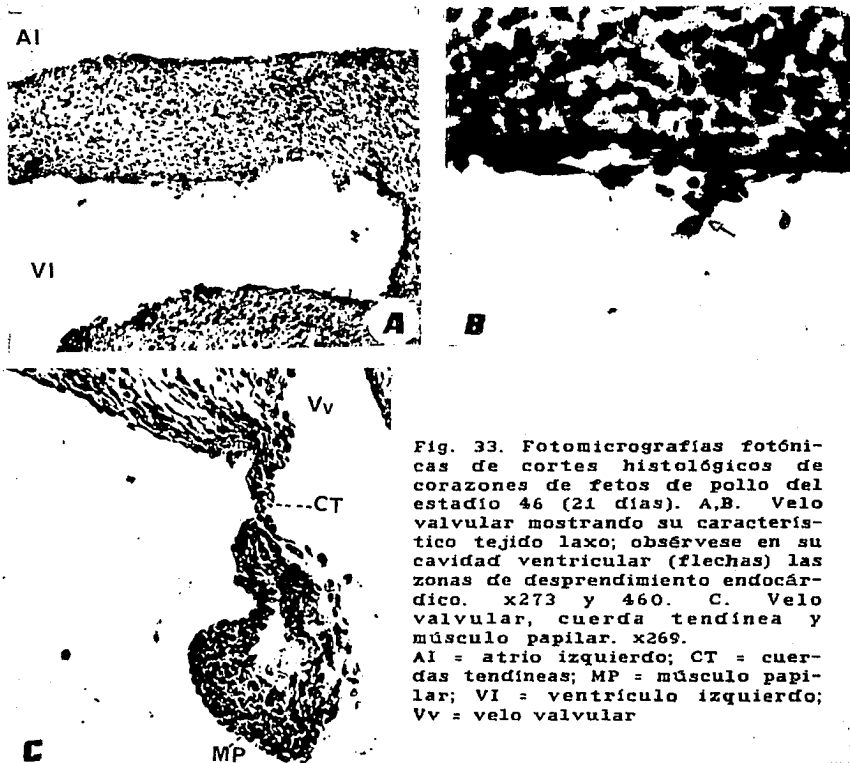


Fig. 33. Fotomicrografías fotónicas de cortes histológicos de corazones de fetos de pollo del estadio 46 (21 días). A,B. Velo valvular mostrando su característico tejido laxo; obsérvese en su cavidad ventricular (flechas) las zonas de desprendimiento endocárdico. x273 y 460. C. Velo valvular, cuerda tendinea y músculo papilar. x269.

AI = atrio izquierdo; CT = cuerdas tendineas; MP = músculo papilar; VI = ventrículo izquierdo; Vv = velo valvular

## 10. BIBLIOGRAFIA

## 10. BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, L., ARCINEGA A., SAUCEDO R.: The quantitative anatomy of the normal human heart in fetal and perinatal life. *Int. J. Cardiol.* 17: 57-72, 1987.
- ANDERSON, R.H., BECKER, A.: *Cardiac Anatomy*. Editorial Gower Medical Publishing. London, 1980.
- ARGUELLO, C., DE LA CRUZ, M.V. y SANCHEZ, C.: Experimental study of the formation of the heart tube in the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 33: 1-11, 1975.
- ARGUELLO, C., SERVIN, M., ARCINIEGAS, E., VALENZUELA, B.: Fusion mechanisms of endocardial atrioventricular cushions. En: *Paediatric Cardiology. Atrioventricular Septal Defects*. Editado por Manuel Quero Jiménez y Manuel Arteaga Martínez. Editorial Norma S.A. Madrid, 1988. pp. 64-75.
- ARTEAGA, M., MAITRE, M.J., GARCIA-PELAEZ, I., GONZALEZ DE VEGA, C., QUERO, M.: Anatomía y fisiología normal del corazón. En: *Cardiología Pediátrica*. Editado por Julio Ardura Fernández. Editorial Aula Médica. Madrid, 1987. pp. 1-39.
- ARTEAGA, M., GARCIA-PELAEZ, I., GIMENEZ-RIBOTTA, M., QUERO-JIMENEZ, M.: Embryological development of endocardial atrioventricular cushions in the chick embryo. En: *Paediatric Cardiology. Atrioventricular Septal Defects*. Editado por Manuel Quero Jiménez y Manuel Arteaga Martínez. Editorial Norma S.A. Madrid, 1988. pp. 48-63.
- CASTRO-QUEZADA, A., NADAL-GINARD B., y DE LA CRUZ, M.V.: Experimental study of the formation of the bulboventricular loop in the chick. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27: 623-637, 1972.
- DAVIS, C. L.: Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Canegie. Inst. Wash. Contrib. Embryol* 19: 245-284, 1927.
- DE LA CRUZ, M.V., ANSELM, G., ROMERO, A., MONROY, G.: A qualitative and quantitative study of the ventricles and great vessels of normal children. *Am. Heart J.* 60: 675, 1960.
- DE LA CRUZ, M. V., SANCHEZ, C., ARTEAGA, M. y ARGUELLO, C.: Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J. Anat.* 123: 661-686, 1977.
- DE LA CRUZ, M.V., GIMENEZ-RIBOTTA, M., SARAVALLI, O., CAYRE, R.: The contribution of the endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to the

- development of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. *Am. J. Anat.* 166: 63-72, 1983.
- DE VRIES, P.A. y SAUNDERS, J.B.: Development of the ventricles and spiral outflow tract in the human heart. A contribution to the development of the human heart from age group IX to age group XV. *Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol* 37: 87-114, 1962.
  - FRAZLER, J.E.: The formation of the pars membranacea septi. *J. Anat. Physiol.* 51: 19-29, 1916.
  - GARCIA-PELAEZ, I., DIAZ-GONGORA, G., ARTEAGA, M.: Contribution of the superior atrioventricular cushion to the left ventricular infundibulum. Experimental study on the chick embryo. *Acta Anat.* 118: 224-230, 1984.
  - GARCIA-PELAEZ, I., ARGUELLO, C., GIMENEZ-RIBOTTA, M., VALENZUELA, B., ARTEAGA, M.: Morphological and ultrastructural changes in the distal bulbus during embryonic development. en: *Correlations Between Experimental Cardiac Embryology and Teratology and Congenital Cardiac Defects*. Editado por Antonia Aráñega y Tomás Pexieder. Universidad de Granada. Granada, España, 1989. pp. 171-201.
  - HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88: 49-92, 1951.
  - HAY, D.A., LOW, F.N.: The fusion of dorsal and ventral endocardial cushions in the embryonic chick heart: A study in fine structure. *Am. J. Anat.* 133: 1-24, 1972.
  - HAY, D.A.: Development and fusion of the endocardial cushions. En: *Morphogenesis and Malformation of the Cardiovascular System*. Birth Defects: Original Article Series. Vol XIV. Rosenquist GC, Bergsman D. New York, 1978. pp.
  - KRAMER, T.C.: The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the interventricular septum in the human heart. *Am. J. Anat.* 71: 343-370, 1942.
  - LAANE, H.M.: *The Arterial Pole of the Embryonic Heart*. Ed. Swets & Zeitlinger BV. Amsterdam, 1978.
  - LAM, C.H.J., RANGANATHAN, N.: Morphology of the human mitral valve. I. Chordea tendineae: A new classification. *Circulation* 41: 449-458, 1970.
  - LOS, J.A., VAN EIJNDTHOVEN, E.: The fusion of the endocardial cushion in the heart of the chick embryo: A light-microscopical and electron-microscopical study. *Z. Anat. Entwickl-Gesch.* 141: 55-75, 1973.

- MAGOVERN, J.H., MOORE, G.W., HUTCHINS, G.M.: Development of the atrioventricular valve region in the human embryo. *Anat. Rec.* 215: 167-181, 1986.
- MALL, F.P.: On the development of the human heart. *Am. J. Anat.* 13: 249-298, 1912.
- MARKWALD, R.R., FITZHARRIS, T.P., MANASEK, F.J.: Structural development of endocardial cushions. *Am. J. Anat.* 148: 85-120, 1977.
- MORSE, D.E., HAMLETT, W.C., NOBLE, C.W.: Morphogenesis of chordae tendinae. I. Scanning electron microscopy. *Anat. Rec.* 210: 629-638, 1984.
- NETTER, F.H. y VAN MIEROP, L.H.S.: Embryology. En: *The Heart. The Ciba Collection of Medical Illustrations, Vol. Editado por F.F. Vonkman. Ciba Pharmaceutical Company, New York, 1969. pp. 112-130.*
- NOBLE, C.W., HAMLETT, W.C., McCANN, P., MORSE, D.E.: Morphogenesis of chordae tendinae in the avian embryo. *Micron* 14: 97-98, 1983.
- ODGERS, P.N.P.: The development of the pars membranacea septi in the human heart. *J. Anat.* 72: 247-259, 1938.
- PINO NUÑEZ, H.R.: Terminología Anatómica Española e Internacional. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina México, D.F. 1970.
- RANGATHAN, N., LAM, C.J.H.: Morphology of the human mitral valve. II: The valve leaflets. *Circulation* 41: 459-468, 1970.
- ROWLATT, U. F., RIMOLDI, H.J.: The quantitative anatomy of the normal child's heart. *Pediatric Clin. North. Amer.* 10: 499-588, 1963.
- STALSBERG, H. y DE HAAN, R.L.: The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev. Biol.* 19: 128-159, 1969.
- STREETER, G.L.: Developmental horizons in human embryos. Description of age group XIII, embryos about 4 or 5 millimeters long, and age group XIV, period of indentation of lens vesicle. *Carnegie. Inst. Wash. Contrib. Embryol.* 31: 27-63, 1945.
- STREETER, G.L.: Developmental horizons in human embryos. Description of age groups XIX, XX, XXI, XXII and XXIII. *Carnegie. Inst. Wash. Contrib. Embryol.* 34: 165-, 1951.
- VAN GILS, F.A.W.: The development of the human atrioventricular heart valves. *Acta Morph. Neerl. Scand.* 16: 151, 1978.

- VAN MIEROP, L.H.S., ALLEY, R.D., KAUSEL, H.W., STRANAHAN, A.: The anatomy and embryology of endocardial cushions defects. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 43: 71-83, 1962.
- VAN MIEROP, L.H.S.: Embryology of the atrioventricular canal region and pathogenesis of endocardial cushion defects. En: *Atrioventricular Canal Defects*. Robert H. Feldt. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1976. pp. 1-12.
- VESLING, J.: De pullitie Aegyptorum et observationis anatomicae et epistolae medicae. En T Bartholin. *The Elder* 1664 (citado por Laane, 1978).
- VON HALLER, A.: Sur the formation du coeur dans le poulet. Vol 2. Lausanne 1758 (citado por Laane, 1978).
- WATERSTON, D.: The development of the heart in man. *Trans. Roy. Soc. (Edinburgh)* 52: 257-302, 1917.
- WENINK, A.C.G., GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.: Left and right ventricular patterns. Consequence of ventricular septation and valve development. *Br. Heart J.* 48: 462-468, 1982.
- WENINK, A.C.G., GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.: The role of atrioventricular cushions in the septation of the heart. *Int. J. Cardiol.* 8: 25-44, 1985.