

# Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Posgrado en Biología Experimental



**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## **Determinación del Destino Prospectivo de las Paredes del Cono y el Significado de la Proliferación y Apoptosis del Miocardio. Estudio Experimental en Embrión de Pollo**

Tesis

Que para obtener el Grado de Maestro en Biología Experimental

Presenta

**Biol. Exp. Roberto Lazzarini Lechuga**

**Codirectoras:**

Dra. Reyna Fierro Pastrana

Dra. Concepción Sánchez Gómez

**Asesor:**

Dr. Manuel Arteaga Martínez

México D.F. Febrero del 2012

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo con número de registro 330822 de la beca otorgada por CONACYT

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Determinación del Destino Prospectivo de las Paredes del Cono y el Significado de la Proliferación y Apoptosis del Miocardio. Estudio Experimental en Embrión de Pollo", que presentó Roberto Lazzarini Lechuga. El día 24 de Febrero del año 2012

**Presidente**

Dr. Manuel Arteaga Martínez  
Facultad de Medicina, UNAM



---

**Secretario**

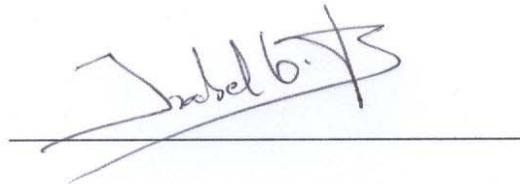
Dra. Rocío Ortiz  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I



---

**Vocal**

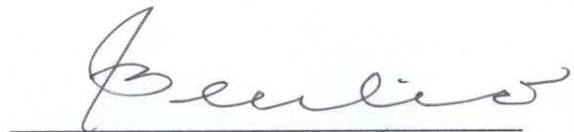
Dra. Isabel García Peláez  
Facultad de Medicina, UNAM



---

**Vocal**

M. en C. Alicia Balderrábano Saucedo  
Instituto Nacional de Cardiología, Secretaría de Salud



---

Miembros del comité tutorial de la tesis “Determinación del Destino Prospectivo de las Paredes del Cono y el Significado de la Proliferación y Apoptosis del Miocardio. Estudio Experimental en Embrión de Pollo”

**Dra. Concepción Sánchez Gómez**

Investigador en Ciencias medicas “C”  
Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y  
Teratogénesis Experimental.  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

**Dra. Reyna Fierro Pastrana**

Profesor Investigador Titular C de Tiempo Completo  
Laboratorio de Biología Celular  
Departamento Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

**Dr. Manuel Arteaga Martínez**

Profesor Titular B de Tiempo Completo  
Departamento de Anatomía  
Facultad de Medicina, UNAM

## **Dedico este trabajo**

*A la memoria de mi abuela, por hacer de mi lo que ahora soy*

*A Roberto Lechuga, por su ejemplo de vida*

*A mi madre*

*A mis Hijos Brenda y Oswaldo*

*A mis tías, primos y primas*

*A mis compañeros de generación Ana, Carlos, Yesica, “Ingris”, “Eliazar”, Donají, Mayra,*

*Arlette*

*A ti por tu ayuda para la realización de este trabajo, por tu amistad y por ser mi  
inspiración, Paola Ortega*

*A la Dra. Sanchez, Dra. Fierro y al Dr. Arteaga*

*A los miembros del laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y*

*Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México, Federico Gómez. Sra.*

*Lidia, Mtra Laura, Dra. Marcela, Dra. Rocío, Sra. María, Carmen*

*A los cientos de embriones de pollo utilizados para la realización de esta tesis. Gracias*

## Resumen

Clásicamente se conoce que los conductos anterior y posterior de la región proximal del tracto de salida embrionario o “Cono” participan en la embriogénesis del tracto de salida del ventrículo derecho (TSVD) e izquierdo (TSVI) respectivamente, mencionado como el proceso morfogénico fundamental “acortamiento” por apoptosis. Por medio de marcaje en vivo en el corazón de embrión de pollo se ha descrito que el conducto anterior se transforma en el TSVD. Sin embargo, no existe evidencia experimental que relacione directamente al conducto posterior del Cono con el desarrollo del TSVI. Con base en estos hechos, el objetivo de este trabajo fue determinar mediante marcaje *in vivo* del corazón de embrión de pollo, el destino prospectivo de las paredes del cono (derecha, izquierda, dorsal y ventral), desde el estadio 22HH hasta su manifestación anatómica en el corazón maduro. También se estableció el patrón espacio temporal de miocitos apoptóticos y cíclicos durante este proceso. Para lograr este objetivo, corazones embrionarios de pollo (estadio-22HH) se marcaron *in ovo* con tinta china/gelatina en los límites Cono-Tronco y Cono-ventricular sobre las paredes derecha, izquierda, dorsal y ventral por separado. Los embriones se re-incubaron para rastrear las marcas hasta los estadios 24, 26, 28, 30, 32, 34 y 36HH. Los corazones se fotografiaron *in-ovo* (22HH) y al final de experimento, después de fijarlos. Para determinar si el Cono disminuye o incrementa su longitud se llevó a cabo un análisis morfométrico, midiendo la distancia entre las marcas al inicio (estadio 22HH) y al final del experimento (estadio 30 y 36HH). Para detectar apoptosis las muestras se procesaron con LTR y para determinar

proliferación se empleó la técnica de PCNA. Además, al menos tres corazones de cada etapa se seleccionaron para hacer un estudio histológico. Con base en los resultados del rastreo de las marcas colocadas en las distintas paredes del Cono se logró construir un mapa de destino en el que se determinó que todas las paredes conales giran para colocarse en la pared ventral cardíaca, las marcas se encontraron exclusivamente en estructuras cardíacas del ventrículo derecho entre las que destacan 1. Pared libre anterior 2. Pared izquierda del TSVD, 3. Porción derecha de la base cardíaca y 4. Porción superior del borde agudo cardíaco. Por medio de histología se determinó que el Cono inicialmente tubular, pierde continuidad en su pared dorso-izquierda y sus distintas paredes rotan hacia una posición ventro-lateral. Estos resultados en conjunto niegan la existencia del supuesto Cono posterior. Los resultados del análisis morfométrico indican que el Cono no sufre acortamiento en sus dimensiones céfalo-caudales. Respecto al patrón apoptótico en el Cono se encontró que no fue uniforme ni en el espacio ni en el tiempo. La apoptosis se manifestó especialmente en las paredes derecha e izquierda y aparece gradualmente a partir del estadio 24HH, incrementándose entre los estadios 26 a 32HH. Estos hallazgos no son congruentes con el concepto de acortamiento del tracto de salida embrionario, más bien indican que la apoptosis participa en finas remodelaciones, socavando las paredes laterales del Cono, durante su transformación de una estructura tubular en una lamina. Respecto al patrón de miocitos en proliferación específicamente en el Cono, los resultados indican un crecimiento diferencial dominante en la porción derecha.

## **Abstract**

It is known that the initially undivided Conus, is separated by the endocardial crest into two conducts (anterior Conus and posterior Conus). Classically it has been mentioned that both the anterior and posterior Conus are involved in the embryogenesis of the outflow tract of the right and left ventricles respectively. At the same time, it has been mentioned that the main cellular process responsible of the normal development of the ventricular outflow tracts is the "shortening" by apoptosis of the Conus and the Truncus. By in vivo labeling of the chick embryo heart it was discovered that the "anterior conus" becomes the right ventricle outflow (RVOT). In contrast, there is no experimental evidence that directly relates to the "posterior conus" with the development of the left ventricle outflow (LVOT). Based on these facts, the objective of this work was to determine by means of in vivo labeling of chicken embryo heart the prospective fate of the walls of the Conus (right, left, dorsal and ventral), from the Stage 22HH up to their anatomical manifestation in the mature heart (Stage 30-36HH). It was also established the spatio-temporal pattern of apoptotic and proliferative myocytes during this process. To this purpose embryonic chicken hearts (stage-22HH) were labeled in ovo with Indian ink/gelatin in the Conus-Trunk transition and the boundary between the Conus and developing ventricle, separately at the right, left, dorsal and ventral walls. The eggs were re-incubated to obtain embryos at stages 24, 26, 28, 30, 32HH, 34HH and 36HH. The hearts were photographed in ovo (22HH) and once fixed at the end of experiment. To determine if the length of the Conus decreases or increases a morphometric analysis was carried

out, by measuring the distance between the marks at the beginning (stage 22HH) and at the end of the experiment (stage 30 and 36HH). To detect apoptosis, samples were processed with LTR and to determine proliferation the technique of PCNA was used. In addition, at least three hearts of each stage were selected to perform histological studies. On the basis of the results of the *in vivo* labeling of the Conal wall it was designed a fate map in which it was determined that all the Conal walls become placed on the ventral wall heart and the marks were found exclusively in cardiac structures of the right ventricle, the most noteworthy were 1. The anterior free wall and the left wall of the RVOT. 2. The right portion of the base of the heart and 4. The superior portion of the acute edge of the heart. By histology it was determined that the Conus initially tubular, loses continuity in its posterior left wall, at the same time the Conal sleeve rotate toward a ventro-lateral position and become a slider structure. Together these results deny the existence of the “posterior Conus”. The morphometric analysis indicates that the cephalo-caudal dimensions of the Conus increase during development therefore it does not suffer from shortening as has been classically mentioned. Apoptosis was observed especially on the right and left walls and comes on gradually from stadium 24HH, rise among the stages 26 to 32HH. These findings are not consistent with the concept of shortening of the outflow tract of embryonic, rather indicate that apoptosis is involved in fine remodeling undermining the lateral walls of the Conus during its transformation from a tubular structure on a slide. With respect to the pattern of proliferative myocytes, specifically in the Conus, the results indicate a differential growth particularly in the right portion.

## **Abreviaturas**

AD	Atrio derecho
ADN	Acido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
Ao	Aorta
AP	Arteria pulmonar
AV	Atrioventricular
CTR	Corazón en tubo recto
LTR	Lysotreaker Red
PBS	Buffer de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
TIV	Tabique interventricular
TSE	Tracto de salida de embrionario
TSVD	Tracto de salida del ventrículo derecho
TSVI	Tracto de salida del ventrículo izquierdo
VA	Ventrículo arterial
VD	Ventrículo derecho
VI	Ventrículo izquierdo

## Índice General

RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
ABREVIATURAS	xiv
I.- Introducción	01
1.1.- Aspectos Anatómicos	01
1.1.1.- El Corazón	01
1.1.2.- Segmentos Ventriculares	03
1.1.3.- Cámaras de Salida Ventriculares	04
1.1.4.- Segmento Arterial	05
1.2.- Antecedentes Embriológicos	07
1.2.1.- Componentes Embrionarios de los Tractos de Salida, Válvulas Ventrículo Arteriales y Tronco de las Grandes Arterias	08
1.2.2.- Origen y Destino del Cono	10
1.2.3.- El Tronco	14
1.2.4.- Saco Aórtico	15
1.2.5.- Significado del Cojín Ventrosuperior del Canal AV en el Desarrollo del TSVI	17
1.3.- Teorías de la Remodelación del Cono y el Tronco en los Tractos de Salida Ventriculares y Tronco de las Grandes Arterias	18
1.3.1.- Apoptosis	20
1.3.1.1.- Generalidades del Proceso Apoptótico	22
1.3.1.2.- Técnicas de Determinación de la Apoptosis	24
1.4.- Ciclo Celular y Proliferación	25

1.4.1.- Pruebas de Determinación de Proliferación por medio de PCNA	26
II.- Planteamiento del Problema	27
III.- Hipótesis	28
IV.- Justificación	29
V.- Objetivo General	30
5.1 Objetivos Específicos	30
VI.- Material y Métodos	31
6.1.- Embriones	31
6.2.- Marcaje <i>in ovo</i>	31
6.3.- Tinción LTR	32
6.4.- Fijación / Fotografía	32
6.5.- Análisis Morfométrico	33
6.6.- Histología	33
6.7.- Determinación de PCNA por Inmunofluorescencia	33
6.8.- Planos Corporales	34
6.9.- Conteo Celular	36
VII.- Resultados	37
7.1.- Rastreo del Destino Prospectivo de las paredes del Cono	37
7.1.1.- Pared Derecha	38
7.1.2.- Pared Izquierda	39
7.1.3.- Pared Ventral	39
7.1.4.- Pared Dorsal	39
7.2.- Análisis Morfométrico	41

7.3.- Cambios Histológicos	45
7.4.- Patrón Apoptótico	46
7.5.- Patrón Espacio Temporal de Miocitos Cíclicos	50
7.5.1.- Análisis Temporal de Cardiomiocitos del Cono	51
7.5.2.- Patrón Espaciotemporal de Cardiomiocitos	52
7.5.3.- Análisis Temporal de Cardiomiocitos Cíclicos	53
7.5.4.- Análisis Espaciotemporal de Cardiomiocitos Cíclicos	54
VIII.- Discusión	55
8.1.- Destino de las Paredes del Cono	56
8.2.- Teoría del Cono Anterior y Cono Posterior vs Desplazamiento de las Paredes del Cono	59
8.3.- Significado de la Proliferación Celular y Apoptosis en el Desdoblamiento del Cono	62
8.3.1.- Acortamiento y Apoptosis	62
8.3.2.- Significado de la Proliferación del Miocardio	64
IX.- Conclusiones	66
X.- Anexos	67
10.1.- Inclusión en Parafina	67
10.2.- Tinción Hematoxilina-Eosina	68
10.3.- Marcas de Tinta China-Carbón/Gelatina; Oxido de Hierro/Gelatina	69
10.4.- Soluciones	70
10.4.1.- Formalina Neutra	70
10.4.2.- Solución Amortiguadora de Fosfatos	70
10.4.3.- Solución Ringer	70
XI.- Bibliografía	71

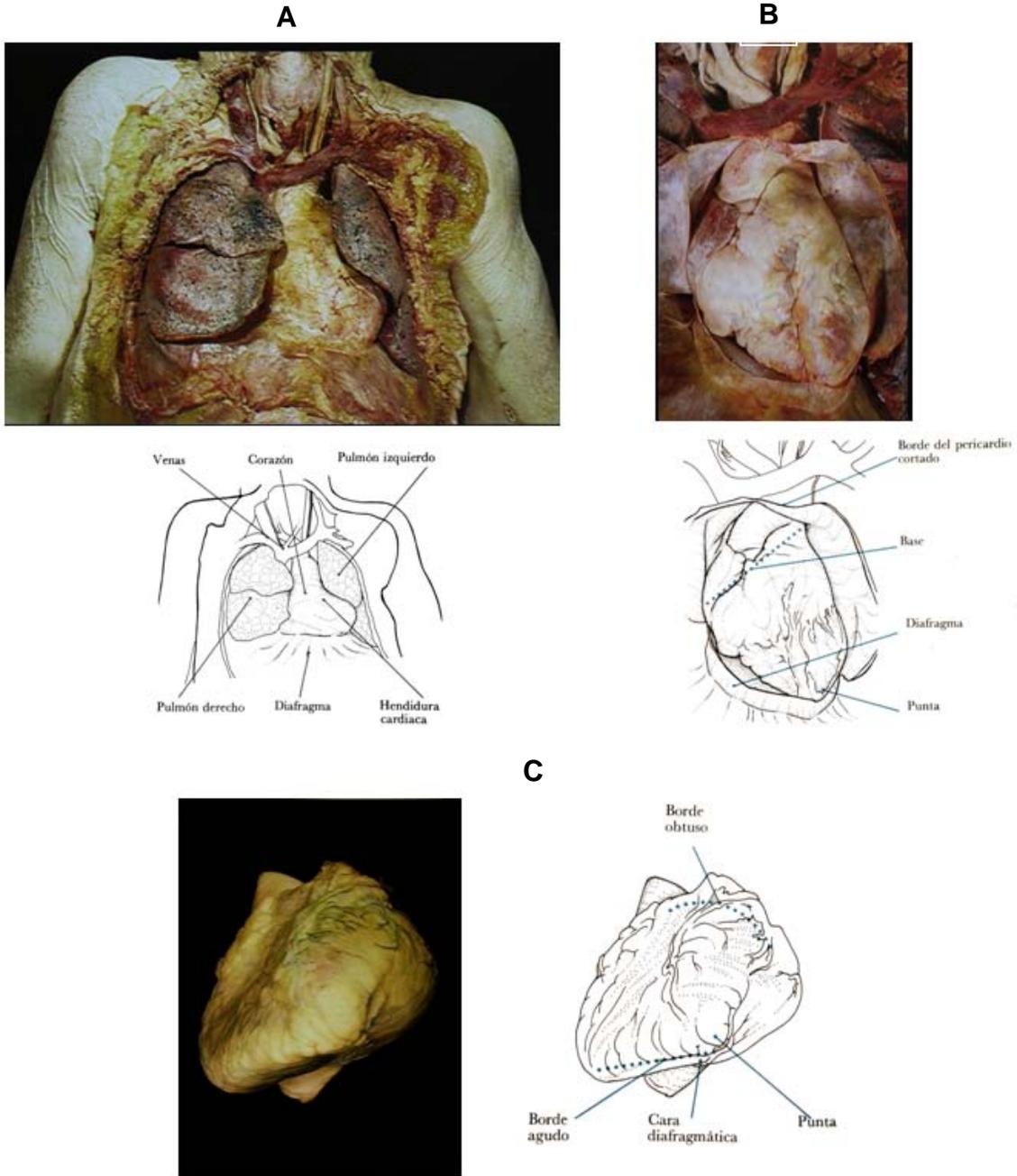
# **I.- Introducción**

## **1.1. Aspectos Anatómicos**

### **1.1.1 El corazón**

Es el órgano central del aparato circulatorio, es un músculo hueco tetracameral con funciones de bomba tanto aspirante como impelente de la sangre. Está constituido por tres capas celulares: Endocardio, epitelio simple que reviste las cuatro cámaras, impide el contacto directo de la sangre con las cavidades internas del corazón; Miocardio, constituido por tejido muscular contráctil y Epicardio, capa de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas y algún grado de adipocitos principalmente, asociadas a vasos coronarios (Ham, 1967).

El corazón se encuentra alojado en el tórax, ocupando la porción inferior del mediastino, entre los pulmones, por delante de la columna vertebral y descansando sobre el diafragma. Se considera que el corazón tiene forma de pirámide triangular invertida. La base está compuesta por los atrios y la porción inicial de las grandes arterias, la punta está formada por el ápex cardiaco de musculatura ventricular. Este órgano presenta tres caras o superficies: una anterior o esternocostal, relacionada con el esternón y costillas; otra inferior o diafragmática, asociada a dicho músculo y otra posterior (Ilustración 1). La unión de las superficies anterior e inferior forma el llamado “borde agudo cardiaco” (Arteaga et al., 1987; Anderson y Becker., 1981).



**Ilustración 1.** A. Situación espacial del corazón. B. Silueta cardíaca. C. Bordes Cardiacos. Tomada de Anderson y Becker (1981).

Para su estudio el corazón se ha dividido en tres segmentos. **Segmento atrial.**

Constituido por los atrios derecho (AD) e izquierdo (AI), separados por un tabique de escasos milímetros de grosor. Reciben la sangre procedente de las venas sistémicas y pulmonares que después ingresan al segmento ventricular por medio de los orificios atrioventriculares (AV), provistos de una válvula que regula el paso de sangre impidiendo el reflujo en dirección opuesta. **Segmento ventricular.** Formado por los ventrículos derecho (VD) e izquierdo (VI) también separados entre sí por un tabique mayormente muscular, llamado septum interventricular (TIV). **Segmento arterial.** Incluye la arteria pulmonar (AP) que recibe la sangre procedente del VD derecho para hacerla llegar finalmente a los pulmones y la aorta (Ao), la cual recibe la sangre procedente del VI para dirigirla a todo el cuerpo (Arteaga et al., 1987; Anderson y Becker, 1981).

### **1.1.2 Segmentos Ventriculares**

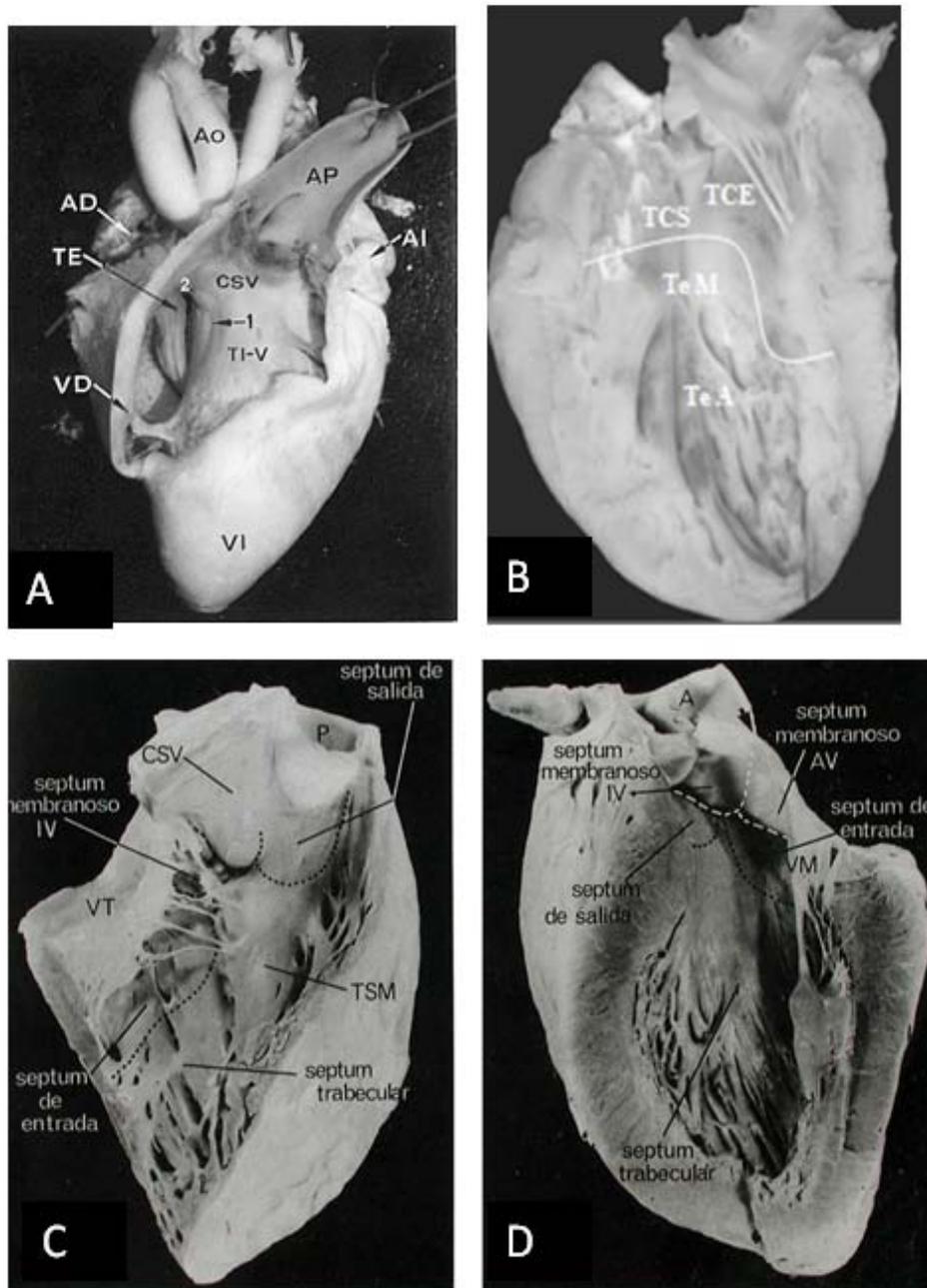
En el hombre y el pollo los ventrículos a pesar de ser unidades funcionales, están constituidos por tres regiones con límites definidos, llamadas cámaras o tractos (Ilustración 2), cada una con un origen embrionario distinto. La **cámara de entrada**, aloja a la válvula atrio-ventricular y su aparato tensor músculo tendinoso, regula el paso de la sangre de los atrios hacia los ventrículos. En la **Región trabeculada**, las características de las trabéculas permiten distinguir a cada ventrículo independientemente de su posición. Por otro lado la **Cámara de salida**, aloja a la válvula ventrículo-arterial que regula el paso de sangre de los ventrículos a su arteria correspondiente impidiendo el regreso sanguíneo.

### **1.1.3 Cámaras de Salida Ventriculares**

Las cámaras o tractos de salida de ambos ventrículos presentan características anatómicas distintas entre sí, pero tanto en humano como en el pollo tienen dos límites, uno ventricular y otro arterial (Ilustración 2). El tracto de salida del VD es llamado infundíbulo debido a que las tres paredes que lo integran son totalmente musculares: la cresta supraventricular, la pared libre anterior del VD y la pared izquierda de la cámara de salida (erróneamente llamada pared septal). Dichas estructuras asemejan una forma de cono truncado, con base sobre una línea imaginaria tangencial desde el borde inferior de la cresta supraventricular hasta la pared izquierda de la cámara. Su vértice (límite arterial del infundíbulo) corresponde al borde inferior del anillo de inserción de la válvula ventrículo-arterial derecha o válvula pulmonar. La cámara de salida derecha está separada de la válvula atrio-ventricular por la cresta supraventricular (Ilustración 2-A, C). Por otro lado, la cámara de salida del VI es llamada vestíbulo ya que es una estructura en parte muscular y en parte fibrosa. Su porción muscular llamada “pared septal” está integrada por la porción lisa y paramedial del TIV así como del tabique membranoso. La pared fibrosa está representada por una continuación de la porción libre de la valva anteroseptal de la válvula mitral, la cual se extiende hasta la porción posteroizquierda del anillo aórtico, conocida también como “continuidad fibrosa mitroaórtica” (Ilustración 2B, D). Esta característica le confiere a la valva anteroseptal estar formando parte integral de la cámara de entrada así como de la cámara de salida. (Arteaga et al., 1987; Anderson y Becker, 1981). Al igual que en el infundíbulo, el límite arterial del vestíbulo corresponde a las válvulas ventrículo-arteriales.

#### **1.1.4 Segmento Arterial**

El segmento arterial está constituido por la arteria pulmonar (AP) y la aorta (Ao). La arteria pulmonar recibe sangre procedente del VD a través de la válvula ventrículo arterial derecha o pulmonar, situada por encima del tracto de salida ventricular, a un nivel más alto que la válvula aortica. Distalmente la válvula pulmonar se continúa con el tronco o arteria pulmonar principal, la cual finalmente se bifurca en dos ramas o arterias pulmonares derecha e izquierdas (Anderson y Becker, 1981; Arteaga et al., 1987). En pollo a diferencia del humano, el tronco de la arteria pulmonar es más corto. La aorta recibe sangre que viene del VI a través de la válvula ventrículo arterial izquierda o aórtica. De su porción distal emerge la aorta ascendente que se curva hacia la derecha, adelante y a la izquierda continuándose sin límite preciso con el arco aórtico (Anderson y Becker, 1981; Arteaga et al., 1987). En el pollo, el tronco de la aorta es más corto, emerge en forma recta y carece de cayado (Ilustración 2A). Las válvulas ventrículo arteriales constan de tres valvas o sigmoideas, unidas al miocardio ventricular por su borde convexo y ancladas al anillo valvular por su extremo cóncavo. Una característica de relevancia de la válvula aortica es que existe una continuidad entre la porción posteroizquierda del anillo aórtico y la valva antero-septal de la válvula mitral (continuidad fibrosa mitroaórtica). Además de los espacios entre las sigmoideas conocidos como “senos de Valsalva” surgen las arterias coronarias derecha e izquierda.



**Ilustración 2.** Corazones adultos de pollo (A, B) y hombre (C, D) mostrando la similitud que existe en los límites del tracto de salida del ventrículo derecho (A, C) y del ventrículo izquierdo (B, D). AD= atrio derecho; AI= atrio izquierdo; Ao= aorta; AP= arteria pulmonar; CSV= cresta supraventricular; TCE= tabique de la cámara de entrada; TCS tabique de la cámara de salida; TE= tracto de entrada; TeA= tabique apical; TeM= tabique membranoso; TI-V= tabique interventricular; TSM= trabécula septo marginalis; VD= ventrículo derecho; VI= ventrículo izquierdo; VM= válvula mitral; VT= Válvula tricúspide.

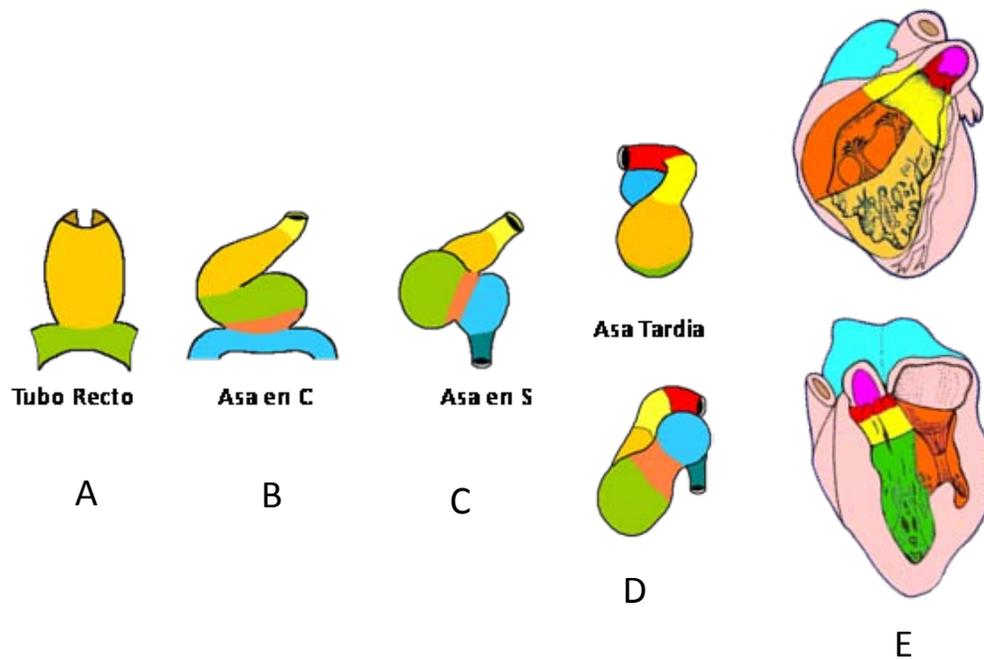
## 1.2 Antecedentes Embriológicos

Se conoce clásicamente como “modelo preformista” del desarrollo cardiaco a la interpretación descriptiva sobre la constitución embrionaria del “corazón en tubo recto” (CTR) realizada por medio de cortes histológicos de embriones humanos. Dicho modelo afirma que en el CTR (inicio de la fase morfogénica del desarrollo cardiaco) ya se encuentran todas las estructuras que se transformarán en el corazón maduro. Al final de la década de los veinte, Davis su principal exponente estableció que el CTR (Horizonte X, 4 somitas) se encuentra constituido por regiones separadas por surcos superficiales, estas regiones las llamó “cavidades cardiacas primitivas” y determinó que cada una de ellas formaría una cavidad cardiaca definitiva. De esta manera, el llamado *Bulbo aórtico* originaría a las grandes arterias, *el Bulbus cordis* al ventrículo derecho, el *ventrículo primitivo* al ventrículo izquierdo y *los atrios primitivos derecho e izquierdo* a los atrios definitivos (Davis 1927). No obstante, gracias a experimentos de marcaje en vivo en el embrión de pollo, que permiten delimitar selectivamente estructuras en desarrollo y rastrear los cambios a lo largo del tiempo permitiendo estudios longitudinales, así como el uso de técnicas de cultivo de tejido embrionario, ahora se conoce que el corazón maduro se origina por la integración gradual de 6 segmentos cardiacos primitivos y cada uno de ellos da origen a una región/tracto de una cavidad cardiaca (Ilustración 3) pero no a la cavidad completa (Castro-Quezada A. et al 1972; De la Cruz et al 1977, 1989). De tal manera se puede decir al contrario de la idea preformista, que el desarrollo cardiaco se caracteriza por ser un proceso progresivo, secuencial e irreversible.

Inicialmente en el CTR solo están presentes los primordios de las regiones trabeculadas ventriculares. Poco más tarde, a medida que el tubo cardiaco se curva a la derecha y se tuerce, se van integrando poblaciones celulares en su extremo caudal para formar el tracto de entrada embrionario y los atrios primitivos, mientras que en el extremo cefálico del corazón, el denominado “campo cardiogénico anterior” se va transformando progresivamente en los segmentos proximal (Cono) y distal (Tronco) del tracto de salida embrionario, el cual queda en continuidad con el saco aórtico (Mjaatvedt et al., 2001, Waldo 2001).

### **1.2.1 Componentes Embrionarios de los Tractos de Salida, Válvulas Ventriculares-Arteriales y Tronco de las Grandes Arterias**

Más recientemente se ha establecido que los tractos o cámaras de salida ventriculares, tronco de las grandes arterias (pulmonar y aorta) y válvulas que los regulan, se originan a partir de diversas estructuras embrionarias, ninguna de ellas presente en el CTR, entre las que destacan los segmentos proximal (Cono) y distal (Tronco) del tracto de salida embrionario (TSE) y el saco aórtico (De la Cruz 1977; García-Peláez y Arteaga 2007; Sánchez-Gómez 2005, Waldo et al, 2005).



**Ilustración 3.** Cardiogénesis por adición paulatina de segmentos cardiacos. A) Tubo recto, solo se encuentran los primordios de las regiones trabeculadas del ventrículo derecho (VD) en posición cefálica (ocre) y la del ventrículo izquierdo (VI) en posición caudal (verde). B) Asa en "C" se adicionan dos nuevos segmentos desde su porción caudal, los tractos de entrada (naranja) así como los primordios atriales (azul claro). Desde su porción cefálica comienza a desarrollarse el Cono (amarillo). C) Asa en S se termina el desarrollo del Cono y se adiciona el seno venoso (azul oscuro). D) Asa tardía se desarrolla el último segmento cardiaco en aparecer: el Tronco (rojo). E) Diagrama mostrando la participación de los segmentos cardiacos en el VD y el VI.

### 1.2.2 Origen y Destino del Cono

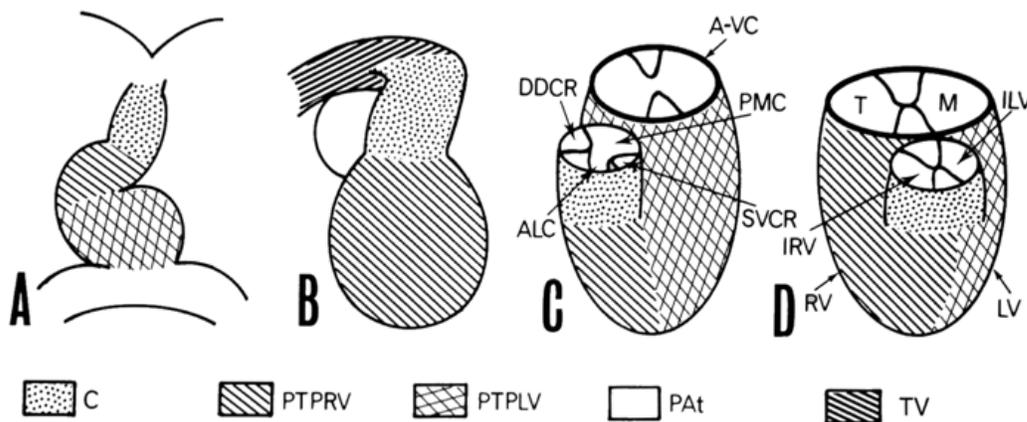
Por medio de experimentos de marcaje *in vivo* en el embrión de pollo se demostró que el “Cono” también llamado segmento proximal del TSE aparece en estadio 12 de la clasificación de Hamburger y Hamilton (1951), siendo la estructura cardíaca más cefálica del corazón en esta etapa, el Cono se conecta desde su límite caudal al primordio de la región trabeculada del VD (De la Cruz et al., 1977).

Aún es ampliamente aceptado que por la fusión de las crestas del Cono, este segmento es tabicado (septado) en dos conductos, uno anterior o pulmonar y otro posterior o aórtico (Ilustración 4). Dicho proceso se dice inicia en el estadio 22HH, con la formación de las crestas sinistroventral y la dextrodorsal del Cono, inicialmente, formadas en su mayoría por abundante matriz extracelular. Conforme avanza el desarrollo ambas crestas incrementan de volumen y se fusionan, dando origen al septum conal, quedando así formados los dos conductos antes mencionados, los cuales se encuentran conectados caudalmente con la región trabeculada del VD y cefálicamente con el primordio del polo arterial o Tronco. Dicho proceso ha sido reportado tanto en humanos como en pollo (Kramer 1942; De Vries y Saunders 1962; De la Cruz et al. 1977, 1992; Arteaga et al. 1982). De la Cruz y colaboradores. (1977, 1989) y García-Peláez (2007) investigaron además el destino prospectivo de los componentes del Cono embrionario. Concluyeron que la pared anterior (pared lateral derecha) da origen a la pared libre del infundíbulo. Respecto a las crestas, descubrieron que la dextrodorsal origina a la cresta supraventricular, mientras que la sinistroventral forma la pared izquierda del tracto de salida del VD

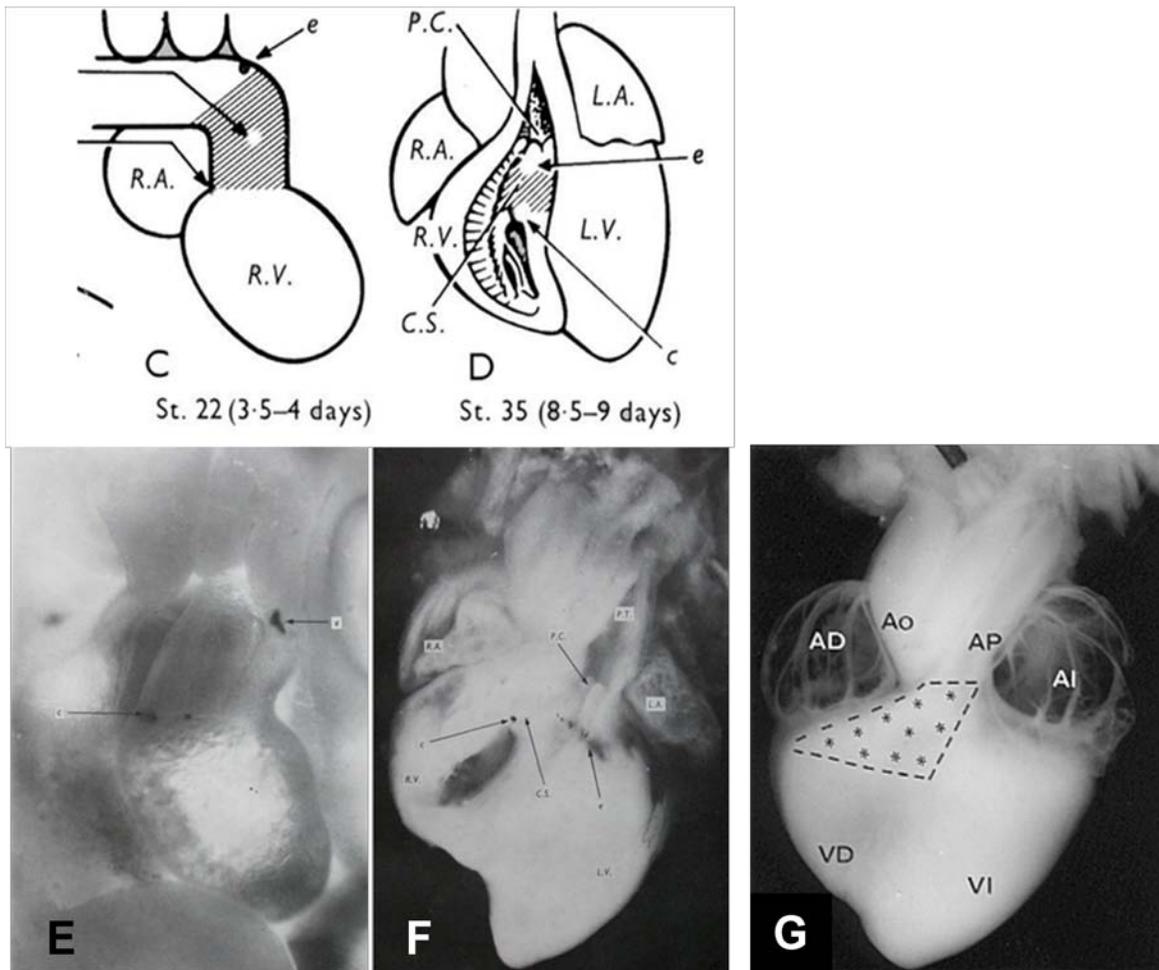
(Ilustración 5). Con base en la idea de que el “Cono anterior” da origen al tracto de salida del VD y el “Cono posterior” al tracto de salida del VI, Arteaga y colaboradores (1982) en parte para corroborar el destino del Cono posterior, hicieron una lazada con un filamento de nailon en el límite conoventricular del corazón de embriones de pollo en estadio 22HH y lograron provocar doble salida del VD (Ilustración 6). Aunque pudieron identificar dos tipos, una con vasos lado a lado y otra con pulmonar anterior y aorta posterior, sin embargo no explicaron los mecanismos morfogenéticos involucrados.

Así mismo, Qayyum y colaboradores (2001) mediante estudios anatómicos y cortes histológicos transversales de corazón de embrión de pollo, describen la septación de la región proximal del tracto de salida embrionario o Cono por parte de las crestas derecha e izquierda (dextrodorsal y sinistroventral), proceso que concluye en el estadio 30HH (Ilustración 7). De este estudio destacan dos aseveraciones: Por un lado mencionan que antes del estadio 30HH el Cono no presenta dos conductos separados; así mismo señalan que la actividad valvular de las crestas conales es una función que manifiestan desde su aparición, lo cual fue confirmado por Nomura-Kitabayashi (2009), mediante un ratón transgénico. Respecto de la región distal del tracto de salida embrionario (Tronco) Qayyum y colaboradores (2001) en concordancia con García-Peláez y Arteaga (2007) describen tres crestas pero confirman que en el estadio 29HH se adicionan nuevas crestas troncales, llamadas intercalares y concluyen que la septación de los tractos de salida en dos conductos por parte de las crestas del Cono, crestas del Tronco y cojines endocardios del canal

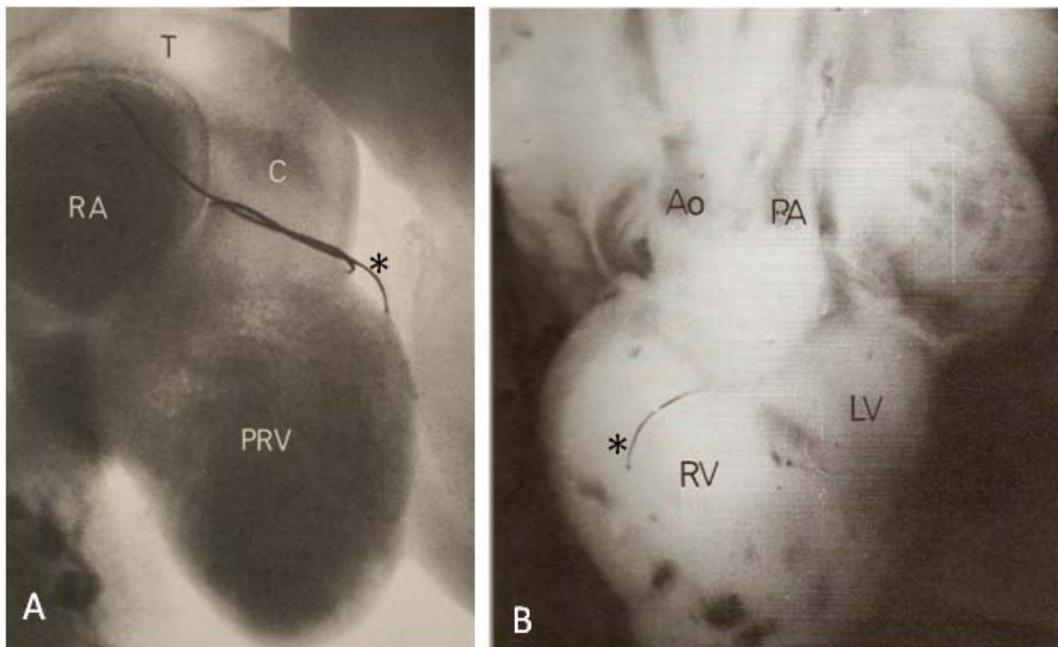
AV no se realiza de manera uniforme a lo largo del tracto de salida embrionario. En resumen los reportes antes mencionados no concuerdan del todo con la idea de la existencia dos conductos conales.



**Ilustración 4.** Desarrollo normal del Cono según Arteaga y colaboradores (1982). A) Inicio del desarrollo del Cono asa en "C". B) Inicio del desarrollo del Tronco. C) Se observa la aparición de las crestas conales que marca el inicio de la tabicación del Cono. D) Muestra la fusión de las crestas conales y consecuente formación de los dos Conos: uno anterior y otro posterior el cual debería eventualmente incorporarse al VI y formar junto con el cojín ventrosuperior del canal atrio-ventricular el tracto de salida del ventrículo izquierdo. ALC= Cono antero-lateral; A-VC= canal atrioventricular; C= Cono; DDCR= cresta dextrodorsal del Cono; ILV= infundíbulo del ventrículo derecho; IRV= infundíbulo del ventrículo derecho; LV= ventrículo izquierdo; M= válvula mitral PAt= primordio de los atrios; PMC= Cono postero-medial; PTPLV= primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho; PTPRV= primordio de la región trabeculada del ventrículo izquierdo; RV= ventrículo derecho; SVCR= cresta sinistroventral del Cono; T= válvula tricúspide TV= Tronco; VI= Ventrículo izquierdo.



**Ilustración 5.** Destino de las crestas conales y pared derecha (Cono anterior) determinado mediante marcaje *in vivo* en embrión de pollo. Modificado de De la Cruz y colaboradores (1977). C) Esquema del corazón embrionario en estadio 22HH mostrando la zona delimitada por las marcas. D) Esquema del destino prospectivo de la pared derecha formando el tracto de salida del ventrículo derecho, se hace especial hincapié en su participación de la cresta supraventricular. E y F) Fotomicrografías del inicio y fin del experimento. G) Síntesis de experimentos marcando la pared derecha del Cono. AD= atrio derecho; AI= atrio izquierdo; Ao= aorta; AP= arteria pulmonar; C.S.= cresta supraventricular; c= marca limite Cono-ventricular; e= marca limite Cono-Tronco; L.A.= atrio izquierdo; P.C.= válvula pulmonar; R.A.= atrio derecho; R.V.= ventrículo derecho; VD= ventrículo derecho; VI= ventrículo izquierdo.



**Ilustración 6.** Producción experimental de doble salida del ventrículo derecho en el embrión de pollo. A) Corazón estadio 22HH que le fue anudado un filamento en el Cono. B) Corazón maduro estadio 36HH se aprecia doble salida del ventrículo derecho tipo "lado a lado." Ao= aorta; C= Cono; LV= ventrículo izquierdo; PA= arteria pulmonar; PRV= primordio del ventrículo derecho; RA= Atrio derecho; RV= ventrículo derecho; T= Tronco; \*=Filamento.

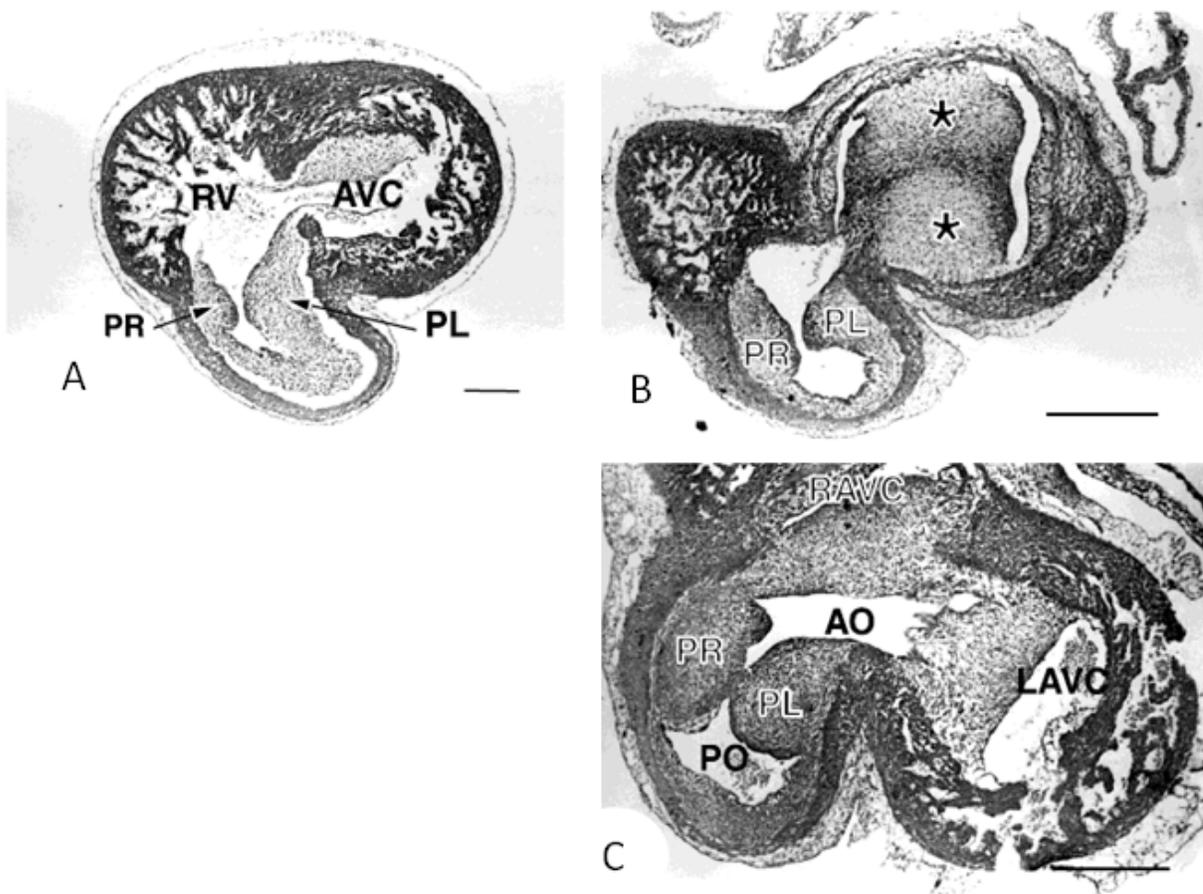
### 1.2.3 El Tronco

El Tronco es una de las últimas estructuras del corazón embrionario en aparecer. García-Peláez y Arteaga (1993; 2007) empleando técnicas de marcaje *in vivo* describen que el Tronco se desarrolla de manera paulatina iniciando en estadio 13HH y terminando en el 22HH y señalan que su destino prospectivo es dar origen a las válvulas ventrículo-arteriales (VA) mismas que incluyen los pisos valvulares y valvas sigmoideas, así como a la región proximal de las grandes arterias. Sin embargo no hay un acuerdo definitivo de que el Tronco de origen a la región proximal o tronco de las grandes arterias. En la actualidad muchos de los autores piensan que

éstas se desarrollan a partir del saco aórtico (Sánchez-Gómez et al., 2005; Waldo et al., 2005).

#### **1.2.4 Saco Aórtico**

Inicialmente el saco aórtico es una estructura única, con características histológicas de tejido vascular. Más tarde al mismo tiempo que se proyecta a la cavidad pericárdica, el saco aórtico es dividido por un tabique de células provenientes de la cresta neural cardíaca, en dos conductos uno aórtico y otro pulmonar, los cuales se transforman en la región proximal de las grandes arterias (Kirby et al., 1983).



**Ilustración 7.** Septación del Cono, cortes transversales. A) Estadio 25HH mostrando las crestas derecha e izquierda aun sin fusionarse. B) Estadio 29HH las crestas conales muy próximas. C) Estadio 30HH las crestas se han fusionado formando así la cresta supraventricular. AO= salida aortica; AVC= cojines del canal atrio-ventricular; LAVC= Canal atrioventricular izquierdo; PL= cresta izquierda; PO= salida pulmonar; PR= cresta derecha; RAVC= canal atrioventricular derecho; RV= ventrículo derecho; \*= fusión de los cojines del canal atrioventricular. Tomada de Quayyum y colaboradores (2001).

### **1.2.5 Significado del Cojín Ventrosuperior del Canal AV en el Desarrollo del TSVI**

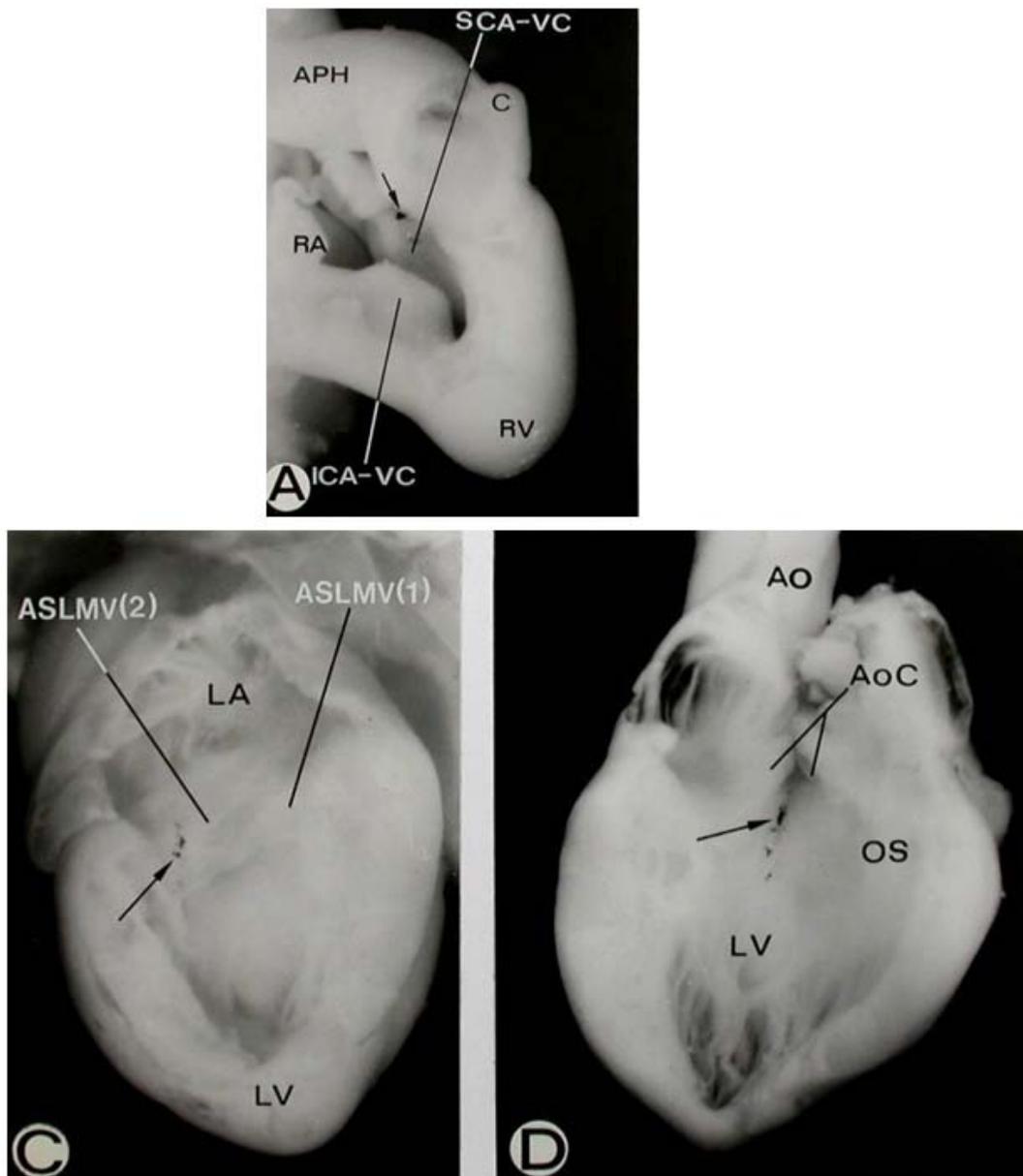
Uno de los temas más controvertidos de la embriogénesis cardiaca es el desarrollo del tracto de salida del VI, debido en parte a que no se cuenta con evidencias experimentales que lo relacionen directamente con estructuras del Cono. Inicialmente empleando técnicas descriptivas además de determinarse la existencia de dos conos (Kramer, 1942; De Vries y Saunders, 1962; De la Cruz et al., 1977, 1992; Arteaga et al., 1982), se concluyó que la continuidad fibrosa mitro-aortica es el resultado de la fusión de la región proximal de la cresta sinistroyinferior del Tronco con el cojín ventrosuperior del canal atrioventricular (Akimoto, 1979; Okamoto, 1980); sin embargo otros afirman que la regresión de miocardio subaórtico es la que contribuye (Jackson et al., 1995; Ya et al., 1998).

Estas conclusiones no concuerdan en ningún aspecto con las evidencias experimentales reportadas por De la Cruz y colaboradores (1982) y García-Peláez y colaboradores (1984), obtenida mediante marcaje en vivo en el embrión de pollo sobre la participación del cojín ventrosuperior del canal AV en la génesis del tracto de salida del ventrículo izquierdo. Ambos grupos de autores marcaron dicho cojín en embriones de pollo de estadios 19-24HH. Al rastrear las marcas hasta corazón maduro, descubrieron su participación en estructuras anatómicas del ventrículo izquierdo, particularmente en la continuidad fibrosa mitroaórtica así como en la pared septal (tabique interventricular), ambos constituyentes de las paredes del tracto de salida del VI (Ilustración 8). A pesar de que De la Cruz (1998) reflexionó sobre la concordancia de estos hallazgos con la anatomía normal del corazón y con lo

descrito sobre el desarrollo del tracto de salida del VD, no aclara cómo se integran el denominado “Cono posterior” (pared lateral izquierda) y el cojín ventrosuperior o viceversa para que ambos formen el tracto de salida ventricular izquierdo. Incluso ella mencionó que era necesario conocer el destino prospectivo de la pared posterior del Cono para dar una interpretación correcta del desarrollo del infundíbulo.

### **1.3 Teorías de la Remodelación del Cono y el Tronco en los Tractos de Salidas Ventriculares y Tronco de las Grandes Arterias.**

Existen al menos tres teorías para explicar la remodelación del TSE, para la correcta alineación de las conexiones ventrículo-arteriales: Transdiferenciación de cardiomiocitos en células de musculo liso (Ya et al., 1998), proliferación diferencial de cardiomiocitos (Sánchez-Gómez et al., 2005) y apoptosis, indispensable para el acortamiento del TSE (Watanabe et al., 1998, 2001).



**Ilustración 8.** Participación del cojín ventrosuperior del canal atrioventricular en el desarrollo del tracto de salida del ventrículo izquierdo. A) Microdissección de la cavidad derecha del corazón embrionario 24 horas después de ser marcado el cojín ventrosuperior del canal atrioventricular estadio 23HH. C) Microdissección del corazón maduro estadio 35HH mostrando la cavidad izquierda ventricular, vestigio de marca sobre la valva anteroseptal de la válvula mitral. D) Fue removida la valva anteroseptal, vestigios de marca sobre la porción lisa del tabique interventricular. Ao= aorta; AoC= cúspide aortica; APH= polo arterial del corazón; ASLMV (1)= porción de la valva anteroseptal de la válvula mitral insertada en el septum; ASLMV (2)= porción libre de la valva anteroseptal de la válvula mitral o continuidad mitroaórtica; C= Cono; ICA-VC= cojín inferior del canal atrioventricular; LA= atrio izquierdo; LV= ventrículo izquierdo; RA= ventrículo izquierdo; RV= ventrículo derecho; SCA-VC= cojín superior del canal atrioventricular. Tomada de De la Cruz M y Markwald R (1998).

### **1.3.1 Apoptosis**

En 1926 se publicó el primer reporte sobre la aparición de muerte celular durante la embriogénesis en varios órganos de algunas especies de animales (Ernst, 1926). Años más tarde se enfatizó la importancia y utilidad de la “degeneración” y muerte de células durante el desarrollo embrionario (Saunders, 1966; Menkes et al., 1970). También se puntualizó que la desregulación de la muerte celular causa desarrollo anómalo (Menkes et al., 1970).

Los reportes pioneros de muerte celular durante el desarrollo cardíaco normal en el embrión de pollo relacionan a la apoptosis con diversos procesos entre los que destacan la remodelación de la aorta dorsal, involución del conducto arterioso, formación del septum aortopulmonar y absorción del bulbo cardíaco -parte del tracto de salida embrionario- (Hughes, 1948; Menkes et al., 1965). En la década de los setenta del siglo pasado, Pexieder (1972a; 1972b; 1975) realizó un estudio sistematizado de muerte celular durante la cardiogénesis, también en embrión de pollo. Reporta una lista de más de 30 focos de muerte que aparecen durante el proceso, los llama “sitios de degeneración celular” y los describe durante el periodo comprendido entre el 2<sup>do</sup> y 20<sup>avo</sup> días de incubación. Uno de esos focos de muerte lo encuentra en el bulbo cardíaco y crestas bulbares, estructuras que coinciden con la región del tracto de salida embrionario denominada “Cono”. Adicionalmente, algunos investigadores describen la apoptosis que se presenta en el septum conal como un proceso indispensable para incrementar el volumen ventricular (Okamoto y Satow, 1975). También se señaló que los sitios de muerte celular en las crestas bulbares facilitan la invasión de células miocárdicas para formar la cresta supraventricular

(Akimoto, 1979; Okamoto, 1980). Así mismo se sabe que en el corazón embrionario los tejidos que presentan muerte celular programada además del miocardio son: células mesenquimales derivadas del endocardio, células de la cresta neural cardiaca y epicardio (Poelmann et al., 1998; Ya et al., 1998; Van den Hoff et al., 1999; Cheng et al., 2002).

Respecto al miocardio, Watanabe y colaboradores (1998, 2001) sugiere que para la correcta alineación de la conexión ventrículo-arterial es esencial la eliminación de cardiomiocitos del tracto de salida embrionario mediante apoptosis, promoviendo así la remodelación, acortamiento y rotación de esta estructura (Ilustración 9); idea reforzada por Schaefer y colaboradores (2004). Los procesos de remodelación, acortamiento y rotación del “Cono” y el “Tronco” han sido descritos desde hace varios años mediante análisis anatómico en aves y mamíferos (Kramer, 1942; Ya et al., 1998), marcaje selectivo del corazón en desarrollo (De la Cruz et al., 1977) y rastreo del destino de cardiomiocitos marcados con adenovirus (Watanabe et al., 1998, 2001). Sin embargo, aún no hay acuerdo sobre el significado de la apoptosis en estos procesos. Sin duda, uno de los problemas que no permite llegar a un consenso, es que muchos investigadores consideran al tracto de salida embrionario una unidad anatómica-embrionaria a pesar de estar compuesto por dos segmentos distintos (Cono y Tronco), con diferentes destinos en el corazón maduro (tracto de salida del VD y válvulas arteriales respectivamente).

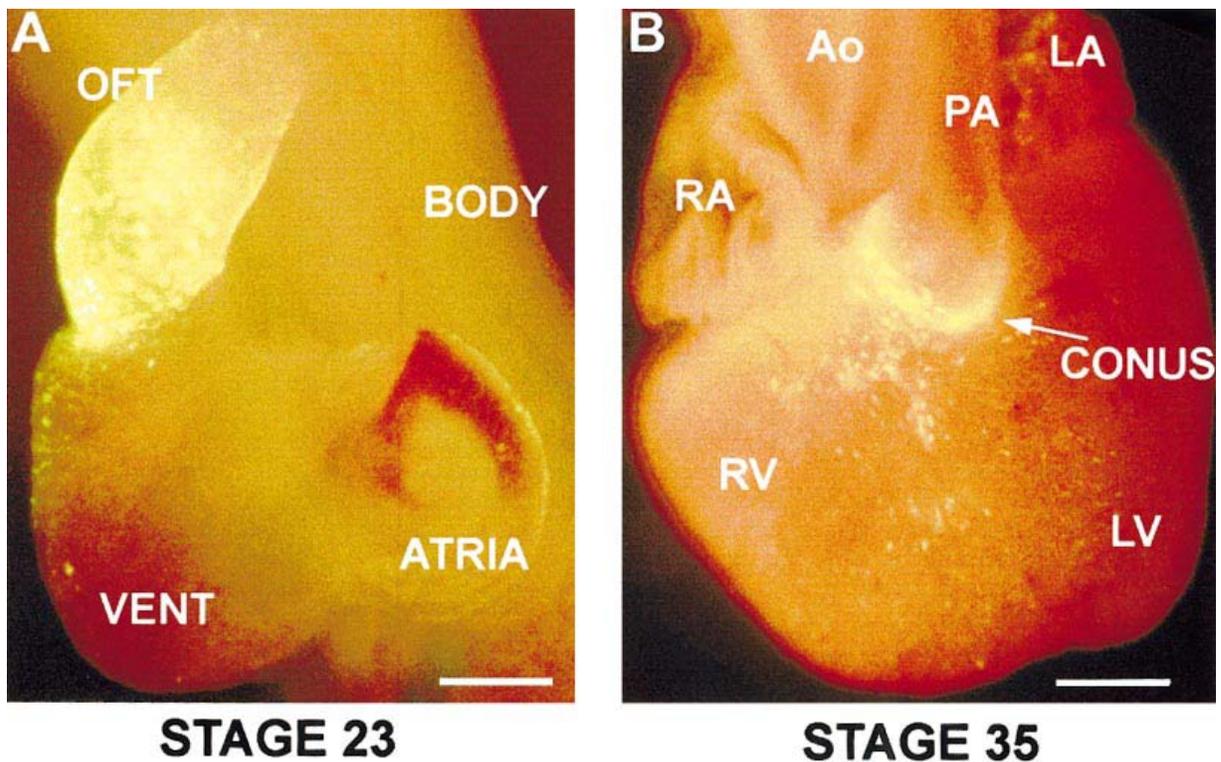
### 1.3.1.1 Generalidades del Proceso de Apoptosis

Se reconocen al menos cuatro tipos de muerte celular clasificados con base en criterios exclusivamente morfológicos, sin una clara referencia de los mecanismos bioquímicos que los regulan: apoptosis, necrosis, autofagia y muerte asociada a la mitosis. El término apoptosis fue introducido en 1972 para distinguir un tipo de muerte celular con características morfológicas y apariencia regular presente en algunas células que morían sin causa aparente y que evocaba la caída de las hojas de los arboles en otoño. Inicialmente se señaló que criterios morfológicos eran suficientes para diferenciar la apoptosis de la necrosis y autofagia (Kerr, 1972). Sin embargo, poco tiempo después se añadieron otros criterios fisiológicos y bioquímicos y se determinó que además de la ausencia de reacción inflamatoria, las características morfológicas propias de la apoptosis eran: activación masiva de caspasas, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y exposición de fosfatidilserina en la cara extracelular de la membrana plasmática, proceso conocido como la señal “comeme” que permite la unión de fagocitos y evita la liberación del contenido celular. Con el tiempo se estableció que estos procesos pueden ser reversibles e incluso suceder en eventos no necesariamente letales (Garrido y Kroemer, 2004; Galluzzi et al., 2008). Con base en estos hechos, el *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCDD) llegó a la conclusión que para definir los diferentes tipos de muerte celular era necesario integrar criterios morfológicos, bioquímicos y enzimáticos. En el caso de la apoptosis la definen como un tipo de muerte celular programada con puntos de no retorno que se acompaña de pérdida de la integridad de la membrana plasmática y fragmentación completa del núcleo, caracterizado por

la presencia de cuerpos discretos llamados “cuerpos apoptóticos” que con frecuencia contienen ADN fragmentado en los espacio internucleosomales. En las etapas más avanzadas, los “cuerpos apoptóticos” ya han sido fagocitados por las células adyacentes (Kroemer, 2009).

La apoptosis es parte esencial de la vida de los organismos multicelulares, está involucrada no solo en la embriogénesis, también participa en el mantenimiento y homeostasis de los tejidos. Durante el desarrollo embrionario, algunos tipos celulares son producidos inicialmente en exceso pero finalmente se someterán a la “muerte celular programada” que contribuye a esculpir órganos y tejidos. Por esta razón en la actualidad el término “muerte celular programada” ha sido sustituido por apoptosis. La importancia de la apoptosis radica en que fallas en la regulación de este proceso dan como resultado aumento o disminución de poblaciones celulares que en la etapa adulta provoca condiciones patológicas como enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, mientras que en la etapa embrionaria la desregulación puede producir defectos en el desarrollo (Thompson et al., 1995).

La apoptosis es un proceso delicadamente regulado fisiológicamente. Los efectores responsables de este proceso son bien conocidos, involucrando la activación de los miembros de la familia de las caspasas y Bcl2, en respuesta a una gran variedad de señales fisiológicas, daños físicos o características ambientales.



**Ilustración 9.** Marcaje de miocardiocitos del Cono mediante adenovirus. Se demuestra el proceso de acortamiento del Cono.). *Ao*= Aorta; *ATRIA*= atrios; *BODY*= cuerpo; *CONUS*= Cono; *LA*= atrio izquierdo; *LV*= ventrículo izquierdo; *OFT*= tracto de salida embrionario; *PA*= arteria pulmonar; *RA*= atrio derecho; *RV*= ventrículo derecho; *Vent*= ventrículos. Tomada de Watanabe y colaboradores (2001).

### 1.3.1.2 Técnicas de Determinación de la Apoptosis

Las técnicas utilizadas para la detección de células en procesos apoptóticos están basadas fundamentalmente, en los cambios morfológicos descritos anteriormente. EL ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) expone células en apoptosis gracias a los extremos libres 3'-OH del ADN, que fueron generados por acción de endonucleasas que fragmentaron el material genético específicamente en los segmentos internucleosomales. En dichos extremos

la enzima “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) cataliza la adición de nucleótidos dUTP (digoxigenina-nucleótidos). Los nucleótidos polimerizados forman un oligómero compuesto por digoxigenina-nucleótidos con nucleótidos no marcados. Por último los fragmentos de ADN que se han etiquetado con la digoxigenina-nucleótidos son revelados por medio del anticuerpo anti-digoxigenina acoplados a fluoresceína. Con ayuda de un microscopio laser confocal o de epifluorescencia se pueden excitar la fluoresceína e identificar celular positivas para apoptosis (Gavrieli, 1992; Schmitz, 1991).

Lysotracker Red (LTR). Es otra forma en que las células apoptóticas se pueden identificar, aun antes de procesar el tejido para histoquímica. Esta tinción tiene la ventaja de etiquetar cuerpos apoptóticos que rodean al que fue el núcleo celular ya sea conteniendo fragmentos de ADN o sin ellos. Ha sido documentada en el análisis de la remodelación en el corazón de pollo.

## **1.4 Ciclo Celular y Proliferación**

El ciclo celular consta de una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan a la división celular y consecuente producción de dos células hijas, cada una de las cuales contienen cromosomas idénticos a los de la célula madre. La duplicación del material genético tiene lugar durante la fase S del ciclo e involucra una amplia gama de moléculas reguladoras, una de ellas el llamado “antígeno nuclear de proliferación celular” (PCNA), es una proteína de 36kDa que es un complejo trimérico en forma de anillo con múltiples funciones, una de ellas esencial

para la progresión del ciclo celular. Se han utilizado oligonucleótidos anti sentido para PCNA, encontrando incapacidad de las células de entrar en la fase S del ciclo. Por lo anterior se ha considerado a PCNA como un elemento esencial de la maquinaria de replicación del ADN y está presente en células cíclicas principalmente en fase S (Lodish et al., 2009).

#### **1.4.1 Pruebas de Determinación de Proliferación por medio de PCNA**

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA o clon PC10, es ampliamente utilizado en pruebas inmunoquímicas e inmuflourescentes. Este ensayo permite marcar células cíclicas que estén expresando PCNA y por lo tanto se encuentran en la en la etapa de G1 a S o en plena síntesis de ADN. Esta técnica es una herramienta confiable para determinar células proliferantes en un tejido normal y en algunos casos neoplásico (Hall et al., 1990).

## **II. Planteamiento del Problema**

Clásicamente se ha pensado que el Cono presenta dos conductos (anterior y posterior). A través de experimentos de marcaje en vivo e *in ovo* en el embrión de pollo, se demostró que el conducto anterior se transforma en el tracto de salida del ventrículo derecho. Respecto al destino prospectivo del conducto posterior, a pesar de no existir evidencia experimental es ampliamente aceptado que se transforma en el tracto de salida del ventrículo izquierdo. Aunado a esta información, los conocimientos sobre los procesos morfogénéticos involucrados en el desarrollo del Cono-Tronco son controversiales. El acortamiento por apoptosis tanto del Cono y Tronco es el evento mas aceptado para explicar la correcta alineación de las grandes arterias con su ventrículo correspondiente. También se piensa que en el desarrollo del tracto de salida del ventrículo derecho interviene el crecimiento diferencial del miocardio ventricular. Lo que deja abierto diversas preguntas. ¿Realmente la pared izquierda del Cono (parte del Cono posterior) participa en el desarrollo del tracto de salida del ventrículo izquierdo?, ¿Qué importancia tienen los procesos morfogénéticos: proliferación y apoptosis durante el desarrollo de los tractos de salida ventriculares?.

### **III. Hipótesis**

Si se marcan selectivamente las paredes del Cono en un estado inicial (estadio 22HH) y se encuentran rastros de dichas marcas en estructuras anatómicas de corazones maduros 36HH (estado final), entonces estas estructuras tendrían un origen embrionario de las paredes del Cono. En este proceso, la apoptosis y la proliferación del miocardio tendrán un patrón diferencial y una función remodeladora.

## **IV. Justificación**

Debido a una mejor cobertura en la atención primaria, principalmente previniendo las enfermedades infecciosas, los defectos congénitos se han posicionado como la principal causa de muerte perinatal. Las cardiopatías congénitas TroncoConales, presentan defectos de los tractos de salida ventriculares, válvulas que los regulan así como el tronco de las grandes arterias. Afectan alrededor de 2 de cada 1,000 nacidos vivos, siendo causa frecuente de mortalidad y morbilidad en fetos no natos y niños de diversas edades. A pesar de su incidencia no se ha determinado por completo sus causas ni cómo se originan. Debido a que las enfermedades congénitas se producen durante la embriogénesis, es esencial el conocimiento del desarrollo normal de las cámaras de salida ventriculares para entender la embriopatogenia de estas cardiopatías. Los datos obtenidos aportarán información necesaria para estudios genómicos sobre el desarrollo del Cono-Tronco y generaran conocimiento indispensable para en el futuro establecer estrategias de tratamiento in útero de las cardiopatías Tronco-Conales.

## V. Objetivo General

Determinar mediante marcaje *in vivo* con tinta china-carbón/gelatina y/o óxido de hierro/gelatina en embrión de pollo, el destino prospectivo de las paredes del Cono: derecha, izquierda, dorsal y ventral; hasta su manifestación anatómica en el corazón maduro, estableciendo el patrón espacio temporal de miocitos apoptóticos/ cíclicos durante este proceso.

## Objetivos Específicos

1. Rastrear el destino de las paredes del Cono: derecha, izquierda, ventral y dorsal durante el desarrollo cardiaco (estadios 22- 36HH).
2. Registrar la distancia entre las marcas que delimitan al Cono y estructura en que se transforma (análisis morfométrico).
3. Estudiar los cambios morfohistológicos del Cono durante la cardiogénesis.
4. Determinar el patrón espacio temporal de miocitos apoptóticos del Cono y estructura en que se transforma desde estadio 22HH hasta estadio 36HH.
5. Establecer el patrón espacio temporal de miocitos cíclicos del Cono estructura en que se transforma en las mismas etapas.

## VI. Material y Métodos

### 6.1 Embriones

Se utilizaron huevos fértiles de gallina (*Gallus domesticus*) libres de parásitos específicos obtenidos de la granja ALPES, (Tehuacán, Puebla, México). Se incubaron mediante “incubadora ranchera” a 37°C y 60% de humedad para obtener embriones de 4 días de incubación (estadio 22HH). El estadio se determinó por la clasificación de Hamburger y Hamilton (1951).

### 6.2 Marcaje *in ovo*

El cascaron de huevos con embriones en estadio 22HH, fue desinfectado limpiándolo con alcohol al 70% y se abrió una ventana de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>. Utilizando un microscopio estereoscópico y empelando pinzas de relojero, se disecaron las membranas coriónica, vitelina y pericárdica a fin de tener acceso directo al corazón. Embriones en estadio 22HH fueron marcados con una mezcla de tinta china-carbón o bien oxido de hierro/gelatina embebida en filamentos de vidrio (Anexo 1), preparados mediante una modificación de la técnica de Seichert (1965). Se colocó una marca en el límite Cono-ventricular o límite inferior (1) y otra en el límite Cono-Tronco o límite superior (2). Se emplearon 120 embriones para marcar 30 corazones en cada una de las paredes del Cono: derecha, izquierda, dorsal, ventral. Una vez marcados los embriones se fotografiaron *in ovo* a través de un microscopio estereoscópico acoplado a una cámara digital, a fin de registrar la ubicación inicial de las marcas en aumentos de 20x - 30x - 40x.

Para rastrear la posición de las marcas a lo largo del tiempo, una vez delimitado el Cono con las marcas (1) y (2) así como fotografiados los embriones, se cubrió la ventana del cascaron con cinta adhesiva y se re-incubaron los huevos hasta obtener embriones en los estadios 24HH, 26HH, 28HH, 30HH, 32HH, 34HH, 36HH.

### **6.3 Tinción LTR**

Embriones marcados de los estadios 22 al 36HH fueron perfundidos tanto en solución fisiológica Ringer como con buffer de fosfatos (PBS) a fin de eliminar eritrocitos. Posteriormente los corazones fueron disecados con ayuda de microscopio estereoscópico, debidamente catalogados y re-incubados individualmente en tubos eppendorf con 1ml de solución de PBS/LysoTracker® Red (LTR) por 30 minutos a 36°C en incubadora de cultivo.

### **6.4 Fijación / Fotografía**

Una vez cultivados con LTR los corazones fueron fijados en formalina neutra (Anexo 2) y almacenados a 4°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de fijación y con el propósito de registrar el desplazamiento de las marcas 1 y 2, así como de revelar células positivas para apoptosis, los corazones se fotografiaron en campo claro sobre los planos: sagital vista derecha e izquierda, plano coronal anterior así como transversal vista cefálica. Posteriormente se fotografiaron utilizando el filtro epifluorescente "rodamina." Para ello se empleó un microscopio estereoscópico acoplado a cámara digital, en aumentos 20x - 40x - 80x.

## **6.5 Análisis Morfométrico**

Para este análisis se empleó un grupo de embriones con el corazón marcado en el estadio 22HH y reincubados hasta los estadios 30 y 36HH. Los corazones se fotografiaron al inicio y final del experimento. Las imágenes capturadas se usaron para medir la separación entre las marcas con el programa Axiovision LE rel. 4.4. Se calculó el promedio, desviación estándar y se aplicó la prueba F del análisis de varianza (ANOVA) de un factor.

## **6.6 Histología**

Los corazones una vez fijados con formalina neutra fueron procesados para inclusión en parafina, para realizar cortes histológicos. Se seleccionaron 3 corazones de cada etapa para teñirlos con la técnica de hematoxilina-eosina (Anexos 3 y 4).

## **6.7 Determinación de PCNA por Inmunofluorescencia**

A fin de establecer el patrón espacio temporal de células en proliferación en el límite Cono-ventricular durante los estadios 22HH al 36HH, se obtuvieron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  del corazón en el plano transversal. Los tejidos se desparafinaron por incubación en un horno a 60 °C durante una hora y dos cambios de xilol, se rehidrataron con cambios en alcoholes graduales desde 100% hasta 30% con 5 minutos en cada uno. Posteriormente se recuperaron los antígenos tratando el tejido con amortiguador de citratos (Biogenex, USA) y sometándolo a 20-25 libras de presión por 5 minutos en olla de presión. Una vez que las preparaciones tomaron la

temperatura ambiente, se lavaron con una solución de PBS/Tween 20 (PBS-T20) y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA). Inmediatamente se decantó el bloqueador y se adicionó a los tejidos anticuerpo primario anti-PCNA diluido en PBS-T20 en una relación 1:100. Las muestras se almacenaron a 4°C por 24 horas. Transcurrido el periodo, las muestras se lavaron con dos cambios de PBS-T20 y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-IgG Alexa 488. Las preparaciones se lavaron nuevamente en dos cambios de PBS-T20 y se tiñó el núcleo celular mediante tratamiento por 10 minutos en el marcador Far-Red Fluorescent Live-Cell Impermeant DNA Dye SRAQ7 (BioStatus, Reino Unido). Nuevamente se lavaron las muestras y se procesaron con medio de montaje vectashiel (Vector, USA). Por último se almacenaron a 0 °C hasta su observación por microscopía laser confocal.

## **6.8 Planos Corporales**

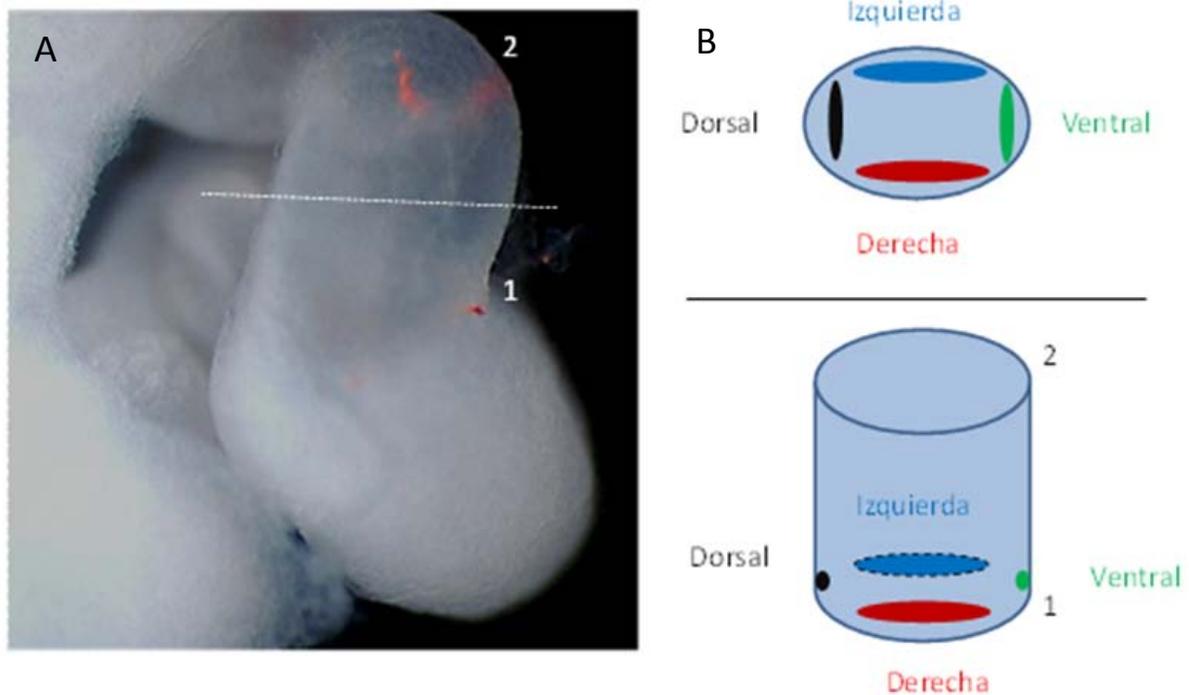
Para el diseño experimental y análisis de resultados en este estudio no se utilizó la nomenclatura clásica para describir algunas estructuras tanto en el corazón embrionario como del corazón maduro. Se emplearon los planos corporales y se definieron de la siguiente manera:

Sagital: Divide al cuerpo en una porción derecha y otra izquierda.

Frontal o Coronal: Divide al cuerpo en una porción anterior y otra posterior.

Transversal: Divide al cuerpo en porciones superiores e inferiores

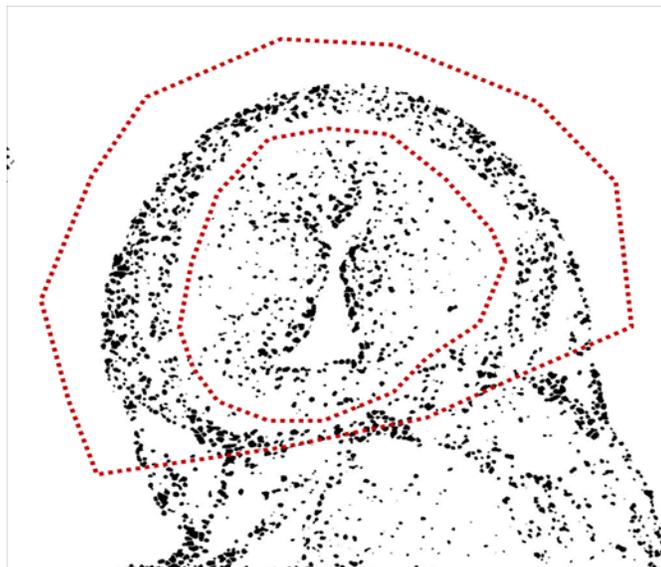
Así mismo, al describir la anatomía del embrión se sustituyeron los términos “Dorsal” en lugar de Posterior y “Ventral” en lugar de Anterior (Ilustración 10). De esta manera, la “Pared anterior del Cono” descrita por De la Cruz y colaboradores (1977) a partir del estadio 22HH, nosotros con base en los planos corporales y su ubicación real en el plano sagital la denominamos pared derecha. Además para identificar cada una de las paredes del Cono se les asignó un color: Dorsal= negro; Ventral= verde; Izquierda= azul; Derecha= roja (Ilustración 10).



**Ilustración 10.** Denominación de las paredes del Cono respecto a los ejes corporales. A) Vista sagital del TSE mostrando el Cono delimitado por dos marcas ubicadas en su límite Cono-ventricular (1) y Cono-troncal (2). B) Esquema mostrando la ubicación espacial de las paredes conales y la nomenclatura empleada para identificarlas.

## 6.9 Conteo Celular

Para el conteo de células se utilizó el software ImageJ<sup>®</sup>. Se procesaron las imágenes obtenidas mediante microscopio Laser Scanning Microscope LSM 510 (confocal). Se transformaron de imágenes digitales a binarias y se contaron utilizando la función AnalyzeParticles. Para discriminar células de las crestas del Cono y epicardio, primero se contaron las células totales, posteriormente se contabilizaron las células pertenecientes a las crestas del Cono y se realizó una resta de los datos obtenidos (Ver ejemplo ilustración 11). Para los datos correspondientes a las porciones derecha o izquierda del Cono, se trazó una línea media sobre el Cono. Cuando fue posible, se utilizaron los vestigios de la marca de tinta de la pared ventral. El cálculo de los datos, tablas y gráficas se realizó en el software Microsoft Excel 2007.



**Ilustración 11.** Imagen binaria procesada en ImageJ<sup>®</sup>, muestra discriminación de células de las crestas del Cono.

## **VII. Resultados**

### **7.1 Rastreo del Destino Prospectivo de las Paredes del Cono**

Con el propósito de conocer la participación de las distintas paredes del Cono en la formación de las estructuras anatómicas del corazón maduro, se rastrearon las marcas que fueron colocadas en sus paredes: derecha, izquierda, dorsal y ventral en estadio 22HH (inicio), hasta su manifestación anatómica en el corazón maduro (estadio 36HH). Para este análisis se tomó como referencia la marca del límite Cono-ventricular (1) así como los planos corporales aplicados al Cono y al corazón completo.

#### **7.1.1 Pared Derecha**

Las marcas colocadas inicialmente (estadio 22HH) en el límite Cono-ventricular, pared derecha (conocida clásicamente como “Cono anterior”) mostraron un desplazamiento lateral en dirección contraria a las manecillas del reloj, desde una posición derecha en el plano sagital hacia una posición anterior en el plano coronal del corazón maduro (36HH). Se analizaron 30 corazones; se encontró que en 83.3% de ellos esta pared conal participa en la formación de la cara esternocostal del corazón maduro, particularmente en la “pared libre” del tracto de salida del VD (Figura 1A). En los corazones restantes la marca no se logró ubicar al final del experimento.

### **7.1.2 Pared Izquierda**

Las marcas insertadas en la pared izquierda (conocida clásicamente como “Cono posterior”), se desplazaron lateralmente en dirección a favor de las manecillas del reloj, desde una posición izquierda en el plano sagital hacia una posición antero-izquierda en el plano coronal del corazón maduro (Figura 1B). En 90% de 20 corazones analizados, la marca al final del experimento (Estadio 36HH) se observó en la pared izquierda del TSVD. En el resto de los corazones maduros no se pudieron registrar las marcas.

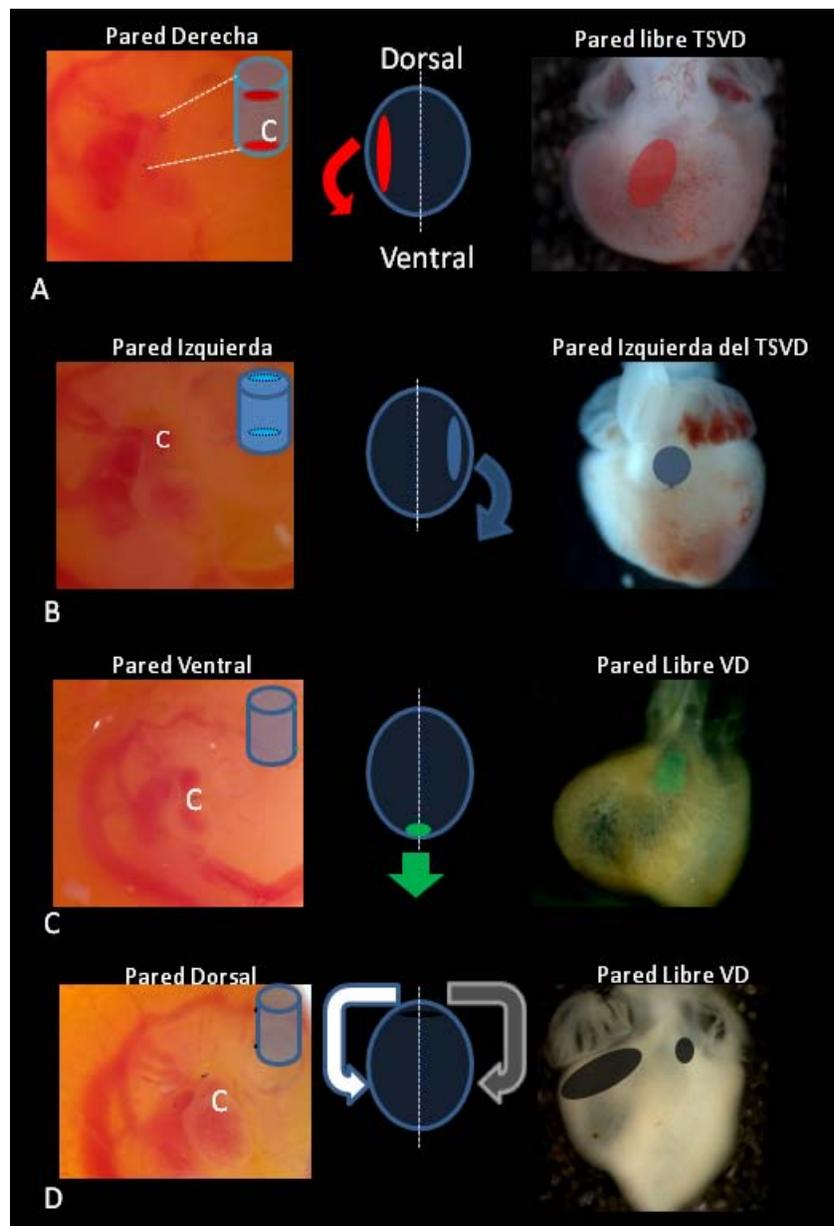
### **7.1.3 Pared Ventral**

Respecto a las marcas aplicadas en la pared ventral del Cono, no presentaron evidencia de movimientos laterales, pero en el corazón maduro (Estadio 36HH) se observó un ligero desplazamiento en dirección céfalo-caudal. Cien por ciento de 30 corazones analizados tenían la marca en la pared libre del tracto de salida del ventrículo derecho, debajo de las sigmoideas pulmonares observadas por transparencia (Figura 1C).

### **7.1.4 Pared Dorsal**

Las marcas colocadas en la pared dorsal del Cono presentaron desplazamiento lateral, casi siempre en contra de las manecillas del reloj, hacia una posición antero-derecha, pero en algunos corazones el desplazamiento fue en sentido contrario. Las estructuras anatómicas donde se encontró participación con más frecuencia fue la porción derecha de la base cardiaca y el segmento superior del borde agudo

cardiaco; con menor frecuencia la marca apareció en la pared izquierda del tracto de salida del ventrículo derecho (Figura 1D).

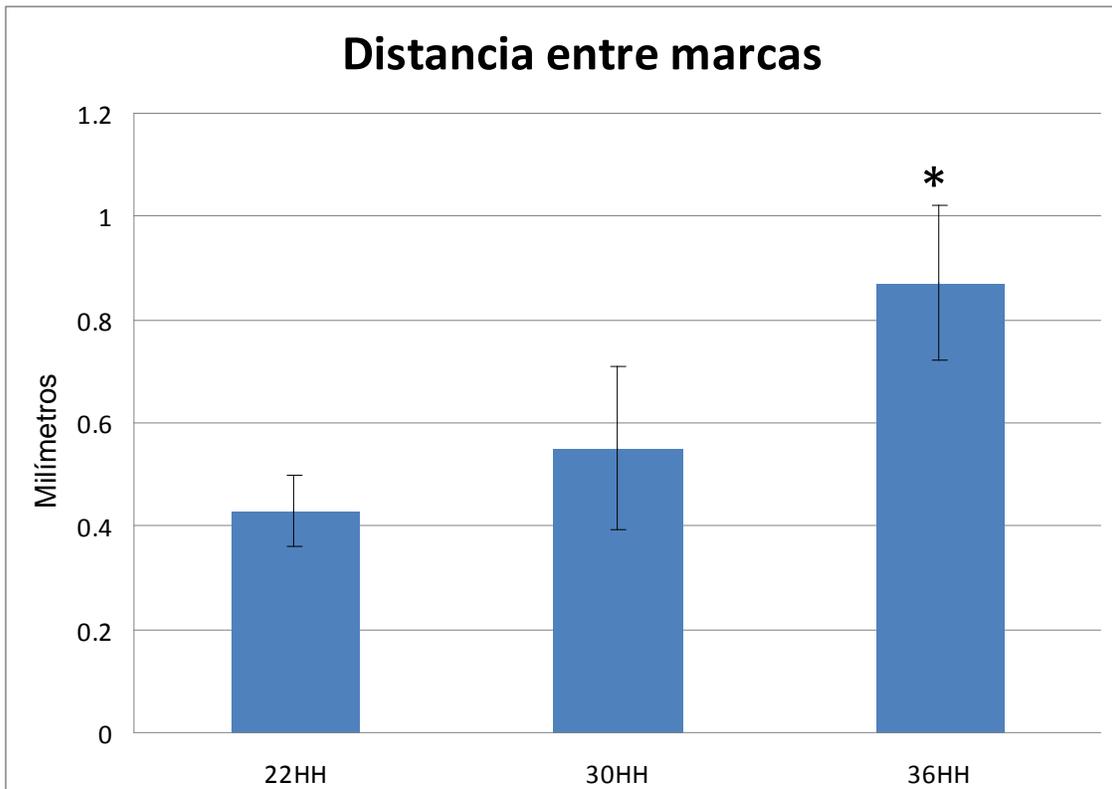


**Figura 1. Destino de las paredes del Cono en componentes del ventrículo derecho.** A) la pared derecha se traslada en contra de las manecillas del reloj hacia la línea media del corazón, participando en la formación de la pared libre del TSVD. B) La pared izquierda (parte del Cono posterior) se moviliza a favor de las manecillas del reloj transformándose en la pared izquierda del TSVD. C) La pared ventral no se moviliza lateralmente su ubicación permanece ventral participando en la formación de la pared libre del TSVD. D) La pared dorsal se desplaza casi siempre en contra de las manecillas del reloj, participando en la formación de la porción superior del borde agudo así como de la parte derecha de la base cardíaca. TSVD= tracto de salida del ventrículo derecho; VD= ventrículo derecho; derecha= roja; izquierda= azul; ventral= verde; dorsal= negro.

## **7.2 Análisis Morfométrico**

A fin de determinar si el Cono sufre “regresión” y/o “acortamiento”, se midió la longitud del Cono (distancia entre los límites anatómicos delimitados por las marcas 1 y 2). Se emplearon 30 corazones en los estadios inicial 22HH, intermedio 30HH y final 36HH. En general se encontró un incremento de los valores a lo largo del proceso.

El promedio de la distancia entre los límites 1 y 2 fue en el **estadio 22HH** 0.43mm,  $\sigma=0.07$ ; en **estadio 30HH** 0.56mm,  $\sigma=0.16$  y en **estadio 36HH** 0.87,  $\sigma=0.15$  (Gráfica 1). La prueba F del análisis de varianza (ANOVA) de un factor, mostró diferencias significativas en la longitud del Cono del grupo 22HH con el grupo 36HH. Las diferencias no fueron significativas respecto a la comparación de los valores registrados entre los estadios 22HH/30HH y 30HH/36HH (Tabla 1).



**Grafica 1.** Distancia entre los límites 1 y 2. ANOVA, Tukey  $p < 0.05$  \* Diferencia significativa entre los promedios del estado inicial 22HH y el estado final 36HH. Cada barra representa la media  $\pm \sigma$ .

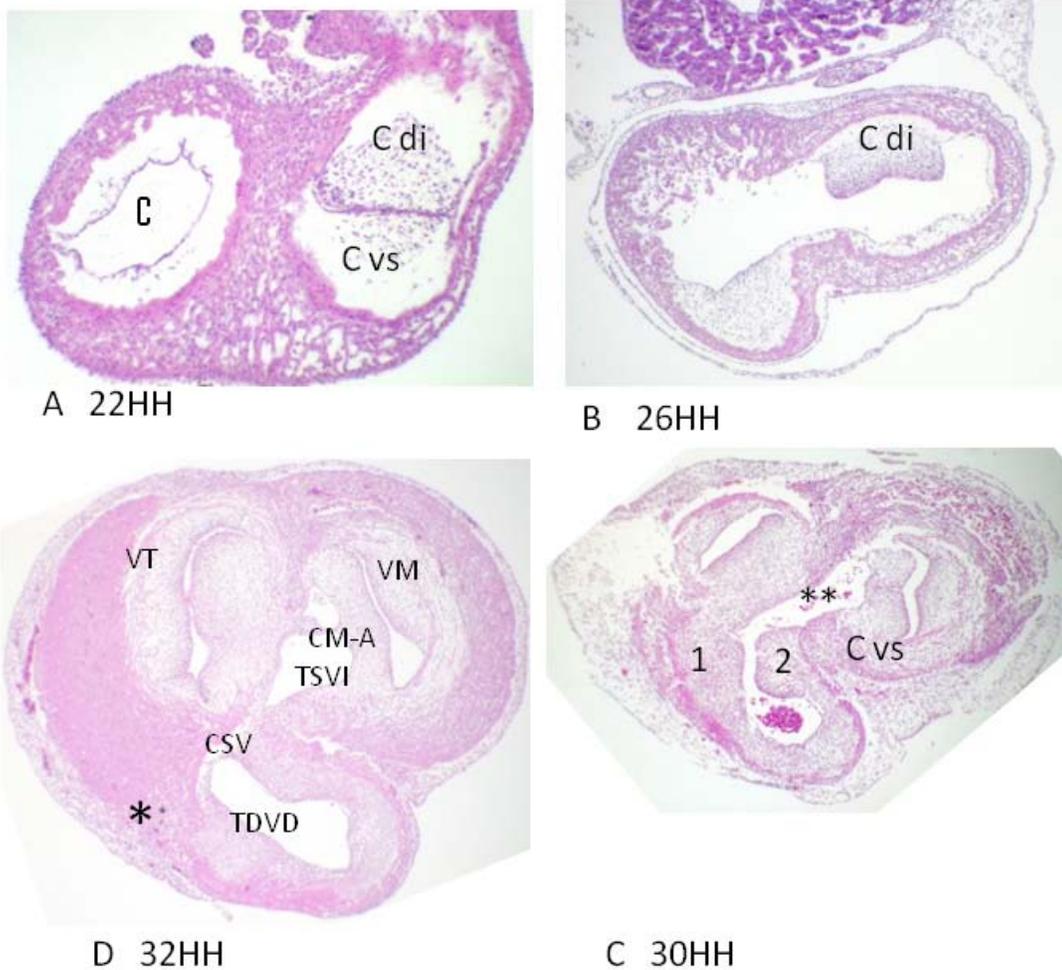
**Tabla 1.** Análisis de varianza. La ANOVA muestra diferencias significativas entre los grupos analizados, lo que permite afirmar que el Cono aumenta de tamaño desde un estado inicial en 22HH hasta uno final 36HH corazón maduro.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	10	4.34	0.434	0.005782222		
Columna 2	10	5.63	0.563	0.027823333		
Columna 3	10	8.73	0.873	0.025801111		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las var.</i>	<i>Suma de cuad.</i>	<i>Grados lib</i>	<i>Promedio cuadra</i>	<i>F</i>	<i>Prob.</i>	<i>Valor crítico F</i>
Entre grupos	1.018206667	2	0.509103333	25.70940411	5.60709E-07	3.354130829
Dentro de los grupos	0.53466	27	0.019802222			
Total	1.552866667	29				

### **7.3 Cambios Histológicos**

Con el propósito de corroborar el destino de la pared izquierda del Cono (Cono posterior) y consecuente desplazamiento de las paredes conales se realizaron cortes histológicos transversales y se tiñeron mediante la técnica hematoxilina –eosina. Las imágenes obtenidas confirman el “desdoblamiento” de las paredes dorsal y laterales hacia una posición ventral observada por marcaje. **En el estadio 22HH** el Cono es una estructura tubular que contiene las crestas sinistro-ventral y dextro-dorsal revestidas de endocardio y con pocas células. El canal AV se observa en posición contralateral y alejado del Cono y presenta los cojines ventrosuperior y dorsoinferior. **En el estadio 26HH** el Cono se ve desplazado hacia la línea media cardíaca. La zona dorso-izquierda de la pared conal pierde continuidad a nivel del límite conoventricular y el canal AV está desplazado hacia la derecha. Los cojines dejan de estar contralaterales respecto al Cono y se observan más cercanos a él. Las crestas conales son más voluminosas y contienen más células. **En el estadio 30HH** el Cono carece totalmente de pared dorsal, sus crestas inicialmente rodeadas por la pared dorsal del Cono están expuestas hacia la luz ventricular y aunque han incrementaron su volumen y celularidad, todavía no se fusionan. El tracto de salida del VI no está individualizado pero se encuentra en continuidad con el TSVD a través de un foramen en proximidad con los cojines del canal AV que están considerablemente adelgazados. **En estadio 32HH** el tracto de salida del VI ya adquirió su pared septal y se cerró la comunicación interventricular a nivel de los tractos de salida. Además se

manifiesta la cresta supraventricular, separando así el tracto de entrada del tracto de salida del VD.



**Figura 2.** Transformación del Cono inicialmente “tubular” en una “lamina” formando estructuras del ventrículo derecho. A) Cono tubular con crestas. B) Pérdida de continuidad de la pared dorsoizquierda del Cono. C) Cono con estructura en U, se observa comunicación interventricular primaria y aproximación de las crestas del Cono en su porción dorsal. D) Tractos de salida ventriculares separados y presencia de la cresta supraventricular. \*Vestigios de marca inicialmente colocada en la pared dorsal del Cono estadio 22HH. \*\* Comunicación interventricular primitiva. C= Cono; Cdi= cojín dorsoinferior; Cvs= cojín ventrosuperior; VM= válvula mitral; VT= válvula tricúspide; CM-A= continuidad mitro-aortica; TSVI= tracto de salida del ventrículo izquierdo; CSV= cresta supraventricular; TDVD= tracto de salida del ventrículo derecho; 1= porción dorsal de la cresta dextrodorsal; 2= porción dorsal de la cresta sinistroventral.

## 7.4 Patrón Apoptótico

Las células positivas para apoptosis reveladas mediante el reactivo LysoTracker® Red (LTR) se visualizan en el órgano completo como puntos rojos brillantes (Fig. 3. Control LTR). Se fotografiaron corazones tratados con LTR en los planos: sagital vista derecha e izquierda, coronal vista frontal y transversal vista cefálica. Al menos tres corazones de cada etapa se usaron para elaborar cortes histológicos transversales. El análisis desde una etapa inicial 22HH hasta el corazón maduro 36HH tanto del órgano completo como en cortes histológicos, no registra el número de células apoptóticas suficientes que sustente “acortamiento” anatómico de la estructura embrionaria. Dicho proceso si se registra en el Tronco.

**Estadio 22HH:** Tanto las fotografías del órgano completo como el análisis de los cortes histológicos de corazones tratado con LTR no mostraron células positivas para apoptosis ni en el Cono ni en el Tronco.

**Estadio 24HH:** Por primera vez se manifiestan células apoptóticas en el corazón, aunque no estaban en el Cono. En la vista sagital izquierda y derecha del órgano completo se encontró un pequeño grupo de puntos fluorescentes rojos, indicativos de apoptosis en el “techo” del Tronco, cerca de su límite con el Cono, sitio donde se encuentra la marca 2 (Fig. 3A, A'). Estos resultados fueron corroborados en el corte histológico (Figura 4A).

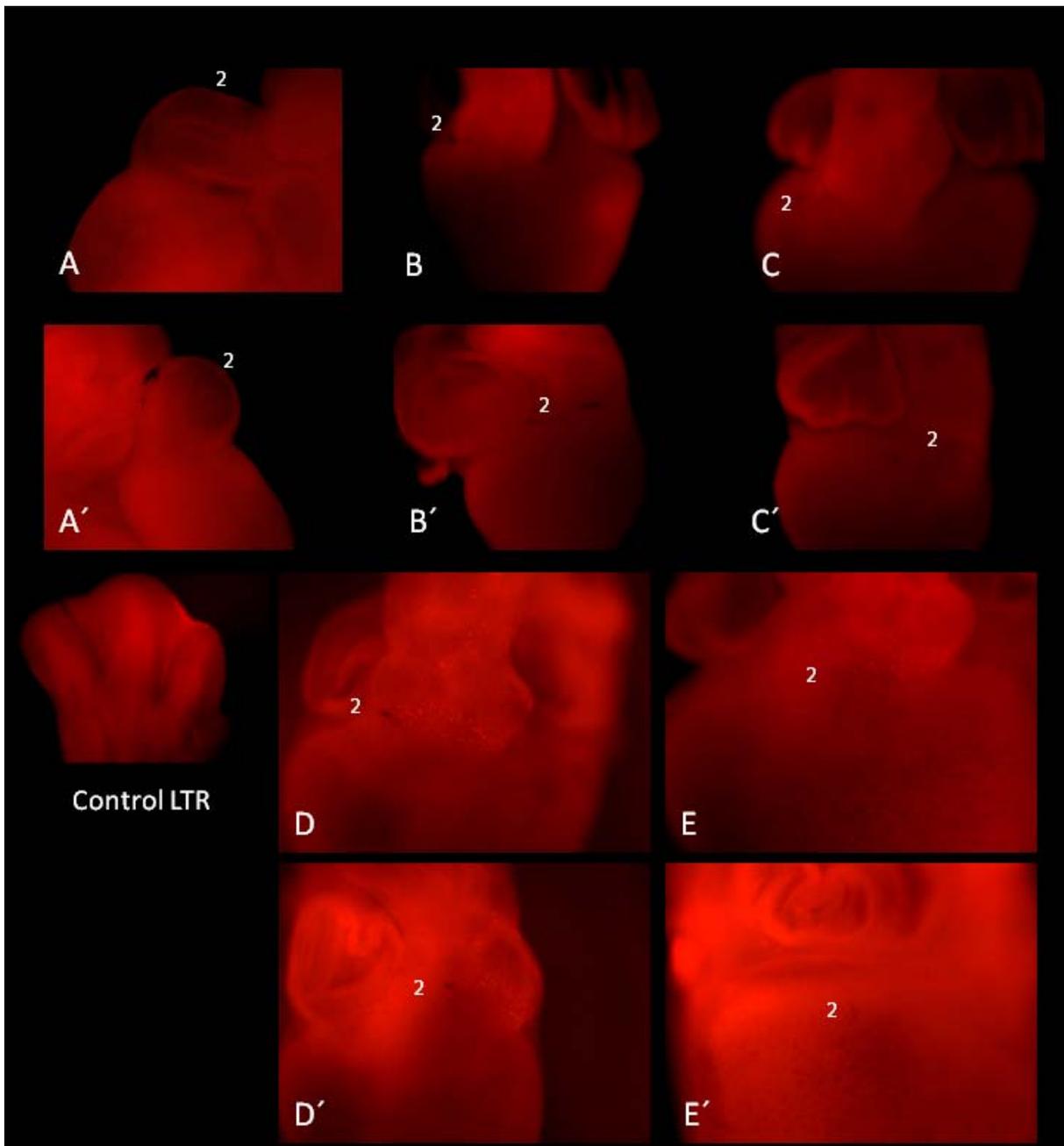
**Estadio 26HH:** En el órgano completo y cortes histológicos fue posible visualizar una mínima cantidad de células apoptóticas en la pared ventral del Cono (Fig. 3B, B'). Por otra parte, en la pared dorsal del Cono en estrecha relación con los cojines del canal

AV también se encontró un foco apoptótico (Fig. 4B, B'). En contraste, las células apoptóticas incrementaron considerablemente en el Tronco en su límite con el Cono.

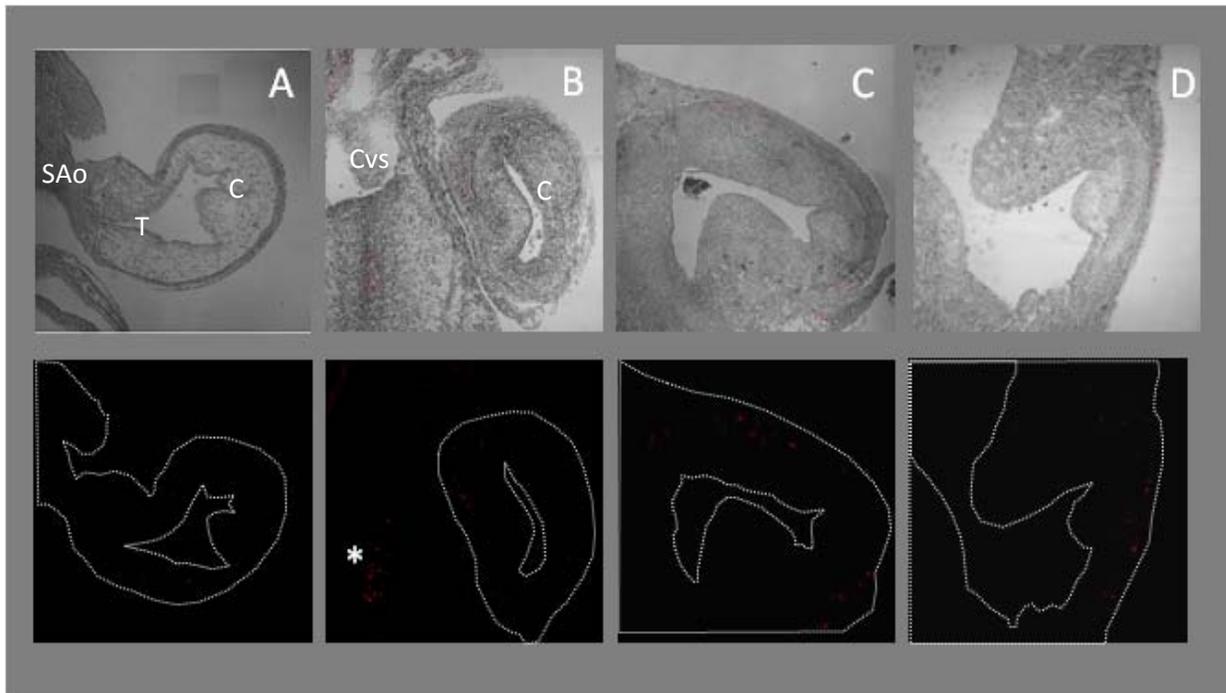
**Estadio 28HH:** Las células apoptóticas comienzan a alinearse en una franja compacta, justo en la región del límite Cono-Tronco (Fig. 3 D y D'). A pesar de que desde las vistas frontal y sagital derecha no se detecta apoptosis en la región del Cono delimitado por las marcas (Fig. 3D, D'), en los cortes histológicos se evidencia apoptosis en miocardiocitos en las paredes ventrolaterales (Fig. 4C, C').

**Estadio 30HH:** La apoptosis durante este estadio se concentra en una franja de tejido por arriba del límite Cono-Tronco donde está ocurriendo la formación de los pisos valvulares ventrículo-arteriales. Histológicamente se confirma la ubicación del patrón apoptótico observada en el órgano completo pero se evidencia que las células apoptóticas son del epicardio (Fig. 4D, D').

**Estadio 32HH:** Durante este estadio las células apoptóticas se siguen presentando en una formación compacta justo por arriba de la marca correspondiente al límite Cono-Tronco (Figura 3 E, E'). Dentro de los límites del Cono no se aprecian células apoptóticas en el órgano completo.



**Figura 3.** Presencia de apoptosis en el corazón completo. 2= límite Cono-Tronco. Control positivo en el interdígito de la extremidad. A y A') estadio 24HH vistas sagitales derecha e izquierda, apoptosis presente en el "techo" del Tronco. B y B') vistas frontal y sagital derecha estadio 26HH, se visualizan algunas células positivas dentro del Cono. C y C') estadio 28HH aumenta el número de células apoptóticas dentro del Cono. D, D') Estadio 30HH; E E') estadio 32HH. No se observa apoptosis en el Cono, presente solo fuera del límite Cono-Tronco.



**Figura 4.** Apoptosis. Cortes transversales. A) Estadio 24HH vista que incluye el Cono (C), Tronco (T) y saco aórtico (SAo). Se registran algunas células positivas en el “techo del Tronco”. B) Estadio 26HH, Cono en estrecha vecindad con el cojín ventrosuperior del canal AV (CVS). Se muestran focos apoptóticos en la pared dorsal del Cono y línea de fusión de los cojines del canal. C) Estadio 28HH. Perdida total de la pared dorsal del Cono. Presencia de dos focos apoptóticos del miocardio conal en las paredes laterales. D) Presencia de apoptosis en células del epicardio, estadio 30HH. Tracto de salida del ventrículo derecho (TSVD) por encima de la comunicación interventricular.

## 7.5 Patrón Espacio Temporal de Miocitos Cíclicos

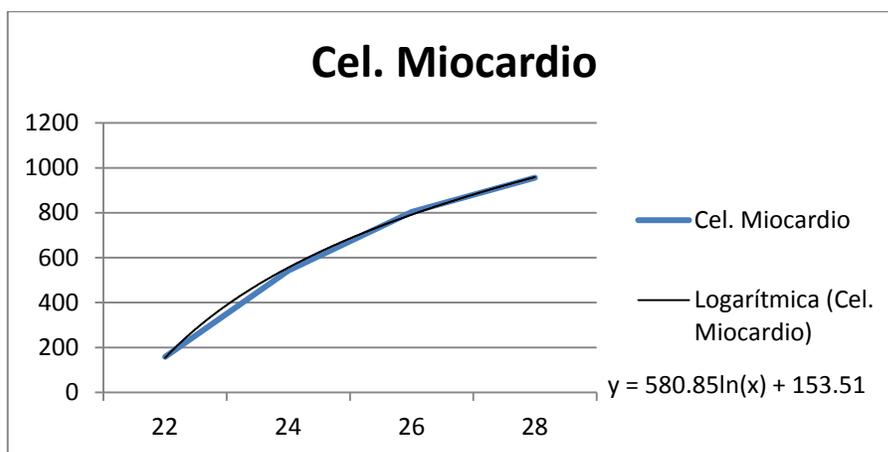
A fin de correlacionar el incremento en las dimensiones del Cono con el desplazamiento de sus paredes hacia componentes del VD observado por marcaje en vivo, se hizo un análisis espacio-temporal de cardiomiocitos cíclicos en el límite Cono-ventricular de corazones en estadios 22-28HH mediante inmunolocalización de la proteína PCNA.

### 7.5.1 Análisis Temporal de Cardiomiocitos del Cono

El incremento del número de cardiomiocitos de las paredes del Cono, se observa en la tabla 2. Se caracteriza por presentar un aumento celular de manera logarítmica (Gráfica 2).

**Tabla 2.** Conteo de Núcleos Celulares del Miocardio Conal.

Estadio	22HH	24HH	26HH	28HH
Cel. Miocardio Conal	158	542	804	956



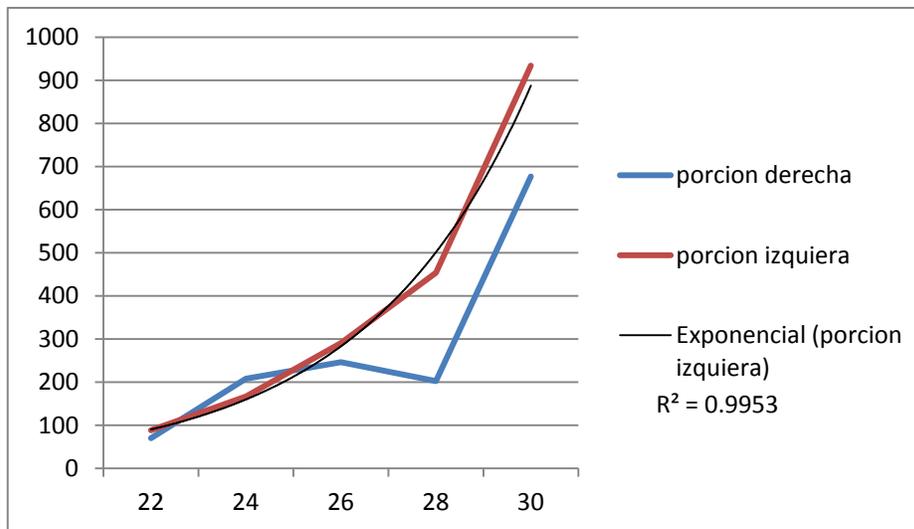
**Gráfica 2.** Numero de Núcleos Celulares del miocardio Conal

### 7.5.2 Patrón Espacio-Temporal de Cardiomiocitos

El Cono se dividió en porciones derecha e izquierda del plano sagital. Durante el periodo comprendido entre los estadios 22HH-28HH se encontró que el incremento en el número de cardiomiocitos es diferencial entre ambas porciones (Tabla 3). En la porción izquierda además del incremento mayor en el número total de células, hubo un aumento considerable del número de cardiomiocitos, presentando una curva de tipo exponencial. En la porción derecha no se aprecia un comportamiento regular que pueda ser definido por una grafica exponencial (Grafica 3).

**Tabla 3.** Cantidad de Núcleos Celulares en las Porciones Derecha e Izquierdas del Cono

	22HH	24HH	26HH	28HH	30HH
Porción derecha	69.9	208	246.3	202.3	677
Porción izquierda	88.5	166.6	290.66	453.6	934.3



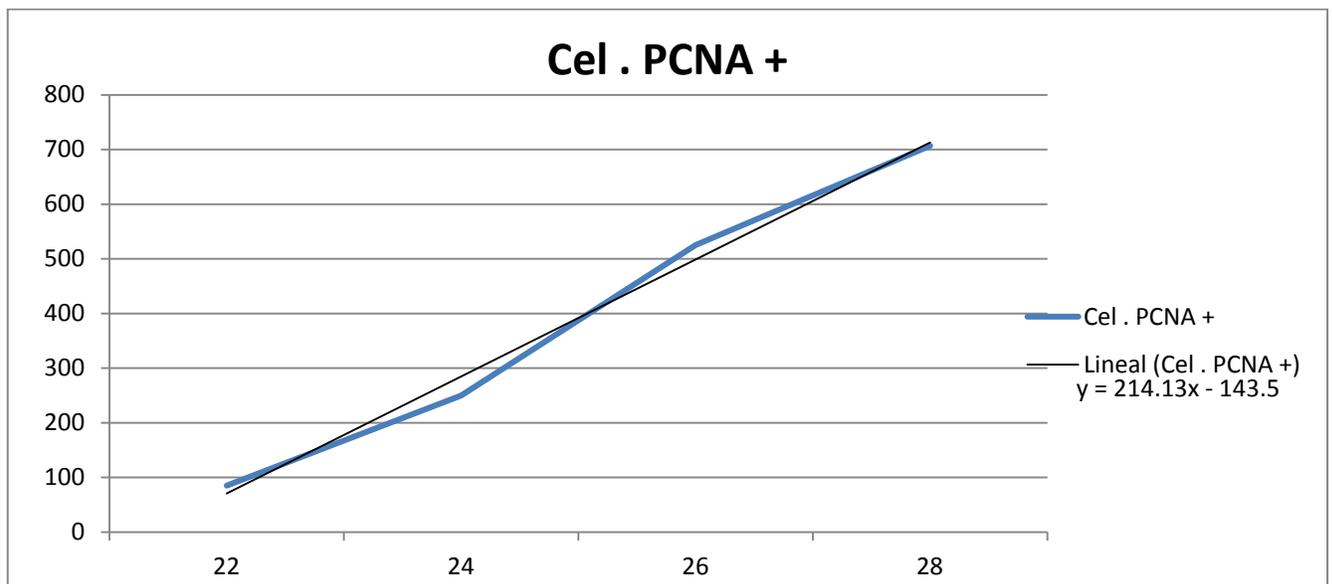
**Grafica 3.** Células Presentes en las Porciones Derecha e Izquierda del Cono

### 7.5.3 Análisis Temporal de Cardiomiocitos Cíclicos

El conteo del número de células positivas a PCNA dentro del miocardio Conal evidenció que dicho proceso se presenta de manera lineal durante la transformación del Cono en estructuras anatómicas del corazón maduro (Tabla 4, Grafica 4).

**Tabla 4.** Número de Células PCNA+

Estadio	22HH	24HH	26HH	28HH
Cel. PCNA +	85	250	525.3	707



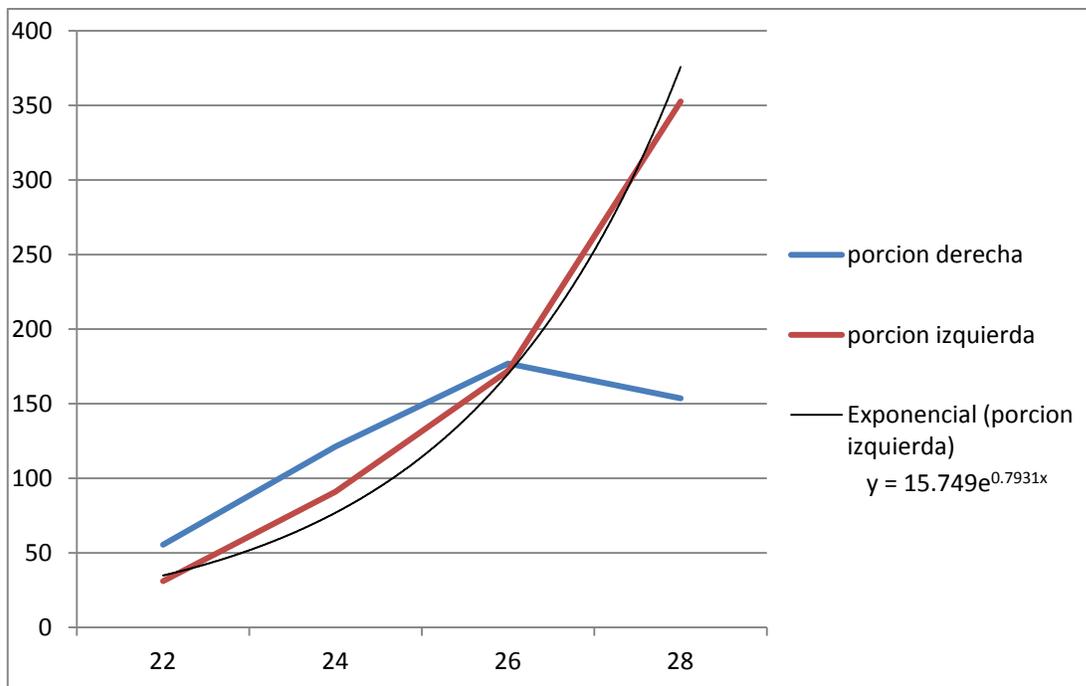
**Grafica 4.** Incremento del Número de Células PCNA+

### 7.5.4 Análisis espacio-temporal de cardiomiocitos cíclicos

Como se describió anteriormente, para este análisis el Cono se dividió en dos porciones (derecha e izquierda). Se encontró que la proliferación celular en el Cono se presenta de manera diferencial entre ambas porciones, solo la porción izquierda manifiesta un comportamiento exponencial (Tabla 5, Grafica 5).

**Tabla 5.** Número de células PCNA+ presentes en las porciones derechas e izquierda del Cono

	22HH	24HH	26HH	28HH
Porción derecha	55.5	121.33	177	153.6
Porción izquierda	31	91	172	352.6



**Grafica 5.** Comportamiento de la Presencia de Células PCNA+ La Porción Izquierda Presenta un Comportamiento Exponencial

## **VIII. Discusión**

No existe aún consenso sobre los componentes embrionarios que participan en la génesis de los tractos de salida ventriculares, válvulas ventrículo arteriales así como tronco de las grandes arterias. Tampoco hay acuerdo sobre los procesos morfogenéticos involucrados. Esto se debe en parte a que algunos investigadores no visualizan la diferencia existente entre los componentes del TSE, el cual está constituido por Cono, Tronco y se debe además considerar el saco aórtico; cada uno con un destino prospectivo distinto en el corazón maduro (Ilustración 3). Por lo tanto pensamos que no debería considerarse al TSE como una unidad embrionaria ni anatómica. Hacer generalizaciones sobre los eventos morfológicos o celulares ocurridos en dicha estructura sin una estricta distinción entre sus componentes, lleva a interpretaciones erróneas, como es mostrado en el presente estudio. En algunos casos la razón por la cual se le ha considerado al TSE como unidad es por la metodología empleada, ya que se han utilizado técnicas de transfección de genes por medio de vector viral a fin de marcar células de sus componentes, en dicha metodología no es posible marcar límites anatómicos precisos, por lo cual los resultados obtenidos incluirán a las tres estructuras embrionarias antes mencionadas. En contraste nuestro estudio hace una diferencia selectiva de las tres estructuras tanto por sus características histológicas como a través del marcaje de tejido. Dicha técnica, aunque relativamente sencilla ha probado durante más de 30 años ser una herramienta sumamente útil para delimitar regiones específicas del

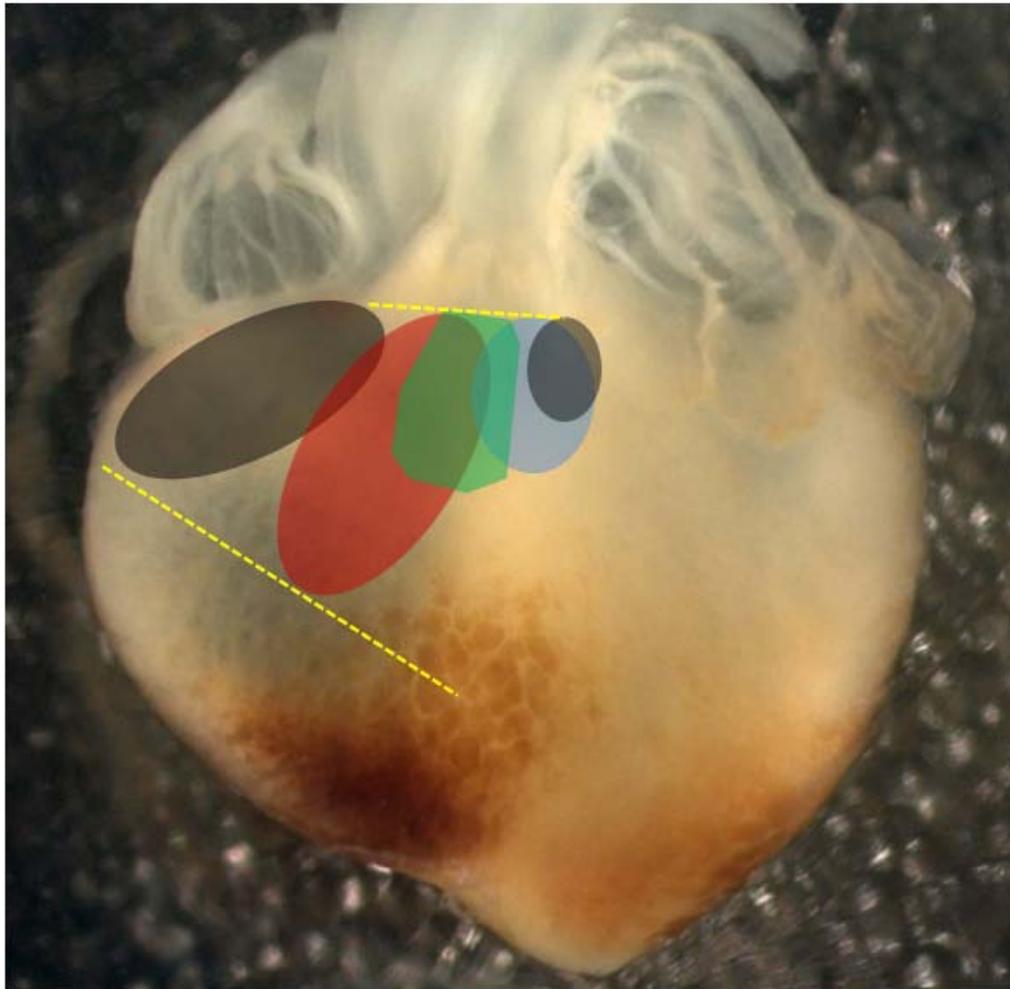
corazón embrionario y rastrear sus cambios hasta que manifiesta su destino en el corazón maduro, enriqueciendo así el conocimiento sobre la cardiogénesis.

### **8.1 Destino de las Paredes del Cono.**

Se ha descrito desde hace más de dos décadas un proceso de septación (división) del Cono en dos conductos, uno anterior que originará al tracto de salida del ventrículo derecho y otro posterior, el cual sin existir evidencia experimental que lo demuestre y solo basándose en la lógica, participaría junto con el cojín ventrosuperior del canal AV en la formación del tracto de salida del ventrículo izquierdo. Dichos conductos se afirma se forman al fusionarse las crestas del Cono (sinistroventral y dextrodorsal) en el centro de la luz conal y formar así los dos conductos mencionados. En otras palabras se describe al Cono como una estructura tubular dividida a su vez en dos tubos, los cuales se transforman cada uno de ellos en los tractos de salida ventriculares correspondientes (Ilustración 4). Dicha teoría implicaba a la apoptosis del Cono posterior así como en algún momento la formación de un canal que conectara al Cono posterior con el cojín ventrosuperior (Kramer, 1942; De Vries y Saunders, 1962; De la Cruz et al., 1977, 1992; Arteaga et al., 1982). Por el contrario en este estudio se delimitó al Cono y se marcó selectivamente cada una de sus paredes, siguiendo su desplazamiento a lo largo del tiempo desde el estadio 22HH hasta el 36HH. Al mismo tiempo se realizó un análisis cuidadoso de los cortes histológicos transversales de la región de interés. Así mismo se determinó el patrón espacio temporal de focos apoptóticos y proliferativos en el miocardio conal.

Esta estrategia nos permitió descubrir aspectos novedosos del desarrollo de los tractos de salida ventriculares.

Respecto al marcaje, descubrimos que todas las paredes conales participan en el desarrollo del TSVD y estructuras ventriculares muy relacionadas como la porción superior del borde agudo. Cabe resaltar que ninguna marca de la pared izquierda del Cono se encontró en el TSVI. Todas las marcas de las distintas paredes se desplazaron hasta ubicarse en las superficies laterales y ventrales del infundíbulo. De esta manera, el análisis cuidadoso del desplazamiento de las marcas de cada pared conal desde su posición inicial hasta la final permitió establecer el mapa de destino que se representa en la figura 5. Es importante resaltar que el cambio de dirección horizontal a diagonal de la línea formada por la marca del límite conoventricular indica la sumatoria del aporte de todas las paredes conales.



**Figura 5.** Mapa de destino de las paredes del Cono. Corazón en vista frontal estadio 36HH, mostrando esquemáticamente la sumatoria de los resultados del destino de cada pared conal. Se puede apreciar la superposición del aporte de las paredes conales representadas mediante los colores correspondientes como se indica en la ilustración 9. Note que las paredes dorsal e izquierda se redistribuyeron hacia una posición ventral.

## **8.2 Teoría del Cono Anterior y Cono Posterior vs Desplazamiento de las Paredes del Cono**

El hecho de que ninguna marca colocada en el perímetro conal no se encontró en el TSVI, niega la participación del Cono posterior en su desarrollo. Para corroborar esta idea así como el desplazamiento dorsoventral de las paredes conales se llevó a cabo un análisis morfohistológicos. En este caso descubrimos que la estructura del Cono inicialmente tubular (Ilustración 10), a nivel de su límite con el ventrículo modifica su forma pues a partir del estadio 24HH su pared dorsoizquierda comienza a perder continuidad (Figura 2B), sus paredes se “desdoblan” y se desplazan paulatinamente hacia la región ventral cardiaca hasta que en el estadio 32HH la pared miocárdica conal tiene una organización laminar (Figura 2D), proceso también relacionado con la rotación cardiaca. Esta interpretación es congruente con el desplazamiento de las marcas colocadas en la pared dorsal del corazón en estadio 22HH las cuales aunque en la mayoría de los casos se desplazaron en el sentido de las manecillas del reloj, algunas lo hicieron en el sentido opuesto (Figura 1D). Por lo menos en dos casos se encontraron rastros de una misma marca en la porción superior del borde agudo y la pared izquierda del TSVD.

La idea de la pérdida de continuidad y desdoblamiento de la pared conal nunca se ha mencionado en la literatura, a pesar de que diversos autores presentan imágenes que la demuestran. En general los autores ignoran este aspecto o hacen una interpretación equivocada (o no le dan la debida importancia). Nuestras fotografías de las figuras 2C y D de los cortes histológicos transversales, son similares a las presentadas por Qayyum y colaboradores (2001) (Ilustración 7). Ellos interpretan que

las crestas conales se forman en el centro del conducto y lo dividen en dos conos. En contraste nosotros observamos que las crestas conales no se proyectan como estructuras individuales, perfectamente bien delimitadas en la cavidad del Cono, en realidad aunque son más voluminosas en la región dorsal, el tejido mesenquimal está recubriendo internamente todo el perímetro del Cono lo que sin duda asegura su actividad valvular transitoria y de cierre momentáneo de la luz conal impidiendo el retorno sanguíneo como lo menciona Nomura-Kitabayashi y colaboradores (2009).

Los cortes histológicos transversales del corazón en estadio 26HH, 30HH y 32HH también muestran que conforme la pared dorsoizquierda del Cono pierden su continuidad y se desdobra, las crestas conales quedan estrechamente relacionadas con la comunicación interventricular y el canal AV (Figura 4C). De esta manera, el Cono y el canal AV, ambos inicialmente contra laterales y relativamente alejados (Figura 2A) más tarde son dorsoventrales y adyacentes (Figura 2C, D). Suponemos que este cambio de relación espacial es resultado del proceso de rotación cardiaca y el desplazamiento hacia la derecha del canal AV. Otro aspecto que se evidencia en los cortes histológicos es que las crestas conales al fusionarse no separan dos conductos (Cono anterior- Cono posterior) más bien forman la cresta supraventricular (Compare C con D en Fig. 4). Cabe resaltar que mediante marcaje in vivo De la Cruz y colaboradores (1998) llegaron a esta misma conclusión. Sin embargo, ella sostiene que las crestas están posicionadas y se fusionan en el centro del Cono separándolo en dos conductos y deja pendiente de explicar el destino del Cono posterior.

Nuestras aseveraciones sobre la rotación y desdoblamiento de las paredes conales y su concomitante transformación en una estructura prácticamente laminar son

soportadas no solo por los resultados del presente trabajo, también reportes de diversos autores con abordajes distintos las sustentan. Por ejemplo Bajolle y colaboradores (2006) describen en el embrión de ratón, la rotación de la pared de miocardio del TSE, antes y durante la formación de las grandes arterias, es un proceso esencial para la correcta alineación de las grandes arterias. Su metodología implicó el marcaje por transfección de subpoblaciones miocárdicas. Otro ejemplo es el trabajo de Arteaga y colaboradores (1982) quienes producen experimentalmente doble salida del ventrículo derecho (DSVD) anudando un “filamento” en el Cono en estadio 22HH en embrión de pollo y reportan la producción de dos tipos DSVD, una con la arteria pulmonar y aorta “lado a lado” y otra pulmonar anterior y la aorta posterior. Con base en nuestros datos sobre el traslado de las paredes conales podemos sugerir que el desarrollo no fue el correcto por acción del “filamento” anudado que impidió el “desdoblamiento” de las paredes conales, evitando por lo tanto la debida ubicación del cojín ventrosuperior del canal AV. De tal manera que tanto la aorta como la arteria pulmonar emergen del tracto de salida del ventrículo derecho.

Respecto al significado del cojín ventrosuperior del canal AV en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares, por la relación que guarda con las estructuras adyacentes y sus características histológicas (Figura 2), pensamos en concordancia con De la Cruz y colaboradores (1982) y García-Peláez y Arteaga (1984) que participa de manera significativa en el desarrollo del TSVI. Estos autores mediante marcaje en vivo en el corazón de embrión de pollo demostraron que del cojín

ventrosuperior del canal AV participa en el desarrollo de la porción libre de la valva anteroseptal de la mitral que forma la continuidad fibrosa mitro-aortica y la pared septal del tracto de salida, ambos componentes del tracto de salida del VI (Ilustración 8). Este hallazgo ha sido ignorado por la mayoría de los investigadores interesados en el tema. Suponemos que esto se debe a que los autores interpretaron sus resultados con base en la existencia de un Cono anterior y otro posterior sin dar argumentos precisos sobre el destino del Cono posterior. También les faltó marcar selectivamente la pared izquierda del Cono haciendo un análisis morfohistológico que les permitiera determinar el destino real del supuesto “Cono posterior”.

Estos hallazgos tienen un amplio significado para entender el desarrollo del tracto de salida del VI. Por un lado señalan al cojín ventrosuperior del canal AV como la estructura embrionaria única que participa en la formación del tracto de salida del VI. Por otro lado, evitan la necesidad de explicar la posible conexión de un hipotético “Cono posterior” con el cojín ventrosuperior del canal AV, por lo tanto desecha también la idea de procesos apoptóticos en esta área del corazón señalada por Schaefer y colaboradores (2004).

## **8.3 Significado de la Proliferación Celular y Apoptosis en el Desdoblamiento del Cono**

### **8.3.1 Acortamiento y Apoptosis**

Los resultados del análisis de la distancia entre las marcas colocadas para delimitar al Cono y rastreadas durante su transformación en estructuras anatómicas del corazón maduro, muestran que el Cono no sufre reducción en sus dimensiones céfalo-caudales (Grafica 1, Tabla 1). Esto niega que la apoptosis pudiera estar involucrada en una reducción del tamaño del Cono, como ha sido señalado (Watanabe et al., 1998; 2001). A pesar de esto, nuestras observaciones del patrón apoptótico en el corazón embrionario de pollo y cortes histológicos transversales apoyan su papel importante en procesos de remodelación. El grupo de Watanabe (2001) considera al Cono y Tronco como una unidad y describe su acortamiento por apoptosis, lo que lleva a una degeneración de la estructura embrionaria en una línea de escasos milímetros de altura, justo al nivel de la conexión ventrículo arterial derecha (Ilustración 9). Sin embargo los resultados de nuestro estudio sobre la morfometría y el análisis del patrón de apoptosis en todo el órgano, no concuerdan con la reducción/acortamiento del Cono. Al contrario por un lado muestran un aumento en sus dimensiones durante la cardiogénesis y evidencian que el proceso apoptótico preponderante ocurre por fuera del límite Cono-Tronco (Figura 3). Respecto del análisis apoptótico de los cortes transversales, que permite determinar en qué pared conal y tipo celular sucede la apoptosis. En el estadio 26HH se encontró un foco en la pared dorsoizquierda del Cono en la región cercana a su

límite con el ventrículo. Esto sugiere que la apoptosis puede estar involucrada en la pérdida de continuidad de la pared del Cono que se registró en el análisis histológico. En el estadio 30HH la apoptosis además de que se encontró abundante en el Tronco en su límite con el Cono, en éste último solo se registró sobre las paredes laterales (Figuras. 3, 4). Estos datos además de rechazar que la apoptosis está involucrada el acortamiento del Cono y/o Tronco, indican que en el Tronco su papel está relacionado con procesos de remodelación para el desarrollo de las válvulas sigmoideas. Respecto a su papel en el Cono suponemos que la apoptosis está involucrada en socavar zonas laterales del miocardio a la altura de la conexión del Cono con el ventrículo, facilitando que una estructura inicialmente tubular, una vez que sus paredes han perdido continuidad en la región dorsoizquierda, se transforme en una estructura laminar (Compare Figuras. 2 y 4).

### **8.3.2 Significado de la Proliferación del Miocardio**

La descripción del “desdoblamiento” de las paredes del Cono, pierde sentido sin realizar un análisis del patrón espacio temporal tanto de la proliferación como de la apoptosis de células miocárdicas, que sustente el desplazamiento visto a través del marcaje selectivo de tejidos. La proliferación celular durante el desarrollo del Cono ha sido poco explorada de la manera en que se aborda en este estudio. La mayoría de los trabajos se centran en factores de crecimiento implicados en el proceso proliferante, brincando desde una visión molecular, a una tisular, dejando de lado el significado a nivel celular. Se ha atribuido al proceso apoptótico un papel preponderante casi “único” en la remodelación de la estructura embrionaria en

cuestión. Nuestro estudio aporta datos sobre la incidencia de proliferación de manera diferencial entre las porciones derecha e izquierda del miocardio Conal que dan evidencias de un crecimiento diferencial. Sin embargo nuestros hallazgos en este aspecto no son del todo concordantes con los resultados del marcaje en vivo. Para lograr resultados concluyentes sobre el papel del crecimiento diferencial del miocardio en el desarrollo del tracto de salida del VD es necesario explorar la proliferación del miocardio por debajo del límite conoventricular, particularmente hacia las porciones laterales (borde agudo y borde obtuso del corazón), ya que ahí es donde se concentra abundante cantidad de células PCNA<sup>+</sup> durante estadios 34-36HH (datos no mostrados). La proliferación de células en este lugar podría dar como resultado el desplazamiento aparente del miocardio inicialmente conal, y su consecuente cambio de una estructura tubular a laminar, proceso en el que también debe estar involucrada la apoptosis como se acaba de mencionar.

Los hallazgos presentados en este trabajo además de aportar una nueva información sobre el destino del Cono y los procesos por los cuales se transforma en las estructuras anatómicas correspondientes del corazón maduro niegan la existencia del Cono posterior. Todo esto plantea una nueva concepción sobre el desarrollo normal de los tracto de salida del ventrículo derecho.

## **IX. Conclusiones**

Las distintas paredes del Cono participan en la génesis de estructuras anatómicas del ventrículo derecho.

Ninguna pared conal interviene en la formación del tracto de salida del ventrículo izquierdo.

La pérdida de continuidad de la pared dorsal del Cono que inicialmente recubre a las crestas conales y su patrón de rotación niega la existencia del Cono posterior.

Los resultados de los estudios morfométricos así como de células apoptóticas del miocardio (órgano completo y cortes seriados), indican que el Cono no sufre acortamiento por apoptosis.

La apoptosis en el Cono, cojines del canal atrioventricular y epicardio del corazón embrionario participa en “finas” remodelaciones para dar origen al corazón maduro normal.

El patrón espacio temporal de cardiomiocitos en proliferación se da de manera diferencial que junto con la apoptosis conal podría estar involucrado en el aparente desdoblamiento de las paredes del Cono.

## **X. Anexos**

### **10.1 Inclusión en Paraplasto**

Los especímenes fueron deshidratados en series graduales de alcoholes desde 30% hasta 100% por 30 minutos c/u, paso seguido los tejidos fueron aclarados con aceite de cedro/alcohol absoluto (50:50) por 24 horas, posteriormente se pasaron a aceite de cedro puro por 2 horas. A fin de extraer el aceite de cedro los corazones fueron tratados con cloroformo/aceite de cedro (50:50); cloroformo 100% por 30 minutos c/u. Después los tejidos fueron colocados en moldes de inclusión y embebidos en paraplasto/cloroformo (50:50) a 60°C mediante una estufa para histología Ríos Rocha ECML por 30 minutos, se realizaron 3 cambios de paraplasto durante un periodo total de 24 horas. Posteriormente los corazones fueron orientados para cortes histológicos en el eje transversal. Se realizaron cortes seriados de 6 micrómetros de espesor mediante micrótopo Microm® modelo HM315, se estiraron sobre baño de flotación a 50°C y se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina rotulados con número de registro.

## **10.2 Tinción Hematoxilina-Eosina**

- a) Des-parafinado. Los tejidos se colocaron en estufa para histología antes descrita a 60°C por 3 horas, a fin de eliminar el exceso de paraplasto. Una vez transcurrido el tiempo, los tejidos fueron sumergidos en 3 cambios de Xilol por 5 minutos c/u.
- b) Hidratación. Los tejidos fueron sumergidos en series graduales de alcohol por 5 minutos desde 100 hasta 30% y finalmente en agua bidestilada.
- c) Tinción Hematoxilina. Los tejidos fueron bañados por 3 minutos con Hematoxilina de Harris, el exceso de colorante fue lavado con agua destilada por 3 minutos. Se pasaron en un cambio rápido en solución de alcohol al 70°C con 5 gotas de HCL, después con agua:amoníaco (1:1000) por 3 minutos.
- d) Tinción Eosina. A fin de contrastar el núcleo celular los tejidos fueron sumergidos por 1 minuto en Eosina. Posteriormente los cortes fueron deshidratados rápidamente con de alcohol al 96% y dos más de alcohol 100%.
- e) Montaje. Los tejidos se pasan por Xilol e inmediatamente fueron montados en resina Entellan New®.

### **10.3 Marcas Tinta China-Carbón/Gelatina; Oxido de Hierro/Gelatina**

#### Marcas negras

Se mezclan 10 gotas de tinta china en un tubo eppendorf con 1ml de gelatina al 5%, se pone el tubo en “baño María” a 60°C y se agita en vortex por 3 min.

Se adiciona 0.17g de carbón agitando por otros 3 min hasta homogenizar la mezcla

#### Marcas rojas

Se mezcla el oxido de hierro en 1 ml de gelatina al 5% hasta el punto de saturación siguiendo los mismo pasos de agitación.

#### Filamentos

Se utilizaron dos varillas de vidrio que fueron calentadas con mechero de gas en uno de sus extremos, una vez al rojo vivo se acercan los extremos y se realiza la separación de las varillas de manera súbita. Se colectaron los filamentos producidos los cuales son sumergidos en las mezclas de tinta china-carbón/gelatina; oxido de hierro/gelatina. Se dejan secar y se almacenan a 4 °C en cajas de petri, hasta ser utilizadas.

## 10.4. Soluciones

### 10.4.1 Formalina Neutra.

Formaldehido	3.5 ml
PBS	100ml

### 10.4.2 Solución Amortiguadora de Fosfatos PBS

Cloruro de Sodio	8.0g
Cloruro de potasio	0.2g
Fosfato de Sodio monobásico	1.44g
Fosfato de Potasio	0.24g
Agua destilada	1.0 l

### 10.4.3 Solución Ringer

Cloruro de Sodio	6.66g
Cloruro de Potasio	0.41g
Cloruro de Calcio	0.24g

## XI. Bibliografía

- Akimoto N. 1979. The study on the septation of the truncus arteriosus and conus cordis. *Hiroshima M J* 27:103-129.
- Anderson R. y Beaker A. 1982. Atlas fotográfico de anatomía cardiaca. Doyma S.A. Barcelona.
- Arteaga M, Maitre Azcárate MJ, García-Peláez I, González de la Vega C y Quero-Jiménez M. Anatomía y fisiología normal del corazón: En: *CARDIOLOGÍA PEDIÁTRICA*, editado por Julio Ardura Fernández. Ediciones CEA, S.A. (Grupo Jarpyo). Madrid, España, 1987. Pp. 1-39.
- Arteaga M y García-Peláez I. 1989. Nomenclature in the embryonic heart. En: *Correlations Between Experimental Cardiac Embryology and Teratology and Congenital Cardiac Defects*. Aránega A y Pexieder T (editores). Universidad de Granada. Granada, España.
- Arteaga M, De la Cruz M, Sánchez C, Díaz G. 1982. Double Outlet Right Ventricle: Experimental Morphogenesis in the Chick Embryo Heart. *Ped Cardiol* 3:219-227.
- Bajolle F, Zaffran S, Kelly R, Hadchouel J, Bonnet D, Brown N, Buckingham E. 2006. Rotation of the Myocardial Wall of the Outflow Track Is Implicated in the Normal Position of the Great Arteries. *Circ Res*. 98:421-428.
- Castro-Quezada A, Nadal Ginard B, De la Cruz MV. 1972. Experimental study of the formation of the bulbo-ventricular loop in the chick. *J Embryol Exp Morphol*. 27:623- 637.
- Cheng G, Wessels A, Gourdie R, Thompson R. 2002. Spatiotemporal and tissue specific distribution of apoptosis in the developing chick heart. *Dev Dyn* 223:119-133.
- Davis C. 1927. Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Carnegie Contrib Embryol* 19:245-84.
- De la Cruz M, 1998. Embryological development of the outlet of each ventricle. In: De la Cruz M and Markwald R, eds. *Living Morphogenesis of the Heart*. Birkhauser. Boston.
- De la Cruz M, Quero-Jiménez M, Arteaga M, Cayré R. 1982. Morphogénese du septum interventriculaire. *Coeur* 13:443-8.
- De la Cruz M, Sánchez-Gomez C, 1998. Straight tube Heart. Primitive cardiac cavities vs. primitive cardiac segment. In: De la Cruz M y Markwald R, eds. *Living Morphogenesis of the heart*. Birkhauser. Boston. pp: 85-98.
- De la Cruz M, Sánchez-Gómez C, Arteaga M, Arguello C. 1977. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J Anat* 123:651-86.

De la Cruz M, Sánchez-Gómez C, Cayré R. 1991. The developmental components of the ventricles: their significance in congenital cardiac malformations. *Cardiol Young* 1:123-8.

De la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Palomino MA. 1989. The primitive cardiac regions in the straight tube heart (stage 9-) and their anatomical expressions in the mature heart: an experimental study in the chick embryo. *J Anat*; 165:121-131.

De la Cruz, Carré R, Arista-Salado O, Sadowinski S, Serrano A. 1992. The infundibular interrelationships and ventriculoarterial connection in double right ventricle. Clinical and surgical implications.

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

Ernst M. 1926. Über Untergang von Zellen während der normalen Entwicklung bei Wirbeltieren. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.*, 79:228-262.

Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams J, et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* 2008;15:1113-1123.

García-Peláez I y Arteaga M. 1993. Experimental study of the development of the truncus arteriosus of the chick embryo heart. *Anat Rec*; 237:378-384.

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

García-Peláez I y Arteaga M. 2007. Estudio experimental del desarrollo del truncus arteriosus del Corazón de embrión de pollo. *Arch Mex Anat* 2007 (2):21-30.

Garrido C, Kroemer G. 2004. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol*; 16:639-646.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493-501.

Hall P, Levison D, Woods, Yu C, Kellock D, Watkins J. 1990. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162:285-94.

Ham A. 1967. *Tratado de Histología*. Interamericana S.A. México.

Hamburger B, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.

Hughes A. 1948. The histogenesis of arteries in the chick embryo. *J Anat.* 77:266-287.

Kerr J, Wyllie A, Currie A. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.

Kirby ML, Gales TF, Stewart DE. 1983. Neural crest cells contributions to the aortic-pulmonary septation. *Science* 220: 1059-1061.

Kramer T. 1942. The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the interventricular septum in the human heart. *Am J Anat* 71:343-370.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kraisler C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J. 2009. *Biología Celular y Molecular*. Panamericana. Buenos Aires.

Menkes B, Alexandru C, Pavkov A, Mircova O. 1965. Researches on the formation and the elastic structure of the aortopulmonary septum in the chick embryo. *Rev. Roum. Embryol. Cytol.* 2:79-91.

Menkes B, Sandor S, Illies A. 1970. Cell death in teratogenesis. *Adv. Teratol.* 4:170-215.

Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR. 2001. The outflow of the heart is recruited from a novel heart forming field. *Dev Biol.*238:97–109.

Nomura-Kitabayashi A, Phoon C, Kishigami S, Rosenthal J, Yamauchi Y, Abe K, Yamamura K, Samtani R, Lo C. 2009. Outflow tract cushions perform a critical valve-like function in the early embryonic heart requiring BMPRIA-mediated signaling in cardiac neural crest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1617-H1628.

Okamoto N, Satow Y. 1975. Cell death in bulbar cushion of normal and abnormal developing heart. In: Lieberman M, Sano T, eds. *Development and Physiological Correlates of Cardiac Muscle*. Raven Press, New York, pp 51-65.

Okamoto N. 1980. *Congenital Anomalies of the Heart – embryologic, Morphologic, and Experimental teratology* Igaku-Shoin, Tokyo, New York.

Pexieder T. 1972. The tissue dynamics of heart morphogenesis. 1. The phenomena of the death. A. Identification and Morphology. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 137:270-284.

Pexieder T. 1972. The tissue dynamics of heart morphogenesis. 1. The phenomena of the death. B. Topography. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 138:241-253.

Pexieder T. 1975. Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of the heart. *Adv. Anat. Embryol Cell Biol* 51:1-100.

Poelmann R, Mikawa T, Gittenberger-de Groot A. 1998. Neural crest cell in outflow tract septation of the embryonic chicken hearts: Differentiation and Apoptosis. *Dev Dyn*. 212, 373-384.

Qayyum S, Webb S, Anderson R, Verbeek F, Brown N, Richardson M. 2001. Septation and Valvar Formation in the Outflow Tract of the Embryonic chick heart.

Sánchez-Gómez C, Pliego L, Contreras A, Munguía M, Salazar M, García H, Gonzalez M. 2005. Histological Study of the Proximal and distal Segments of the Embryonic Outflow Tract and Great Arteries. *Anat Record part A* 283A:202-211.

Saunders J. 1966. Death in embryonic systems. *Science*, 154:604-612.

Schaefer K, Doughman Y, Fisher S, Watanabe M. 2004. Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn* 299:489-499.

Schmitz G, Walter T, Seibl R, Kessler C. 1991. Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem*. 192:222-231.

Seichert V. 1965. Study of the tissue and organ anlagen shift by the method of plastic linear marking. *Folia Morphol*. 13: 228-238.

Waldo KL, Hutson MR, Ward CC, Zdanowicz M, Stadt HA, Kumiski D, Abu-Issa R, Kirby ML. 2005. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. *Dev Biol*; 281:78–90.

Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Kirby ML. 2001. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 128:3179–88.

Watanabe M, Choudhry A, Berlan M, Singal A, Siwik E, Mohr S, Fisher S. 1998. Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development* 125, 3809-3820.

Watanabe M, Jafri A, Fisher S. 2001. Apoptosis Is Required for the Proper Formation of the Ventriculo-Arterial Connections. *Dev. Biol*. 240, 274-288.

Ya J, Van den Hoff M, De Boer P, Tesink-Taekema S, Franco D, Moorman A, Lamers W. 1998. Normal development of the outflow tract in the rat. *Circ Res* 82:464-472.