



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

299198

"CONTRIBUCIÓN DEL PLIEGUE VENTRÍCULO INFUNDIBULAR EN LA CRESTA SUPRAVENTRICULAR, ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CORAZÓN DE EMBRIÓN DE POLLO"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

CARMEN MAGDALENA AHUMADA GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. EN C. CONCEPCIÓN SÁNCHEZ GÓMEZ



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Contribución del pliegue ventrículo infundibular en la cresta
supraventricular, estudio experimental en corazón de embrión
de pollo."

realizado por Ahumada Gutiérrez Carmen Magdalena

con número de cuenta 08419846-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. en C. Concepción Sánchez Gómez.

Propietario Dra. en C. B. Isabel García Peláez.

Propietario M. en C. Miguel Angel Palomino Garibay.

Suplente Dra. en C. María del Carmen Uribe Aranzábal.

M. del Carmen Uribe

Suplente Dra. en C. Genoveva González Moran.

FACULTAD DE CIENCIAS

U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



Dra. Patricia Ramos Morales **DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

Este trabajo lo dedico a:

A mis padres Carolina y Pedro, por su enorme calidad moral y espiritual, así como por haberme brindado todo su apoyo, cariño y enseñanzas.

A mis hermanos Pedro, Martín, Leonardo y Lorena, quienes siempre me han apoyado en las buenas y en las malas.

A mis amigos Lourdes, Judith, Mauricio y Josefina, por estar siempre en los momentos más difíciles.

A mis tíos Flora y Roberto y mis primas Susi y Tere, por estar en sus corazones y su pensamiento, gracias por todo.

A Doña Carmen y Don Roberto, cuya comprensión y consejos, me alientan a seguir en el camino.

A Luis, por su cariño y paciencia, gracias por ser mi compañero en este tiempo.

Agradecimientos.

A la Dra. Concepción Sánchez: a quien agradezco por haberme ayudado a realizar esta tesis.

A la Bióloga Alejandra Contreras: por sus conocimientos, su apoyo didáctico y laboral, así como por su amistad.

Al Dr. Manuel Arteaga, la Dra. Isabel García y la M. en Ciencias Laura Villavicencio: por sus consejos, apoyo técnico y educativo y por su amistad.

Al M. en C. Miguel Ángel Palomino, a la Dra. M. del Carmen Uribe y la Dra. Genoveva González: por revisar la tesis y brindarme sus opiniones.

A mis compañeros: Don Roberto, Doña Lidia, Marcela, Osvaldo, Doña María, Miguel Ángel y Don Mario: de quienes me he llevado una gran enseñanza.

El apoyo fotográfico lo llevó a cabo el señor Mario Jáuregui.

A Mauricio Contla le agradezco su apoyo para la impresión de ésta tesis.

I N D I C E

	Pág.
I. RESÚMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	9
IV. HIPÓTESIS.....	10
V. OBJETIVOS.....	11
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
A) Estudios anatómicos con microscopía óptica.....	12
B) Experimentos de marcaje " <i>in vivo</i> ".....	13
C) Estudios histológicos.....	14
VII. RESULTADOS	
A) Estudios anatómicos con microscopía óptica.....	15
B) Experimentos de marcaje " <i>in vivo</i> ".....	16
C) Estudios histológicos.....	18
VIII. DISCUSIÓN.....	20
IX. CONCLUSIONES.....	23
X. FIGURAS.....	24
XI. APÉNDICE.....	33
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	38

I. RESUMEN

El corazón de aves y mamíferos es un órgano tetracameral con dos atrios y dos ventrículos. Cada ventrículo está dividido en tracto de entrada, región trabeculada y tracto de salida o infundíbulo. El tracto de salida derecho tiene tres paredes musculares: anterior, izquierda y cresta supraventricular (CSV). Esta última es una estructura propia del corazón normal, que separa los tractos de entrada y de salida del ventrículo derecho (VD) y está ausente en patologías troncoconales como la doble salida del VD. En el corazón del embrión de pollo, hacia el estadio 18 de Hamburger y Hamilton, aparecen en el canal atrioventricular (A-V) los cojines ventral y dorsal, permitiendo que el ventrículo derecho adquiriera su propia entrada; el cono o tracto de salida primitivo aún emerge exclusivamente del VD, entre el cono y al tracto de entrada derecho aparece el pliegue ventrículo infundibular (PVI). En el estadio 22 surgen en el cono las crestas dextrodorsal y sinistroventral, que lo separan en dos; el anterolateral dará origen al tracto de salida derecho. Mediante marcaje "*in vivo*" en el embrión de pollo, se ha demostrado que la cresta dextrodorsal del cono participa en el desarrollo de la CSV, sin embargo debido a que el pliegue ventrículo infundibular, tiene la misma ubicación topográfica en el embrión, suponemos que también interviene. Por ser el desarrollo un proceso dinámico, para comprobar esta hipótesis, se marcó "*in vivo*" el PVI en el embrión de pollo del estadio 22 y se rastreó la marca hasta el 36, también se hicieron estudios anatómicos e histológicos del corazón de los estadios objeto de estudio. Hallamos que en el estadio 22, el PVI es muy amplio, su borde izquierdo, adyacente a la cresta sinistroventral del cono, forma parte de la pared posterior del cono, mientras que su región restante se relaciona con el tracto de entrada del VD y el cojín dorsal del canal A-V; tiene dos sitios de inserción, uno en la base del cojín ventral y el otro en la pared libre derecha del VD. En el estadio 36, la CSV, tiene dos sitios de inserción, uno en el tabique interventricular y otro en la pared libre ventricular derecha y sus límites corresponden a su borde libre y a la inserción de las sigmoideas pulmonares. Respecto a la marca que se colocó en el PVI, se halló en la CSV, en el 64.28% adyacente al tracto de entrada y el 28.57% cercana al tabique interventricular. Los estudios histológicos revelaron que el PVI, está constituido por una delgada capa de miocardio de 3 a 4 células de grosor y un fino endocardio, separados por un espacio estrecho con matriz extracelular carente de células. La CSV está formada por células miocárdicas, que forman un tejido continuo, no compacto, no trabeculado, aparentemente en diferentes grados de histodiferenciación. Estos resultados permiten concluir: 1) El PVI si participa en el desarrollo de la CSV. 2) El PVI en el estadio 22, consta de dos regiones con destino prospectivo y procesos de histodiferenciación diferentes, la región cercana al surco atrioventricular derecho y el cojín dorsal del canal A-V participa en la CSV y se musculariza. 3) La región del PVI relacionada con la cresta sinistroventral del cono y el cojín ventral, posiblemente interviene en el tracto de salida del ventrículo izquierdo y sufre apoptosis. 4) El surco conoventricular izquierdo es sólo una parte del PVI. 5) Los resultados anatómicos apoyan la propuesta que el nombre correcto del PVI debe ser pliegue atrioventrículo infundibular. 6) Estos resultados conjuntamente con los del marcaje de la cresta dextrodorsal del cono, demuestran que la cresta supraventricular tiene un origen dual a partir de la cresta dextrodorsal del cono y del pliegue ventrículo infundibular.

II. INTRODUCCIÓN

Antecedentes anatómicos.

El corazón en las aves y los mamíferos, es un órgano hueco compuesto de cuatro cámaras, dos atrios y dos ventrículos. En el pollo el seno venoso no se incorpora al atrio derecho por lo que la sangre llega al corazón a través de esta estructura. En los mamíferos, el seno venoso se integra a la pared dorsal del atrio derecho, por lo que la sangre llega mediante las venas cavas superior e inferior. Por otro lado en aves y mamíferos, la sangre de los pulmones llega al atrio izquierdo por el seno de las venas pulmonares. Debido a la integración del seno venoso al atrio derecho y del seno de las venas pulmonares al atrio izquierdo, en los mamíferos, las paredes de ambos atrios tienen una zona lisa (sinusal) y otra con músculos pectíneos; mientras que en las aves, las paredes de los atrios carecen de región lisa, debido a que no se integran las zonas sinusales y solo existen músculos pectíneos que en estas dos clases de vertebrados son diferentes en ambas cavidades; en el atrio derecho estos músculos son gruesos y numerosos, mientras que en el izquierdo son de menor grosor y escasos (Anselmi G y de la Cruz MV, 1998).

Los ventrículos en ambos grupos, están divididos en tres regiones: tracto de entrada, región trabeculada y tracto de salida (Goor DA y Lillehei CW, 1975; de la Cruz MV, 1998a). Cada ventrículo presenta características anatómicas que los definen, principalmente su región apical trabeculada (Goor DA y Lillehei CW, 1975). En el pollo y el hombre, el ventrículo izquierdo definitivo, presenta en su tracto de entrada un orificio atrioventricular en donde se inserta el anillo de la válvula mitral (válvula atrioventricular izquierda); de este anillo surgen dos valvas, que se insertan también, a las paredes de la región trabeculada del ventrículo izquierdo, mediante cuerdas tendinosas y músculos papilares (de la Cruz MV, 1998a). El tracto de entrada del ventrículo derecho definitivo, presenta ciertas diferencias anatómicas en ambos grupos (Cayré R y cols., 1993); en el humano se encuentra regulado por una válvula tricúspide, mientras que en el pollo se ha reconocido la presencia de una gran valva de tipo muscular, dividida en dos regiones que se insertan a la pared libre ventricular mediante un músculo papilar pero carece de cuerdas tendinosas. Existen además pequeñas valvas microscópicas, constituidas por tejido fibroso, que se insertan directamente al tabique interventricular (Cayré R y cols., 1993).

Respecto a las regiones apicales trabeculadas, son muy similares en ambas clases de vertebrados, la del ventrículo izquierdo tiene menor cantidad de trabéculas y su aspecto es menos rugoso en comparación con la del ventrículo derecho (de la Cruz MV, 1998a).

Los tractos de salida ventriculares, son el segmento subarterial. En el caso del tracto de salida del ventrículo izquierdo, su límite arterial es el anillo de inserción de la válvula aórtica (sigmoideas o semilunares aórticas); su límite con la región apical trabeculada, corresponde a un plano tangencial al borde libre de la porción libre de la valva anteroseptal de la mitral, la cual constituye la continuidad mitroaórtica. Por consiguiente una de las paredes del tracto de salida del ventrículo izquierdo es de constitución fibrosa y se le denomina vestíbulo. Respecto al tracto de salida del ventrículo derecho, su límite arterial es el anillo de inserción de la válvula pulmonar (sigmoideas ó semilunares pulmonares). El límite con la región apical trabeculada del ventrículo derecho, corresponde en un plano tangencial al borde libre (proximal) de la cresta supraventricular. Debido a que las paredes del tracto de salida del ventrículo derecho son musculares se le denomina infundíbulo; dichas paredes son: la anterior, la izquierda (mal denominada septal) y la cresta supraventricular (de la Cruz MV y cols., 1992; de la Cruz MV, 1998b). Esta última es una estructura muscular, propia del corazón normal, que separa el orificio atrioventricular derecho del tracto de salida del mismo ventrículo (Anderson RH, 1977) (Fig. 1). La cresta supraventricular tiene dos extremos, uno se inserta en el septum interventricular entre las dos ramas de la trabécula septomarginal, mientras que el otro se inserta en el ángulo formado por el anillo atrioventricular derecho (válvula tricúspide, en el humano) y la pared libre del ventrículo derecho (de la Cruz MV, 1998b) (Fig. 1). Esta estructura es muy importante ya que en patologías congénitas troncoconales como la doble salida del ventrículo derecho, no está presente (de la Cruz MV y col., 1992, de la Cruz MV y col., 2001).

Es importante señalar, que desde el punto de vista histológico, el corazón está constituido por tres capas: endocardio, miocardio y epicardio. El endocardio es la túnica que recubre la luz del corazón, es un endotelio compuesto de un epitelio escamoso simple, por debajo del cual hay una capa de fibras de colágena y fibras elásticas, así como de algunos fibroblastos. A mayor profundidad existe una capa de tejido conectivo denso, dotado de fibras elástica intercaladas con fibras de músculo liso. La capa subendocárdica forma el límite del endocardio, en donde éste se adosa en el endomisio y se compone de tejido conectivo laxo y contiene vasos sanguíneos pequeños, nervios y fibras de Purkinje.

El miocardio del corazón adulto, es la capa media y la más gruesa de las tres capas del corazón; está constituido por una red anastomosada de células cardíacas, las cuales presentan un solo núcleo de gran tamaño, oval y de posición central. Dichas células están distribuidas en capas

separadas por tejido conectivo, en el que se encuentran vasos sanguíneos, nervios y células del sistema de conducción del corazón. Los capilares que derivan de estas estructuras invaden el tejido conectivo intercelular y forman una red densa y rica de lechos capilares que rodean a cada fibra muscular cardíaca.

El epicardio es el tejido que rodea al corazón; se compone por una capa fibrosa interna y una serosa externa. La capa interna o subepicárdica, es de tejido conectivo laxo y contiene vasos coronarios, nervios y ganglios, así como grasa. La capa externa o visceral del pericardio se compone de epitelio escamoso simple conocido como mesotelio.

Antecedentes embriológicos

Existen una serie de trabajos cuyo objetivo ha sido el estudio del desarrollo embriológico del corazón, sin embargo la mayoría de éstos han utilizado las técnicas clásicas de embriología descriptiva en material postmortem (Davis CL, 1927; De Vries PA y Saunders JB, 1962; Patten BM, 1948, 1962; de la Cruz MV y cols., 1972), las que son inadecuadas, porque no permiten seguir en forma continua y en el mismo embrión un proceso que es eminentemente dinámico, secuencial, progresivo, irreversible e ininterrumpido, en el que están implicados los procesos básicos del desarrollo de proliferación, movimiento, diferenciación y apoptosis. Por el contrario las técnicas de embriología experimental como marcaje "*in vivo*", el transplante, la supresión y la cinemicrografía han hecho grandes aportaciones al respecto. Además junto con la técnica, el modelo biológico es importante, ya que los embriones de mamíferos como cerdo, ratón y humano, son susceptibles a los procedimientos de las técnicas de la embriología experimental por lo que se produce la muerte del embrión y /o la madre. El embrión de las aves, específicamente *Gallus domesticus*, es un excelente modelo biológico para hacer estudios secuenciales en el mismo individuo, ya que es altamente resistente a la contaminación y a la manipulación quirúrgica y permite marcar selectivamente estructuras embrionarias sin producir la muerte del organismo.

Debido a que en este trabajo usamos como modelo el embrión de pollo, a continuación describiremos el desarrollo cardíaco en este organismo, tomando como base los conocimientos logrados con las técnicas de la embriología experimental, en especial el marcaje "*in vivo*".

La manifestación más temprana de las células formadoras del corazón que se ha podido

establecer es en la etapa de blástula, en el epiblasto y al igual que todas las preáreas órgano formadoras, aunque aún no están determinadas y son semejantes en su histología ya tienen una localización topográfica específica; son dos preáreas cardiogénicas que se ubican en la región caudal del embrión, una a cada lado de la línea primitiva (Spratt, 1946). Conforme avanza el desarrollo, durante la gastrulación, las células precardiacas migran del epiblasto hacia la línea media, penetran en ella y se distribuyen en dirección lateral y cefálica, constituyendo las áreas cardiogénicas ubicadas a nivel del tercio superior de la línea primitiva y extendiéndose por delante del proceso cefálico ó notocorda (Rawles ME, 1943). Posteriormente, en la etapa de gástrula tardía hacia el estadio 6 a 7 (Hamburger y Hamilton, 1951), se desplazan en dirección cefálica y paramedial (línea media ventral) constituyendo la placa cardiogénica que adquiere la forma de una U invertida y circunscribe el extremo cefálico (anterior) de la notocorda (De Haan RL, 1963). En esta etapa, aunque morfológicamente son semejantes, por la activación de su expresión génica y diferenciación bioquímica, las células ya se han determinado, por lo que sólo podrán dar origen a los tejidos propios de su destino prospectivo, el cual ya no depende de su ubicación en el embrión, en este caso es el miocardio (Rawles ME, 1943) y endocardio (Linask KK y Lash JW, 1993).

La siguiente etapa incluye el proceso de tubulación; el mesodermo lateral se delamina en dos hojas, separadas por una cavidad denominada celoma intraembrionario, una es adyacente al ectodermo (pared del cuerpo) y da origen a la somatopleura, la otra al endodermo y forma la esplacnopleura (Stalsberg H y DeHaan RL, 1969). Las células cardiogénicas se ubican en la esplacnopleura, en un área en forma de herradura llamada placa cardiogénica, (Davis CL, 1927), inicialmente está constituida por múltiples acúmulos angiogénicos los cuales cavitan y se interconectan, formando plexos extensos en ambas ramas de la herradura cardiogénica y posteriormente dan origen a un tubo endocárdico en cada una de las ramas; la esplacnopleura vecina, sufre un engrosamiento y constituye el manto miocárdico de los primordios cardiacos. Simultáneamente se inicia el plegamiento del ectodermo y del endodermo en la región cefálica del embrión, dando origen al pliegue cefálico (estadios 7-8) que consta de la placa neural y el intestino portal anterior muy incipiente, cuyo resultado es que la placa cardiogénica que originalmente se encuentra en posición cefálica con respecto a la notocorda, se desplaza en dirección ventromedial, provocando un acercamiento de los primordios cardiacos, los cuales se fusionan y constituyen un tubo endocárdico único, rodeado ventrolateralmente por un manto miocárdico común, el cual progresa caudalmente constituyendo una canal abierta dorsalmente,

siendo su pared dorsal la pared ventral del intestino anterior (estadio 9); este corazón histológicamente es un manto mioendocárdico (Manasek FJ, 1969, Manner J, 1993). A esta estructura se le conoce como "corazón en tubo recto" y corresponde al periodo de pre-asa (Fig. 2A).

Clásicamente se ha considerado que en el corazón en tubo recto ya están presentes todas las cavidades cardiacas primitivas que formarán el órgano definitivo, delimitadas por surcos (Davis CL, 1927). Sin embargo, por experimentos de marcaje "*in vivo*" (de la Cruz MV y cols., 1977, 1989) y supresión (Castro-Quezada y cols., 1972) se demostró que solo se encuentran presentes el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo derecho en posición cefálica y el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo izquierdo en posición caudal, ubicados en serie y separados por los surcos interventriculares derecho e izquierdo (Fig. 2A). En esta etapa, el corazón tiene dos bordes en los que se observan los dos surcos interventriculares (Castro-Quezada A y cols., 1972; de la Cruz MV y cols., 1989).

Con el desarrollo, los pliegues de los bordes derecho e izquierdo de la canal miocárdica se fusionan y forman un tubo que crece gradualmente, por la incorporación de poblaciones celulares en los extremos cefálico y caudal del corazón, dando como resultado la aparición de nuevos segmentos cardiacos primitivos (de la Cruz MV y cols. 1989, de la Cruz MV y Sánchez- Gómez C, 1998).

A partir del estadio 11 se inicia el plegamiento y torsión del tubo cardiaco, que se hace más notable en el estadio 12. Este proceso para su estudio se ha dividido en tres etapas: asa en C, asa en S y etapa avanzada de la torsión (Fig. 2A-D') (Manner J, 2000).

En la etapa de asa en C, el corazón tiene una borde derecho convexo (curvatura mayor) mientras que su borde izquierdo es cóncavo (curvatura menor) (Fig. 2B). Mediante marcaje "*in vivo*" se demostró que los surcos interventriculares derecho e izquierdo del corazón en tubo recto al fusionarse forman el surco interventricular izquierdo del corazón de asa en C, que es muy profundo y separa los primordios de las regiones apicales trabeculadas y que en esta etapa se encuentra en la curvatura menor (Fig. 2B) (Castro-Quezada A y cols. 1972, de la Cruz y cols. 1989, de la Cruz y Sánchez- Gómez, 1998). Es importante señalar, que se ha descrito que en estadios más avanzados, este surco participa en la formación del pliegue ventrículo infundibular. Además aparecen tres nuevos segmentos (compare Fig. 2B con 2A): 1. El cono (primordio de los tractos de salida ventriculares) en posición cefálica al primordio de la región trabeculada de ventrículo derecho. 2. El tracto de entrada primitivo (primordio de ambos tractos de entrada

ventriculares), en posición caudal al primordio de la región trabeculada del ventrículo izquierdo y 3. Los atrios primitivos derecho e izquierdo en la región caudal del corazón (compare Fig. 2B con 2E, E') (de la Cruz MV y cols., 1977, 1989; de la Cruz MV y Sánchez Gómez C, 1998).

En el estadio 14, (Fig. 2C) debido a la flexión de las regiones craneal y cervical del embrión y a la torsión y plegamiento del corazón, el asa cardiaca se coloca en el plano sagital y toma la forma de una S. La curvatura mayor adquiere una posición ventral y la menor dorsal. El tracto de entrada y los atrios primitivos son ligeramente dorso cefálicos, mientras que el cono aún no septado, emerge exclusivamente del primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho y tiene una dirección ventrodorsal, también aparece el seno venoso (de la Cruz, 1998c; Manner, 2000).

Con el desarrollo se inicia la etapa avanzada de la torsión, estadios 16-17 (Fig. 2D,D'). Los segmentos cardiacos primitivos (atrios primitivos, tracto de entrada primitivo, primordio de las regiones apicales trabeculadas de cada ventrículo y cono), ocupan la posición espacial y relación de vecindad similares a la del corazón maduro y además aparece el tronco (Fig. 2D, D'). El cono y el primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho adquieren una posición ventral y derecha (Fig. 2D), los atrios primitivos ascienden a una posición posterosuperior de tal manera que el atrio primitivo derecho, el tracto de entrada primitivo y el primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho son adyacentes; la curvatura menor es poco evidente, mientras que la curvatura mayor corresponde al ápice cardiaco (Fig. 2D, D'). Comienza a evidenciarse el pliegue ventrículo infundibular, sin embargo aún no se ha iniciado el proceso de septación (de la Cruz MV, 1998c).

Posteriormente hacia el estadio 17-18 comienza a aparecer el septum cardiaco primitivo, constituido por el septum primum a nivel de los atrios, los cojines ventral y dorsal en el canal atrioventricular y el septum interventricular primitivo entre las regiones trabeculadas ventriculares. Estas estructuras están alineadas entre sí y sin un límite de demarcación que las separe y debido a que los cojines del canal atrioventricular dividen parcialmente el tracto de entrada primitivo en un orificio atrioventricular derecho y otro izquierdo, la región trabeculada derecha adquiere su tracto de entrada que al inicio es muy estrecho, pero se va ensanchando conforme avanza el desarrollo (de la Cruz y cols. 1983; de la Cruz y Markwald, 1998). Respecto al cono (primordio de los tractos de salida ventriculares) tiene la forma de un cono truncado, sin crestas, el cual aún se comunica exclusivamente con el primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho. Estos dos últimos hechos determinan la aparición definitiva del pliegue

ventrículo infundibular que separa el cono (primordio de los tractos de salida ventriculares) del tracto de entrada del ventrículo derecho embrionario.

Posteriormente entre los estadios 22-23 aparecen las crestas dextrodorsal y sinistroventral del cono, que lo dividen en un cono anterolateral que formará el infundíbulo del ventrículo anatómicamente derecho y un cono posteromedial que participará en el desarrollo del vestíbulo del ventrículo anatómicamente izquierdo (de la Cruz MV,1998b). En esta etapa, el pliegue ventrículo infundibular sigue manteniendo la misma relación topográfica con los tractos de entrada y de salida del ventrículo derecho embrionario y ambos conos aún permanecen comunicados exclusivamente con el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo derecho, es decir el ventrículo izquierdo aún no ha adquirido su tracto de salida, proceso que sucede más tardíamente (de la Cruz MV,1998b).

El pliegue ventrículo infundibular, ha sido descrito por varios autores quienes lo han designado de muy diversas maneras. Davis CL (1927) lo describió en el embrión humano 4529, como un surco bulboventricular izquierdo muy profundo, con una cresta interna. Kramer TC (1942) lo llama pliegue ó espolón conoventricular y lo describe como un reborde de tejido que rodea a la región del cono, que corresponde a la salida del ventrículo izquierdo. DeVries PA y Saunders JB (1962) mencionan la presencia de una estructura entre las ramas transversa proximal (primordio de la región apical trabeculada del ventrículo derecho) y la rama ascendente (infundíbulo ó cono) llamada con muy variados nombres, entre ellos bulboauricular spur, piensan que no es una estructura obstructiva y que es necesario hacer estudios secuenciales para conocer su desarrollo. Netter FH y Van Mierop LHS (1969) lo denominan pestaña conoventricular. Goor DA y cols. (1972) consideran que es un pliegue que separa al cono del ventrículo izquierdo, lo llaman espolón conoventricular y señalan que la cresta sinistroventral del cono lo divide en dos regiones, una anterior que forma parte del tracto de salida del ventrículo derecho y otra posterior que es parte del tracto de salida del izquierdo. Anderson RH y cols. (1977) lo denomina pliegue atrioventriculo infundibular, mientras que Wenink ACG y Gittenberger-de Groot AC (1985) lo llaman pliegue primario y de la Cruz MV y cols. (1992) pliegue ventrículo infundibular. Más recientemente, de la Cruz MV y Markwald R (1998) proponen que con base en su constitución embriológica la denominación correcta es pliegue atrioventriculo infundibular.

III .- JUSTIFICACIÓN

La incorporación del cono anterior al ventrículo derecho es un proceso tardío y poco conocido; se han sugerido diversos factores participantes, tales como los cambios de posición de los segmentos cardiacos primitivos (Kramer TC, 1942, Goor DA y Lillehei CW, 1972), la migración de poblaciones celulares desde el extremo anterior (cefálico) del corazón que se van integrando (Thompson RP y Fitzharris TP, 1979), el crecimiento diferencial del miocardio ventricular (Pexieder T y Christen Y, 1981) y procesos de histodiferenciación (Arguello C y cols., 1978). La mayoría de estas investigaciones, se han realizado, usando las técnicas de embriología descriptiva en material "*post mortem*" de embriones humanos, de mamíferos como ratón y cerdo y de pollo. Respecto a los componentes embriológicos del infundíbulo del ventrículo anatómicamente derecho, también los conocimientos son escasos. El marcaje "*in vivo*" en el embrión de pollo, ha demostrado que la cresta dextrodorsal del cono participa en el desarrollo de la cresta supraventricular (de la Cruz y cols. 1982; García-Peláez I., 1986), que como ya se ha descrito en los antecedentes anatómicos, es una de las paredes de dicho infundíbulo, sin embargo, aún se desconoce si el pliegue ventrículo infundibular tiene alguna participación en el desarrollo de esta estructura anatómica.

IV .- HIPÓTESIS.

Debido a que el pliegue ventrículo infundibular separa los tractos de entrada y salida (cono) del ventrículo derecho embrionarios, suponemos que dicho pliegue participa en el desarrollo de la cresta supraventricular, que en el corazón maduro tiene una ubicación topográfica similar.

V.- OBJETIVOS

Objetivo general.

Investigar mediante experimentos de marcaje "*in vivo*" en el embrión de pollo, la participación del pliegue ventrículo infundibular en la cresta supraventricular.

Objetivos particulares.

1. Estudiar las características anatómicas del corazón del embrión de pollo del estadio 22, haciendo especial énfasis en la ubicación topográfica del pliegue ventrículo infundibular y su relación anatómica con el tracto de entrada del ventrículo derecho embrionario y con el cono (tracto de salida primitivo).
2. Estudiar en el corazón del embrión de pollo del estadio 36, la ubicación topográfica de la cresta supraventricular y su relación anatómica con los tractos de entrada y salida del ventrículo derecho.
3. Marcar "*in vivo*", el pliegue ventrículo infundibular en el estadio 22, en que aparece el cono anterior (primordio del tracto de salida del ventrículo derecho) y rastrear la marca hasta su expresión anatómica definitiva, en el corazón maduro del estadio 36.
4. Estudiar las características histológicas del pliegue ventrículo infundibular en el estadio 22 y de la cresta supraventricular en el estadio 36.

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Se utilizaron huevos fértiles de gallina *Gallus domesticus* de la raza White Leghorn, se colocaron en una incubadora ranchera a 37.5° C con 86 a 87 % de humedad, para obtener embriones de los estadios 22 y 36 y se clasificaron según la clave de Hamburger y Hamilton (1951), basada en el tiempo de incubación por horas y en las características morfológicas del embrión.

Se eligió el corazón de pollo como modelo biológico, por sus características anatómicas y embriológicas similares al del humano y porque además en él se pueden marcar selectivamente estructuras del corazón embrionario y seguir su desarrollo en el mismo individuo hasta su expresión anatómica definitiva.

Se realizaron tres tipos de estudios: estudios anatómicos con microscopia óptica, experimentos de marcaje "*in vivo*" y estudios histológicos.

A) Estudios anatómicos con microscopia óptica.

Para conocer las características internas del corazón del embrión de pollo de las edades objeto de esta investigación, se utilizaron 5 embriones del estadio 22 y 5 del 36, los cuales se fijaron por perfusión, (apéndice 1) inyectando formol al 3.5% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Soluciones 1 y 2).

Estadio 22. Con el propósito de conocer la ubicación topográfica del pliegue ventrículo infundibular y sus relaciones de vecindad con el cono (primordio de los tractos de salida ventriculares), el tracto de entrada del ventrículo derecho embrionario y los cojines dorsal y ventral del canal atrio ventricular, a los corazones se les disecó la pared derecha del cono y del primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho. Se usó un cabello a manera de sonda para seguir la comunicación del atrio primitivo derecho con su ventrículo correspondiente a través de su propio tracto de entrada; otro trozo de cabello se colocó en la pared posterior del cono. Todo este procedimiento se realizó con la ayuda de unas tijeras de microcirugía oftalmológica de Vannas, pinzas de relojero del número 5 y un microscopio estereoscópico Zeiss.

Estadio 36 (corazón maduro). Para conocer la ubicación topográfica de la cresta supraventricular y su relación con los tractos de entrada y de salida (infundíbulo) del ventrículo derecho, a los corazones de este estadio se les se retiró la pared libre anterior del infundíbulo y de la región apical trabeculada del ventrículo derecho, así como de la arteria pulmonar. También en este caso, se utilizó un pequeño trozo de cabello para seguir el curso del tracto de entrada del ventrículo derecho y conocer su relación con la cresta supraventricular. Se usó el mismo material quirúrgico y óptico.

En ambos casos se tomaron fotografías del corazón completo (antes de disecarlo) y en diferentes etapas de la disección, usando un microscopio Olympus SZ-STU2 y una cámara fotográfica Olympus C-35AD-4.

B) Experimentos de marcaje “*in vivo*”.

Con el propósito de investigar la expresión anatómica del pliegue ventrículo infundibular en el corazón maduro, se marcó “*in vivo*” dicha estructura embriológica en el estadio 22 y se rastreó la marca hasta el 36. El marcaje se realizó “*in ovo*”(apéndice 2). Se usó como marca una mezcla de gelatina /carbón /tinta china, preparada con una modificación de la técnica de Seicher (apéndice 3). Los embriones se dividieron en dos series, la primera fue para crear la técnica quirúrgica de marcaje y la segunda para rastrear la marca.

Serie 1. Una vez conocida la ubicación topográfica del pliegue ventrículo infundibular en el corazón del estadio 22 por los estudios anatómicos, el siguiente paso fue identificar el pliegue y su relación con las estructuras vecinas en los embriones vivos en este mismo estadio, para poder crear la técnica quirúrgica de colocación de la marca. Este procedimiento se realizó dentro del cascarón, usando la técnica de marcaje “*in ovo*” (apéndice 2), abriendo una ventana en el cascarón del huevo, en la región de la cámara de aire, para poder observar al embrión. Se retiraron las membranas vitelina y pericárdica, inmediatamente después, se introdujo la marca en el pliegue que se observa entre el cono y el surco atrioventricular derecho. La marca consistió en un pequeño filamento de vidrio, de aproximadamente 10 μm de diámetro, cubierto con una mezcla de gelatina /carbón /tinta china (apéndice 3). El filamento se retiró 2 ó 3 minutos después, permaneciendo una mancha oscura inmersa en el tejido. Para conocer con precisión la ubicación de la marca y confirmar si estaba colocada en el pliegue ventrículo infundibular, los embriones se

sacrificaron inmediatamente después del marcaje, se fijaron y se disecaron siguiendo la misma técnica que se usó en los estudios anatómicos.

Con el propósito de corroborar que la eficacia de la técnica de marcaje del pliegue ventrículo infundibular fuera mayor al 80 %, en un grupo de 27 embriones del estadio 22 se marcó el pliegue antes descrito, se sacrificaron inmediatamente, se disecó el corazón, se localizó la ubicación precisa de la marca y se contabilizaron los resultados.

Serie 2. Cuando se obtuvo un porcentaje de éxito en la técnica de marcaje cercano al 80%, en un grupo de embriones del estadio 22 se marcó "*in ovo*" el pliegue ventrículo infundibular, siguiendo la técnica descrita en el apartado anterior. Inmediatamente después, se cubrió la ventana del cascarón con una cinta adhesiva, para evitar la contaminación y desecación del embrión. Los embriones se reincubaron durante 7 días, hasta alcanzar el estadio 36, se extrajeron del huevo con una cucharilla, se lavaron en PBS ó ringer (soluciones 2 y 3), se perfundieron y disecaron como se mencionó en los estudios anatómicos del estadio 36. Los corazones una vez disecados se fotografiaron usando un equipo de microscopía Olympus SZ-STU2 con cámara fotográfica Olympus C-35AD-4.

C) Estudios histológicos.

Para investigar las características del pliegue ventrículo infundibular en el estadio 22 y de la cresta supraventricular en el estadio 36, se seleccionaron 5 embriones de los grupos de marcaje 1 y 2 respectivamente y se fijaron con formaldehído al 3.5%. En ambos casos, primero se disecó el corazón para confirmar que la marca estuviera ubicada en las estructuras objeto de nuestro estudio (el pliegue ventrículo infundibular en el estadio 22 y la cresta supraventricular en el 36). Los corazones una vez fotografiados se deshidrataron en un tren de alcoholes del 30 al 100%, se aclararon con aceite de cedro y se incluyeron en paraplast (apéndice 4). Se realizaron cortes transversales de 5 μm de grosor y se tiñeron con la técnica tricrómica de Masson (apéndice 5). Se observaron y analizaron en un microscopio Olympus y se fotografiaron con los objetivos 4x, 20x y 40x y un ocular de 1.6x.

VII. RESULTADOS

A) Estudios anatómicos con microscopía óptica.

Estadio 22. (Fig. 3). Externamente se observa que el proceso de torsión y plegamiento cardiaco está muy avanzado (Fig.3A), el cono emerge del primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho, el límite entre ambas estructuras corresponde a los surcos conoventriculares derecho e izquierdo, este último es el más pronunciado, el derecho casi no es evidente. El cono se encuentra levemente desplazado hacia la derecha y sobre la superficie del atrio primitivo derecho, sigue una dirección caudocefálica casi recta, continuándose con el tronco. La unión entre el cono y el tronco es el sitio donde el corazón cambia a una dirección ventrodorsal (Fig. 3A).

Al hacer la disección encontramos que el proceso de septación cardiaca está también muy avanzado (Fig. 3B). Se observan los cojines del canal atrioventricular, el ventral (superior) y el dorsal (inferior) y el tabique interventricular primitivo que separa ambas regiones apicales trabeculadas. Todas estas estructuras están muy desarrolladas (Fig. 3B). Respecto al septum primum (tabique interatrial primitivo), solo lo pudimos observar por la transparencia de la pared del atrio primitivo derecho. Al introducir un pequeño trozo de cabello a través del tracto de entrada del ventrículo derecho embrionario, que en este estadio tiene una orientación ventrodorsal y es muy estrecho, pudimos confirmar la comunicación directa entre el atrio primitivo derecho y su ventrículo correspondiente (Fig. 3B). A pesar de que los cojines dorsal y ventral del canal A-V aún no se fusionan, dividen parcialmente el tracto de entrada primitivo en un orificio atrioventricular derecho y otro izquierdo. Encontramos que ya están presentes las crestas del cono, una es dextrodorsal y la otra sinistroventral. También hallamos un pliegue muy amplio, que rodea el tracto de entrada del ventrículo derecho embrionario y tiene una orientación de derecha a izquierda y dos sitios de inserción, uno en la base del cojín ventral y el otro en la pared libre derecha de la región trabeculada del ventrículo derecho (Fig. 3B). Por su ubicación, corresponde al pliegue ventrículo infundibular, pues separa los tractos de entrada y de salida (cono) del ventrículo derecho embrionarios, el primero sigue una dirección ventrodorsal y está en el mismo plano que el pliegue, mientras que el cono está en posición cefálica y ligeramente ventral. El pliegue corresponde a un surco externo que por lo observado al introducir un cabello

en la pared posterior del cono, se encontró que solamente su borde izquierdo, adyacente a la cresta sinistroyventral del cono forma parte de dicha pared (Fig. 3B). A pesar del gran avance en el proceso de septación cardiaca y que el cono está parcialmente dividido en dos, ambos conos aún emergen exclusivamente del ventrículo derecho embrionario.

Estadio 36 (Fig. 4). La vista externa del corazón, muestra que las grandes arterias, aorta y pulmonar y sus tractos de salida se encuentran en posición ventral con respecto a los atrios y cefálica con respecto a los ventrículos (Fig. 4A). Existe un atrio derecho ubicado a la derecha y otro izquierdo ubicado a la izquierda, entre ambos se observa la emergencia de las grandes arterias. También es evidente una muesca que corresponde al surco del tabique interventricular.

Las disecciones del ventrículo derecho (Fig. 4B), permitieron observar las tres regiones anatómicas que lo constituyen: tracto de entrada, tracto de salida y región trabeculada; esta última es más pequeña que la del ventrículo izquierdo. Respecto al tracto de entrada, ya se ha ensanchado. Ya se ha cerrado la comunicación interventricular, en su extremo basal se inserta la cresta supraventricular, dicha cresta se inserta también en la pared libre ventricular y separa los tractos de entrada y de salida de este ventrículo. La cresta supraventricular tiene dos límites el ventricular corresponde a su borde libre y el arterial es el anillo de inserción de las sigmoideas pulmonares (Fig. 4B).

B) Experimentos de marcaje “*in vivo*”.

Serie 1. La técnica quirúrgica para marcar “*in vivo*” el pliegue ventrículo infundibular, se logró después de múltiples ensayos, la adecuada consistió en introducir la marca en el pliegue que se observa entre el cono y el surco atrioventricular derecho, en la zona adyacente al cojín dorsal del canal A-V. Esta región se pudo ubicar por el contraste que produce la sangre al pasar a través del tracto de entrada del ventrículo derecho embrionario, tomando como referencia ambos cojines del canal A-V. Al principio los ensayos no fueron contabilizados, porque debido al desconocimiento de la región y no saber como abordarla, se cometían muchos errores. Una vez que se logró un porcentaje aproximado del 80% de marcas colocadas en la región correcta, se contabilizaron los resultados de un lote de 27 embriones. La marca se encontró en el pliegue ventrículo infundibular en 21 casos (Fig. 5A), en el pliegue ventrículo infundibular y el cojín

ventral (superior) del canal A-V en 2 casos, en la pared posterior del cono en 3 casos y en 1 caso no se encontró la marca (Tabla 1).

**RESULTADOS DE LOS EMBRIONES MARCADOS EN EL PLIEGUE
VENTRÍCULO INFUNDIBULAR EN EL ESTADIO 22 Y SACRIFICADOS
INMEDIATAMENTE**

<u>UBICACIÓN DE LA MARCA</u>	<u># DE EMBRIONES</u>	<u>%</u>
PVI	21	77.7
PVI + CDCA-V	2	7.41
PPC	3	11.11
No se encontró	1	3.70
Total	27	100

Tabla 1. PVI =pliegue ventrículo infundibular; CDCA-V =cojín dorsal del canal;
PPC =pared posterior del cono.

Serie 2. (Fig. 5). Se contabilizaron 14 embriones que se marcaron en el estadio 22 (Fig. 5A) y se reincubaron hasta el 36 (Fig. 5B,C). La marca se colocó en el pliegue ventrículo infundibular, en la región adyacente al cojín dorsal del canal A-V (Fig. 5A). Al final del experimento a los corazones se les retiró la pared libre anterior del infundíbulo, de la región apical trabeculada del ventrículo derecho y de la arteria pulmonar y quedó expuesto el infundíbulo ventricular derecho. En un caso no se halló la marca, en los 13 restantes se encontró una marca lineal ligeramente difusa en la cresta supraventricular muy cercana ó sobre su borde libre, en 4 casos en su región adyacente al tabique interventricular (Fig. 5B) y en 9 casos en la adyacente al tracto de entrada (Fig.5C). Nunca la hallamos inmersa en su tercio medio ó adyacente a las sigmoideas pulmonares (Tabla 2).

**RESULTADOS DE LOS EMBRIONES MARCADOS EN EL
PLIEGUE VENTRÍCULO INFUNDIBULAR EN EL ESTADIO 22 Y
SACRIFICADOS EN EL ESTADIO 36.**

<u>UBICACIÓN DE LA MARCA</u>	<u># DE EMBRIONES</u>	<u>%</u>
CSV adyacente al TE	9	64.28
CSV adyacente al TIV	4	28.57
No se encontró	1	7.14
Total	14	100

Tabla 2. CSV =cresta supraventricular; TE =tracto de entrada; TIV =tabique interventricular.

C) Estudios histológicos.

Estadio 22. (Fig. 6 A-C). En este estadio, el cono es una estructura de pared muscular miocárdica delgada, no trabeculada de dos a tres células de espesor. Contiene dos crestas que histológicamente están constituidas por miocardio, endocardio y un gran espacio ocupado por matriz extracelular, que adquiere una ligera pigmentación azul pálido con la técnica de Masson, en el interior de dicha matriz se encuentran algunas células mesenquimatosas (Fig. 6A,B). Las regiones apicales ventriculares tienen finas trabéculas constituidas de miocardio y cubiertas por endocardio. Existe un fino epitelio epicárdico rodeando el corazón (Fig. 6 B). El pliegue ventrículo infundibular, se pudo ubicar por la presencia de la marca, está constituido por una delgada capa de miocardio de 3 a 4 células de grosor y un fino endocardio, entre ambos hay un espacio estrecho que contiene matriz extracelular, pero en su interior no observamos ningún tipo de células (Fig. 5C). Estos resultados contrastan con lo que encontramos en las crestas del cono y los cojines endocárdicos del canal A-V, en cuyo caso, observamos células mesenquimatosas en el interior de la matriz extracelular.

Estadio 36 (Fig. 5 D-F). Los cortes transversales del corazón maduro muestran que el proceso de diferenciación miocárdica ha avanzado y que los sistemas valvulares atrioventriculares y semilunares aorticas y pulmonares están muy desarrollados histológicamente, aunque los músculos papilares y las cuerdas tendinosas aún no están completamente diferenciados y la valva mural de la válvula atrioventricular derecha está en proceso de miocardialización (Fig. 5D). Se encontró que la marca perdió su continuidad lineal, observándose pequeños puntos oscuros, que corresponden a las partículas de carbono, entre las células miocárdicas de la cresta supraventricular (Fig. 5E,F) que tiene una estructura muscular no trabeculada y está compuesta por células miocárdicas con un núcleo central grande que forman un tejido continuo, no compacto. Dichas células se encuentran aparentemente en diferentes grados de histodiferenciación, inmersas en una matriz, posiblemente rica en colágena, que se tiñe de azul con la técnica de Masson (Fig. 5F). La cresta supraventricular se inserta en el tabique interventricular, también en proceso de histodiferenciación.

VIII. DISCUSIÓN

Se eligió el estadio 22 para iniciar la investigación porque además de que el ventrículo derecho ha adquirido su tracto de entrada, lo cual ocurre en el estadio 17-18 (de la Cruz et al, 1983), el cono está parcialmente dividido por las dos crestas que se han desarrollado en su interior (Fig. 3B), de esta manera se pudo distinguir la otra estructura importante en este estudio, es decir el cono anterior, que es el primordio del tracto de salida del ventrículo derecho (infundíbulo). Además las crestas conales sirvieron como un límite anatómico de dicha estructura. Los resultados de los estudios anatómicos del corazón en el estadio 22 (Fig.3) confirman estas características del órgano y están de acuerdo con lo descrito por otros investigadores que han estudiado el embrión de pollo (de la Cruz MV, 1977; Pexieder, 1981; de la Cruz y cols., 1989; de la Cruz y Markwald, 1998) y el humano (Kramer, 1942; De Vries y Saunders, 1962; Netter y Van Mierop, 1969).

Se halló que el pliegue ventrículo infundibular está localizado en la base del corazón, tiene una dirección de derecha a izquierda y se extiende desde el borde derecho del orificio A-V derecho hasta la base del cojín ventral del canal A-V y separa el cono (en posición cefálica y ligeramente ventral) y el tracto de entrada primitivo del ventrículo derecho (en el mismo plano que el pliegue) (Fig. 3B). Una descripción similar ha sido hecha por otros autores en el embrión humano (Van Mierop y cols. 1962; Netter y Van Mierop, 1969) y en el pollo (de la Cruz y cols. 1983; de la Cruz y Markwald, 1998).

Se observó que dicho pliegue corresponde a un surco externo cuyo borde izquierdo, adyacente a la cresta sinistroventral del cono, forma parte de la pared posterior del cono, sin embargo la región restante está relacionada con el surco atrioventricular derecho y el cojín dorsal del canal A-V (Fig. 3B), por consiguiente el surco conoventricular izquierdo no corresponde al pliegue ventrículo infundibular completo como han sugerido diversos autores (Kramer, 1942; de la Cruz y Pio da Rocha, 1956). Además con base en la ubicación del pliegue ventrículo infundibular, coincidimos con de la Cruz y Markwald (1998) que el nombre debe ser pliegue atrioventrículo infundibular.

La marca que se colocó en el corazón del estadio 22 en el pliegue ventrículo infundibular fue encontrada en el corazón maduro en la cresta supraventricular (Fig. 5), en un sitio cercano a su

borde libre. Estos resultados permiten concluir que el pliegue ventrículo infundibular sí participa en el desarrollo de dicha estructura anatómica (cresta supraventricular) y por consiguiente demuestran que la hipótesis fue correcta. El hecho de que la marca fuera encontrada en el tercio proximal de la cresta supraventricular, ya sea en la región adyacente al tabique interventricular (Fig. 5B) ó en la adyacente al tracto de entrada (Fig. 5C), dependió de dónde se colocó la marca originalmente en el estadio 22, en el pliegue ventrículo infundibular entre ambos cojines ó desplazada hacia la derecha.

Se encontró que el pliegue ventrículo infundibular es una estructura muscular cuyo borde libre interno está formado por endocardio, entre ambos tejidos existe una escasa cantidad de matriz extracelular que no se tiñó con la técnica de Masson y en la que no se observaron células mesenquimatosas (Fig 6 C), estos resultados se encontraron en los embriones previamente marcados y disecados para confirmar la ubicación precisa de la marca y después se procesaron para hacer los estudios histológicos. Los hallazgos de este trabajo contrastan con lo descrito por Markwald y col., 1998 y de la Cruz y Markwald, 1998 que señalan que dicho pliegue está constituido por tejido mesenquimatoso, pero al parecer sus observaciones las realizaron en estadios mayores. En el laboratorio se han estudiado estadios más tempranos (18-21) siguiendo la misma metodología, pero iniciando el marcaje en el estadio 18 y tampoco se observó la presencia de células mesenquimatosas en la región que contenía la marca. A pesar de esta nueva información, se desconoce de donde provienen las células miocárdicas que constituyen la cresta supraventricular, sin embargo es posible que exista un proceso de miocardialización similar al que se presenta en el desarrollo del septum interinfundibular (Van den Hoff y col., 1999).

Es importante señalar que no se había sospechado la participación del pliegue ventrículo infundibular en la cresta supraventricular. En los estudios clásicos sobre la cardiogénesis humana, como es lógico usando las técnicas descriptivas, se ha señalado que la cresta supraventricular se origina de ambas crestas del cono (Goor y cols., 1972, Orts-Llorca y cols., 1982) ó bien exclusivamente de la cresta dextrodorsal del cono (Anderson y cols., 1974, Netter y Van Mierop, 1969). Esta última propuesta ha sido corroborada mediante el marcaje "*in vivo*" en el embrión del pollo (de la Cruz y cols., 1982 y García-Peláez I, 1986), ésta última marcó la cresta dextrodorsal del cono en el estadio 24 y la encontró en el tercio medio y distal de la cresta supraventricular en el estadio 36, no halló marcas en el tercio proximal ni en el borde libre, sitio en el que se encontró en este estudio.

Los resultados del marcaje "*in vivo*" de la cresta dextrodorsal del cono que demuestran su participación en la cresta supraventricular (de la Cruz y cols., 1982 y García-Peláez I 1986), conjuntamente con los de este trabajo del marcaje del pliegue ventrículo infundibular (Fig. 5), nos permiten concluir que la cresta supraventricular tiene un origen dual a partir de la cresta dextrodorsal del cono y el pliegue ventrículo infundibular. Sobre la participación de las crestas del tronco en el desarrollo de la cresta supraventricular (Los, 1978; García-Peláez I, 1986), pensamos que es un hallazgo importante que hay que considerar al analizar la morfogénesis de esta estructura anatómica.

Respecto a las características anatómicas del pliegue ventrículo infundibular y su posible destino prospectivo, se ha mencionado que es una estructura obstructiva que evita el paso de sangre desde el ventrículo izquierdo hacia el cono y tronco (Kramer, 1942). Sin embargo, de Vries y Saunders (1962) mencionan que esta aseveración, hecha en base a observaciones estáticas de embriones humanos no tiene bases sólidas, pues al observar embriones de pollo en vivo, sugirieron la necesidad de hacer estudios secuenciales. Más adelante otros autores estudiando embriones humanos y haciendo reconstrucciones en cera (Goor y cols., 1970), mencionan que el pliegue ventrículo infundibular al que denominan espolón conoventricular, presenta dos regiones, una anterior que dará origen al tracto de salida del ventrículo derecho, mientras que la posterior formará el tracto de salida del ventrículo izquierdo.

Los resultados anatómicos de este trabajo (Fig. 3) y los de marcaje en vivo del pliegue ventrículo infundibular (Fig. 5), conjuntamente con los de marcaje en vivo del cojín ventral del canal A-V (de la Cruz y col., 1982, García-Peláez y col., 1984) que demuestran su participación en el desarrollo del tracto de salida del ventrículo izquierdo, permiten proponer que dicho pliegue en realidad consta de dos regiones, cada una con un destino prospectivo diferente y sufren procesos de histodiferenciación distintos. La región adyacente al surco conoventricular izquierdo, la cresta sinistroventral del cono y el cojín superior ó ventral del canal A-V posiblemente participa en el desarrollo del tracto de salida del ventrículo izquierdo y sufre procesos de apoptosis, mientras que su región cercana al surco atrioventricular derecho y el cojín dorsal del canal A-V (marcada en este trabajo), participa en el desarrollo de la cresta supraventricular y se miocardializa.

IX. CONCLUSIONES

1. El pliegue ventrículo infundibular si participa en el desarrollo de la cresta supraventricular.
2. El pliegue ventrículo infundibular en el estadio 22, consta de dos regiones con destino prospectivo y procesos de histodiferenciación diferentes, la región cercana al surco atrioventricular derecho y el cojín dorsal del canal atrioventricular participa en el desarrollo de la cresta supraventricular y se musculariza.
3. La región del pliegue ventrículo infundibular relacionada con la cresta sinistroventral del cono y el cojín ventral, posiblemente participa en el tracto de salida del ventrículo izquierdo y sufre apoptosis.
4. El surco conoventricular izquierdo no corresponde al pliegue ventrículo infundibular completo.
5. Los resultados anatómicos apoyan la propuesta que el nombre correcto del pliegue ventrículo infundibular debe ser pliegue atrioventriculo infundibular.
6. Los hallazgos de este trabajo conjuntamente con los del marcaje de la cresta dextrodorsal del cono, demuestran que la cresta supraventricular tiene un origen dual a partir de la cresta dextrodorsal del cono y del pliegue ventrículo infundibular.

X. FIGURAS

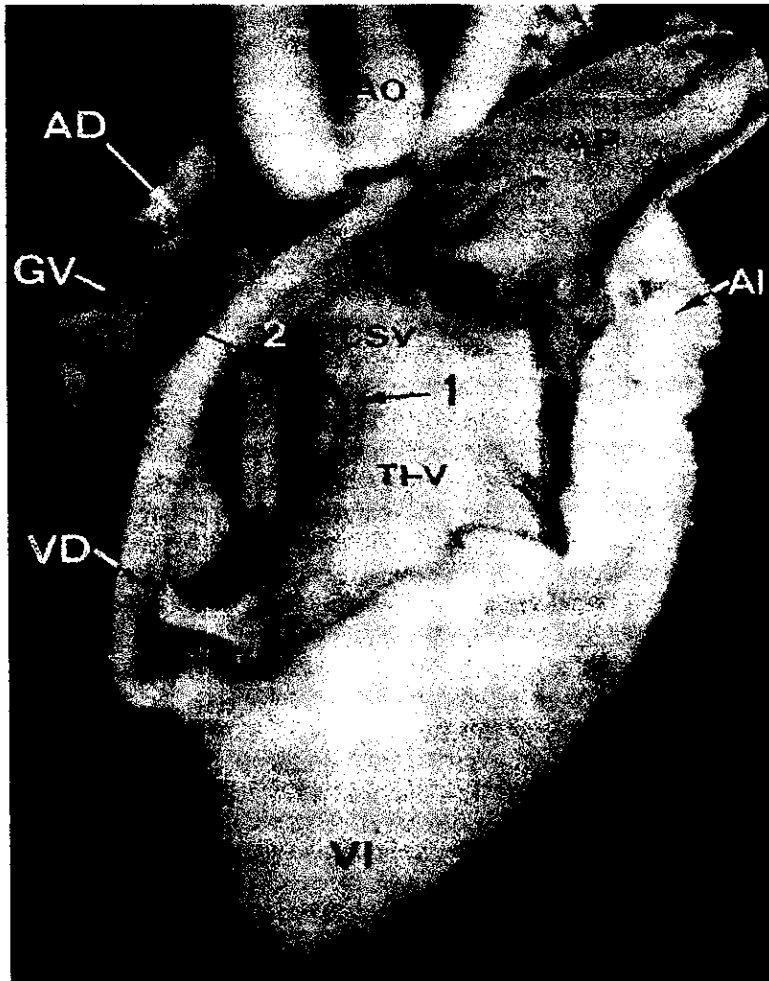


Fig. 1. Corazón de pollo adulto *Gallus domesticus*. Vista interna del ventrículo derecho (VD) y su infundíbulo. Note la presencia de la cresta supraventricular (CSV) la cual tiene dos sitios de inserción, uno entre las dos ramas de la trabécula septomarginalis (1) y el otro en la pared libre ventricular derecha (2), esta cresta separa el tracto de entrada del ventrículo derecho en cuyo interior se encuentra la gran valva del aparato valvular atrioventricular (GV) y el tracto de salida que se continúa con la arteria pulmonar (AP). AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; Ao, aorta; TI-V, tabique interventricular; VI, ventrículo izquierdo.

*Fotografía proporcionada por la Dra. en C. Concepción Sánchez Gómez

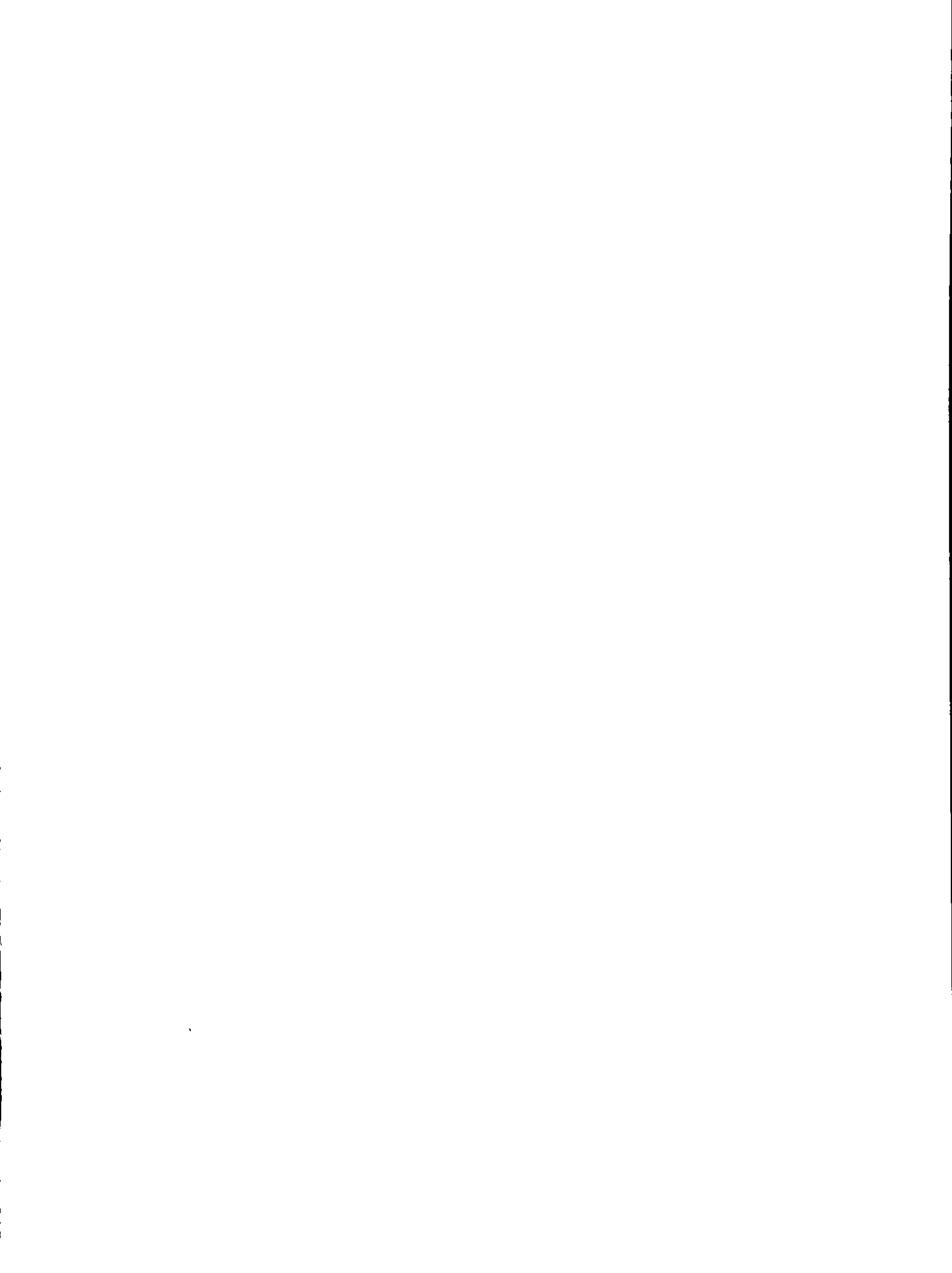


Fig.2. Esquemas que muestran el estadio en que aparecen los segmentos cardiacos primitivos, sus cambios de posición durante el proceso de torsión y plegamiento cardiaco y su expresión anatómica en el corazón maduro. Información lograda usando las técnicas de marcaje en vivo en el embrión de pollo. A. Estadio 9. Corazón en tubo recto, constituido exclusivamente por el primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho (CTVD) en posición cefálica y el primordio de la región trabeculada del ventrículo izquierdo (CTVI) en posición caudal, separados por los surcos interventriculares derecho (1) e izquierdo (1'). B. Estadio 12. Corazón de asa en C. La curvatura mayor (2) es derecha, mientras que la curvatura menor (3) es izquierda. Aparecen el primordio de los tractos de salida (TS), el primordio de los tractos de entrada (TE) y los atrios primitivos derecho (4) e izquierdo (4'). C. Estadio 14. Corazón de asa en S. La curvatura mayor (2) es ventral y la menor es dorsal y muy estrecha. Los atrios primitivos (4, 4') se colocan ligeramente dorsocefálicos y aparece el seno venoso (SV). D.D'. Estadio 16-17. Etapa avanzada de la torsión. Vista sagital derecha e izquierda respectivamente. Los primordios de las regiones apicales trabeculadas se ubican uno a la derecha (CTVD) y otro a la izquierda (CTVI), la curvatura mayor constituye el ápice cardiaco (2) y la curvatura menor es poco evidente. Los atrios primitivos (4,4') son dorsocefálicos. Por consiguiente los segmentos cardiacos primitivos adquieren la relación de vecindad similar al corazón definitivo. También aparece el tronco. E, Vista interna del ventrículo derecho definitivo; E' Vista interna del ventrículo izquierdo definitivo. En ambos se muestran las tres regiones anatómicas que lo forman y su constitución embriológica.

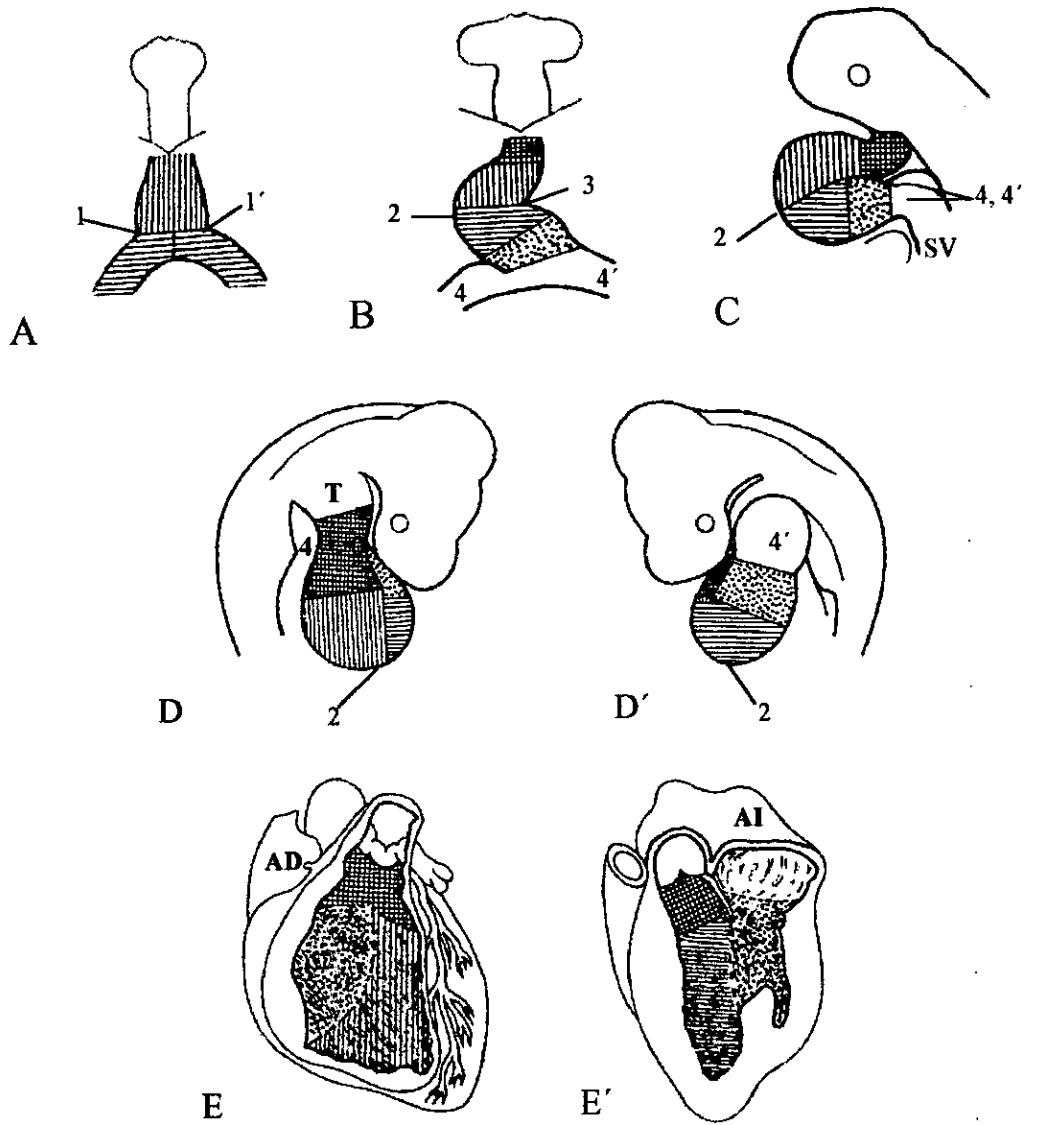






Fig. 2  CTVD Componente trabeculado del ventrículo derecho  CTVI Componente trabeculado del ventrículo izquierdo  TS Tracto de salida  TE Tracto de entrada

*Tomado de: de la Cruz MV and Markwald R. 1998. Living Morphogenesis of the Heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser.

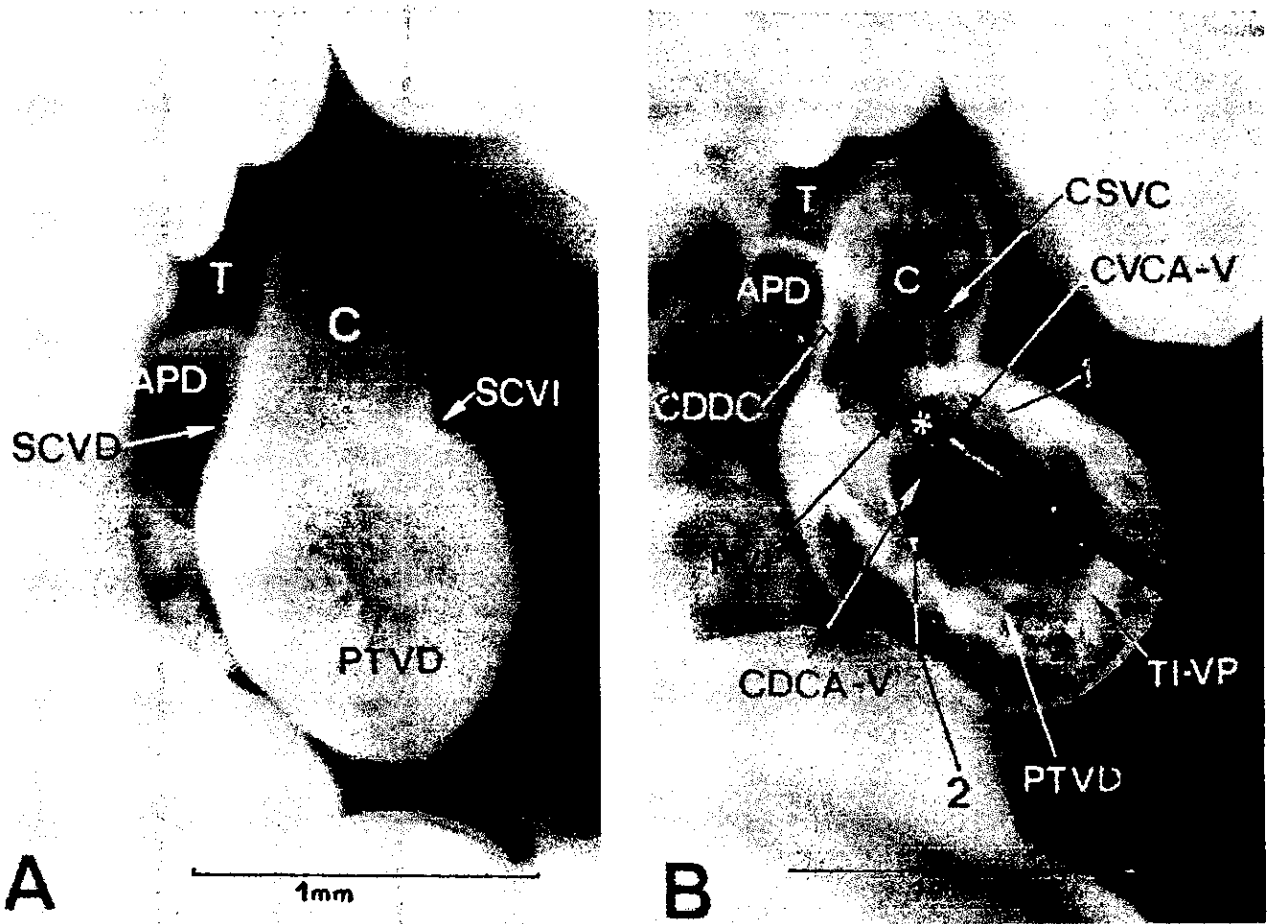


Fig. 3. Fotografías del corazón de embrión de pollo del estadio 22 que muestran los resultados de los estudios anatómicos con microscopía óptica. A. Corazón completo. Observe que el cono (C) emerge del primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho (PTVD). El surco conoventricular derecho (SCVD) casi ha desaparecido, mientras que el surco conoventricular izquierdo (SCVI) es más pronunciado. B. Disección del cono y de la pared libre del primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho, mostrando que el atrio primitivo derecho (APD) ya adquirió su tracto de entrada, señalado por un asterisco y por el que pasa un pequeño trozo de cabello. El pliegue ventrículo infundibular (PVI), es muy amplio y tiene dos sitios de inserción, uno en la base del cojín ventral del canal atrioventricular (1) y el otro en la pared libre derecha de la región trabeculada del ventrículo derecho (2). Note que el pliegue ventrículo infundibular tiene dos regiones, una adyacente a la cresta sinistroventral del cono (CSVC) y al cojín ventral del canal atrioventricular (CVCA-V) y la otra relacionada con el tracto de entrada del ventrículo derecho (*) y con el cojín dorsal del canal atrioventricular (CDCA-V). CDDC, Cresta dextrodorsal del cono; TI-VP, Tabique interventricular primitivo; T, Tronco.

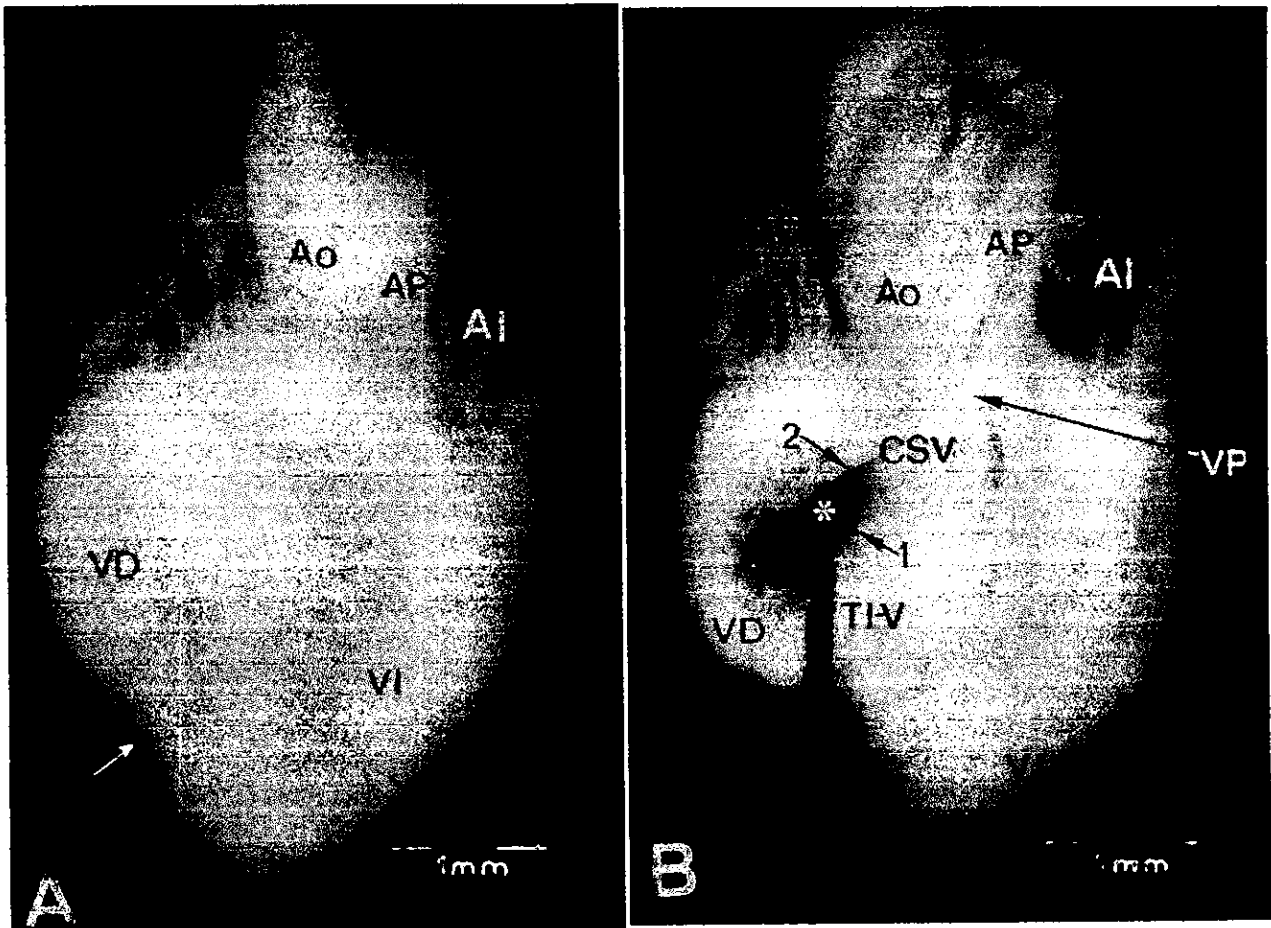


Fig. 4. Fotografías del corazón de embrión de pollo del estadio 36 mostrando los resultados de los estudios anatómicos con microscopía óptica. A. Corazón completo. Note que la arteria pulmonar (AP) emerge del ventrículo derecho (VD), mientras que del ventrículo izquierdo (VI), surge la aorta (Ao), ambos separados por el surco interventricular (flecha). B. Disección del ventrículo derecho. Obsérve que la cresta supra-ventricular (CSV) separa el tracto de entrada por el que pasa un trozo de cabello (*), del tracto de salida del ventrículo derecho y se inserta por uno de sus extremos al tabique interventricular (1) mientras que el otro se inserta a la pared libre ventricular (2). El límite arterial de la cresta supra-ventricular es el anillo de inserción de las sigmoideas pulmonares (VP) y el ventricular es su borde libre. El tabique interventricular (TI-V) ya se ha cerrado. AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo.

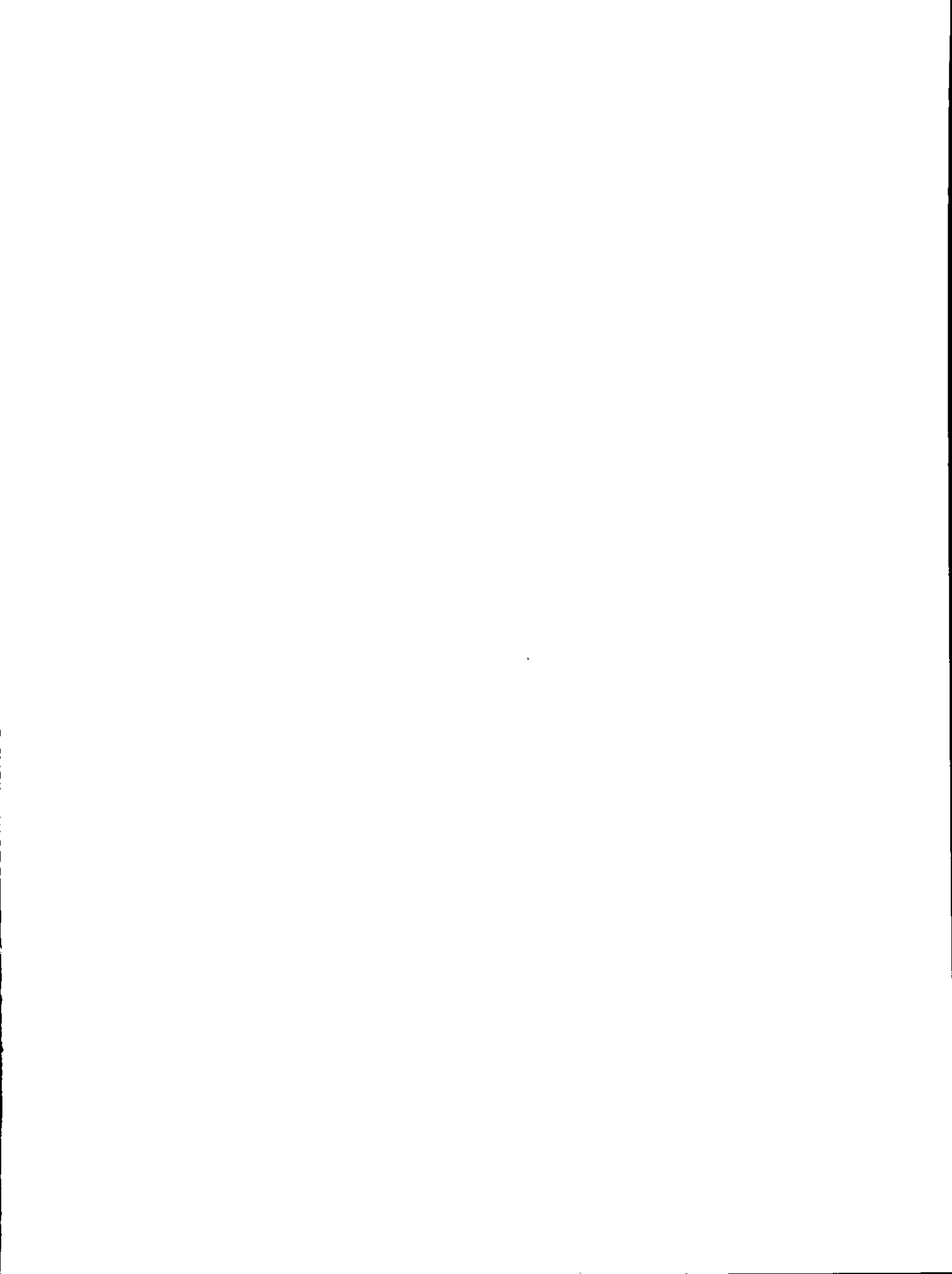


Fig. 5. Fotografías de los resultados del marcaje en vivo participación del pliegue ventrículo infundibular en el desarrollo que demuestran la de la cresta supraventricular. A. Estadio 22. Disección para mostrar la ubicación inicial de la marca la cual se colocó en el pliegue ventrículo infundibular (PVI) cercana al cojín dorsal del canal atrioventricular (CDCA-V). Dicho pliegue separa el tracto de entrada embrionario (*) y el cono (C) (primordio de los tractos de salida ventriculares). B, C. Estadio 36. Disección del ventrículo derecho (VD) que muestra la ubicación final de la marca la cual se encontró en el tercio inferior de la cresta supraventricular (CSV), cercana a su borde libre, en B adyacente al tabique interventricular (TI-V) y en C adyacente al tracto de entrada, obviamente, esto dependió de la posición inicial de la marca. Se introdujo un trozo de cabello en el tracto de entrada del ventrículo derecho (*) tanto en el corazón embrionario como en el corazón maduro. T, Tronco; C, cono; CDDC, cresta dextrodorsal del cono; CSVC, cresta sinistroventral del cono; CVCA-V, cojín ventral del canal atrioventricular; APD, atrio primitivo derecho; 1 y 2, sitios de inserción del pliegue ventrículo infundibular; FTDV, primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho; Ao, Aorta; AP, arteria pulmonar; AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; VI, ventrículo izquierdo

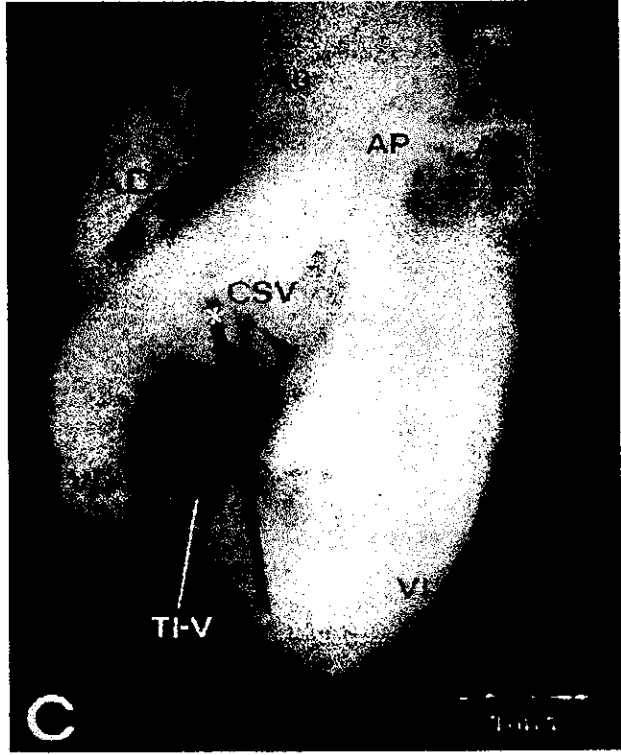
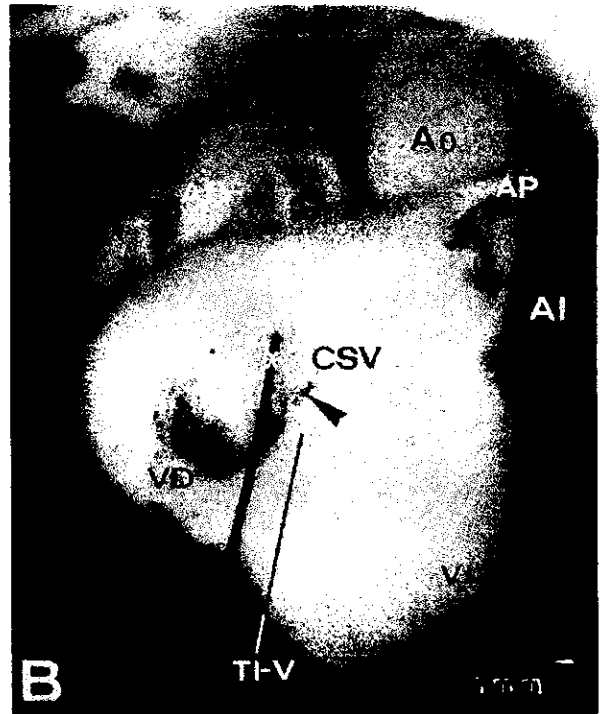
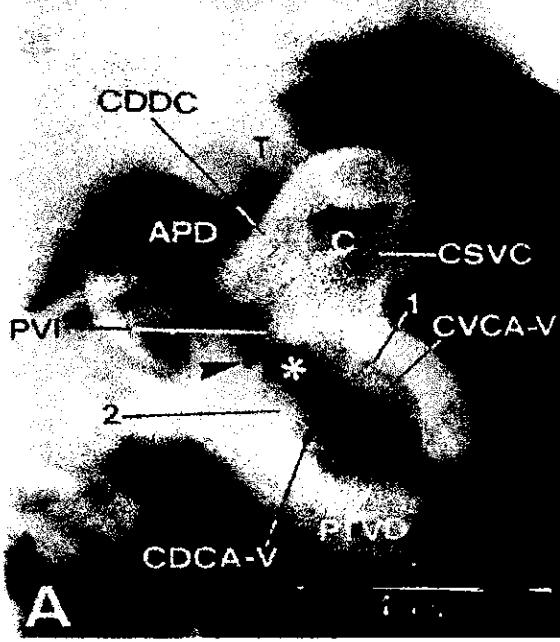
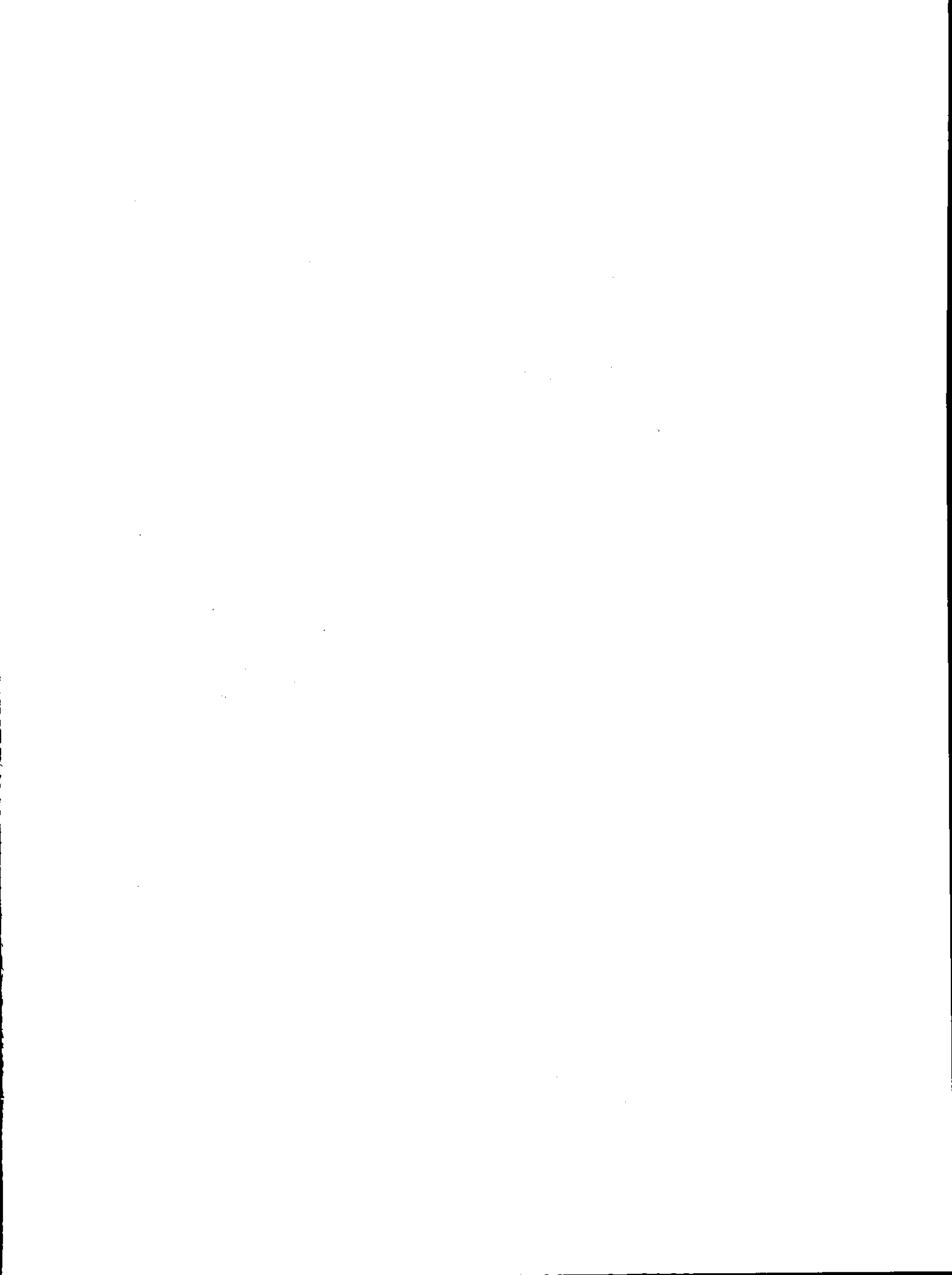
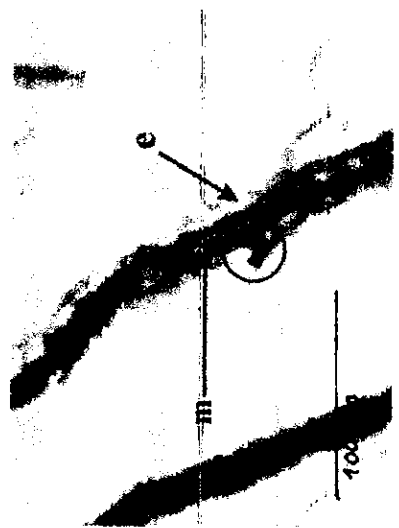


Fig.5

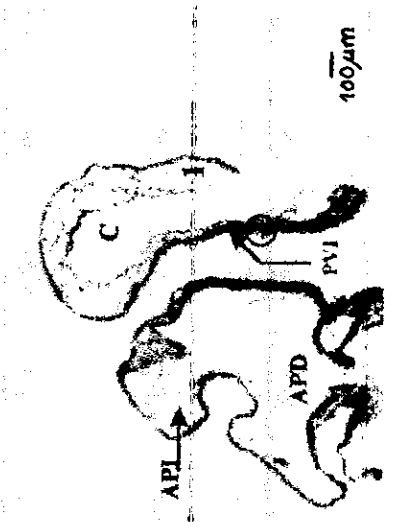




C



B



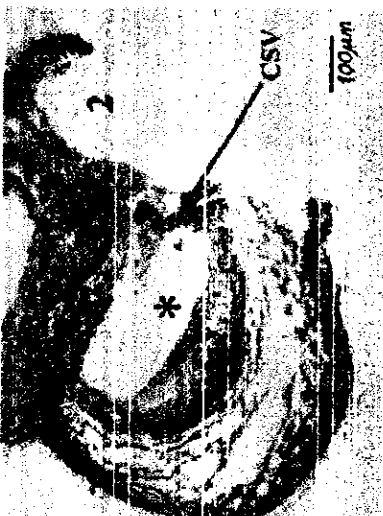
A



F



E



D

Fig. 6

Fig. 6. Fotografías de los resultados de los estudios histológicos del pliegue ventrículo infundibular (estadio 22) y de la cresta supraventricular (estadio 36). En ambos casos la región objeto de estudio se localizó por la presencia de la marca. A, B, C. Corte oblicuo de un corazón del estadio 22 previamente marcado en el pliegue ventrículo infundibular, disecado para confirmar la ubicación correcta de la marca y teñido con la técnica de Masson. A. Observe que el cono (C) tiene una pared miocárdica no trabeculada, entre el miocardio y el endocardio existe un espacio que contienen múltiples células inmersas en una matriz extracelular, con un ligero tono azulado que corresponden a las crestas conales, la sinistroventral (1) es la más evidente. Encerrada en un círculo se encuentra la marca en el pliegue ventrículo infundibular (PVI). B, C. Acercamientos del pliegue ventrículo infundibular constituido por una capa de miocardio (m) de 2 a 3 células de grosor, note la marca encerrada en un círculo y el espacio entre el miocardio (m) y el endocardio (e) muy estrecho. D, E, F. Corte transversal a nivel de los pisos valvulares atrioventriculares, de un corazón maduro teñido con la técnica de Masson, el cual fue previamente marcado en el pliegue ventrículo infundibular en el estadio 22, reincubado hasta el estadio 36 y disecado para confirmar la ubicación de la marca en la cresta supraventricular. D. Note la relación de vecindad de la cresta supraventricular (CSV) con el orificio atrioventricular derecho (*) y el tracto de salida del mismo ventrículo (2) y su inserción con el tabique interventricular (3). E, F. Acercamientos de la cresta supraventricular en los que se observan las marcas dispersas entre el miocardio, rodeadas por un círculo. Note que las células miocárdicas aún no forman un tejido compacto y aparentemente tienen diferentes grados de diferenciación.

XI. APÉNDICES

TÉCNICAS.

...a en el cascarón de huevo
...ieran en el estadio 22 y se
...al embrión. Se cortó la
...nucleación y se extrajo el
...mero 5. El embrión se lavó
...al anillo para facilitar su
...a formol en PBS al 3.5% a
...libre 25, unida a una pipeta
...venoso, que se preparó al
...nto quirúrgico e inyección

...aplicándolo con algodón.
...e la cámara de aire usando
...microscopio para seleccionar
...huevo fueron colocados
...o, con algodón en su base
...vapores de fenol y/o luz
...brir una ventana de 1 cm²
...s de Ringer (Soluciones 3)
...sin dientes, se retiraron las
...vitelina y pericárdica. Se
...os bajo el microscopio

estereoscópico y usando la clave de Hamburger y Hamilton (1951). Los embriones que habían alcanzado el estadio 22 y eran normales, se separaron para marcarlos inmediatamente, los más pequeños se reincubaron hasta alcanzar la edad requerida. Una vez marcados los embriones, se colocó cinta adherente en la ventana del cascarón y se reincubaron en una incubadora Narco #302 con temperatura y humedad controladas, a 37°C con 86 a 87% de humedad, posteriormente se sacrificaron al alcanzar el estadio 36.

3.- Técnica de preparación de la marca.

Dos varillas de vidrio de 4 mm de diámetro fueron expuestas a la flama de un mechero, al calentarse al rojo vivo, se estiraron para obtener filamentos de vidrio de aproximadamente 10 μ m de diámetro. En un baño María se mezcló 1 ml de gelatina para microbiología estéril al 3 % con 1/2 cucharadita de carbón activo y 17 gotas de tinta china comercial, se agitó por un minuto y sin dejar de calentar. Con esta mezcla se recubrieron los filamentos, usando un asa de vidrio. Cuando los filamentos secaron, se cortaron en trozos de 5 cm de largo y se guardaron en el refrigerador en una caja de Petri estéril.

4.- Técnica de inclusión en paraplast

Los corazones una vez fotografiados se deshidrataron en un tren de alcoholes 30%, 50%, 70%, 90%, 96% y absoluto durante 10 min. cada uno en el caso del estadio 22 y 30 min. para el estadio 36. Los especímenes se aclararon con aceite de cedro dando un cambio de una mezcla de alcohol absoluto y aceite de cedro (1:1), durante 20 min. en el caso del corazón del estadio 22 y 30 min. para el del estadio 36. El baño de aceite de cedro puro fue de 20 min. para el estadio 22 y 30 min. para el estadio 36. Respecto a la mezcla de aceite de cedro + cloroformo (1:1) se mantuvo por 30 min. en ambos estadios. El siguiente cambio se hizo en una mezcla cloroformo + parafina (1:1) durante 20 y 30 min. respectivamente. Este procedimiento y los que siguen se hicieron dentro de un horno para histología Ríos Rocha ECM a 58-60° C. La preinclusión consistió en colocar los especímenes en paraplast puro toda la noche (ambos estadios) y dos cambios de 1hr. para el estadio 22 y de 2 hrs. para el estadio 36. En este último se usó una bomba de vacío para eliminar el aire que hubiera quedado atrapado en las cámaras cardíacas. Los corazones se colocaron en

moldes plásticos para inclusión en parafina orientándolos para obtener cortes transversales. Esto se logró colocando los corazones sobre un papel con una cruz y orientándolos de tal manera que los atrios quedaran paralelos a uno de los ejes. Se hicieron cortes seriados de 5 μm de espesor en un micrótomo Leitz, que se estiraron colocándolos en un baño de flotación con gelatina a 50° C. Una vez estirado el tejido los cortes se montaron en portaobjetos marcados con su número de registro.

5.- Técnica de Masson.

- a) Los cortes se desparafinaron y rehidrataron. Se colocaron un máximo de 16 hrs. en un horno para histología Ríos Rocha ECML a 60°C. Se embebieron en dos cambios de xilol de 10 min. c/u y se rehidrataron en un tren de alcoholes al 100%, 96%, 90%, 70% y 30% durante 5 min. hasta llegar a agua destilada.
- b) Posteriormente los cortes se colocaron en Bouin 1 hr. a 60° C y se lavaron con agua de la llave y agua destilada.
- c) Se cambiaron a un baño de hematoxilina en donde permanecieron durante 10 min. hasta que se tiñeron los núcleos.
- d) El siguiente paso consistió en colocarlos en una solución de hidróxido de amonio al 1% por un tiempo de 5 min.
- e) Después de que se lavaron con agua de la llave y agua destilada, se embebieron en escarlata de Biebrich por 8 min.
- f) En una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico permanecieron por 8 min.
- g) En azul de anilina se mantuvieron por 8 min.
- h) Para virar el color de la anilina se usó ácido acético al 1% por 5 min.
- i) Para deshidratar el tejido nuevamente se hicieron pasar por un tren de alcoholes graduales de 30%, 50%, 70%, 90% rápidamente y 96% y 100% por 3min. Finalmente se pasaron en 3 baños de xilol por 10 min c/u y se montaron con resina entellan (alcilacrilato con xilol).

Soluciones para Masson.

A) Bouin.

Ácido pícrico saturado	(O ₂ N) ₃ C ₆ H ₂ OH	1500 ml
------------------------	--	---------

Solución b

Ácido fosfotúngstico	$P_2O_5 \cdot 24WO_3 \cdot x H_2O$	10 gr.
Agua bidestilada	H_2O	99 ml.

Solución de trabajo: 1 parte de la solución a +1 parte de la solución b + 2 partes de H_2O dd.

F) Ácido acético glacial al 1 %

Ácido acético glacial	$C_2H_4O_2$	1 ml.
Agua bidestilada	H_2O	99 ml.

G) Hidróxido de amonio

Hidróxido de amonio al 1%	NH_4OH	1 ml.
Agua de la llave		99 ml.

SOLUCIONES.

1.- Formol 3. 5% en PBS 1x pH 7.2

Formaldehído al 37 %	CH_2O	9.45 ml.
PBS 1x pH 7.2		aforar a 100 ml.

2.- Solución amortiguadora de fosfatos PBS 1x pH 7.2

Fosfato de sodio dibásico	$Na_2 HPO_4$	8.5176 gr.
Fosfato de sodio mono básico	$Na H_2 PO_4$	3.4834 gr.
Cloruro de sodio	$Na Cl$	11.9462gr.
Agua bidestilada	H_2O	aforar a 1 lt.

3.- Solución Ringer

Cloruro de sodio	$Na Cl$	7.00 gr.
Cloruro de potasio	$K Cl$	0.42 gr.
Cloruro de calcio	$Ca Cl_2$	0.24 gr.
Agua bidestilada	H_2O	aforar a 1 lt.

Formaldehído	CH ₂ O	500 ml
Ácido acético glacial 100%	C ₂ H ₄ O ₂	100 ml

B) Escarlata de Briebrich, solución patrón:

Solución a.

Escarlata de Briebrichal 1%	C ₂₂ H ₁₄ N ₄ O ₇ S ₂ Na ₂	900 ml.
Fucsina ácida al 1%	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₉ S ₃ Na ₂	100 ml.
Ácido acético glacial	C ₂ H ₄ O ₂	10 ml.

Solución de trabajo: 1 parte de la solución a + 3 partes de H₂O.

C) Azul de anilina:

Azul de anilina	C ₃₂ H ₂ N ₃ Na ₂ O ₉ S ₃	25gr.
Ácido acético glacial	C ₂ H ₄ O ₂	20 ml.
Agua bidestilada	H ₂ O	995 ml.

D) Hematoxilina de Weigert:

Solución a.

Hematoxilina	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	10 gr.
Alcohol al 96%	C ₂ H ₅ OH	990 ml.

Solución b.

Cloruro férrico acuoso 29%	Fe Cl ₃ .6H ₂ O	4 ml.
Agua bidestilada	H ₂ O	95 ml.

Solución de trabajo: 1 parte de la solución a +1 parte de la solución b.

E) Fosfotúngstico - fosfomolibdico.

Solución a

Ácido fosfomolibdico	12Mo O ₃ .H ₃ PO ₄ .xH ₂ O	10 gr.
Agua bidestilada	H ₂ O	99 ml.

XII.- BIBLIOGRAFÍA.

Anderson RH, Wilkson JL, Arnold RR, Lubkiewicz K. 1974. Morphogenesis of bulboventricular malformations. I: Consideration of embryogenesis in the normal heart. *Br Heart J.* 36: 242-255.

Anderson RH, Becker AE, Van Mierop LHS. 1977. What should the "crista" ? *Br Heart J.* 39:856-9.

Anselmi G, de la Cruz MV. 1998. Embryological development of the atria. Septation and visceratrial situs. In : de la Cruz MV and Markwald R., editors. *Living morphogenesis of the heart.* Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 169-186..

Arguello C, de la Cruz MV, Sánchez C. 1978. Ultrastructural and experimental evidence of myocardial cell differentiation into connective tissue cells in embryonic chick heart. *J Mol Cell Cardiol.* 10:307-15.

Balinsky, BI. 1978. *Introducción a la embriología.* Ed. Omega. Barcelona. pp 644.

Castro-Quezada A, Nadal-Ginard B, de la Cruz MV. 1972. Experimental study of the formation of the bulboventricular loop in the chick. *J. Embryol Exp Morphol.* 27:623-37.

Cayré R, Valencia- Mayoral P, Coffe-Ramírez V, Sánchez-Gómez C, Angelini P, de la Cruz MV. 1993. The right atrioventricular valvular apparatus in the chick heart. *Acta Anat.* 148:27-33.

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

De Haan RL.1963. Organization of the cardiogenic plate in the early chick embryo. *Acta Embriol. Morphol Exp.* 6:26-38.

de la Cruz MV, Pio Rocha. 1956. An ontgenetic theory for the explanation of congenital malformations involving the truncus and conus. *American Heart Journal.*5 (5): 782-805.

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

de la Cruz MV, Sánchez-Gómez, Arteaga M, Arguello C. 1977. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J Anat.* 123: 661-86.

de la Cruz MV, Quero- Jiménez M, Arteaga-Martínez M y Cayré R. 1982. Morhpogénésis du septum interventriculare. *Coeur.* (13) 4:443-448.

de la Cruz MV, Jiménez-Ribotta M, Saravilli O, Cayré R. 1983. The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to the development of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. *Am J Anat.* 166: 63-72.

de la Cruz MV, Sánchez-Gómez, Robledo Tovi. JL .1987. Experimental study of the development of the ventricular inlets in the chick embryo. *Embryology.* 1:25-37.

de la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Palomino MA. 1989. The primitive cardiac regions in experimental study in the chick embryo. *J. Anat.* 165:121-31.

de la Cruz MV, Cayré R, Arista-Salado O, Sadowinski S, Serrano A. 1992. The infundibular interrelationships and the ventriculoarterial connection in doublet outlet right ventricle. Clinical and surgical Implications. *Int J Cardiol.* 35:153-64.

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

247: 510-20.

de la Cruz MV. 1998a. Primitive cardiac segment, normal heart and congenital heart diseases. In: de la Cruz MV and Markwald R, editors. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 219-228.

de la Cruz MV. 1998b. Embryological development of the outlet of each ventricle. In: de la Cruz MV and Markwald R., editors. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 157-168.

de la Cruz MV. 1998c. Torsion and looping of the cardiac tube and primitive cardiac segments. Anatomical manifestations. In : de la Cruz MV and Markwald R., editors. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 99-111.

de la Cruz, MV, Markwald RR. 1998. Embryological development of the ventricular inlets. Septation and atrioventricular valve apparatus. In : de la Cruz MV and Markwald R., editors. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 131-155.

de la Cruz MV, Moreno Rodríguez R. 1998. Embryological development of the apical trabeculated region of both ventricles. The contribution of the primitive interventricular septum in the ventricular septation. In: de la Cruz MV and Markwald R., editors. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 121-130.

de la Cruz MV, Sánchez- Gómez C. 1998. Straight tube heart. Primitive cardiac cavities vs. primitive cardiac segments. In: de la Cruz MV and Markwald R, editors. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 85-98.

de la Cruz MV, Markwald RR, Rumeno L, Sánchez- Gómez C, Sadowinski S, Galicia T, Gómez F. 2001. Living morphogenesis of the ventricles and their regional congenital pathology. *Cardiol Young*. 11(4)

De Vries PA, Saunders JB. 1962. Development of the ventricles and spiral outflow tract in the human heart. A contribution of the development of the human heart from age group IX to age group XV. *Carnegie Contrib Embryol.* 256:89-114.

García-Peláez I, Díaz Góngora G, Arteaga M. 1984. Contribution of the superior atrioventricular cushion to the left ventricular infundibulum. Experimental study of the chick embryo. *Acta Anat.* 118:224-30.

García- Peláez I. 1986. Aportaciones experimentales sobre el desarrollo morfológico del truncus arteriosus en el embrión de pollo. Tesis. Universidad Autonoma de Madrid.

Goor DA, Edwards JE, Lillehei CW. 1970. The development of the interventricular septum of the human heart ; correlative morphogenetic study. *Chest.* 58: 453-467.

Goor DA, Dizeche R, Lillehei CW. 1972. The conotruncus. I. Its normal inversion and conus absorption. *Circulation.* 46:375-384.

Goor DA, Lillehei CW. 1975. Congenital formations of the heart: The anatomy of the heart. In *embryology, anatomy and operative considerations.* New York. Grune and Stratton. pp 1-37.

Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stage in the development of the chick Embryo *J Morphol.* 88:49-92.

Kramer TC. 1942. 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.* 71:343-70.

Los JA. 1978. Cardiac septation and development of the aorta, pulmonary trunk, and pulmonary veins: previous work in the light of recent observations. *En morphogenesis and malformation of the cardiovascular system.* Birth Defects. 14: 109-138.

Linask KK, Lash JW. 1993. Early heart development: dynamics of endocardial cell sorting suggests a common origin whit Cardiomyocytes. *Dev Dyn.* 195:62-9.

Manasek FJ. 1969. Embryonic development of the heart. II. Formation of epicardium. *J Embryol Morphol.* 87:281-89.

Manner J. 1993. Experimental study on the formation of epicardium in the chick embryos. *Anat Embryol.* 187: 281-89.

Manner J. 2000. Cardiac looping in the chick embryo. A morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of looping process. *Anat Rec:* 259-62

Markwald RR, Trusk T, Moreno Rodríguez R. 1998. Formation and septation of the tubular heart : integrating the dynamics of morphology with emergent molecular concepts. In : de la Cruz MV and Markwald R, editors. *Living morphogenesis of the heart.* Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 43-84.

Netter FH, Van Mierop LHS. 1969. Embryology. In Netter FH editor. *CIBA collection of medical illustrations.* Ardsley, New Jersey. CIBA Pharmaceutical Co. Vol.5: 119-25.

Orts-Llorca F, Puerta J, Sobrado J. 1982. The formation, septation and fate of the truncus arteriosus in man. *J Anat.* 134: 41-56.

Patten BM. 1922. The formation of cardiac loop in the chick. *Am J Anat.* 30:373-97.

Patten BM. 1948. *The early embryology of the chick.* 3rd ed. Philadelphia: The Blakiston Co. 184-92.

Patten BM. 1962. *Embriología humana.* El Ateneo. Buenos Aires. pp.660-664.

Pexieder T, and Christen Y. 1981. Quantitative analysis of shape development in the chick embryo heart. *Perspectives in cardiovascular research, Vol. 5, Mechanisms of the cardiac*

morphogenesis and teratogenesis. Raven Press. New York. pp 49-66.

Rawles ME. 1943. The heart forming areas of the early chick blastoderm. *Physiological Zoology*. 16:22-42.

Rawles ME. 1936. A study in the localization of organ-forming in the chick blastoderm of head process stage. *Journal experimental Zoology*. 72:271-315.

Rosenquist, GC, De Haan RL. 1966. Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study. *Carnegie Contributions to Embryol*. 263:111-21.

Spratt, NT Jr. 1946. Formation of the primitive streak in the explanted blastoderm marked with carbon particle. *Journal Experimental Zoology*. 103:259-304.

Stalesberg H, De Haan RL. 1969. The areas precardial and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev. Biol*. 19:128-59.

Steding G, Seidl W. 1980. Contribution to the development of the heart : normal development. *Thorac Cardiovasc Surgeon*. 28:128-59.

Thompson RP, Fitzharris TP. 1979b. Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: The formation and migration of mesenchymal tissue. *Am J Anat*. 154:545-556.

van den Hoff MJB, Moorman AFM, Ruijter JM Lamers WH, Bennington RW, Markwald RR, Wessels A. 1999. Myocardialization of the cardiac outflow tract. *Developmental Biology*. 212:

Van Mierop LHS, Alley RD, Kausel HW, Stranahan A. 1962. The anatomy and embryology of endocardial cushions defects. *J Thorac Cardiovasc Surg* 43: 71-83.

Wenink ACG, Gittenberg- de Groot AC. 1985. The role of atrioventricular endocardial cushions in the septation of the heart. *Int J Cardiol*. 8: 25-44.