



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO FCF1, NRG Y SUS  
RECEPTORES EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR  
DURANTE LA MORFOGÉNESIS DE LOS TERCIOS MEDIO Y APICAL DEL  
TABIQUE INTERVENTRICULAR EN EMBRIÓN DE POLLO”**

## **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA**

**ALEJANDRA CONTRERAS RAMOS**

**Cotutoras:**

**Dra. Concepción Sánchez Gómez**

**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**

**Asesor:**

**Dr. Humberto González Márquez**

**México D.F. Junio 2008**

*Miembros del comité Tutoral de la tesis “Participación de los factores de crecimiento FCF1, NRG y sus receptores en la regulación de la proliferación celular durante la morfogénesis de los tercios medio y apical del Tabique Interventricular en embrión de pollo” realizada por Alejandra Contreras Ramos.*

***Dra. Concepción Sánchez Gómez***

Investigador en Ciencia Médicas “C”

Lab de investigación en Biol. del Desarrollo y Teratogénesis Experimental

Hospital Infantil de México Federico Gómez

csgomez\_2000@yahoo.com

***Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana***

Profesor Titular “C” Tiempo Completo.

Lab. Biología Celular

Depto. Ciencias de la Salud. U.A.M.- Iztapalapa.

reyna@xanum.uam.mx

***Dr. Humberto González Márquez***

Profesor Titular “C” Tiempo Completo

Lab. Expresión Génica

Depto. Ciencias de la Salud. U.A.M. - Iztapalapa.

hgm@xanum.uam.mx

*Miembros del Jurado de examen, designados por el Posgrado en Biología Experimental para la tesis “Participación de los factores de crecimiento FCF1, NRG y sus receptores en la regulación de la proliferación celular durante la morfogénesis de los tercios medio y apical del Tabique Interventricular en embrión de pollo” realizada por Alejandra Contreras Ramos, el día 20 de Junio del 2008 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa”*

- **Dr. Humberto González Márquez**

Profesor Titular “C” Tiempo Completo  
Lab. Expresión Génica  
Depto. Ciencias de la Salud. U.A.M. - Iztapalapa.  
hgm@xanum.uam.mx

- **Dr. Sebastián Manuel Arteaga Martínez**

Profesor Titular “B” Tiempo Completo  
Depto. Anatomía, Facultad de Medicina UNAM,  
manuelarteagamartinez@yahoo.com

- **Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez**

Investigador Titular “A”.  
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.  
Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS  
rmcoralv@prodigy.net.mx, rmcoralv@gmail.com

- **Dr. José Alfonso Boyso Montes de Oca**

Auxiliar de Investigación “I”  
Lab. Neurontogenia, Depto Fisiología, Biofísica y Neurociencias.  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.  
aboyzo@fisio.cinvestav.mx; alfboyzo@gmail.com

## “AGRADECIMIENTOS AL CONACYT Y OTROS APOYOS”

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez, y el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la UAM-I.

El Doctorado en Biología Experimental UAM-I:309-0 de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, se encuentra actualmente en el Padrón Nacional de Posgrados (PNP) SEP/CONACYT clave: C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo fue realizado gracias a los apoyos brindados por **CONACYT 129476** y por el Hospital Infantil de México Federico Gómez (**proyectos HIM/2004/046 y HIM/2007/006 SSA.733**)

*Pertenezco a una raza desarrollada más allá de los púlpitos.  
Soy una de ellas porque mi corazón mancha al tomarlo entre las manos,  
Porque coincide en tamaño con el hueco de un nicho;  
Fresco y dulce como el de un animal,  
Chupad mi corazón para que, al morir,  
Sepan que hemos estado juntos.*

*Soy una de ellas porque mi corazón será abono.  
Porque mi sangre, que es la suya,  
Sube y baja por mi cadáver como por escaleras mecánicas;  
porque el fundamento de mi carácter,  
Al descomponerse, se incorpora a una especie salvaje  
Que ladra y que hiere y que te lleva a su terreno,  
Que ignora las afrentas, que jamás se extinguirá.*

*Elena Medel*

## DEDICO ESTE TRABAJO

*A la memoria de mi Madre. Por su ejemplo de lucha, trabajo y superación, por creer en mí y sobre todo por darme la vida.*

*María Victoria Ramos Rodríguez*

*A mi Familia. Por dejarme volar para alcanzar mis sueños.*

*A la Familia Gallegos Zarza. Por permitirme entrar en sus corazones, por considerarme un miembro más de su familia, por su gran apoyo.*

## *Agradezco*

*A mis asesores Dra Concepción Sánchez Gómez, Dra Reyna Fierro Pastrana y Dr. Humberto González Márquez. Por su paciencia, tiempo, enseñanza y dedicación a mí persona, por creer en mí e iniciarme en la investigación.*

*Al comité revisor y evaluador. Dr. Humberto González Márquez, Dr. Sebastián Manuel Arteaga Martínez, Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, Dr. José Alfonso Boyzo Montes de Oca. Por sus comentarios, sugerencias, apoyo y tiempo en la revisión de este trabajo.*

*A tu amigo. Ser incondicional, de múltiples formas que a lo largo de vida me ha permitido compartir los buenos y malos momentos, tu que me brindas una mano, tu que valoras lo que soy, tu que conoces cada etapa de mi vida. Gracias*

*Irma Hernández Bautista  
Lucía Lima García  
Claudia Gallozo  
Lupita Cabrera  
Carmen Ahumada  
Inés Ruíz  
Elidia Loredó  
Luis Barbo  
José Arellano  
Emma Mendoza  
Georgina Leyva  
Georgina Contreras  
Marí Eugenia Sepúlveda  
Grises Gallegos  
Angélica Silva  
Francisco Acosta  
Alma R Luna  
Alma Camacho  
Sandra Orozco  
Mónica Reinoso  
Mónica Moreno  
Miguel A. Palomino  
Miguel A Martínez  
Carlos Vera  
Rocío Medina  
Mara Torres  
Zacnitéc Flores  
José R. Contreras  
Dalia A. Contreras  
Dulce B. Contreras  
Enrique Gallegos  
Paulina Gallegos  
Silvia Espejel  
José Alfonso Boyzo  
Alicia y Domingo  
Y muchos Más*

*A tú. Por aparecer en mi vida, por tu sencillez, por tu cariño y amor, gracias Bladimir Roque*

*El utópico es siempre un buscador,  
no de victorias pírricas de cuerpos  
ni de mercados donde sirvan carne,  
sino de anhelos claros.  
Ser utópico implica sed de espinas,  
lirismo a manos llenas,  
quienes se rigen  
por afán propio entienden qué es ser un soñador,  
la niebla de sí mismo; el último reducto  
de un tiempo donde el corazón no vale  
y sólo se permite  
el eco en las palabras de estoicismo  
y la tristeza como imperativo.  
El utópico busca la deriva, vagando entre los cuerpos  
el mar donde perderse cuerpo adentro.*

*Vito Domínguez Calvo*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
I. Antecedentes Anatómicos .....	1
II. Antecedentes Patológicos.....	3
III. Antecedentes Embriológicos.....	5
V. Factores de crecimiento .....	10
V.1 Factor de Crecimiento Fibroblástico .....	10
V.1. Neuregulinas.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	22
JUSTIFICACIÓN .....	23
HIPÓTESIS .....	24
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
MATERIAL Y MÉTODO .....	26
I.1 Material Biológico.....	26
II. METODOS.....	26
II.1. INCLUSIÓN EN PARAPLASTO.....	26
II.2. PATRÓN DE MIOCITOS CÍCLICOS.....	27
II.2A. Citometría de flujo para la determinación de la actividad proliferativa.....	27
II.3. PATRÓN DE MIOCITOS APOPTÓTICOS.....	30
II.3a. TUNEL <i>in situ</i> .....	31
II.3b. Marcaje con Lisotracker.....	31
II.3c. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	31
II.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES .....	31
II.4A. Análisis del patrón de distribución espacio temporal de FGF1 y RFGF1.....	31
II.4B. Patrón de distribución espacio temporal de NRG1 y ErbB2/4.....	32
II.4B4. RT-PCR de NRG.....	34
II.4B.5. Hibridación in situ.....	36

A. DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE MIOCITOS CÍCLICOS DURANTE LA SEPTACIÓN CARDIACA.....	38
B. DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LOS MIOCITOS APOPTÓTICOS.....	49
C. DISTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES .....	56
Análisis espacio-temporal de FGF1 y RFGF1.....	56
DISCUSIÓN.....	72
Formación del TI-V .....	72
Significado de la proliferación miocárdica en el desarrollo de los tercios medio y apical del TI-V. ....	73
Implicaciones de la apoptosis en el desarrollo de la región muscular del TI-V .....	77
Patrón de expresión del factor de crecimiento fibroblástico 1 (FCF1).....	81
Patrón de expresión de la Neuregulina (NRG1).....	83
CONCLUSIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89
APÉNDICES.....	104
I. TÉCNICAS.....	104
II. SOLUCIONES .....	107

**PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO FCF1, NRG Y SUS RECEPTORES EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DURANTE LA MORFOGÉNESIS DE LOS TERCIOS MEDIO Y APICAL DEL TIV EN EMBRIÓN DE POLLO.**

**RESUMEN**

El tabique interventricular (TI-V) consta de tres tercios. El basal (componente fibroso) derivado de los cojines del canal atrioventricular y crestas del cono. Los tercios medio y apical (componente muscular) se originan por la fusión progresiva de las trabéculas ventriculares y al igual que las cavidades ventriculares durante su desarrollo crece en sentido apuesto a los atrios. Esta complejidad anatómica y embriológica determina que la ausencia o desarrollo anómalo de trabéculas o TI-V produzca cardiopatías congénitas complejas como hipoplasias ventriculares y corazón univentricular. Por otro lado, por técnicas modernas de biología molecular y genética se ha descubierto que durante el desarrollo embrionario y en la vida postnatal los factores de crecimiento fibroblásticos (FCFs) y la neuregulina1 (NRG1) representan dos vías de señalización que regulan diversas actividades de los miocitos. Entre las funciones que se les atribuyen están supervivencia, protección contra apoptosis, proliferación, interacción célula-célula, diferenciación y especificación del linaje miocárdico. No obstante, es necesario integrar los procesos morfogenéticos responsables del desarrollo de la región muscular del TI-V con la regulación molecular de este proceso. Para obtener esta información, se correlacionaron los patrones espacio-temporales de miocitos ventriculares cíclicos y apoptóticos con la distribución de FCF1, NRG1 y sus receptores respectivos (RRCF, ErbB2 y ErbB4) en el corazón de embriones de pollo durante el proceso de septación cardíaca (estadios de Hamburger y Hamilton 18-30). Se hicieron análisis por Western Blot (WB), Citometría de Flujo (CF), Inmunohistoquímica (IHQ), RT-PCR e hibridación *in situ* (HIS). El análisis de los resultados de IHQ e HIS se determinaron distinguiendo paredes, trabéculas y TI-V en desarrollo. Se confirmó la prevaencia de la trabécula central, a la que conforme avanza el desarrollo se ancla el resto de las trabéculas para originar la porción muscular del TI-V. Así mismo se mostraron evidencias de que la proliferación de los miocitos es el mecanismo regulador del incremento diferencial de la masa muscular ventricular. La distribución espacio-temporal de este proceso determina

el sentido de crecimiento de trabéculas, TIV en desarrollo y cámaras ventriculares en sentido opuesto a los atrios. Por CF se determinó que la mayor actividad cíclica (fases S o G2/M) de las células de la región ventricular se presentó entre sts 18-26HH. Durante los sts 28-30HH más del 73% de las células fue determinada en fase G1-G0. Los valores mayores de I-M, I-BrdU, I-PCNA siempre se hallaron en la superficie epicárdica de las paredes ventriculares, región inferior de la trabécula central (st. 18-22HH) y borde inferior del TI-V en desarrollo (del st. 24HH en adelante). Los resultados de TUNEL, marcaje con LysoTracker e inmunolocalización de proteínas apoptóticas, no apoyan la participación de este proceso en el desarrollo de la región muscular del TI-V. Estos hallazgos junto con los resultados de marcaje *in vivo* que señalan que el sitio prospectivo del TI-V aparece en la etapa de corazón en tubo recto, indican que el desarrollo del tabique sucede en tres fases: 1. *Premorfogenética*, 2. *Morfogenética* y 3. *Crecimiento e/o histodiferenciación*. Dicha clasificación fue empleada para correlacionar la expresión espacio-temporal de las proteínas (FCF1, NRG1 FGFR, ErbB2 y ErbB4) con la actividad cíclica y apoptótica de los miocitos ventriculares. Los resultados de FCF1 indican que esta proteína no está relacionada con los procesos de proliferación de los miocitos ventriculares, sin embargo la expresión temporal del RFCF sugiere su participación en la regulación de la actividad mitótica de miocitos ventriculares acoplado a un FCF distinto al 1. El RNAm de NRG se expresó en endocardio y miocardio; en contraste RNAm de ErbB2/ y ErbB4 se expresaron exclusivamente en el miocardio. Basados en estos hechos, suponemos que durante el desarrollo del TI-V existen dos procesos regulados por NRG1. Primero (sts 17-20HH) mediante regulación parácrina el complejo NRG1/ErbB2/4 controla la morfogénesis de las láminas trabeculares. Más tarde (st. 28HH en adelante) por regulación autócrina NRG1/ErbB4/4 determina la maduración miocárdica.

## **IMPORTANCE OF FGF1 AND NRG1 ON REGULATION OF CELL PROLIFERATION DURING MORPHOGENESIS OF THE MEDIAL AND APICAL THIRDS OF THE AVIAN INTERVENTRICULAR SEPTUM.**

### **ABSTRACT**

The interventricular septum (IVS) is constituted by three regions. The basal third (mesenchymal component) originates from the endocardial cushions of the atrioventricular canal and the conal ridges. The medial and apical thirds (muscular component) originate by the fusion of the ventricular trabeculations. It is now also known that the developing IVS as well as the ventricular cavities grow in opposite direction to the atria. That embryonic and anatomic complexity determinates that the absence or anomalous development of trabeculations and IVS results into very complex congenital cardiac defects as hypoplastic right or left ventricle and univentricular heart. On the other hand, using modern molecular and genetic techniques, it has been discovered that during embryonic development and post natal life, fibroblast growth factors (FGFs) and the endocardial derived neuregulin 1 (NRG1) are two major signal transduction pathways which play a variety of roles in the development and function of myocytes. Survival and antiapoptotic activities, cell proliferation, cell to cell interaction, cell differentiation and myocardial lineage specification are some functions mediated by FGFs and NRG1. Although this knowledge, integration of morphogenetic process involved in the development of the muscular region of the IVS and molecular regulation is scarcely known. To gain insight into this subject we correlated the temporal and spatial pattern of cyclic and apoptotic myocytes and the distribution of FGF1, NRG1, RFGR, ErbB2 and ErbB4, in the ventricular region of the heart of chicken embryos during cardiac septation (Hamburger and Hamilton stages ranging through 18-30HH). For this purpose, Western Blotting (WB), Flow Cytometry (FC), Immunohistochemistry (IHQ) and RT-PCR were performed. The temporal and spatial pattern of expression of NRG1mRNA was also determined in histological sections by *in situ* hybridization (ISH). Trabeculations, IVS, and ventricular free wall were discriminated in IHQ and ISH analysis. It was confirmed that trabeculations of the right and left ventricular walls gradually appose, adhere, and fuse to a central trabeculation which corresponds to that projected above the interventricular groove to form the developing IVS. Likewise, evidences were shown that the differential increase at the muscular ventricular mass depends on myocytic proliferation. The

temporal and spatial pattern of high-intensity foci of cyclic myocytes determines that trabeculations, developing IVS and ventricular chambers expand in opposite direction to the atria. It was found by FC that the main cyclic activity (S, G2/M phases) on cell at the ventricular region corresponded to st. 18-26HH. At st. 28-30HH more than 73% of cells were determined to be in the G1-G0 phase. The most persistent high I-M, I-BrdU and I-PCNA were always found at the epicardial surface of the ventricular wall, at the inferior region of the central trabeculation (stages 18-22HH) and at the inferior border of the developing septum (stage 24HH onward). TUNEL, LysoTracker labelling and immunolocalization of apoptotic proteins did not showed any evidence that this process could be important in the development of the muscular zone of the IVS. All these results together with those by *in vivo* labelling which demonstrate that the prospective place of the IVS appears at the straight tube heart stage, indicate that morphogenesis of the muscular region of the IVS occurs in three phases: 1. *Premorphogenetic*, 2. *Morphogenetic* and 3. *Histodifferentiation*. Correlation of the temporal and spatial pattern of expression of FGF1, NRG1, FGFR, ErbB2 and ErbB4 with distribution of cyclic and apoptotic myocytes was determined based on this classification. The results indicate that although FGF1 is not involved in proliferation of the embryonic ventricular myocytes, it is possible that FCFR1 together with any different FGF could be implicated. NRG1 mRNA was found expressed in the endocardium and myocardium while ErbB2/4 mRNAs were expressed only in the myocardium. Based in these facts, we suppose that NRG1 could be regulating two different processes. At the beginning of the IVS development (st 17-20HH) the endocardial derived NRG1 signalling pathway via ErbB 2/4 receptors is essential for trabeculation of the ventricular myocardium. Later from stage 28HH onward the myocardial derived NRG1 signalling pathway via ErbB 4/4 determines myocardial maturation.

**ABREVIATURAS**

ARIA	Receptor de Acetil colina
A-V	Atrio-ventricular
BrdU	Bromo deoxiuridina
CI-V	Comunicación interventricular
DO	Densidad Óptica
dg	días de gestación
DIG	Digoxigenina
FCE	Factor de Crecimiento Epidermal
FCF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
FCG	Factor de Crecimiento Glial
FDN	Factor de Diferenciación Neu
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina
HH	Hamburger y Hamilton
HRG	Heregulina
HRP	Peroxidasa de rábano
I-BrdU	Indice de Bromo Desoxiuridina
I-M	Indice Mitótico
I-PCNA	Indice del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
NRG	Neuregulina
RFCF	Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico
St	Estadio
TI-V	Tabique Interventricular
TI-VP	Tabique Interventricular Primitivo
TRITC	Isotiocianato de Tetrametil Rodamina

## INTRODUCCIÓN

### I. Antecedentes Anatómicos

El corazón es el órgano responsable de recibir y bombear la sangre a todo el cuerpo. Tanto las aves (pollo) como los mamíferos (humano) poseen un corazón tetracameral formado por dos atrios, derecho e izquierdo y dos ventrículos, derecho e izquierdo. En ambos grupos, las cavidades contra laterales quedan separadas completamente por un tabique cardiaco común que permite que el torrente sanguíneo venoso y el arterial se mantengan independientes y evita que se mezclen. Este tabique abarca desde la región atrial hasta el ápice ventricular, recibe distintas denominaciones según el sitio en donde se ubica y las cavidades que separa. De esta manera, se reconocen tres tabiques: 1) El interatrial, que separa a los atrios, 2) El atrioventricular, el cual separa el atrio derecho del ventrículo izquierdo y 3) El interventricular, que separa a los ventrículos (Ilustración 1).

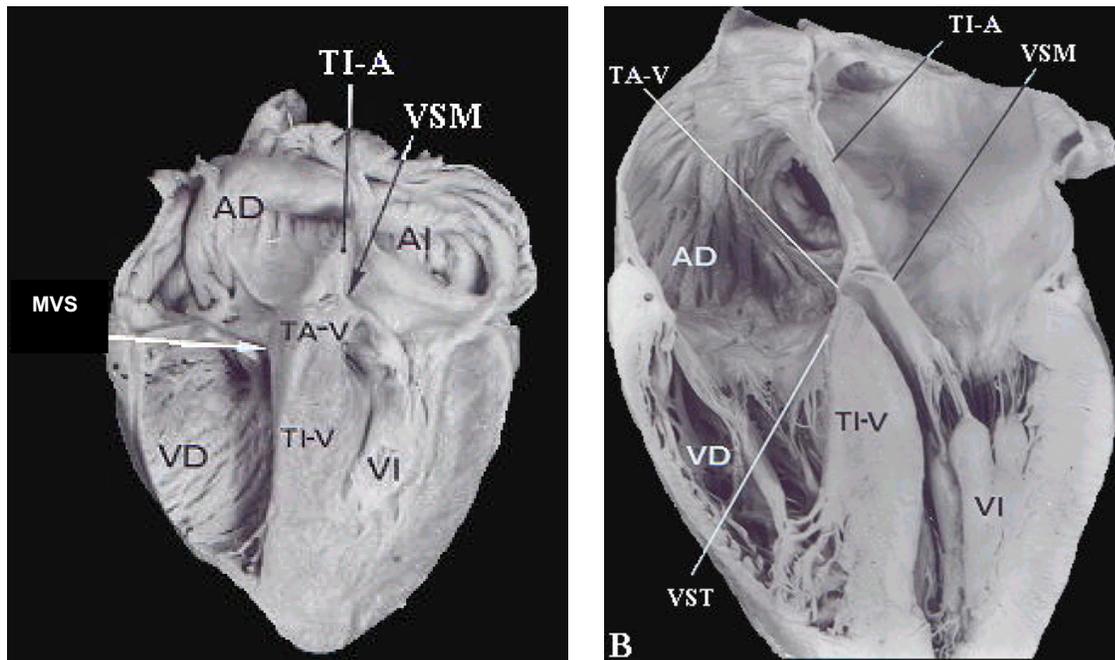


Ilustración 1. Anatomía del Tabique Cardiaco. A) Disección frontal del Corazón de Pollo. B) Disección frontal del Corazón Humano. En dirección céfalo-caudal el Tabique Cardiaco en ambas especies esta compuesto por el Tabique Interatrial (TI-A), el Tabique Atrioventricular (TA-V) y el TIV (TIV). AD = Atrio Derecho, AI = Atrio Izquierdo, VD = Ventrículo Derecho, VI = Ventrículo Izquierdo, VST = Valva Septal de la Tricúspide, VSM = Valva Septal de la Mitral, MVS = Microvalvas Septales.

El tabique interventricular (TI-V) tanto en el pollo como en el humano, está delimitado por las mismas estructuras. Por la superficie derecha sus bordes son: 1) la inserción de la valva septal de la tricúspide en el humano (Sánchez Gómez *et al.*, 1990) o micro valvas septales en el pollo (Cayré R *et al.*, 1993), que lo separan del tabique atrioventricular y 2) el anillo de inserción de las sigmoideas pulmonares posteriores, que constituye su frontera con la arteria pulmonar. En la superficie izquierda no existe una estructura anatómica que permita identificar su límite con el tabique atrioventricular, pero sí se manifiesta el límite preciso con la aorta, que es el anillo de inserción de las sigmoideas coronarias (Sánchez Gómez *et al.*, 1990).

Existen varias discrepancias sobre las regiones que forman el TI-V y su denominación, incluso en ciertos casos el tabique no separa las estructuras que se había supuesto. Por un lado Anderson y Becker (1981) en humanos, lo describen formado por dos regiones: una pequeña porción membranosa de aproximadamente 5mm de diámetro en el individuo adulto y otra muscular, que ocupa la mayor parte. Estos mismos autores (Anderson y Becker, 1981) al igual que Soto *et al.*, (1980) señalan que la porción muscular consta de tres regiones: 1) la porción de las cámaras de entrada, 2) la porción de la región trabéculada y 3) la porción de las cámaras de salida (Ilustración 2). Sin embargo, otros autores, entre ellos De la Cruz (1979) y De la Cruz y cols. (1982), con base en sus características anatómicas y origen embrionario, dividen el TI-V tanto en el pollo como en el humano en tres tercios: basal, medio y apical. El primero corresponde a la región que separa las cámaras de entrada y las cámaras de salida de los ventrículos. De acuerdo con Anderson y Becker (1981) esta región del tabique consta de dos partes, una muscular entre los tractos de entrada de ambos ventrículos y una membranosa que separa el tracto de entrada del ventrículo derecho del tracto de salida del ventrículo izquierdo. Respecto a su origen embrionario es muy complejo y aunque no existe un acuerdo general, se ha mencionado que participan los cojines del canal atrioventricular y las crestas del cono (De la Cruz 1979, De la Cruz, *et al.*, 1982). Los tercios medio y apical del

tabique separan la región trabeculada de los ventrículos. Sobre su morfogénesis existen varias propuestas.

El TI-V al nivel del tercio medio es liso y el tercio apical es trabeculado. En la superficie izquierda de este último las trabéculas son finas y largas mientras que en la superficie derecha son gruesas y cortas (Anderson y Becker, 1981; Sánchez Gómez *et al.*, 1990) (Ilustraciones 1, 2). Además en la superficie derecha se observa el cuerpo de la trabécula septo marginal, estructura muscular muy prominente, que tiene la forma de una “Y”; su extremo cefálico se divide en dos ramas entre las que se inserta la cresta supraventricular, que separa los tractos de entrada y de salida del ventrículo derecho (Soto *et al.*, 1980, Anderson y Becker, 1981; Sánchez Gómez *et al.*, 1990).

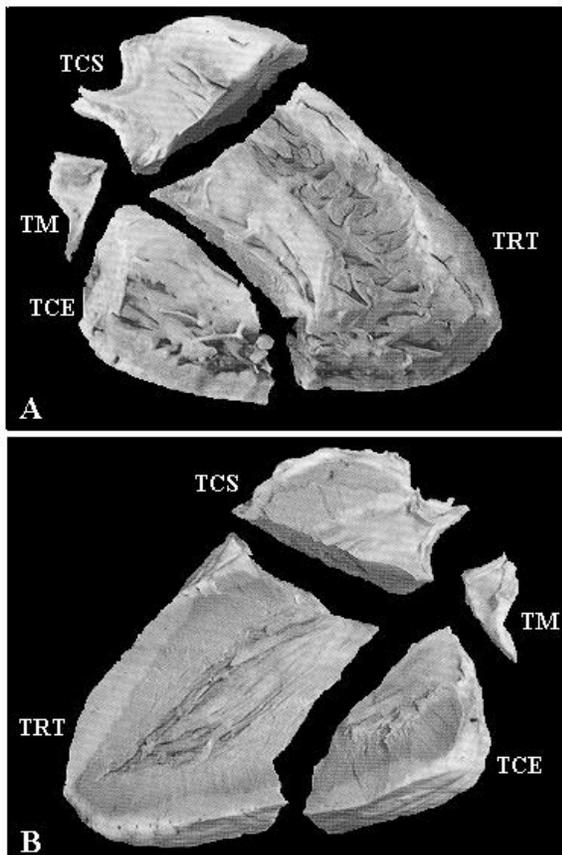


Ilustración 2. Anatomía del TIV humano según Anderson y Becker 1981. A) Superficie derecha, B) Superficie izquierda. Note el Tabique Membranoso (TM) y el Tabique muscular seccionado en sus diferentes componentes, que siguiendo el flujo sanguíneo son: TCE= Tabique de las Cámaras de Entrada. TRT= Tabique de las Regiones Trabeculadas, TCS= Tabique de las Cámaras de Salida.

## II. Antecedentes Patológicos

Se ha señalado en la literatura que los defectos septales ventriculares representan en conjunto 30% de las cardiopatías congénitas observadas en niños

después del nacimiento (Soto *et al.*, 1980). Este tipo de patología incluye un grupo amplio de malformaciones con diferentes alteraciones anatómicas y funcionales. Algunas son relativamente sencillas, persistiendo un orificio en el TI-V, casi siempre al nivel del tercio basal, que mantiene la comunicación entre ambos ventrículos. Otras son muy complejas pues están acompañadas de alteraciones de las cavidades ventriculares y los tractos de entrada y de salida. Este último tipo de patología se ha descrito con muy diversas denominaciones, entre ellas corazón univentricular, *cor triloculare biatriatum*, *cor bilocurare* (De la Cruz, 1979).

Con el propósito de lograr un consenso en la clasificación de las cardiopatías del primer tipo, en las que existe una comunicación interventricular aislada (CI-V), Soto y cols. (1980) estudiaron 220 corazones de niños con esta patología, con base en su ubicación describieron tres tipos principales: CI-V perimembranosa, CI-V subinfundibular y CI-V muscular. Respecto a su embriopatogenia, los estudios descriptivos en el embrión humano conjuntamente con el marcaje en vivo en el corazón de embrión de pollo señalan que las CI-V perimembranosas y las subinfundibulares se deben a una alteración en el desarrollo de los cojines del canal atrioventricular y las crestas del cono respectivamente (Sánchez Gómez *et al.*, 1990).

Soto y cols. (1980) no analizaron las patologías complejas, que involucran los tercios medio y apical del TI-V y las trabéculas de las paredes ventriculares, así como los tractos de entrada y de salida. En contraste, Anselmi y cols. (1976), tomaron en consideración estos aspectos y estudiaron 1100 piezas de necropsia de corazones humanos que habían sido clasificados como ventrículos únicos y encontraron que existen dos modalidades. Basados en el aspecto hemodinámico, al primer grupo lo denominaron **ventrículo único**, pues aunque existen dos cavidades ventriculares, separadas por un tabique muscular; uno de los orificios atrioventriculares es atrésico, dando como resultado que el ventrículo subyacente sea hipoplásico, mientras que el otro ventrículo está hipertrofiado y muy dilatado pues maneja casi todo el volumen de sangre. Actualmente a este grupo se le ha denominado también **Hipoplasia ventricular**.

Por otro lado, Anselmi y cols. (1976) basados en los aspectos anatómicos, al segundo grupo lo llamaron **ventrículo común**, pues encontraron que existe una cavidad ventricular única que carece de TI-V. Respecto a la pared que recubre la cavidad ventricular, puede ser característica del ventrículo derecho, del ventrículo izquierdo o con características compartidas (Ilustración 3).

La información sobre la embriopatogénesis del corazón univentricular y el ventrículo único es casi nula. Este hecho ha contribuido a la existencia de diversas descripciones, definiciones, nomenclaturas y clasificaciones de estas cardiopatías tan complejas, determinando que este sea uno de los temas más polémicos de la cardiología pediátrica. Sin embargo, para obtener esta información es indispensable primero conocer los componentes embrionarios que participan en la embriogénesis del TI-V, los procesos básicos del desarrollo implicados y los mecanismos moleculares y genéticos que los regulan.

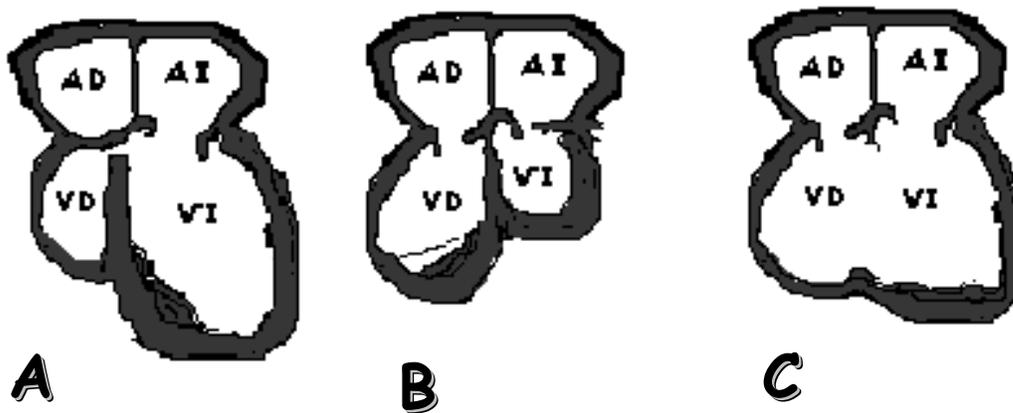


Ilustración 3. Representación esquemática de las diferentes patologías que involucran al TIV. A y B). **Ventrículo único**, existen dos cavidades ventriculares, separadas por un tabique muscular; sin embargo un ventrículo es hipoplásico y el otro hipertrofiado. C). **Ventrículo común**, presenta una cavidad ventricular única, cuya pared puede tener característica del ventrículo derecho, del ventrículo izquierdo o compartidas.

### III. Antecedentes Embriológicos

La investigación sobre la morfogénesis normal del TI-V inicialmente se realizó en embriones humanos, basándose en el concepto clásico preformista de Davis (1927), quien señaló que en el corazón en tubo recto estaban presentes todas las

cavidades cardiacas primitivas que darían origen al órgano maduro (Ilustración 4). De esta manera se planteó que el primer indicio del TI-V se observa hacia la tercera semana post coito (Horizonte XI), etapa en la que existe en la rama transversa del asa una zona muscular lisa, sin trabéculas, ubicada entre las regiones trabeculadas ventriculares o bolsas trabeculadas. Se pensó que al crecer las bolsas trabeculadas en dirección caudal, la zona lisa quedaba atrapada entre ellas. Se concluyó que la región trabeculada del TI-V se formaba por las bolsas trabéculas ventriculares que coalescen, mientras que la lisa se originaba de la pequeña zona carente de trabéculas presente en la rama transversa del asa, la que, más tarde en el desarrollo (Horizonte XIX), hace contacto con los cojines del canal atrioventricular y las crestas del cono cerrando la comunicación entre los ventrículos (Streeter, 1942; Grant, 1962; Goor *et al.*, 1970).

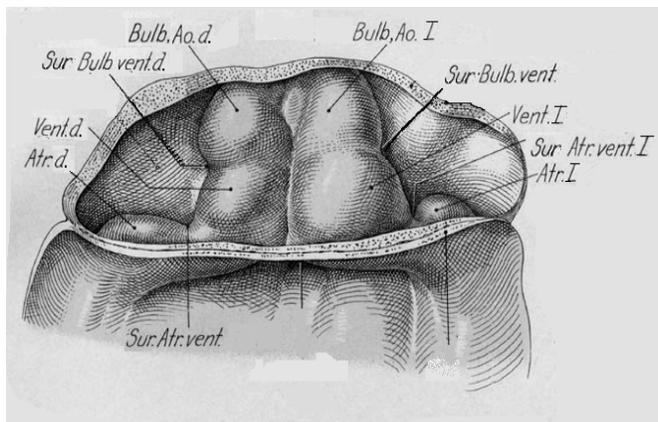


Ilustración 4. Esquema del Corazón en tubo Recto del Embrión Humano Horizonte X, señalando las **Cavidades cardiacas primitivas** que lo forman y los surcos que las separan según Davis (1927). Bulb.Ao= Bulbo Aórtico, Vent.d= Ventrículo derecho. Vent.I= Ventrículo Izquierdo. Atr. D= Atrio derecho. Atr. I= Atrio Izquierdo. Sur. Buld. vent.d= Surco Bulbo-Ventricular derecho. Sur.Bulb.vent.I= Surco Bulbo ventricular izquierdo. Sur Atr vent d. Surco Atrio-ventricular derecho. Sur Atr.vent I= Surco Atrio-ventricular izquierdo

Mediante el marcaje *in vivo* con una mezcla de gelatina y tinta china en embriones de pollo, se demostró que el corazón en tubo recto St 9HH (Hamburger y Hamilton, 1951) está formado exclusivamente por dos segmentos cardiacos primitivos, el cefálico corresponde al primordio de la región apical trabeculada del ventrículo derecho, mientras que el caudal es el primordio de la región apical trabeculada del ventrículo izquierdo, ambos separados por los surcos interventriculares (De la Cruz *et al.*, 1989) (Ilustración 5A).

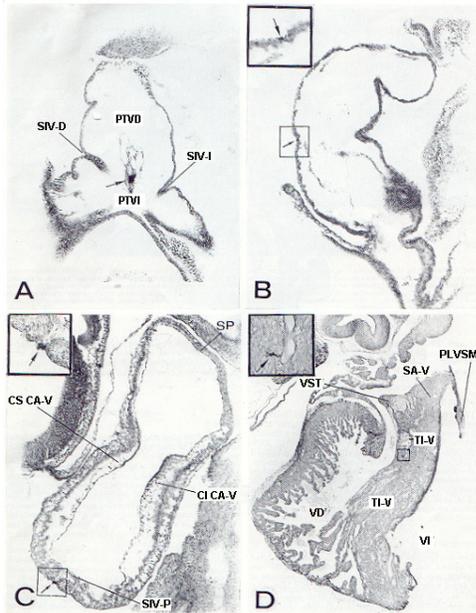


Ilustración 5. Cortes histológicos que ilustran los experimentos de marcaje *in vivo* de De la Cruz y cols. A) Corazón en Tubo recto, Est 9HH, B) Corazón en Asa en C, St 14HH; C) Corte sagital del corazón del Est 17HH, D) Corte frontal del corazón maduro, St 36HH. Note en el corazón en tubo recto el sitio prospectivo del Septum Interventricular Primitivo (SI-VP), en la línea ventral de fusión, a la altura de los Surcos Interventriculares (punto oscuro señalado por una flecha). En el St 17HH se expresa como un esbozo, el cual en el corazón maduro da origen a los tercios medio y apical del Tabique Interventricular (TIV), pues la marca presente en el esbozo (Recuadro Fig. C), más tarde en St 36HH se localiza en el TIV, en el limite entre los tercios basal y medio (Recuadro Fig. D). Sp, *Septum primun*; CSCA-V= Cojín Superior del Canal atrio ventricular; CICA-V= cojín inferior del canal atrio ventricular, TIV= TIV, PLVSM= porción libre de la valva septal mitral; SA-V= septo atrio ventricular, VST= valva septal tricúspide; VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo, SIV-D= Surco Interventricular Derecho, SIV-I= Surco Interventricular Izquierdo.

Basados en este nuevo concepto y empleando la misma técnica de marcaje *in vivo*, de la Cruz y cols. (De la Cruz *et al.*, 1997; De la Cruz y Moreno-Rodríguez, 1998) propusieron que el sitio prospectivo del *TI-V primitivo* (TI-VP) se encuentra en el corazón en tubo recto, en la línea media de fusión, a la altura de los surcos interventriculares y que posteriormente entre los Sts 15HH–18HH se manifiesta como un esbozo. Al marcar *in vivo* este esbozo descubrieron que da origen a los tercios medio y apical del TI-V del corazón maduro (Ilustración 5). Este grupo de investigadores señaló que el proceso se lleva cabo por el crecimiento del TI-VP en sentido caudo-cefálico, desde el ápice hacia los cojines del canal atrioventricular (canal A-V) y es debido a la incorporación de células que migran desde las paredes libres ventriculares (De la Cruz *et al.*, 1997; De la Cruz y Moreno-Rodríguez, 1998).

Sin embargo, Contreras y cols. (2008), al emplear el marcaje *in vivo* en el corazón de embriones de pollo, conjuntamente con el estudio de los cambios anatómicos e histológicos del TI-V en desarrollo y las paredes libres ventriculares entre los Sts 18HH a 36HH, demostraron que en este proceso no participa la coalescencia de

las bolsas trabeculadas de los ventrículos mencionada por Streeter (1942), ni la migración de poblaciones celulares provenientes de los ventrículos, como lo propusieron De la Cruz y cols. (1997) y De la Cruz y Moreno-Rodríguez (1998). Se encontró que los tercios medio y apical del TI-V se originan en conjunto por las trabéculas ventriculares que se adhieren a un trabécula central ubicada sobre el surco interventricular y simultáneamente se ramifican y elongan en dirección opuesta a los cojines del canal A-V (Ilustración 6)

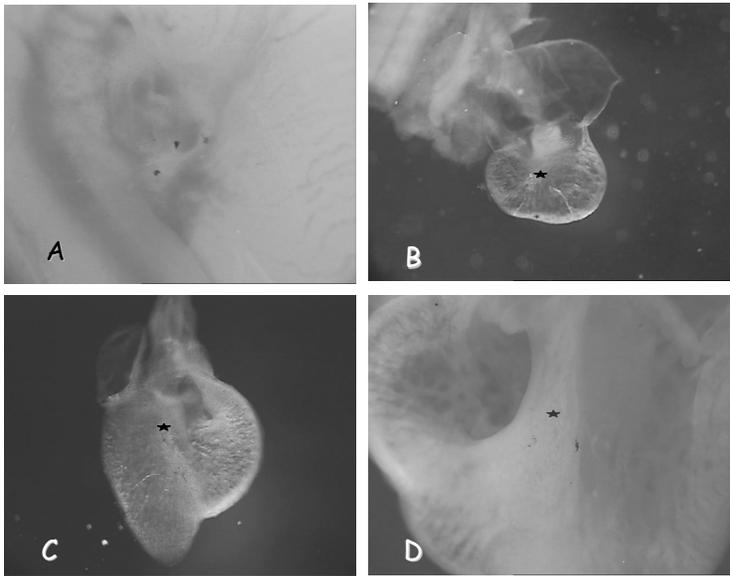


Ilustración 6. Rastreo de las marcas del septo interventricular (SI-VP) y trabéculas ventriculares en embriones de pollo. A) St 18, B) St 24, C) St 28 y D) St 36. Note que la marca central colocada en el SI-VP se distribuye a lo largo de esta estructura, mientras que las marcas laterales, puestas en las trabéculas laterales, al igual que la marca central, poco a poco descienden hasta ubicarse en posición paralela respecto a la marca central, sin mezclarse y permaneciendo en su ventrículo correspondiente.

#### IV. Procesos básicos del desarrollo implicados en la morfogénesis del TI-V.

Tanto en aves como en mamíferos, la morfogénesis normal y funcional del corazón es el resultado de la adicción progresiva, cefálica y caudal, de poblaciones celulares (Markwald *et al.*, 1998, Meilhac, *et al.*, 2003, Abu-Issa *et al.*, 2004), mediante una coordinada regulación de crecimiento celular, migración, diferenciación, proliferación y/o apoptosis (Sissman, 1966; Pexieder, 1975, 1980; Paschoud y Pexieder, 1980; Clark *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 2000).

Respecto a la proliferación celular, los estudios pioneros en el corazón de embrión de pollo de Sissman (1966) y Stalsberg (1969) en los años 60's destacan este proceso como un evento necesario para la adquisición del volumen ventricular durante la torsión del tubo cardiaco. Por su parte Soufan y cols. (2006) mediante análisis con BrdU y reconstrucciones con computadora observaron que el

miocárdio del corazón en tubo recto, se origina por la proliferación rápida de un pequeño grupo celular reclutado en el tubo cardiaco, posteriormente la formación de las cámaras se da por una alta actividad de células que incrementan su volumen, seguida por un incremento en la proliferación celular. Se ha descrito que, al finalizar la torsión (10dg ratón, 11dg rata, St 17HH pollo, finales de la cuarta semana en humano), se observan cambios en la región luminal de los ventrículos que consisten en la formación de pequeñas protuberancias llamadas trabéculas que corren dorsoventralmente; su extremo libre mira hacia la luz de la cavidad, mientras que en su parte inferior se anclan a la pared miocárdica compacta (Viragh y Challice 1973; Steding *et al.*, 1981; Ben-Shachar *et al.*, 1985; Icardo y Fernandez-Teran 1987). Numerosos investigadores señalan que la alta actividad proliferativa de la pared miocárdica y el bajo grado de diferenciación permite el desarrollo de nuevas trabéculas (Jeter y Cameron, 1971; Viragh y Challice 1973; Romyantsev, 1977; Rychter y Rychterova, 1983; Tokuyasu 1989; Thompson *et al.*, 1990, Thompson, 1995; Mikawa *et al.*, 1992a, 1992b). Al respecto, Thompson y cols. (1995) proponen que el desarrollo de los ventrículos está regulado por un gradiente de crecimiento, ya que observan que el decremento de la proliferación y el incremento en la diferenciación corre de afuera hacia el centro del ventrículo.

Abdelwahid y cols. (1999) observaron apoptosis en las trabéculas y en la pared libre compacta entre los 11 a 16 dg en ratas. Entre tanto Zhao y Rivkees (2000) identificaron, mediante TUNEL, células positivas a muerte celular programada en la región ventricular y tabique de embriones de ratón a partir de 13 dg hasta 2 días después del nacimiento. Así mismo, Cheng y cols. (2002) notaron un alto nivel de muerte celular en la cresta del TI-V (sitio donde se desarrollará el haz de His) y en las trabéculas ventriculares de embriones de pollo. Por su parte Sharma y cols. (2004) propusieron que el índice de muerte celular varía de acuerdo con la especie, pues al analizar embriones de ratón, determinaron que los índices de muerte celular en el haz de His y trabéculas ventriculares no son tan altos como los de la región apical del corazón y las paredes ventriculares derecha e izquierda.

A pesar de toda esta información, en ningún trabajo se destaca la verdadera importancia de la proliferación y apoptosis con el desarrollo de las trabéculas y paredes ventriculares, así como en la morfogénesis del TI-V pese a que este elemento es indispensable en la estructura cardiaca definitiva normal.

## **V. Factores de crecimiento**

Se ha descrito, tanto en aves como en mamíferos, que la actividad mitótica de los miocitos cardiacos sucede en las etapas fetal y neonatal; sin embargo, en esta última, la proliferación celular es muy limitada y los mecanismos reguladores son poco conocidos (MacLellan y Schneider, 1999).

En la fase fetal, se ha demostrado la existencia de ciertos factores de crecimiento encargados de regular el ciclo celular y el crecimiento de los miocitos, incluso controlar su diferenciación terminal. Entre los más conocidos están los factores de crecimiento epidermal, fibroblástico (FCF) y similar a la insulina (MacLellan y Schneider, 1999). Cada uno de estos factores forma una familia, cuyos miembros se denominan con números o letras del alfabeto griego, existiendo una cantidad variada de tipos, según sea el caso. Además, aunque estos factores de crecimiento tienen en común la característica de ser señales químicas, reconocidas por receptores específicos presentes en la superficie de la célula, cada tipo de una familia puede modular distintas actividades celulares.

### **V.1 Factor de Crecimiento Fibroblástico**

Los FCFs forman una familia de más de 22 polipéptidos mitogénicos, en vertebrados tienen un peso molecular alrededor de 34 kDa. Incluye tanto FCF ácido (FCF1) y básico (FCF2), así como otros productos oncogénicos como el factor de crecimiento fibroblástico de los queratinocitos (FCFK), int-2, FCF5 y FCF6 (Parlow *et al.*, 1991). Al menos nueve miembros de esta familia se han distinguido por su actividad reguladora - autocrina o paracrina- en el desarrollo del corazón en aves y de mamíferos (Zhu *et al.*, 1996; Sugi *et al.*, 1995). A pesar que FCF1 y FCF2 originalmente fueron aislados e identificados como proteínas propias del tejido neural, incluyendo cerebro e hipotálamo, se ha demostrado que regulan múltiples funciones incluso durante la cardiogénesis entre las que

destacan mitogénesis, quimiotaxis, sobrevivencia y diferenciación (Sugi *et al.*, 1995; Patstone *et al.*, 1993 Matsumoto *et al.*, 1998).

Todos los miembros de la familia de los FCFs son proteínas secretadas a la matriz extracelular, la mayoría (FGF3, 8, 10, 15, 17-19 y 21-23) tienen una secuencia peptídica secretora, sin embargo FCF9, 16 y 20 carecen de esa señal. La característica principal de esta familia es que se unen al proteoglicano del heparán sulfato pues tienen alta afinidad por la heparina, que es un glicosaminoglicano localizado en la matriz extracelular.

La molécula de los FCFs tiene forma triangular, cada lado consta de 4 péptidos  $\beta$  hélice, uno tiene un sentido antiparalelo y los otros tres son normales, lo que le confiere a la molécula la apariencia de un trébol de 4 hojas (Ilustración 7).

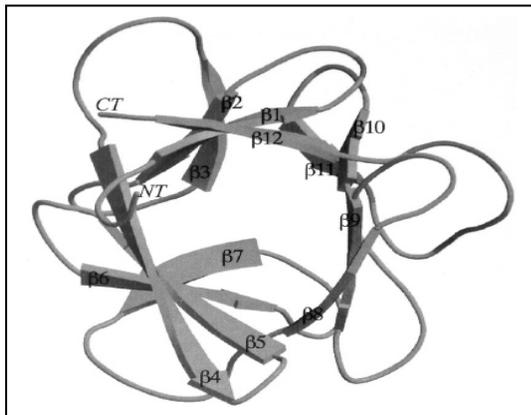


Ilustración 7. Diagrama del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FCF). Los factores adoptan una forma de trébol, cada hoja tiene 4 péptidos  $\beta$ .

Los receptores específicos de los FCFs (RFCF) son glicoproteínas monoméricas de membrana, compuestas por una porción extracelular, una región transmembranal relativamente larga (~28 aminoácidos), seguida de una región citoplasmática que es la más divergente. Presenta dos dominios subsecuentes de tirosin cinasa, separados por una secuencia de 14 aminoácidos (Cohen, 2004).

Todos los miembros de la familia de RFCF pueden existir como secuencias cortas o largas (Ilustración 8). Esta variación es el resultado de un procesamiento (splaiicing) alternativo, que determina: 1. El número de dominios similares a la inmunoglobulinas (Ig-like) en su extremo amino-terminal (dos para las secuencias cortas o tres para las secuencias largas). Cada dominio Ig-like está separado por

una secuencia corta altamente ácida de función desconocida (Patstone *et al.*, 1993, Pasumarthi *et al* 1995, Grothe *et al.*, 1996). 2. La formación de receptores solubles secretados que se producen por la escisión del dominio IgIII adyacente a la región intramembranal. 3. La variación del dominio IgIII que determina la unión al ligando específico.

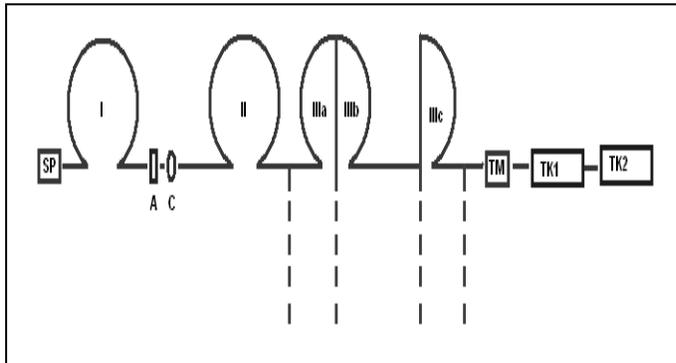


Ilustración 8. Diagrama de un receptor de factor de crecimiento fibroblático mostrando los 3 dominios Ig-like (Igl, IgII, IgIII). El procesamiento alternativo del dominio IgIII con la participación de tres exones distintos (IgIIIa, IgIIIb, IgIIIc) amplía la variabilidad del receptor. SP= Péptido señal, TM= Tallo transmembranal, TK1 y TK2 = dominios cinasas.

Tanto los FCFs como sus receptores cuando están separados son monómeros, aunque a través de cristalografía se ha observado que la unión del ligando (asociado a la heparina) con su receptor, ocasiona cambios conformacionales en el dominio extracelular del complejo, dando como resultado la formación de dímeros muy estables (Ilustración 9). Este cambio induce a la vez la autofosforilación de los dominios tirosín cinasa de la molécula del receptor, iniciando una cascada de señalización a través de tres vías: 1. MAP cinasas, 2. proteína cinasa C, 3. Traductores y activadores de señales transcripcionales (Cohen, 2004; Givol *et al.*, 2004; Wagner y Siddiqui 2007) (Ilustración 10).

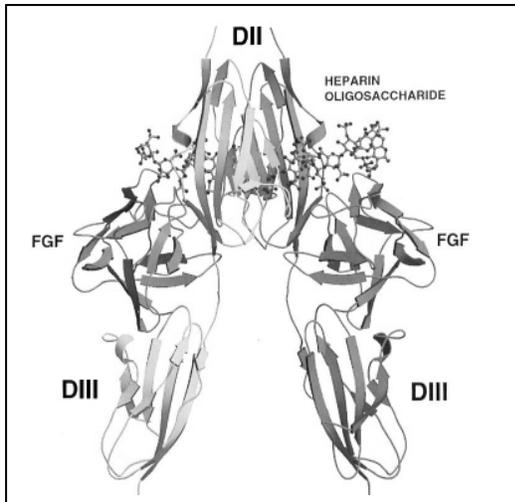


Ilustración 9. Diagrama del complejo heparina:FCF:RFC. Observe que una molécula de FCF se asocia con un receptor del FCF entre los dominios DII y DIII, luego se une un oligosacarido de heparina estableciendo así un complejo ternario. Este último elemento sirve como un activador del receptor.

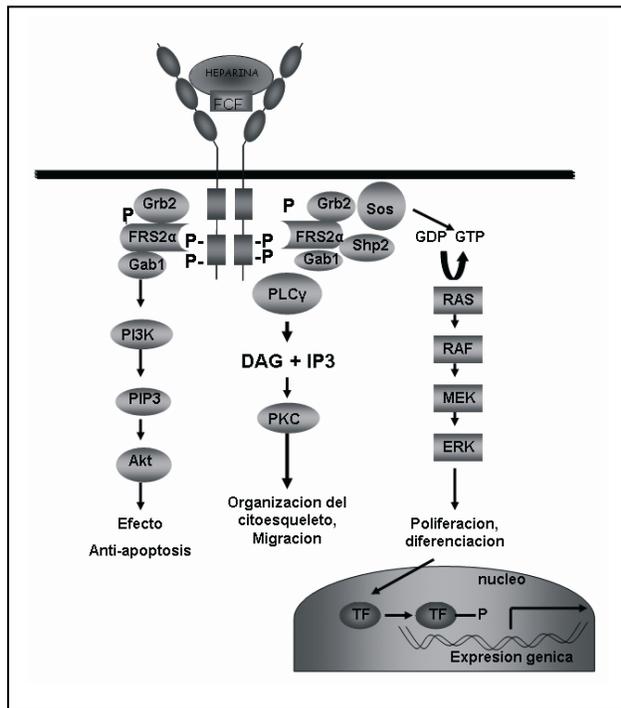


Ilustración 10. Vías de transducción de señales del complejo heparina-FCF-RFCF. La unión heparina/FGF, estimula la fosforilación de los receptores FCF, lo que provoca el acoplamiento de proteínas FRS2a. La fosforilación de FRS2a facilita la unión de los adaptadores Grb2 y Gab, así como la proteína tirosina fosfatasa Shp2. Esta última dirige la señal del FCF a la vía PI-3 cinasa-AKT o Ras-MAP quinasa. En contraste la activación de la vía PLCc estimula PKC. Estas vías controlan diversas actividades de las células como anti-apoptosis, organización del citoesqueleto, migración, proliferación y diferenciación,

### Expresión del FCF1 en el corazón

Los primeros antecedentes que se conocen sobre la expresión en el espacio y tiempo de los FCFs en corazón son los estudios de Yu y cols. (1990) en embriones de rata, quienes mediante inmunohistoquímica, analizando embriones de 11 a 20dg y neonatos de 1 a 5 semanas, observaron alta positividad de los

miocitos tanto para el FCF1 como el FCF2. Estos resultados, conjuntamente con el hecho que los miocitos cardiacos después del nacimiento pierden la capacidad para dividirse pero comienzan a incrementar en tamaño, les llevaron a concluir que FCF1 y FCF2 estimulaban tanto la proliferación como la diferenciación de estas células. Así mismo, al analizar el efecto de FCF2 en miocitos de corazón de neonato y adulto, cultivados *in vitro*, se reportó que tiene un efecto mitogénico (Sugi *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1998). Por otro lado Engelmann y cols. (1992) utilizando inmunohistoquímica, observaron que el FCF1 se expresa en el corazón de ratas de 14-21dg (St 26-41HH pollo), formando agregados en los miocitos ventriculares. Después del nacimiento la mayor intensidad del factor fue observada en la primera semana, disminuyendo en la segunda. Hacia la 3-4 semanas solamente algunos miocitos fueron positivos, pero también encontraron marca en algunas células del endocardio y del epicardio, resultado que fue confirmado mediante hibridación *in situ* (Engelmann y cols. 1992). En pollo, por hibridación *in situ* en fetos de 10 días (St 36HH pollo), se observó que el RNAm del FCF1 también llamado *cek1* es el más abundante y se expresa en más tejidos, comparado con los mensajeros de otros factores de esta familia como: FCF2, FCF3 (Patstone *et al.*, 1993, Sugi *et al.*, 1995).

Por su parte, Parlow y cols. (1991), Sugi y cols. (1995) y Zhu y cols. (1996) al analizar los estadios tempranos de la cardiogénesis, en combinación con ensayos funcionales *in vitro*, demostraron que FCF1, FCF4 y FCF2 son sintetizados por el endodermo. También descubrieron que FCF1 y 4 son indispensables en el embrión de pollo de St 5HH para mantener la proliferación de las células de mesodermo precardiaco. Con base en sus hallazgos, Zhu y cols. 1996 propusieron que FCF1 y FCF4 ejercen una actividad autocrina para regular la diferenciación de los miocitos, aparentemente hasta los Estadios 11 y 15 respectivamente. Debido a que el pico máximo de intensidad alcanzado por FCF1 y FCF4 fue en los Sts 18 y 24HH (10 a 10.5dg ratón, 11 a 12 Dg. rata, Horizonte XIV a XV humano), declinando después en concordancia con el descenso en la proliferación de los miocitos (St 27 y 30HH respectivamente), los mismos investigadores pensaron que FCF1 y FCF4 no ejercían su actividad en el

miocardio definitivo, una vez que había terminado el proceso de crecimiento y diferenciación de los miocitos por lo que concluyen que la cardiogénesis está regulada principalmente por el FCF1, 2 y 4. Así mismo dividieron el proceso en dos pasos: El primero depende de una acción paracrina, es controlado por las células del endodermo que producen FCF2, el cual soporta la diferenciación de las células del mesodermo a células cardíacas. En el segundo paso los miocitos se regulan vía autocrina, sintetizando alta proporción de FCF1 y menor cantidad de FCF2 y 4, controlando su actividad proliferativa.

Así mismo en estudios en humano adulto se ha sospechado que el FCF1 está implicado en patologías asociadas con el crecimiento del corazón y vasos coronarios como la hiperplasia e hipertrofia miocárdica, así como en la proliferación de células de músculo liso en aterosclerosis y estenosis coronaria (Zaho *et al*, 1994a; 1994b; 1995). Respecto a la formación de los vasos, estos mismos autores encontraron que FCF1 y FCF2 se expresaban en el tejido mesenquimal donde se forman los angioblastos (Zaho *et al*, 1995).

### **V.1. Neuregulinas**

Las Neuregulinas (NRG) son un grupo importante de factores de crecimiento implicados en la regulación de la proliferación. Pertenecen a la familia de los factores de crecimiento epidermal (FCEs), se denominan NRG por ser señales críticas para el desarrollo del sistema nervioso (Longart y Buonanno, 2002, Negro *et al.*, 2004). Fueron descubiertas a finales de los 80's y por estudios en fibroblastos transformados o en líneas celulares de cáncer de mama en cultivo *in vitro* se encontró que tienen la capacidad de activar la fosforilación de proteínas RAS. Con técnicas de clonación molecular y estudios de las vías de señalización, se encontró que el factor de diferenciación Neu (FDN) en roedores, la Heregulina (HRG), su homólogo en el humano, la proteína inductora de la actividad del receptor de acetilcolina (ARIA) y el factor de crecimiento glial (FCG) pertenecen a la misma familia de factores de crecimiento colectivamente llamados NRG (Falls, 2002, 2003; Smith y Bader, 2007).

Estructuralmente las NRGs presentan una larga cola citoplasmática, una región trans-membranal muy conservada, una zona yuxtamembranal muy variable, que

contiene los sitios sensibles a las proteasas y un dominio similar al FCE de aproximadamente 50 aminoácidos. En la región media existen variantes alternativas que determinan las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del FCE (Ilustración 11). Sin embargo la diversidad y complejidad bioquímica y funcional de esta familia de proteínas radica en que existen cinco genes distintos (NRG1,2,3,4 y 13) con una amplia variedad de isoformas (Ilustración 11), además se conocen diferentes tipos de receptores y vías de señalización (Falls, 2002; 2003).

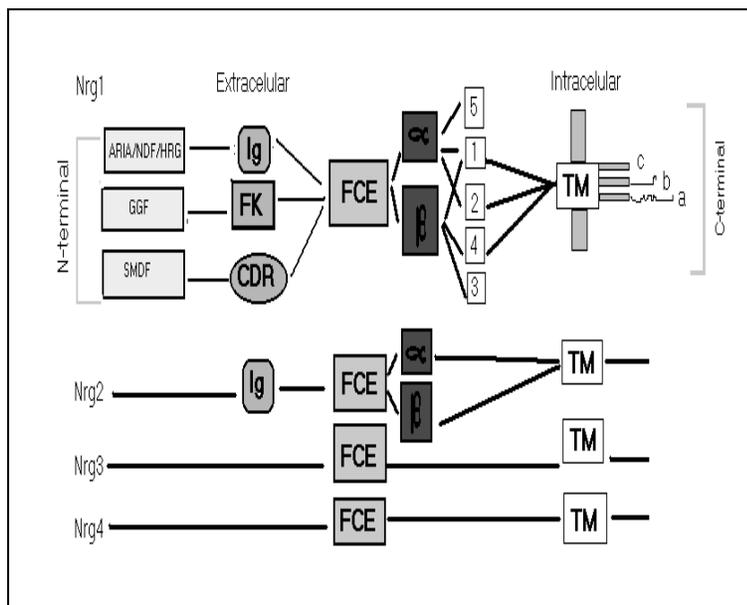


Ilustración 11. Homología de las NRG1s (NRG). Observe que todas tienen en común un dominio similar al factor de crecimiento epidermal (FCE) que en algunas puede ser de tipo  $\alpha$  ó  $\beta$  dependiendo de su exon. HRG= heregulina; ARIA= inductora de la actividad del receptor de acetilcolina GGF= factor de crecimiento glial, TM= Tallo Transmembranal, CDR= Dominio rico en cisteínas, Ig= Dominio de inmunoglobulina.

Las NRGs se unen e interactúan con proteínas transmembranales con actividad tirosín cinasa, conocidas como receptores ErbB, que son miembros de la familia de receptores de los FCE. Se denominan ErbB por el oncogén viral v-Erb-B, el cual es una forma mutada del receptor ErbB1, algunos investigadores lo llaman receptor del factor de crecimiento epidermal humano HERs (Falls, 2002; 2003). En estudios empleando anticuerpos contra los componentes de los receptores ErbB se ha demostrado que son homodímeros o heterodímeros formados por dos subunidades (Longart y Buonanno, 2002, Rimer, 2003). Respecto a la afinidad de las NRG y sus receptores, las NRG1 son más afines a los heterodímeros ErbB2/3 y ErbB2/4 las NRG2 a los heterodímeros ErbB3/4 y las NRG3 y 4 a los homodímeros ErbB4 (Longart y Buonanno, 2002; Falls, 2002).

Sobre las vías de señalización, estudios *in vivo* demostraron que la interacción de NRG1 con su receptor ErbB, estimula la actividad intrínseca tirosín cinasa de ErbB, fosforilando residuos de tirosina localizados en su dominio citoplásmico (c-terminal). Este cambio inicia una cascada de transducción de la señal que produce efectos muy específicos sobre las funciones celulares tales como proliferación, apoptosis, diferenciación etc. (Ilustración 12). (Meier *et al.*, 1998; Okoshi *et al.*, 2004; Grego-Bessa *et al.*, 2007)

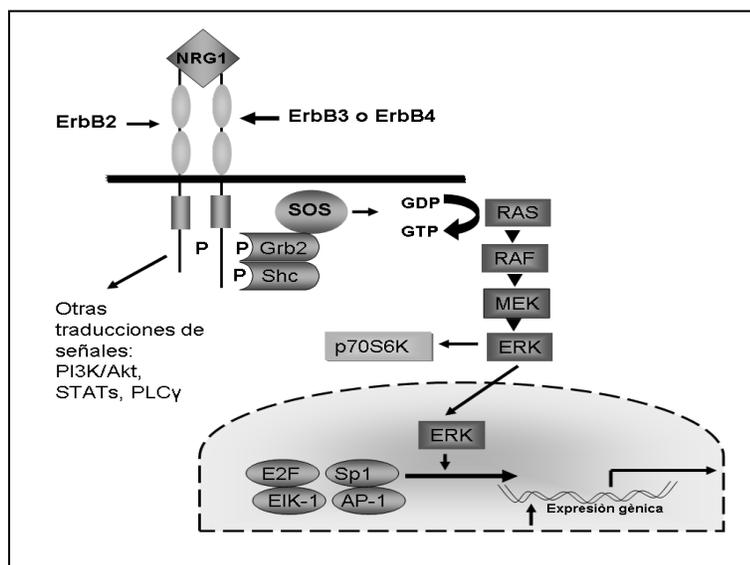


Ilustración 12. Vía de señalización de NRG1/ErbB. La unión del NRG al heterodímero ErbB2/4, provoca la liberación de residuos de tirosina (P) en el extremo carboxilo terminal. La actividad tirosin cinasa es reconocida por proteínas adaptadoras como Grb2 y SHC, que activan vías de señalización, como Ras-MAPK, PI3K-Akt, PLC-PKC, y la Jak / Stat.

### Expresión de las NRG1s en el corazón

Respecto a la posible participación de NRG en el desarrollo cardiaco, Zhao y cols. (1999) encontraron la expresión de los receptores ErbB2 y ErbB4 en miocitos de rata adulta y neonatal cultivados *in vitro*. También se ha descrito que la NRG1 $\beta$  en asociación con su receptor suprime la apoptosis y promueve el crecimiento y sobrevivencia de los miocitos en sistemas *in vitro* (Falls. 2003). Por otro lado Kim y cols. (2003) en sistemas en cultivo encontraron la expresión del receptor ErbB4 en las células miocárdicas a partir del día 6 de desarrollo. Basados en estos resultados y en lo descrito por Zhao y cols. (1999) concluyeron que este receptor es un excelente marcador de los cardiomiocitos. Kim y cols. (2003) también realizaron hibridación *in situ* y encontraron en el endocardio expresión del RNAm

de NRG tipo I en mayor proporción que el RNAm de las NRG tipo III. Sin embargo el mensajero de las NRG tipo II no fue detectado ni en endocardio ni en miocardio. Otro grupo de investigadores, mediante inmunolocalización describió tanto en el endocardio atril como en el ventricular la presencia de NRG1 dentro de caveolas (microvasculaturas); siendo el endocardio que recubre los cojines del canal atrioventricular el que expresa esta proteína en mayor cantidad. Respecto a las ErbB2 y 4 las encontraron en el miocardio de atrios y ventrículos, mientras que ErbB3 la observaron exclusivamente en las células mesenquimales (Carraway III, 1996; Smith y Bader, 2007)

Usando ratones transgénicos “knock-out”, en los que fue suprimido el dominio FCE-like en todas las isoformas de NRG1 (pan-NRG1), Meyer y Birchmeier (1995) observaron que los factores de crecimiento mutados son incapaces de activar al receptor. Los embriones murieron prematuramente, el día 10.5dg. En el corazón encontraron defectos en el canal atrioventricular y escasa formación de trabéculas. Este daño se acompañó de una severa reducción en la población de células nerviosas, principalmente células de Schwann, células derivadas de la cresta neural, así como daño en el linaje de los oligodendrocitos. Sin embargo, la muerte temprana del embrión no permitió estudiar la función de estos factores de crecimiento en etapas avanzadas del desarrollo. En otra investigación con embriones de ratones en los que se inactivaron las isoformas Ig-NRG tipos I y II, los embriones también murieron el día 10.5dg (St 16 a 20HH pollo; 11dg rata, horizonte XIV humano) presentaron anomalías cardíacas similares a las de pan-NRG, pero en este caso el desarrollo del linaje de los precursores de las células de Schwann fue normal (Falls, 2002). Embriones de pollo, al infectarlos en etapa de blástula con un retrovirus que inactiva NRG1 y cultivarlos durante noventa horas más, presentaron anomalías cardíacas similares a las del ratón (Zhao y Lemke 1998; Smith y Bader, 2007). Este hecho confirma la importancia de NRG en la cardiogénesis.

En contraste, los ratones knock-out con el gen CDR-NRG (NRG tipo III) inactivado no presentan defectos cardíacos. A pesar de que los productos llegaron a término, murieron prematuramente por asfixia, debido a que las sinapsis neuromusculares

no eran funcionales y los nervios craneales y periféricos estaban reducidos más de 50% (Lee *et al.*, 1995, Falls, 2002). Finalmente la mutación de las NRGs en todas las isoformas del dominio FCE tipo  $\alpha$ , pero no las isoformas  $\beta$ , también en ratón, aparentemente no afecta el desarrollo cardíaco, aunque los neonatos presentan anomalías en el tórax (Falls, 2002, 2003, Lemmens 2007).

También se ha analizado el efecto de las mutaciones en los receptores de las NRGs en la cardiogénesis. Erickson y cols. (1997) utilizaron ratones homocigóticos recesivos para el ErbB2 (delección de los amino ácidos 256-304) y ErbB3 (delección de los amino ácidos 70-107). Hallaron que en ambos casos los embriones no completan su desarrollo, debido a que presentan malformaciones graves incompatibles con la vida. Al sacrificar los embriones mutantes ErbB2 el día 10.5dg encontraron defectos muy severos similares a los de los ratones pan-NRG, en ellos los aparatos valvulares atrioventriculares y el tejido mesenquimal estaban pobremente desarrollados y el cerebro medio y cerebelo eran anormales. Los mutantes ErbB3 sobrevivían más tiempo por lo que los sacrificaron el día 13.5dg (St 28 a 32HH pollo, 15dg rata, 41 días en Humano). En este caso los embriones eran pequeños y aunque el corazón estaba un poco más desarrollado que en los mutantes ErbB2 era hipoplásico, con una pared miocárdica muy delgada. Lee y cols. (1995) al emplear este mismo modelo, no observaron anomalías en los cojines del canal A-V, ni en el tracto de salida, sin embargo concluyen que la ausencia de ErbB2 no permite el desarrollo de las trabéculas miocárdicas. El hecho de que Gassmann y cols. (1995), al delectar el receptor ErbB4, encontraran una patología similar a la descrita por Lee y cols. (1995) los llevó a concluir que el heterodímero ErbB2/4 está implicado en una regulación paracrina de la diferenciación del miocardio. Con base en esta idea, se ha propuesto que las NRG y sus receptores ErbB2 y ErbB4 pudieran estar implicados en la producción de hipertrofia ventricular y/o estenosis aórtica. Baliga y cols. (1999) cultivaron *in vitro* miocitos ventriculares de rata adulta, adicionaron al medio NRG1. Analizaron la incorporación de fenil alanina tritiada y observaron un incremento en la síntesis de proteínas. Basados en estos resultados, los mismos investigadores concluyeron que NRG1 regula la hipertrofia miocárdica

que da como resultado la remodelación del corazón. Estos autores (Baliga *et al.*, 1999) mencionan que la vía de señalización responsable de la hipertrofia miocárdica es compleja e implica la participación de la proteína PD098059 que en su estado activo inhibe MAPKs, evitando la vía de señalización en la que la actividad de ANGII conduce a la multiplicación celular. De esta manera en la hipertrofia el complejo NRG/ErbB2/4 activa Mek1 (MAPK cinasa), el resultado es la inhibición de PD098059 y la activación de ANGII como mediador mitogénico. Por el contrario, en ausencia de la NRG y/o su receptor, sucede un proceso de histodiferenciación, ya que PD098059 en su estado activo, por un lado inhibe a Mek1 y ANGII, pero por el otro activa PI-3 cinasa, la que a su vez actúa sobre P70<sup>S6K</sup> activándola, lo que conduce a la expresión de sarcómeros bien organizados. Sin embargo. Rohrbach y cols. (1999), al estudiar ratas adultas normales y con estenosis aórtica, entre las semanas 6 a 22, revelaron que, en ambos grupos de animales, los RNAm y las proteínas de los receptores ErbB2, ErbB4 y NRG1 están presentes en los mismos niveles.

En el tratamiento del cáncer mamario en estado de metástasis, recientemente se ha logrado bloquear la activación del ErbB2 mediante la producción de anticuerpos monoclonales “humanizados” denominados **trastuzumab o herceptín** (Longart y Buonanno, 2002; Falls, 2002, 2003, Fukazawa *et al.*, 2003). Al administrar el anticuerpo conjuntamente con antraciclina a pacientes enfermas, se halló que el heterodímero ErbB2/4 se expresa casi exclusivamente en las paredes ventriculares y las pacientes tratadas presentaban cardiomiopatía dilatada del ventrículo izquierdo y debilidad en la contractilidad muscular Longart y Buonanno, 2002; Falls, 2002, 2003. Estos hallazgos son evidencias de que el bloqueo de los heterodímeros ErbB2/3 y ErbB2/4; provoca la pérdida del arreglo miofibrilar, aspecto que también fue corroborado en ratones tratados con trastuzumab Longart y Buonanno, 2002; Falls, 2002, 2003. Sin embargo, en estudios *in vitro* realizados por Sawyer y cols. (2002) se demostró que el trastuzumab aumenta la susceptibilidad de los miocitos ventriculares de rata adulta a la antraciclina provocando fragmentación del DNA, que puede ser la causa del desorden miofibrilar y pérdida de la contractilidad de los miocitos.

Estos hallazgos de los estudios *in vitro* e *in vivo* en miocardio de organismos neonatos y adultos así como de las investigaciones llevadas al cabo en embriones de aves y mamíferos ya descritos, evidencian el papel de las NRGs en modular la morfogénesis cardíaca ya que resulta un posible mitógeno de las células miocárdicas, que además parece estimular el crecimiento de las células mesenquimales de los cojines endocárdicos A-V y un factor de proliferación y diferenciación que promueve la formación de las trabéculas ventriculares.

*¿Es que en verdad se vive aquí en la tierra?  
!No para siempre aquí!  
Un momento en la tierra,  
si es de jade se hace astillas,  
si es de oro se destruye,  
si es plumaje de ketzalli se rasga,  
!No para siempre aquí!  
Un momento en la tierra.*

NEZAHUALCÓYOTL

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TI-V participa en la separación de los torrentes arterial y venoso. Recientemente se ha demostrado que en la morfogénesis de sus tercios medio y apical intervienen las trabéculas ventriculares, siendo la interacción, adhesividad, aumento de volumen, diferenciación y proliferación de los miocitos los principales procesos básicos del desarrollo implicados (Contreras *et al.*, 2008a,b).

A pesar de la importancia de la multiplicación de las células en la generación y moldeado de los tejidos y órganos durante la embriogénesis, por varias décadas este conocimiento permaneció al nivel descriptivo, sin poderse investigar los mecanismos reguladores; esto debido, sobre todo, a problemas de orden metodológico. Sin embargo, con el advenimiento de las técnicas de biología y genética molecular se han descubierto algunas proteínas -factores de crecimiento- que regulan el ciclo celular de los miocitos cuya función parece depender de la presencia de gradientes logrados mediante procesos autocrinos y/o paracrinos. Algunos ejemplos son el FCF1, implicado en la proliferación y diferenciación del miocardio en etapas tempranas de la cardiogénesis (Yu *et al.*, 1990; Parlow *et al.*, 1991; Engelmann *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1998; Mima *et al.*, 1995; Pasumarthi *et al.*, 1995; Sugi *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1996) y la NRG cuya ausencia provoca alteraciones en el desarrollo de las trabéculas ventriculares (Gassmann *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Meyer y Birchmeier, 1995; Carraway III, 1996; Ericsson *et al.*, 1997; Zhao y Lemke, 1998; Rohrbach *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003). Estos hallazgos hacen al FCF y NRG excelentes candidatos para investigar el proceso de regulación de la proliferación e histodiferenciación de los miocitos responsables del desarrollo de los tercios medio y apical del TI-V. Sin embargo, antes de crear animales transgénicos o usar la infección retroviral para inhibir la actividad de los factores, es preciso determinar su patrón de expresión en espacio y tiempo y correlacionar los resultados con las zonas de multiplicación de los miocitos en los componentes embrionarios del TI-V.

## JUSTIFICACIÓN

El desarrollo embrionario del corazón es un tema complejo y de gran actualidad. A nivel mundial, 8 de cada 1000 recién nacidos presentan cardiopatías congénitas. Estudios epidemiológicos en México señalan que en niños menores de un año la muerte por estas enfermedades ocupa el tercer lugar. Actualmente se sabe que, del total de las cardiopatías congénitas, más del 30% corresponde a los defectos septales ventriculares (Soto, 1980). Algunos de estos son muy complejos y debido a su diversidad morfológica y funcional y a la escasa información de su embriogénesis, existen descripciones y clasificaciones muy confusas, determinando que éste sea un tema muy polémico de la cardiología pediátrica y de difícil solución mediante los estudios anatómicos en el humano.

Por otro lado, numerosas investigaciones destacan que los procesos de proliferación y apoptosis juegan un papel importante durante períodos críticos de la cardiogénesis. En el corazón embrionario se ha demostrado que la insuficiente proliferación o el exceso de apoptosis puede resultar, directa o indirectamente, en desarrollo anómalo de los ventrículos provocando hipoplasia miocárdica y cardiopatías congénitas (Anderson y Becker, 1981; Sánchez Gómez *et al.*, 1990; Li y Rozen, 2006). Sin embargo, para obtener información sobre la patología del TI-V, lograr una prevención y corrección, primero es preciso conocer los procesos básicos implicados en el desarrollo normal del tabique y determinar los mecanismos moleculares que los regulan. Esta información es indispensable para en el futuro planear estudios experimentales en condiciones *in vivo* mediante retrovirus, RNAi e incluso animales transgénicos.

## HIPÓTESIS

A pesar de que se sabe que los factores FCF1 y NRG y sus receptores ErbB2/4 y RCF1 intervienen en la regulación de la proliferación y/o apoptosis de los miocitos, no se ha determinado su presencia durante la morfogénesis de los tercios medio y apical del TI-V en el embrión de pollo. Suponemos que si estas proteínas están implicadas en el control de la proliferación y/o apoptosis de los miocitos de esta región del tabique, deben seguir un patrón espacio temporal que concuerde con dichos procesos.

*¿Con qué he de irme?  
¿Nada dejaré en pos de mí sobre la tierra?  
¿Cómo ha de actuar mi corazón?  
¿Acaso en vano venimos a vivir,  
a brotar sobre la tierra?  
Dejemos al menos flores  
Dejemos al menos cantos*

NEZAHUALCÓYOTL

## OBJETIVO GENERAL

Determinar, en el corazón del embrión de pollo, la distribución espaciotemporal de los factores de crecimiento FCF1 y NRG y sus receptores RFCF1 y ErbB2/4, en las trabéculas y paredes ventriculares y su correlación con las zonas de miocitos cíclicos y apoptóticos durante la embriogénesis normal de los tercios medio y apical del TI-V.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la distribución espacial y temporal de las zonas de miocitos cíclicos en la región ventricular del corazón de embrión de pollo durante el proceso de tabicación (Sts 18 al 30HH), empleando cortes histológicos seriados teñidos con hematoxilina y eosina (H-E) o procesados para detectar el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y BrdU.
2. Determinar en las mismas etapas la actividad proliferativa de los miocitos ventriculares mediante citometría de flujo.
3. Analizar en la región ventricular del corazón la distribución espacial y temporal de las zonas de muerte celular mediante TUNEL *in situ*, marcaje con Liosotracker e inmunolocalización de marcadores de apoptosis (Fas, Ligando de Fas, Caspasa 8, Bcl-2, Bax).
4. Establecer por Western blot, citometría de flujo e inmunolocalización el patrón de distribución espacial y temporal del factor de crecimiento FCF1 y su receptor RFCF1 en la región ventricular del corazón embrionario de los Sts 18HH a 30HH
5. Estudiar mediante Western blot, citometría de flujo e inmunolocalización, la distribución espacial y temporal de NRG y el heterodímero del receptor ErbB2/4.
6. Determinar la distribución espacial y temporal del RNAm de NRG, usando RT-PCR e hibridación *in situ*.
7. Correlacionar los patrones espaciotemporales de proliferación y apoptosis de los miocitos ventriculares durante la tabicación cardiaca con la distribución de los factores FCF1 y NRG y sus respectivos receptores RFCF1 y ErbB2/4.

## MATERIAL Y MÉTODO

### I.1 Material Biológico

Se usaron huevos fértiles de la especie *Gallus domesticus* que fueron incubados a 37°C y 86% de humedad para obtener embriones de los Sts 18, 20, 22, 24, 26, 28 y 30HH. La edad se determinó de acuerdo con la clasificación de Hamburger y Hamilton <sup>1951</sup> (HH) que relaciona la cronología con la morfología del embrión. Consideramos como el parámetro más importante la morfología cardiaca.

### I.2. Anticuerpos.

anti-FCF (H-125) IgG de conejo policlonal, Santa Cruz , C.A., anti-HRG (C-20) IgG de conejo policlonal, Santa Cruz , C.A., anti-ErbB4 (c-18) IgG de conejo policlonal, Santa Cruz , C.A., anti-ErbB2 (c-18, NEU) IgG de conejo policlonal, Santa Cruz , C.A., anti-Bcl-2 IgG de conejo policlonal, Santa Cruz , C.A., anti-Bax IgG de conejo policlonal, Santa Cruz , C.A., anti-Caspasa 3 IgG de conejo policlonal, Santa Cruz , C.A., anti-Caspasa 8 IgG de conejo policlonal Santa Cruz , C.A., anti-Fas IgG de conejo policlonal Santa Cruz , C.A., anti-Fas Ligando IgG de conejo policlonal Santa Cruz , C.A., anti-RFCF (VBS-7) IgG<sub>1</sub> de ratón monoclonal, Oncogene Research Products USA. anti-PCNA (pc-10) IgG<sub>2a</sub> de ratón monoclonal, BioGenex USA., anti-BrdU (MBG 6H8) IgG de ratón monoclonal, Roche, Alemania.

## II. METODOS

### II.1. Inclusión en paraplasto.

Los corazones fueron perfundidos y mantenidos en diferentes soluciones fijadoras durante 24 horas, dependiendo de la técnica a la que se someterían posteriormente. Estudios histológicos, Bouin alcohólico (apéndice II.1). Inmunohistoquímica, BrdU formol 3.5% en PBS (apéndice II.2). TUNEL e Hibridación *in situ*, paraformaldehído 4% en PBS (apéndice II.3). Transcurrido el tiempo, los órganos se deshidrataron empleando una serie de alcoholes graduales, se transparentaron en aceite de cedro y se incluyeron en Paraplasto (Oxford Labware) (apéndice I.1).

## **II.2. PATRÓN DE MIOCITOS CÍCLICOS.**

### ***II.2A. Citometría de flujo para la determinación de la actividad proliferativa.***

#### **II.2A.1. Obtención de miocitos cardiacos.**

Los corazones se lavaron con solución de Ringer (apéndice II.4) para eliminar el exceso de sangre, inmediatamente fueron disectados para obtener la región ventricular, eliminando los atrios, tracto de entrada y tracto de salida. Inmediatamente las muestras fueron sometidas a digestión, sumergiéndolas 15min. en solución de perfusión (apéndice II. 5) suplementada con etilen glicol tetraacetato ácido (EGTA) y 30 min. en una mezcla de colagenasa (2 mg/mL.) y EGTA, incrementando gradualmente la concentración (0.5mM a 2.5mM). Después las células se disgregaron mediante agitación suave por 30seg y subsecuentemente se filtraron a través de una membrana de 50µm de porosidad. El filtrado se centrifugó 5 min a 55x g. El botón celular se resuspendió en DMEM con suero fetal al 10%. Se cuantificaron las células usando una cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fases, (Olympus CK2, Tokyo, Japón). El material celular de cada etapa fue almacenado a -70°C (apéndice II.6) hasta su uso.

#### **II.2A.2. Citometría de Flujo**

La suspensión de células previamente obtenida, se descongeló y lavó en PBS 1X (apéndice II.7). Se tomaron muestras de  $5.0 \times 10^5$  células de cada etapa del desarrollo (apartado II.2A.1) y se centrifugaron a 400x g durante 5min a temperatura ambiente. Posteriormente, basados en las instrucciones del fabricante del kit CycleTEST™ (Becton Dickinson Co. California USA), se realizó la digestión de la membrana celular y citoesqueleto, adicionando solución de tripsina en tetrahidrocolato de espermicina, seguida de agitaciones suaves. El proceso de digestión se detuvo incubando las muestras 10min. en solución de inhibición. La tinción de los núcleos se realizó incubando las muestras 10 min. en solución de yoduro de propidio, en la oscuridad y en frío (2 a 8 °C). Finalmente las suspensiones fueron filtradas a través de una malla de nylon de 50µm; el sobrenadante fue depositado en tubos de 12 x 75mm. Los controles consistieron

en la ausencia de la tinción. Aproximadamente 10,000 eventos de cada etapa fueron leídos en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Co. California USA), empleando el programa de captura CellFIT. Las lecturas fueron realizadas en el canal de detección FL2. Los resultados fueron analizados en el programa ModFit LT (Becton Dickinson, Co. California USA), presentados en gráficas de puntos. El índice de DNA (ID) fue determinado al dividir el valor de fondo entre las células de la poblaciones en  $G_0/G_1$ .

## **II.2B. Estudios histológicos.**

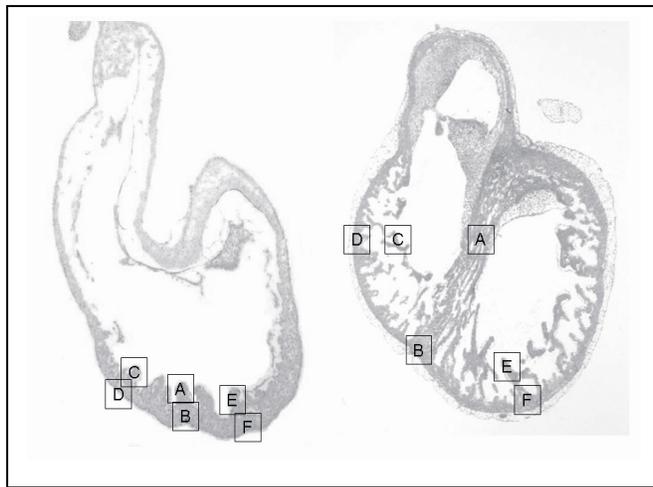
Para establecer la ubicación de los miocitos cíclicos en la región ventricular del corazón embrionario durante la tabicación, se empleó un total de 21 corazones incluidos en paraplasto, 3 de cada uno de los siguientes Ests: 18, 20, 22, 24, 26, 28 y 30HH. Se hicieron cortes seriados en el plano frontal de 5  $\mu\text{m}$ . Las laminillas una vez desparafinadas con xileno y rehidratadas con una serie gradual de etanol, se lavaron en agua destilada y tiñeron empleando la técnica de Hematoxilina y Eosina establecida en el laboratorio (Pliego, 2003) (apéndice I.2).

Se seleccionaron aquellas preparaciones en las que estaban presentes las trabéculas y el TI-V en desarrollo. Se estableció una regionalización de los componentes embrionarios del TI-V para su análisis considerando un campo microscópico de las siguientes zonas (Esquema 1):

- A. Zona cefálica de la trabécula central (Sts 18-22HH), del TI-V en desarrollo (Sts 24-28HH) o límite entre los tercios basal y medio del TI-V (Est 30HH)
- B. Zona caudal de la trabécula central (Sts 18-22HH) o del TI-V en desarrollo (Sts 24-30HH)
- C. Extremo cefálico de la trabécula más distal del VD, adyacente a la trabécula central (Sts 18-22HH), o al TI-V en desarrollo (Sts 24-30HH)
- D. Extremo caudal (adyacente a la pared libre) de la trabécula más distal del VD
- E. Extremos cefálico de la trabécula más distal del VI, adyacente a la trabécula central (Sts 18-22HH), o al TI-V en desarrollo (Sts 24-30HH)
- F. Extremo caudal (adyacente a la pared libre) de la trabécula más distal del VI

Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico Olympus. Se tomaron fotografías con una cámara digital, usando un ocular 10X y un objetivo 100X. Considerando el tamaño del órgano y el volumen de los miocitos que lo componen, para evitar evaluar una misma célula en cortes contiguos, se examinó un corte de cada tres (Moreno, 1998)

En las fotografías se cuantificaron los núcleos de miocitos (TN) y los miocitos mitóticos (MM), y se calculó el índice Mitótico (IM) usando la formula  $IM = (MM) \times 100 / TN$



Esquema 1. Representación de las regiones analizadas durante en el desarrollo del tabique interventricular. A,B) Extremo superior e Inferior de la trabecula y tabique en desarrollo. C,D) Trabécula del ventrículo derecho. E,F) Trabécula del ventrículo izquierdo.

## II.2C. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Para determinar el patrón de expresión espaciotemporal de PCNA en la región ventricular del corazón embrionario (Sts 18-30HH), se obtuvieron cortes seriados en el plano frontal de 5  $\mu$ m. Las laminillas una vez desparafinadas, rehidratadas y lavadas en PBS, se trataron con amortiguador de citratos (Biogenex, USA) y se sometieron a 20-25 lbs de presión por 5min para recuperar los antígenos del tejido. Después de tomar la temperatura ambiente, las preparaciones se lavaron con PBS-Tween 20 (PBS-T20) y se incubaron 10 min. con una solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA). Inmediatamente se decantó el bloqueador y las preparaciones se incubaron por 20 min. en una cámara húmeda, a temperatura ambiente, con el anticuerpo primario Anti-PCNA diluido en PBS-T20. Se realizó un control negativo, incubando las muestras con PBS y

bloqueador de proteínas. Una vez lavados los cortes con PBS-T20 se incubaron por 20 min. con el polímero anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP) o con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). La reacción enzimática en la histoquímica fue revelada empleando la solución de sustrato-cromógeno por 10 min. y contrastada con Hematoxilina, usando Entellan como medio de montaje. Las muestras fluoresceínadas fueron tratadas con RNAsa A durante 20 min, lavadas con una solución SSC 2X (apéndice II.8) y contrastadas con azul de Evans (tinción citoplasmática), empleando vectashiel (Vector, USA) como medio de montaje e incrementador de la fluorescencia (Portales y González, 1997).

### **II.2D. Marcaje del corazón con BrdU.**

Se obtuvieron embriones de los Sts 18 a 30HH, en condiciones *in vivo e in ovo* con una jeringa de insulina se les inyectó en el corazón una solución de BrdU 1:1000 en PBS, (10U p / embrión), basados en la técnica descrita en 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit (Roche, Alemania). Los embriones se reincubaron a 37°C por 1h. Posteriormente las muestras fueron lavadas con Ringer, fijadas y procesadas para incluirse en paraplástico. Los cortes seriados después de desparafinados y rehidratados se lavaron con agua destilada y con PBS, se incubaron con anti-BrdU conjugado con HRP o FITC y se procesaron como se indicó en el apartado II.2.B.

El análisis del patrón de expresión de PCNA y BrdU se llevó a cabo siguiendo la misma regionalización del corazón y método mencionados en los estudios histológicos. En este caso se cuantificaron los núcleos de miocitos (TN) y los miocitos positivos a PCNA o BrdU. Se calculó el índice respectivo (I-PCNA, I-BrdU) con la misma fórmula empleada para calcular el índice mitótico.

### **II.3. PATRÓN DE MIOCITOS APOPTÓTICOS**

Para establecer la ubicación de las células en procesos de apoptosis se hicieron estudios de Tunel *in situ*, marcaje con lisotracker e inmunohistoquímica

***II.3a. TUNEL in situ.***

Tres corazones de cada etapa de estudio incluidos en paraplástico fueron cortados en serie a 8µm. Después de desparafinadas e hidratadas las laminillas se trataron con proteinasa K por 15min a temperatura ambiente, seguido de varios lavados con PBS. Posteriormente se trataron con solución de equilibrio (10 seg.). Se adicionó la solución de reacción con enzima TdT y se incubó por una hora a 37°C. La actividad de la enzima fue detenida con solución de paro y se adicionó anti-digoxigenina (DIG) conjugado con HRP. El material se procesó de manera similar a lo descrito en el apartado II.2b.

***II.3b. Marcaje con Lisotracker.***

Tres embriones de cada estadio fueron seleccionados para obtener el corazón. Los corazones una vez lavados con Ringer estéril, fueron incubados con 5µM de solución de Lysotracker en PBS (Molecular Probes, USA) a 37°C durante 20 a 30min. Después los órganos fueron fijados con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 2h. Para determinar el marcaje en los distintos componentes embrionarios, cada corazón fue disectado en cuatro cámaras y analizados en un microscopio estereoscópico con epifluorescencia "Stero Lumar V12 (Zeiss, Alemania) en el canal 3 (rojo), mediante el programa de Axiovision LE rel 4.4.

***II.3c. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia***

Se empleó un total de 21 corazones incluidos en paraplástico, (3 de cada etapa de estudio) para determinar mediante inmunodetección el patrón de expresión de los marcadores apoptóticos Fas, Ligando de Fas, Bcl-2, Bax, Caspasas 3 y 8. Se siguió el método descrito en el apartado II. 2B.

***II.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES******II.4A. Análisis del patrón de distribución espacio temporal de FGF1 y RFGF1.******II.4A.1. Western blot***

La región ventricular fue tratada con una solución de lisis celular (apéndice II.9). El lisado se centrifugó 15,000x g por 15min a 4°C., se recupero el sobrenadante.

Posteriormente, el lisado se cuantificó por el método de Lowry, para asegurar una concentración equivalente de 50µg por carril. Cada muestra se diluyó en amortiguador de carga (Laemli para SAS-PAGE), se desnaturizó a 95°C durante 5 minutos y se resolvió por electroforesis en un gel de acrilamida al 12%, con pesos moleculares preteñidos en paralelo. El sobrenadante se cuantificó por el método de Lowry. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (protran ba-83, Schleircher and Schuell, Inc., Keene, nh). Cada membrana se bloqueó ( 5% de leche en polvo baja en grasas en PBS.-T) y se incubaron con anticuerpo primario (anti-FCF1 o anti-RFCF1) diluidos en amortiguador de bloqueo 1:1000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados en PBS-Tween las membranas se incubaron con un anti-conejo o anti-ratón acoplado a peroxidasa diluido en solución de bloqueo. Después de tres lavados con PBS-T20 se adicionó un sustrato quimioluminiscente de acuerdo al manual del Western Blot Luminol Reagent (Santa Cruz, C.A.). El revelado se logró exponiendo brevemente (30 a 80 seg.) la membrana a una película fotográfica (Kodak MR film). Las membranas fueron fotografiadas, la Densidad Óptica (DO) fue analizada con el programa ImagenJ 1.39u (Nacional Institutes of Health, USA).

#### **II.4A.2. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.**

Cortes histológicos en serie de 8µm fueron procesados para detectar por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia la presencia de FCF1 y RFCF1, mediante el método descrito en el apartado II. 2B

#### ***II.4B. Patrón de distribución espacio temporal de NRG1 y ErbB2/4.***

##### **II.4B.1. Western blot**

Se extrajo la proteína total de la región ventricular siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. Después de bloquear las secuencias inespecíficas la membrana de nitrocelulosa se incubó 2 hrs. a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (anti-HRG, anti-ErbB2 o anti-ErbB4) a una dilución de 1:1000. Después de lavar con PBS-T20 se adicionó e incubó el anti-conejo conjugado con HRP durante 2hr. La reacción se reveló

exponiendo brevemente la membrana a una película fotográfica (Kodak MR film) y se tomaron fotografías en donde se determino la D O.

#### **II.4B.2. Citometría de flujo.**

Se emplearon muestras de  $10 \times 10^6$  células haciendo el proceso por triplicado. Cada tubo fue incubado 30 min. con el anticuerpo primario (anti-HRG o anti-ErbB2 o anti-ErbB4), el cual fue acoplado al anticuerpo secundario anti-conejo conjugado FITC, mediante una incubación de 30 min. Posteriormente se incubó el anti-MF20, seguido del anti-ratón asociado a Isotiocianato de Tetrametil Rodamina (TRITC) por 30 min. Entre cada incubación se realizaron centrifugaciones y lavados breves. Los controles consistieron en la ausencia de cada uno de los anticuerpos. Finalmente las células fueron lavadas y fijadas con formol en PBS 2.5 %. Se adquirieron aproximadamente 5,000 eventos/ tubo en un citómetro de flujo DDM-equipped FACScan (Vector Dickinson, Co. California USA) utilizando el programa CellFIT. Los canales empleados fueron FL1 para FITC y FL2 para TRITC. Se determinó el promedio y porcentaje de marcaje, los resultados fueron presentados en histogramas.

#### **II.4B.3. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.**

Cortes seriados de  $8\mu\text{m}$  se emplearon para detectar por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia la presencia de NRG1 y el receptor ErbB2/4 con el método descrito en el apartado II.2B, empleando los anticuerpos en dilución 1:50. Se usaron 3 corazones de cada etapa.

En las inmunohistoquímica de los factores y receptores, se evaluó la presencia de los factores en los distintos componentes celulares (miocardio, endocardio y epicardio). El método de análisis consistió en establecer cuatro grados de positividad: +++ células con alta positividad al antígeno, ++ células con señal media, + células con señal muy baja, +/- células con escasa señal y - células sin señal.

La inmunofluorescencia de los factores y receptores fueron analizadas en un microscopio Confocal (Zeiss, Axiovert) empleando el programa de captura y análisis de la intensidad, LSM 510-2.5 software (Carl Zeiss, Goettingen,

Germany). Para la captura de la imagen se utilizaron los Láser de 488nm y 543nm, así como filtros de pase corto (BP 505-530) para FITC y pase largo (LP 560) para las tinciones de contraste del núcleo. Los valores de intensidad se determinaron en cada una de las imágenes tomadas a 1000x, para ello se trazó la barra que mide intensidades y se obtuvieron los datos. De cada imagen se determinó la sumatoria, la cual fue dividida entre el total de imágenes de cada grupo para obtener el promedio de intensidad. El promedio de cada uno de los factores estudiados y sus receptores en los distintos estadios fueron representados en Gráficas.

#### ***II.4B4. RT-PCR de NRG.***

##### **II.4B.4a. Extracción de DNA de corazón adulto y RNA total del corazón embrionario de pollo.**

Las regiones ventriculares de los corazones de embriones de cada etapa fueron obtenidas, inmediatamente lavadas con solución de Ringer y mantenidas en medio de congelación hasta su uso. El fragmento de corazón adulto y las muestras de cada grupo de corazón embrionario se usaron para extraer DNA y RNA total, basados en el protocolo de extracción de DNA purification system y RNAagents Kit (Promega, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los tejidos se colocaron en solución desnaturante y se trituraron en frío. Posteriormente se adicionó acetato de sodio 2M, pH4.0. El material se depositó en mini columnas de 1.5ml y se centrifugó 3 min a 13,000x g. Cada columna fue tratada con una mezcla de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, por 15min; se centrifugaron a 13,000x g por 3 min. y se transfirieron a un tubo nuevo. El ácido nucleico (DNA o RNA) fue recuperado adicionando a cada columna agua libre de nucleasas y centrifugando a 13,000x g por un 3 min. El material fue almacenado en viales y congelado (-20 a -70 °C). La pureza de los extractos se corroboró por electroforesis en un gel de agarosa 1.5%. La concentración de ácidos nucleicos extraídos se determinó mediante la absorbancia a 260nm.

**II.4B.4b. PCR de NRG1.**

La efectividad de los iniciadores fue corroborada por PCR, empleando el DNA de corazón de pollo adulto (200ng/μl). Para ello se usaron los iniciadores azarosos (Invitrogen Life Technologies, USA). Los fragmentos específicos de DNA fueron amplificados por PCR (40 ciclos). Los PCRs fueron realizados en un volumen total de 50μl de solución que contenía 0.5 unidades de Taq polimerasa, 25pmol de los iniciadores 5' y 3', 2.5mM de dNTPs y 10X de solución de reacción Taq, 25mM de Cl<sub>2</sub>Mg. El dominio yuxtamembranal de NRG1 de pollo fue amplificado con el iniciador JM5' (GGA TGC TGC TGC TAC TGT CA) y con el JM3' (ACA TCA TCC GAA CTG GGA GA). La reacción de PCR se realizó siguiendo los siguientes pasos, la primera desnaturalización a 94°C por 2min, con subsecuentes ciclos de 30seg a 94°C, extensión a 60°C y desnaturalización a 68°C. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2%. Las bandas se hicieron evidentes tiñendo con bromuro de etidio y se visualizaron en una cámara de luz UV.

**II.4B.4c. RT-PCR de NRG1.**

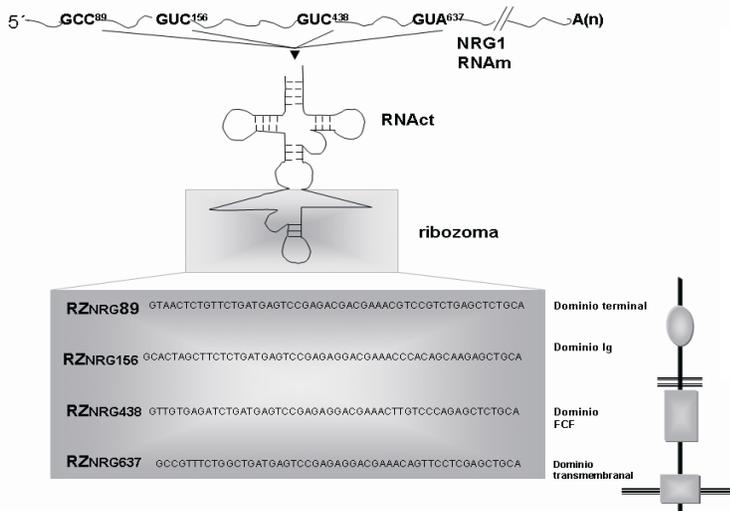
Trescientos ng/μl de RNA total de cada estadio fueron convertidos en cDNA con la enzima transcriptasa reversa AMV, siguiendo las instrucciones del fabricante Access RT-PCR System (Promega, USA). Para ello, se emplearon iniciadores azarosos (Invitrogen Life Technologies, USA). Los fragmentos específicos de cDNA fueron amplificados con 40 ciclos de PCR. La reacción de PCR fue realizada en un volumen total de 50μl que incluyó Tfl DNA polimerasa (5 U/μl), AMV transcriptasa reversa (5 U/μl), solución de reacción AMV/Tfl (5X), mezcla de dNTPs (10mM) y Cl<sub>2</sub>Mg (25mM). Se empleó como testigo de la reacción los primer sentido y antisentido del kit y el control negativo fue agua. El dominio yuxtamembranal del cDNA de NRG1 de pollo fue amplificado empleando 25pmol de los iniciadores JM5' y JM3'. La transcripción fue realizada a 45°C por 45min, posteriormente se realizó la desnaturalización del cDNA a 94°C por 2 min, con subsecuentes ciclos de 30seg a 94°C, extensión a 60°C y desnaturalización a 68°C. Los productos de PCR se separaron y visualizaron siguiendo el mismo

método descrito en el apartado II.4B.4b. Se empleo marcador de peso de 100 a 1000kb.

**II.4B.5. Hibridación in situ.**

**III.4B.5a. Diseño de la ribozonda**

Basados en los datos obtenidos a través del Banco Genómico (Gen-Bank) en la página de internet [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), los datos de Zhao y Lemke, <sup>(1998)</sup> y mediante el uso del programa de cómputo Vector NT-1 Versión 7, se determinó que la secuencia más conservada de la NRG1 se ubica en el dominio similar a las inmunoglobulinas a partir del nucleótido 156 rico en GUC (Esquema 2). Se seleccionó la secuencia 5'TTGGTTCACTTAATCCG3' y se diseño en Bioelec, USA. La sonda fue marcada en el extremo 3' con DIG empleando la enzima desoxirribonucleotidil transferasa (TDT) (Roche, Alemania), de acuerdo con el procedimiento de marcaje de oligonucléotidos descrito por Gorodezky (1999).



Esquema 2. Diagrama de la ribozima tRNA de NRG1 y sus 4 sitios en el RNAm de NRG1. en el recuadro de inferior se observa las secuencias de cada dominio específico para la neuregula, los números indican la posición del nucleótido.

**II.4B.5b. Reacción de hibridación in situ**

Cortes histológicos de 8µm previamente desparafinados e hidratados fueron tratados con Proteinasa K 12 min a 37°C. La actividad de la enzima fue detenida con glicina al 0.2% en PBS-TX, seguida de varios lavados en PBS. La posfijación se realizó con una mezcla de paraformaldehído:gluteraldehído 4:0.2. Al finalizar los lavados se incubó durante 1h a 70°C en solución de Prehibridación (apéndice II.10). La hibridación se realizó incubando las preparaciones toda la noche a 42°C

en una mezcla de solución de prehibridación adicionada con 200 ng de la sonda marcada. Cada laminilla se cubrió con parafilm para evitar la desecación. Al día siguiente, las preparaciones se lavaron con formamida al 50% en SSC 2X y con SSC 4X. Posteriormente la actividad endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 0.1% por 5 min. Para evitar la inespecificidad de la reacción, las muestras se trataron por 10 min. con solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA) a temperatura ambiente. Después se incubaron con anti-DIG acoplado a HRP diluido 1:100 en PBS, durante 1hr. Finalmente la reacción fue obtenida al adicionar la solución del cromógeno conjugado con DAB. Los núcleos fueron contrastados con hematoxilina y se empleó entellán como medio de montaje. En este caso, se evaluó la reacción estableciendo cuatro grados de positividad: +++ células con alta positividad, ++ células con señal media, + células con señal muy baja, +/- células con escasa señal y - células sin señal (Sambrook y Russell, 200, Segura *et al.*, 1997)

## RESULTADOS

### A. DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE MIOCITOS CÍCLICOS DURANTE LA SEPTACIÓN CARDIACA.

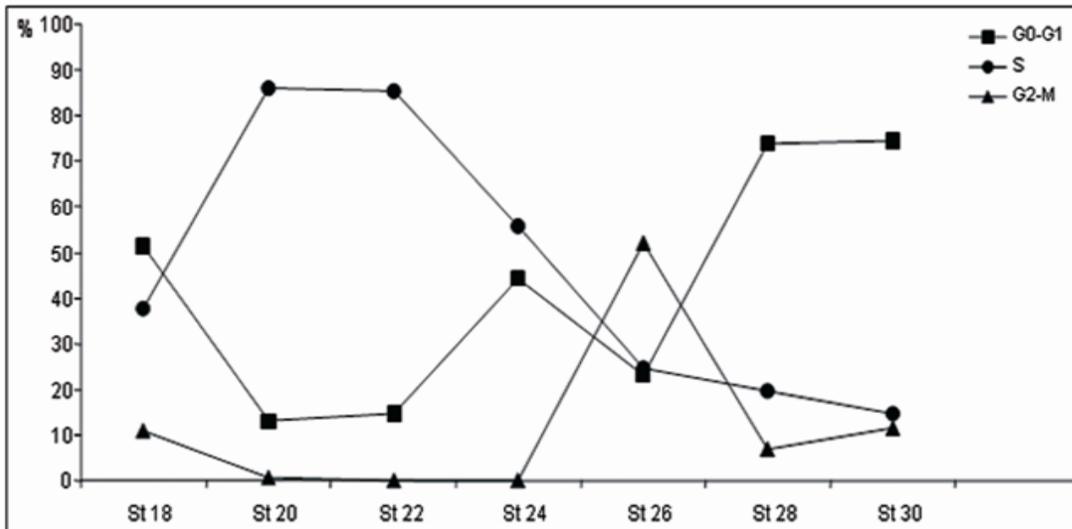
La cuantificación de las distintas fases del ciclo celular determinada por citometría de flujo en células de la región ventricular durante el desarrollo del TI-V está representada en la gráfica 1. En ella se observa que la fase de síntesis de DNA (S) fue mayor del 80% en los Sts 20 a 22HH, posteriormente dicho porcentaje decayó hasta un 20% en los Sts 28 a 30HH. El promedio de miocitos en fase G2-M se mantuvo por debajo del 10%, excepto en el Stadio 26HH. Finalmente la tendencia de miocitos en fase G1-G0 fue mayor del 50% al inicio del estudio, luego entre el 20 a 26HH decayó hasta el 15% incrementándose hasta un 70% entre 28-30HH (Tabla 1, gráfica 1). El índice de DNA determinado para cada St fue: 18HH=1.34; 20HH=1.89; 22HH=1.57; 24HH=1.46; 26HH=1.55; 28HH=1.37; 30HH=1.39.

El patrón espacio-temporal de crecimiento del TI-V se determinó analizando conjuntamente las características morfológicas de la región ventricular del corazón embrionario, los índices mitótico (I-M), de expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (I-PCNA) y de incorporación del marcador de nucleótidos Bromo-desoxi-uridina (I-BrdU). Cabe destacar que durante todo el periodo de estudio, los índices mitótico y BrdU fueron bajos comparados con los de PCNA (Tabla 2, Figs.1-4 B,C,F,G). A pesar de esto, presentaron un patrón diferenciado en ambos extremos del tabique en desarrollo, como sucedió con I-PCNA (Gráfica 2). En los tres casos, los valores siempre fueron bajos en el extremo superior del tabique (Tabla 2, Gráfica 2A, Figs. 1D,2D,3D,4D) y mayores en las paredes ventriculares y extremo inferior (Tabla 2, Gráfica 2B, Figs. 1E,2E,3E,4E).

Tabla 1. Distribución de la actividad cíclica en la región ventricular, durante la tabicación cardiaca.

Estadios	%G0-G1	% S	% G2-M
18HH	51.31	37.84	10.85
20HH	13.22	86.04	0.74
22HH	14.76	85.24	0
24HH	44.22	55.78	0
26HH	23.12	24.73	52.15
28HH	73.69	19.6	6.71
30HH	74.34	14.5	11.6

### ACTIVIDAD CÍCLICAS DE LA REGIÓN VENTRICULAR



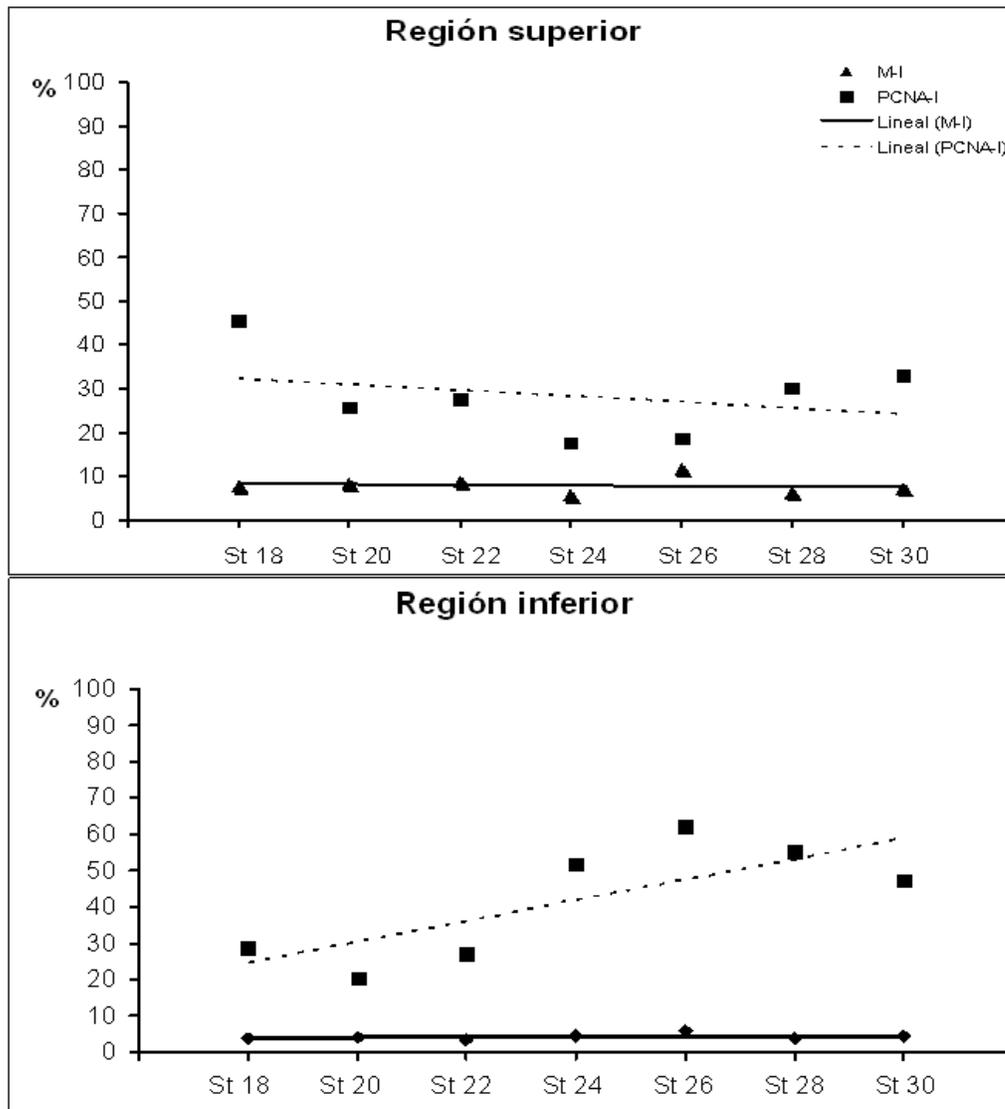
Gráfica 1. Determinación de la actividad cíclica en la región ventricular durante el proceso de tabicación por citometría de flujo. Observe que entre los estadios 20 a 24HH la fase de síntesis (S) es predominante. En el estadio 26HH la fase G<sub>2</sub>-M es más importante. Finalmente entre los estadios 28 a 30HH la mayoría de las células se localizan en fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>. St=Estadios del desarrollo basados en Hamburger and Hamilton.

Tabla 2. Distribución espacial de miocitos cíclicos durante la tabicación cardiaca.

Estadios	I-M				I-PCNA				I-BrdU	
	RS	RI	PVD	PVI	RS	RI	PVD	PVI	RS	RI
18HH	3.7	7.8	6.1	4.1	45.4	28.8	21.4	23.4	–	–
20HH	4.3	8.3	7.1	6.3	25.9	20.6	28.2	24.7	15.5	33
22HH	3.5	8.9	7.3	7.1	27.6	27.2	31.2	32.6	13	36
24HH	4.6	5.8	4.3	6.1	17.7	51.7	45.6	49.5	2	12
26HH	6.03	11.6	11.4	10.2	18.2	62.1	43.7	46.4	2.4	11
28HH	3.7	6.1	8.06	6.6	30.2	55.3	54.6	69.4	3.6	6.4
30HH	4.4	7.3	6.4	8.4	33	47.3	77.5	61.6	2.8	4.6

I-M= Índice Mitótico, I-PCNA= Índice del Antígeno nuclear de proliferación, RI, RS= Región Superior e Inferior del tabique interventricular en desarrollo, PVD= Pared del ventrículo derecho, PVI= Pared del ventrículo izquierdo, Estadios= Estadios del desarrollo basados en Hamburger y Hamilton.

## DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE MIOCITOS CÍCLICOS DURANTE EL DESARROLLO DEL TI-V.



Gráfica 2. Distribución espacio-temporal de los miocitos cíclicos durante el desarrollo del tabique interventricular, determinada por los índices de la actividad mitótica (I-M) y la determinación del antígeno nuclear de proliferación (PCNA). St=Estadios del desarrollo basados en Hamburger and Hamilton. Note la pérdida de la actividad cíclica en la región superior, principalmente entre los estadios 22 a 28HH. (\_\_\_\_) tendencia lineal de I-M, (.....) tendencia lineal de I-PCNA.

**Sts 18-20HH.** En la región apical de ambos ventrículos sólo existen trabéculas escasamente desarrolladas, cubiertas externamente por una capa de células planas de endocardio con un núcleo oscuro bien definido (Fig. 1A). Las trabéculas constan de múltiples miocitos pequeños. En el St 22HH todas las trabéculas son más largas y se mantienen independientes, destacando la trabécula central sobre el surco interventricular. En el extremo inferior de cada trabécula se observa el inicio de la primera ramificación (Fig. 1B,C). Las paredes ventriculares están compuestas por una capa de dos o tres células miocárdicas, las cuales tienen citoplasma irregular con muy escasas miofibrillas pobremente organizadas, su núcleo es grande y claro con poca cromatina y su nucleolo es muy prominente, casi siempre paracentral (Fig. 1C), en la superficie adyacente al epicardio se notaron algunas mitosis. En este periodo, el extremo superior de la trabécula central mostró escasa positividad a PCNA, en contraste, en el extremo inferior el valor de I-PCNA fue cercano al 30%, (Gráfica 2B).

**Sts 22-24HH.** En la zona ventricular las láminas trabeculares, más cercanas al surco interventricular, se van uniendo paulatinamente a la trabécula central hasta formar una unidad denominada TI-V primitivo (TI-VP), en el que además se distinguen dos regiones (Fig. 2A). En el extremo cefálico (liso) se ubican miocitos con un núcleo más definido y mayor cantidad de citoplasma que los de la región caudal (ramificada) con miocitos pequeños, más abundantes que muestran algunas mitosis (Compare Figs 2B y 2C). En el St 24HH las laminas trabeculares además de mantenerse independientes son más ramificadas y constan de miocitos con abundante citoplasma y miofibrillas más organizadas, su núcleo es grande redondo u oval. El endocardio presenta células planas, con un núcleo bien definido. La pared que recubre al ventrículo derecho tiene 3 a 4 células de grosor y es más delgada que la del ventrículo izquierdo que tiene 5 a 6 células de espesor. En este caso los miocitos son muy similares a los del extremo inferior de la trabécula central. En este periodo se notó un aumento en el valor de I-PCNA tanto en el extremo posterior del tabique como en la superficie epicárdica de las paredes ventriculares (Tabla 2)

**Sts 26-28HH.** Un suceso importante de este periodo fue que hacia el St 28HH los cojines del canal A-V se habían unido con el TI-VP cerrando la comunicación al nivel de los tractos de entrada. Por su parte el TI-VP conservó sus dos zonas muy manifiestas (Fig. 3A). Los miocitos de la región cefálica forman un tejido muy compacto, su citoplasma es abundante, menos diferenciado que el de las trabéculas, su núcleo es grande (Fig. 3B). Por el contrario los miocitos de la región inferior, al igual que en las etapas anteriores, son más pequeños y abundantes, con poco citoplasma y un núcleo grande (Fig. 3C). Las ramificaciones de las laminas trabeculares son muy abundantes, compuestas por una capa de tres o cuatro miocitos. La pared del ventrículo derecho continúa siendo más delgada que la del ventrículo izquierdo. En ambos casos comienza a establecerse un gradiente de diferenciación; los miocitos cercanos al endocardio tienen mayor cantidad de citoplasma con escasas miofibrillas relativamente organizadas y muy pocas células en mitosis, mientras que los adyacentes al epicardio tienen poco citoplasma menos diferenciado y al igual que el extremo inferior del TIV se observaron múltiples miocitos mitóticos. Tanto en el extremo posterior del tabique como en la superficie epicárdica de las paredes ventriculotes I-PCNA continuó incrementando (Tabla 2).

**St 30HH.** El TI-V se había completado, se cerró la comunicación interventricular también a nivel de los tractos de salida, de esta manera ya se han establecido los tres tercios del TI-V (Fig. 4A). El tercio medio es ligeramente compacto (Fig. 4B) y en el apical se observa que algunas trabéculas, adyacentes a las cavidades ventriculares, aun están en proceso de fusión al núcleo central. A lo largo de estos dos tercios existen grupos de miocitos que presentan abundante citoplasma y núcleo bien definido. En el tercio medio existe un mayor grado de diferenciación miocítica, que en el tercio apical (Compare Fig. 4B con 4C). Los miocitos de las trabéculas más alejadas del tabique, en ambos ventrículos, están más diferenciados. La pared del ventrículo derecho continúa relativamente más delgada que la del ventrículo izquierdo y el gradiente de diferenciación miocárdica es más evidente. Los índices mitóticos de los extremos del tabique así como de la pared izquierda incrementaron respecto a la etapa anterior. Respecto a I-PCNA

solo incrementó en la región posterior del tabique donde sobrepasó el 77% (Tabla2).

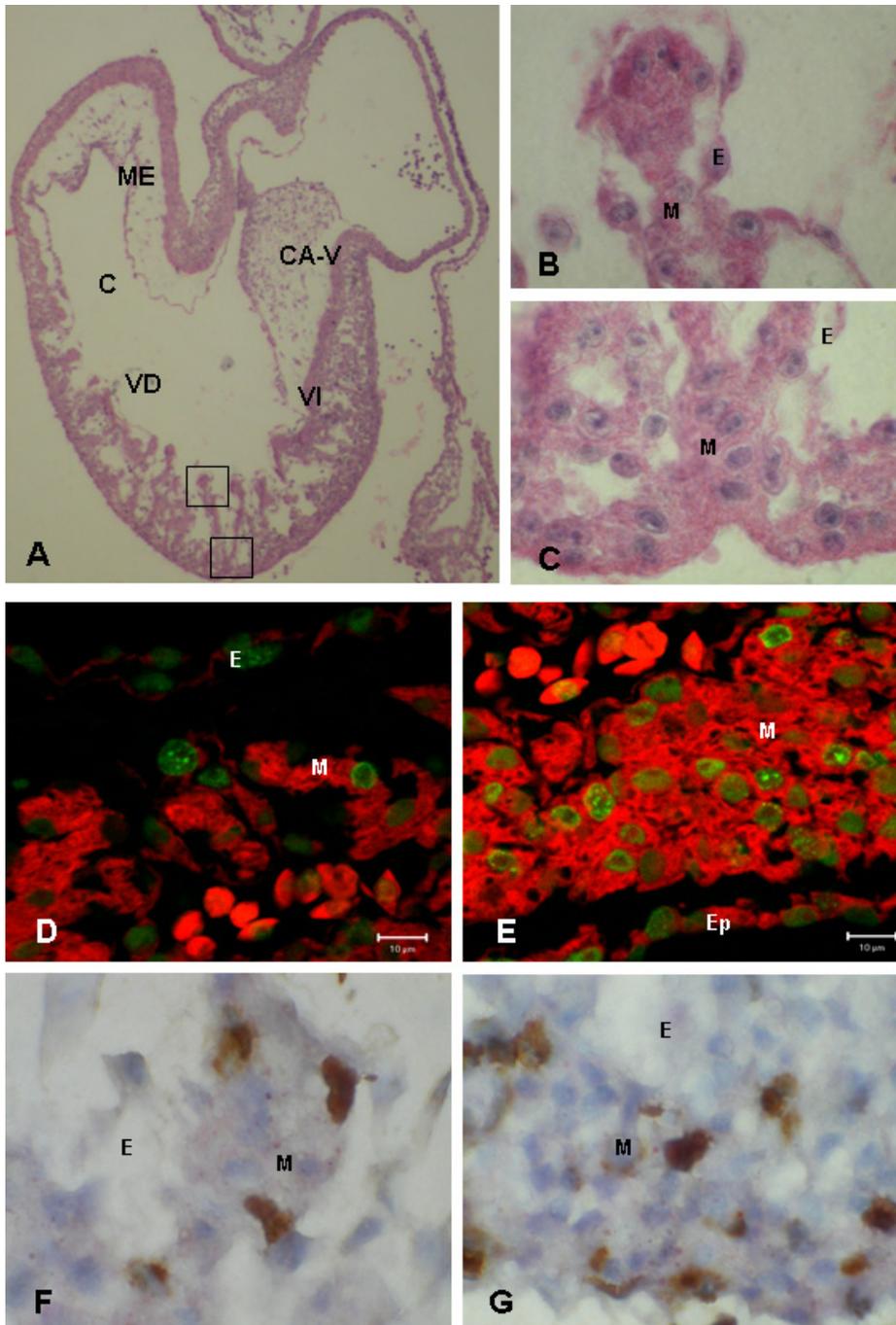


Fig. 1. Estudio de la actividad cíclica de los miocitos ventriculares del corazón de Embrión de pollo de estadio 18-20HH. Cortes histológicos en plano frontal. A) Vista panorámica (4X). B, C) Tinción con H-E. D, E) Inmunofluorescencia del antígeno nuclear de proliferación (PCNA) (canal verde) contrastando el citoplasma con azul de Evans (canal rojo) detectada por Microscopia Confocal. F, G) Inmunohistoquímica para determinar la expresión de Anti-Bromo deoxiuridina (BrdU), el citoplasma fue contrastado con hematoxilina. Los recuadros muestran la trabécula central ubicada arriba del surco interventricular, analizada en las micrografías B-G 100X. C= Región proximal del tracto de salida embrionario, CA-V=Canal atrio ventricular, E=Endocardio, Ep= Epicardio, M=Miocárdio ME=Mesenquima, T= Región distal del tracto de salida embrionario, VD= Ventrículo Derecho, VI=Ventrículo Izquierdo.

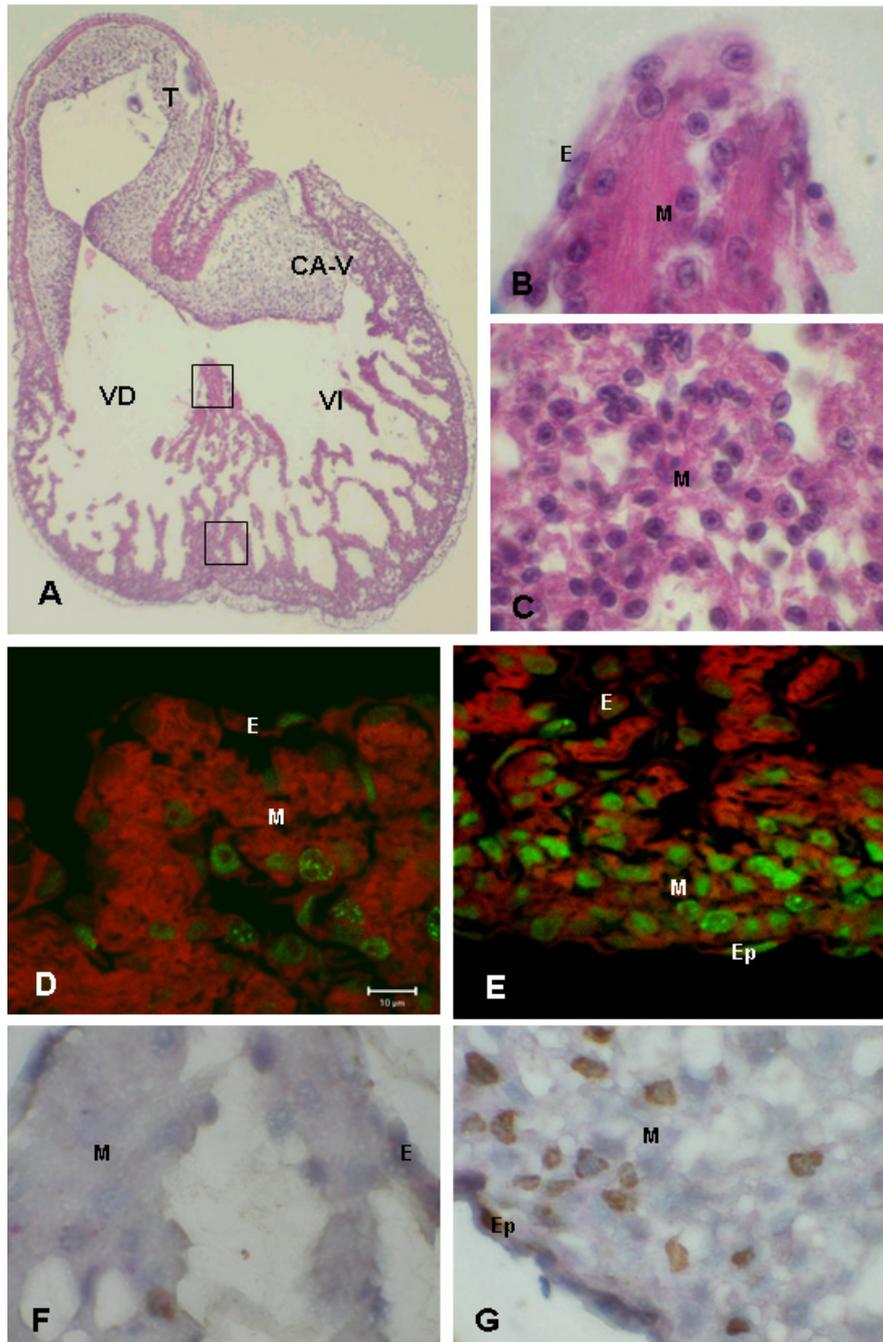


Fig 2. Análisis de la proliferación miocárdica del tabique interventricular en desarrollo de estadio 22-24HH. Cortes histológicos en plano frontal. A) Vista panorámica (4X). B, C) Tinción con H-E. D, E) Inmunofluorescencia del antígeno nuclear de proliferación (PCNA) en el canal verde contrastando el citoplasma con azul de Evans (canal rojo) detectado con Microscopia Confocal. F, G) Inmunohistoquímica para determinar la expresión de Anti-Bromo deoxiuridina (BrdU), el citoplasma fue contrastado con hematoxilina. Los recuadros muestran los extremos superior e inferior del tabique en desarrollo, ubicado sobre el surco interventricular, analizadas a 100X. Note en las diferentes técnicas que el extremo inferior del tabique en desarrollo además de tener mayor cantidad de miocitos, su actividad cíclica es mayor. Las siglas son similares a las indicadas en la Fig 1.

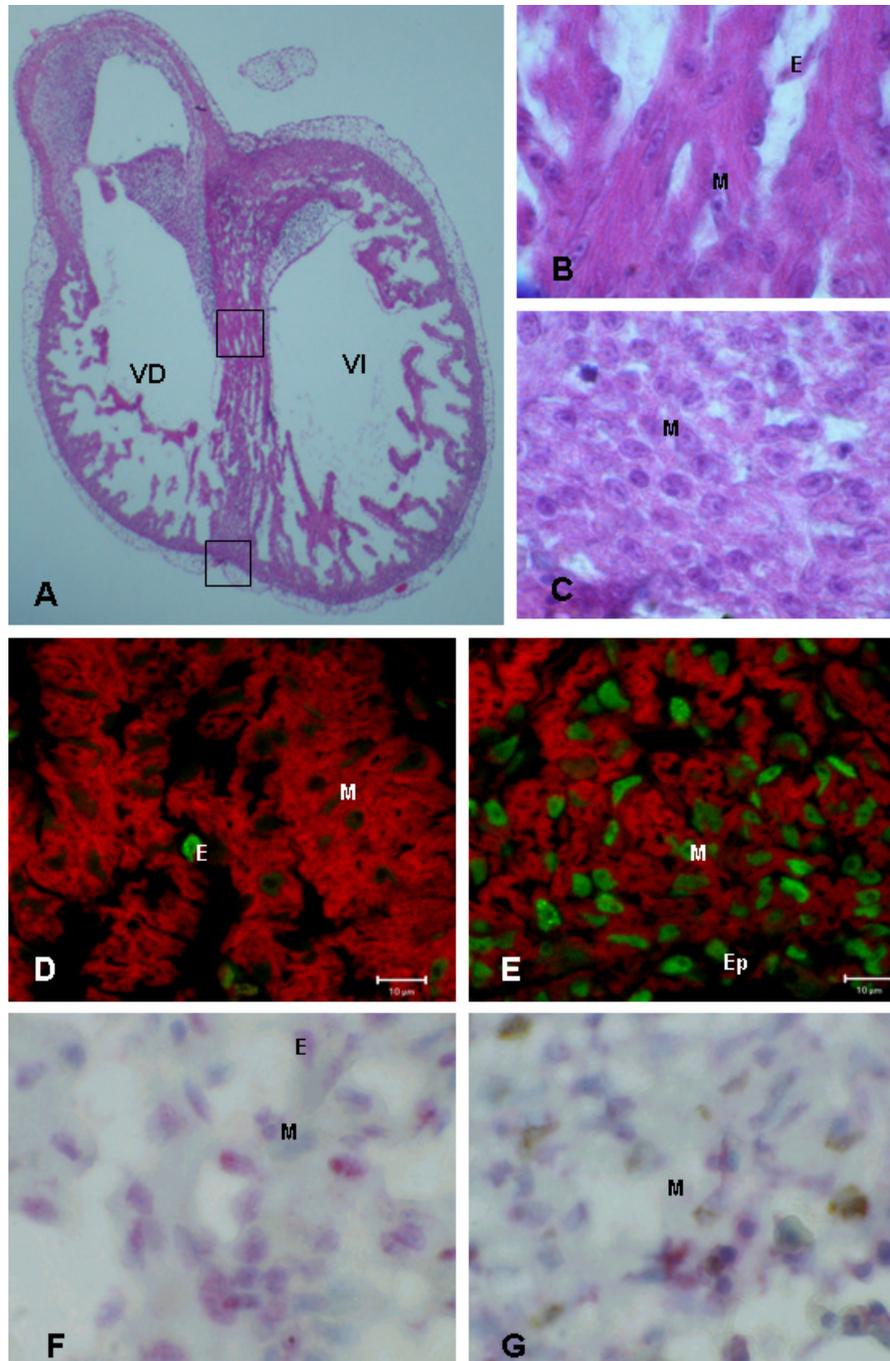


Fig 3. Regionalización de la actividad cíclica durante el desarrollo del tabique interventricular en el corazón de Embrión de pollo de estadio 26-28HH en cortes frontales. A) Vista panorámica (4X). B, C) Tinción con H-E. D, E) Inmunofluorescencia del antígeno nuclear de proliferación (canal verde) contrastando el citoplasma con azul de Evans (canal rojo) detectada por Microscopia Confocal. F, G) Inmunohistoquímica para determinar la expresión del Anti-Bromo deoxiuridina, el citoplasma fue contrastado con hematoxilina. Los recuadros indican los extremos superior e inferior del tabique ubicado arriba del surco interventricular, analizados a 100X. Observe que la comunicación a nivel de los tractos de entrada ya se ha cerrado, sin embargo ambos extremos del tabique conservan características histológicas distintas. El extremo inferior conserva mayor actividad cíclica. Las siglas son similares a las indicadas en la Fig 1.

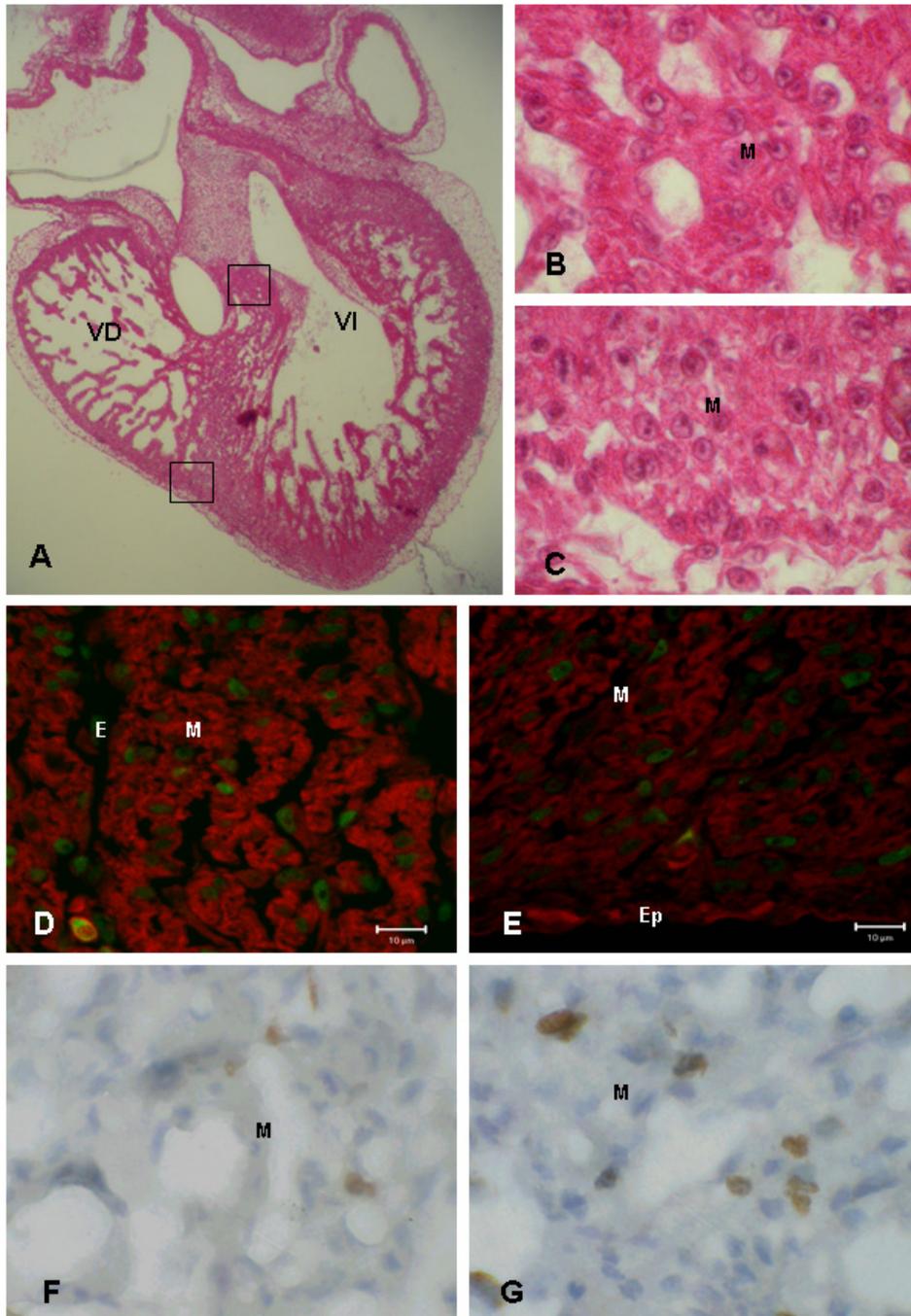


Fig 4. Expresión de la proliferación en el tabique de corazón de Embrión de pollo de estadio 30HH. A) Vista panorámica (4X). B, C) Tinción con H-E. D, E) Inmunofluorescencia del antígeno nuclear de proliferación (canal verde) contrastando el citoplasma con azul de Evans (canal rojo) detectada por Microscopia Confocal. F, G) Inmunohistoquímica para determinar la expresión del Anti-Bromo deoxiuridina, el citoplasma fue contrastado con hematoxilina. Los recuadros muestran los extremos superior e inferior del tabique analizados a 100X en las siguientes micrografías. Aprecie las diferencias histológicas entre ambos extremos, mientras que la actividad cíclica decae en el extremo inferior. Las siglas son las indicadas en la Fig 1.

## **B. DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LOS MIOCITOS APOPTÓTICOS**

Mediante la técnica de TUNEL *in situ* y marcaje con lisotracker se determinó la frecuencia de apoptosis. En ambas técnicas observamos muy pocas células apoptóticas cuya distribución no presentó un patrón regionalizado referente a las estructuras estudiadas. No obstante antes del St 24HH la señal fue casi nula, en comparación con los Sts 26HH a 30HH, sin notar alguna diferencia entre los ventrículos ni el TI-V desarrollado (Fig 5). Mediante el marcaje con Lisotracker a partir del St 24HH fue posible observar algunas células apoptóticas sobre la pared externa de los ventrículos, sobre el surco interventricular y escasa señal en las trabéculas (Fig. 6)

El análisis de la distribución de marcadores apoptóticos en la región ventricular del corazón embrionario empleando inmunohistoquímica mostró que durante todo el periodo de estudio (Sts 18-30HH) la proteína Fas y su ligando (L-Fas) están presentes en baja proporción en miocitos y son más abundantes en el endocardio (Figs 6, Tabla 3). La mayor expresión de Fas fue detectada entre los Sts 22 a 24HH (Fig. 6C), mientras que L-Fas fue más abundante entre los Sts 24 a 28HH (Fig. 6D,F). La señal de caspasa 3 fue intensa tanto en los núcleos del endocardio como en miocardio y epicardio entre los Sts 22 a 28HH (Figs 7C,E); en el St 30HH la señal decayó drásticamente y sólo algunas zonas del miocardio ventricular expresaron positividad al antígeno (Fig. 7G). Por otro lado, Bax fue encontrada en miocardio, endocardio y epicardio entre los Sts 18 a 24HH (Fig. 7B,D), a partir del St 26HH la señal fue disminuyendo hasta ser negativa en el St 30HH (Fig. 7F,H). La caspasa 8 y Bcl-2 no se detectaron durante todo el período de estudio (Fig. 8).

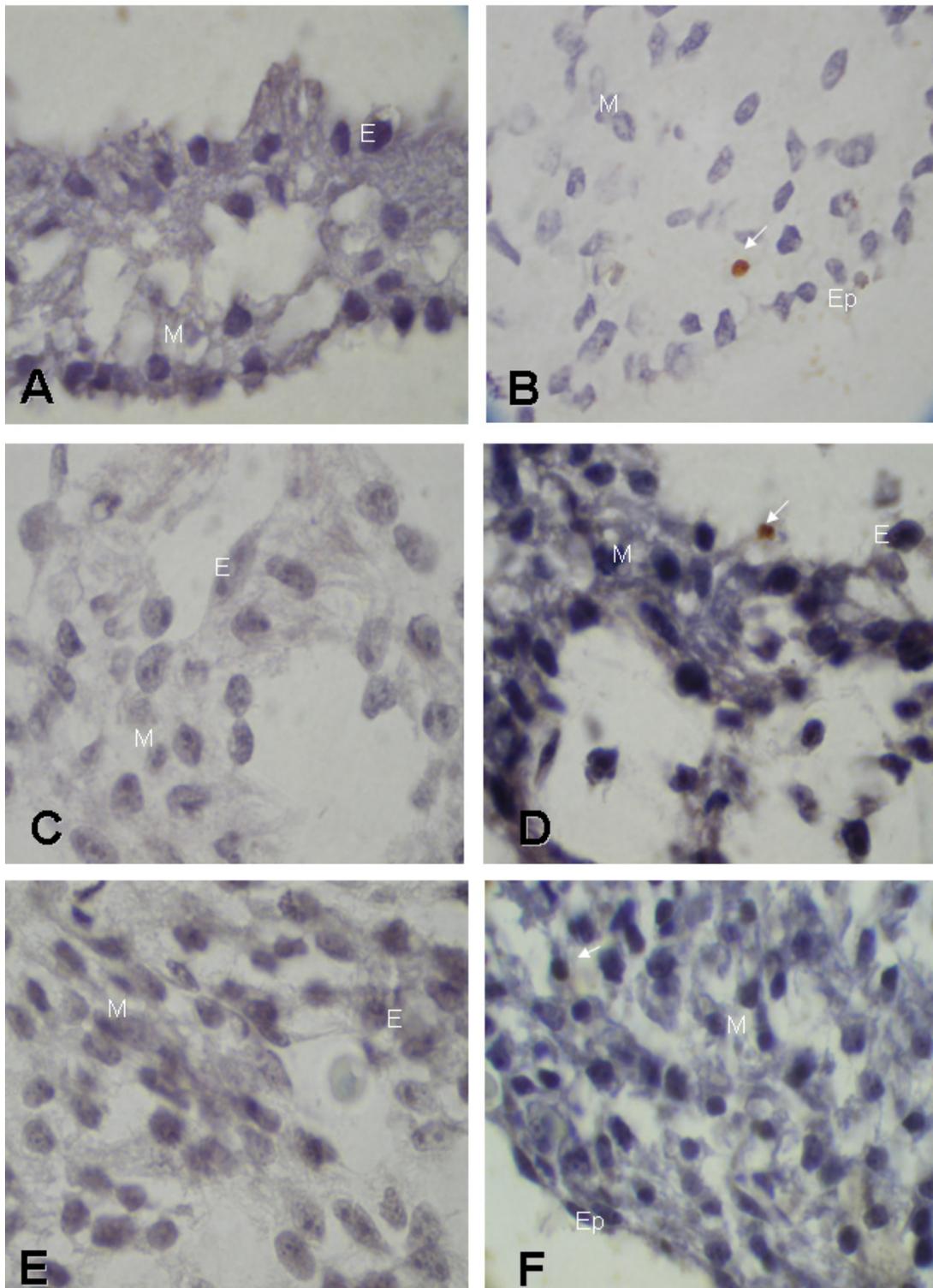


Fig 5. Determinación de la actividad apoptótica miocárdica durante el desarrollo del tabique interventricular. Inmunohistoquímica empleando el método de Tunel. A) Estadio 18-20HH. B) Estadio 22HH. C) Estadio 24, D) Estadio 26HH. E) Estadio 28HH, F) Estadio 30HH. Note la escasa muerte celular detectada a los largo de todo el estudio.

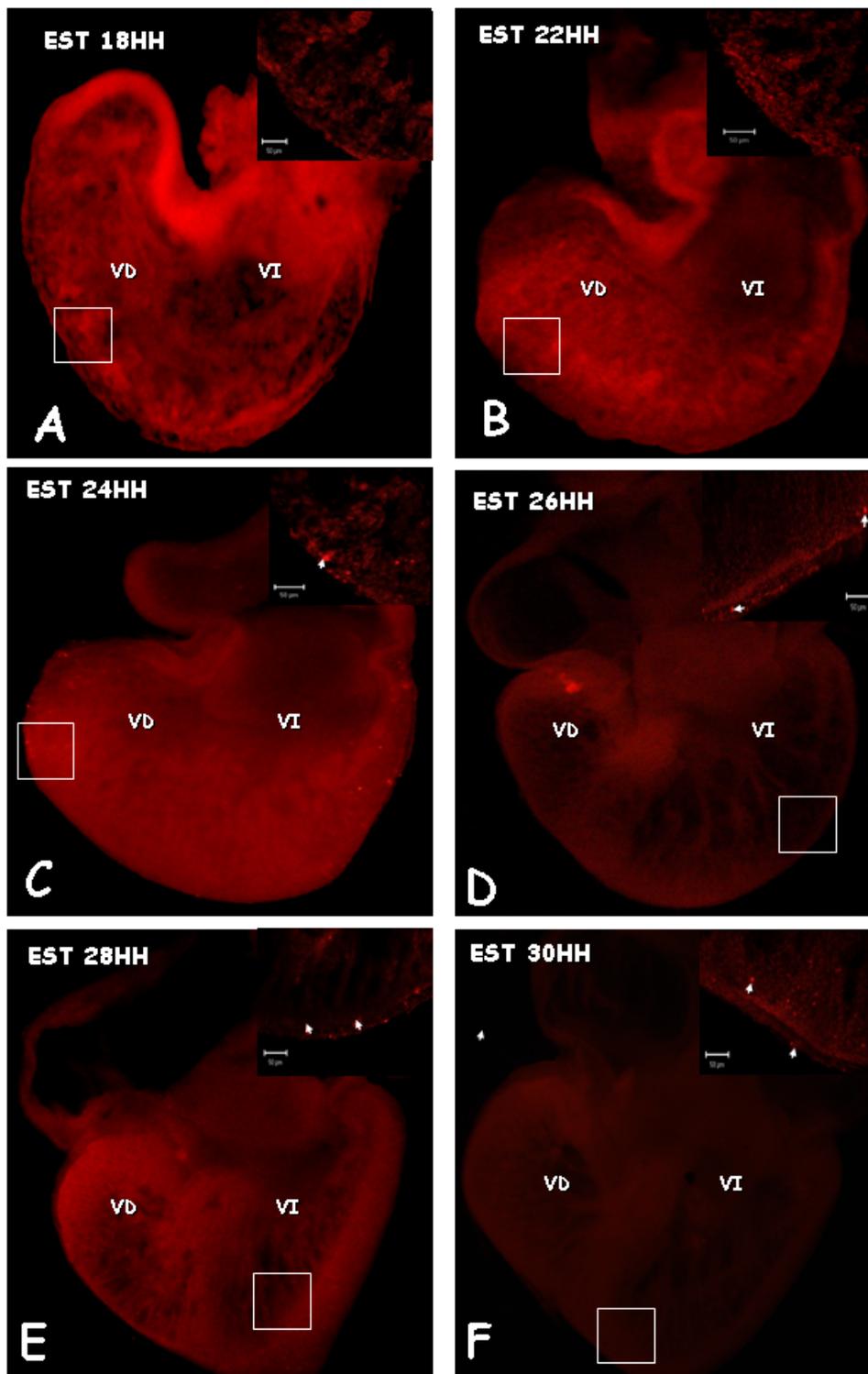


Fig 6. Estudio de la Muerte celular programada mediante Tinción fluorescente de lisosomas con microscopia de epifluorescencia y Confocal durante el desarrollo del tabique interventricular. A) Estadio 18-20HH. B) Estadio 22HH. C) Estadio 24, D) Estadio 26HH. E) Estadio 28HH, F) Estadio 30HH. Note una escasa muerte celular en la región ventricular a partir del estadio 24HH hasta el estadio 30HH.

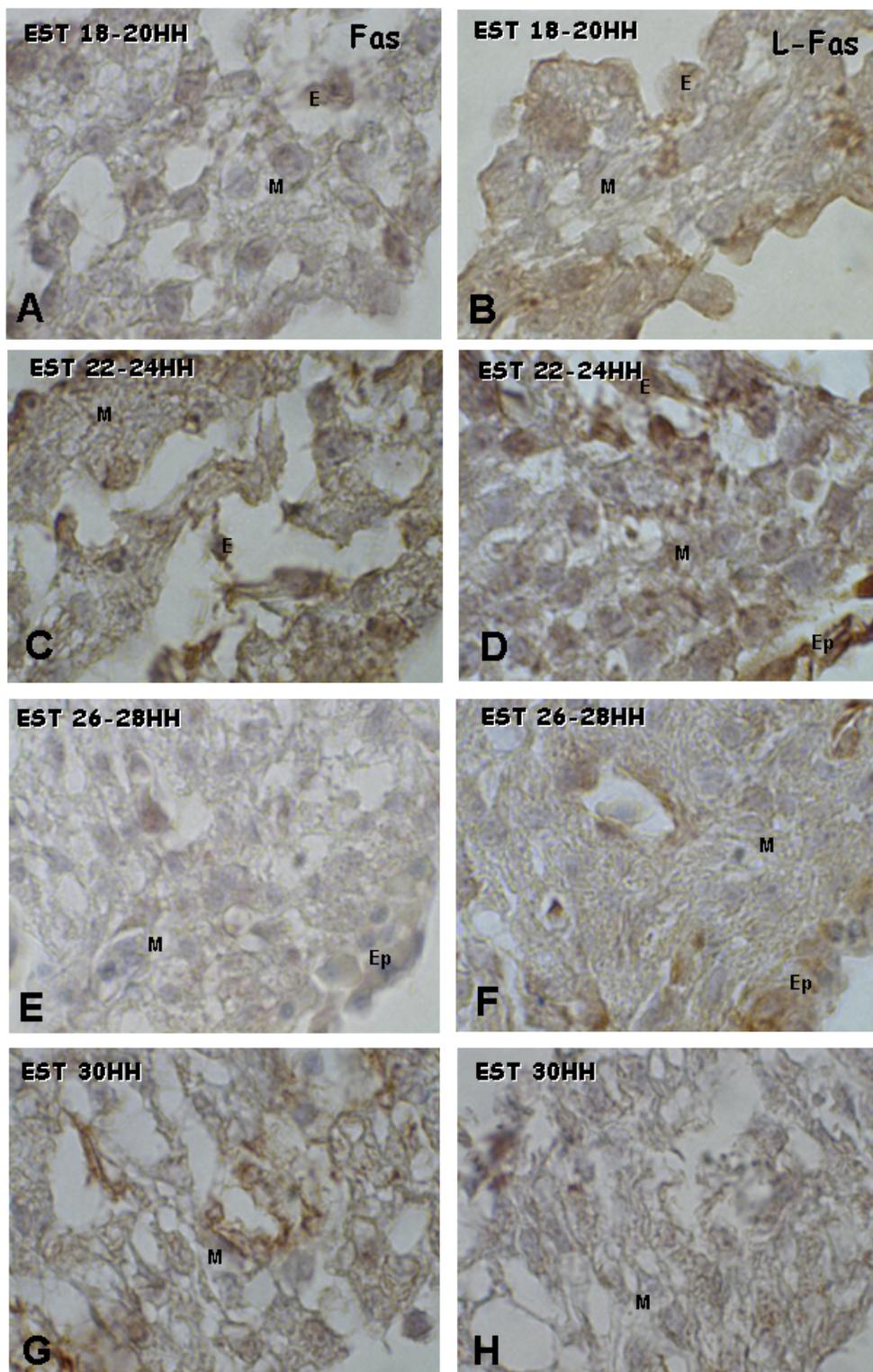


Fig. 7. Análisis de la expresión del marcador apoptóticos L-FAS y su receptor durante el desarrollo del tabique interventricular. A, B) Estadio 18-20HH. C, D) Estadio 22-24HH. E, F) Estadio 26-28HH, G, H) Estadio 30HH. Observe ambos antígenos predominantes en el endocardio durante todo el periodo de estudio.

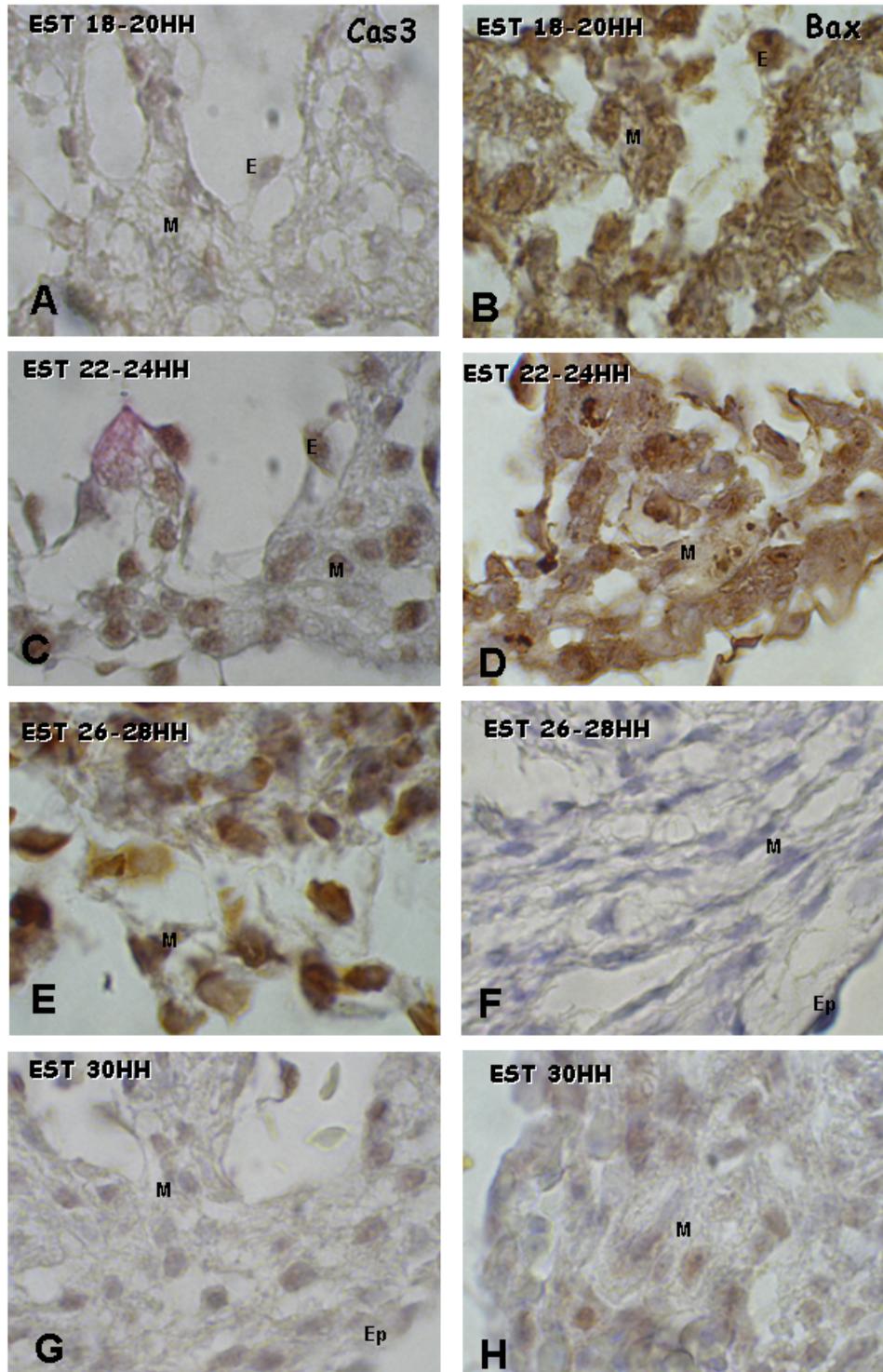


Fig. 8. Análisis de la expresión de Caspasa 3 y Bax durante el desarrollo del tabique interventricular. A, B) Estadio 18-20HH. C, D) Estadio 22-24HH. E, F) Estadio 26-28HH, G, H) Estadio 30HH. Aprecie la expresión nuclear de la caspasa 3 principalmente entre los estadios 22-28HH, en todos los componentes celulares de la región ventricular. Mientras que Bax fue determinado tanto en núcleo como en el citoplasma de los distintos componentes únicamente entre los estadios 18-24HH.

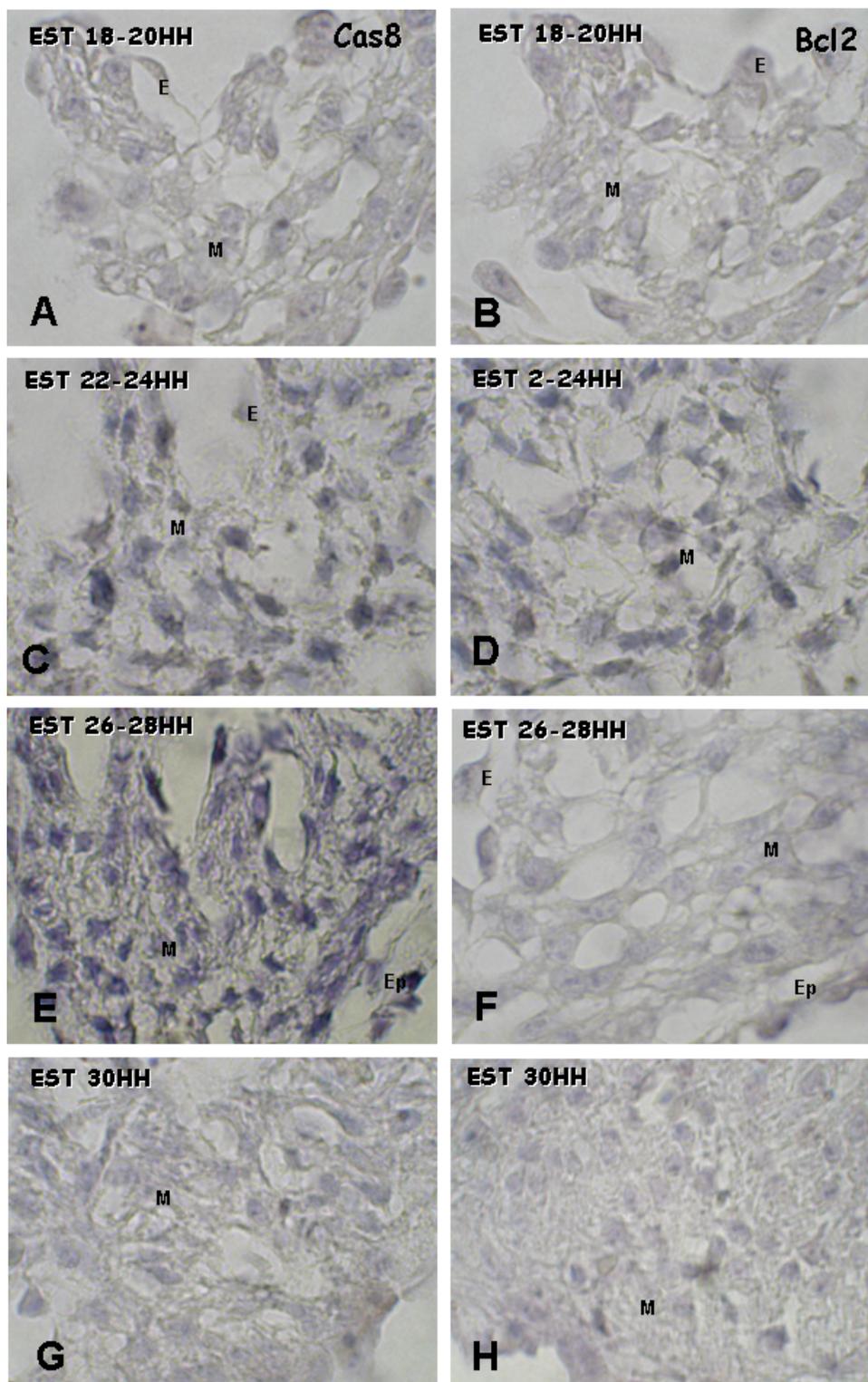


Fig. 9. Inmunohistoquímica de Caspasa 8 y Bcl2 durante el desarrollo del tabique interventricular. A, B) Estadio 18-20HH. C, D) Estadio 22-24HH. E, F) Estadio 26-28HH, G, H) Estadio 30HH. Note que ambos marcadores fueron negativos durante el desarrollo del tabique interventricular.

Tabla 3. Expresión de Marcadores apoptoticos en los componentes celulares de la región ventricular y tabique en desarrollo.

Estadios	Fas			L-Fas			Caspasa 3			Caspasa 8			Bcl-2			Bax		
	E	M	Ep	E	M	Ep	E	M	Ep	E	M	Ep	E	M	Ep	E	M	Ep
<b>18HH</b>	+	±	/	++	±	/	±	±	/	-	-	/	-	-	/	+++	+++	/
<b>20HH</b>	+	±	/	++	±	/	±	±	/	-	-	/	-	-	/	+++	+++	/
<b>22HH</b>	++	+	+	++	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
<b>24HH</b>	++	+	+	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
<b>26HH</b>	++	±	+	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	±
<b>28HH</b>	+	±	+	+++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	±	±	±
<b>30HH</b>	+-	±	+	+	±	++	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-

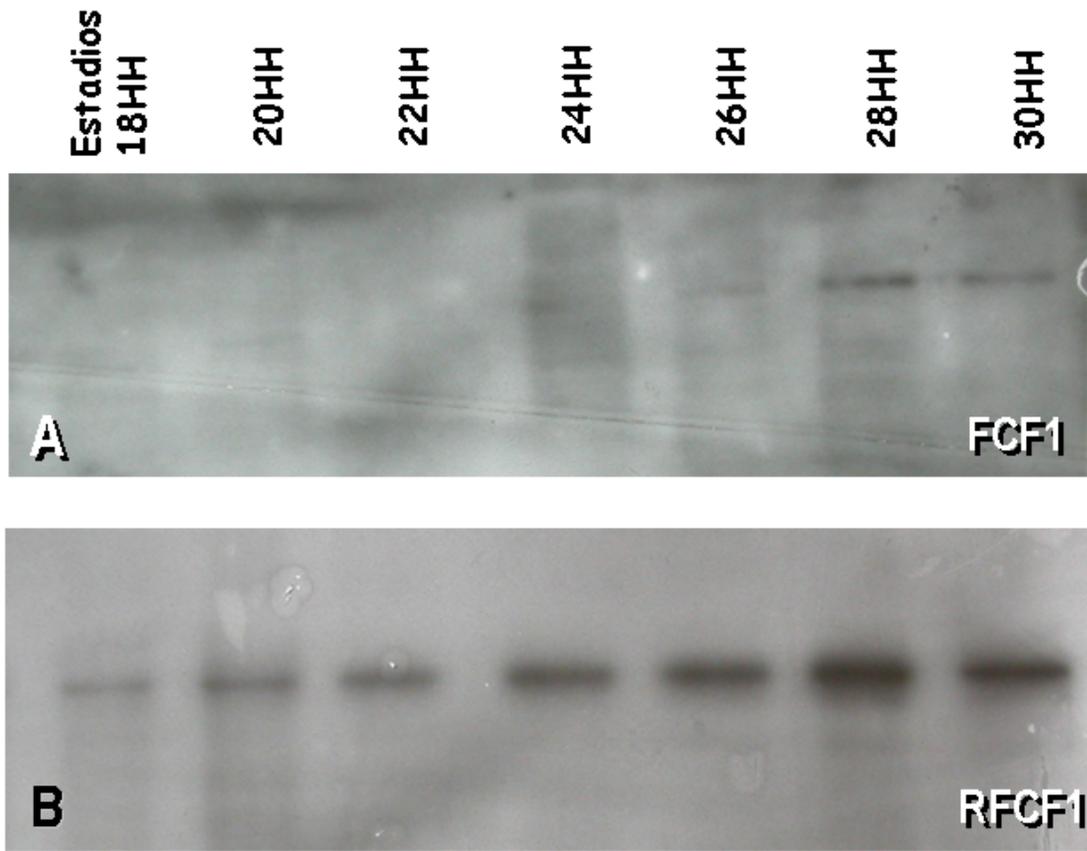
E= Endocardio, Ep= Epicardio, M= Miocárdio. Estadios= Estadios del desarrollo de Hamburger y Hamilton.

## **C. DISTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES**

### ***Análisis espacio-temporal de FGF1 y RFGF1.***

Mediante Western Blot determinamos la especificidad de los anticuerpos empleados y se encontró una baja expresión relativa de FCF1 en todos los Ests (Fig. 10). Al comparar las D.O. encontramos una expresión del RFCF1.

Durante el proceso de tabicación del corazón de embrión de pollo, por inmunohistoquímica no se encontró un patrón de distribución selectivo del FCF1 ni del RFCF1 en las distintas zonas de la región ventricular. Ambos antígenos fueron detectados únicamente en los miocitos (Figs. 10,11). No fue posible distinguir alguna diferencia ni en el espacio ni en el tiempo en el nivel de expresión de las proteínas, sin embargo al analizar la intensidad de fluorescencia en el microscopio confocal fue posible determinar diferencia en los distintos Sts (Fig. 10B,D,F,H, y Fig. 11 B,D,F,H, Tabla 4). FGF presentó expresión escasa y homogénea durante todo el periodo, en contraste, el promedio de intensidad de fluorescencia analizada con el microscopio confocal de R-FCF1 fue incrementando desde el St 22 hasta el 28HH (Gráfica 3). Incluso fue posible detectar agregados del antígeno (Fig. 11A,C,E,G). Finalmente en el St 30HH los niveles de intensidad RFCF fueron muy bajos, similar a lo observado en FCF1, los agregados desaparecieron, la proteína estaba distribuida homogéneamente en los miocitos del tabique ya formado (Compare G, H en Figs. 10 y 11, gráfica 3).



D.O.			
Estadios	FCF		RFCF
18HH	0.272		0.385
20HH	0.274		0.469
22HH	0.284		0.495
24HH	0.448		0.618
26HH	0.375		0.682
28HH	0.53		0.883
30HH	0.5		0.835

Fig 10. Western blot del Factor de Crecimiento Fibroblástico 1 y su receptor en la región ventricular de corazones de embrión de pollo de estadios 18-30HH. La tabla inferior muestra las Densidades ópticas determinadas.

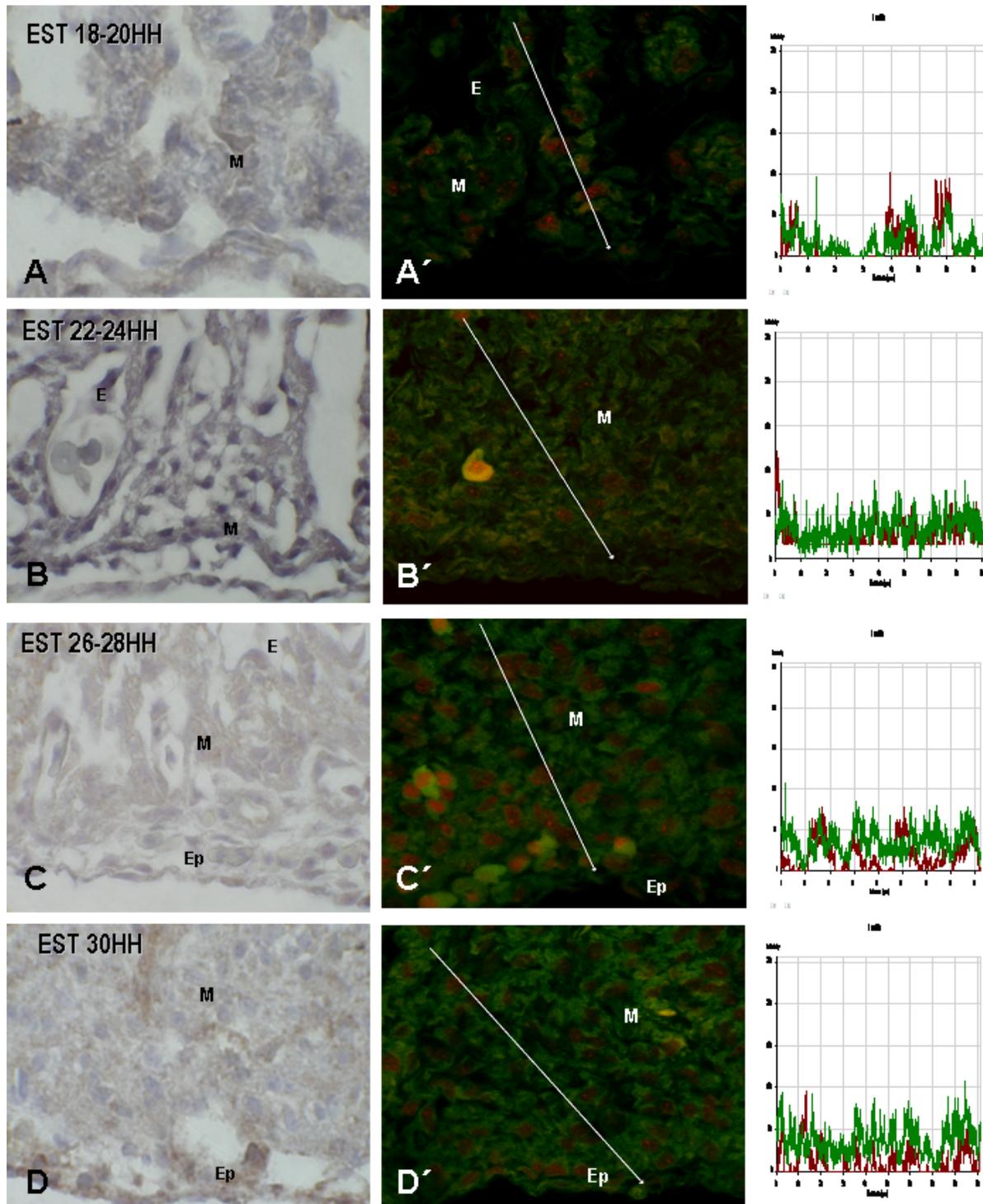


Fig. 11. Expresión del Factor de Crecimiento Fibroblástico durante la formación del tabique interventricular en el corazón de embrión de pollo. A-D) Inmunohistoquímica, A'-D') Microscopia Confocal. A,A') Estadio 18-20HH. B,B') Estadio 22-24HH. C,C') Estadio 26-28HH. D,D') Estadio 30HH. Las gráficas demuestran la expresión de intensidad de fluorescencia del Factor acoplado a FITC (color verde). Núcleos contrastados con Ioduro de propidium (Canal Rojo). Observe la baja expresión del antígeno a lo largo del estudio. M=Miocardio, E=Endocardio, Ep=Epicardio.

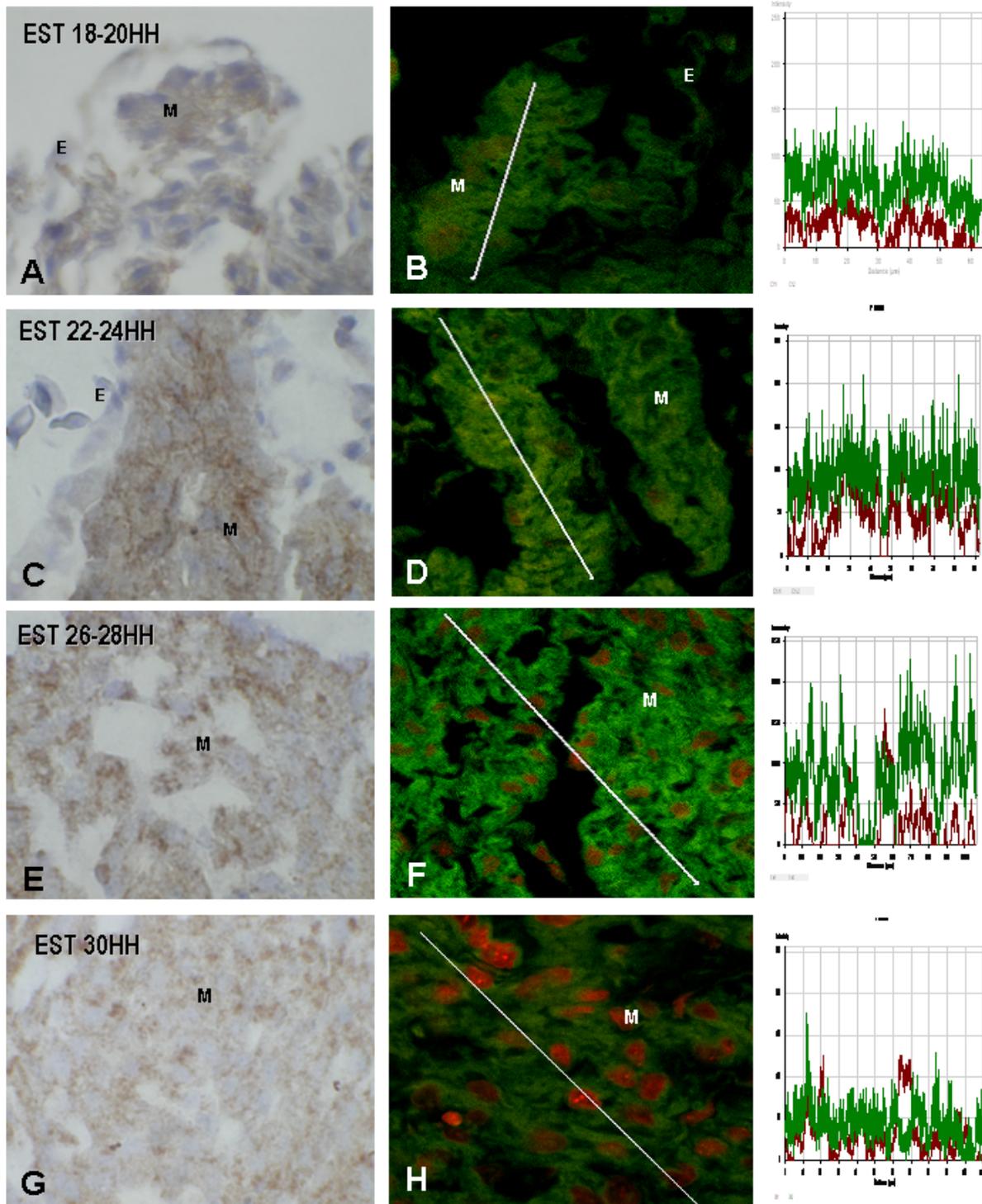


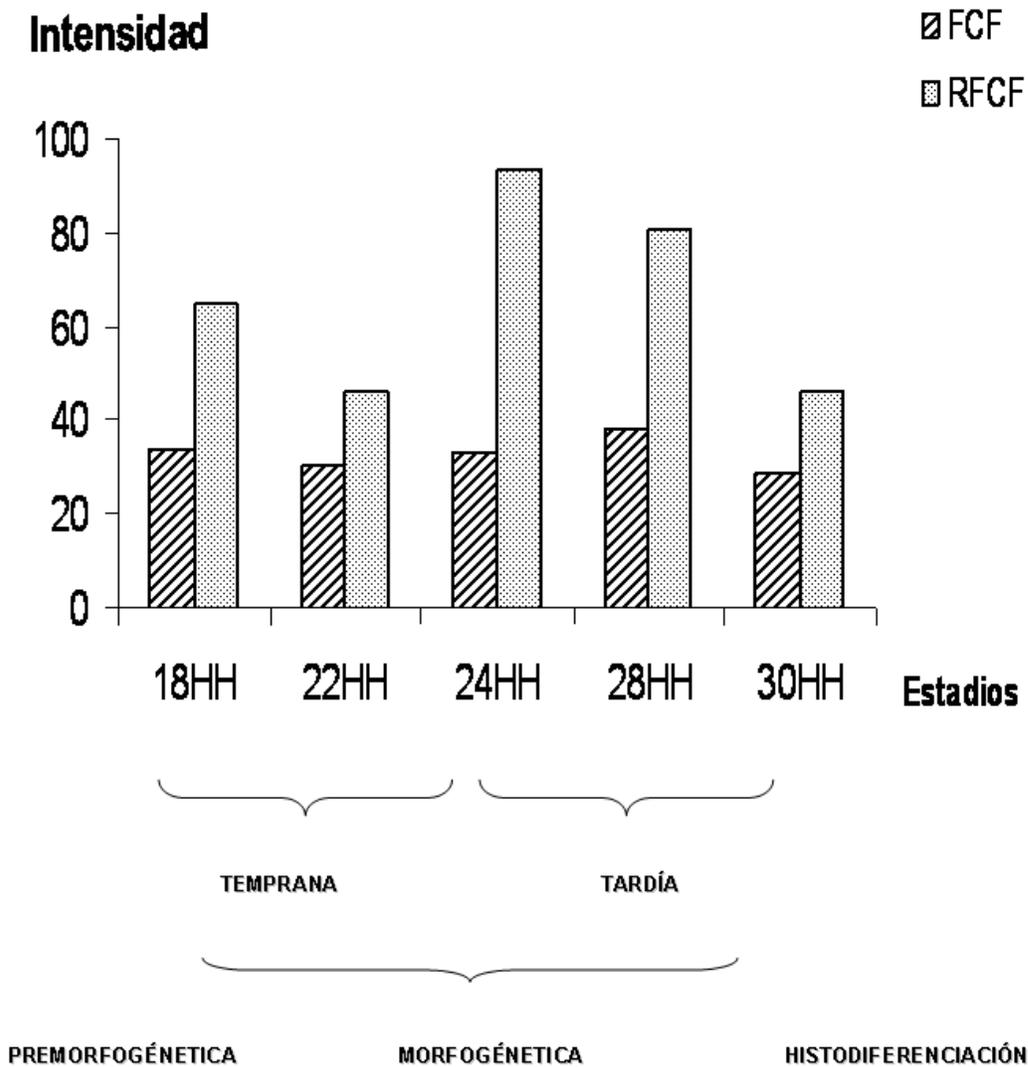
Fig. 12. Expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico durante la formación del tabique interventricular en el corazón de embrión de pollo. A-D) Inmunohistoquímica, A'-D') Microscopía Confocal. A,A') Estadio 18-20HH. B,B') Estadio 22-24HH C,C') Estadio 26-28HH. D,D') Estadio 30HH. Las gráficas muestran la expresión de intensidad de fluorescencia del Factor acoplado a FITC (color verde). Núcleos contrastados con Ioduro de propidium (Canal Rojo). Note la alta expresión y selectividad del receptor en el miocardio a lo largo del estudio. M=Miocardio, E=Endocardio, Ep=Epicardio.

Tabla 4. Determinación de la expresión del Factor de crecimiento Fibroblástico 1(FCF1) y su receptor RFCF1 en los distintos tipos celulares durante el desarrollo del tabique interventricular.

		<b>FCF1</b>				<b>RFCF1</b>				
ETAPAS		Estadios	RS		RI		RS		RI	
			E	M	M	Ep	E	M	M	Ep
<b>MORFOGÉNESIS</b>	<b>FASE TEMPRANA</b>	<b>18HH</b>	+++	++	++		-	++	++	
		<b>20HH</b>	++	+	++		-	++	++	
		<b>22HH</b>	++	+/-	+/-	-	-	+	+	-
		<b>24HH</b>	+++	+	+	-	-	++	++	-
	<b>FASE TARDÍA</b>	<b>26HH</b>	-	+	+	-	-	++	++	-
		<b>28HH</b>	-	+	+	+/-	-	++	++	-
		<b>30HH</b>	-	+	+/-	+/-	-	+	+	-
<b>HISTODIFERENCIACIÓN</b>										

E = Endocardio, EP = Epicardio M = Miocardio, RI, RS= Región Inferior y Superior del tabique interventricular.

## INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE FCF1 Y RFCF1



Gráfica 3. Determinación de los índices de intensidad de fluorescencia del Factor de Crecimiento Fibroblástico1 y su receptor durante el desarrollo del TI-V. Aprecie que el FCF1 tiene una expresión basal a lo largo del estudio, a diferencia del RCF1, el cual incrementa su expresión principalmente durante la fase morfogénica tardía.

### **Análisis espacio-temporal de NRG y ErbB2/4.**

La especificidad de los anticuerpos empleados fue evaluada por Western Blot, mediante el análisis densitométrico encontramos que la ant-NRG, anti-ErbB2 y anti-ErbB4 reconocen una sola banda de alrededor de 180-190kDa. Fue evidente un incremento de NRG en los Sts 22, 26 y 30HH, mientras que la mayor concentración de ErbB2, fue detectada en el St 18HH y poco a poco fue decayendo hasta el St 30HH. En contraste, ErbB4 fue poco evidente en los primeros Sts, pero fue incrementando hasta el St 30HH (Fig. 12).

El análisis cuantitativo, por citometría de flujo, de la NRG1, en los miocitos de la región ventricular, evidenció que menos del 4% de las células, entre los Sts 18-28HH, expresan la proteína, posteriormente en el St 30HH, el porcentaje se incrementó hasta 12%. El receptor ErbB2/4, por su parte, es predominante en los Sts 20, 22, y 30HH (Gráfica 4).

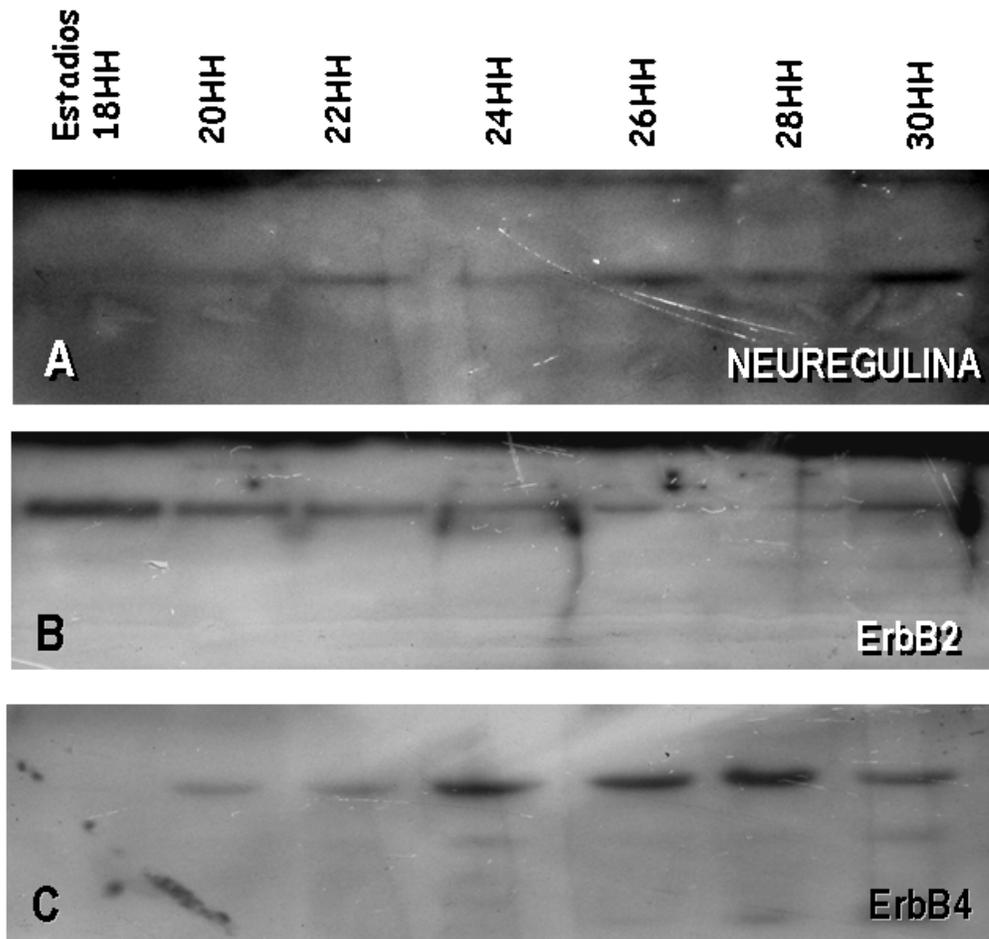
El estudio de la distribución de las proteínas por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia permitió establecer el tipo celular en el que se expresan y aunque no se encontró un patrón de distribución regionalizado, fue posible determinar diferencias en el tiempo mediante los promedios de intensidad de fluorescencia con microscopía confocal, en los miocitos de las trabéculas, paredes y TI-V en desarrollo (Figs. 13,14,15, Gráfica 5).

La NRG en el St 18HH está presente en baja proporción en las células de miocárdico y en mayor proporción en endocardio, tanto de trabéculas como de pared (Fig. 13A,B). Al continuar el desarrollo (St 20HH) fue notable la distribución de la NRG, formando agregados en algunos miocitos de las paredes libres y la región caudal de la trabécula ubicada sobre el surco interventricular; sin embargo, la intensidad de la fluorescencia fue similar a la observada en el St 18HH. Entre los Sts 22-24HH la señal fue detectada en la totalidad de los miocitos y escasamente en el endocardio (Fig. 13C,D). En el St 26HH se incrementó la presencia de agregados; a partir del St 28HH se incrementó la señal al antígeno aunque los agregados disminuyeron en todas las regiones del tabique analizadas. Por su parte el endocardio y epicardio fueron negativos a NRG (Fig. 13 E-H, Tabla 5, Gráfica 5).

El ErbB2 no presentó un patrón de distribución específico en las diferentes zonas ventriculares analizadas. Sin embargo, se notaron cambios considerables a través del tiempo. En general, los miocitos fueron las únicas células positivas entre los Sts 18-20HH, su distribución fue homogénea sobre el tejido y mediante inmunofluorescencia se encontró una mayor expresión (Fig. 14A,B). Al continuar el desarrollo del tabique se notó también un decremento de intensidad de este receptor desde el St 24HH hasta 28HH, manteniéndose casi imperceptible mediante inmunohistoquímica; a diferencia de la NRG, este receptor decayó a más de la mitad de su expresión (Fig 14 C-F, gráfica 5, Tabla 5). En el St 30HH, sólo se logró determinar mediante inmunofluorescencia un aumento en la intensidad del marcaje, sin observar agregados (Fig. 14F,H, gráfica 5).

ErbB4 no presentó un patrón de distribución selectivo en las zonas ventriculares analizadas. Mediante inmunohistoquímica se observó una saturación del antígeno en todos los Sts, sin embargo, la microscopia confocal nos permitió distinguir dos etapas de mayor intensidad del antígeno. La primera fue detectada entre los Sts 18-20HH y la segunda entre los Sts 28-30HH (Fig. 15, Gráfica 5). Al igual que el receptor ErbB2, el endocardio no presentó señal en las etapas analizadas. El epicardio fue positivo con intensidad media a partir del St 22HH, se mantuvo así hasta el St 28HH, pero fue negativo en el St 30HH.

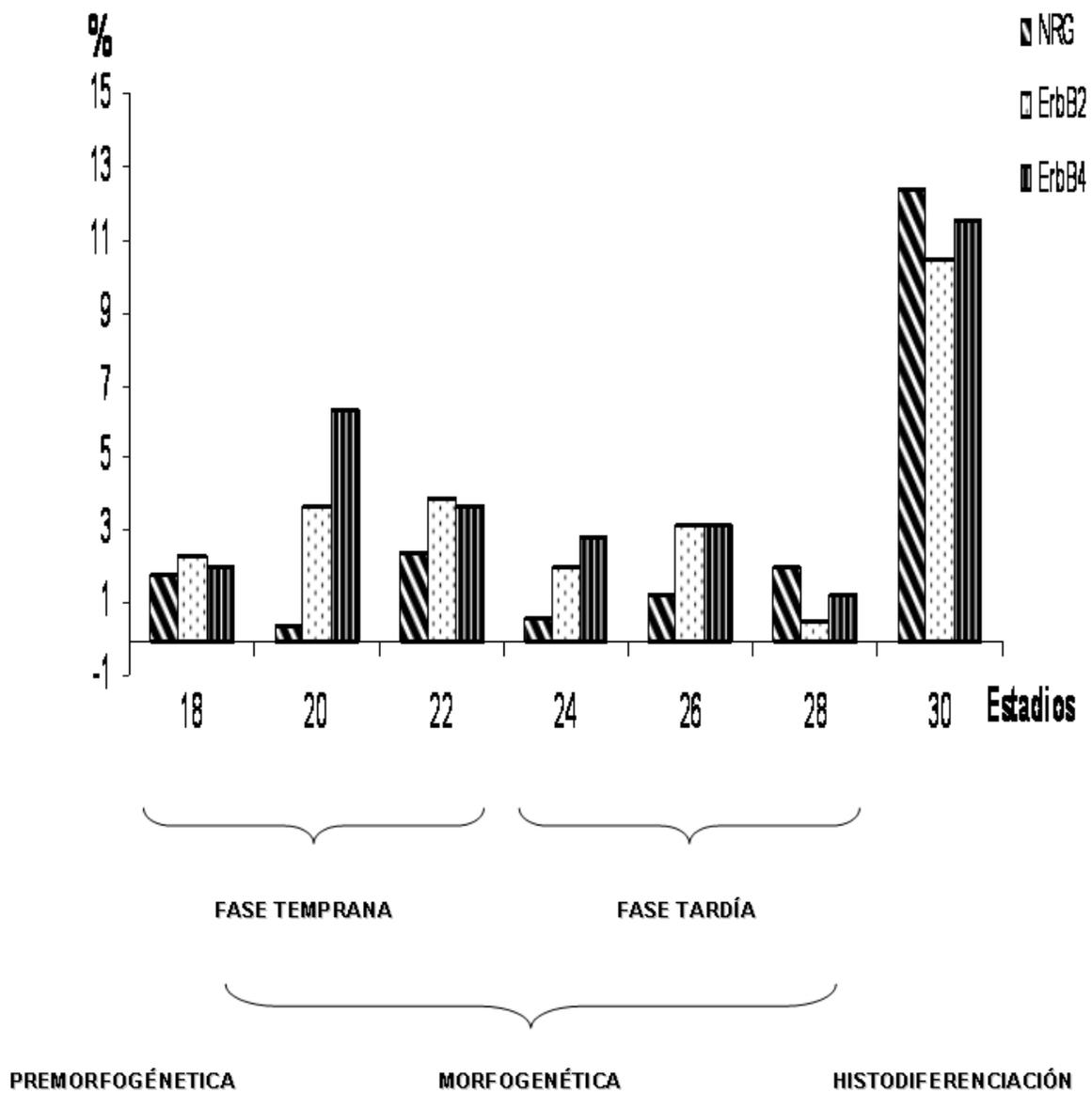
El análisis de la concentración de RNAm por RT-PCR, reveló que el mensajero de NRG está presente en todos los Sts analizados, sin embargo fue muy escaso en los Sts 20HH y 28HH (Fig. 16A). Entre tanto, los estudios de hibridación *in situ* revelaron que, entre los Sts 18-20HH, el mensajero de NRG sólo se expresó en el endocardio de toda la región ventricular (Fig. 16B). Posteriormente en el St 22HH tanto las células del miocárdico como del endocardio fueron positivas a la sonda (Fig. 16C). Sin embargo, durante los Sts 24-30HH la expresión del RNAm fue exclusiva de los miocitos (Fig. 16D-G).



D.O.				
Estadios	NRG	ErbB2	ErbB4	
18HH	0.916	0.895	0.375	
20HH	0.747	0.657	0.467	
22HH	0.657	0.571	0.5	
24HH	0.54	0.639	0.947	
26HH	0.86	0.497	0.906	
28HH	0.815	0.432	1.104	
30HH	1.772	0.894	0.759	

Fig. 13 Determinación por Western blot del factor de crecimiento Neuregulina y sus heterodímero ErbB2/4 en la región ventricular de corazones de embrión de pollo de estadios 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30HH. A) Neuregulina B) ErbB2. C) ErbB4.

## CITOMETRÍA DE NRG Y ERBB2/4



Gráfica 4. Análisis citométrico de la expresión de NRG1 y el receptor heterodímero ErbB2/4 en los miocitos de la región ventricular de corazón de embrión de pollo. Observe que la expresión de la proteína y su receptor es baja durante la etapa morfogénica en comparación con la etapa de histodiferenciación.

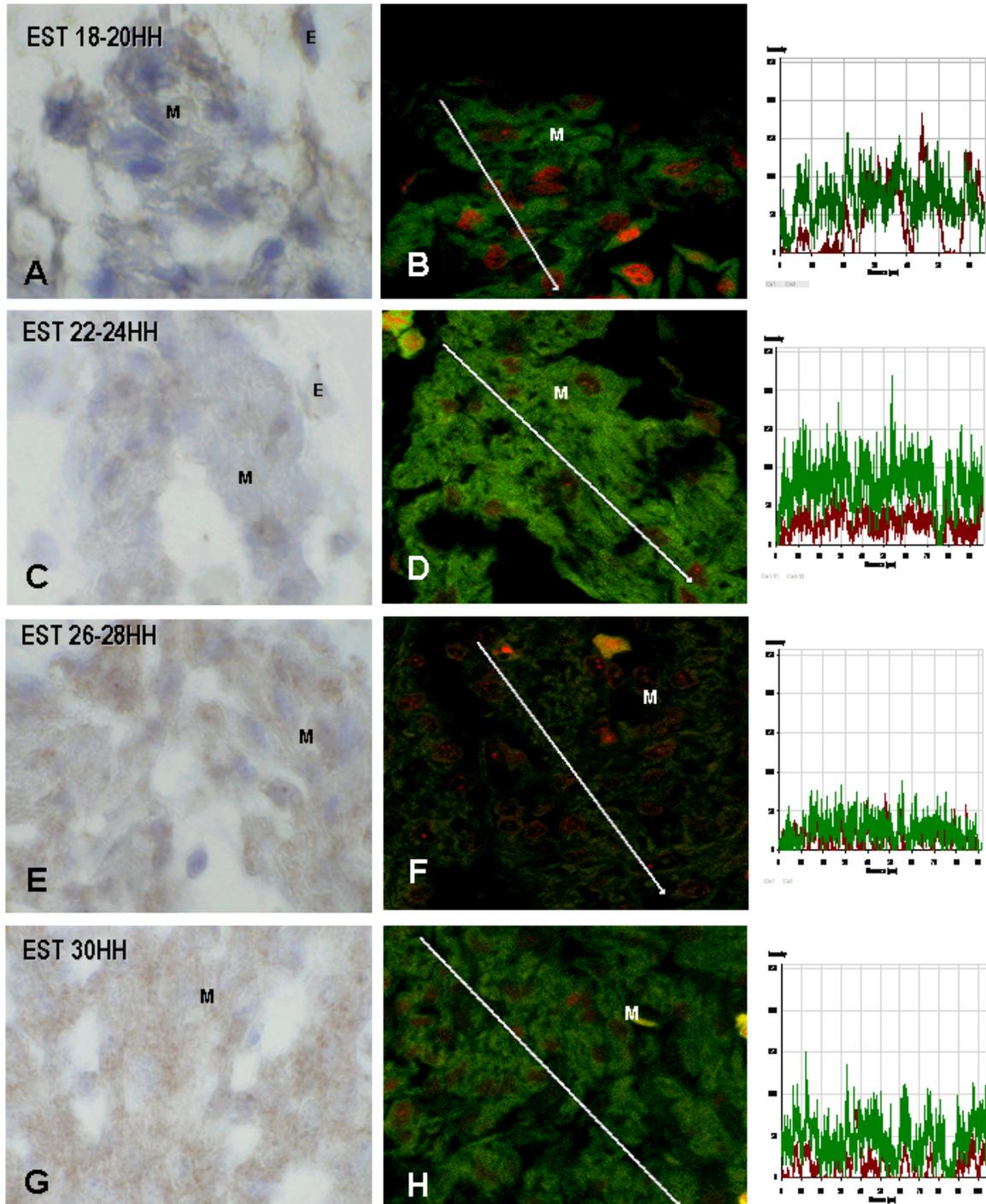


Fig. 14. Análisis espacio-temporal de la Neuregulina durante el desarrollo del tabique interventricular en el corazón de embrión de pollo. A-D) Inmunohistoquímica, A'-D') Microscopia Confocal. A,A') Estadio 18-20HH. B,B') Estadio 22-24HH C,C') Estadio 26-28HH. D,D') Estadio 30HH. Las gráficas de muestran los índices de intensidad del Factor acoplado a FITC (color verde). Núcleos contrastados con Ioduro de propidium (Canal Rojo). Aprecie que el antígeno es detectado al inicio del estudio tanto en el miocardio como el endocardio, posteriormente su expresión es determinada solo en el miocardio. M=Miocardio, E=Endocardio, Ep=Epicardio.

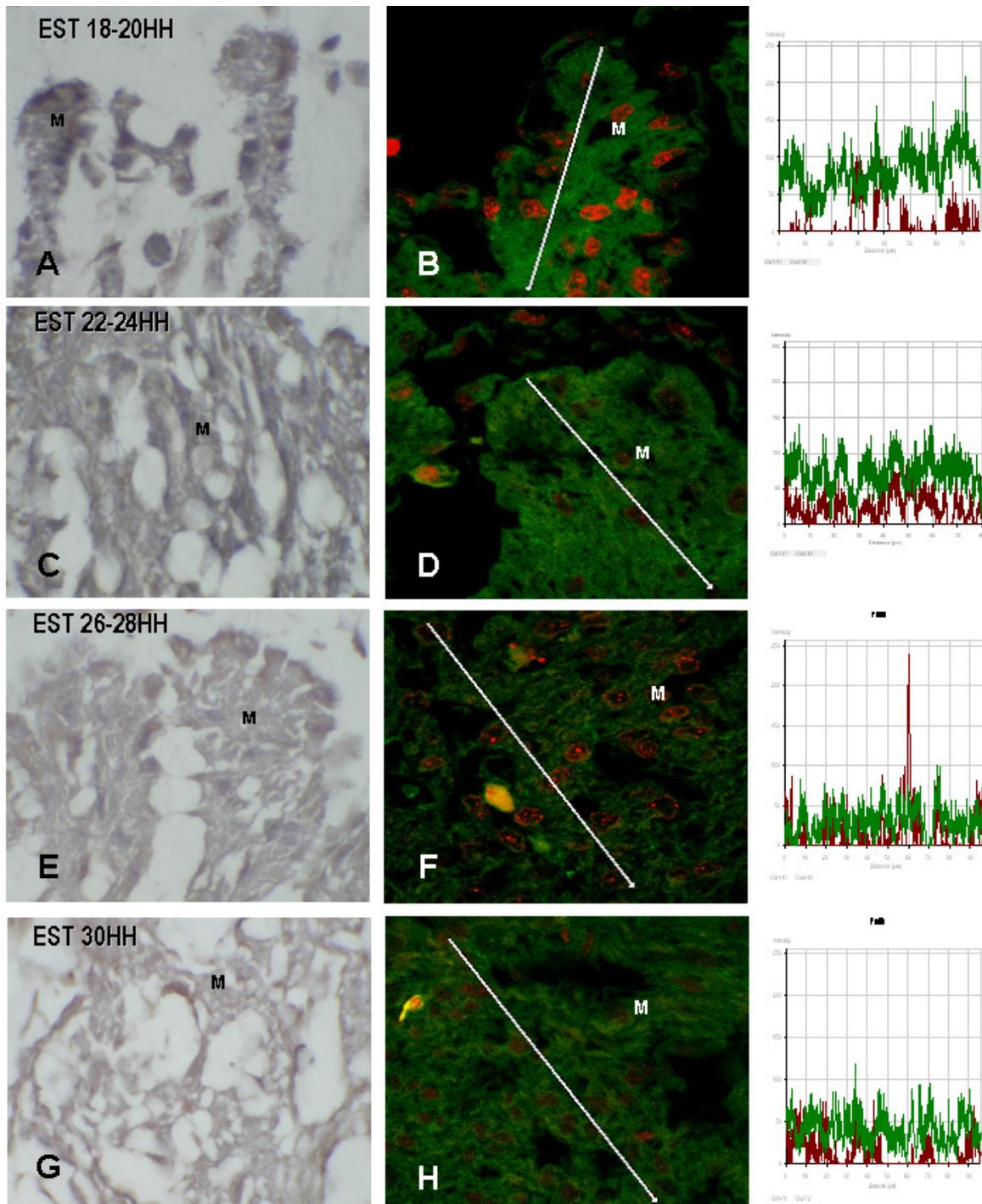


Fig. 15. Análisis espacio-temporal del receptor ErbB2 durante el desarrollo del tabique interventricular en el corazón de embrión de pollo. A-D) Inmunohistoquímica, A'-D') Microscopia Confocal. A,A') Estadio 18-20HH. B,B') Estadio 22-24HH) C,C') Estadio 26-28HH. D,D') Estadio 30HH. Las gráficas de muestran los índices de intensidad del Factor acoplado a FITC (color verde). Núcleos contrastados con Ioduro de propidium (Canal Rojo). Observe que la expresión del antígeno es mayor al inicio del estudio y poco a poco decae, sin ser negativa. M=Miocardio, E=Endocardio, Ep=Epicardio.

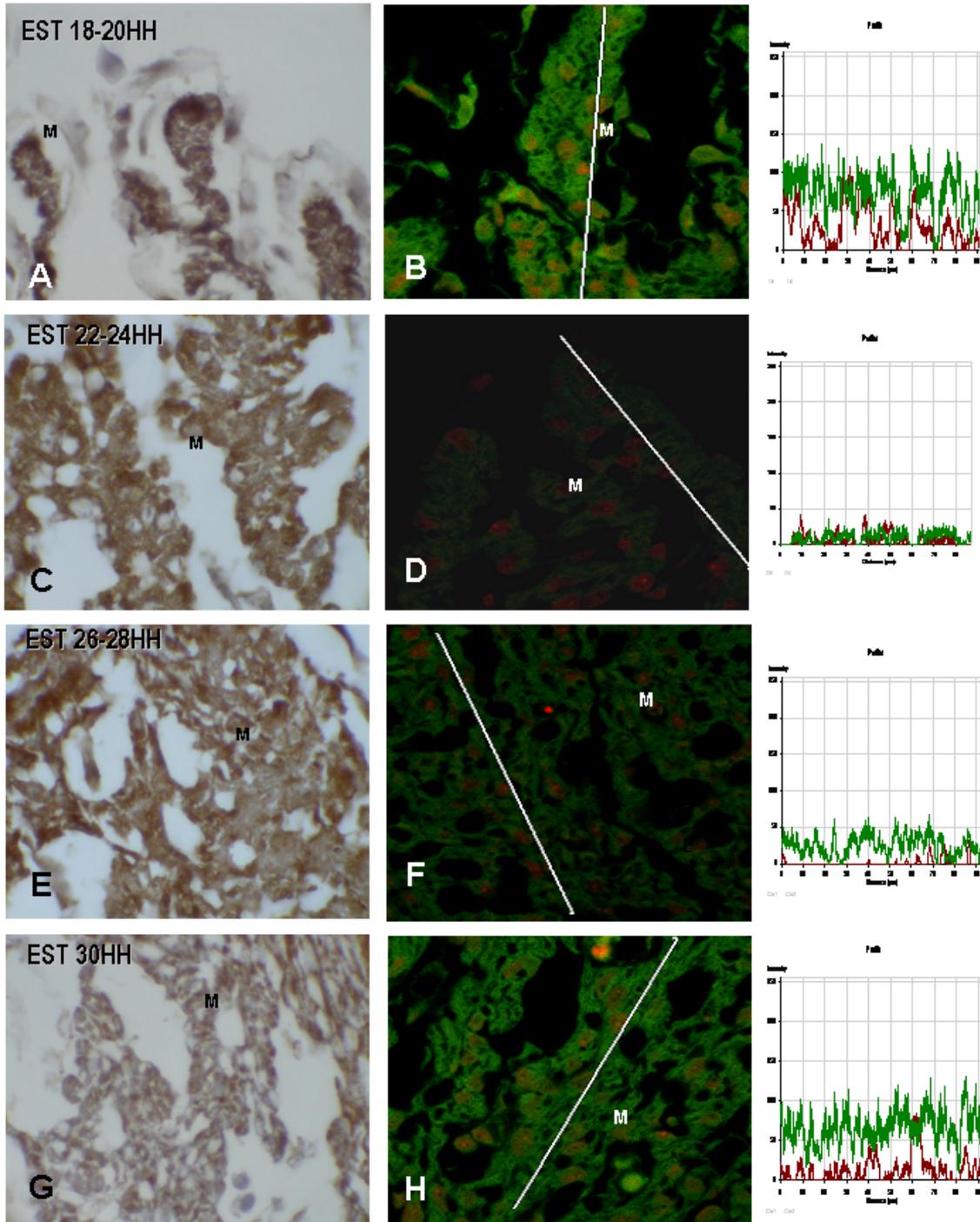


Fig. 16. Estudio espacio-temporal del receptor ErbB4 durante el desarrollo del tabique interventricular en el corazón de embrión de pollo. A-D) Inmunohistoquímica, A'-D') Microscopia Confocal. A,A') Estadio 18-20HH. B,B') Estadio 22-24HH) C,C') Estadio 26-28HH. D,D') Estadio 30HH. Las gráficas de muestran los índices de intensidad del Factor acoplado a FITC (color verde). Núcleos contrastados con Ioduro de propidium (Canal Rojo). Note la alta expresión del antígeno en el miocardio del tabique en desarrollo. M=Miocardio, E=Endocardio.

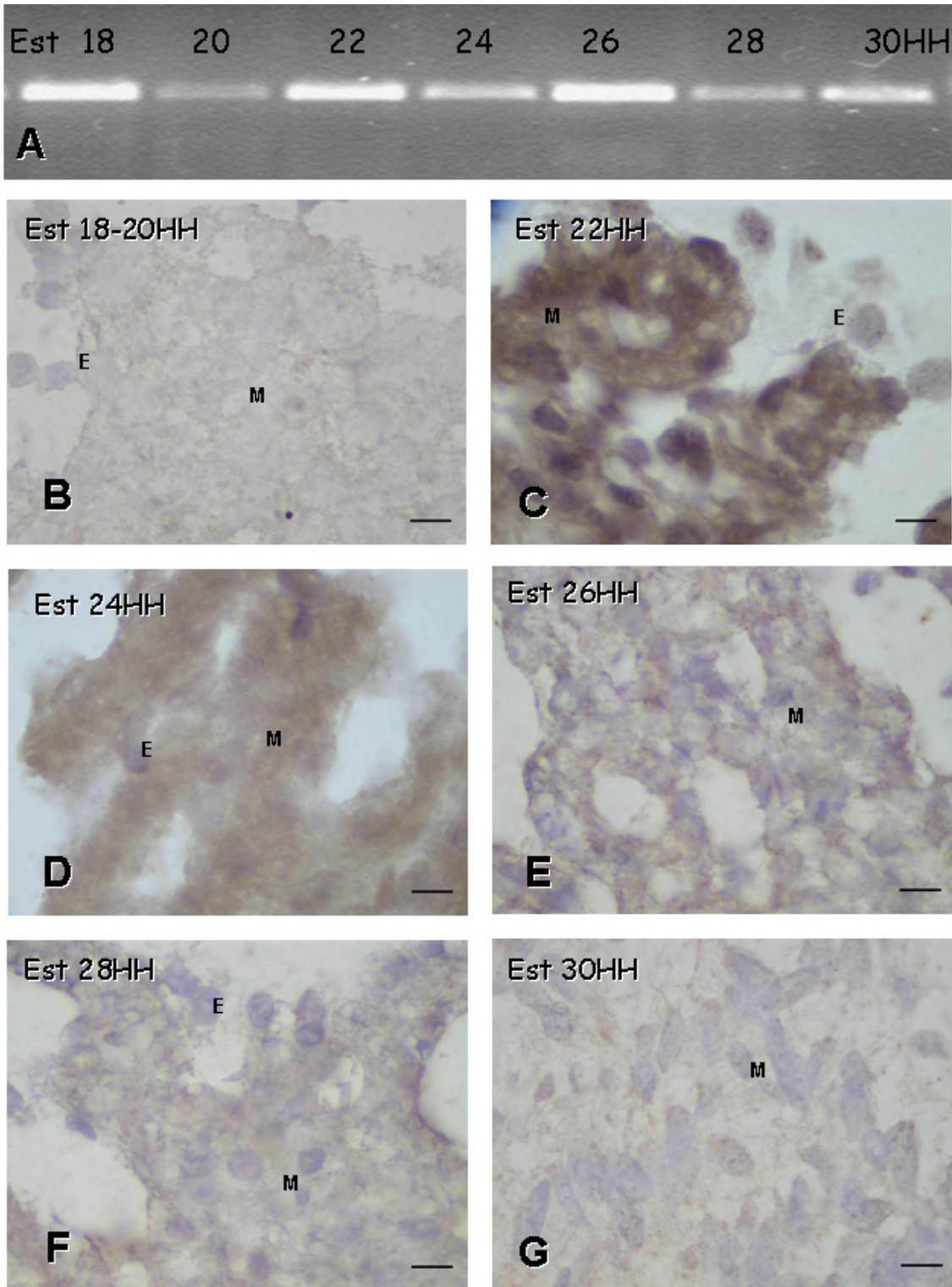


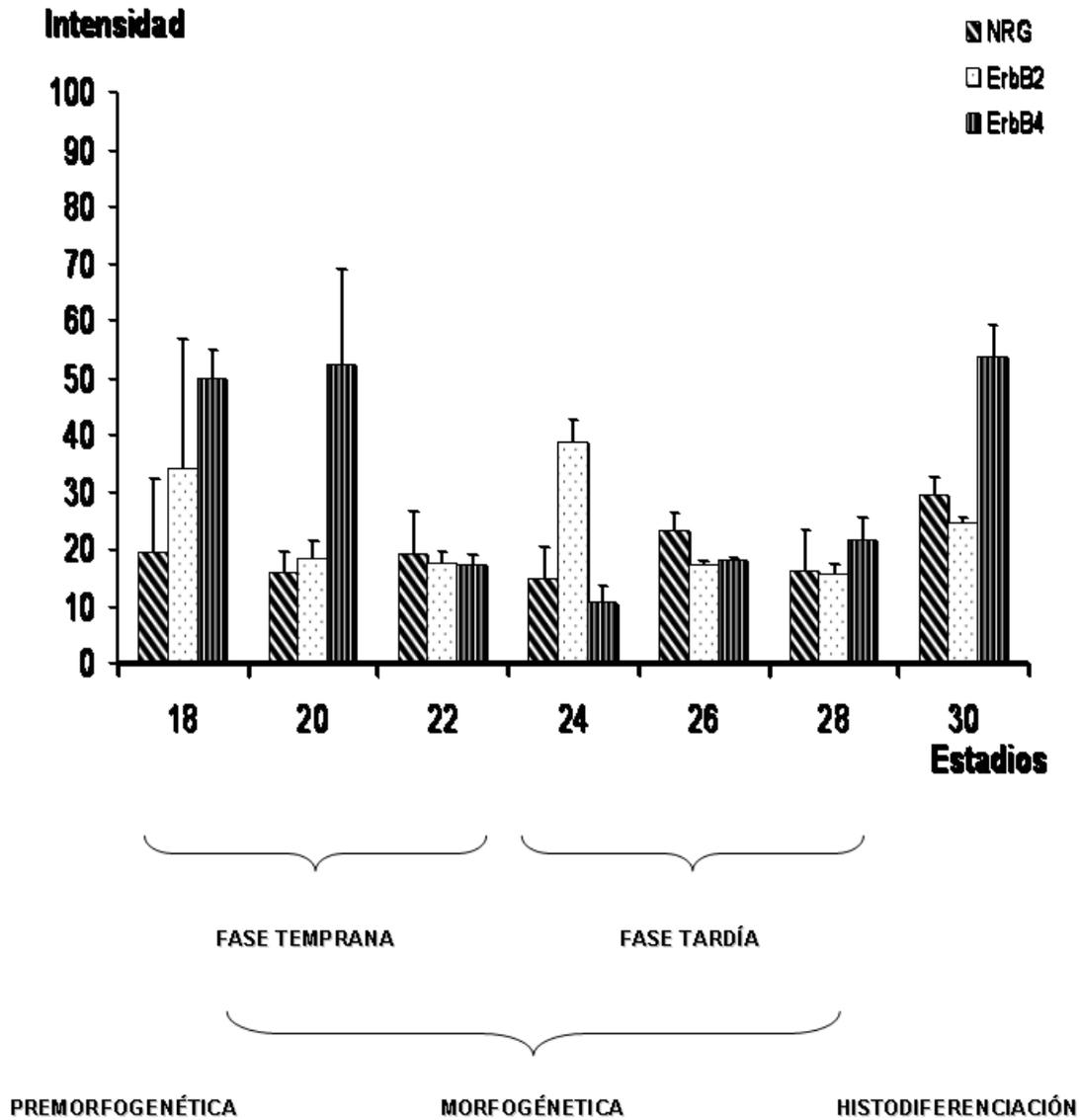
Fig. 17. Determinación del RNAm de la Neuregulina durante el desarrollo del tabique interventricular en el corazón de embrión de pollo. A) Estudio de RT-PCR en donde se aprecia una variación del RNA. B-G) Estudio de Hibridación en situ. Note la alta expresión de mensajero de Neuregulina en el miocardio de los estadios 22-26HH. M=Miocardio, E=Endocardio.

Tabla 5. Determinación de la expresión del Factor de crecimiento Neuregulina y el heterodímero de su receptor ErbB2/4 en los distintos tipos celulares durante el desarrollo del tabique interventricular.

			NRG1				ErbB2								
			ErbB4												
ETAPAS		Estadios	RS		RI		RS		RI		RS		RI		
			En	M	M	Ep	En	M	M	Ep	En	M	En	M	
MORFOGÉNESIS	FASE	<b>18HH</b>	+	++	++		-	++	++	++	-	+	-	+	
	TEMPRANA	<b>20HH</b>	++	++	++		-	++	++	++	-	++	-	++	
		<b>22HH</b>	+++	+	+	-	-	+/-	+/-	+/-	-	+++	-	+++	
		<b>24HH</b>					-				-				
	FASE TARDÍA	<b>26HH</b>		+	+++	+	-	-	+	++	+	-	+++	-	+++
		<b>28HH</b>		-	++	++	-	-	++	+	+	-	+++	-	+++
				-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+++	-	+++
						-									
HISTO	<b>30HH</b>					-	+/-	+	+/-	-	++	-	++		
DIFERENCIACIÓN															

E = Endocardio, EP = Epicardio, M = Miocardio, RI, RS= Región Inferior y Superior del tabique interventricular

## INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DEL NRG/ErB2/4



Gráfica 5. Determinación de los índices de intensidad de fluorescencia del Factor NRG y su receptor heterodímero ErbB2/4 durante el desarrollo del T1-V. Note que la intensidad de la proteína y el dímero ErbB2 durante todo el estudio es baja a diferencia del receptor ErbB4, el cual presenta dos picos, el primero durante la fase temprana de la morfogénesis y el segundo al inicio de la histodiferenciación.

## DISCUSIÓN

La tabicación es un proceso clave de la cardiogénesis que implica la transformación de un tubo simple en un órgano con cuatro cavidades y dos tractos de salida (Sharma *et al.*, 2004), denominado corazón maduro. En este proceso participan poblaciones celulares cuya actividad biológica (metabolismo, secreción, proliferación, crecimiento, migración, apoptosis y diferenciación) está finamente orquestada y regulada genéticamente (Pexieder, 1980; Paschoud y Pexieder, 1980; Lin *et al.*, 2000 y Sarkar *et al.*, 2004). Existe poco conocimiento sobre los procesos morfogénéticos y mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del TI-V. Con el propósito de obtener información al respecto, en este estudio analizamos la correlación que existe entre los patrones espacio-temporales de miocitos ventriculares cíclicos y apoptóticos con la expresión de dos factores de crecimiento (FCF1 y NRG1) y sus respectivos receptores, que nos permite especular su posible función en el desarrollo de los tercios medio y apical del TI-V.

### Formación del TI-V

La región ventricular tanto en el pollo como en otras especies se caracteriza por la presencia de dos distintos tipos de organización miocárdica (Anderson y Brown, 1996; Lamers, 2002; Togi *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2006). Por un lado, el miocardio trabecular provee la fuerza contráctil al corazón; permitiendo la expansión del miocardio de la zona compacta (Sedmera y Thomas, 1996). En contraste, la zona compacta o pared ventricular, es la encargada de la relajación activa del miocardio ventricular durante la función diastólica (Ishiwata *et al.*, 2003). Pese a este conocimiento, poco se ha abordado sobre la importancia de la pared y trabéculas ventriculares en el desarrollo del TI-V.

Mediante el análisis de cortes seriados del corazón de embriones de pollo durante el proceso de tabicación, encontramos al igual que Contreras y cols. (2008a) que en la porción ventricular del corazón en St 18HH existen pequeñas protuberancias miocárdicas, delimitadas por endocardio, conocidas como trabéculas, que se expanden ventro-dorsalmente tal como ha sido observado en otras especies

(Ben-Shachar *et al.*, 1985; Sedmera *et al.*, 1997, 2000). Así mismo, confirmamos que siempre por encima del surco interventricular prevalece una trabécula, al principio un poco más prominente y menos ramificada que las demás, denominada “trabécula central” a la que, conforme avanza el desarrollo, se ancla el resto de trabéculas para conformar la porción muscular del TI-V; tal como lo describimos en estudios previos empleando microscopía electrónica y marcaje en vivo (Contreras *et al.*, 2008a). También apreciamos que, en la porción de las trabéculas, donde se anclan a su pared ventricular correspondiente, se forman pequeños huecos delimitados por endocardio que, a medida que avanza la cardiogénesis van dividiendo a las trabéculas en múltiples ramas. Nuestras observaciones, además de coincidir con las láminas trabeculares fenestradas de primero, segundo y hasta tercer grado reportadas por otros autores, indican que las trabéculas que van apareciendo paulatinamente son las proyecciones ramificadas de las trabéculas antecesoras pero no formaciones de novo como se ha descrito clásicamente (Ben-Shachar, *et al.*, 1985; Icardo y Fernández-Terán, 1987; Sedmera *et al.*, 1997, 2000).

### **Significado de la proliferación miocárdica en el desarrollo de los tercios medio y apical del TI-V.**

El abandono del ciclo celular en el corazón es una característica determinante en la especificación del linaje celular (Clubb y Bishop, 1984). En el corazón, la diferenciación terminal de los miocitos está dada por el incremento de la actividad contráctil y la permanencia de las células en la etapa G1 o G0 del ciclo celular (Rumyantsev 1977; Icardo y Ojeda 1984; Rumyantsev *et al.*, 1990). Bajo estos argumentos, Clubb y Bishop (1984), Clark y Fischman (1983) y Clark y cols. (1991) coinciden en que el crecimiento miocárdico en mamíferos abarca varias etapas del desarrollo del individuo y se divide en tres fases: Hiperplasia (etapa embrio-fetal), transicional (etapa postnatal) e hipertrófica (etapa madura). Varias investigaciones durante la etapa embrionaria destacan la importancia de la proliferación en el desarrollo del corazón en tubo recto, proceso de torsión, expansión de las cavidades ventriculares, músculos papilares y sistema de

conducción (Sissman, 1966; Jeter y Cameron, 1971; Rychterova, 1971; Rychter *et al.*, 1979; Icardo y Fernández-Terán, 1987; Rumyanstsev *et al* 1990; Thompson *et al.*, 1990; Mikawa *et al.*, 1992a, 1992b; Moorman y Lamers, 1994; Soufan *et al.*, 2006). Sin embargo, poco se ha abordado sobre el significado de la proliferación celular en el establecimiento de la arquitectura del miocardio trabecular, la zona compacta y el TI-V. En este trabajo encontramos evidencias de que la proliferación de los miocitos no sólo es el mecanismo regulador del incremento en la masa muscular ventricular como lo establecieron Clark y cols. (1989, 1991). Si no que, en términos generales, observamos, al analizar todos los componentes celulares de toda la región ventricular que la mayor actividad cíclica de las células de esta región se presenta entre los Sts 18-26HH pues la mayoría de ellas se localizó en las fases S o G2/M. Más tarde, durante los Sts 28-30HH, gran parte de la proporción de células permaneció en fase G1, lo que indica que las células de la región ventricular han comenzado a abandonar el ciclo celular y/o que el ciclo celular tiene una duración mayor, para dar paso a un proceso de maduración miocardial. Así mismo, al determinar el I-M, I-PCNA y el I-BrdU de cada uno de los componentes de la región ventricular (trabéculas, TI-V en desarrollo y zona compacta o pared), notamos que la actividad cíclica de los miocitos es distinta en cada uno de los elementos embrionarios, con una dominancia en la región de la zona compacta adyacente al epicardio. Además, observamos una pérdida de la actividad cíclica al final del periodo de estudio. Por lo tanto, podemos concluir que la distribución espacio-temporal de los miocitos cíclicos es determinante en el desarrollo y sentido de crecimiento de las trabéculas formadoras del TI-V así como de la expansión de las cámaras ventriculares.

Existen dos hipótesis sobre el proceso de crecimiento del TI-V en desarrollo, en la primera de ellas se sugiere que el incremento progresivo del TI-V es debido a un proceso activo de crecimiento celular de la región apical o inferior (Pateen, 1964; a.C. y Paúl, 1975). En contraste, otros autores proponen que el crecimiento del TI-V es el resultado de la integración pasiva o reclutamiento de poblaciones celulares provenientes de las cavidades derecha e izquierdas, que conducen a un crecimiento virtual de la región muscular del tabique (Van Mierop y Netter, 1969;

Rychter *et al.*, 1979; Van Mierop y Kutsche, 1984; De la Cruz *et al.*, 1997; Christoffels *et al.*, 2000; Meilhac *et al.*, 2004; Stadtfeld 2007). Sin embargo, nuestras observaciones no concuerdan del todo con ninguna de estas hipótesis. Por lo que postulamos una tercera hipótesis: basada en tres aspectos importantes del crecimiento del TI-V.

**1. Las trabéculas.** Mediante el análisis histológico de cortes seriados, notamos que todas las trabéculas que se desarrollan en el St 18HH y se ramifican paulatinamente, son las formadoras del TI-V entre los Sts 22-28HH. Pero resulta interesante mencionar que, al avanzar el desarrollo, conforme las láminas trabeculares se adosan a la trabécula central e incrementa el número de ramificaciones en su extremo inferior, no incrementa la presencia de miocitos cíclicos en cada ramificación. En su lugar sólo observamos cambios en su tamaño celular, incluso a partir del St 22HH algunas células miocíticas pertenecientes a las últimas trabéculas en adosarse a la trabécula central, manifestaron pequeñas miofibrillas escasamente organizadas, al mismo tiempo que presentaron una baja en la actividad mitótica determinada por los índices de mitosis, PCNA, BrdU (Tabla 2, Gráfica 2). Este decremento en la actividad mitótica de los miocitos trabeculares continuó hasta el final del estudio. Estos resultados permiten concluir que la elongación y ramificación de las láminas trabeculares no depende de la actividad proliferativa, más bien son el resultado de un proceso hipertrófico.

**2. Trabécula central.** Esta estructura fue evidente por marcaje *in vivo* en un trabajo previo (Contreras *et al.*, 2008a). En el presente estudio observamos que, al ser la estructura base del TI-V, presenta escasos procesos de ramificación. Asimismo, mediante estudios histológicos apreciamos una organización espacio-temporal de sus miocitos cíclicos, notando que los ubicados en el extremo superior (región adyacente a los cojines del canal AV) son poco proliferativos, y además, conforme avanza el desarrollo del TI-V hasta el cierre de la comunicación interventricular, el número de miocitos cíclicos va decayendo. En cambio, los miocitos del extremo inferior (región adyacente al epicardio o también denominada zona apical) conservan una gran actividad cíclica, principalmente entre los Sts 22-26HH, determinada por los altos índices de PCNA y BrdU. Esta

condición, además de estar sustentadas por las observaciones histológicas, coincide con las fases de ciclo celular analizadas previamente por citometría de flujo (Gráfica 1). Estos resultados concuerdan con los de Jeter y Cameron (1971) y los de Clark y Fischman (1983) quienes, al marcar con timidina tritiada miocitos de embriones de edades similares a las estudiadas en este trabajo, observaron que la mayor capacidad de proliferación radica en los de estadios más tempranos. Así mismo, notamos que, al avanzar el desarrollo del TI-V, disminuye la actividad cíclica de la mayoría de los miocitos de la región inferior. Todos estos hechos revelan que el extremo superior del tabique en desarrollo conserva el linaje celular más antiguo, poco proliferativo y más diferenciado. En contraste, los miocitos proliferativos del extremo inferior son la verdadera fuente de nuevos miocitos que determinan el crecimiento del TI-V en esa dirección (opuesta a los atrios).

**3. Zona compacta.** Los estudios de la actividad cíclica revelaron que los miocitos con mayor actividad tienen un patrón diferencial espacio-temporal que determina el crecimiento de los ventrículos en sentido opuesto a los atrios. La mayoría de los miocitos cíclicos se localizan en la zona compacta adyacente al epicardio, dicha condición disminuye conforme se avanza hacia el endocardio y son más abundantes en los Sts 24-28HH. Estos resultados coinciden con los tres estados de maduración de la pared miocárdica (miocitos indiferenciados, moderadamente diferenciados y maduros) observados por Zhang y Pasumarthi (2007) en ratón. Sin embargo, pese a que dichos investigadores no lograron describir una regionalización precisa de los tipos celulares mediante microscopio electrónica, si demostraron que los miocitos indiferenciados son predominantes en los ratones entre 11 y 18dg (St 21 a 34HH pollo), mientras que el día 18.5 (St 36HH pollo) los miocitos maduros son predominantes. Nuestros hallazgos son consistentes con las 4 etapas de morfogénesis miocárdica descritas por Mikawa y cols. (1992a, 1992b), dichos autores demostraron, mediante estudios de clonación viral, que las células miocárdicas tienen una distribución horizontal, mientras que las progenitoras de las células tallo marcadas por ellos se distribuyeron en un sentido ventro-horizontal formando un cono con mayor número de células clonales en la

zona adyacente al epicardio; sin embargo, no establecieron el gradiente del crecimiento como si lo hicimos nosotros en este trabajo.

La regionalización espacio-temporal de los miocitos altamente proliferativos que marca el sentido de crecimiento de las paredes ventriculares (zona compacta) en dirección contraria a los atrios, descrita en este trabajo, coincide parcialmente con el proceso de expansión dorso-ventral observado por Christoffels y cols. (2000), Lamers y Moorman (2002) y Togi y cols. (2004). Así mismo, consideramos que este proceso permite que las láminas trabeculares se ramifique y adosen a la trabécula central (compactación) para desarrollar el TI-V el cual aumenta de tamaño en la misma dirección. Por tanto, descartamos la idea de que el tabique crece en dirección baso-apical (hacia los atrios) como lo propusieron Mikawa y cols. (1992a, b), De la Cruz (1997), Franco y cols. (2006) y Stadtfeld y cols (2007).

### **Implicaciones de la apoptosis en el desarrollo de la región muscular del TI-V**

La apoptosis ocurre en procesos morfogenéticos de muchos organismos. Jacobson (1997) propone que la apoptosis durante la embriogénesis tiene al menos cuatro funciones: 1. Remodelación estructural; 2. Eliminación de estructuras innecesarias; 3. Control del número celular; 4. Eliminación de células anormales, fuera de su lugar, no funcionales o perjudiciales. En corazón, se ha señalado que la apoptosis es un fenómeno crucial en la remodelación e integración de los tractos de salida y en los cojines del canal A-V durante el desarrollo valvular (Pexieder, 1975; Cheng *et al.*, 2002; Fiorina, *et al.*, 2004). Respecto a su importancia en el desarrollo de trabéculas, paredes y TI-V, en este trabajo, mediante la técnica de TUNEL *in situ* y marcaje con lisotracker, no encontramos evidencias que apoyen la participación de la apoptosis en el desarrollo de las estructuras cardiacas estudiadas, pues aunque notamos una variación en el tiempo, los miocitos apoptóticos eran sumamente escasos y no presentaban un patrón regionalizado. Mediante la técnica TUNEL *in situ*, observamos que, entre los Sts 18 a 22HH, la apoptosis fue escasa o casi nula tanto en las trabéculas como en la pared de ambos ventrículos, similar a lo observado por Zhao y Rivkees (2000) en embriones de ratón 10.5dg, edades

equivalentes a las de este estudio. Posteriormente, a partir del St 24HH, cuando ya es evidente el TI-V, percibimos algunos miocitos apoptóticos, principalmente en la pared del ventrículo derecho. Finalmente en los Sts 26 a 30HH se detectaron escasos miocitos apoptóticos a lo largo del TI-V en desarrollo y en las paredes de ambos ventrículos, similar a lo detectado por Pexieder (1975) mediante estudios descriptivos también en aves. La baja frecuencia y falta de regionalización de apoptosis miocárdica durante la tabicación del corazón en el pollo (Sts 18 a 30HH), indican que no está implicada en la remodelación y/o formación de las trabéculas ni en el desarrollo de TI-V. No obstante, es necesario establecer si ésta es una característica específica de las aves pues Abdelwahid y cols. (1999) y Barbosky y cols (2006) encontraron un incremento en los índices de apoptosis de las trabéculas y región compacta de las paredes ventriculares durante los días 11 a 13dg (y de 12 a 16.5 dg en el ratón (St 24 a 36HH en pollo) lo que los llevó a sugerir que la apoptosis es necesaria para la formación de las cavidades ventriculares y para la compactación de las trabéculas.

Así mismo, cuando marcamos con lisotracker, además de no encontrar un marcaje abundante ni regionalizado en los miocitos de trabéculas, paredes o TI-V, observamos que el marcaje se concentró en células de linaje epicárdico, ubicadas en la región apical ventricular y sobre el surco interventricular. Esta ubicación concuerda con los resultados de los estudios histológicos, en donde se apreció una invasión importante de células del epicardio en estadios finales (28HH, 30HH) en la porción inferior del TI-V. Posiblemente este linaje celular está implicado en la vasculogénesis del TI-V como lo propusieron Gittenberger-de Groot y cols. (2000) y Pérez-Pomares y cols. (2002). En contraste, en ratón, Barbosky y cols (2006), mediante el uso de lisotracker durante el periodo de 12.5 a 16.5 dg (Sts 26 a 36HH de pollo), aunque detectaron un patrón apoptótico similar al nuestro en el surco interventricular, no pudieron definir el linaje celular marcado porque no realizaron una disección del corazón ni estudios histológicos.

Se conocen dos tipos de vías de señalización de la apoptosis. En la primera, la transducción de señales es determinada por receptores de membrana de la familia Fas y su respectivo ligando (Fas-L) que activan a la caspasa 8 (*vía*

*extrínseca*). La segunda vía se caracteriza por la translocación de la proteína Bax, la liberación del citocromo C en la mitocondria y la activación posterior de la caspasa 9 (*vía Intrínseca*) (Hochhauser *et al.*, 2003).

En este estudio, analizamos la expresión de algunos marcadores de ambas vías mediante inmunohistoquímica. Encontramos que, tanto la proteína L-Fas como su receptor, están presentes a lo largo del periodo estudiado (Sts 18 a 30HH). Fas fue localizado en la mayoría de los miocitos ventriculares, sin manifestar una regionalización; mientras que el ligando Fas-L, fue evidente tanto en los miocitos como en el endocardio entre los Sts 22 a 28HH. Estos datos son similares a los observados por Sharma y cols (2004) empleando los mismos marcadores en embriones de ratón de 10.5 a 13.5 (al comparar con embrión de pollo, St 18 a 30HH). La presencia simultánea del ligando y el receptor en la región ventricular indica una posible actividad de la vía de señalización *extrínseca*. Sin embargo, no encontramos la expresión de la caspasa 8, lo que sugiere que esta vía no está activada o sea que, en el caso de la región ventricular embrionaria de pollo, el ligando Fas y su receptor regulan otros procesos distintos a la apoptosis como podrían ser proliferación y/o diferenciación. Esta última idea, además de haber sido sugerida por Bromme y Holtz (1996) y Sharma y cols. (2004) es fuertemente apoyada por los hallazgos de otros investigadores que encontraron que el ligando Fas y su receptor están presentes en el corazón normal de adultos (Nakamura *et al.*, 2000, Nelson *et al.*, 2000; Wollert *et al.*, 2000) y en ratones en los que se afecta la región ventricular como hipoxia cardíaca (Tanaka *et al.*, 1994), hipertrofia miocárdica (Wollert *et al.*, 2000), insuficiencia cardíaca (Heinke *et al.*, 2001) o cardiomiopatía inducida (Nakamura *et al.*, 2000). Finalmente, los estudios *in vitro*, han revelado que la activación de Fas-L en células cardíacas de ratones normales (Wollert *et al.*, 2000) y en miocitos hipertróficos de neonatos (Badorff *et al.*, 2002) no induce apoptosis.

Sobre la ausencia de caspasa 8 es necesario hacer estudios en etapas tardías del pollo pues se ha descrito que la delección del gen de esta proteína en ratones provoca la muerte en el útero, debido a defectos del tubo neural, así como alteraciones en la masa ventricular. (Revisado en Kang *et al.*, 2004).

Sobre la *vía mitocondrial*, sólo estudiamos Bax y su inhibidor Bcl-2. Mediante inmunohistoquímica observamos que Bax fue expresado fuertemente en el citoplasma de los miocitos en toda la región ventricular de embriones de Sts 18 a 24HH. A partir de entonces dicha expresión disminuyó hasta decaer en el St 30HH. En contraste, Bcl-2 fue negativo en todo el periodo de estudio. Estos resultados complementan las observaciones de Sun y cols. (2002) en embriones de rata de 9 a 11.5dg, (St 9 a 18HH), etapas más tempranas a las de nuestro estudio, en donde revelan alta expresión de Bax y baja positividad a Bcl-2. La presencia de Bax durante el desarrollo del TI-V y la ausencia de Bcl2 en este periodo indicaría una alta actividad apoptótica. Sin embargo, el análisis de apoptosis por TUNEL *in situ* y lisotracker no apoyan este proceso. Estos resultados sugieren que el Bax detectado durante esta etapa embrionaria se encuentra libre, sin translocarse a la mitocondria lo que evita la liberación del citocromo C y por consecuencia Apaf-1 y caspasa 9 no se unen para formar el apoptosoma. Bajo este contexto, es necesario estudiar otras moléculas de la familia Bcl-2, como Bak, Bad, Bcl-X, Bcl-XL, Bcl-w, y Mcl-1 que se sabe pueden activar o inhibir la apoptosis (Yang y Korsmeyer, 1996) y podrían estar involucradas en la morfogénesis cardíaca.

Consideramos que esta información sobre el significado de la proliferación y apoptosis miocárdica permitirá determinar el o los mecanismos regulares de la proliferación, pues se ha demostrado que cuando ocurre una disminución en el tamaño del TI-V, la geometría de las cámaras ventriculares se ve afectada por un decremento en el volumen ventricular (Donofrio *et al.*, 1995).

Basados en los estudios de marcaje *in vivo* de De la Cruz y cols. (1997,1998) y Contreras y cols (2008a), así como los hallazgos sobre la importancia de la proliferación y apoptosis de los miocitos ventriculares mostrados en este trabajo, hemos dividido el desarrollo del tabique en tres fases:

1. *Fase Premorfogenética*. Comprende el periodo entre los Sts 9 a 17HH. Durante esta fase en el corazón en tubo recto aparece el sitio prospectivo del primer esbozo del TI-V. Esta edad corresponde en el pollo al St 9-10HH, 9días 5h en rata, 7.5 a 8 dg en ratón y 22+/- 1 día en humano. Más tarde, aunque el corazón

sufre diversos cambios morfológicos, las trabéculas comienzan a formarse cuando los ventrículos adquieren la posición lado a lado, St 17-18HH.

2. *Fase Morfogénica*. Incluye dos pasos: Morfogénesis Temprana: Sucede la formación del TI-VP (St 18-24HH en pollo, 11 a 12dg en rata, 9.5 a 10.5dg en ratón, 29 a 31+/- 1 día en humano). Morfogénesis Tardía: Se cierra el foramen interventricular (St 26-30HH en pollo, 12 a 16dg en rata, 10.5 a 13dg en ratón, 31 a 45 día en humano).

3. *Fase de crecimiento e histodiferenciación*. Ocurre desde el St 30HH en adelante en pollo, 16dg en rata, 13dg en ratón, 45 días en humano.

El análisis de los resultados de la expresión espaciotemporal de FCF1 y NRG1 así como sus receptores se ha basado en esta clasificación y en los patrones espaciotemporales de miocitos cíclicos y apoptóticos.

### **Patrón de expresión del factor de crecimiento fibroblástico 1 (FCF1)**

Como se describió en los antecedentes, se piensa que la cardiogénesis está determinada por la participación de los FCF1, 2 y 4 en dos pasos o etapas. El primer paso comienza con la especificación de las células del mesodermo en miocitos, inducida principalmente por el FCF1, 2 que es sintetizado por las células del endodermo. Después, una vez especificado el miocardio, se ha propuesto que la proliferación, diferenciación y vasculogénesis del corazón son reguladas por los propios miocitos, vía autocrina, mediante la síntesis del FCF1 y su receptor RFCF (Engelmann *et al.*, 1992). Pese a esta información poco se conoce sobre su implicación en la regulación de la proliferación de los miocitos formadores de trabéculas y por consiguiente del TI-V.

En este trabajo, observamos mediante inmunohistoquímica que el FCF1 se expresa en los ventrículos tanto en endocardio, epicardio y miocárdico durante el desarrollo del tabique. Sin embargo, existieron diferencias. En endocardio y epicardio la reacción positiva al antígeno fue escasa al *inicio de la etapa morfogénica* (St 18HH), incrementando poco a poco hasta el St 24HH pero decayó durante la morfogénesis tardía (Sts 26 a 28HH) hasta desaparecer al inicio de la *etapa de histodiferenciación* (Sts 30HH). En los miocitos, durante la

morfogénesis temprana (Sts 18HH a 24HH), la reactividad al antígeno fue homogénea pero escasa. No obstante, durante la *morfogénesis tardía* (St 24 a 28±1HH) percibimos un incremento en la intensidad en los miocitos del tabique en formación. Esta condición se conservó hasta el inicio de la *etapa de histodiferenciación* (St 30HH), aunque la proteína se reorganizó formando agregados. Estos datos son similares a los reportados por Fu y cols. (1991) en embriones de rata de 11 a 13dg (St 24 a 30HH en pollo) y por Zhu y cols. (1996) en embriones de pollo entre los St 18 a 27HH. Ambos grupos proponen una posible acción paracrina del endocardio y epicardio sobre el miocárdico para iniciar los procesos de vasculogénesis. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis, pues nunca detectamos una polarización de los miocitos marcados que correlacionara con su cercanía al endocardio o epicardio sobretodo en la etapa en que se inicia la vasculogénesis (28-30HH).

Nosotros, al igual que Sugi y cols. (1995), encontramos que RFCF1 es expresado por todas las células del miocárdico tanto de la región ventricular como en las formadoras del TI-V, pero no en endocardio ni epicardio. Por lo que respecta a su distribución a través del tiempo, notamos que durante la fase morfogenética la reactividad al antígeno fue incrementando paulatinamente y decayó al inicio de la etapa de histodiferenciación. Es importante destacar que RFCF1 siempre fue más abundante que el factor. Una posible explicación es que el miocito debe sintetizar más receptor porque se sabe que éste tiene la capacidad de reconocer otros factores de la misma familia como FCF2 y 4 (Engelmann *et al.*, 1992, Sugi *et al.*, 1992; Mima *et al.*, 1995; Shu *et al.*, 1996). Basados en estos señalamientos y en que los índices altos de expresión del RFCF detectados en este estudio concuerdan con los estadios en donde se observaron miocitos con mayor actividad proliferativa, podemos especular que este receptor junto con otros factores de la misma familia, que no fueron estudiados en este trabajo, podrían estar implicados en la formación del TI-V.

### **Patrón de expresión de la Neuregulina (NRG1)**

Diferentes estudios han revelado la importancia de la NRG1/ErbB en la morfogénesis cardíaca. Esta es una proteína secretada por el endocardio, indispensable durante la etapa embrionaria de ratones de 9.5 a 10.5dg (St 17 a 23HH pollo) para la expresión de trabéculas y el aparato valvular (cojines del canal A-V), mediante la regulación de los receptores ErbB2/4 en la región ventricular y ErbB2/3 en canal A-V. En el corazón fetal, su participación radica en la transformación del miocárdico en células del sistema de conducción; así mismo, promueve la diferenciación y supervivencia de los miocitos cardíacos (Falls, 2002, 2003; Rimer, 2003; Meyer y Birchmeier, 1995, Milan *et al.*, 2007). Finalmente, en el corazón postnatal y adulto, se ha descrito que la NRG1 es secretada por células endoteliales de las arterias coronarias y el endocardio adyacentes a los miocitos cardíacos, pero no se expresa en grandes arterias ni venas coronarias (Lemmens *et al.*, 2006, 2007). Así mismo, diversos autores señalan que NRG/ErbB controlan la hipertrofia cardíaca, regulan la supervivencia, proliferación, organización miofibrilar y la interacción célula a célula de los miocitos cardíacos (Zhao y Lemke 1998; Baliga *et al.*, 1999; Sawyer *et al.*, 2002; Fukazawa *et al.*, 2003; Kuramochi *et al.*, 2006). Además, protege de la apoptosis, estrés oxidativo y antraciclinas. (Fukazawa *et al.*, 2003; Kuramochi *et al.*, 2004; Lemmens *et al.*, 2006).

En este trabajo mostramos evidencias de la participación de la NRG1 en el desarrollo del TI-V. Mediante Western Blot, se demostró que en la región ventricular la **expresión relativa** (concentración) de NRG1 es mayor en los Sts 22, 26 y 30HH (10.5 a 11 y 13dg ratón). Mientras que al analizar su expresión espacio-temporal mediante inmunohistoquímica, no se halló un patrón regionalizado relacionado con las zonas de crecimiento y proliferación antes descritas, aunque sí se observaron cambios de expresión en el tiempo. Notamos que, al inicio de la *morfogénesis* en los primeros Sts 18 a 20HH (9.5 a 10dg ratón), la NRG1 no sólo es evidente en el endocardio, también se detecta en el miocárdico de los diferentes componentes del tabique. Incluso, a finales de esta etapa e inicio de la *histodiferenciación*, se expresó en los miocitos de la porción

interna del tabique en desarrollo y también fue evidente en algunas células del epicardio. Sin embargo, fue difícil determinar en los cortes seriados el grado de expresión de la NRG1 por lo que fue preciso determinar en el tiempo, los índices de intensidad del fluoróforo en los miocitos mediante inmunofluorescencia con microscopia confocal y la frecuencia de miocitos que expresaban NRG1 por citometría de flujo. De esta manera, observamos que aunque prácticamente todos los miocitos de la región ventricular eran positivos al anticuerpo, la intensidad de fluorescencia era muy basal durante toda la etapa morfogénica (Sts 18 a 28HH; 9.5 a 12dg). En contraste, los resultados de citometría de flujo, empleando el mismo anticuerpo, mostraron que menos de 2% de los miocitos de la región ventricular en estos mismos estadios presentaron la proteína. Más tarde, al inicio de la histodiferenciación detectamos un incremento en la población de miocitos positivos a la NRG cuantificados tanto por citometría de flujo como por microscopia confocal, patrón que no concuerda del todo con las etapas de alta actividad mitótica. Estos hechos demuestran que la NRG1 no esté implicada en la regulación de la proliferación indispensable para la embriogénesis del TIV.

El hecho de que el anticuerpo empleado fuera policlonal que reconoce la región C-terminal de todas las NRG1 indica que la proteína detectada por ambas técnicas es transmembranal, por consiguiente sintetizada por los miocitos. Esta aseveración está en contra de lo expresado clásicamente tanto en la etapa embrionaria como en la fetal y adulta en donde se señala que es el endocardio el que sintetiza a la NRG1.

Para confirmar nuestra hipótesis, realizamos estudios de RT-PCR e hibridación *in situ*. En el primer caso notamos que toda la región ventricular expresaba el RNAm de NRG1; sin embargo, los estadios con mayor expresión relativa del mensajero fueron 18, 22, 24, 26 y 30HH. Por otro lado, la hibridación *in situ*, mostró que la NRG1 es exclusiva del endocardio al inicio de la morfogénesis (St 18 a 20HH), más tarde (Sts 22-28HH) el RNAm de la NRG se localizó tanto en endocardio con en miocárdico. Esta expresión disminuye cuando se inicia la etapa de histodiferenciación (St 30HH). Estos resultados demuestran que el endocardio no

es el único tipo celular que sintetiza NRG1 durante el desarrollo del corazón como clásicamente se ha mencionado (Garratt, 2006, Liu *et al.*, 2005).

Respecto a los receptores de NRG1, diferentes estudios en mamíferos han demostrado que el heterodímero ErbB2/4 sólo está presente en la región ventricular (Carraway, 1996). En contraposición, encontramos, en el corazón de embrión de pollo entre los Sts 18 a 30HH, que este dímero no es exclusivo de la región ventricular, pues ambos estaban presentes en los miocitos de todo el corazón. Incluso los detectamos también, aunque en menor intensidad, en miofibroblastos y células epicárdicas. La presencia de los receptores en los miocitos de la zona ventricular, especialmente de las regiones formadoras del tabique en todos los estadios analizados mediante Western blot, apreciamos un efecto inverso en la expresión relativa de ErbB2 con respecto al ErbB4. Es decir el ErbB2, fue más abundante al inicio del estudio (St 18HH) y poco a poco fue decayendo hasta el St 30HH. En contraste, el ErbB4; fue escasamente expresado al inicio y poco a poco incrementó hasta el St 30HH. Así mismo, al determinar la frecuencia e índices de intensidad *in situ* del heterodímero ErbB2/4 en los miocitos de la región ventricular mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia, notamos que no hay una regionalización en la expresión de este receptor aunque sí una variación en el tiempo. De esta manera, identificamos dos picos de expresión del heterodímero, el primero fue detectado al inicio de la etapa morfogénica (St 18-20HH), antes de los procesos de proliferación, mientras que el segundo correspondió a la etapa de histodiferenciación (St 30HH), en ambos casos ErbB4 fue predominante.

Basados en nuestros hallazgos, consideramos que durante el desarrollo del TI-V existen dos mecanismos regulados por la NRG1 que se manifiestan en diferentes etapas del desarrollo. El primero tiene lugar entre los Sts 17-20HH, es de tipo paracrino, depende del endocardio y sucede a través del heterodímero ErbB2/4. Controla la morfogénesis de las láminas trabeculares pero no el crecimiento de las trabéculas por proliferación de los miocitos ventriculares. El segundo sucede después del St 28HH en adelante, es de tipo autocrino mediado por el homodímero ErbB4/4, provoca un incremento del RNAm de NRG1 en el miocardio

de paredes y TI-V que precede al incremento en la expresión de la proteína.  
También creemos que regula la maduración histológica.

*Cuadratura del círculo  
Perímetro constante  
Del insondable vacío.  
Base y altura del sinsentido  
Tristes líneas que se buscan*

*Encuentran y de frente siguen.  
Circunferencia somos  
Frontera de lo inasible  
Que es la vida.  
Mar de catetos prolongados  
Teoremas que dimensionan  
El valor de nuestra nada  
Nuestra muerte.*

*Eric Uribares Rangel*

## CONCLUSIONES

1. Por encima del surco interventricular prevalece una trabécula, un poco más prominente, denominada “trabécula central” a la cual conforme avanza el desarrollo, se ancla el resto de trabéculas para conformar la porción muscular del TI-V.
2. En la región en donde se ancla cada trabécula a su pared ventricular se forman pequeños huecos delimitados por endocardio que, a medida que avanza la cardiogénesis, van dividiendo a las trabéculas en múltiples ramas.
3. El extremo superior del tabique en desarrollo conserva el linaje celular más antiguo (poco proliferativo y más diferenciado). En contraste, el extremo inferior es la fuente de nuevos miocitos que determinan el crecimiento del TI-V en esa dirección (opuesta a los atrios).
4. La elongación y ramificación de las láminas trabeculares no depende de la actividad proliferativa, su crecimiento es el resultado de un proceso hipertrófico.
5. La regionalización espacio-temporal de los miocitos altamente proliferativos marca el sentido de crecimiento de las cavidades y tabique ventriculares en una dirección contraria a los atrios.
6. No se encontraron evidencias que impliquen a la apoptosis en la remodelación de trabéculas, ni el desarrollo del TI-V en embriones de pollo.
7. La baja actividad apoptótica, junto con la presencia del ligando Fas y su receptor, en ausencia de Caspasa 8, indican la regulación de procesos distintos a la apoptosis como proliferación y/o diferenciación.
8. El Bax detectado durante la etapa embrionaria parece no translocarse a la mitocondria, lo que evita la liberación del citocromo C y por consecuencia Apaf-1 y caspasa 9 no forman el Apoptosoma.
9. Con base en los cambios anatómicos y la actividad celular prominente (proliferación, histodiferenciación) el desarrollo del tabique consta de tres fases: *Premorfogenética, Morfogenética, Crecimiento e Histodiferenciación.*
10. No se detectó una correlación entre la expresión del FCF1 y el proceso de proliferación

11. La correlación de la proliferación con la expresión del RFCF sugiere la implicación de este receptor en la regulación de la actividad mitótica de los miocitos de la región ventricular a través de un FCF distinto al 1.
12. La NRG1 no está implicada en la regulación de la proliferación indispensable para la embriogénesis del TI-V.
13. Basados en nuestros hallazgos, consideramos que durante el desarrollo del TI-V existen dos mecanismos regulados por la NRG1 que se manifiestan en diferentes etapas del desarrollo. El primero tiene lugar entre los Sts 17-20HH, es de tipo paracrino, depende del endocardio y sucede a través del heterodímero ErbB2/4. Controla la morfogénesis de las láminas trabeculares pero no el crecimiento de las trabéculas por proliferación de los miocitos ventriculares. El segundo, sucede después del St 28HH en adelante, es de tipo autocrino mediado por el homodímero ErbB4/4, provoca un incremento del RNAm de NRG1 en el miocardio de paredes y TI-V, que precede al incremento en la expresión de la proteína. Regula, también, la maduración histológica.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Abdelwahid E., Pelliniemi L.J., Niinikoski H., Simell O., Tuominen J., Rahkonen O., Jokinen E. 1999. Apoptosis in the pattern formation of the ventricular wall during mouse heart organogenesis. *Anat. Rec* 256:208-217.
2. Abu-Issa R., Waldo K., Kirby M. L. 2004. Heart fields: one, two or more? *Dev. Biol.* 272, 281– 285.
3. Anderson R. H., Becker E.A. 1981. Atlas fotográfico de Anatomía Cardíaca. Ediciones Doyma. Barcelona. pp. 420-427.
4. Anderson R.H., Brown N.A. 1996. The anatomy of the heart revisited. *Anat Rec.* 246(1):1-7.
5. Anselmi G., Arteaga M., Espino V.J. 1976. Ventrículo Único. Nueva clasificación embriológico-anatómica. I. Patología y Fisiología. *Arch Inst Cardiol Méx.* 46: 148-167.
6. Badorff C., Ruetten H., Mueller S., Stahmer M., Gehring D., Jung F., Ihling C., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2002. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest.* 109(3):373-81.
7. Baliga R.R., Pimental D.R., Zhao Y.Y., Simmons W.W., Marchionni M.A., Sawyer D.B., Kelly R.A. 1999. NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-Kinase, p70<sup>S6K</sup>, and MEK-MAPK-RSK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 277:2026-2037.
8. Barbosky L., Lawrence D.K., Karunamuni G., Wikenheiser J.C., Doughman Y.Q., Visconti R.P., Burch J.B., Watanabe M. 2006. Apoptosis in the developing mouse heart. *Dev Dyn.* 235(9):2592-602.
9. Ben-Shachar G., Arcilla R.A., Lucas R.V., Manasek F.J. 1985. Ventricular trabeculations in the chick embryo heart and their contribution to ventricular and muscular septal development. *Circ. Res.* 57, 759-766.
10. Bromme H.J. Holtz J. 1996. Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem.* 163-164:261-75.
11. Carraway III K.L. 1996. Involvement of the neuregulins and their receptors in cardiac and neural development. *Bio Essays.* 18:263-266.

12. Cayré R., Valencia-Mayoral P., Coffe-Ramírez V., Sánchez Gómez C., Angelini P., De la Cruz M.V. 1993. The right atrioventricular valvular apparatus in the chick heart. *Act Anat.* 148: 27-33.
13. Clark, E. B., Hu N., Frommelt P., Vandekieft G.K., Dummett J.L., Tomanek R.J. 1989: Effect of increased pressure on ventricular growth in stage 21 chick embryos. *Am J Physiol.* 257, H55-61.
14. Clubb F.J, Bishop S. P. 1984. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab Invest.* 50, 571-577.
15. Contreras R.A., Sánchez-Gómez C., García R.H., Cimarosti L. 2008. Normal development of the muscular region of the interventricular septum. I. The significance of the ventricular trabeculations. *Anat. Histol. Embryol.* ISSN 0340–2096.
16. Contreras R. A., Sánchez G.C., Fierro P.R., González M.H. Acosta V.F. Arellano G.J. 2008. Normal development of the muscular region of the interventricular septum. ii. the importance of myocardial proliferation. *Anat. Histol. Embryol.* Aceptado.
17. Cheng G., Wessels A., Gourdie R.G., Thompson R.P. 2002. Spatiotemporal and tissue specific distribution of apoptosis in the developing chick heart. *Dev. Dyn.* 223, 119-133.
18. Christoffels V.M., Habets P.E., Franco D., Campione M., de Jong F., Lamers W.H., Bao Z.Z., Palmer S., Biben C., Harvey R.P., Moorman A.F. 2000. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 223(2):266-78.
19. Clark, A.W., Fischman A.D. 1983: Analysis of population cytogenetics of chick myocardial cells in tissue culture. *Dev Biol.* 97, 1-9.
20. Clark, E.B., Hu N., Turner D.R., Litter J.E., Hansen J. 1991: Effect of chronic verapamil treatment on ventricular function and growth in chick embryos. *Am J Physiol.* 261, H166-171.
21. Cohen M. 2004. The fibroblast growth factor signaling pathway. FGFs/FGFRs and associated disorders. En Esptein C, Ericsson R, Wynshaw-Boris A.

- Inborn errors of development. The molecular basic of clinical disorders of morphogenesis. *Oxford University Press, Inc. N Y.* pp. 381-400.
22. Davis C.L. 1927. Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Carnegie Contrib Embryol.* 19: 245-284.
  23. De la Cruz M.V., Castillo M.M., Villavicencio L., Valencia A., Moreno-Rodríguez R.A. 1997. Primitive interventricular septum, its primordium, and its contribution in the definitive interventricular septum: in vivo labeling study in the chick embryo heart. *Anat Rec.* 247: 512-20.
  24. 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. En. De la Cruz MV, Markwald R editors. *Living morphogenesis of the heart.* Boston, Basel, Berlin. Birkhäuser. 120-130.
  25. De la Cruz MV. 1979. Different concepts of univentricular Heart. *Herz* 4:67-72.
  26. De la Cruz, M.V., Quero-Jiménez M., Arteaga M.M., Cayré R. 1982. Morphogenèse du septum interventriculaire. *Coeur.* 13: 442-448.
  27. Donofrio M.T., Jacobs M.L., Norwood W.I., Rychik J. 1995. Early changes in ventricular septal defect size and ventricular geometry in the single left ventricle after volume-unloading surgery. *J Am Coll Cardiol.* 26(4):1008-15.
  28. Engelmann G., Dionea C., Jaye M. 1992. Acid fibroblast growth factor and herat development. *Circ Res.* 72:7-19.
  29. Erickson S.L, O'Shea K.S, Ghaboosi N., Loverro L., Frantz G., Bauer M., Lu L.H., Moore M.W. 1997. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *The Company of Biologists Limited.* 124:4999-5011.
  30. Falls D.L. 2002. Neregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental cell research.* 284: 14-30. Revisión.
  31. Falls D.L. 2003. Neuregulins and the neuromuscular system 10 years of answers and questions. *J Neurocytology.* 32:619-647.

32. Fiorina, P., Corradi D., Pinelli S., Maestri R., Lagrasta C., Buscaglia M., Davalli A., Folli F., Astorri E. 2004. Apoptotic/mytogenic pathways during human heart development. *Int J Cardiol.* 96:409-417.
33. Franco D., Meilhac M.S., Cristoffels M.V., Kispert A., Buckingham M., Kelly G.R. 2006. Left and right ventricular contributions to the formation of the interventricular septum in the mouse heart. *Dev. Biol.* 294, 366-375.
34. Fu Y.M., Spirito P., Yu Z.X., Biro S., Sasse J., Lei J., Ferrans V.J., Epstein S.E., Casscells W. 1991. Acidic fibroblast growth factor in the developing rat embryo. *J Cell Biol.* 114(6):1261-73.
35. Fukazawa R, Miller T.A., Kuramochi Y., Frantz S., Kim Y.D., Marchionni M.A., Kelly R.A., Sawyer D.B. 2003. Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J Mol Cell Cardiol.* 35(12):1473-9.
36. Garratt A.N. 2006. "To erb-B or not to erb-B..." Neuregulin-1/ErbB signaling in heart development and function. *J Mol Cell Cardiol.* 41(2):215-8.
37. Gassmann M., Casagrande F., Orioli D., Simon H., Lai C., Klein R., Lemke G. 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature.* 378:390-393.
38. Gittenberger-de Groot, A.C., Vranken-Peeters M.P., Bergwerff M., Mentink M.M., Poelmann R.E. 2000. Epicardial outgrowth inhibitions lead to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res.* 87, 969-971.
39. Givol D., Eswarakumar V., Lonai P. 2004. The fibroblast growth factor signaling pathway. Molecular and Cellular Biology of FGF signaling. En Epstein C, Ericsson R, Wynshaw-Boris A. Inborn errors of development. The molecular basic of clinical disorders of morphogenesis. Oxford University Press, Inc. N Y. pp. 367-380.
40. Goor A.D., Edwards E.J, Lillehei W. 1970. The development of the interventricular septum of the human heart. Correlative morphogenetic study. *Chest.* 58: 453-67.

41. Gorodezky C. 1999. Manual de Técnicas de Genética Molecular. Editores INDRE, México D.F.
42. Grant P.R. 1962. The Embryology of ventricular flow pathways in man. *Circulation* 25: 756-79.
43. Grothe C., Brand-Saberi B., Wilting J., Bodo Ch. 1996. Fibroblast growth factor receptor 1 in skeletal and heart muscle cell: Expression during early avian development and regulation after notochord transplantation. *Dev Dyn.* 206: 310-317.
44. Hamburger B., Hamilton H.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 88: 49-92.
45. Harh J.Y, Paul M.H. 1975. Experimental cardiac morphogenesis. I. Development of the ventricular septum in the chick. *J Embryol Exp Morph.* 33: 13-28.
46. Heinke M.Y., Yao M., Chang D., Einstein R., dos Remedios C.G. 2001. Apoptosis of ventricular and atrial myocytes from pacing-induced canine heart failure. *Cardiovasc Res.* 49(1):127-34.
47. Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, Pannet H, Shneyvays V, Shainberg A, Goldshtaub V, Tobar A, Vidne BA. 2003. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284(6):H2351-9.
48. Icardo J.M., Ojeda J.L. 1984. Effects of colchicine on the formation and looping of the tubular heart of the embryonic chick. *Acta Anat* (Basel). 119(1):1-9.
49. Icardo, J.M., Fernandez-Terán A. 1987. Morphologic study of ventricular trabeculation in the embryonic chick heart. *Acta Anat.* 130, 264-274.
50. Ishiwata T., Nakazawa M., Pu W.T., Tevosian S.G., Izumo S. 2003. Developmental changes in ventricular diastolic function correlate with changes in ventricular myoarchitecture in normal mouse embryos. *Circ Res.* 93(9):857-65.
51. Jacobson M.D. 1997. Programmed cell death: a missing link is found. *Trends Cell Biol.* 7(12):467-9.

52. Jeter, J.R. Cameron I.L. 1971. Cell proliferation patterns during cytodifferentiation in embryonic chick tissues: Liver, heart and erythrocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 23, 403-422.
53. Kang T.B., Ben-Moshe T., Varfolomeev E.E., Pewzner-Jung Y., Yogev N., Jurewicz A., Waisman A., Brenner O., Haffner R., Gustafsson E., Ramakrishnan P., Lapidot T., Wallach D. 2004. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol.* 173(5):2976-84.
54. Kang J.O., Sucov H.M. 2005. Convergent proliferative response and divergent morphogenic pathways induced by epicardial and endocardial signaling in fetal heart development. *Mech Dev.* Jan;122(1):57-65.
55. Karp G. 1999. Cell and molecular biology concepts and experiments. John Wiley and Sons, Inc. Segunda edición. Pp 574-607.
56. Kim H.S., Hidaka K., Morisaki T. 2003. Expression of ErbB receptors in ES cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 309:241-246.
57. Kramer T.V., 1942. The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the ventricular septum in the human heart. *Am J Anat.* 71, 343-370.
58. Kuramochi Y., Guo X., Sawyer D.B. 2006. Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 41(2):228-235.
59. Lamers, W.H. Moorman A.F.M. 2002. Cardiac septation: A late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis. *Circ Res.* 91, 93-103.
60. Lee K.F., Simon H., Chen H., Bates B., Hung M.C., Hauser C. 1995. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature.* 378:394-398.
61. Lemmens K., Segers V.F., Demolder M., De Keulenaer G.W. 2006. Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk. *J Biol Chem.* 14;281(28):19469-77.

62. Lemmens K., Doggen K., De Keulenaer G.W. 2007. Role of neuregulin-1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease: implications for therapy of heart failure. *Circulation*. 116(8):954-60. Revisión.
63. Li D., Rozen R. 2006. Maternal folate deficiency affects proliferation, but not apoptosis, in embryonic mouse heart. *J Nutr*. 136(7):1774-8.
64. Lin I.M., Das I., Schwartz G.M., Tsoulfas P., Mikawa T., Hempstead B. L., 2000. Trk C receptor signaling regulates cardiac myocyte development in vivo. *Dev. Biol*. 226, 180-191.
65. Liu F.F., Stone J.R., Schuldts A.J., Okoshi K., Okoshi M.P., Nakayama M., Ho K.K., Manning W.J., Marchionni M.A., Lorell B.H., Morgan J.P., Yan X. 2005. Heterozygous knockout of neuregulin-1 gene in mice exacerbates doxorubicin-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(2):H660-6.
66. Longart M., Buonanno A. 2002. Las neuregulinas: una familia de factores con funciones críticas en el desarrollo del sistema nervioso y en la diferenciación y transformación celular. *Rev Neurol* 34:91-97.
67. Lopez J., Edelman E., Stamler A., Hibberd M., Prasad P., Thomas K., DiSalvo J., Caputo R., Carrozza J., Douglas P., Sellke F., Simons M. 1998. Angiogenic potencial of perivascularly delivered aFCF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol*. 274: H930-936.
68. MacLellan R., Schneider M.D. 1999. Cell proliferation in cardiovascular development and disease. En Harvey Richard P, Rosenthal Nadia. Heart development. *Academic Press. San Diego*. Pp 405-407.
69. Markwald R.R., Trusk T., Moreno-Rodriguez R. 1998. Formation and septation of tubular heart. In Living morphogenesis of the heart (M. V. De la Cruz and R. Markwald, eds). Birkhäuser, Boston, Basel, Berlin, pp. 43-84.
70. Matsumoto I., Nijima A., Oomura Y., Sasaki K., Tsuchiya K., Aikawa T. 1998. Acidic fibroblast growth factor activates adrenomedullary secretion and sympathetic outflow in rats. *Am J Physiol* 275: R1003-1012.
71. Meier T., Masciulli F., Moore C., Schoumacher F., Eppenberger U., Denzer A., Jones G., Brenner H.R. 1998. Agrin can mediate acetylcholine receptor

- gene expression in muscle by aggregation of muscle-derived neuregulins. *J Cell Biol.* 141: 715-726.
72. Meilhac S.M., Esner M., Kelly R.G., Nicolas J.F., Buckingham M.E. 2004 The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell.* 6(5):685-98.
73. Meilhac S., Kelly R., Rocancourt D., Buckingham M. 2003. The mouse as a model of heart morphogenesis in mammals: origin and lineage of myocytes. *J Soc Biol.* 197(2):179-86. Revisión.
74. Meyer D., Birchmeier C. 1995. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature.* 378:386-389.
75. Milan D.J., Giokas A.C., Serluca F.C., Peterson R.T., MacRae C.A. 2006. Notch1b and neuregulin are required for specification of central cardiac conduction tissue. *Development.* 133(6):1125-32.
76. Mikawa T., Cohen-Gould L., Fischman D.A. 1992a. Clonal analysis of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective retrovirus. III: Polyclonal origin of adjacent ventricular myocytes. *Dev Dyn.* 195(2):133-141.
77. Mikawa T., Fischman D.A. 1992b. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(20):9504-9508.
78. Mima T., Ueno H., Fischman D.A., Williams L.T., Mikawa T. 1995. Fibroblast growth factor is required for *in vivo* cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc. Natl Acad Sci USA* 92: 467-471.
79. Moorman A.F.M. Lamers W.H. 1994. Molecular anatomy of the developing heart. *Trends Cardiovasc Med.* 4, 257-264.
80. Moreno RR. 1998. Contribución del cojín inferior del canal atrioventricular en la septación cardíaca y en el desarrollo de las válvulas atrioventriculares. Tesis doctoral. Facultad de ciencias. U. N. A. M.

81. Nakamura T., Mizuno S., Matsumoto K., Sawa Y., Matsuda H., Nakamura T. 2000. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest.* 106(12):1511-9.
82. Negro A, Brar BK, Lee KF. 2004 Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res.* 59:1-12. Revisión.
83. Nelson M.A, Passeri J., Frishman W.H. 2000. Therapeutic angiogenesis: a new treatment modality for ischemic heart disease. *Heart Dis.* 2(4):314-25.
84. Grego-Bessa J., Luna-Zurita L., del Monte G., Bolós V., Melgar P., Arandilla A., Garratt A.N., Zang H., Mukoyama Y.S., Chen H., Shou W., Ballestar E., Esteller M., Rojas A., Pérez-Pomares J.M., de la Pompa J.L. 2007. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell.* 12(3):415-29.
85. Niu j., Azfera A., Deucherc M.F, Goldschmidt-Clermonte P.J., Kolattukudya P.E. 2006. Targeted cardiac expression of soluble Fas prevents the development of heart failure in mice with cardiac-specific expression of MCP-1. *J Mol Cell Cardiol.* 40(6): 810–820.
86. Okoshi K., Nakayama M., Yan X., Okoshi M., Schuldt A., Marchionni M., Lorell B. 2004. Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: Muscarinic modulation of (beta)-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation.* 110:713-717.
87. Parlow M., Bolender D., Nighat K.M., Lough J. 1991. Localisation of bFGF-like proteins as punctuate inclusions in the preseptation myocardium of the chicken embryo. *Dev. Biol.* 146: 139-147.
88. Paschoud, N., Pexieder T. 1980. Patterns of proliferation during the organogenetic phase of heart development. In Mechanism of cardiac morphogenesis and teratogenesis (T. Pexieder, ed). New-York: Raven press, pp. 73-88.
89. Pasumarthi K.B., Jin Y., Bock M.E., Lytras A., Kardami E., Cattini P.A. 1995. Characterization of fibroblast growth factor receptor RNA expresión in the embryonic Mouse Heart. *Ann N Y Acad Sci.* 406-417.

90. Patstone G., Pasquale E., Maher P. 1993. Different members of the fibroblast growth factor receptor family are specific to distinct cell types in the developing embryo. *Dev. Biol.* 155:107-123.
91. Patten B.M. 1964: Foundations of embryology. McGraw Hill. New York, pp. 545-569.
92. Perez-Pomares J.M., Phelps A., Sedmerova M., Carmona R., Gonzalez-Iriarte M., Muñoz-Chapuli R., Wessels A. 2002. Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT-1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: A model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol.* 247, 307-326.
93. Pexieder T. 1975. Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of heart. *Advances in anatomy, embryology and cell biology.* 51, 1-100.
94. Pexieder T. 1980. Cellular Mechanisms Underlying the normal and abnormal development of the heart. In Etiology and morphogenesis of congenital heart disease (R. V. Praagh and A. Takao, eds). Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co, pp. 127-153.
95. Pliego P.L.Y. 2003. Estudio histológico de la pared del cono anterior y del tronco durante la embriogénesis del infundíbulo del ventrículo derecho en el corazón de embriones de pollo. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México.
96. Portales L.G., González D.V. 1997. Manual de Técnicas de Inmunohistoquímica. Editores DAVI-LAB. México D.F.
97. Rimer M. 2003. Neuregulins: Primary or secondary signals for the control of synapse-specific gene expression. *J Neurocytol.* 32: 665-675.
98. Rohrbach S., Yan X., Weinberg E.O., Hasan F., Bartunek J., Marchionni M., Mark A., Lorell B. 1999. Neuregulin in Cardiac Hypertrophy in Rats with Aortic Stenosis: Differential Expression of erbB2 and erbB4 Receptors. *Circulation.* 100:407-412.
99. Romyantsev P.P. 1977. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. *Int Rev Cytol.* 51:186-273.

100. Rumyantsev P.P., Erokhina I.L., Antipanova E.M., Martynova M.G. 1990. DNA and sex chromatin content in nuclei of conductive system and working myocytes of normal and hypertrophied human heart. *Acta Histochem Suppl.* 39:225-37.
101. Rychter Z., Rychterová V. 1983. Embryonic development of the heart ventricle. *Cesk Fysiol.* 32(3):237-40.
102. Rychter Z., Rychterová V., Lemež L. 1979. Formation of the heart loop and proliferation structure of its wall as a base for ventricular septation. *Herz* 4, 86-90.
103. Rychterova V. 1971. Principle of growth in thickness of the heart ventricular wall in the chick embryo. *Folia Morphol.* 19, 262-272.
104. Sambrook J, Russell W.D. 2001. Molecular Cloning a laboratory manual. Tercera edición. Editores Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Cork.
105. Sánchez-Gómez C., Cayré R., De la Cruz M.V. 1990. Consideraciones embriológicas y anatómicas sobre la septación cardiaca normal y patológica. II. Septum atrioventricular e interventricular. *Bol Med Hosp Inf Mex.* 47: 51-58.
106. Sarkar, S., Chawala-Sarkar M., Young D., Nishiyama K., Rayborn M.E., Hollyfield J.G., Sen S. 2004. Myocardial cell death and regeneration during progression of cardiac hypertrophy to heart failure. *J. Biol. Chem.* 279, 52630-52642.
107. Sawyer D.B., Zuppinger C., Miller T.A., Eppenberger H.M, Suter T.M. 2002. Modulation of Anthracycline- Induced Myofibrillar Disarray in Rat Ventricular Myocytes by Neuregulin- 1B and AntierbB2. *Circulation.* 105:1551-1554.
108. Sedmera D., Pexieder T., Hu N., Clark E.B. 1997. Developmental changes in the myocardial architecture of the chick. *Anat Rec.* 248(3):421-32.
109. Sedmera D., Thomas P.S. 1996. Trabeculation in the embryonic heart. *Bioessays.* 18(7):607.
110. Sedmera, D., Pexieder T., Vuillemin M., Thompson P.R, Anderson H.R. 2000. Developmental Patterning of the myocardium. *Anat. Rec.* 258, 319-37.

111. Segura V.M., López V.G., Jiménez G.L. 1997. Hibridación *in situ* ultraestructural. Editores Plaza y Valdés, S. A. de C.V. Pp: 16-18.
112. Sharma R.P., Anderson H.R., Copp J.A., Herderson J.D. 2004: Spatiotemporal analysis of programmed cell death during mouse cardiac septation. *Anat. Rec.* 277A, 355-369.
113. Sissman N.J., 1966. Cell multiplication rates during development of the primitive cardiac tube in the chick embryo. *Nature.* 210, 154-157.
114. Smith TK, Bader DM. 2007. Signals from both sides: Control of cardiac development by the endocardium and epicardium. *Semin Cell Dev Biol.* 18(1):84-9.
115. Soto B., Moulart J.A., Anderson H.R. 1980. Classification of ventricular septal defects. *Brit Heart J.* 43:332-343.
116. Soufan A.T., Van den Berg G., Ruijter J.M., De Boer P.A.J., Van Hoff M.J.B., Moorman A.F.M., 2006. Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation. *Circ Res.* 99, 545-552.
117. Steding G., Seidl W. 1981. Contribution to the development of the heart, Part II: Morphogenesis of congenital heart diseases. *Thorac Cardiovasc Surg.* 29(1):1-16.
118. Stadtfeld M., Ye M., Graf T. 2007. Identification of interventricular septum precursor cells in the mouse embryo. *Dev Biol.* 302(1):195-207.
119. Stalsberg H. 1969. Regional mitotic activity in the precardiac mesoderm and differentiating heart tube in the chick embryo. *Dev Biol.* 20(1):18-45.
120. Steding G., Seidl W., Kluth D., Schulze M. 1981. On the morphogenesis of the normal and the malformed heart. *Folia Morphol (Praha)* 29:243-246.
121. Streeter GL. 1942. Development horizon in human embryos. Description of age group XI, 13 to 20 somites and age group XII, 21 to 29 somites. *Carnegie Contrib Embryol.* 30: 211-30.
122. Streeter, G. L., 1948: Development horizon in human embryos. Description of age group XV, XVI, XVII, and XVIII, being the third issue of the *Carnegie Collection. Contrib. Embryol.* 32, 133-203.

123. Sugi Y, Sasse J, Barron M, Lough J. 1995. Developmental Expression of Fibroblast growth factor receptor-1 (*cek-; flg*) during heart development. *Dev Dyn.* 202:115-125.
124. Sugi Y, Sasse J, Lough J. 1992. Inhibition of precardiac mesoderm cell proliferation by antisense oligodeoxynucleotide complementary to fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *Dev. Biol.*157:28-37.
125. Sun F, Akazawa S, Sugahara K, Kamihira S, Kawasaki E, Eguchi K, Koji T. 2002. Apoptosis in normal rat embryo tissues during early organogenesis: the possible involvement of Bax and Bcl-2. *Arch Histol Cytol.* 65(2):145-57.
126. Tanaka A., Matsumori A., Wang W., Sasayama S. 1994. An angiotensin II receptor antagonist reduces myocardial damage in an animal model of myocarditis. *Circulation.* 90(4):2051-5.
127. Thompson D.R. 1995. Cardiac rehabilitation: how can it be improved? *J Psychosom Res.* 39(5):519-23.
128. Thompson R.P., Lindroth J.R., Wong Y.M.M. 1990. Regional differences in DNA-synthetic activity in the preseptation myocardium of the chick. In *Developmental Cardiology: Morphogenesis and function* (E. B. Clarke and A. Takao, eds). Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co, pp. 219-234.
129. Togi K., Kawamoto T., Yamauchi R., Yoshida Y., Kita T., Tanaka M., 2004. Role of Hand1/eHAND in the Dorso-ventral patterning and interventricular septum formation in the embryonic heart. *Mol. Cell Biol.* 24, 4627-4635.
130. Tokuyasu K.T. 1989. Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. III. Generation of fasciae adherentes and costameres. *J Cell Biol.* 108(1):43-53.
131. Ueda H., Oikawa A., Nakamura A., Terasawa F., Kawagishi K., Moriizumi T. 2005. Neuregulin receptor ErbB2 localization at T-tubule in cardiac and skeletal muscle. *J Histochem Cytochem.* 53(1):87-91.
132. Van Mierop L.H., Kutsche L.M. 1984. Interruption of the aortic arch and coarctation of the aorta: pathogenetic relations. *Am J Cardiol.* 54(7):829-34.

133. Van Mierop, L. H. S., and F. H. Netter, 1969: Embryology. In Collection of Medical Illustrations (F. H. Netter, ed). New Jersey: CIBA Pharmaceutical Co, Vol. 5, Sect. III, pp 112-130.
134. Virágh S., Challice C.E. 1973. Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse. *J Ultrastruct Res.* 42(1):1-24.
135. Wagner M., Siddiqui M.A. 2007. Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation. *Exp Biol Med* (Maywood). 232(7):852-65.
136. Wagner M, Siddiqui MA. 2007. Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation. *Exp Biol Med* (Maywood). 232(7):866-80.
137. Wollert K.C., Heineke J., Westermann J., Lüdde M., Fiedler B., Zierhut W., Laurent D., Bauer M.K., Schulze-Osthoff K., Drexler H. 2000. The cardiac Fas (APO-1/CD95) Receptor/Fas ligand system: relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1 in cardiac myocytes. *Circulation.* 101(10):1172-8.
138. Yang E., Korsmeyer S.J. 1996. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.* 88(2):386-401.
139. Yu Z., Epstein S., Casscells W. 1990. Immunohistochemical localizacion of Basic and fibroblast growth factores in developing rat Heart. *Circulation.* 84: 322-332.
140. Zhang F., Pasumarthi K.B. 2007. Ultrastructural and immuno-characterization of undifferentiated myocardial cells in the developing mouse heart. *J Cell Mol Med.* 11(3):552-60.
141. Zhao JJ, Lemke G. 1998. Selective disruption of neuregulin-1 function in vertebrate embryos using ribozyme-tRNA transgenes. *Com Biol Limited.* 125:1899-1907.
142. Zhao X, Citrin B, millar G, Frist W. Merril W, Fischell T, Atkinson J, Yeoh T-K. 1995. Association of acid fibroblast growth factor and untreated low grade rejection with cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation.* 59:1005-1010.

143. Zhao X, Frist W, Yeoh T, Miller G. 1994a. Modification of alternative Messenger RNA splicing of fibroblast growth factor receptor in human cardiac allografts during rejection. *J Clin Invest.* 94:992-1003.
144. Zhao X, Yeoh T, Frist W, Porterfield D, Miller G. 1994b. Induction of acidic fibroblast growth factor and full-length platelet-derived growth factor expression in human cardiac allografts. *Circulation.* 90: 677-685.
145. Zhao YY, Feron O, Dessy Ch, Han X, Marchionni M, Kelly RA. 1999. Neuregulin signaling in the heart. Dynamic targeting of erbB4 to caveolar microdomains in cardiac myocytes. *Cir Res.* 84:1380-1387.
146. Zhao Z., Rivkees S.A. 2000. Programmed cell death in the developing heart: regulation by BMP4 and FGF2. *Dev Dyn.* 217(4):388-400.
147. Zhu X., Sasse J, McAllister D, Lough J. 1996. Evidence that fibroblast growth factors 1 and 4 participate in regulation of cardiogenesis. *Dev Dyn.* 207: 429-438.

## APÉNDICES

### I. TÉCNICAS

#### I.1. Técnica de inclusión en Paraplasto

Los corazones una vez fijados con Bouin-alcohólico por 12h y lavados con alcohol al 70% por un día, fueron deshidratados en un tren de alcoholes graduales de 70%,80%, 90% 96% y absoluto durante 15 min. en cada uno. Las muestras se aclararon con aceite de cedro, dando un cambio de una mezcla de alcohol absoluto y aceite de cedro (1:1), durante 1h y un baño de aceite de cedro puro de 2 días. Luego fueron tratadas con aceite de cedro + cloroformo (1:1) durante 1h. Los siguientes procedimientos fueron realizados dentro de un horno para histología Ríos Rocha ECM a 58-60°C. Un cambio se hizo con una mezcla de cloroformo: parafina (1:1) por 30 min. La preinclusión fue realizada colocando los especímenes en paraplasto puro toda la noche y dos cambios de 1h. Por ultimo los corazones fueron colocados en moldes de plástico para su inclusión, orientándolos en posición ventral para obtener cortes frontales. Los cortes se hicieron seriados de 5µm de espesor en un micrótopo Leitz, se estiraron colocándolos en un baño de flotación con gelatina a 50°C y se montaron en portaobjetos marcados con su número de registro.

#### I. 2. Técnica de Hematoxilina-Eosina

Los cortes se desparafinaron y rehidrataron. Se colocaron de 1 a 2h en un horno para histología Ríos Rocha ECM a 58-60°C, luego se embebieron en dos cambios de xileno de 10 min. c/u; se rehidrataron en un tren de alcoholes al 100%, 96%, 80%, 70%, 50% 35% durante 2 min. c/u hasta llegar al agua destilada. Posteriormente se dio un baño de 7 a 8 min. con Hematoxilina de Harris, el exceso del colorante fue lavado con agua destilada por 3 min. El color de los núcleos fue virado al realizar un cambio rápido con la solución 70% de alcohol con 5 gotas de HCl y 3min. con agua de la llave:amoniac (1:10000). Esta reacción se detuvo al lavar los cortes en agua destilada. El citoplasma celular fue teñido con Eosina durante 3-6 min. Los cortes fueron deshidratados rápidamente con dos cambios de alcoholes de 96% y dos de alcohol absoluto. Luego de bañar los cortes con xileno se montaron con resina.

**Soluciones para Hematoxilina-Eosina:****A) Hematoxilina Harris**

Hematoxilina en Cristales	2.5 g
Alcohol 96%	25 ml
Alumbre de amonio de potasio	50 g
Agua destilada	500 ml
Oxido rojo de mercurio	1.25 g

**Procedimiento:**

Disolver la hematoxilina en el alcohol, calentando ligeramente y separando el recipiente. En 100 ml de agua destilada disolver el alumbre calentando ligeramente. Mezclar las dos soluciones y lavar los dos recipientes con los 100 ml de agua restantes. Hervir a fuego fuerte y cuando se inicia el hervor, retirar el recipiente del calor, añadir el oxido rojo de mercurio, seguir calentando a fuego muy lento, hasta que la solución tome un color rojo púrpura. Enfriar la solución rápidamente con agua corriente de la llave. Filtrar diez veces para eliminar los residuos de amonio. Por cada 100 ml de hematoxilina añadir de 4 a 5 ml de ácido acético glacial, la mitad al acabar de preparar la solución y la otra mitad al usarla.

**B) Eosina de Carnegie:**

Eosina	4 g
Alcohol de 96°	100 ml
Agua destilada	300 ml

**Procedimiento:**

Disolver primero la eosina en agua y añadir después el alcohol. Dejar madurar a la luz y en frasco claro durante tres semanas. Guardar en el mismo frasco. Si se usa eosina amarillenta, para lograr una tinción adecuada, añadir tres gotas de ácido acético glacial por cada 100 ml de colorante.

**1.3. Técnica de Marcaje de oligonucleotidos.**

La sonda fue mezclada en una relación 100 pmol por cada 25U de TDT y 1 nmol de Dig-dUTP y se resuspendió con su buffer correspondientes. La mezcla fue incubada durante 2h a 37°C, inmediatamente después se colocó en hielo. La reacción fue detenida por sobrecalentamiento incubando la muestra a 70°C 10 min. y adicionando EDTA 0.2M. El

oligonucleótido marcado fue precipitado con acetato de sodio y etanol al 70% durante 12h a -20°C. La sonda fue recuperada centrifugando la mezcla a una velocidad de 12,000xg a 4°C/30 min. El botón del oligonucleotido marcado fue lavado con etanol al 70%, secado al aire y resuspendido en 50µl de TE 1X y almacenado a -20°C hasta su uso.

## II. SOLUCIONES

### II. 1. Bouin alcohólico.

Solución saturada de alcohol al 70% con ácido pícrico	75 ml
Formol 37% CH <sub>2</sub> O	25 ml
Ácido acético glacial C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	5 ml
Aforar con agua destilada hasta un volumen de	100 ml

### II. 2. Formol al 3.5 % en PBS 1X, pH 7.2

Formaldehído al 37% CH <sub>2</sub> O	9.45 ml
PBS 1X	100 ml

### II. 3. Paraformaldehído al 4% en PBS

Paraformaldehído	4gr
PBS pH 7.4	100ml

\* El PBS se calienta entre 50 a 60°C, se agrega poco a poco el paraformaldehído, se agita hasta que la solución se transparente. En caso de turbidez se adiciona una o dos gotas de NaOH 1N.

### II. 4 Ringer

Cloruro de Sodio (NaCl)	16.66gr
Cloruro de Potasio (KCL)	1.05gr
Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> )	0.6gr
H <sub>2</sub> O destilada	2.5litros

### II. 5 Solución de Perfusión

Glucosa	1gr
NaHCO <sub>3</sub>	0.58gr
Ácido pirúvico pH 7.3	0.27gr

### II. 6.- Medio de Congelación

Medio RPMI 1640 (con antibióticos)	60mL
Suero Fetal de Bovino	20mL
Dimetil sulfóxido (DMSO)	20mL

**II. 7.- PBS 1X**

Cloruro de sodio (NaCl)	11.94 g
Fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	8.51 g
Fosfato de potasio ( $\text{KHPO}_4$ )	3.48 g
Aforar con agua destilada hasta un volumen de	1000 ml

**II.8. Solución de SSC20X, pH 7.0**

Cloruro de Sodio NaCl	175.3g
Citrato de Sodio	88.2g
H <sub>2</sub> O inyectable	1000mL

\*esterilizar por autoclave

**II.9. Solución de Lisis**

Tris 10 mM pH 8.0;  
 Cloruro de sodio 150 mM  
 Dexosicolato de sodio 1%  
 Tritón x-100 1%  
 SDS (sodium dodesil sulfato) 0.1%  
 Leupeptina 1nM, Fenilmetilsufonida 1nM

**II.10. Solución de Prehibridación**

PIPES 40mM (pH 6.8)  
 EDTA 1mM (pH 8.0)  
 Cloruro de Sodio (NaCl) 0.4M  
 Formamida 50% (v/v) en SSC 2X  
 Solución de bloqueo comercial al 1%,  
 Lauril Sulfato de Sódio SDS 7%  
 Solución de Denhardt's al 5X  
 Sulfato de Dextran al 50%

## **PERSPECTIVAS**

- Corroboraremos la baja expresión de muerte celular durante la maduración de los ventrículos en mamíferos.
- Con la finalidad de determinar el FCF que junto con el RCF1 está implicado en la regulación del desarrollo del TIV, analizaremos la expresión espaciotemporal de otros FCFs distintos al 1 y la correlacionaremos con los datos obtenidos en este estudio sobre los patrones espaciotemporales de miocitos cíclicos y apoptóticos.
- Con las aportaciones obtenidas en este trabajo, realizaremos estudios de cultivo in Vitro para determinar la participación de la NRG en la formación de las trabéculas y su implicación en la histodiferenciación del miocardio ventricular.
- Integraremos los conocimientos obtenidos con las patologías de corazón univentricular e hipoplasias ventriculares.

**ARTICULO**

1 **NORMAL DEVELOPMENT OF THE MUSCULAR REGION OF THE**  
2 **INTERVENTRICULAR SEPTUM. II. THE IMPORTANCE OF MYOCARDIAL**  
3 **PROLIFERATION**

4

5 Alejandra Contreras- Ramos<sup>1</sup> MC

6 Concepción Sánchez- Gómez<sup>1</sup> PhD

7 Reyna Fierro-Pastrana<sup>2</sup> PhD

8 Humberto González-Martínez<sup>2</sup> PhD

9 Francisco Acosta-Vazquez<sup>3</sup> MC

10 José Arellano-Galindo<sup>4</sup> PhD

11

12 1, 3, 4. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Deptos. Biología del Desarrollo y  
13 Teratogénesis Experimental, Patología Clínica y Experimental, Hematología, Sección  
14 Biología Molecular.

15

16 2. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México. Depto. Ciencias de la  
17 Salud.

18

19 **To whom correspondence should be addressed:**

20 Concepción Sánchez- Gómez PhD. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Depto.  
21 Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental. Dr. Márquez 162, Col. Doctores,  
22 Del. Cuauhtémoc. CP 06720. México, D.F.

23 Phone: (55-5) 5-88-90-05

24 e-mail: csanchez@himfg.edu.mx, csgomez\_2000@yahoo.com

25

26 **NUMBER OF FIGS: 6**

27

28 **NUMBER OF TABLES: 2**

29

30 **SOURCES OF FUNDING.**

31 - Grant sponsor: Secretaría de Salud, México, Grant number: HIM/2004/046.

32 - Alejandra Contreras Ramos is a fellowship of Consejo Nacional de Ciencia y  
33 Tecnología. Grant number: CoNaCyT 129476.

1

**SUMMARY**

2

In the first paper we concluded that the muscular region of the interventricular septum is developed by the trabecular branches and showed evidence that the developing interventricular septum elongates in a direction opposite of the atria. Nevertheless, to date the literature is lacking precise information on the importance of myocardial proliferation not only in this process but also in the morphogenesis of the ventricular cavities. The aim of the present study was to determine the spatial and temporal distribution of high-intensity foci of cycling myocytes in the ventricular region of the heart of chicken embryos during cardiac septation. Histological studies, detection of the proliferating cell nuclear antigen by light and confocal microscopy and flow cytometry analysis were carried out. The results corroborate that the developing interventricular septum grows in a direction opposite of the atria. A remoulding mechanism that results in fenestrated trabecular sheets and trabecular branching is discussed. Our findings allowed us to summarize the normal morphogenesis of the muscular region of the interventricular septum in a way that is different from that suggested by other researchers.

17

18

19

Key words: Cardiac septation, Interventricular septum, Cell proliferation, Ventricular trabeculations Chick embryonic heart

21

22

23

1

## INTRODUCTION

2 In birds and mammals, the mature heart results from the progressive addition of  
3 cephalic and caudal cell populations (De la Cruz, 1998; Markwald et al., 1998, Abu-  
4 Issa R. et al., 2004). Numerous cellular activities including cell growth, cell proliferation  
5 and apoptosis are necessary for development of the characteristic morphology of the  
6 heart (Sissman, 1966; Pexieder, 1975, 1980; Paschoud and Pexieder, 1980; Clark et  
7 al., 1989; Lin et al., 2000; Sharma et al., 2004; Sarkar et al., 2004; Soufan et al., 2006).  
8 Formation of the ventricular trabeculations and the interventricular septum are some  
9 very clear examples of this. In our previous paper (Contreras et al., 2007), in which we  
10 labelled the heart of chicken embryos *in vivo*, we concluded that morphogenesis of the  
11 interventricular septum (IVS) occurs in two steps: A. Formation of the primitive  
12 interventricular septum. B. Growth of the primitive interventricular septum (PIVS) and  
13 closure of the interventricular foramen. We also demonstrated that the muscular region  
14 of the interventricular septum is formed by the trabecular branches. Likewise, we  
15 provided evidence showing that elongation of the developing ventricular septum occurs  
16 in a direction opposite of the atria (Contreras et al., 2007). However, to date there is no  
17 precise information on the importance of myocardial proliferation in morphogenesis of  
18 the ventricular cavities and the muscular region of the IVS. In order to gain this  
19 information, the aim of the present study was to determine the spatio- temporal  
20 distribution of high-intensity foci of cyclic myocytes in the ventricular region of the heart  
21 of chicken embryos during cardiac septation (stages 18 to 30HH). For this purpose,  
22 histological studies and detection of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using  
23 light and confocal microscopy were carried out. The proliferative activity of the cardiac  
24 cells was also determined by flow cytometry. A regional myocyte proliferation pattern  
25 was found, supporting the idea that the developing IVS elongates in the direction  
26 opposite of the atria. Likewise, a summary of morphogenesis of the muscular region of  
27 the septum is offered.

1

## MATERIALS AND METHODS

2 Descriptions of materials, methods and results are based on definitions by Contreras et  
3 al., (2007). We considered the superior or basal region of the PIVS which faces the  
4 cushions of the atrioventricular (AV) canal. In contrast, the inferior region is at the  
5 myocardial wall of the pointed end (apex) of the heart.

6 *Embryos.* Fertile White Leghorn hen's eggs were obtained from a local hatchery  
7 (ALPES Tehuacán, Pue. México). They were incubated at 37°C in a moist atmosphere  
8 to acquire embryos at stages 18HH (3 days), 20HH (3 1/2 days), 22HH (4 days), 24HH  
9 (4 1/2 days), 26HH (5 1/2 days), 28HH (6 days) and 30HH (8 days). The embryos were  
10 staged according to Hamburger and Hamilton (1951). They were perfused, fixed in  
11 alcoholic Bouin's solution and dissected in order to obtain the heart.

12 *Histological analysis of the heart.* After an overnight fixation, the specimens were  
13 dehydrated and embedded in paraplast. Frontal 5µm serial sections were cut and  
14 stained with haematoxylin and eosin. Photographs were taken at 400X and 1000X  
15 magnification, using an optic microscope (Olympus BH-2 RFCA, Tokyo Japan)  
16 equipped with a digital camera (Nikon Collpix 4500, Tokyo, Japan). Photographs at  
17 1000X magnification were used to count the myocyte nuclei (TM) and the mitotic  
18 myocytes (MM) in a tissue area corresponding to the microscopic field. The following  
19 regions were considered: **A.** The right and left ventricular walls to which the more  
20 distant myocardial trabeculation was anchored (all the stages studied). **B.** The superior  
21 and inferior regions of trabeculation that projected above the interventricular groove  
22 (stages 18, 20 and 22HH). **C.** The superior and inferior zones of the PIVS (stages 24,  
23 26 and 28HH). **D.** The inferior border of the mature IVS and the boundary between its  
24 basal and medial thirds (stage 30HH). At each stage, three hearts were examined; to  
25 avoid the problem of double-counting the same cells, every 3rd section was analyzed.

26 The Mitotic Index (M-I) of myocytes for each region was evaluated according to Fiorina  
27 et al., (2004) by the average of myocyte nuclei (TM) and of mitotic myocytes (MM) as  
28 follows:  $M-I = MM \times 100/TM$ .

1 *Immunohistochemistry and immunofluorescent assays.* Embryos were fixed overnight  
2 in 3.5% formaldehyde in PBS (Phosphate Saline Solution) at 4°C, dehydrated through  
3 graded ethanol and embedded in paraplast. Serial 5µm sections were cut and mounted  
4 onto polylysine-coated slides. After deparaffination and hydration slides were washed  
5 with PBS. To recover antigenicity, histological sections were immersed in an antigen  
6 retrieval citra plus solution (BioGenex HK080-5K) and autoclaved for 5 minutes. They  
7 were pretreated with a power universal reagent (BioGenex HK085-5K) to reduce  
8 nonspecific binding and then incubated with the primary antiserum anti-PCNA (mouse  
9 monoclonal, DAKO Corp.) at a dilution of 1:200 in PBS or a normal rabbit serum  
10 (negative control). Three rinses with PBS were followed by incubation with a  
11 horseradish peroxidase polymeric rabbit/mouse system (DAKO Corp K067589) or with  
12 FITC conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Santa Cruz SC-2010) at a  
13 dilution of 1:200 in PBS (green fluorescence). After several washes, the  
14 immunohistochemistry preparations were contrasted with haematoxylin;  
15 immunofluorescent assays were counterstained with Evans blue (red fluorescence).

16 *Histological detection of PCNA.* Photographs at 1000X magnification were taken from  
17 immunohistochemistry preparations of the frontal sections of the embryonic heart using  
18 the same equipment employed for the histological studies. The myocyte nuclei (TM)  
19 and myocytes expressing PCNA (M-PCNA) were recorded in a tissue area  
20 corresponding to the microscopic field. The same regions studied in the histological  
21 analyses were considered. The average value was used to evaluate the PCNA index  
22 or percentage of myocytes expressing PCNA (PCNA-I) as follows:  $PCNA-I = (Mpcna) \times$   
23  $100 / TM$ . To confirm the results of histological detection of PCNA immunofluorescence,  
24 preparations were photographed under a confocal laser scanning microscope (Zeiss,  
25 Axiovert) using the LSM 510- 2.5 software (Carl Zeiss, Goettingen, Germany).

26 *Isolation of cardiac cells.* Hearts were perfused and washed with a permission buffer  
27 solution (1g glucose; 0.58g NaHCO<sub>3</sub>; and 0.27g pyruvic acid, pH 7.3). The ventricular  
28 region was separated from the atria and immersed in an ethylene glycol tetracetic acid

1 (EGTA) supplemented permission buffer solution for 15 minutes. The tissue was  
2 digested with collagenase (2 mg/ml) for 30 minutes gradually enhancing the EGTA  
3 concentration. Immediately the samples were triturated for 30 seconds, filtered through  
4 a 50  $\mu$ M cheese cloth and centrifuged at 500x g for 5 minutes. The pellet was  
5 suspended in a 4% bovine serum albumin solution. Cells in the suspension were  
6 counted under a phase-contrast microscope (Olympus CK2, Tokyo, Japan). The  
7 samples were capped and stored in the dark at 2° to 8°C until used for the flow  
8 cytometric analysis.

9 *Flow cytometric determination of DNA content and proliferative activity of cells.* A  
10 CycleTEST™ kit (Becton Dickinson 23292301) was used. Samples of  $5.0 \times 10^5$  cardiac  
11 cells were obtained as described in the previous paragraph. Cell suspensions were  
12 centrifuged (400x g/ 5 minutes) at room temperature (20° to 25°C). For enzymatic  
13 digestion of cell membranes and cytoskeleton, a trypsin solution in a spermine  
14 tetrahydrochloride detergent buffer was added. After gently shaking, the samples were  
15 incubated for 10 minutes in an inhibitory solution (trypsin inhibitor and ribonuclease A in  
16 citrate-stabilizing buffer) at room temperature. To stain the cell nucleus, each tube was  
17 subsequently incubated for 10 minutes in a propidium iodide solution in the dark at 2°  
18 to 8°C. Cells were filtered through a 50- $\mu$ m nylon mesh into a labelled 12 x 75-mm  
19 tube. The results were captured using the CellFIT software on a DDM-equipped  
20 FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Co. California USA). Ten thousand events  
21 were acquired in the list mode for each sample and analyzed with the ModFit LT  
22 software (Becton Dickinson Co. California USA). The DNA index (DI) was calculated by  
23 dividing the average of the relative DNA content of cell debris by the mode normal  
24  $G_0/G_1$  population.

25

1

## RESULTS

### 2 *I. Histological changes in the interventricular septum during cardiac septation.*

3 Frontal histological sections of the embryonic heart between stages 18 to 20HH  
4 showed the apical region of the future ventricles lined by some small myocardial  
5 projections covered by endocardium. These projections are classically called  
6 trabeculations which, in anatomic terms, are scarcely branched individual structures  
7 (Fig.1A). In this period, a slightly thicker trabeculation above the interventricular groove  
8 (central trabeculation) was observed (Fig 1A). The lateral trabeculations were a little bit  
9 longer and their free edge, facing the cushions of the AV canal, was oriented towards  
10 the central trabeculation (Fig 1A). Within the ventricular wall where each trabeculation  
11 was anchored, small spaces were observed to be lined by endocardium, which gave  
12 the impression of forming trabecular branches (Fig. 1A,II,III). During stages 21 to  
13 22HH, trabeculations at the superior edge began to lose individuality and to fuse. In  
14 contrast, trabeculations at the inferior region (adjacent to the ventricular wall) became  
15 longer and more branched (Compare Figs. 1A and 2A). Later at stage 24HH, the PIVS  
16 could be observed for the first time (Fig. 2B). Two regions formed this embryonic  
17 structure that was facing the cushions of the AV canal: one that was smooth and the  
18 one area, located towards the ventricular apex, had a trabeculated appearance (Fig.  
19 2B). At the beginning, the ventricular region of the heart was formed by myocytes with  
20 scarce cytoplasm, a big, clear central nucleus and a small nucleolus. From stage  
21 20HH, some histological differences become evident; the myocytes were smaller and  
22 more abundant at the inferior limit of the central trabeculation and in the surface of the  
23 ventricular wall adjacent to the epicardium (Compare I with II and III in Fig. 1). The  
24 PIVS along its length displayed different histological features (Compare I with II in Fig.  
25 2). Myocytes were scarce at the superior (smooth) end; they had a relatively compact  
26 nucleus and slightly abundant cytoplasm with some myofibrils (Fig. 2-I). In contrast, at  
27 the inferior region (trabeculated zone) of the septum, as well as in the epicardial  
28 surface of the ventricular wall abundant, smaller, polyhedral myocytes with scarce

1 granular cytoplasm and without myofibrils were found (Fig.2-II). Myocytes often were  
2 forming small groups where some mitotic myocytes could be observed (Fig.2-II, III).  
3 Between stages 26 to 28HH (Figs. 3, 4A), the PIVS had grown significantly, mainly by  
4 expansion of its trabeculated zone which displayed highly branched trabeculations. At  
5 stage 26HH a strong invasion of pericardial cells to the developing IVS was observed.  
6 Towards stage 28HH, the cushions of the AV canal and the superior boundary of the  
7 PIVS had fused and the interventricular foramen was already closed at the ventricular  
8 inlets (Fig. 4A). The smooth region of the PIVS was more compact but the histological  
9 features of the septum were similar to the previous stage (Compare Figs. 2B,I,II, 3A,I,II,  
10 and 4AI, AII). In spite of that, myocytes at the superior end were more differentiated  
11 and elongated. They had abundant cytoplasm and a big oval-shaped nucleus that was  
12 rich in compact chromatin (Figs. 3B,I, 4A,AI). At the inferior boundary of the septum  
13 and at the ventricular wall, myocytes were still abundant, small and barely  
14 differentiated; several of them were mitotic (Figs. 3II,III, 4AII).

15 At stage 30HH, the mature IVS was formed of three thirds (basal, medial and apical);  
16 the interventricular foramen was completely closed. The medial third had a compact  
17 aspect (Fig. 4B,BI). At the apical third, the trabeculations were highly elongated and  
18 ramified; some had the appearance of being in the process of fusing (Fig. 4B). The  
19 muscular region of the IVS and the ventricular wall displayed similar histological  
20 features. The myocytes were more differentiated than at the previous stages and fewer  
21 were mitotic (Compare AI, AII, with BI, BII in Fig. 4).

## 22 ***II. Temporal and spatial distribution of cyclic myocytes during cardiac septation.***

23 To determine the spatiotemporal distribution of mitotic myocytes and the expression of  
24 PCNA, the regions of the embryonic heart described previously were analyzed.  
25 Although M-I and PCNA-I followed a linear drift during cardiac septation, the first was  
26 found to be lower than the second in each stage and region under study (Figs. 5, Table  
27 1). This result can be explained as follows: PCNA is a protein involved in DNA

1 duplication, and hence it is present in the S phase of the cell cycle; nevertheless, it is  
2 degraded 20 hours after the cell cycle has ended.

3 The most persistent high-intensity foci of cyclic myocytes (mitotic cells and green  
4 fluorescence) were always found at the epicardial surface of the free ventricular wall, at  
5 the inferior region of the central trabeculation (stages 18- 22HH) and at the inferior  
6 border of the developing septum (stage 24HH onward). In contrast, myocytes at the  
7 superior end of the PIVS as well as at the endocardial surface of the ventricular wall  
8 were rarely mitotic and usually expressed less PCNA (green fluorescence) (Figs. 1- 5,  
9 Table 1). Concordantly, it was found that at the superior end of the central trabeculation  
10 and at the developing septum M-I remained almost constant. The highest value was  
11 displayed at stage 26HH (Fig. 5A, Table 1). PCNA-I decreased at stages 18-22HH but  
12 increased later (stages 24 to 30HH) when the PIVS had been formed (Fig. 5A, Table  
13 1). On the contrary, at the inferior limit of the PIVS and the epicardial surface of the  
14 ventricular wall, M-I and PCNA-I gradually increased. In both cases, the highest value  
15 was displayed at stage 26HH; however after stage 28HH both values decreased (Fig.  
16 5B, Table 1).

17 The DNA index (DI) determined by flow cytometry was: 1.34 (st18), 1.89 (st20), 1.57  
18 (st22), 1.46 (st24), 1.55 (st26), 1.37 (st28) and 1.39 (st30). At stage 18HH 51.3% of  
19 cells were found to be in the G1-G0 phase of the cell cycle and 37% were in the S  
20 phase (Fig. 6, Table 2). During stages 20 to 22HH more than 80% of cells were at the  
21 S phase. Towards stage 24HH, there seemed to be a balance between G1-G0 and S  
22 phases (44.22 vs. 55.78). The values decreased at stage 26HH maintaining the  
23 valance (23.12 vs. 24.72). More than 50% of cells were determined to be in the G2-M  
24 phase. Between stages 28-30HH, more than 73% of cells were determined to be in the  
25 G1-G0 phase and less than 20% in the S phase (Fig. 6, Table 2).

26  
27

28

1

## DISCUSSION

2 Even though cardiac septation is a key process leading to the transformation from a  
3 simple cardiac tube into a complex four-chambered structure, little is known about the  
4 biological processes involved in the development of the septa. In this study, we  
5 documented the importance of a regional pattern of proliferative myocytes in the  
6 formation of the IVS and in the growth of the ventricular cavities. Our previous  
7 hypothesis that during cardiac develop the IVS elongates in a direction opposite of the  
8 atria (Contreras et al., 2007) was also corroborated.

### 9 **Morphological aspects of trabeculations and IVS development**

10 Histological analysis of the ventricular region of the embryonic heart between stages  
11 18-30HH provided the following conclusions: 1. All the trabeculations appear around  
12 stage 18HH and they immediately begin to branch out profusely to form the trabecular  
13 sheets described by other researches (Ben-Shachar et al., 1985; Sedmera et al., 1997,  
14 2000; Contreras et al., 2007). 2. Confirmation of the existence of a central trabeculation  
15 above the interventricular groove that, as Contreras et al. (2007) demonstrated,  
16 corresponds to a central axis to which the right and the left trabecular sheets adhere  
17 and fuse to form the muscular zone (medial and apical thirds) of the IVS. 3. Agreement  
18 with the findings by Franco et al., (2006) who using transgenic mice, concluded that the  
19 IVS myocardium originates from left and right myocardial cells. 4. Further proof that  
20 development of the apical region of the IVS results from branching out and elongation  
21 over time of trabeculations at their inferior boundary, as was suggested (Hard and  
22 Paul, 1975; Contreras et al., 2007). 5. Indication that the invasion of pericardial cells to  
23 the developing IVS that we observed around stage 26HH is involved in vasculogenesis  
24 of the septum as Gittenberger-de Groot et al., (2000) and Perez-Pomares et al., (2002)  
25 proposed.

26 It has been pointed out that each trabeculation results from the clonal expansion of a  
27 myocardial stem cell into the ventricular lumen (Mikawa et al., 1992a). The  
28 remoulding mechanism that results in trabecular branching, however, is unknown. Our

1 observations permit us to speculate that trabecular branches originate during cardiac  
2 septation. The process begins at stage 17-18HH when the ventricular wall is form by  
3 an epithelial myocardial sleeve from which incipient myocardial trabeculations project.  
4 First, within the ventricular wall to which each trabeculation is anchored, the initially  
5 adjacent myocytes lose their unions and become individual cells; simultaneously some  
6 spaces are formed between them. At the same time each myocyte begins to grow and  
7 to differentiate while the spaces become lined by endocardium. This process is  
8 repeated as the ventricular cavities increase in size. It results in the formation of more  
9 branched trabecular sheets. Almost at the end of cardiac septation (after stage 28HH),  
10 trabecular branching is finished.

#### 11 **Importance of cellular proliferation in trabecular and IVS morphogenesis**

12 A close association exists between abandonment of the cell cycle by the cardiac cells  
13 and the start of the histological maturation of the ventricular chambers. This process is  
14 accompanied by specification of the cell lineage and the terminal differentiation of  
15 myocytes (Icardo, 1987; Rumyantsev, 1991). In this context, Clubb and Bishop (1984)  
16 and Clark and colleagues, (1983, 1989, 1991) agree that myocardial growth takes  
17 place in three phases: hyperplasic (embryonic-fetal period), transitional (postnatal  
18 period) and hypertrophic (mature period). However we found that the cyclic activity of  
19 the myocardial cells decreased from stage 26HH onward (Fig. 6, Table 2), therefore we  
20 think that the transitional phase begins during the fetal period.

21 On the other hand, it has been suggested that myocyte proliferation is relevant to  
22 development of different cardiac structures including ventricular chambers,  
23 interventricular septum, papillary muscles and conduction system (Sissman, 1966;  
24 Icardo and Fernández Terán, 1987; Mikawa et al., 1992a, 1992b; Rumyanstsev, 1991;  
25 Jeter and Cameron, 1971; Rychterova, 1971; Rychter et al., 1979; Thompson et al.,  
26 1990; Moorman and Lamers, 1994). However, it is not yet clear how cell proliferation is  
27 involved in those events. We noticed that as the proliferative ability of cells diminished  
28 they grew and displayed a greater volume of cytoplasm. This fact together with our

1 findings related to M-I and PCNA-I indicate that myocytes located in the superior region  
2 of the developing septum correspond to the oldest cellular line, which would follow a  
3 differentiation pathway. In contrast, at the inferior end of the central trabeculation and  
4 of the PIVS, as well as at the epicardial surface of the ventricular wall, we observed a  
5 high-intensity focus of cyclic myocytes. These results together with our findings by flow  
6 cytometry (Fig. 6, Table 2) permit us to conclude that: 1. Myocytes resulting from the  
7 higher focuses of proliferative activity are involved in growth of the ventricular cavities  
8 and the PIVS. 2. During cardiac septation the ventricular cavities and the developing  
9 IVS increase in size along the apico-basal and dorso-ventral axes in a direction  
10 opposite of the atria. These conclusions agree with the findings of Christoffels et al.,  
11 (2000), Lamers and Moorman (2002) and Togi et al., (2004) who described a  
12 centrifugal expansive growth process of the embryonic ventricles. Likewise results by  
13 Mikawa and Franco studying the cardiac morphogenesis by clonal analysis in the chick  
14 and mouse heart, respectively, are concordant with our findings. Mikawa et al. (1992a,  
15 b) found clonal colonies expanded from epicardial to endocardial layers of the  
16 ventricular myocardium, generally exhibiting a cone shape with the base of the cone  
17 near the epicardium. Franco et al. (2006) observed clonal colonies mainly at the inferior  
18 region of the developing septum. In spite of these results they argued that the  
19 developing IVS grew actively towards the atria.

20 The higher M-I and PCNA-I as well as the more significant cell cycle activity detected  
21 by flow cytometry was found after formation of the PIVS. Later when the interventricular  
22 foramen started to close, PCNA-I dropped and only 26% of cells were in the cell cycle.  
23 At the same time, hypertrophy and cell differentiation became the predominant  
24 biological processes. These results were similar to the drift of the mitotic and tritiated  
25 thymidine-labeling indexes described by analyzing chicken embryo myocytes cultured  
26 *in vitro* of similar ages to the ones we studied (Jeter and Cameron, 1971; Clark and  
27 Fischman, 1983). The same authors also noted that the younger myocytes had higher  
28 proliferation ability than the older ones. All these facts not only indicate that the end of

1 ventricular organogenesis is related to the loss of the proliferative ability of the  
2 myocardial cells but also corroborate that after the stage 28HH the most important  
3 process in development of the IVS is cell differentiation.

4 Clark and colleagues (1989, 1991), based on studies in which they modified the  
5 hemodynamics of chicken embryo, concluded that multiplication of the myocardium  
6 (hyperplasia) is not important in ventricular organogenesis. Our results however  
7 indicate that during the embryonic period hyperplasia actually has a morphogenetic  
8 effect. Thus, any decrease in myocytes during cardiogenesis would not only affect the  
9 mass of the ventricular walls, but would also alter the morphogenesis of the  
10 trabeculations, and therefore the development of the ventricular septum.

11 It has been pointed out that development of the interventricular septum is a multi-step  
12 process; its stages are defined by the different events taking place. Accordingly,  
13 Rychter and colleagues (1979) and Van Mierop and Kutsche (1984) proposed three  
14 phases. They pointed out that at first the developing IVS grows passively and that  
15 during the second and third phases, growth is due to the active apico-basal migration  
16 and proliferation of myocytes derived from the left and right ventricular chambers,  
17 respectively. In this work low M-I and PCNA-I were observed before formation of the  
18 PIVS. Later on (when the developing IVS is growing) myocytes resulting from cellular  
19 proliferation increase, indicating active growth of the ventricular region. Finally, when  
20 the interventricular foramen closes, M-I decreases and myocytes are more  
21 differentiated. These findings not only are consistent with the passive growth described  
22 by Rychter et al., (1979) and Van Mierop and Kutsche (1984), but also refute the  
23 process of cellular migration. They also support the idea of the separation of the  
24 morphogenetic phase of development of the IVS into two steps, as pointed out by  
25 Contreras and colleagues (2007).

26 Recently Sarkar and colleagues (2004) concluded that during cardiac development  
27 both apoptosis and cellular proliferation take place in an orderly balance. In the context  
28 of the remodelling of the IVS, Cheng and colleagues (2002) pointed out that apoptosis

1 takes place on the crest of the developing septum (possible superior end) on  
2 trabeculations and at the bundle of His. Pexieder (1975) and Sharma et al., (2004)  
3 described that apoptosis would be implied in vasculogenesis of the IVS. In our case,  
4 we discovered in this paper the importance of myocardial proliferation in the  
5 development of the ventricles and the muscular region of the IVS.

6 Our findings demonstrate in accordance with Sedmera and colleagues (2000) that  
7 morphogenesis of the IVS as well as development of myocardial architecture of the  
8 ventricles goes through several steps. Based on findings by De la Cruz et al. (1997,  
9 1998) and our current results, we suggest three phases because although in each one  
10 different events take place, only one or two basic processes (cell adhesion, cell  
11 proliferation, cell differentiation) are relevant.

## 12 ***Summary of morphogenesis of the muscular region of the IVS***

13 *1. Premorphogenetic phase.* It occurs between stages 9 to 16-17HH and was  
14 described carefully by De la Cruz and colleagues in 1997. During this period, the  
15 embryonic ventricles are formed and the torsion and looping process begins. At the same  
16 time, the cushions of the AV canal, the ventricular trabeculations and the conal ridges  
17 begin to develop. However, our observations demonstrate that the PIVS is not yet  
18 formed at stage 18HH. First at stage 9-10HH (straight heart tube) the prospective place  
19 of the central trabeculation appears. Findings of this paper disagree that this place is  
20 the primordium of the PIVS as De la Cruz et al. (1997, 1998) supposed. Later by stage  
21 17HH when the apical regions of the future ventricles are already side-by-side small  
22 myocardial trabeculations become evident and the dorsal and ventral cushions of the  
23 AV canal appear, thereby starting cardiac septation (De la Cruz et al., 1983).

24 *2. Morphogenetic phase.* It has been described thoroughly in a previous paper  
25 (Contreras et al., 2007). Our histological analysis and findings of the temporal  
26 distribution of cyclic myocytes agree that this phase includes two steps: a). Formation  
27 of the PIVS (stages 18HH- 23HH). During this period the main process involved is cell

1 adhesion. b). Growth of the developing septum and closure of the interventricular  
2 foramen (afterward stage 24HH). At this time cell proliferation is the most important  
3 process implicated.

4 *3. Histodifferentiation phase.* It takes place from stage 30HH onwards. Our  
5 observations allow us to conclude that in this period cell adhesion and cell proliferation  
6 are less important. Ventricular myocytes however become more differentiated;  
7 simultaneously the conduction system and the coronary vessels develop. We think that  
8 these processes result in the formation of the multilayered architecture of the  
9 ventricular wall described by Sedmera and colleagues (2000).

10 Our results are an initial advance in knowledge of the meaning of myocyte proliferation  
11 in ventricular and IVS development. This information will be useful to understand how  
12 some human congenital defects of ventricles develop (Anselmi et al., 1976) and may  
13 lead to improved experimental models that lack compaction of the muscular  
14 interventricular septum (Sucov, et al., 1994; Chen et al., 2004), or that demonstrate  
15 local destruction of the myocardial mass (Shilham, et al., 1996), ventricular hypertrophy  
16 and cardiac failure resulting from the defects of the ventricular walls. These very  
17 complex pathologies have been considered the most common causes of mortality due  
18 to congenital heart malformations worldwide during the pre- and neonatal period.

19

20

21

1 **ACKNOWLEDGEMENTS.**

2 The authors are grateful to Mario Jáuregui Castro, Lucía Lima García and Emma  
3 Mendoza for technical assistance. This paper is part of the first author's PhD  
4 (Doctorado en Biología Experimental UAM-Iztapalapa) thesis.

1

## REFERENCES

2

Anselmi, G., M. Arteaga, and V. J. Espino, 1976: Ventrículo Único. Nueva clasificación embriológico-anatómica. I. Patología y Fisiología. Arch. Inst. Cardiol. Méx. 46, 148-167.

3

4

Abu-Issa, R., K. Waldo, and M. L. Kirby. 2004: Heart fields: one, two or more? Dev. Biol. 272, 281– 285.

5

6

Ben-Shachar, G., R. A. Arcilla, R. V. Lucas, and F. J. Manasek, 1985: Ventricular trabeculations in the chick embryo heart and their contribution to ventricular and muscular septal development. Circ. Res. 57, 759-766.

7

8

Clark, A. W. and A. D. Fischman, 1983: Analysis of population cytokinetics of chick myocardial cells in tissue culture. Dev. Biol. 97, 1-9.

9

10

Clark, E. B., N. Hu, D. R. Turner, J. E. Litter, and J. Hansen, 1991: Effect of chronic verapamil treatment on ventricular function and growth in chick embryos. Am. J. Physiol. 261, H166-171.

11

12

Clark, E. B., N. Hu, P. Frommelt, G. K. Vandekieft, J. L. Dummett, and R. J. Tomanek, 1989: Effect of increased pressure on ventricular growth in stage 21 chick embryos. Am. J. Physiol. 257, H55-61.

13

14

Clubb, F. J. and S. P. Bishop, 1984: Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. Lab. Invest. 50, 571-577.

15

16

Contreras, R. A., C. Sánchez-Gómez, R. H. García, and L. Cimarosti, 2007: Normal development of the muscular region of the interventricular septum. I. The significance of the ventricular trabeculations. *in revision*.

17

18

Chen, H., S. Shi, L. Acosta, W. Li, J. Lu, S. Bao, Z. Chen, Z. Yang, M. D. Schneider, K. R. Chien, S. J. Conway, M. C. Yoder, L. S. Haneline, D. Franco, and W. Shou, 2004: BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. Development. 131, 2219-2231.

19

- 1 Cheng, G., A. Wessels, R. G. Gourdie, and R. P. Thompson. 2002: Spatiotemporal  
2 and tissue specific distribution of apoptosis in the developing chick heart. *Dev. Dyn.*  
3 223, 119-133.
- 4 Christoffels, V. M., P. E. Habets, D. Franco, M. Campione, F. Jong de, W. H.  
5 Lamers, Z. Z. Bao, S. Palmer, C. Biben, R. P. Harvey, and A. F. Moorman, 2000:  
6 Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev.*  
7 *Biol.* 233, 266-278.
- 8 De la Cruz, M. V., 1998: Torsion and looping of the cardiac tube and primitive  
9 cardiac segments. Anatomical manifestations. In *Living morphogenesis of the heart*  
10 (M. V. De la Cruz and R. Markwald, eds). Birkhäuser, Boston, Basel, Berlin, pp. 99-  
11 119.
- 12 De la Cruz, M. V., M. Giménez- Ribotta, O. Saravalli, and R. Cayré, 1983: The  
13 Contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to  
14 cardiac septation and to the development of the atrioventricular valves: study in the  
15 chick embryo. *Am. J. Anat.* 166, 63-72.
- 16 De la Cruz, M. V., and R. Moreno-Rodríguez, 1998: Embryological development of  
17 the apical trabeculated region of both ventricles. The contribution of the primitive  
18 interventricular septum in the ventricular septation. In *Living morphogenesis of the*  
19 *heart* (M.V. De la Cruz and R. Markwald, eds). Birkhäuser, Boston, Basel, Berlin,  
20 pp. 120-130.
- 21 De la Cruz, M. V., M. M. Castillo, L. Villavicencio, A. Valencia, and R. A. Moreno-  
22 Rodríguez, 1997: Primitive interventricular septum, its primordium, and its  
23 contribution in the definitive interventricular septum: in vivo labeling study in the  
24 chick embryo heart. *Anat. Rec.* 247, 512-520.

- 1 Fiorina, P., D. Corradi, S. Pinelli, R. Maestri, C. Lagrasta, M. Buscaglia, A. Davalli,  
 2 F. Folli, and E. Astorri. 2004: Apoptotic/mytogenic pathways during human heart  
 3 development. *Int. J. Cardiol.* 96, 409-417.
- 4 Franco, D., M. S. Meilhac, M. V. Cristoffels, A. Kispert, M. Buckingham, and G.R.  
 5 Kelly, 2006: Left and right ventricular contributions to the formation of the  
 6 interventricular septum in the mouse heart. *Dev. Biol.* 294, 366-375.
- 7 Gittenberger-de Groot, A. C., M. P. Vranken-Peeters, M. Bergwerff, M. M. Mentink,  
 8 and R. E. Poelmann, 2000: Epicardial outgrowth inhibitions leads to compensatory  
 9 mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary  
 10 formation. *Circ. Res.* 87, 969-971.
- 11 Hamburger, B. and H. L. Hamilton, 1951: A series of normal stages in the  
 12 development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.
- 13 Harh, J. Y. and M. H. Paul, 1975: Experimental cardiac morphogenesis. I.  
 14 Development of the ventricular septum in the chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33,  
 15 13-28.
- 16 Icardo, J. M. and A. Fernandez-Terán, 1987: Morphologic study of ventricular  
 17 trabeculation in the embryonic chick heart. *Acta Anat.* 130, 264-274.
- 18 Jeter, J. R. and I. L. Cameron, 1971: Cell proliferation patterns during  
 19 cytodifferentiation in embryonic chick tissues: Liver, heart and erythrocytes. *J.*  
 20 *Embryol. Exp. Morphol.* 23, 403-422.
- 21 Lamers, W. H. and A. F. M. Moorman, 2002: Cardiac septation: A late contribution  
 22 of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis. *Circ. Res.* 91, 93-  
 23 103.
- 24 Lin, I. M., I. Das, M. G. Schwartz, P. Tsoulfas, T. Mikawa, and L. B. Hempstead,  
 25 2000: Trk C receptor signaling regulates cardiac myocyte development in vivo. *Dev.*  
 26 *Biol.* 226, 180-191.

- 1 Markwald, R. R., T. Trusk, and R. Moreno-Rodriguez, 1998: Formation and  
 2 septation of tubular heart. In *Living morphogenesis of the heart* (M. V. De la Cruz  
 3 and R. Markwald, eds). Birkhäuser, Boston, Basel, Berlin, pp. 43-84.
- 4 Mikawa, T., A. Birisov, A. M. C. Brown, and D. A. Fischman, 1992a: Clonal analysis  
 5 of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective  
 6 retrovirus: I. Formation of the ventricular myocardium. *Dev. Dyn.* 193, 11-23.
- 7 Mikawa, T., L. Cohen-Gould, and D. A. Fischman, 1992b: Clonal analysis of cardiac  
 8 morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective retrovirus: III.  
 9 Polyclonal origin of adjacent ventricular myocytes. *Dev. Dyn.* 195, 133-141.
- 10 Moorman, A. F. M. and W. H. Lamers, 1994: Molecular anatomy of the developing  
 11 heart. *Trends Cardiovasc Med.* 4, 257-264.
- 12 Paschoud, N. and T. Pexieder, 1980: Patterns of proliferation during the  
 13 organogenetic phase of heart development. In *Mechanism of cardiac  
 14 morphogenesis and teratogenesis* (T. Pexieder, ed). New-York: Raven press, pp.  
 15 73-88.
- 16 Perez-Pomares, J. M., A. Phelps, M. Sedmerova, R. Carmona, M. Gonzalez-  
 17 Iriarete, R. Muñoz-Chapuli, and A. Wessels, 2002: Experimental studies on the  
 18 spatiotemporal expresion of WT-1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: An  
 19 model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by  
 20 epicardially derived cells (EPDCs). *Dev. Biol.* 247, 307-326.
- 21 Pexieder, T., 1975: Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of heart.  
 22 *Advances in anatomy, embryology and cell biology.* 51, 1-100.
- 23 Pexieder, T., 1980: Cellular Mechanisms Underlying the normal and abnormal  
 24 development of the heart. In *Etiology and morphogenesis of congenital heart  
 25 disease* (R. V. Praagh and A. Takao, eds). Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co,  
 26 pp. 127-153.

- 1 Rumyantsev, P. P., 1991: Interrelations of the proliferation and differentiation  
2 processes during cardiac myogenesis and regeneration. *Int. Rev. Cytol.* 51, 188-  
3 273.
- 4 Rychter, Z., V. Rychterova, and L. Lemez, 1979: Formation of the heart loop and  
5 proliferation structure of its wall as a base of ventricular septation. *Herz.* 4, 86-90.
- 6 Rychterova, V. 1971: Principle of growth in thickness of the heart ventricular wall in  
7 the chick embryo. *Folia Morphol.* 19, 262-272.
- 8 Sarkar, S., M. Chawala-Sarkar, D. Young, K. Nishiyama, M. E. Rayborn, J. G.  
9 Hollyfield, and S. Sen, 2004: Myocardial cell death and regeneration during  
10 progression of cardiac hypertrophy to heart failure. *J. Biol. Chem.* 279, 52630-  
11 52642.
- 12 Sedmera, D., T. Pexieder, N. Hu, and E. B. Clark, 1997: Developmental changes in  
13 the myocardial architecture of the chick. *Anat. Rec.* 248:421-432.
- 14 Sedmera, D., T. Pexieder, M. Vuillemin, P. R. Thompson, and H. R. Anderson.  
15 2000: Developmental Patterning of the myocardium. *Anat. Rec.* 258, 319-37.
- 16 Sharma, R. P., H. R. Anderson, J. A. Copp, and J. D. Herderson, 2004:  
17 Spatiotemporal analysis of programmed cell death during mouse cardiac septation.  
18 *Anat. Rec.* 277A, 355-369.
- 19 Shilham, M. W., M. A. Oosterwegel, P. Moerer, J. Ya, P. A. de Boer, M. van de  
20 Wetering, S. Verbeek, W. H. Lamers, A. M. Kruisbeek, A. Cumano, and H. Clevers,  
21 1996: Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in  
22 mice lacking Sox4. *Nature.* 380, 711-714.
- 23 Sissman, N. J., 1966: Cell multiplication rates during development of the primitive  
24 cardiac tube in the chick embryo. *Nature,* 210, 154-157.

- 1 Soufan, A. T., G. Van den Berg, J. M. Ruijter, P. A. J. De Boer, M. J. B. Van Hoff,  
2 and A. F. M. Moorman, 2006: Regionalized sequence of myocardial cell growth and  
3 proliferation characterizes early chamber formation. *Circ. Res.* 99, 545-552.
- 4 Sucov, H. M., E. Dyson, C. I. Gumeringer, J. Price, K. R. Chien, and R. M. Evans,  
5 1994: RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in  
6 heart morphogenesis. *Genes Dev.* 8, 1007-1018.
- 7 Thompson, R. P., J. R., Lindroth, and Y. M. M. Wong, 1990: Regional differences in  
8 DNA-synthetic activity in the preseptation myocardium of the chick. In  
9 *Developmental Cardiology: Morphogenesis and function* (E. B. Clarke and A.  
10 Takao, eds). Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co, pp. 219-234.
- 11 Togi, K., T. Kawamoto, R. Yamauchi, Y. Yoshida, T. Kita, and M. Tanaka, 2004:  
12 Role of Hand1/eHAND in the Dorso-ventral patterning and interventricular septum  
13 formation in the embryonic heart. *Mol. Cell Biol.* 24, 4627-4635.
- 14 Van Mierop, L. H. S., and L. M. Kutsche, 1984: Comparative anatomy and  
15 embryology of the ventricles and arterial pole of the vertebrate heart. In *Congenital  
16 heart disease: cause and processes* (J. J. Nora and A. Takao, eds). Mount Kisco,  
17 NY: Futura Publishing Co, pp. 459-479.

1 **Table 2. Flow cytometric analysis of the proliferative activity of the ventricular**  
 2 **cells during cardiac septation.**

3

	<b>%G0-G1</b>	<b>% S</b>	<b>% G2-M</b>
<b>St 18</b>	51.31	37.84	10.85
<b>St 20</b>	13.22	86.04	0.74
<b>St 22</b>	14.76	85.24	0
<b>St 24</b>	44.22	55.78	0
<b>St 26</b>	23.12	24.73	52.15
<b>St 28</b>	73.69	19.6	6.71
<b>St 30</b>	74.34	14.5	11.6

4

5 G0, G1, S, G2, M= Phases of the cell cycle. St= Stage of development according to

6 Hamburger and Hamilton

1 **Table 2. Flow cytometric analysis of the proliferative activity of the ventricular**  
 2 **cells during cardiac septation.**

3

	<b>%G0-G1</b>	<b>% S</b>	<b>% G2-M</b>
<b>St 18</b>	51.31	37.84	10.85
<b>St 20</b>	13.22	86.04	0.74
<b>St 22</b>	14.76	85.24	0
<b>St 24</b>	44.22	55.78	0
<b>St 26</b>	23.12	24.73	52.15
<b>St 28</b>	73.69	19.6	6.71
<b>St 30</b>	74.34	14.5	11.6

4

5 G0, G1, S, G2, M= Phases of the cell cycle. St= Stage of development according to

6 Hamburger and Hamilton

1

**FIGURE LEGENDS**

2 **Fig 1.** Histological analysis and confocal detection of PCNA in the embryonic ventricles  
3 at stage 20HH. **A.** Frontal section of the heart. **I,I', II,II'**. Superior and inferior regions of  
4 the central trabeculation respectively. **III, III'**. Ventricular free wall. Green fluorescence=  
5 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Red fluorescence= Cytoplasm. Arrows=  
6 mitotic myocytes, AVC= Atrioventricular canal, C= Proximal segment of the embryonic  
7 outflow tract. E= Endocardium, g= Interventricular groove, M= Myocytes, LV= Left  
8 ventricle, RV= Right ventricle. S= Spaces within the ventricular wall.

9

10 **Fig. 2.** First manifestation of the primitive interventricular septum. **A, B.** Frontal  
11 sections of the heart at stages 22 and 24HH. **I,I',II, II'**. Superior and inferior regions of  
12 the primitive interventricular septum respectively. **III, III'**. Ventricular wall. Observe  
13 smaller and more abundant myocytes expressing more PCNA (green fluorescence) at  
14 the inferior region of the septum. Arrows= Mitotic myocytes, AVC= Atrioventricular  
15 canal, C= Proximal segment of the embryonic outflow tract. E= Endocardium, Ep=  
16 Epicardium, IVG= Interventricular groove, M= Myocytes, LV= Left ventricle, RV= Right  
17 ventricle. S= Spaces, T= Distal segment of the embryonic outflow tract.

18

19 **Fig. 3.** Development of the apical third of the interventricular septum. **A.** Frontal  
20 section of the heart at stage 26HH. **I,I',II,II'**. Superior and inferior regions of the  
21 primitive interventricular septum respectively. Notice abundant less differentiated  
22 myocytes expressing more PCNA (green fluorescence) at the inferior region of the  
23 septum. **III,III'**. Ventricular wall. AVC= Atrioventricular canal, C= Proximal segment of  
24 the embryonic outflow tract. Ep= Epicardium, IVG= Interventricular groove, M=  
25 Myocytes, LV= Left ventricle, RV= Right ventricle. S= Spaces, T= Distal segment of the  
26 embryonic outflow tract.

27

1 **Fig. 4.** First appearance of the mature interventricular septum. Frontal sections of the  
 2 heart at stages 28HH (**A**) and 30HH (**B**). Superior (**AI,I'**) and inferior (**AII,II'**) regions of  
 3 the septum (stage 28HH). Observe at the inferior region of the interventricular septum  
 4 myocytes expressing more PCNA (Green fluorescence) and starting to become  
 5 differentiated. Medial (**BI,I'**) and apical (**BII,II'**) thirds of the mature septum (stage  
 6 30HH). Notice along the length of the septum more differentiated myocytes than at the  
 7 previous stages. Ep= epicardium Out= Outflow tract. In= Inlet tracts, IVG=  
 8 Interventricular groove, M= Myocardial cells, LV= Left ventricle, RV= Right ventricle.

9

10 **Fig. 5.** Spatiotemporal distribution of cyclic myocytes during cardiac septation depicting  
 11 the higher mitotic and PCNA indexes in the inferior region of the developing septum.  
 12 St= Stage of development according to Hamburger and Hamilton. PCNA= proliferating  
 13 cell nuclear antigen, M-I= Mitotic index, PCNA-I= PCNA Index. (...) M-I linear drift,  
 14 (\_\_\_) PCNA-I linear drift.

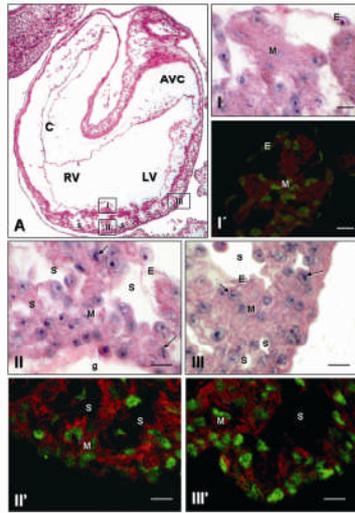
15

16 **Fig. 6.** Flow cytometric determination of proliferative activity of the ventricular cells  
 17 during cardiac septation. Observe the most significant cyclic activity of the cells  
 18 between stages 24HH to 26HH. G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M= Phases of the cell cycle. St= Stage of  
 19 development according to Hamburger and Hamilton.

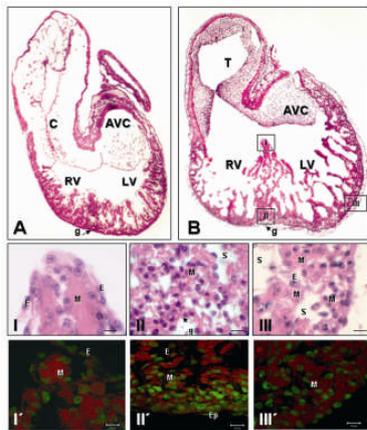
20

21

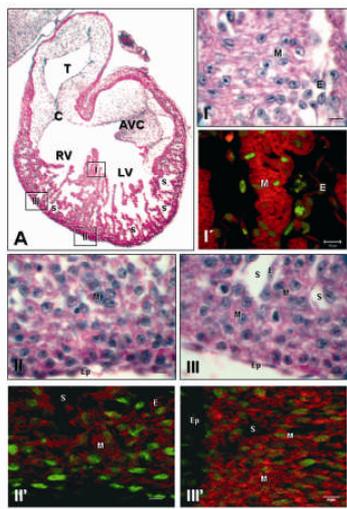
1



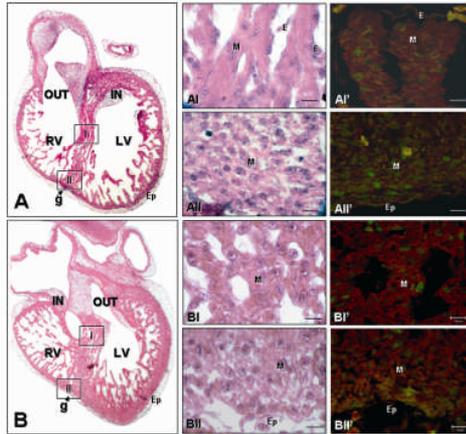
2



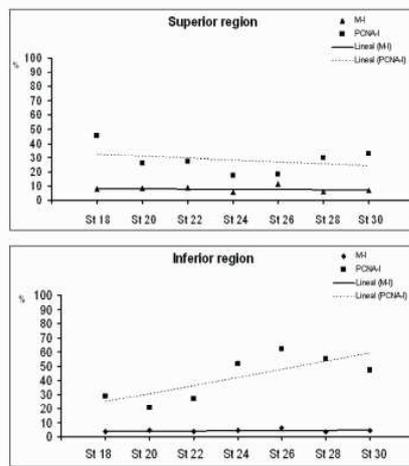
3



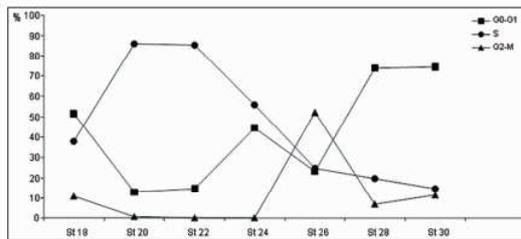
1



2



3



*Miembros del Jurado de examen, designados por el Posgrado en Biología Experimental para la tesis "Participación de los factores de crecimiento FCF1, NRG y sus receptores en la regulación de la proliferación celular durante la morfogénesis de los tercios medio y apical del Tabique Interventricular en embrión de pollo" realizada por Alejandra Contreras Ramos, el día 20 de Junio del 2008 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa"*

- **Dr. Humberto González Márquez**

Profesor Titular "C" Tiempo Completo  
Lab. Expresión Génica  
Depto. Ciencias de la Salud. U.A.M. - Iztapalapa.  
hgm@xanum.uam.mx



- **Dr. Sebastián Manuel Arteaga Martínez**

Profesor Titular "B" Tiempo Completo  
Depto. Anatomía, Facultad de Medicina UNAM,  
manuelarteagamartinez@yahoo.com



- **Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez**

Investigador Titular "A".  
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.  
Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS  
rmcoralv@prodigy.net.mx, rmcoralv@gmail.com

- **Dr. José Alfonso Boyso Montes de Oca**

Auxiliar de Investigación "I"  
Lab. Neurontogenia, Depto Fisiología, Biofísica y Neurociencias.  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.  
aboyzo@fisiio.cinvestav.mx; alfboyzo@gmail.com

