
Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina

**ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y
MORFOMÉTRICO CARDÍACO
EN EMBRIONES HUMANOS DEL
ESTADÍO 16 DE O'RAHILLY**

Tesis Doctoral

Dimitrios Gonzalo Marantos Gamarra

Madrid, Año 2000

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina

**ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y
MORFOMÉTRICO CARDÍACO
EN EMBRIONES HUMANOS DEL
ESTADÍO 16 DE O'RAHILLY**

Tesis Doctoral

Dimitrios Gonzalo Marantos Gamarra

Madrid, Año 2000

A mis Padres,
que lo han sacrificado todo por mí

A mi Familia, por su cariño
y en especial a mi Abuelo,
el Dr Gonzalo Gamarra Caller,
por haber empezado una tradición familiar
en esta tan hermosa Profesión

A ti, Susana,
porque mucho del tiempo
dedicado a esta Tesis te pertenece

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D Juan Jiménez Collado, Catedrático de Anatomía Humana y Director del Instituto de Embriología de la Universidad Complutense de Madrid, por el continuo e incondicional apoyo y por la confianza puesta en mi persona durante mis años como Estudiante de Licenciatura y Alumno Interno, durante todo el Doctorado y en especial durante la realización de este Trabajo de Investigación

Al Profesor D Luis Alfonso Arráez Aybar, Profesor Titular de Anatomía Humana, por toda su ayuda, por su estímulo inestimable, por su generosa cooperación y por haberme transmitido la pasión por la investigación en este campo tan interesante del Estudio de la Anatomía del Desarrollo del Corazón

A todos los Profesores del Departamento de Anatomía y Embriología Humana II, por haberme ayudado y guiado siempre durante mi formación

A Dña Ana María Álvarez Castrosín, Administrativa, por su dedicación altruista, por su eficacia y por la amistad que siempre me ha dispensado

A todo el Personal Laboral del Departamento de Anatomía y Embriología Humana II, por su callada e insustituible labor

A todos mis Amigos y en particular a los que se dedican a la Investigación, por haber compartido sus ideas y pensamientos conmigo



*Universidad Complutense
Facultad de Medicina
Madrid*

D.JOSE FRANCISCO RODRIGUEZ VAZQUEZ, DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS II DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que reunido el Consejo de Departamento de Ciencias Morfológicas II en fecha 8 de mayo de 2000, acordó por unanimidad que el trabajo de investigación presentado por D. DIMITRIOS GONZALO MARANTOS GAMARRA, titulado: "Análisis descriptivo y morfométrico cardíaco en embriones humanos del estadio 16 de O'Rahilly" y realizado bajo la dirección de los Profesores Juan Jiménez Collado y Luis A. Arraéz Aybar, reúne todas y cada una de las condiciones exigidas según RD 778/98 de fecha 30 de abril de 1998 para la colación del Grado de Doctor.

Dado en Madrid, a dieciseis de mayo de dos mil.

Fdo.: Prof. J.Fco. Rodríguez Vázquez





*Universidad Complutense
Facultad de Medicina
Madrid*

D. LUIS ALFONSO ARRAEZ AYBAR, PROFESOR TITULAR DE ESCUELA UNIVERSITARIA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS II DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que el Trabajo de Investigación, base de Tesis Doctoral titulado: "Análisis descriptivo y morfométrico cardiaco en embriones humanos del estadio 16 de O'Rahilly", ha sido realizado por D. DIMITRIOS GONZALO MARANTOS GAMARRA bajo nuestra Dirección, considerando quien suscribe que reúne todas y cada una de las condiciones exigidas según RD 778/98 de fecha 30 de abril de 1998 para optar a colación del Grado de Doctor.

Dado en Madrid, a dieciseis de mayo de dos mil:

Fdo: Prof. Luis Alfonso Arráez Aybar

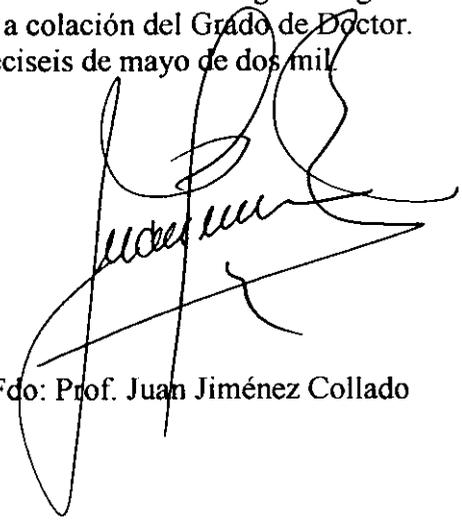


*Universidad Complutense
Facultad de Medicina
Madrid*

D.JUAN JIMENEZ COLLADO, CATEDRATICO NUMERARIO DE ANATOMIA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que el Trabajo de Investigación, base de Tesis Doctoral titulado: "Análisis descriptivo y morfométrico cardiaco en embriones humanos del estadio 16 de O'Rahilly", ha sido realizado por D. DIMITRIOS GONZALO MARANTOS GAMARRA bajo nuestra Dirección, considerando quien suscribe que reúne todas y cada una de las condiciones exigidas según RD 778/98 de fecha 30 de abril de 1998 para optar a colación del Grado de Doctor.

Dado en Madrid, a dieciseis de mayo de dos mil.



Fdo: Prof. Juan Jiménez Collado

ÍNDICE

	Página
• Introducción	1
• Embriología Descriptiva y Experimental. Sinopsis Histórica	4
• Aportaciones de la Biología Molecular	19
• Anatomía Cuantitativa	36
• Material y Métodos	40
• Preparación de los Embriones Humanos Estudiados	41
• Análisis Morfométrico: Metodología	43
• Morfometría Cardíaca: Cálculos Matemáticos	44
• Reconstrucción 3D: Metodología	45
• Resultados	47
• Estudio Morfológico y Descriptivo	48
• Estudio Cuantitativo	57
• Figuras	58
• Discusión	71
• Consideraciones Previas	72
• Morfología del Desarrollo Cardíaco	84
• Morfometría del Estadio 16	97
• Conclusiones	98
• Bibliografía	101

INTRODUCCIÓN

El corazón, órgano cuyo latir ha representado la “vida” y su silencio la “muerte”, es sin duda la estructura anatómica cuyo estudio más interés ha suscitado en cualquier campo de las Ciencias Médicas desde los albores de la humanidad y si bien el estudio de su Anatomía del Desarrollo ha sido realizado por numerosísimos autores, aún persisten algunas controversias en los eventos de su morfogénesis y una ausencia, casi total, de parámetros morfométricos en las fases iniciales de su desarrollo. En este trabajo de investigación, base de Tesis Doctoral y tras analizar una amplia bibliografía, nos proponemos establecer los parámetros morfodiferenciativos y morfométricos del corazón embrionario en el Estadio 16 de O'Rahilly.

La Biología Molecular nos enseña que las interacciones proteicas crean formas. Para García Bellido (1999), el problema de la Biología es el problema de la Forma, y por tanto la Embriología es la parte de la Biología encargada de estudiar los cambios de esas formas durante el cambio prenatal. No obstante, el objetivo final de la Embriología no es averiguar cómo la diferente lectura de la información genética nos lleva a la síntesis de una determinada proteína en el embrión, ni tampoco comprender los mecanismos que regulan con precisión exquisita el ritmo de localización de las mitosis en las diferentes regiones de un tejido en desarrollo, como tampoco analizar el mecanismo íntimo por el que determinadas fuerzas producen el plegamiento de una lámina celular, para formar un tubo o esfera. Su objetivo es, como señala Jiménez Collado (1981), mucho más complejo: el ser capaz de describir tan exactamente como sea posible, a todos los niveles considerados, cómo un órgano funcional surge a partir de una célula precursora. Para conseguirlo, es evidente que debemos de poseer toda la información mencionada anteriormente e incluso más.

El desarrollo de cualquier órgano representa la suma de una serie de interacciones y propiedades cambiantes de las células que van a constituirlo,

por ello, al analizar ese proceso debemos buscar las propiedades fundamentales de las células que van a regir su comportamiento para así llevarlas, paso a paso, a organizarse en una configuración funcional orgánica

Diversas son las capacidades que proporcionan a una célula embrionaria una serie de alternativas. división o no, cambios de forma -por actividad pseudopodial o contracciones en su superficie-, cambios en sus propiedades de adhesividad, histodiferenciación por síntesis de componentes estructurales o por acción de productos extracelulares Sólo a través o por medio de la especificación de un número finito de alternativas posibles para cada célula, en todos los momentos dados, se pueden conseguir organizaciones complejas y específicas Asumimos que la célula elige, entre las diversas alternativas opcionales, aquella que le viene impuesta por la información que obtiene de su genoma, por la estructura de la célula en ese preciso momento y por las influencias que el medio circundante ejerce sobre ella (Jiménez Collado, 1993) Visión de la organogénesis que reconoce la complejidad de los acontecimientos del desarrollo que implica

Todo este ciclo de interdependencias es el que debemos analizar y comprender antes de describir cómo se forma un órgano, es decir, antes de que podamos relacionar todos los procesos significativos que se han producido, así como los mecanismos reguladores que operan durante su desarrollo Para enfrentarse a esa gran complejidad, Grobstein (1962), sugiere la necesidad de recurrir al análisis de los mecanismos del desarrollo desde una perspectiva multidisciplinar

Embriología Descriptiva y Experimental. Sinopsis Histórica

El conocimiento de la Anatomía del Desarrollo Cardíaco ha sido realizada por numerosos autores dada su transcendencia clínica; no obstante, persisten discordancias en el proceso y en la cronología de los hechos (Anderson y Wilcox, 1993) Los defectos cardíacos congénitos tienen una frecuencia de 6 a 8 casos por 1000 nacimientos (Gillum, 1994, Bernstein, 1996). Si bien la causa se desconoce en la mayoría de los casos, se piensa que casi todos los defectos cardíacos congénitos dependen de múltiples factores genéticos y ambientales (Clark, 1986) cada uno de los cuales tiene un efecto menor, es decir, es de herencia multifactorial. Con mucha probabilidad, la patogénesis de muchos defectos congénitos cardíacos depende de alteraciones en la migración de células de la cresta neural, de la función hemodinámica, de la muerte celular y de la proliferación de la matriz extracelular (Clark, 1996)

Una de las primeras referencias bibliográficas la encontramos en Aristóteles, pero no es hasta el siglo XIII cuando el médico árabe Ibn An-Nafis realiza por primera vez una descripción sucinta y convincente de la circulación sanguínea menor, conocimiento que no se difunde en el mundo occidental de la época, donde reinan incuestionablemente los conocimientos de Galeno, -la existencia de un septo interventricular permeable con pequeños *poros* por donde la sangre pasaría del ventrículo derecho al izquierdo- Un siglo después, el médico español Miguel Servet, cuestiona las enseñanzas de Galeno, afirmando que el septo interventricular es impermeable en el corazón normal. Pero el “verdadero descubrimiento” de la circulación sanguínea acontece en el siglo XVII gracias a la obra del médico inglés William Harvey, “*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*” (1628), que señala el inicio del pensamiento médico moderno

En el aspecto embriológico, los trabajos de von Haller (1758), sintetizan el denominado, por Alcalá Santaella (1929), “periodo de la preexistencia de los gérmenes”, que se extiende entre el año 1600 hasta el año 1759, año en que Wolff, con su “Theoria Generationis”, echa por tierra la Teoría del Encajamiento de los Gérmenes, hasta entonces vigente

El anatomista alemán Wilhelm His (1831-1904), es el primer autor que estudia el embrión humano sistemáticamente y el primero que presenta, de forma ordenada, la división del corazón en los estadios jóvenes. Divide el tubo cardíaco primitivo en tres partes principales: bulbo, ventrículo y atrium. Sus estudios se realizan en disección de embriones y a partir de sus dibujos, construye unos modelos a gran aumento que, por estar realizados sin ningún método de reconstrucción, son inexactos y de escaso valor, siendo sólo aceptables en la configuración externa. No obstante, quien realmente inicia el estudio científico de la embriología cardíaca es Gustav Born, al publicar en 1883 su método de reconstrucción tridimensional en cera, el “Plattenmodelliermethode”, que lleva su nombre. Interpreta, que el incremento de la angulación de la vía del flujo, en el lugar donde el canal interventricular desemboca en el tracto de salida del ventrículo derecho, como consecuencia del levogiro del lado derecho del tubo cardíaco o espolón bulboventricular y que denomina Septo Interventricular Primario, tiene que ir disminuyendo en el curso del desarrollo.

Rose (1889), describe la configuración del Septum Spurium, así como la aparición del Septum Sinus Venosii.

Hochstetter (1891, 1906), señala que las almohadillas auriculoventriculares fusionadas forman la porción superior o posterior de la pars membranácea en aquella parte que separa al vestíbulo aórtico de la

aurícula derecha. Estas ideas sirven para el estudio que Tandler realiza en cuatro embriones humanos de 5, 2, 6, 5, 9 y 14 mm y que se recoge en el libro de Embriología que en 1912 publicaron Keibel y Mall. Ese mismo año Mall, al mismo tiempo que Tandler pero por separado, publica la reconstrucción del corazón de un embrión de 11 mm, estudiando la arquitectura muscular de los ventrículos.

En 1906 Keith publica "Malformations of the Bulbus Cordis", cuyos diagramas facilitan la comprensión de las ideas de los autores anteriores, así como la interpretación de las malformaciones cardíacas. De igual modo, difunde la idea de la reabsorción del espolón bulboventricular o septum interventricular primario de Born, siguiendo las ideas de éste y de His (1893). Elabora una teoría de base filogenética al pensar que el espolón es homologable a una punta existente en el corazón de los elasmobranquios, en el cual, aparentemente, éste obstruye prácticamente el flujo. Sus diagramas marcan la presencia y después la atrofia de la cresta bulboventricular que, derivada de la curvatura menor del bulbus y del ventrículo, crea la dificultad de paso de la sangre del ventrículo izquierdo a la aorta, concluyendo que en el ser humano, esta aleta debe de sufrir una reabsorción durante estadios fetales posteriores. Ideas, que en parte se crean buscando encuadrar el desarrollo del corazón humano con el de los selacios dentro de la Ley Biogenética de Haeckel (1866, 1874). Este concepto gana una amplia difusión durante décadas, hasta que Kramer (1942) y más recientemente, de Vries y Saunders (1962), demuestran, mediante cuidadosas reconstrucciones de corazones fetales humanos, que en el hombre, la angulación nunca impide el flujo y que en lugar de existir una reabsorción, lo que acontece es un crecimiento notorio del tejido alrededor de la aleta, lo que es responsable de la aparente disminución en el tamaño.

Por su parte, Frazer (1916) y Waterston (1918), realizan trabajos con material humano y aportan datos de interés, entre los que podemos destacar la participación del espolón bulboventricular en la morfogénesis cardíaca y la orientación de los orificios auriculoventriculares hacia cada cavidad ventricular homónima

En el estudio de la morfogénesis y posterior desarrollo del septum primum interatriarum del asa cardíaca era clásico admitir, no faltando quienes mantienen aún esa postura, que este septo surge como una cresta en forma de media luna en la porción dorsocefálica del atrio común, creciendo caudalmente hacia la luz del canalis atrioventricularis communis, donde se están organizando las almohadillas endocárdicas, lo que condiciona que la fusión de éstas establezca el septum intermedium de His. Entre los bordes cóncavo y libre del septum primum y las almohadillas dorsal y ventral del conducto auriculoventricular común, se delimita un espacio, el Foramen Subseptale descrito por Fischel (1935), que va disminuyendo progresivamente a medida que el septum primum crece en dirección caudal en la luz de la aurícula primitiva. Hacia la sexta semana del desarrollo, las almohadillas endocárdicas del conducto auriculoventricular común terminan por fusionarse, configurando el septum intermedium que, una vez constituido, es alcanzado por el borde libre del septum primum, desapareciendo a continuación el foramen subseptale.

En 1924, Davis describe un tejido de estirpe mesenquimal que, si bien pobre en células, invade el espacio mioendocárdico primitivamente acelular, amplio y fibrilar que denomina Gelatina Cardíaca, cuyo papel en la futura formación de septos y válvulas cardíacas tiene una importancia transcendental.

Los estudios de López Rodríguez (1951), sobre la tabicación de la aurícula primitiva, condicionan una nueva interpretación del concepto morfológico de la tabicación del atrio común al demostrar que ésta se lleva a cabo por la participación de una serie de estructuras diferentes: septum primum, septum secundum, valvas del seno venoso y rodete común de las venas pulmonares. Para este autor, el septum primum se forma a expensas de un crecimiento pasivo que se realiza de forma excéntrica y no por la dilatación progresiva de las ampollas auriculares favorecida por la corriente hemodinámica del tubo cardíaco, como se venía hasta entonces admitiendo.

Asami (1972), confirma que el borde del septum primum se engruesa por crecimiento endocárdico, dando lugar al cierre del ostium primum o foramen subseptale de Fischel, es decir, confirma la presencia en el septum primum de un fenómeno activo que colabora en la formación del tabique interauricular.

Más recientemente, Benítez (1974) y Benítez y col (1975), distinguen en la construcción del septum primum, dos porciones diferentes por su origen y estructura, siendo una engrosada y de estructura mesenquimal y la otra, fina o membranosa y de constitución mioepicárdica. La primera, formada a expensas de la gelatina de Davis, forma el borde libre del septum primum, mientras que la otra, se constituye por crecimiento excéntrico, instaurándose de forma pasiva, por dilatación progresiva de las ampollas auriculares en formación, utilizando, como punto de anclaje, la porción mesenquimal. Para estos autores, el primordio del septum primum es la gelatina de Davis, que persiste en la línea medio sagital del atrio común, dispuesta a manera de arco o herradura y cuyos cuernos o pilares se continúan con la gelatina del canalis atrioventricularis communis, con la que forman un todo indivisible. La infiltración celular que afecta a este conjunto gelatinoso y que determina su

crecimiento activo, va ligeramente desfasada a nivel del septum primum, en relación con los procesos de crecimiento a nivel del canalis atrioventricularis communis, en el que se han esbozado las almohadillas endocárdicas. Por último, el anclaje del septum primum al material que esboza las almohadillas endocárdicas, es indispensable para que prosiga la tabicación auricular, al ser tomada esta área como punto de apoyo para la construcción pasiva, a la vez que para el crecimiento excéntrico de la porción membranosa del septum primum interatriorum, ante la progresiva dilatación de las ampollas auriculares ahora esbozadas.

Las publicaciones de Odgers (1934, 1938) y de Kramer (1942), proporcionan unos documentados trabajos sobre el desarrollo de la pars membranacea del septum interventricular y la participación del bulbo y tronco siendo los puntos claves de referencia de todos los trabajos posteriores.

Streeter, publica entre 1942 y 1951, una serie de trabajos donde sistematiza la morfología embriológica por medio de sus "Horizontes", tomando como base las descripciones de Davis (1927), sobre la morfogénesis del corazón humano en embriones humanos de hasta 20 somitos. Además, hace notar la diferencia, en el desarrollo del corazón embrionario, de las regiones trabeculadas y no trabeculadas e introduce en 1948, el concepto de Tubo Cardíaco Primario, considerando como tal a la porción situada entre la comunicación atrioventricular y los arcos arteriales y designando como Porción Venosa a la zona proximal a la comunicación atrioventricular, incluyendo en ella, como es lógico, a las aurículas.

El Tubo Cardíaco Primario es, en su forma más temprana, la parte no trabeculada del corazón fetal entre el orificio auriculoventricular y el tronco arterioso. No debe de ser confundido con Tubo Cardíaco Primitivo, un término

utilizado frecuentemente para el producto de la fusión de los primordios cardíacos bilaterales en los estadios más tempranos del crecimiento cardíaco. El concepto de Tubo Cardíaco Primario es muy útil para comprender el desarrollo de las vías del flujo en el corazón, ya que hace énfasis en la notable diferencia del potencial de crecimiento entre las varias regiones del corazón y focaliza la atención en aquellas áreas más sensibles a la tabicación.

A partir de la década de los cincuenta pasamos a una etapa en la que los investigadores del desarrollo cardíaco comienzan a enfocar el problema desde un punto de vista no estrictamente morfogenético, intentado compaginar los datos anatómicos con los procesos histológicos y dinámicos. La importancia del "tempo" de evolución de cada reducto tisular, según se va diferenciando, se pone de manifiesto en esa década por diversos autores (Streeter, 1942-1951; Grant, 1953; Doerr, 1955; Goerttler, 1956) relacionando, asimismo, este crecimiento diferencial con las modificaciones que adopta el tubo cardíaco.

En el aspecto genético existe, en las décadas centrales del siglo XX, una viva polémica entre los defensores de las teorías filogenéticas, es de señalar a Lev y Saphir (1945), -que continúan las expuestas por Spitzer (1929) y aceptadas por Kramer- y las que se inclinan por la mayor validez de las teorías ontogenéticas. Para Grant (1962), de Vries y Saunders (1962), Morris (1965), los imperativos filogenéticos han recibido mucha atención especulativa en el pasado, pero puesto que no se prestan a medición o experimentación y son por naturaleza fuerzas distantes, es improbable que no sean más que útiles para la inferencia.

Foxon (1954), señala que de los factores que rigen el desarrollo cardíaco, -filogénicos, ontogénicos y hemodinámicos-, el primero se

considera, tal vez, demasiado dogmáticamente, mientras que el último, como señala von Baer (1828), es normalmente subestimado. Para von Baer, corrientes de flujo sanguíneo en el corazón fetal, pueden ser responsables de la tabicación en espiral del tronco, llevando a una disposición trenzada de la aorta y de la arteria pulmonar

De Vries y Saunders (1962), recogiendo la sugerencia anterior y basándose en observaciones morfológicas de todo el material recogido en trabajos anteriores del Instituto Carnegie de Washington, elaboran una teoría según la cual, las crestas o rodets bulbotruncuales serían resultado de la corriente hemática impulsada por la contracción ventricular hacia la porción distal del tubo cardíaco y hacia la aorta primitiva. Estas estructuras están tapizadas por un material deformable y poco diferenciado, -de características similares a la gelatina de Davis-, que tiende a veces hacia la luz tubular y que resulta moldeado por las fuerzas cinéticas que le impone la específica dirección del flujo hemático. Con esta teoría, intentan resolver el problema de la morfogénesis del septum spiroideum, previa constitución de las dos bombas ventriculares o porciones trabeculadas, que trabajando en paralelo, provocan el moldeado de la porción reticular subendocárdica de la porción distal del bulbus cordis y la aparición de las dos crestas en espiral

En ese mismo año, Grant publica "The Embryology of Ventricular Flow Pathways in Man", con el deseo de demostrar que la investigación de la embriología cardíaca es un campo de investigación apropiado y poderoso para el investigador con orientación clínica. Estudia el desarrollo cardíaco desde una perspectiva clínica, dado que en esas fechas, todavía persisten muchos de sus aspectos oscuros y apenas hay alguna forma de cardiopatía congénita cuyo mecanismo de desarrollo se conozca con profundidad

Por otro lado, la embriología experimental también ha aportado importantes hallazgos que han sentado los cimientos de la Biología Molecular del Desarrollo en general y de la morfogénesis cardíaca en particular

Estudios experimentales realizados en embriones de pollo han permitido identificar, a nivel del blastocisto, regiones y áreas con capacidad cardioformadora, denominadas Áreas Cardiogénicas, éstas adquieren forma de herradura, localizadas a nivel de la extremidad cefálica del blastocisto y laterales a la línea primitiva, a la que abrazan a nivel de su extremidad craneal Para Rawles (1936), sin embargo, son ovoideas, siendo su posición central condensada

En Estadios previos a los de la línea primitiva, el material con potencia prospectiva cardioformadora se localiza a nivel del epiblasto, ocupando la posición media y posterolateral, posteriormente se invagina, con una secuencia constante y uniforme primero lo hacen las áreas preendocárdicas y preconales mioepicárdicas, le siguen las ventriculares, preatriales y presinusales, también mioepicárdicas, siendo las últimas las correspondientes al seno (Orts Llorca y Jiménez Collado, 1967, Orts Llorca y Jiménez Collado, 1969, Orts Llorca y Jiménez Collado, 1970, Orts Llorca y col., 1979) A su vez, las células mioepicárdicas invaginadas, lo hacen como una lámina compacta, mientras que las endocárdicas se disponen aisladas e independientes

Las áreas cardiogénicas poseen ya, en fases tan precoces del desarrollo, diferenciación química, siendo muy ricas en glucógeno, sin embargo, la diferenciación histológica ocurre más tardíamente, iniciándose con la diferenciación de los angioblastos endoteliales que originarán el endocardio El mesodermo esplácnico, a este nivel, se engruesa para formar miocardio y epimiocardio Entre estos dos, se interpone un espacio acelular relleno con

material de aspecto gelatinoso denominado por Davis (1924), "Gelatina Cardíaca", que más tarde será invadido por células procedentes del endocardio y del epimiocardio

Respecto a la Inducción Cardíaca, Ekman (1925), Bacon (1945), Nieuwkoop (1946, 1973), Mangold (1956), Chuang y Tseng (1957) y Jacobson (1959, 1961), en experiencias realizadas en anfibios, consideran que el inicio de la diferenciación es debido al efecto inductor que en la fase de gástrula tiene el entoblasto del intestino anterior, atribuyendo a la porción anterior de la placa neural un efecto inhibitor sobre la determinación cardíaca, efecto que incluso puede suprimir su formación Orts Llorca (1934), mediante extirpaciones de entoblasto situado en la región del mesoblasto precardiaco, afirma que éste es incapaz de autodiferenciarse, siendo su diferenciación dependiente de la inducción del entoblasto De Haan (1962), considera que la diferenciación regional del mesoblasto precardiaco depende de la capacidad de la hoja media, inducida por ento o epiblasto

En la actualidad, se acepta plenamente la acción inductora ejercida por el entoblasto en la determinación cardíaca, existiendo notables divergencias sobre el posible papel que el ectoblasto tiene en la diferenciación cardíaca, ya que, frente a la postura de de Haan (1962), está la mantenida por Spemann y Falkenberg (1919), Orts Llorca (1963, 1964), Orts Llorca y Jiménez Collado (1971) y Jiménez Collado y Puchades Orts (1977), para quienes el ectodermo no influye en la determinación ni en la diferenciación cardíacas

Respecto a la denominada Fase Plexiforme, el primer esbozo morfológico del corazón en el hombre está representado por un plexo endocárdico de cordones sólidos, que secundariamente se tunelizan y vienen a situarse, en el Estadio 9, junto a la cara ventral de la faringe (Orts Llorca,

1960, Orts Llorca, Jiménez Collado y Ruano Gil, 1960) Este plexo es irregular, existiendo entre él y el manto epimiocárdico un amplio espacio acelular de gelatina de Davis. Es interesante resaltar que en estos Estadios, el esbozo del corazón humano es de aspecto plexiforme, al contrario que en los demás animales, en los que el tubo cardíaco se constituye por unión de dos esbozos laterales que se fusionan en la línea media, por delante de la faringe. Orts Llorca (1960)

La porción craneal del plexo establece comunicación con los primeros arcos arteriales, mientras que la porción caudal, aún doble e independiente, todavía no lo ha realizado con las venas viteloumbilicales.

Al final de la fase plexiforme, el esbozo endocárdico adquiere la disposición de “tubo único de calibre irregular”, continuándose cranealmente con el saco aórtico y primeros arcos arteriales, mientras que caudalmente lo hace con las venas vitelinas y umbilicales. La continuidad, tanto craneal como caudal, entre plexo endocárdico o “tubo irregular” y formaciones vasculares sugiere la posibilidad de inicio de circulación en embriones humanos en este período. El tubo endocárdico, cubierto por el manto mioepicárdico, está ahora situado en la cavidad pericárdica y por un corto periodo de tiempo queda unido a su pared dorsal por el mesocardio dorsal. Para Streeter (1942), en el Estadio 10 (embriones de 10 somitos), el mesocardio dorsal se hace fenestrado y en el Estadio 11 (embriones de 16 somitos) llega a desaparecer por completo, dejando un pasaje, -seno transversal del pericardio-, que comunica uno y otro lado de la cavidad pericárdica, dorsal al corazón primitivo.

El tubo cardíaco primitivo atraviesa craneocaudalmente la cavidad pericárdica y después de la desaparición del mesocardio dorsal, permanece fijado a la cavidad pericárdica solamente por la entrada venosa o extremidad

caudal y por la salida arterial o craneal, a cuyo nivel el epicardio se continúa con el pericardio parietal. En efecto, la terminación dilatada de cada vena vitelina pasa, desde el saco vitelino, a través del septum transversum, para unirse con la extremidad caudal del tubo cardíaco primitivo. Cada dilatación está unida con la vena umbilical correspondiente, procedente de la placenta en desarrollo, formando el seno venoso primitivo, que posteriormente recibe la terminación de las venas cardinales comunes (conducto de Cuvier) del lado correspondiente. Cada vena cardinal común está formada por la unión de las venas cardinales anterior y posterior (o superior e inferior) correspondientes, que drenan sangre de las paredes embrionarias en desarrollo. El extremo craneal del tubo endocárdico se continúa ahora, en cada lado, con vasos plexiformes que se han diferenciado "in situ" del mesodermo del primer arco branquial correspondiente.

Estos vasos pasan dorsalmente alrededor de la faringe primitiva, uniéndose a la aorta dorsal ipsilateral diferenciada, también "in situ", en el mesodermo que se sitúa a los lados de la notocorda.

Por crecimiento diferencial se delimitan en el tubo cardíaco varias dilataciones separadas por canales o surcos. Desde el extremo caudal al craneal, estas dilataciones son, el seno venoso, la aurícula primitiva, el ventrículo primitivo y el bulbus cordis.

Una vez formado, el tubo cardíaco primitivo deja de ser recto, apareciendo una curvatura progresiva de convexidad derecha a nivel de la región del ventrículo, que determina la presencia en el lado izquierdo de un profundo surco, éste divide al asa cardíaca en dos partes: porción caudal, futuro ventrículo izquierdo, y porción craneal, de la que deriva el ventrículo derecho, bulbo o cono.

Sin embargo, puede decirse que el tubo cardíaco único no es recto en ningún momento de su desarrollo. En embriones de 10 somitos (Estadio 10), en los que sólo el bulbo y el ventrículo se han soldado, se aprecia una incurvación de convexidad derecha a nivel ventricular. Esta inflexión se acentúa rápidamente, de tal forma que en embriones de 16 a 19 somitos, sobrepasa ampliamente por la derecha el cuerpo embrionario. En Estadios más avanzados, el ventrículo crece en dirección caudal, sobrepasando a la aurícula, ya única, que va situándose dorsal y craneal al ventrículo, a la vez que la porción bulbar se desplaza hacia la derecha, por lo que el corazón adquiere forma de sigma (σ).

Estas incurvaciones son debidas a múltiples factores que, actuando conjunta o independientemente, condicionan que el asa cardíaca, en los embriones de vertebrados sea de convexidad derecha. A la hora de explicar el proceso de incurvación cardíaca existen muchas teorías, aunque ninguna de ellas es válida en su totalidad, así Patten (1964), explica que las curvaturas son consecuencia del crecimiento más rápido en longitud del tubo cardíaco que el de la cavidad pericárdica, Bremer (1932) o más tarde, de Vries y Saunders (1962), establecen la teoría hemodinámica, según la cual la dirección oblicua de la corriente sanguínea es la que condicionaría que el tubo cardíaco se incurvase, Sissman (1970), determina el índice mitótico en las distintas curvaturas y observa mayor número de mitosis en el lado convexo que en el cóncavo, pero al no encontrar patrones significativos en las distintas regiones del miocardio, considera que esta diferencia en el índice mitótico es la consecuencia y no la causa de la incurvación. Otro de los factores que se ha invocado como posible responsable de la incurvación, ha sido el diferente porcentaje de muerte celular regional, circunstancia que no se observa con frecuencia en el mesodermo cardíaco.

Orts Llorca (1970), mediante homoinjertos de tubo cardíaco en cavidad celómica de huésped, observa que el esbozo cardíaco injertado se incurva, si bien las incurvaciones aparecidas son anormales, hecho que no sucede si se añade, al material injertado, entoblasto faríngeo.

El seno venoso se abre por el orificio sinuatrialis en la aurícula derecha, de forma que al final del período somítico, el esbozo cardíaco es un solo tubo, excepto en la parte más caudal, en donde porciones del seno venoso permanecerán no fusionadas, como los cuernos derecho e izquierdo. Tres pares de venas proveen la vía final de retorno de la sangre a los cuernos correspondientes: las umbilicales, las vitelinas y las cardinales comunes. Inicialmente son simétricas, pero pronto se hace evidente una asimetría en las venas vitelinas, que forman un plexo a nivel del septum transversum. La sangre pasa de este plexo al conducto hepatocardiaco, originado del tronco vitelino derecho, mientras que el segmento equivalente del izquierdo comienza a regresar. En el Estadio 14 (embriones de 6-7 mm), la vena umbilical derecha regresa y desaparece, el cuerno izquierdo del seno venoso se reduce de tamaño, transformándose en el seno coronario. En esta nueva redistribución venosa se establece en el hígado un nuevo canal venoso, el conducto venoso o "shunt" entre la vena umbilical izquierda y el conducto hepatocardiaco, por lo que la sangre elude los sinusoides hepáticos, de tal forma que el cuerno derecho aumenta de tamaño. Consecuencia de todo ello es un cambio en la posición del orificio sinoauricular, hacia el lado derecho de la superficie dorsal de la aurícula y en la conversión de la original orientación transversal del orificio en vertical, proyectándose sus bordes dentro de la aurícula, constituyendo, de esta forma, las valvas sinusales venosas derecha e izquierda.

La aurícula, el ventrículo y el bulbo crecen ahora rápidamente y simultáneamente sufren cambios en su posición. La aurícula crece

transversalmente y se extiende lateral y ventralmente, apareciendo a ambos lados del bulbo. El surco bulboventricular reduce su profundidad y consecuentemente, la parte caudal del bulbo es absorbida por el ventrículo, con lo que gradualmente se va a la izquierda y aparece sobre la superficie ventral del corazón. El asa bulboventricular se sitúa por delante de la aurícula, de la que está separada por el surco auriculoventricular. Al continuar creciendo caudal y lateralmente los ventrículos, aumenta la separación entre éstos, formándose un surco entre ambos, el surco interventricular. El crecimiento de la aurícula y del ventrículo deja entre ellos una zona de menor crecimiento, por lo que aparece un surco cada vez más marcado, el surco auriculoventricular o surco coronario.

Domenech Mateu y Reig Villalonga (1980), estudian el papel que los arcos arteriales juegan en la morfogénesis cardíaca normal. En embriones de pollo del Estadio 20 de Hamilton Hamburger (1952), ligan los arcos arteriales constatando la producción de alteraciones de la tabicación interventricular, pars membranácea, por alteración de sus elementos formadores, -crestas bulboconales y cojinetes endocárdicos- y doble salida del ventrículo derecho al impedirse la migración normal del conus cordis.

Aportaciones de la Biología Molecular

Respecto a la Embriología Molecular, si bien es partir de 1980 cuando empiezan a establecerse los rudimientos del conocimiento de la base molecular del desarrollo inicial, fue a comienzos del siglo XX cuando los investigadores determinaron que las suspensiones de células de un mismo tipo tienen una fuerte tendencia a agregarse. Si se mezclan juntos diferentes tipos de células embrionarias, lo característico es que se organizan de acuerdo con el tipo de tejido del cual proceden. Sus patrones de ordenamiento incluso dan claves sobre sus propiedades y su comportamiento en el organismo maduro. Por ejemplo, si se mezclan células de ectodermo y mesodermo embrionarios, se reúnen en un agregado que tiene una capa superficial de células ectodérmicas que rodean a un agregado central de células mesodérmicas.

Las investigaciones actuales han comenzado a encontrar una base molecular para muchos de los fenómenos de agregación y ordenamiento celular descritos por los primeros embriólogos. Se han caracterizado varias familias de moléculas de adhesión celular (CAM), unas Ca^{++} dependientes y otras Ca^{++} independientes. Las CAM se han estudiado ampliamente en relación con los primeros sucesos del desarrollo. En embriones de aves en fase previa a la gastrulación, las células tanto del epiblasto como del hipoblasto contienen dos CAM (L-CAM o E-cadherina y N-CAM) en sus superficies. Se produce un cambio importante cuando las células del epiblasto migran por la estría primitiva, pierden la expresión de ambas CAM durante la fase migratoria, mientras que están comenzando a formar un mesodermo organizado. Más adelante, ciertos derivados de las células mesodérmicas vuelven a expresar las CAM. En general, cuando un tipo celular epitelial se transforma en una célula mesenquimatosa, se pierden sus CAM de superficie.

La expresión de las CAM es un excelente indicador de la inducción primaria en el embrión joven. Antes de la inducción, el epiblasto expresa tanto N-CAM como E-cadherina. Después de la inducción primaria del sistema nervioso, las células de la placa neural conservan la N-CAM pero pierden la expresión de la E-cadherina. Por el contrario, en el ectodermo no neural, se pierde la expresión de la N-CAM pero se conserva la de la L-CAM (Carlson, 2000).

Las principales familias de moléculas que hoy sabemos controlan muchos aspectos del desarrollo embrionario han sido agrupadas en cuatro categorías: I) Factores de Transcripción, II) Moléculas de Activación o de Señal, III) Moléculas Receptoras y IV) Moléculas de Transducción de las Señales.

I) Factores de Transcripción

Los Factores de Transcripción son proteínas que poseen dominios que se fijan al ADN de las regiones promotoras o intensificadoras de genes específicos. Pueden ser generales, cuando se encuentran en todas las células del organismo y específicas para ciertas células y etapas del desarrollo.

Por lo general, los factores de transcripción específicos son muy importantes en la iniciación de los patrones de expresión genética que redundan en cambios esenciales para el desarrollo, entre ellas podemos señalar las proteínas básicas *hélice-asa-hélice*, las proteínas *zinc finger* y las proteínas de *homeodomino*.

Los nucleótidos que codifican el homeodominio reciben el nombre colectivo de homeobox. Los genes *hox* constituyen los homólogos de los

complejos homeóticos de los vertebrados. Los genes *hox* del ratón y del hombre están organizados en cuatro complejos (*hox A*, *hox B*, *hox C* y *hox D*), generados posiblemente por duplicación y divergencia de un ancestro común. Dentro de cada complejo los genes están ordenados de modo que los genes homólogos ocupan las mismas posiciones dentro del complejo y se denominan “parálogos”. Los ratones y los seres humanos poseen al menos 38 genes homeobox homólogos, -en vertebrados se denominan genes *hox*- ubicados en cuatro regiones de cuatro cromosomas diferentes y organizados en 13 grupos parálogos (Scott, 1992, Duboule, 1994)

De manera similar a lo que ocurre en la *Drosophila*, la expresión de los genes *hox* se caracteriza por seguir un patrón caudocraneal y por mostrar límites segmentarios, de modo que, arrancando en el extremo caudal, cada gen muestra un límite anterior característico y que coincide con una frontera metamérica. Por alguna razón aún desconocida, la expresión de los genes dentro de cada complejo sigue un orden fijo (expresión colineal). La consecuencia de ello es que cada segmento contiene una combinación característica de genes *hox* que lo diferencia de los segmentos anterior y posterior. El ejemplo más claro surge de los estudios de expresión de los *hox* en el rombencéfalo y su coincidencia con los límites anatómicos de los rombómeros, estructuras de apariencia segmentaria, que aparecen de forma transitoria en el desarrollo temprano del rombencéfalo. De hecho, se puede demostrar que la expresión de los genes *hox* y de otros genes segmentarios (*krox 20*) es previa a la formación de los rombómeros (Bally-Cuif y Wassef, 1995)

La expresión metamérica de los genes *hox* se extiende a la cresta neural y a sus derivados (Kirby, 1988, Kirby y Waldo 1990). La cresta neural constituye una subpoblación celular de origen ectodérmico que se especifica

muy temprano en los pliegues neurales a lo largo de todo el tubo nervioso y que muestra una enorme potencialidad en cuanto a su capacidad de migración y generación de diversos tipos celulares que van desde las neuronas vegetativas y sensoriales del tronco y algunos ganglios craneales a la glía, al cartílago y al hueso del macizo craneofacial y a los melanocitos de la piel. La cresta neural participa, pues, del mismo código de expresión de genes *hox*, de modo que los arcos branquiales muestran límites precisos para la expresión de los diferentes genes *hox*, siguiendo el mismo patrón colineal del rombencéfalo.

Mediante el uso de técnicas de ingeniería genética se han llevado a cabo experimentos por los cuales se trataban de inducir mutaciones en los genes *hox*, con el propósito de indagar su posible función homeótica. Al parecer, las mutaciones nulas de algunos genes *hox* sugieren que esto es lo que ocurre cuando se pierde la especificación de los rombómeros afectados. El ácido retinoico es capaz de mimetizar algunos de estos cambios homeóticos y su efecto es paralelo a la alteración de los límites de expresión de los genes *hox*, que de forma característica, se hacen más anteriores. Dado que los genes *hox* contienen elementos de respuesta al ácido retinoico y que éste es capaz de inducir su expresión siguiendo un patrón colineal, se sospecha que el ácido retinoico, al que desde hace mucho tiempo se conoce como una molécula con profundos efectos sobre el desarrollo y la teratogénesis, podría desempeñar un papel en la secuencia normal de activación de los genes *hox* (Morriss-Kay, 1992).

Merece la pena mencionar aquí, aunque sea brevemente, que el principio de organización metamérica parece extenderse a lo largo de todo el cerebro, incluyendo las regiones más anteriores. Esta idea ha sido muy discutida hasta hace muy poco tiempo, debido en parte al desconocimiento de genes con dominios de expresión anterior y a la complejidad anatómica del

cerebro La elaboración de modelos morfológicos adecuados y la exploración de los dominios temporales y espaciales de expresión de una variedad de genes, entre ellos, genes de la familia *wnt*, *pax* y otros con dominios homeóticos (*dbx* y *otx*), ha permitido elaborar modelos en los cuales se puede identificar un principio de organización neuromérica extendida hasta el telencéfalo y en la que se han propuesto unidades metaméricas denominadas *prosómeros* (Bally-Cuif y Wassef, 1995)

II) Moléculas de Activación o de Señal

Las Moléculas de Activación o de Señal son mediadoras en la mayoría de las interacciones, como las inducciones, que se dan entre grupos de células en los embriones, muchas de las cuales son responsables de interacciones inductivas Las moléculas de señal interactúan con las células diana mediante la unión a receptores específicos de superficie o a receptores citoplásmicos Estos receptores representan los elementos iniciales de las complejas vías de transducción de señales, que convierten la señal en un suceso intracelular que provoca nuevos patrones de expresión genética en las células diana

Muchas de estas moléculas de activación son factores peptídicos de crecimiento Las importantes en el desarrollo embrionario pertenecen a varias grandes familias

1. Familia del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β)

Hay casi 30 factores en esta familia, que se pueden agrupar en subfamilias de isoformas más relacionadas entre sí A nivel unicelular, los múltiples y aparentemente complejos efectos producidos por los factores de esta familia se pueden resumir en tres tipos de actividad

- a) Efectos sobre el ciclo celular el *TGF-β* detiene el ciclo en el segmento tardío de la fase G_1 , efecto que al menos en parte se debe a la inducción de proteínas (p15 y p27) que inhiben la actividad de cinasas dependientes de ciclina (CDK-2 y CDK-4), cruciales para la transición de G_1 a S

- b) Efectos sobre la expresión de proteínas de matriz extracelular el *TGF-β* estimula la producción tanto de colágeno y fibronectina como de integrinas, y al mismo tiempo reduce la expresión de enzimas que degradan proteínas de matriz extracelular, el resultado global es un gran aumento de la matriz extracelular, lo que a su vez determina efectos secundarios sobre las células y los tejidos afectados

- c) Modulación de la expresión y actividad de otros factores de crecimiento y sus receptores el *TGF-β* puede inducir una mayor expresión del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y sus receptores, o la reducción de receptores para citocinas como interleucina I o factor estimulante de colonias (CSF-1), lo que se traduce en importantes efectos sobre la proliferación y diferenciación de las células correspondientes.

Massagué y col (1994), demuestran que la regulación transcripcional, inducida por factores de la familia *TGF-β*, está mediada por proteínas denominadas *Smad*. El *TGF-β* induce la fosforilación de estas proteínas en residuos serina específicos. Posteriormente, estas proteínas se translocan al núcleo, donde, en forma de homodímeros o heterodímeros, regulan la transcripción de genes específicos.

Diversos factores de esta familia regulan importantes y variados aspectos del Desarrollo -de insectos, anfibios, aves y mamíferos-, a saber, inducción mesodérmica, proliferación mioblástica o invasión de la gelatina

cardíaca por células endoteliales auriculoventriculares (Kingsley, 1994). El gen *nodal*, un miembro de esta familia, se expresa en todo el epiblasto antes de la gastrulación, pero su actividad se concentra en el nódulo primitivo durante ésta. Sus efectos se observan más en las regiones caudales que en las craneales del embrión. En el mutante que carece de gen *nodal* la estria primitiva no se forma y el embrión es deficiente en mesodermo.

La *activina* es una molécula de la familia *TGF- β* que muestra la capacidad de inducir experimentalmente tejido mesodérmico a partir del epiblasto. La *activina* muestra ventanas para inducir la expresión de genes mesodérmicos, es decir que los genes inducidos por *activina* lo hacen sólo en un espectro de concentraciones de *activina*. El tipo de mesodermo inducido por la *activina* depende de la concentración, de modo que

- las concentraciones altas de *activina* inducen el mesodermo dorsal (notocorda, músculo), mientras que,
- las concentraciones bajas inducen mesodermo con características laterales (mesénquima, sangre)

También es interesante el hecho que la *activina* es capaz de inducir actividad organizadora, de modo que el trasplante de células ectodérmicas tratadas con *activina* produce una duplicación axial (Mitrani y Shimon, 1990).

2. Familia Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (*FGF-b*)

De forma similar, éstos factores cumplen diversas funciones en la embriogénesis, como es la estimulación de la proliferación de las células mesenquimatosas, la estimulación del crecimiento de los capilares o la inducción de la elongación de la yema de las extremidades, pero es incapaz de inducir actividad organizadora o mesodermo axial (Wilkie, 1995).

3. Familia de Proteínas *Hedgehog*

Es una las más influyentes en el embrión joven y media las actividades de muchas zonas importantes de organización. Hasta la fecha, en mamíferos, se han descrito tres formas -*sonic*, *India* y *desert*- derivadas de tres genes diferentes. Las propiedades físicas y químicas de la proteína *sonic hedgehog* (*shh*) la hacen especial, experimentando autodivisión proteolítica. Después de unirse a una molécula receptora en la célula diana, la señal de la *sonic hedgehog* estimula la célula diana a producir nuevos productos génicos o a realizar nuevas vías de diferenciación (van den Heuvel e Ingham, 1996)

III) Moléculas Receptoras

Para que las moléculas intercelulares de señal ejerzan un efecto en las células diana, tienen que interactuar normalmente con los receptores de dichas células. La mayoría de estos receptores están localizados en la superficie celular, si bien algunos son intracelulares, -en especial los de las moléculas liposolubles como los esteroides, los retinoides y las hormonas tiroideas-. Los receptores de la superficie celular suelen ser proteínas transmembrana con dominios extracelulares, transmembranosos y citoplásmicos. El dominio suele ser una hormona, una citocina o un factor de crecimiento. Cuando el ligando se une al receptor, efectúa un cambio de conformación con el dominio citoplásmico de la molécula receptora.

Podemos clasificar los receptores de superficie celular en dos grandes grupos: a) los que tienen actividad intrínseca de proteín-cinasa, donde se incluyen la familia de los receptores para los *FGF-b*, -en los cuales el dominio citoplásmico posee actividad tirosín-cinasa-, y la superfamilia de los receptores para los *TFG-β*, -con actividad de serina / treonina cinasa para el dominio

citoplásmico- y b) aquéllos en que la actividad de proteínasasa está separada de la molécula misma del receptor

IV) Moléculas de Transducción de la Señal

La transducción de la señal es el proceso por el cual la señal enviada por el primer mensajero, -el factor de crecimiento u otra molécula de activación-, se expresa como una respuesta intracelular. La señal de transducción comienza cuando el primer mensajero se une a un receptor y cambia su conformación. Si el receptor no posee actividad intrínseca de las proteínasas, la unión del ligando al receptor estimula una reacción en cadena o en cascada, que conduce a la producción de un segundo mensajero, que activa las proteínasas citoplásmicas. Una cascada típica constaría de una serie de pasos por los cuales el receptor activado, actuando a través de *proteínas G*, -proteínas que ligan trifosfato de guanosina y difosfato de guanosina-, estimula un enzima efector, por ejemplo la adenilciclase, para convertir las moléculas precursoras en segundos mensajeros, -por ejemplo el monofosfato cíclico de adenosina y el trifosfato de inosina más diacilglicerol-. Este segundo mensajero activa las proteínasas citoplásmicas, que fosforilan las proteínas diana, ya sea activándolas o desactivándolas. Tras una serie de pasos adicionales, se modifica la transcripción del ADN. De esta manera la cascada de la transducción lleva una respuesta celular, que en el desarrollo embrionario podría ser la transformación de un tipo celular durante la diferenciación o la producción de un producto específico por parte de la célula diana.

Determinar que una región definida por su actividad o su destino en el desarrollo se halla bajo el dominio de expresión de un gen o grupo de genes y relacionarlos en un esquema de operación es quizás una de las aspiraciones de

la moderna biología del desarrollo De Robertis y col (1990), se preguntan qué caracteriza al *organizador* de Spemann desde un punto de vista molecular, y llevan a cabo una búsqueda de genes con homeodominio, en una genoteca de ADNc obtenida por microdissección de los labios dorsales del blastoporo del *Xenopus*. Este trabajo permite identificar un nuevo gen denominado *goosecoid* (*gsc*), que codifica un factor de transcripción y cuyo patrón de expresión temprano se superpone con el *organizador*. Además, *gsc* se expresa en las aves y los mamíferos en el nodo de Hensen, tal y como cabría esperar de un gen característico del *organizador*. El gen *gsc* se regula como la actividad organizadora, de modo que es inducido por la activina y por genes de la familia *wnt* pero no por *FGF-b*, y es inhibido por la radiación ultravioleta y por el ácido retinoico. La inyección de ARNm de *gsc* en células del blastocisto induce un centro de organización ectópico y un eje secundario. Mediante los marcadores moleculares y el examen estructural se puede mostrar, además, que la dosis de inyección de ARNm de *gsc* determina el tipo de mesodermo inducido. La expresión de *gsc* muestra al menos tres umbrales diferentes para especificar cuatro tipos distintos de mesodermo (notocorda, músculo, pronefros y sangre) y esto coincide con la distribución gradual de dorsal a ventral que la expresión de *gsc* muestra en el blastocisto. El gen *noggin* se coexpresa con *gsc* y es un factor soluble con actividad de inducción mesodérmica dorsal. Sería, pues, un excelente candidato para ser la señal posicional enviada como consecuencia de la especificación por *gsc*.

Durante la gastrulación, se forma la estría primitiva en el epiblasto del extremo caudal del embrión bilaminar. El hipoblasto determina el origen y la orientación de la estría primitiva. Las células que migran a través de la estría primitiva forman el mesodermo y el endodermo, convirtiéndose el epiblasto restante en ectodermo. La inducción mesodérmica sucede aún antes que la inducción neural. Los factores de crecimiento como el *Vgl* y la *activina* son

los agentes efectores de la inducción mesodérmica. Conforme pasan por la estría primitiva, las futuras células mesodérmicas del epiblasto cambian de morfología, dejan de ser células epiteliales del epiblasto para convertirse en células en botella y después en células de mesénquima. Las células del mesodermo extraembrionario forman el tallo corporal. La migración de las células mesenquimatosas durante la gastrulación se ve facilitada por las moléculas de la matriz extracelular como el ácido hialurónico y la fibronectina.

Se sabe que varios genes, expresados en el nódulo primitivo, controlan diversos sucesos iniciales del desarrollo, como la formación de la notocorda y de la estría primitiva y la formación del mesodermo. Algunos como el *Lim-1* controlan la organización de las estructuras craneales, en tanto que otros, como el *gen-T* controlan el desarrollo de las regiones caudales del cuerpo. La expresión del *gen-T* parece que es activada por los productos de los genes *HNF-3 β* ¹ y *Goosecoid*². Herrmann (1995), en estudios realizados en *mutantes T* (braquiuria), demuestra que la actividad del *gen-T* es necesaria para los desplazamientos normales, durante la gastrulación, de las futuras células mesodérmicas a través de la estría primitiva.

También se ha descubierto una base molecular para la asimetría morfológica del cuerpo. Mitrani y Shimon (1990), encuentran que la *activina*, un poderoso inductor del mesodermo en el sapo y un estimulador de la formación de la estría primitiva en el pollo, junto con un receptor para la activina, (*cAct-RIIa*) se expresan de manera asimétrica en el lado derecho de la estría primitiva y del nódulo de Hensen. Este hecho inhibe la expresión del *sonic hedgehog* (*Shh*) en el lado derecho. Si no hay actividad de *activina* en el

¹Requerido para la iniciación de la Notocorda.

²Su expresión ectópica causa la formación de un eje corporal secundario.

lado izquierdo, el (*Shh*) sigue expresándose en el lado izquierdo del nódulo de Hensen y estimula la expresión de un gen similar al *nodal* en la misma área. La proteína *nodal*, un factor de crecimiento, puede entonces estimular la proliferación asimétrica de las células del mesodermo en el lado izquierdo por medio de mecanismos aún desconocidos, lo que lleva al crecimiento asimétrico del tubo cardíaco y a que éste se doble y a una rotación asimétrica del cuerpo como un todo (Zhou, 1993)

La expresión asimétrica de ciertos genes, por ejemplo del *gen sonic hedgehog*, alrededor del nódulo de Hensen, dirige el desarrollo asimétrico normal de los órganos como el corazón, el hígado y el estómago (Johnson y Tabin, 1995)

Las primeras fases del desarrollo del sistema circulatorio consisten en la migración del futuro mesodermo del que se va a organizar el corazón, a través de la estría primitiva, para formar las áreas del mesodermo esplácnico precárdico. Las células de esta área expresan genes para dos grupos de factores de transcripción, el *Nkx-5* y la familia *MEF2*, que son importantes para el desarrollo inicial normal del corazón (Lin y col, 1997, Schott, 1998). Aquellas células que forman el corazón y en su migración pasan por la parte más craneal de la estría primitiva, a la postre contribuyen al tracto de salida del corazón, en tanto que las que pasan por la parte más caudal de la estría primitiva contribuyen al tracto de entrada (Carlson, 2000)

El primordio del corazón se observa por primera vez a los 18 días, Estadio 9, y comienza a latir a los 22-23 días (Tuchmann-Duplessis, 1970). En el área cardiogénica, las células mesenquimales esplácnicas, ventrales al celoma pericárdico, se agregan y se disponen juntas entre sí para formar dos bandas celulares longitudinales, los cordones angioblásticos, que se canalizan para

formar dos tubos cardíacos endoteliales de pared delgada. Para Lin y col (1997), el *gen murino MEF-2C*, que se expresa en células precursoras cardiogénicas antes de la formación de los tubos cardíacos, sería un regulador esencial en el desarrollo cardíaco temprano, si bien aún es necesario aclarar su función. Srivastava y col (1995), mediante estudios moleculares en embriones de ratón y de pollo, demuestran la presencia de dos genes *6HLH* (*hélice-asa-hélice*), *d-HAND* y *e-HAND*, en los dos tubos cardíacos primitivos y en las etapas tardías de la morfogénesis cardíaca.

Por su parte Bolender y Markwald (1991), con ayuda de un anticuerpo mononuclear específico para los precursores de las células endoteliales (*QHI*), han encontrado células reactivas cercanas a la superficie basal del endodermo inmediatamente ventrales al intestino anterior, por lo que consideran que esta área podría estabilizar el endotelio en desarrollo y favorecer la fusión de los tubos bilaterales, porción del endodermo que permanece en contacto con el endocardio durante algún tiempo a través del mesocardio dorsal.

A medida que ocurre el plegamiento embrionario lateral, estos tubos se aproximan entre sí y se fusionan, a lo largo de la línea media, para formar un sólo tubo cardíaco endotelial rodeado casi por completo por las futuras células miocárdicas que, a diferencia de las del endocardio, forman un epitelio continuo, a través de la línea media. La fusión de los tubos endocárdicos se inicia en el extremo craneal o arterial (tracto de salida) del corazón en desarrollo y se extiende caudalmente, extremo venoso, donde las futuras aurículas se encuentran al principio muy separadas entre sí.

En el embrión de 4 semanas, -Estadio 10-, la pared del corazón presenta entre el manto miocárdico y el endocardio un considerable espacio ocupado por la Matriz Extracelular Basal (MEB), -Membrana Basal

Miocárdica para Bolender y Markwald (1991), clásicamente denominada gelatina de Davis-, segregada por las células miocárdicas. La MEB, compuesta por ácido hialurónico, hialuronidasa y fibronectina entre otras sustancias, actúa como lugar de depósito de factores inductores procedentes de las células miocárdicas que pueden modificar la diferenciación de células endocárdicas específicas y facilita la oclusión de la luz tubular durante la contracción, lo que proporciona una ayuda mecánica a la generación del flujo sanguíneo.

En relación a su potencial de desarrollo el endocardio muestra diversidad regional, diferencias sutiles de su morfología, como la presencia o ausencia de fenestraciones o la magnitud de las uniones íntimas, apoyan el concepto de especificidad regional de los endotelios.

En respuesta a una acción inductiva, ejercida por el miocardio subyacente, algunas células procedentes de áreas circunscritas del endocardio pierden su carácter epitelial y se transforman en células mesenquimatosas. Las células endocárdicas contienen la molécula de adhesión celular *N-CAM* en sus superficies. Aquellas células que se transforman en mesénquima disminuyen la producción de la *N-CAM*. Al ser activadas por los factores inductores miocárdicos, las células endoteliales pierden sus relaciones intercelulares, reducen la expresión de *N-CAM* y aumentan la expresión de moléculas de adhesión al sustrato, como son el condroitín sulfato y la fibronectina, al tiempo que experimentan una reordenación del citoesqueleto que es necesaria para su migración, expresando además procolágeno I. Se supone que esto facilita su conversión en células móviles (Crossin y Hoffman, 1991).

Bolender y Markwald (1991), en estudios *in vivo* en aves, han demostrado que poco antes de la transformación de las células endocárdicas en mesénquima, aparecen en la gelatina cardíaca unas partículas de 20 a 50 nm de diámetro por debajo de estas células, pero no bajo otras áreas del endocardio. Estas partículas, denominadas *adheronas*, son producidas por las células miocárdicas subyacentes y tras su fraccionamiento y reaplicación a una monocapa endotelial dan lugar a la expresión de *N-CAM*. Las adheronas contienen un complejo molecular de proteoglicanos, fibronectina y varias proteínas de la MEB. Una de estas proteínas, la *ES-30*, también se expresa en otros tejidos -la notocorda, el ectodermo del tubo neural, la cresta ectodérmica apical- que son los únicos que pueden sustituir al miocardio e inducir la transformación del epitelio del endocardio en mesénquima. Estas partículas pueden inducir, *in vitro*, las células endoteliales auriculoventriculares a transformarse en mesénquima, por lo que la transformación estaría desencadenada por un reloj intrínseco. La inducción de la invasión de la gelatina cardíaca por las células del endotelio auriculoventricular también se acompaña de actividad del *TGF-β1* y *TGF-β3*. Si éste factor de crecimiento se inactiva, la transformación no se produce (Nakajima, 1998).

Las señales inductoras originadas en las células miocárdicas hacen que un subgrupo de las células endocárdicas que revisten el canal auriculoventricular y que el tracto de salida proximal se transforme en mesénquima, -mesénquima cardíaco-, mientras que las células endocárdicas de otras regiones, -aurículas y ventrículos-, conservan su carácter epitelial. Desde el punto de vista molecular, el corazón primitivo está segmentado (De Robertis y col., 1990, Olson y Srivastava, 1996). Los segmentos del endocardio que experimentan una transformación mesenquimatosa expresan el gen *Msx-1* mientras que las células endocárdicas de la aurícula y del ventrículo no lo hacen (Chan-Thomas, 1993). A la formación de células

mesenquimatosas cardíacas en el canal auriculoventricular y en el tracto de salida proximal sigue su migración hacia la membrana basal miocárdica. La acumulación de mesénquima y matriz en estas regiones produce protusiones, los cojinetes subendocárdicos, que se proyectan hacia el interior del tubo cardíaco y ayudan a la función valvular del canal auriculoventricular y del tracto de salida.

Cuando al final de la tercera semana se forma el tubo cardíaco, éste tiene una simetría bilateral. Pronto, experimenta un plegamiento característico hacia la derecha, por lo cual es la primera estructura asimétrica que aparece en el cuerpo del embrión.

Como señalamos en páginas anteriores, la caracterización de la base celular para la formación del asa cardíaca ha resultado muy difícil. Aunque se ha demostrado claramente que la formación del asa es una propiedad intrínseca del tubo cardíaco en desarrollo, para lograr este efecto se han postulado factores tan diversos como microtúbulos, haces de actina localizados asimétricamente, presión de la gelatina cardíaca de Davis y cambios individuales en la forma de las células miocárdicas.

La primera indicación a nivel molecular del desarrollo asimétrico del tubo cardíaco es el desplazamiento en la expresión del factor de transcripción *e-HAND* desde ambos lados hacia el lado caudal izquierdo del tubo cardíaco (Biben y Harvey, 1997). El *d-HAND* se expresa de forma predominante en el ventrículo derecho. Las moléculas *HAND* pueden desempeñar un papel en la interpretación de las señales moleculares asimétricas primitivas y en la expresión de esta información en las células, lo que da como resultado la formación del asa. Además de esta serie de procesos moleculares, ciertos genes cardíacos específicos también parecen intervenir en la formación inicial.

del asa del tubo cardíaco. Los bloqueos de tres tipos de factores de transcripción cardíacos (*Nkx-2*, *MEF-2* y las moléculas *HAND*) se caracterizan por la detención del desarrollo cardíaco en la etapa de formación del asa (Harvey, 1996). Anteriormente, indicamos cómo la expresión asimétrica de los genes *somc hedgehog*, alrededor del nódulo de Hensen dirige el desarrollo asimétrico normal de los órganos como el corazón, el hígado y el estómago (Johnson y Tabin, 1995)

Al comienzo del desarrollo cardíaco, la aurícula se separa inicialmente del ventrículo mediante la formación de unos cojinetes auriculoventriculares engrosados. La fusión definitiva del tejido de cojinetes opuestos a través de la luz del canal auriculoventricular forma una cuña de mesénquima que actúa como guía para la unión de los tabiques musculares internos. La posición de los cojinetes subendocárdicos corresponde a la futura posición del esqueleto fibroso del corazón y de las válvulas.

Las células mesenquimatosas transformadas secretan *proteasas*, que pueden destruir las *adheronas* inductivamente activas y restablecer la estabilidad morfogenética de las regiones de los cojinetes endocárdicos. Estos acontecimientos celulares y moleculares constituyen la base inicial de la formación de las principales válvulas cardíacas (Eisenberg y Markwald, 1995)

Anatomía Cuantitativa

En los últimos decenios han surgido nuevas perspectivas al aplicar regladamente métodos matemáticos y geométricos al estudio de la forma y de la estructura del cuerpo humano. Nos referimos a las concepciones de Frick (1969) y Scharf (1970), (cálculo alométrico) y las de Elias y Hyde (1983), (métodos estereológicos) que intentan abarcar, mediante la valoración estadística de mediciones, proporciones y cambios de las formas y estructuras dentro del organismo y obtener conclusiones de la representación cuantitativa de las estructuras parciales en las imágenes de corte.

La aplicación de la Bioestadística y el uso de la herramienta informática han desarrollado ese aspecto que Frick (1969), llama Anatomía Cuantitativa y que define como “la parte de la Anatomía que, mediante la ayuda de mediciones, generalmente las de procedimientos estadísticos o geométricoestadísticos, intenta obtener conocimientos sobre magnitudes y relaciones entre las distintas partes que componen el organismo y sobre la evolución de estas correlaciones durante la ontogénesis. Igualmente, intenta encontrar la correspondencia espacial de los distintos componentes a partir de su representación cuantitativa y reuniendo los resultados de los análisis métricos, sacar conclusiones sobre formas y procesos biológicos”. Este sentir ya es adelantado por Klatt (1921), cuando expresa que todo organismo sano es un conjunto compuesto de distintas partes armónicamente sintonizadas entre el tamaño o volumen del organismo y el de sus partes, regiones u órganos.

La base fundamental de la Anatomía Cuantitativa es la de considerar las formas y estructuras, no como elementos individuales, sino como entes relacionados armónicamente entre sí. Es decir, las formas humanas dependen absolutamente, para su comprensión, del resto de las partes que lo constituyen.

Por otro lado, la aplicación de las llamadas Nuevas Tecnologías en la descripción de las propiedades y características morfológicas, ha permitido conceptualizar una específica metodología, la Morfología Matemática, que define criterios por aplicación de imágenes transformadas para obtener una información cuantitativa (Serra, 1986) El análisis de las estructuras biológicas, en torno a esa poderosa y precisa herramienta que es el ordenador, debe contribuir a la sólida definición de una nueva Biología Estructural que quizás pueda hacer posible una formulación de la función, -en el sentido matemático-, que presida el desarrollo de las formas de un animal o quizás de todos ellos (Bolender, 1992)

Frente al elevado número de autores que han estudiado aspectos cualitativos del corazón en período prenatal, son escasos los que han realizado estudios cuantitativos, predominando entre ellos los realizados en período fetal Álvarez y col (1987), describen la configuración anatomogeométrica para cada ventrículo en la vida fetal y perinatal.

En la década de los años sesenta empieza a señalarse la ausencia de estudios cuantitativos en los trabajos de embriología Así Grant (1962), señala la carencia de estudios detallados sobre los cambios volumétricos del corazón durante el desarrollo De Haan (1965), es el primer autor en advertir que al presentar las estructuras cardíacas un crecimiento diferencial durante la morfogénesis, es necesaria una aproximación cuantitativa para analizar la forma y el tamaño de estas estructuras durante el proceso de crecimiento cardíaco. Laird y col (1965), confirman la insuficiencia de estudios cuantitativos en el período embrionario “ most efforts to develop a growth equation have been limited to the postnatal period”

Pexieder (1973), es uno de los primeros autores en introducir la aproximación cuantitativa en la investigación de la morfogénesis humana y Mandarim (1987), considera que los parámetros volumétricos son más precisos que los lineales para establecer el desarrollo cualitativo del corazón

¿Cuál es el interés en cuantificar el desarrollo cardíaco embrionario? Los resultados de un estudio morfométrico son un complemento necesario para el conocimiento cualitativo del desarrollo embrionario, en lo referente al corazón podemos ver una casi inexistencia de datos en la literatura especializada

Cuantificar, ¿ por qué? La respuesta nos la proporciona Thompson (1948) “ numerical precision is the very soul of science, and its attainment affords the best, perhaps the only criterion of the truth of theories and the correctness of experiments”

Cuantificar, ¿ cómo? Las bases teóricas y los métodos prácticos de la morfometría están ampliamente difundidos en la literatura (Weibel, 1979, Sokal y Rohlf, 1981, Elias y Hyde, 1983)

Los citólogos fueron los pioneros en detectar los cambios de morfología y tamaño en las células, tanto en casos de malignidad como en el de variaciones metabólicas. En su afán de ponderar la magnitud de esos cambios, no se conforman con la simple observación microscópica e introducen métodos específicos que les pueden proporcionar datos mensurables relacionados con la forma y tamaño de las estructuras observadas. Los parámetros valorables pueden ser múltiples y una vez obtenidos es posible transformarlos y valorarlos fácilmente merced a fórmulas matemáticas

Delesse (1848), introdujo las técnicas morfométricas clásicas mediante superposición de retículas de puntos y es en el Centro de Geoestadística de Fontainebleau donde surge el cuerpo doctrinal de la denominada Morfología Matemática (Serra, 1982). En las estimaciones morfométricas, se persiguen en general diversos objetivos, que pueden ir desde el simple conteo de elementos estructurales hasta la valoración del tamaño de los mismos, la medida del área o incluso su estimación volumétrica

La estereología es una técnica que permite obtener datos sobre un número de objetos identificables en una estructura tridimensional, muestreando en dos dimensiones, es decir, proporciona una técnica para contar objetos en un corte de la estructura, tal como un espécimen histológico es visto bajo el microscopio. Es por tanto una herramienta esencial para saber el número de unidades en cualquier sistema, sean unidades funcionales, como el glomérulo renal u organelas de la célula como la mitocondria (Howard y Reed, 1998). Actualmente, los sistemas de análisis de imagen por ordenador que utilizan una videocámara, una tableta digitalizadora y un software de análisis de imagen son un método preciso y eficaz para estimar parámetros estereológicos en cortes histológicos seriados (Hyde y col, 1992, Salisbury y Whimster, 1993)

La importancia de la morfometría en el estudio anatómico actual es indiscutible y puede ser avalada con las palabras de Loud y Anversa (1984) "The fundamentals of morphometry are worthy for their simplicity. Starting from a collection of representative two-dimensional samples, such as tissue sections, and a superimposed grid of test points and line segments, one can determine the three-dimensional volume, surface area, and number and length of recognizable components just by the process of counting".

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los Embriones Humanos Estudiados

Para la realización de este Trabajo de Investigación, base de Tesis Doctoral, hemos utilizado 10 embriones humanos procedentes de embarazos ectópicos e histerectomías, pertenecientes a la Colección del Instituto de Embriología de la Universidad Complutense dirigido por el Profesor Jiménez Collado

Nuestra colección de embriones está clasificada según criterio de orden creciente de longitud vértex-cóccix. Por ello, la primera etapa de este estudio consiste en la selección y clasificación de los embriones según el sistema de Estadios acorde a los criterios establecidos por el Instituto Carnegie. Dichos criterios para el Estadio 16 pueden apreciarse en la Tabla I.

Tabla I Características morfológicas del Estadio 16

Características Externas	Características Internas
<ul style="list-style-type: none">• Pigmento retiniano visible• Montículos auriculares en desarrollo• Los sacos nasales se oponen ventralmente• Desarrollo de las láminas de los pies.	<ul style="list-style-type: none">• Se desarrolla la epísis cerebral• Evaginación neurohipofisaria visible.• Se evidencian los bronquios lobulares.

Los embriones seleccionados (Tablas II y III) para el presente estudio pertenecen todos al Estadio 16, oscilando su tamaño entre 8 y 11 mm, con una buena calidad de preparación. Se rechazaron aquéllos incompletos (por faltar cortes

histológicos de la región cardíaca), aquéllos con signos evidentes de deterioro tisular o que presentaban alguna embriopatía o malformación

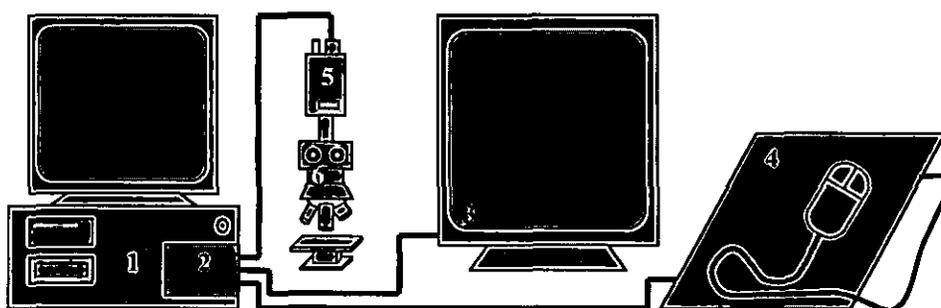
Los especímenes, en su día, fueron cortados en serie, montados, seriados y sometidos a los métodos habituales de diferentes técnicas histológicas. Todos fueron fijados en Formol Neutro al 10% durante 24-72 horas, seguidamente se deshidrataron, según proceder habitual del Laboratorio, en etanol a partir de concentraciones crecientes, aclarado con benzoato de metilo y benzol para seguidamente ser incluidos en Parafina P.F. de 43° a 50° según proceder de Peterfi. Con posterioridad se seccionaron en diferentes planos, con grosor de 8 a 10 micras. La tabla II presenta más detalles de estos aspectos.

Tabla II: Características de los embriones estudiados

Embrión	Long. V-C (mm)	Corte (µm)	Fijador	Inclusión	Tinción	Orientación
MAR 3	8	10	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Azan	Frontal
VE 1	8.5	8	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Eosina	Frontal
GT	8.75	10	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Eosina	Transversal -Oblicuo
BOT	9	10	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Eosina	Transversal
CN 2	9.5	10	Zenker	Parafina	Hematoxilina -Eosina	Sagital
FAUS 4	9.7	10	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Eosina	Frontal
CA 2	10	10	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Eosina-Azan	Tranversal
RE	10	10	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Eosina	Frontal
FE 1	10.5	10	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Eosina	Transversal
CN 4	11	10	Formol 10%	Parafina	Hematoxilina -Eosina	Transversal

Análisis Morfométrico: Metodología

Mediante un microscopio óptico convencional Leitz-Wetzlar se realiza el estudio secuencial plano a plano de los cortes correspondientes a las estructuras cardíacas objeto de estudio. Utilizamos como analizador de imágenes el sistema VIDS cuya configuración hardware comprende (figura 1) ordenador personal; tarjeta de conexión VIDS IV, monitor en color de alta resolución, tableta digitalizadora con cursor y video-cámara para color tipo CCD, según el siguiente esquema:



La video-cámara (5) se adapta al ocular del microscopio óptico (6), conectándose a la tarjeta de conexión VIDS (2) que también recibe conexión de la tableta digitalizadora (4) y del monitor en color de alta resolución (3)

Colocado el portaobjetos en la pletina, se obtiene una imagen de la muestra en el monitor de alta resolución (3), permitiendo el cursor de la tableta digitalizadora (4) dibujar a lo largo del contorno de cada una de las estructuras seleccionadas. Cuando el cursor alcanza el punto inicial se completa automáticamente la imagen de la estructura por cálculo de diferenciación significativa entre puntos sucesivos.

Para poder procesar la imagen y realizar su análisis, es preciso cuantificar la función de transmisión óptica. Esta cuantificación se realiza en unidades de espacio llamados Pixel. Previa calibración del objetivo a emplear, el software calcula automáticamente el factor de calibración, cociente entre la longitud obtenida y la longitud de referencia en pixels.

La medición automatizada de estructuras, en cada uno de sus diversos cortes, da lugar a su caracterización mediante una serie de medidas.

Morfometría Cardíaca: Cálculos Matemáticos

El estudio cuantitativo del desarrollo cardíaco en período postsomítico tiene por base la medida de los diámetros lateral y anteroposterior máximos del corazón y el cálculo del volumen total de este órgano.

Según la orientación de los cortes del embrión, los diámetros máximos del corazón se calculan de la siguiente manera:

- Embriones cortados frontalmente
 - ◆ El diámetro longitudinal máximo ($\emptyset L$) se obtiene directamente.
 - ◆ El diámetro anteroposterior máximo ($\emptyset A-P$) se calcula multiplicando el número de cortes seriados del corazón por el espesor del micrótopo, es decir $\emptyset = n^\circ \text{ cortes} \bullet \text{ espesor}$.

- Embriones cortados sagitalmente
 - ◆ El diámetro anteroposterior máximo se obtiene directamente.
 - ◆ El diámetro lateral máximo se obtiene por la fórmula anterior $\emptyset = n^\circ \text{ cortes} \bullet \text{ espesor}$.

El volumen de los corazones embrionarios se calcula sumando las áreas parciales de las imágenes proyectadas y multiplicando esta suma por el espesor de los cortes (Elias y Hyde, 1983)

$$V = e \sum_{i=1}^{i=n} n \cdot A_i$$

Donde

e = espesor del corte histológico.

A_i = área del corazón en cada corte.

n = nº de cortes estudiados

Cada área se midió diez veces, tomándose la media aritmética de cada una de las áreas medidas. Todas las mediciones se realizan por el mismo observador.

Reconstrucción 3D: Metodología.

1. Descripción General del Proceso de Modelado 3D en Ordenador.

La conversión de un objeto real tridimensional en un modelo 3D de ordenador puede ser dividida en cuatro fases básicas, según Kaufman y col (1998)

- a) **Deconstrucción** La deconstrucción de un objeto sólido genérico puede lograrse de varias maneras que dependen de la naturaleza del objeto, con el resultado final de una serie de cortes. Un modelo de arcilla, cera, o resina de un tejido incluido puede cortarse físicamente en secciones. El número y espesor de las secciones determinará la resolución espacial potencial de cualquier reconstrucción en el eje de sección.

- b) **Análisis** Cualquier técnica de modelado requiere análisis de las secciones originales para determinar como volverán a ser ensambladas. Es necesario identificar rasgos de interés en una serie de secciones y decidir cómo estas regiones deben ser conectadas y bifurcadas en el modelo final informatizado, en otras palabras, para establecer las relaciones topológicas.
- c) **Reconstrucción:** Después del análisis y trazado, las secciones se vuelven a montar para construir un modelo en “marco de alambre” del objeto 3D original. Este proceso involucra la digitalización de las secciones y el alineamiento del conjunto de datos resultantes. Finalmente puede aplicarse una “superficie” o una “piel” en diversos colores.
- d) **Presentación** El modelo 3D debe presentarse de modo que sea fácilmente accesible a los potenciales usuarios. Una manera útil de lograrlo consiste en crear una animación interactiva que permita al modelo ser manipulado en el espacio virtual.

2. Características del Software Empleado

El software VIDS, una vez realizada la medición automatizada de estructuras en cada uno de sus diversos cortes permite linketear los ficheros de coordenadas de los diversos contornos obtenidos, proporcionándonos la reconstrucción 3D de la muestra, siendo visualizada en el monitor en color del ordenador. La reconstrucción inicial, a través de un menú interactivo, puede ser rotada en un sistema de ejes de coordenadas (x, y, z) así como aumentada o disminuida de tamaño. Cada estructura puede ser reconstruida separadamente o en conjunto y de igual modo permite la creación de animaciones.

RESULTADOS

Estudio Morfológico y Descriptivo

Nuestro estudio se ha basado en el análisis morfodescriptivo, con microscopio óptico, de los cortes seriados correspondientes al corazón de estos embriones, así como en su análisis morfométrico digitalizado

Con objeto de no repetir innecesariamente descripciones, elegimos por su buen estado de conservación y tinción al embrión Fe-1 de 10.5 mm de longitud, 37 días, ya que de modo constante, los corazones de los restantes especímenes presentan identidad y superposición de estructuras, modelaje citológico y dispositivo espacial, al pertenecer todos ellos al Estadio 16 de O'Rahilly. Del conjunto de cortes seriados correspondientes al corazón de este embrión Fe-1, seleccionamos los más representativos para ilustrar la morfología de cavidades y el grado de organización de los tabiques interatriales e interventriculares

El análisis de los cortes realizados con microscopio óptico convencional sigue en todo momento una cadencia craneocaudal. Es importante resaltar, que en el embrión Fe-1, siendo los cortes transversales, presentan una marcada inclinación de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, circunstancia que nos ha impedido utilizar este espécimen para realizar mediciones de tamaño y crecimiento de septos y comunicaciones aún persistentes entre las cavidades cardíacas

En los cortes más craneales de la serie (fig 1), se observa la porción más acuminada de la parte derecha e izquierda del atrio común que, como consecuencia del crecimiento excéntrico del atrio en dirección craneolateral, aparecen nítidamente separadas e inmersas en el interior de la cavidad pericárdica. La porción derecha del atrio presenta en sus paredes

mioepicárdicas, excrescencias que se proyectan hacia la luz, configurando el esbozo de las futuras crestas pectíneas del atrio derecho. De igual modo, en la porción posterior e izquierda del mismo se contempla el septum spurium, unión de las valvas derecha e izquierda del seno venoso a nivel de su extremo craneal. Este septo constituye un tabique que, partiendo de la pared posterior de la porción derecha del atrio común, se dirige oblicuamente hacia delante y a la izquierda para fusionarse con la pared anteromedial del mismo, la presencia del septum spurium determina que se aísle en la parte más craneal de la porción derecha del atrio común, dos cavidades asimétricas, siendo de mayor volumen la de situación lateral, ambas con contenido hemático.

La porción izquierda del atrio común constituye una vesícula de luz irregular, a manera de bumerán o *croissant*, que abraza por su cara derecha al tronco arterioso, intentando, dorsal al mismo, alcanzar la parte derecha del atrio común.

El tronco arterioso, de situación medio sagital, ocupa la pars ventralis de la cavidad pericárdica. Sus paredes, constituidas por tejido conjuntivo embrionario, conforman las crestas del tronco, fusionadas a este nivel para constituir el tabique aortopulmonar, que en la pars distalis del tronco aísla, tal y como contemplamos en la figura 1, las luces de aorta y de pulmonar.

Topográficamente, la cavidad pericárdica se sitúa ventral a las venas cardinales superiores derecha e izquierda situadas en la pared posterior de la cavidad celómica, ocupando sus flancos laterales, interponiéndose entre ambas el esbozo traqueoesofágico, flanqueado a derecha e izquierda por los nervios recurrentes.

Algunas micras más en dirección caudal (fig 2), la vena cardinal superior derecha, en su pared anterior, presenta un engrosamiento que corresponde al contacto de esta vena con la pared posterior del atrio común

En conjunto, la totalidad del atrio rodea como alforjas las caras posterior y laterales del tronco arterioso. En el interior del atrio y en su porción derecha sigue observándose el septum spurium, con una disposición similar a la descrita en cortes más craneales, aunque acentúa su inclinación hacia la izquierda. En la pared posterior del atrio se aprecia, paralelo al septum spurium, un tabique incompleto que corresponde al anclaje posterosuperior del septum primum en la pared atrial siendo evidente el foramen primum

A la derecha del septum primum, y en el espacio interseptovalvular se visualiza el septum secundum que, a este nivel constituye un tabique completo, oblicuamente dirigido hacia adelante. La presencia de estos tabiques delimita en el interior del atrio tres cavidades de diferente luz

El tronco arterioso, abrazado por las vesículas atriales, muestra, a este nivel, las crestas troncales conformadas por el tejido conjuntivo embrionario, que si bien toman contacto, no se establece fusión a este nivel, hecho éste denunciado por la presencia de un muro endotelial

En dirección caudal (fig 3), la vena cardinal superior derecha se evagina por su cara anterior en la porción derecha y posterior del atrio común, estando engrosada la zona de contacto entre la citada vena y el atrio.

En la luz del atrio sigue visualizándose el septum spurium, de similares características a las descritas anteriormente. Un hecho significativo es la presencia en estas secciones, del septum secundum, que aparece como un

tabique incompleto de disposición divergente con relación al septum primum, de este primero observamos no sólo el anclaje posterosuperior, sino además el cuerno anterosuperior del mismo, mostrando su típica disposición en semiluna y delimitando entre ambos el foramen primum

En la porción ventral y en la línea medio sagital de la cavidad pericárdica se observa la parte distal del cono bulbis, cuyas paredes están integradas por el tejido conjuntivo embrionario que se acumula y se proyecta hacia su luz, constituyendo las crestas dextrodorsal y sinistroventral que, a este nivel, si bien están próximas, no llegan a contactar

En la figura 4, prosigue la evaginación de la pared anterior de la vena cardinal superior derecha, desembocando en la luz del seno venoso, estando éste limitado por las valvas derecha e izquierda, que aún están fusionadas en su parte más caudal.

Continúan observándose los cuernos anterosuperior y posterosuperior del septum primum y por tanto el foramen primum delimitado entre éstos

Entre la valva izquierda del seno venoso y el cuerno posterosuperior del septum primum, la pared posterior del espacio interseptovalvular se proyecta discretamente hacia la luz atrial, el relieve al que da lugar lo interpretamos como la parte más caudal del septum secundum

El cono bulbis muestra con claridad las crestas dextrodorsal y sinistroventral cuya separación es más nítida que en planos anteriores. La luz del cono bulbis, como consecuencia de la protusión de las crestas conales, adquiere forma de bolardo invertido

Entre cono bulbis y atrio, se delimita claramente en la cavidad pericárdica un estrecho pasadizo que corresponde al fondo del seno transverso de Theile

Caudalmente (fig 5), las valvas derecha e izquierda del seno venoso se encuentran separadas, siendo ambas de disposición convergente; la valva derecha es de mayor longitud que la izquierda.

En la pared anterior del atrio, en su porción inferior, se observa el septum primum que constituye a este nivel un tabique corto e incompleto, bajo el que se contempla un espacio acelular que interpretamos como cavum subseptale.

Ventral, con relación al atrio común, se aprecia el cono bulbis y a su izquierda, la parte más craneal del ventrículo primitivo, siendo manifiesta su separación en la superficie anterior por el profundo surco bulboventricular. A nivel de las paredes del cono bulbis aparecen las crestas dextrodorsal y sinistroventral, ambas de forma triangular, cuya base se continúa con el material de las paredes del cono bulbis y cuyo vértice se proyecta hacia la luz del mismo, tratando de aislar las futuras cámaras de salida de sendos ventrículos, dándole a ésta forma de paleta de albañil. A la izquierda de la cresta dextrodorsal, se observa el material correspondiente a la almohadilla endocárdica superior, no apreciándose distingo citoestructural entre ésta y las crestas del cono.

En dirección caudal (fig 6), es ya patente la presencia del mesocardio posterior, observándose a este nivel el esbozo de los dos bronquios principales, así como el esbozo pulmonar derecho

En estos planos, el atrio común está completamente septado en la línea mediosagital por la porción inferior del septum primum, que hacia atrás se fusiona con la pared del atrio, mientras que ventralmente se continúa con el material de la almohadilla endocárdica superior. El septum primum describe una curva de convexidad izquierda.

En la porción ventral de la cavidad pericárdica, se sitúa el asa bulboventricular, siendo manifiesto en su superficie el surco bulboventricular, así como los profundos surcos atriobulbar derecho y atrioventricular izquierdo.

Debido a la oblicuidad del corte, el ventrículo primitivo carece de luz a este nivel, mientras que el bulbus cordis, cuyas paredes inician una tenue trabeculación, sí la posee. Está presente a este nivel la almohadilla endocárdica superior en cuya cara auricular se fija el pilar anterior del septum primum, mientras que su cara ventricular libre delimita con el borde superior del septo inferior la porción más anterior y superior del foramen bulboventricular secundario, tal y como referíamos antes, por la oblicuidad del corte, no hay continuidad entre la luz del bulbus cordis y el ventrículo.

Otro hecho significativo se observa en esta sección, y es la fusión de la cresta sinistroventral con la vertiente bulbar del septum inferior.

A la derecha de la almohadilla endocárdica superior, se sitúa el cojinete lateral derecho que a este nivel, está en contacto con la citada almohadilla, existiendo una continuidad entre su material y el de la cresta dextrodorsal.

En la pared posterior de la cavidad celómica, dorsal a la porción izquierda del atrio común, la vena cardinal superior izquierda presenta en su parte anterior un engrosamiento que se va insaculando hacia la derecha

En la figura 7, se observan las almohadillas endocárdicas superior e inferior que han establecido contacto, aunque no fusión, para construir el septum intermedium. Entre la almohadilla endocárdica inferior y el cojinete lateral derecho, a este nivel fusionado con la cresta dextrodorsal del cono, se delimita un estrecho pasadizo que pone en comunicación la parte derecha del atrio común con el futuro ventrículo derecho, es el esbozo del orificio aurículoventricular derecho

La cara ventricular de la almohadilla endocárdica superior delimita, conjuntamente con el borde superior y anterior del septum inferior, el orificio bulboventricular secundario, de tal forma que el canal atrioventricular derecho desemboca a la derecha del orificio bulboventricular secundario a nivel del área comprendida entre éste y el foramen bulboventricular primario, área que, siendo primitivamente del ventrículo común, es asimilada por el bulbus cordis trabeculado para formar el ventrículo derecho del adulto

En la cara auricular de las almohadillas endocárdicas, se produce la fusión del septum primum con la valva izquierda del seno venoso, continuándose su material con el del septum intermedium en construcción. Esta fusión aún no es completa a estos niveles, pues observamos una pequeña cavidad triangular limitada en la concavidad del septum primum

La valva derecha del seno venoso acentúa su inclinación hacia la izquierda, tratando de aproximarse y contactar con el conjunto valva izquierda-septum primum

En la superficie cardíaca, son patentes y marcados los surcos atriobulbar, atrioventricular y bulboventricular que establecen el límite externo entre las diferentes vesículas cardíacas. Dorsalmente, persiste el mesocardio posterior, siendo manifiesta la evaginación que presenta la cara anterior de la vena cardinal superior izquierda.

En la figura 8, la almohadilla endocárdica inferior ha aumentado considerablemente de volumen, estando en contacto con la almohadilla endocárdica superior, poniéndose de manifiesto claramente la ausencia de fusión del tejido conjuntivo embrionario (gelatina de Davis) de ambas almohadillas.

La cara ventricular de la almohadilla endocárdica inferior delimita con el septum inferior el foramen ventrículo-bulbar secundario. El septum inferior, en su vertiente bulbar, presenta la porción más inferior de la cresta sinistroyventral. La orientación de este septum se ha modificado notablemente, hecho que, pese a la oblicuidad de los cortes, se pone de manifiesto en esta figura dirigiéndose ventrodorsal y lateromedialmente. Otro hecho llamativo es el contraste existente entre las paredes ventriculares y bulbares, siendo muy manifiesta la trabeculación en el ventrículo primitivo y menos intensa en el bulbus cordis.

Sigue observándose el *canalis atrioventricularis dexter*, cuyo margen derecho está limitado, a esta altura, por el cojinete lateral derecho fusionado a la cresta dextrodorsal, siendo su margen izquierdo la almohadilla endocárdica inferior.

En la cara auricular de las almohadillas endocárdicas superior e inferior se produce finalmente la fusión del complejo valva derecha, valva

izquierda, septum primum, habiendo desaparecido, por tanto, el espacio interseptovalvular

Dorsal a la porción izquierda del atrio común se evidencia el ductus de Cuvier izquierdo, que continúa su desplazamiento medial para finalmente desembocar en la porción derecha del atrio común

A nivel del orificio atrioventricular izquierdo (figuras 9 y 10), la almohadilla endocárdica inferior se fusiona conjuntamente con la cresta dextrodorsal al borde superior libre del septum inferior, por lo que se produce el cierre a esta altura del foramen bulboventricular secundario. Continúa observándose la almohadilla endocárdica superior en contacto con la inferior, delimitándose entre aquella y el cojinete lateral izquierdo el futuro orificio mitral

La confluencia valva derecha, izquierda y septum primum, conforma el septum sinus venosus, observándose la desembocadura de la vena cardinal inferior derecha, futura vena cava inferior, en el cuerno derecho del seno venoso

Finalmente, en los cortes más caudales (fig 11), se evidencia la parte más declive del cuerno izquierdo del seno venoso, ductus de Cuvier, limitando dorsalmente las porciones más bajas del bulbus cordis y ventrículo primitivo

La figura 12 nos muestra la reconstrucción 3D de este embrión. Se aprecia que su morfología externa se aproxima a la definitiva del corazón adulto.

En visión ventral, se observa que el tronco arterioso, -rodeado, a manera de alforjas, por el atrio común-, se continúa en dirección caudal y lateral, en ángulo obtuso, con la parte más craneal del bulbus cordis. Éste se continúa, mediante un ángulo agudo, con el ventrículo primitivo del que está

claramente separado por el surco bulboventricular, oblicuamente dirigido de abajo a arriba y de derecha a izquierda. En su parte más caudal, el ventrículo primitivo constituye el ápex cordis

Estudio Cuantitativo

La medición automatizada de estructuras, en cada uno de sus cortes, da lugar a su caracterización mediante una serie de medidas. Estudiados los especímenes de este Estadio, por la metodología descrita anteriormente, hemos obtenido los resultados que se expresan a continuación, en la tabla III

Tabla III: Morfometría de los embriones estudiados

EMBRIÓN	Longitud V-C (mm)	Diámetro A-P (mm)	Diámetro Lateral (mm)	Volumen Cardíaco (mm³)
MAR 3	8	1,1	1,7	3,05
VE 1	8 5	1,4	1,8	3 07
GT	8 75	1,5	2	3 27
BOT	9	1,4	1,9	3 52
CN 2	9 5	1,8	2,1	4 03
FAUS 4	9 7	1,8	2,3	4 027
CA 2	10	2	2,3	4 55
RE	10	1,9	2,3	4 53
FE 1	10 5	2,1	2,4	5 04
CN 4	11	2,2	2,4	5 166

FIGURAS

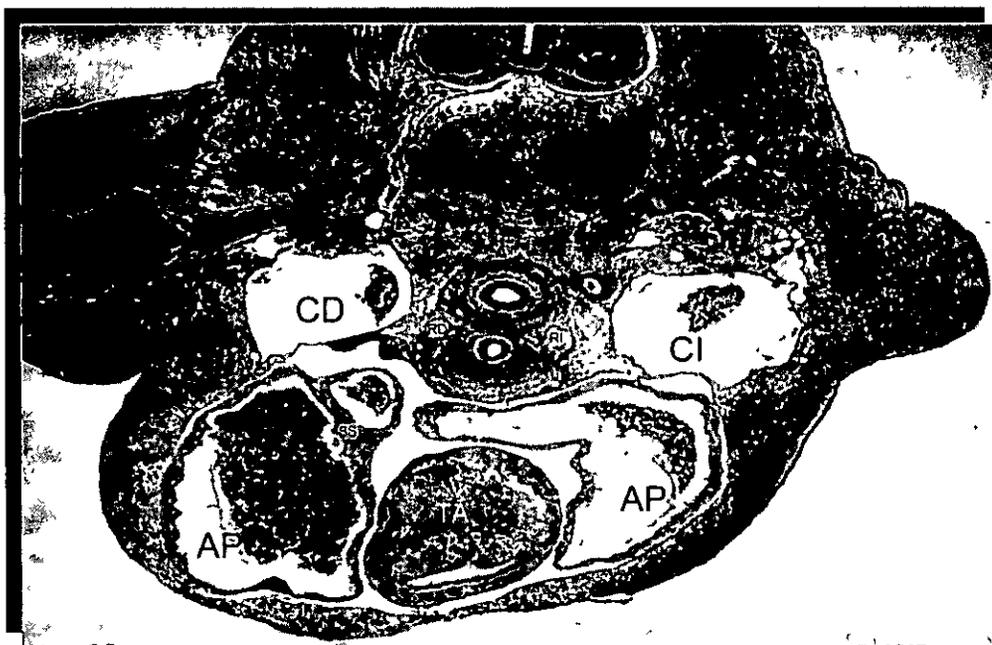


Figura 1

- | | | | |
|----|-----------------------------|----|----------------------------------|
| AP | Aurícula Primitiva | CD | Vena Cardinal Superior Derecha |
| RD | Nervio Recurrente Derecho | CI | Vena Cardinal Superior Izquierda |
| RI | Nervio Recurrente Izquierdo | TA | Tronco Arterioso |
| SS | Septum Spurium | | |

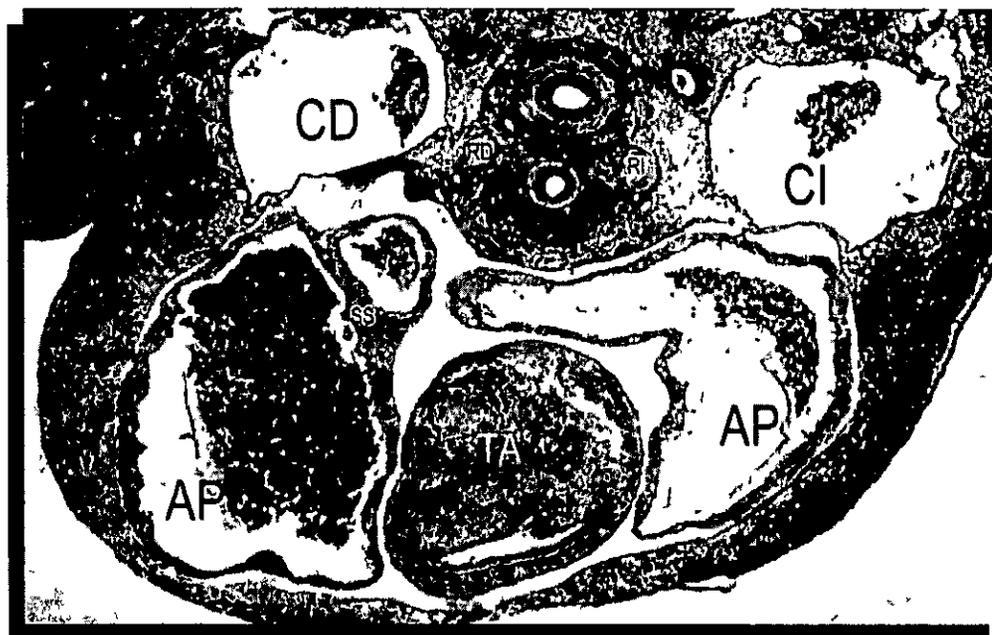




Figura 2.

- | | | | |
|----|--------------------|----|------------------------------------|
| AP | Aurícula Primitiva | RI | Nervio Recurrente Izquierdo |
| SC | Septum Secundum | RD | : Nervio Recurrente Derecho |
| SP | Septum Primum | CD | Vena Cardinal Superior Derecha |
| FP | Foramen Primum | CI | : Vena Cardinal Superior Izquierda |
| SS | Septum Spurium | TA | Tronco Arterioso |



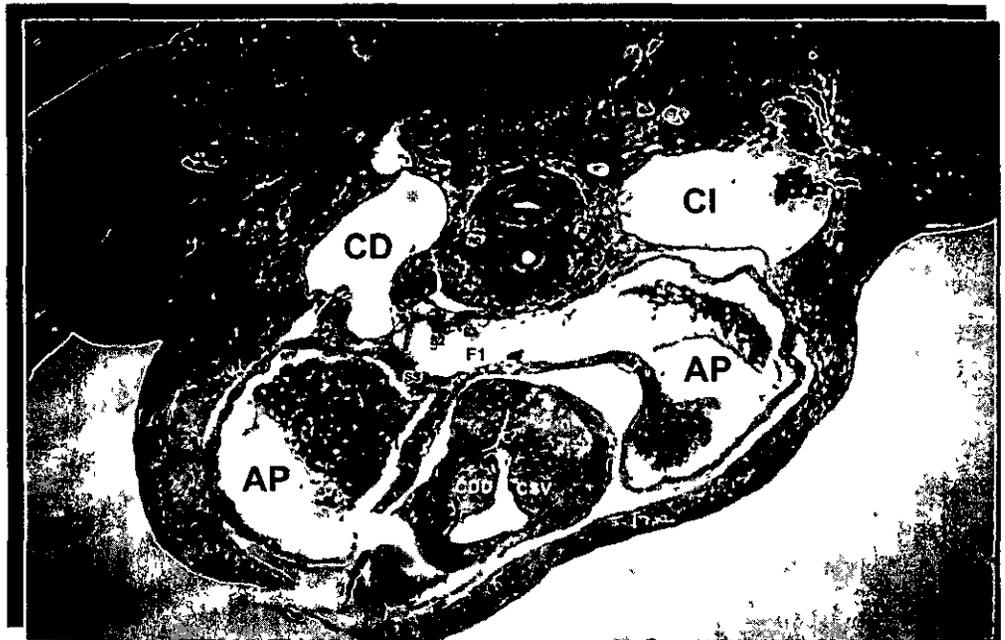


Figura 3

- | | | | |
|-----|---------------------|-----|----------------------------------|
| AP | Aurícula Primitiva | RD | Nervio Recurrente Derecho |
| S2 | Septum Secundum | RI | Nervio Recurrente Izquierdo |
| S1 | Septum Primum | CD | Vena Cardinal Superior Derecha |
| SS | Septum Spurium | CI | Vena Cardinal Superior Izquierda |
| CDD | Cresta Dextrodorsal | CSV | Cresta Sinistroventral |
| F1 | Foramen Primum | TA | Tronco Arterioso |





Figura 4

VD	Valva Derecha Seno Venoso	CD	Vena Cardinal Superior Derecha
VI	Valva Izquierda Seno Venoso	CI	Vena Cardinal Superior Izquierda
S1	Septum Primum	CDD	Cresta Dextrodorsal
S2	Septum Secundum	CSV	Cresta Sinistroventral
F1	Foramen Primum	STT	Senos Transversos de Theile





Figura 5

- | | | | |
|----|------------------------|-----|-----------------------------|
| AP | Aurícula Primitiva | VI | Valva Izquierda Seno Venoso |
| VP | Ventrículo Primitivo | VD | Valva Derecha seno Venoso |
| S1 | Septum Primum | CDD | Cresta Dextrodorsal |
| SB | Surco Bulboventricular | CSV | Cresta Sinistroventral |
| CS | Cavum Subseptale | | |

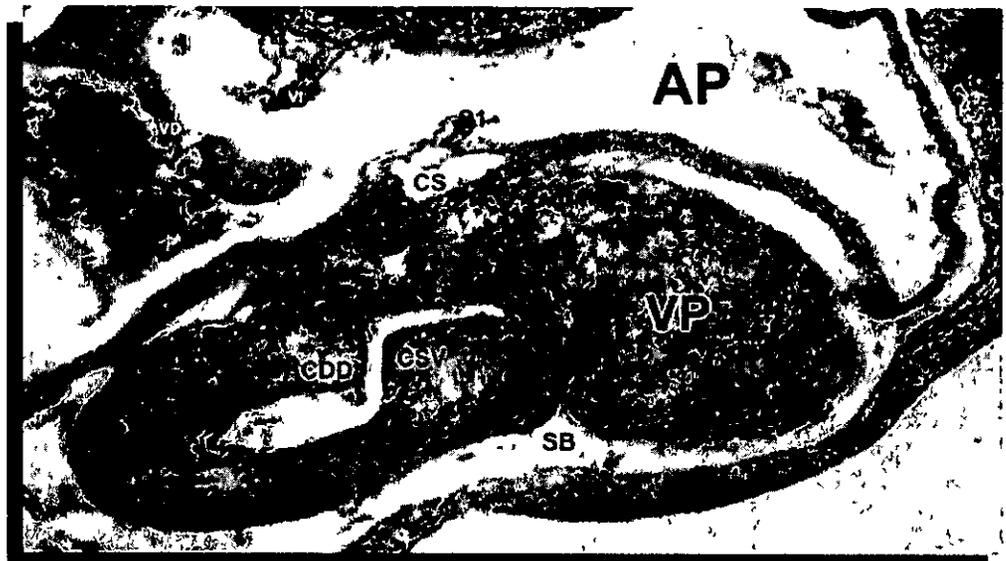




Figura 6

VP Ventrículo Primitivo
 CDD Cresta Dextrodorsal
 CSV Cresta Simistroventral
 S1 Septum Primum
 SI Septum Inferior
 MD Mesocardio Dorsal
 SAB Surco Atriobulbar
 SBV Surco Bulboventricular

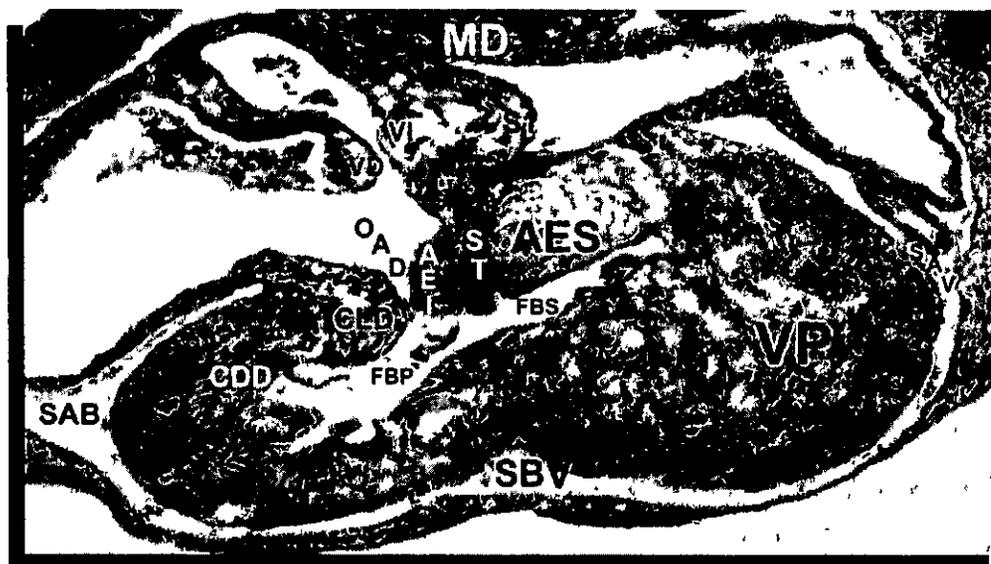
FBP Foramen Bulboventricular Primario
 FBS Foramen Bulboventricular Secundario
 CLD Cojinete Lateral Derecho
 OAD Orificio Atrioventricular Derecho
 OAI Orificio Atrioventricular Izquierdo
 AES Almohadilla Endocárdica Superior
 CI Vena Cardinal Superior Izquierda





Figura 7

VP	Ventrículo Primitivo	AEI	Almohadilla Endocárdica Inferior
S1	Septum Primum	AES	Almohadilla Endocárdica Superior
SAP	Surco Atriobulbar	CI	Vena Cardinal Superior Izquierda
CDD	Cresta Dextrodorsal	SAV	Surco Atrioventricular
SBV	Surco Bulboventricular	FBP	Foramen Bulboventricular Primario
CLD	Cojnete Lateral Derecho	FBS	Foramen Bulboventricular Secundario
ST	Septum Intermedium	VD	Valva Derecha Seno Venoso
MD	Mesocardio Dorsal	VI	Valva Izquierda Seno Venoso
OAD	Orificio Atrioventricular Derecho		



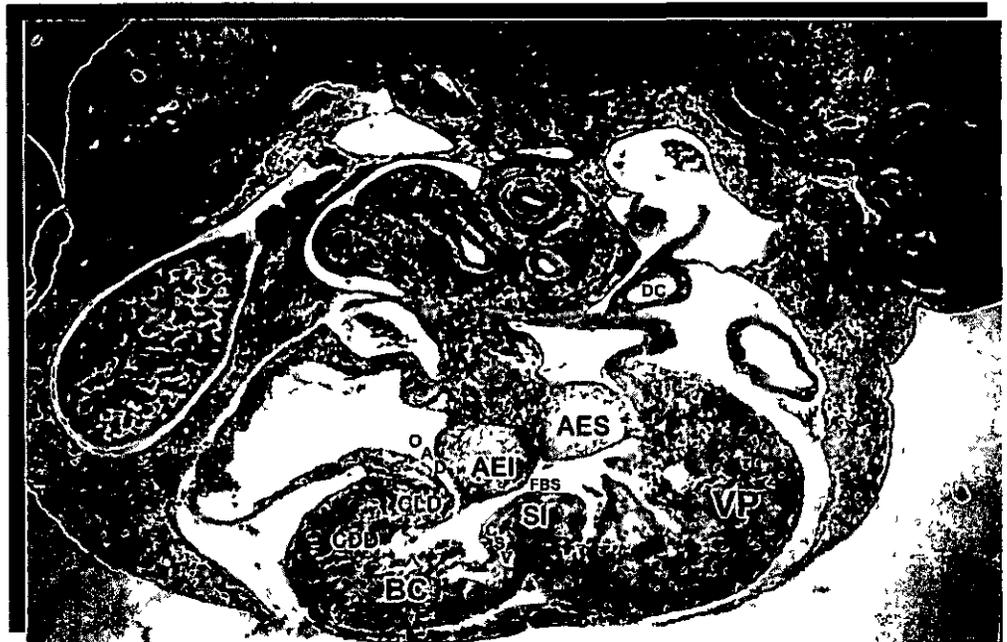
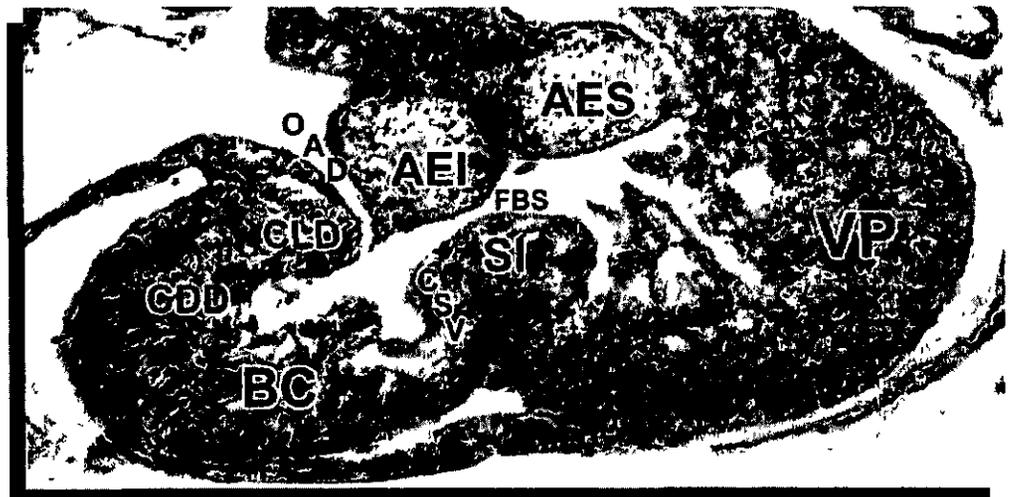


Figura 8

VP	Ventrículo Primitivo	AEI	Almohadilla Endocárdica Inferior
BC	Bulbus Cordis	AES	Almohadilla Endocárdica Superior
SI	Septum Inferior	FBS	Foramen Bulboventricular Secundario
CDD	Cresta Dextrodorsal	OAD	Orificio Atrioventricular Derecho
CLD	Cojinete Lateral Derecho	DC	Ductus de Cuvier Izquierdo
CSV	Cresta Simistroventral		



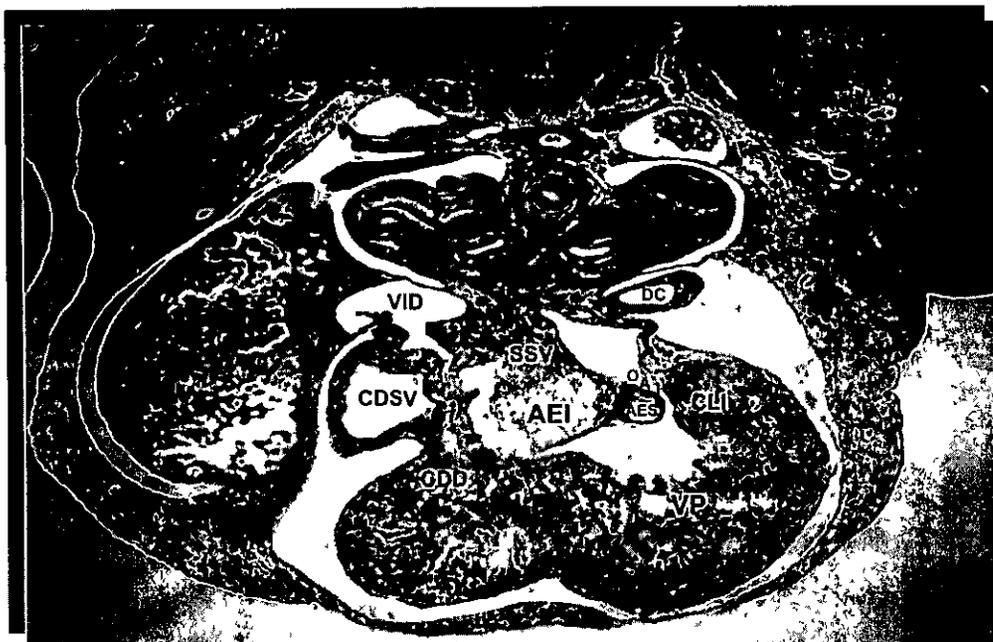


Figura 9

VP	Ventrículo Primitivo	AEI	Almohadilla Endocárdica Inferior
CDD	Cresta Dextrodorsal	AES	Almohadilla Endocárdica Superior
DC	Ductus de Cuvier Izquierdo	OAI	Orificio Atrioventricular Izquierdo
SSV	Septum Sinus Venosii	VID	Vena Cardinal Inferior Derecha
CLI	Cojinete Lateral Izquierdo	CDSV	Cuerno Derecho Seno Venoso





Figura 10

- | | | | |
|-----|----------------------|-----|-------------------------------------|
| VP | Ventrículo Primitivo | AES | Almohadilla Endocárdica Superior |
| SI | Septum Inferior | AEI | Almohadilla Endocárdica Inferior |
| BC | Bulbus Cordis | OAI | Orificio Atrioventricular Izquierdo |
| SSV | Septum Sinus Venosum | DC | Ductus de Cuvier Izquierdo |



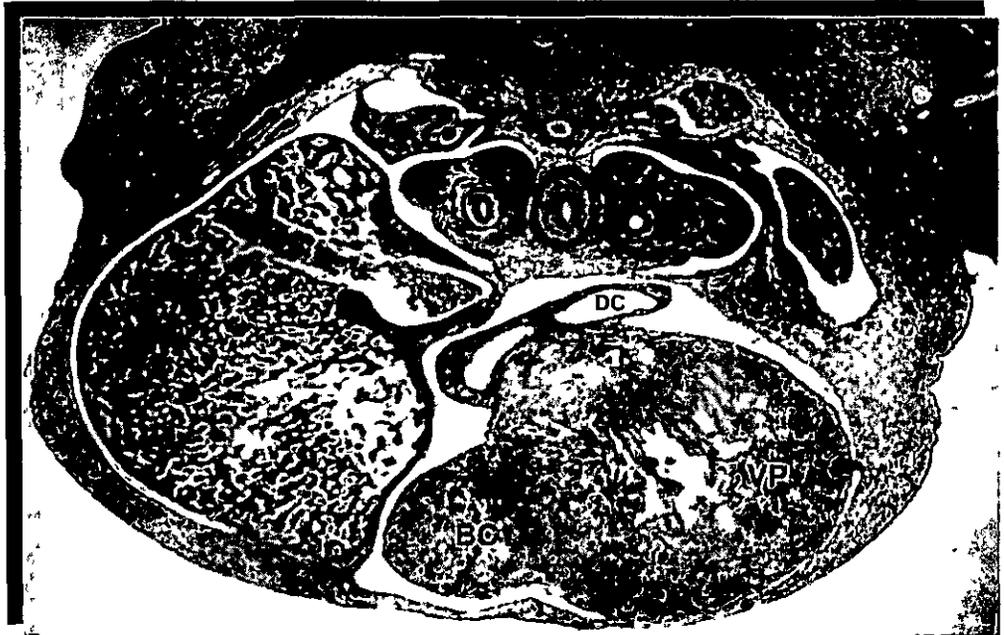


Figura 11

BC Bulbus Cordis
VP Ventriculo Primitivo

DC Ductus de Cuvier Izquierdo



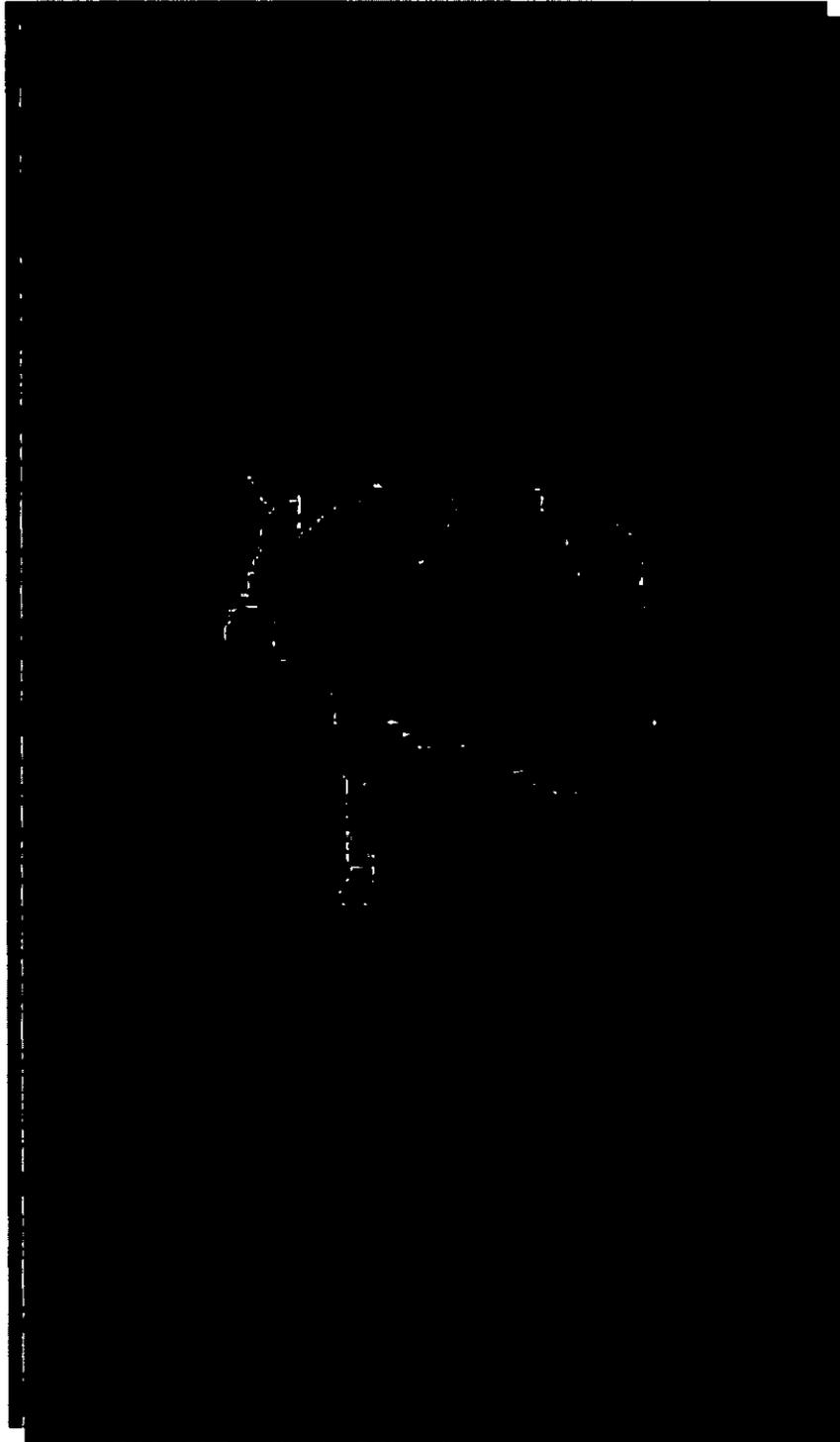


Figura 12 Reconstrucción 3D del Embrión Fe-1, visión anterolateral

DISCUSIÓN

Consideraciones Previas

Estudiadas las aportaciones de los distintos embriólogos sobre el Desarrollo Cardíaco, es de resaltar que, a pesar del hecho que su conocimiento es de importancia considerable, dada su trascendencia clínica, todavía persisten discordancias en el proceso y cronología de hechos (Anderson y Wilcox, 1993) En nuestra opinión esas discordancias en los resultados de las investigaciones han sido debido fundamentalmente a tres hechos

- **Terminología** uso de una terminología heterogénea para definir las estructuras que aparecen en el embrión
- **Estadía**. falta de criterios unificadores en cuanto a los períodos en el desarrollo embrionario.
- **Dimensionalidad** dificultades en la interpretación de estructuras tridimensionales, a partir de cortes histológicos bidimensionales

I. Terminología

Los conocimientos de cualquier estudio se expresan con una terminología específica. Se comprende que, para que los resultados de esos estudios den sus mejores frutos debe ser superado el problema terminológico, en particular si los hallazgos tienen valor en la descripción y entendimiento del corazón en desarrollo. Inicialmente, podría pensarse que este punto es circunstancial y ha sido resuelto rápidamente y por unanimidad por los autores Sin embargo, muchas de las controversias surgidas desde finales del siglo XIX hasta nuestros días y que han arrojado ciertas maldiciones sobre algunos estudios del desarrollo cardíaco se han originado, no por observaciones científicas sino, sencillamente por diferencias semánticas y todavía en 1998, O'Rahilly y Muller escriben "Desgraciadamente, no se ha

publicado, hasta el día de hoy, ninguna recopilación fidedigna de terminología relacionada con el desarrollo cardíaco”

Rokitanski (1875), en su minucioso estudio sobre las malformaciones cardíacas auriculares, crea los conceptos, aún vigentes, de septum primum et secundum. La terminología referente a los tabiques auriculares es la única que es uniforme en todos los trabajos revisados, excepto el de Christie (1963), que distingue en el septum secundum dos componentes: uno dorsal y craneal o verdadero septum secundum y otro caudal y ventral que denomina falso septum secundum

Born (1888), al describir el orificio inferior del septum primum, lo denomina ostium atriorum primum, término usado igualmente por Taussig (1960) Para Tandler (1912) y Arey (1965), este orificio es el foramen ovale primum Fischel (1935), López Rodríguez (1951, 1960), Orts Llorca y López Rodríguez (1951) y Puerta Fonollá y Orts Llorca (1978), denominan a este orificio foramen subseptale Otros autores como Keith (1906, 1924), Patten (1960), Hamilton y Mosman (1973) y más recientemente O’Rahilly y Muller (1998), le dan el nombre de foramen primum, nombre que es aceptado por la American Heart Association

Cuando se va a producir el cierre del foramen primum, determinado por la unión del septum primum con el septum intermedium o interventricular, aparece un nuevo orificio en la parte dorsocraneal del septum que asegura la comunicación vital entre ambas aurículas durante el período fetal Este nuevo orificio es para His (1886) y Born (1888), el ostium secundum, para Mall (1912), Barniville (1914) y Waterston (1918), es el foramen ovale primum, Keith (1906), lo denomina foramen oval, para Arey (1965), foramen ovale secundum Otros como Orts Llorca y Mari (1952) y Puerta Fonollá y Orts

Llorca (1978), lo denominan foramen primum Patten (1964), Hamilton y Mosman (1973) y más recientemente O'Rahilly y Muller (1998), lo denominan foramen secundum

El crecimiento del septum secundum limita, por su borde libre, junto con el del septum primum un orificio, que es el denominado foramen oval por Born (1889), Patten (1931), Orts Llorca y López Rodríguez (1951), Hamilton y Mosman (1973) y O'Rahilly y Müller (1998), terminología que usaremos nosotros Mall (1912), Barniville (1914) y Waterston (1918) lo denominan foramen ovale secundum.

De igual modo, las regiones del tubo cardíaco primitivo han recibido, a lo largo de los años, nombres a menudo confusos Keith (1924), describe los componentes del tubo cardíaco recto que son, en sentido caudorrostral aurícula, ventrículo, bulbo y tronco; Streeter (1942), describe sólo porciones auricular, ventricular y bulbar, pero subdivide el bulbo en ventrículo derecho, cono del corazón y tronco arterial, Anderson y col (1978), describen la porción ventrículobulbar como integrada por dos segmentos el ventrículo primitivo y el bulbus cordis, aunque dividen el ventrículo en tres partes la entrada, relacionada con la válvula auriculoventricular, la porción trabecular y la salida, que sostiene una válvula arterial.

Otro punto conflictivo que ha originado controversias entre los diferentes investigadores dedicados a la embriología cardíaca, lo constituye la región más distal del tubo cardíaco. En un principio, ésta se denomina bulbus arteriosus por von Haller (1758), Kolliker (1861) y His (1886) Gegenbauer (1866), Boas (1880) y His (1886) describen, sobre bases filogenéticas, una región inmediatamente proximal, que llaman conus arteriosus y es Born (1889), quien al aceptar las ideas de Langer (1895), populariza la

denominación de conus arteriosus para designar una zona más o menos infundibular que aparece en la rama distal del asa cardíaca, y reserva el nombre de bulbus cordis para otra zona más distal que incluye la parte más alejada del asa y el comienzo del tronco

Esta terminología se acepta por casi todos los embriólogos, -aunque Pernkopff y Wintinger (1936), proponen la división del tubo cardíaco en preámbula y metámbula-, hasta que Kramer (1942) recomienda la sustitución del término conus por el de bulbus cordis y desde entonces se describe con este nombre en la mayor parte de las publicaciones. Sin embargo, algunos autores recusan tal terminología y creen que es preferible llamar infundíbulo a la porción terminal del asa cardíaca, (de Vries y Saunders, 1962), o prescindir de cualquier denominación específica (Streeter, 1951).

Para van Mierop y col (1962), y Netter y van Mierop (1969). “... en embriones del Estadio de 10 somitos, (Estadio 10), el tercio craneal del tubo endocárdico está dilatado y forma el saco aórtico, a partir del cual se origina el primer par de arcos aórticos. El tercio caudal está también ligeramente dilatado hasta la mitad del tubo, denominándolo ventrículo embrionario precoz. La porción media restante, más bien pequeña, cobrará pronto importancia y se convertirá en el bulbo arterioso, unida al ventrículo embrionario precoz por el orificio interventricular primario. El tercio proximal del bulbo arterioso, ventrículo derecho primitivo en su casi totalidad, el ventrículo derecho adulto y el tercio adyacente del bulbo formarán los conductos de salida de ambos ventrículos y lo llaman conus cordis. Streeter señala que a veces, este término embriológico se confunde con el de la NA, conus arteriosus, que se usa solamente para la porción ventricular derecha anterolateral”. De igual modo, se expresan O’Rahilly y Muller (1998), para quienes el término conus cordis debe reservarse para el infundíbulo del ventrículo derecho en el corazón

postnatal y consideran que debe omitirse el término bulbus al habersele asignado tres significados distintos. Denomina al tercio terminal del bulbo, tronco arterioso, cuya mayor parte de la porción distal junto con el saco aórtico contiguo del que proceden los arcos aórticos, los denomina saco tronco-aórtico.

Pexieder (1981), duda si hacer una distinción entre conus cordis y tronco arterioso, mientras que Kramer (1942) y de Vries y Saunders (1962), prefieren hacer esta distinción en una etapa más incipiente. Basándose en un estudio histológico y utilizando reconstrucciones en cera, Orts Llorca (1986), divide el bulbus cordis en tres porciones: proximal o bulbus cordis trabeculado, media o cono bulbis y distal o tronco y opinan que el tronco arterioso surge del saco aórtico, (Estadíos Carnegie 12-13) y se va invaginando en la cavidad pericárdica.

Teal y col (1986), recomiendan evitar por completo los términos bulbo, cono y tronco y referirse a la región ubicada entre la parte trabecular del ventrículo derecho y el saco aórtico como tracto de salida. O'Rahilly y Muller (1998), proponen el término conotronco para designar, a partir del Estadio 10 de Carnegie, la parte del corazón incipiente que es continuación de la porción trabeculada del ventrículo derecho, denominando tronco arterioso a la porción distal y conus cordis a la porción adyacente del ventrículo derecho.

Del análisis bibliográfico consultado para la realización de este trabajo hemos constatado la persistencia en la literatura actual de todas las variantes terminológicas, incluida la referencia al bulbus cordis / tracto de salida como troncocono. Por nuestra parte, la terminología empleada para la realización de este Trabajo ha sido la defendida por Orts Llorca y Jiménez Collado en sus diferentes trabajos.

En un intento de unificar criterios Pexieder y col. (1989), publican los resultados del Grupo de Trabajo de Embriología y Teratología de la Sociedad Europea de Cardiología y si bien aceptan que incluso entre los propios miembros del grupo es improbable una aprobación universal de los términos sugeridos, proponen una terminología para la descripción del corazón en desarrollo con una filosofía centrada en tres axiomas

1º) Considerar el desarrollo prenatal del corazón en tres fases

- **Fase de Organogénesis Inicial o Temprana** Comienza con la formación de la herradura cardíaca y termina en el Estadio del asa cardíaca completamente formada. Dividen la fase en tres Estadios Pretubo, Tubo y Asa

- **Fase de Organogénesis Avanzada.** Comienza con la aparición de un ensanchamiento del segmento auricular del asa y con los primeros signos de tabicamiento dentro del componente ventricular. Acaba cuando los ventrículos derecho e izquierdo, completamente formados, se separan completamente entre sí mediante un tabique. Esta fase puede ser dividida en Estadios de tabicamiento de los tractos de salida y de cierre de la comunicación interventricular embrionaria

- **Fase de Crecimiento Fetal:** Se inicia cuando los dos ventrículos están separados completamente entre sí y termina con el nacimiento. Se conoce muy poco, hasta ahora, sobre esta fase, con diferencia, en términos de tiempo, el período más largo del desarrollo. Esencialmente, abarca desde el tercer hasta el noveno

mes de crecimiento intrauterino y puede ser razonablemente descrito de una manera temporal

2º) La terminología es concebida para evitar términos “contenciosos o polémicos”, utilizados en la descripción del corazón a término, normal o anormal y también para evitar términos derivados de la anatomía comparada.

3º) El sistema está construido para permitir la futura integración de nuevos conocimientos

Respecto a la descripción del corazón en desarrollo, consideran que siempre se han de señalar al menos tres características específicas para describir de forma completa el desarrollo cardíaco. Éstas son el aspecto externo (como pliegues y expansiones), las cavidades (aurículas versus ventrículos y demás) y los aspectos internos de las cámaras (crestas, cojinetes, pliegues, válvulas, etc.). Un resumen del vocabulario propuesto se da en la tabla IV, junto con una revisión de términos previamente usados que, consideran, deberían de ser eliminados

En nuestra opinión, creemos urgente un consenso internacional sobre la terminología a utilizar en las fases del desarrollo cardíaco, que no debería ser ambigua, ni prestarse a controversia y que tuviera sentido tanto para el embriólogo experimental como para el cardiólogo clínico sin olvidar que una terminología tiene valor sólo cuando es utilizada

Tabla IV Resumen de la terminología propuesta por el Grupo de Trabajo de Embriología y Teratología de la Sociedad Europea de Cardiología (1989)

CARACTERÍSTICAS EXTERNAS		MORFOLOGÍA DE CAVIDADES		CARACTERÍSTICAS INTERNAS	
Vocabulario Existente	Nomenclatura Propuesta	Vocabulario Existente	Nomenclatura Propuesta	Vocabulario Existente	Nomenclatura Propuesta
ORGANOGENESIS TEMPRANA					
		Ventrículo Primitivo	Rama Ascendente (distal, craneal)	Estadio de Placa Cardíogénica	
		Bulbus	Rama Descendente (proximal, caudal)	Estadio de Tubo Cardíaco	
		Saco Aórtico		Estadio de Asa Cardíaca	
ORGANOGENESIS TARDÍA					
	Hendidura Senoauricular	Sinus Venosus	Seno Venoso		
Sulcus Interatrial	Hendidura Interauricular	Aurícula Común Derecha Izquierda	Porción Auricular Común Derecha Izquierda	Septo Auricular	Septo Auricular Foramen Oval Primario / Secundario
Sulcus Aurículo-ventricular	Hendidura Aurículo-ventricular	Canal Aurículo-ventricular Común Derecho Izquierdo	Porción Aurículo-ventricular Común Derecha Izquierda	Cojinetes Aurículo-ventriculares	Eminencias (cojinetes) Aurículo-ventriculares
Sulcus Interventricular	Hendidura Interventricular	Ventrículo Común Derecho Izquierdo	Porción Trabeculada Ventricular Derecha Izquierda	Foramen Interventricular Septo Interventricular	Comunicación Interventricular Septo Primario Ventricular
Sulcus Bulbo-ventricular	Hendidura Ventriculo-arterial	Bulbus	Porción Ventriculo-arterial Derecha Izquierda	Cojinetes Bulbares	Eminencias (Cojinetes o Crestas) Ventriculo-arteriales
		Tronco	Porción Arterial	Septo Aortico-pulmonar	Septo Aortopulmonar
CRECIMIENTO FETAL					
Vocabulario no existente, nomenclatura a elaborarse					

II. Estadiaje

Muchas de las investigaciones iniciales, realizadas en los primeros momentos del desarrollo cardíaco, han estado basadas en el examen de embriones humanos reconstruidos mediante la técnica clásica establecida por Born, (1883) Mientras que esos estudios proporcionaron información, la estandarización de la datación de dichos especímenes era imposible. Más aún, no podía existir certeza de que los embriones estudiados eran, de hecho, normales, sin olvidar la dificultad de obtener suficientes especímenes para proporcionar una secuencia creciente que cubriera los períodos cruciales del desarrollo cardíaco

La necesidad de unificar Estadios en el desarrollo embrionario lo es, no sólo para describir de forma exacta su desarrollo, sino también para su uso en trabajos de investigación. Se pueden ordenar los embriones como una serie de ejemplares individuales seleccionados y numerados en un presunto orden de su desarrollo Sin embargo, en este tipo de series, dado un embrión cualquiera, éste puede estar avanzado en un aspecto a la vez que retrasado en otro y por ello, puede llegar a ser imposible emparejar un nuevo embrión con alguno de los de referencia

Un Estadio Embrionario es un corte, realizado arbitrariamente, a través del eje del tiempo del desarrollo embrionario, equivalente al fotograma de una película A pesar de ello, el estadiaje es necesario para la secuencia y cronología de los hechos

Franklin P Mall (1862-1917), funda la Colección Embriológica Carnegie en Baltimore y es la primera persona en datar los embriones humanos en 1914 Su sucesor, George L. Streeter (1873-1948), establece,

entre 1942 y 1951, un sistema de clasificación en 23 “Horizontes”, detallando la anatomía externa e interna embrionaria, que constituye la base del sistema de datación de embriones humanos utilizado en la actualidad, que es completado por O’Rahilly (1973), en “Estadíos” y revisado por O’Rahilly y Muller (1987), quienes establecen el sistema de clasificación del Instituto Carnegie de Washington, -Estadíos Carnegie-, hoy en día aceptados internacionalmente. Los Estadíos Carnegie conciernen únicamente al período embrionario (primeras 8 semanas postfertilización) y el esquema consiste en 23 etapas del desarrollo¹, basados en datos morfológicos, tanto externos como internos, en lugar de hacerlo directamente en la edad o el tamaño; por ello, los criterios morfológicos característicos de un Estadio determinado permanecen intactos incluso cuando aparece información nueva concerniente a la edad embrionaria. Por tanto, como resultado de recientes estudios ecográficos, se asignan edades mayores a ciertos Estadíos. Sin embargo, hay que resaltar que los Estadíos dependen de la morfología tanto interna como externa, cuyos rasgos no son siempre accesibles mediante imágenes ecográficas.

III. Dimensionalidad

En el campo de las ciencias morfológicas, la mejora en la resolución visual de pequeñas estructuras, inferiores a 1 mm, en tejidos biológicos conlleva, por regla general, la sección en planos del tejido a estudiar, esta mejora en la resolución visual implica la pérdida de la tercera dimensión y hace necesaria alguna herramienta que permita la comprensión tridimensional de las estructuras en desarrollo motivando la ideación y perfeccionamiento de las Técnicas de Reconstrucción Tridimensional, es decir, el ensamblaje de la forma tridimensional a partir de secciones microscópicas. Por ello, el conocimiento de la morfología espacial del corazón embriomario humano

¹ De los Estadíos 1 al 8 presomíticos, del 9 al 12 somíticos y del 13 al 23 post-somíticos

deriva principalmente de estudios microscópicos de cortes serados y de reconstrucciones basadas en ellos

Entre los historiadores de la Embriología existe unanimidad en reseñar a Wilhelm His (1831-1904), como el primer investigador que estudió sistemáticamente el embrión humano y el primero en establecer las bases de la reconstrucción tridimensional. No obstante, el reconocimiento tridimensional de las secciones histológicas se ha venido realizando, desde finales del siglo XIX, fundamentalmente por el Método Tridimensional en Cera ideado por Born (1883), técnica que en síntesis consiste en proyectar a determinados aumentos las secciones a reconstruir, con su correspondencia en el grosor de la lámina en la que se dibuja, proceder que si bien es didáctico, es poco fidedigno por cuanto presenta algunos inconvenientes derivados del material empleado y de la técnica en sí, que determinan que la calidad de la reconstrucción y fiabilidad de las proporciones depende principalmente del número de secciones a reproducir.

Gaunt y Gaunt (1978), señalan que las ciencias morfológicas siguen aún dependiendo de la percepción, identificación e interpretación precisas de formas y estructuras que son, junto con el desarrollo de criterios de detección imparciales y la mejora en la resolución espacial, los recursos metodológicos principales para ayudar al investigador.

Pexieder (1978), considera que todas las técnicas de reconstrucción comparten la posible desventaja de artefactos desconocidos, idea que se generaliza entre los investigadores. Este sentir, unido a la utilización de la microscopía electrónica de barrido (Yamauchi, 1965), determinan el desuso de las técnicas de reconstrucción tridimensional. Wenink y Chon (1984), tras examinar 8 corazones de embriones de cerdo comparan la posibilidad de

artefactos y el valor de la reconstrucción gráfica frente a la microscopía electrónica de barrido y, si bien señalan que la única diferencia entre las dos técnicas es el porcentaje más alto de encogimiento en el proceder de la microscopía electrónica, concluyen que los resultados son comparables.

El desarrollo experimentado por la tecnología de la imagen y de la informática hicieron factibles las técnicas de digitalización de imágenes, facilitando el uso de softwares gráficos en ordenadores personales (PC's) sobre una amplia base de aplicaciones, incluidas las ciencias morfológicas, produciéndose un resurgir del interés por las técnicas de reconstrucción espacial (Arráz y col, 1994) En la actualidad, los PC's forman parte del inventario estándar de un laboratorio anatómico y respecto a décadas pasadas, la reconstrucción 3D en ordenador es una herramienta importante en el análisis de secciones seriadas

Según nuestro criterio, los métodos de representación visual tienen la gran ventaja de mostrar relaciones que el descriptivo no puede, lo que contribuye a eliminar alguna de la nomenclatura artificial que se ha ido formando alrededor del desarrollo cardíaco, surcos varios, aletas, crestas, habiéndolo convertido en materia complicada y de difícil entendimiento

Morfología del Desarrollo Cardíaco.

El principio que sirve de guía para la división del corazón embrionario es, según Jiménez Collado y col (1983) y Pexieder y col (1989), el hallazgo de áreas más o menos distinguibles donde ocurre tabicación, criterio que seguimos para realizar el estudio morfológico de los especímenes de este estudio

A nivel atrial, como consecuencia de la expansión que en dirección laterodorsal realiza la porción derecha del atrio común, el seno venoso queda totalmente invaginado en el atrio. Su forma cilíndrica se ha perdido debido a que la parte ventromedial se ha introducido profundamente en la aurícula y ahora adopta una forma de vírgula

Langman (1969), señala que al inicio de la sexta semana y por la aparición del profundo pliegue sinoatrial, -que separa la porción izquierda del seno venoso del lado izquierdo de la aurícula-, que la entrada al seno se hace angosta y se desplaza hacia la derecha. La obliteración de las venas umbilicales y onfalomesentérica determina que la prolongación sinusal izquierda pierda importancia

O'Rahilly y Muller (1987), señalan que en el Estadio 12, el seno venoso sólo se abre en la aurícula derecha, a través del orificio sinoauricular. Esta abertura está protegida por las válvulas venosas derecha e izquierda, que se fusionan rostralmente, -Langman las señala en dirección craneodorsal- y forman una prominencia o techo, el septum spurium (López Rodríguez 1951), pliegue que se proyecta en el interior de la aurícula

En nuestros embriones la parte caudal del seno está ya totalmente inmersa en la cavidad atrial a nivel de su parte derecha, siendo considerable el desarrollo que presentan las valvas del seno venoso, en especial la predominancia de la valva derecha, criterio que coincide con Patten (1964), quien señala que en la sexta semana, el seno venoso se ha desviado de la línea media, situándose su comunicación con la aurícula, a la derecha del septum interatrial recién formado

La septación interna auricular se realiza por el crecimiento de dos tabiques: septum primum y septum secundum. Es aceptado por todos los autores, que el septum primum crece desde la pared dorsal y craneal como un pliegue falciforme, estando separado de la válvula venosa izquierda por el espacio interseptovalvular y que, hacia el final del segundo mes y por invaginación de la pared muscular auricular, aparece el septum secundum sobre la cara derecha del septum primum. El septum secundum abarca más que la amplitud total del espacio interseptovalvular, de modo que las inserciones dorsales del septum primum y de la válvula venosa izquierda quedan en el interior de la aurícula sobre sus superficies izquierda y derecha, respectivamente

Según nuestro criterio, en la formación del tabique interatrial, entran a formar parte estructuras pertenecientes al seno venoso y más concretamente, las valvas del mismo. La valva derecha del seno venoso surge por la aposición y posterior fusión de las paredes del primitivo pliegue sinuatrial derecho que constituye, en el Estadio 12, la denominada por Los (1960), plica venosa. Jiménez Collado (1981), considera que en gran modo se forma por aposición y fusión de la pared lateral del seno venoso con la pared dorsal de la aurícula durante los Estadios 16 y 17, al desplazarse y crecer en dirección caudal y laterodorsal. López Rodríguez (1951), condiciona que la porción caudal y

dorsal de la valva derecha se forme por la fusión de la pared lateral de la vena vitelina derecha y dorsal de la aurícula primitiva. La disposición que adopta esta valva durante el Estadio 16 aparece bien individualizada en los cortes histológicos más caudales, una vez que se delimita más craneal el septum primum spurium.

Para López Rodríguez (1951, 1960) y Los (1960), la primitiva área interpósita, desde los primeros Estadios del desarrollo, se fragmenta dando lugar a una cresta media, de donde se diferenciará el septum primum y otra cresta lateral derecha, que Los (1960), denomina crista venosa, futura valva izquierda del seno venoso, que ya en estos Estadios, contacta con la plica venosa, futura valva derecha, constituyendo el septum primum sinuatriale descrito por Los (1960)

En este embrión del Estadio 16, la separación entre valva izquierda del seno venoso y septum primum es evidente, dando origen a un bien estructurado espacio interseptovalvular de His o espacio intersepto sive valvularis de Rose. La configuración de este espacio estará en dependencia a la expansión craneolateral auricular, por el contrario, la porción media de la aurícula primitiva crece menos y dentro de ella, el área caudal. En la porción derecha de la aurícula primitiva, el seno se encuentra desplazado lateralmente siendo este mayor en su superficie craneal, lo que motiva que la crista venosa, futura valva izquierda, se desplace cada vez más lateralmente en sentido dorsocraneal hasta terminar fusionándose, por encima del orificio sinuatrial, con la valva derecha, constituyéndose así el septum primum spurium, disponiéndose entre éste y el septum primum el espacio interseptovalvular, lo que observamos en los embriones estudiados del Estadio 16 debido a la específica disposición que adopta el proceso de fusión.

La otra estructura derivada de la primitiva área interpósita es el septum primum, que aparece bien desarrollado en los cortes más caudales de la serie histológica, como tabique en forma de semiluna o falciforme, el cual está separado de la valva venosa izquierda por el espacio interseptovalvular. El pilar anterior o cuerno ventral del septum primum alcanza la almohadilla endocárdica superior, mientras que la almohadilla endocárdica inferior lo será por el pilar posterior o cuerno dorsal.

Ventral y caudalmente al borde del septum primum en crecimiento, las dos aurículas comunican por el foramen subseptale, -primum para otros autores-. Conforme el septum primum alcanza las almohadillas auriculoventriculares o endocárdicas superior e inferior, el foramen subseptale disminuye de tamaño y se produce a nivel craneal y dorsal al septum primum, la presencia de dehiscencias, que al confluir constituyen el foramen primum, -secundum para otros autores-, cuya presencia es debida al estiramiento que sufre la parte dorsocraneal del mismo por el crecimiento auricular, criterio que coincide con López Rodríguez (1951, 1960).

Benítez (1974) y Benítez y col (1975), distinguen en la construcción del septum primum dos porciones. una membranosa, fina, de génesis mioepicárdica, constituida por crecimiento excéntrico, instaurándose de forma pasiva por dilatación progresiva de las aurículas en formación y otra mesenquimal, engrosada, constituida a expensas de la gelatina de Davis, que forma el borde libre del septum primum.

El estudio de la textura histológica del septum primum nos muestra cómo en éste existen dos partes bien diferenciadas una dorsal de aspecto membranoso y otra ventral engrosada en forma de maza y constituida por un

tejido indiferenciado, que His (1880, 1885), denomina *spina vestibuli* y cuya existencia es negada por Born (1888)

En nuestras observaciones, apreciamos cómo la *spina vestibuli* presenta una estructura análoga a la de los cojinetes endocárdicos con los que se continúa. Entre ella y la almohadilla endocárdica superior se constituye el *cavum subseptale* descrito por López Rodríguez (1951, 1960) y que evidenciamos en nuestros embriones del Estadio 16

En la parte auricular que limita el espacio interseptovalvular, está presente durante este Estadio el esbozo de otro tabique incompleto en forma de semiluna, ubicado medial al *septum spurium* y a la derecha del *septum primum*, es el *septum secundum*, criterio que coincide con López Rodríguez (1951), mientras que O'Rahilly y Muller (1987, 1998), lo describen a partir del Estadio 18

En el interior del seno venoso, más concretamente en la región caudal y dorsal, existe un tabique de disposición transversal, denominado por Rose (1889), *septum sinus venosii*, conformado porque el extremo inferior de la valva derecha del seno venoso se fusiona con el complejo valva izquierda, *septum primum* y *septum intermedium* en construcción visible en este Estadio. Este complicado mecanismo condiciona que a la pared caudal del seno venoso y la craneal de la vena vitelina derecha estén invaginadas y orientadas medialmente a la aurícula derecha, siendo por esta disposición por lo que el *septum primum sinus venosii* queda en el interior del corazón contactando lateralmente con la cara medial de la valva derecha y medialmente con el tabique interatrial, adoptando una orientación transversal

De la porción dorsal al septum primum sinus venosum y de la valva derecha deriva la valva de Eustaquio y de la parte ventral, la de Tebesio

Respecto al canal auriculoventricular, éste tiene en los Estadios iniciales, una considerable longitud *per se* y se corresponde externamente con el pliegue auriculoventricular. En sus paredes dorsal y ventral aparecen, en el espacio ubicado entre el tubo endotelial y el manto mioepicárdico unos relieves, constituidos por un eje de mesénquima y que se denominan almohadillas endocárdicas auriculoventriculares o cojinetes auriculoventriculares endocárdicos, respectivamente ventrocranial o ventral y dorsocaudal o dorsal¹ (Streeter, 1948). Nosotros, siguiendo a Jiménez Collado (1974), y Langman (1969), las denominaremos superior e inferior, respectivamente.

El canal auriculoventricular toma la forma de una hendidura transversa que va ensanchándose y en cuyo centro el endotelio va desapareciendo, lo que lleva a la fusión de los cojinetes endocárdicos (Jiménez Collado, 1981).

El desarrollo de los cojinetes auriculoventriculares, que dará lugar al septum intermedium, ha sido estudiado por diversos autores (Davis, 1927, Odger, 1938, Kramer, 1942; Streeter, 1945, Orts Llorca y Jiménez Collado, 1967; Orueta, 1968, Jiménez Collado y col., 1983). En ellos se delimita la etapa de aparición de los primeros esbozos de engrosamiento de la gelatina cardíaca en el canal auriculoventricular, Estado 13.

¹ Los términos ventral y dorsal se refieren a las posiciones de las almohadillas después que la aurícula se ha situado dorsalmente al bulbus cordis.

En nuestros embriones, las almohadillas auriculoventriculares presentan el espesor de su masa en la superficie endocárdica más superficial debido a que a nivel tisular en los cojinetes hay predominio de tejido celular, criterio que coincide con Teal y col. (1986), quienes lo señalan a partir del Estadio 14

El crecimiento de los cojinetes es muy rápido y al engrosamiento del material gelatinoso se une la formación de un retículo progresivamente rico en células. La expansión es más notable en la parte central del orificio aurículo-ventricular, y por ello quedan dos orificios laterales: mitral y tricúspide. En la parte más externa de estos orificios existe un tejido similar al de los cojinetes centrales que recibe el nombre de cojinetes laterales

En los especímenes estudiados del Estadio 16, observamos una variación de interés en la arquitectura del septum intermedium. Los cojinetes centrales han crecido en dirección preferentemente perpendicular al eje mayor del corazón. Minaya Bernedo (1997), señala cómo en embriones de 15 mm, Estadio 18, la mitad derecha de los cojinetes centrales se encuentra en el mismo plano que el septum primum inferius, es decir perpendicular a la porción izquierda septal

Persiste el debate entre autores sobre la participación del septum inferius en la oclusión del foramen interventricular (McBride y col., 1981, O'Rahilly y Muller 1998), dificultad en parte debida a la difícil demarcación de los límites y estructuras que en él confluyen.

Desde el punto de vista morfológico, el desarrollo cardíaco presenta dos aspectos a destacar (Grant, 1953) uno, el factor hemodinámico, ya reseñado por von Baer y otro, la notoria diferencia entre las zonas

trabeculadas y no trabeculadas del tubo cardíaco primario en un gradiente de crecimiento centrífugo-centrípeto

Respecto al factor hemodinámico, el lumen del tubo cardíaco primario aumenta mucho menos rápidamente que el volumen del tejido circundante y en lo referente al segundo factor en las zonas no trabeculadas, la multiplicación celular parece ser máxima en la superficie endocárdica, con las células más antiguas localizadas en el epicardio. Como resultado el crecimiento de estos tejidos es centrípeto.

Por el contrario, en los tejidos trabeculados, la multiplicación celular se produce principalmente a nivel epicárdico, las células trabeculares son más viejas y maduras que las células corticales y tienden a ser las primeras en desarrollar fibrillas y en mostrar estraciones. Como resultado, el crecimiento de estos tejidos tiene tendencia a ser centrífugo, incrementándose el tamaño de los canales y de las cámaras. Esto explica porqué la tabicación se debe principalmente a los tejidos no trabeculados.

Parece aceptado que la pars muscular, -septum inferius-, es el resultado de la expansión y trabeculación de dos áreas sucesivas e independientes del tubo cardíaco primario que llegarán a constituir los ventrículos (Streeter, 1948)

Pero en sentido estricto ¿qué se entiende por orificio interventricular? En principio, debería ser la porción del tubo cardíaco que queda entre las dos cavidades ventriculares, por tanto, la pared posterosuperior de dicho orificio sería la parte dorsocraneal del tubo cardíaco primario.

El orificio interventricular es en un principio la simple comunicación entre dos cavidades sucesivas en cuyos extremos se encuentran respectivamente la cavidad auricular de un lado y por el otro el bulbo. Posteriormente, el tabique que separa los ventrículos se relaciona con el septum intermedium y ayuda a discriminar dos corrientes independientes en el tubo cardíaco.

O'Rahilly y Muller (1987), denominan orificio interventricular primario, -señalado por Born (1889)-, al espacio entre el septo interventricular y los cojinetes endocárdicos, que posteriormente se transformará en el vestíbulo aórtico del ventrículo izquierdo. No obstante, señalan que los ventrículos se comunican entre sí, también más hacia la derecha, por el orificio interventricular secundario.

El septum intermedium, en el Estadío 16, se ha trasladado hacia la derecha y el septum inferius se alinea con la parte derecha de las almohadillas endocárdicas auriculoventriculares. Tendrá, como pared posterior, la masa central de los cojinetes endocárdicos. Por último, la rotación bulboventricular hace que dicho orificio se abra en plena región bulbar y serán las formaciones que allí se desarrollan las que ayudarán más eficazmente, en etapas finales, a la oclusión del mismo.

El crecimiento del septum inferius está en relación con el desarrollo de los ventrículos. Para Grant (1953), el septum inferius no toma parte activa en la separación de los ventrículos o, para ser más precisos, la oclusión del orificio interventricular no se consigue por el crecimiento del reborde falciforme que el septum inferius forma con la cara anteroinferior del foramen interventricular. Nuestras observaciones coinciden con aquellos autores que interpretan como el septum primum inferius se construye pasivamente por

aposición de las paredes contrapuestas del bulbus cordis y ventrículo primitivo y, si bien el tabique muscular que constituye el septum inferius se desarrolla en dependencia e íntima relación con la morfogénesis ventricular, no obstante, consideramos que serán las almohadillas endocárdicas auriculoventriculares y sobre todo el rodete bulbar derecho, los que de modo más selectivo condicionen este mecanismo o, cuando menos, lo inicien de este modo

Respecto a los rodetes del tronco arterioso, en el Estadio 13 empiezan a aparecer en éste unas prominencias de tejido gelatinoso, gelatina cardíaca de Davis, que se presenta como dos rodetes simétricos y opuestos, denominados rodetes del tronco o crestas conotruncales. Pronto invaden zonas más proximales y en el siguiente Estadio se les identifica perfectamente en la región bulbar. El desarrollo de estas formaciones que, al contactar sus bordes, dividirán poco después el tronco en dos arterias independientes ha sido objeto de múltiples interpretaciones

Autores como Goerttler (1956), o de Vries y Saunders (1962), siguiendo las teorías hemodinámicas de von Baer (1828), formularon una hipótesis hemodinámica con respecto al crecimiento de los rodetes truncales. Sostienen que la dirección espiróidea que adopta el septo aortopulmonar, consecuencia de la fusión de los rodetes, está causada por las corrientes de flujo que provienen de los ventrículos contráctiles. Por ello, la torsión del tabique que separa los vasos del tronco es más el fruto de la especial disposición trabecular -trabajando "en paralelo", lo que imprime a la sangre eyectada una dirección particular-, que de la rotación del propio tronco, considerada como una estructura tubular que se torsionará al acompañar el giro del asa distal del tubo cardíaco

O'Rahilly y Muller (1987, 1998) recogen la opinión que el mesénquima cardíaco permanece como dos crestas conotruncales activas, -o cuatro cojinetes en los embriones de aves-, que aparecen, adoptando una posición en espiral y se fusionan en los Estadios 14 al 16 Sin embargo, consideran posible que toda la región de salida deba su septación longitudinal no a las crestas, sino más bien a la separación precoz, -Estadios 13 al 14-, de los flujos sanguíneos aórtico y pulmonar, que permitiría que el mesénquima cardíaco se situase en un área entre los flujos Así, la disposición helicoidal característica del tronco aórtico y pulmonar postnatal no dependería de una supuesta torsión o contratorsión de las crestas, ni de una reducción conotruncal -que no se produce-

La mayor parte de los libros de texto de embriología divide el septum spiroideum en varias partes de demarcación no precisa En general, casi todos los autores aceptan una separación entre los rodetes del bulbo, que crecen por debajo de las válvulas sigmoideas y los rodetes del tronco que darán lugar al tabique aortopulmonar

De Vries y Saunders (1962), admiten la dificultad de tal distingo, dado que desde un punto de vista histológico, no existe una clara demarcación en la totalidad del trayecto de las elevaciones espiroideas bulbotruncales En cambio, Grant (1953, 1962), llega a diferenciar no sólo los rodetes del bulbo de los del tronco, -para él distintos en su evolución y estructura-, sino también entre ambos rodetes bulbares Basan sus afirmaciones en que el rodete derecho (dextrodorsal) es fibroblástico y ocupa el lugar que queda entre el anillo aórtico y el cojinete superior de septum intermedium Respecto al rodete izquierdo (sinistroventral), mioblástico, éste no participa en la oclusión del orificio interventricular y dará lugar a la musculatura bulbar no trabeculada En nuestras observaciones no hemos podido encontrar diferencias ostensibles ni

en la estructura ni en la histología que nos permitan hacer estas distinciones y si bien coincidimos con la interpretación dada por Grant respecto al destino del rodete izquierdo, tampoco encontramos diferencia histológica alguna entre éste y el rodete derecho

En la cara inferior del bulbo y en el punto donde éste se va a continuar con la cavidad ventricular derecha, el rodete derecho contacta con el cojinete superior y con el lateral derecho, observación poco resaltada en la literatura y coincidente con Orueta (1968)

Existe controversia sobre cuál es el nivel de desarrollo de las válvulas sigmoideas o semilunares (O'Rahilly y Muller, 1998) Unos las sitúan en el extremo distal del tronco (Pexieder, 1981), mientras que otros lo hacen entre el cono y el tronco (Orts Llorca y col , 1982; Bartelings y Gittenberger, 1988) También se ha señalado que la unión ventriculoarterial ya adopta una configuración curvada y girada, como en el adulto Según Bartelings y Gittenberger (1988), un área de mesodermo extracardíaco compacto, el septo aorticopulmonar, comienza a formarse en la unión ventriculoarterial y se extiende en dirección proximal, a contracorriente Para estos autores, el septo derivado de ectomesénquima (cresta neural), está implicado en la separación de las salidas ventriculares derecha e izquierda; mientras que para Pexieder, (1981), lo haría en la separación de las porciones extracardíacas de los troncos aórtico y pulmonar, estando las salidas ventriculares separadas por el septo conotruncal

En resumen, en este Estadio 16 es de resaltar el alto grado de organización adquirido por las crestas del cono bulbis, de las cuales la dextrodorsal avanza proximalmente, mucho más que la sinistroventral, hasta tal punto que esta última se agota en la parte más alta de la cara bulbar del

septum inferior y la primera se prolonga proximalmente hasta fundirse con el cojinete lateral derecho del inicial canalis atrioventricularis comunis

Respecto a la morfología y participación de los rodetes truncales en su división en dos canales, nuestras observaciones coinciden con las manifestadas en todos los textos.

Tras el desarrollo adquirido por el bulbus cordis y específicamente por el cono bulbis se realiza un proceso de realineamiento de la luz del cono bulbis con el foramen ventriculobulbar secundario, hecho de particular importancia para comprender la formación de la cámara de salida de ambos ventrículos

De igual manera, es evidente, la delimitación del foramen ventriculobulbar secundario, que queda marginado por el borde libre del septum inferior y los tubérculos derechos de las caras ventriculares de las almohadillas endocárdicas superior e inferior, en situación suprayacente, y a la izquierda del orificio auriculoventricular derecho, dejando por tanto a su derecha, una parcela de la primitiva luz del ventrículo común que ha sido incorporado por el bulbus cordis para construir la cámara de entrada del ventrículo derecho

Morfometría del Estadio 16

Frente al elevado número de autores que han estudiado aspectos cualitativos del corazón en período prenatal, son escasos los que han realizado estudios cuantitativos (Thurkow y Wenink, 1993), predominando entre ellos los realizados en período fetal. Álvarez y col (1987), describen la configuración anatomogeométrica para cada ventrículo en la vida fetal y perinatal

Respecto a los estudios morfométricos del corazón embrionario, toda su cuantificación se resume en el trabajo de Grant (1962), quien señala la carencia de estudios detallados sobre los cambios volumétricos del corazón durante el desarrollo y realiza medidas lineales del corazón en período embrionario con la idea de comparar el desarrollo cuantitativo de este órgano

Las medidas lineales simples del corazón embrionario son sin duda el método más directo y rápido para evaluar el crecimiento de este órgano. Siguiendo este pensamiento, medimos los diámetros máximos lateral y anteroposterior del corazón en nuestros embriones, obteniendo los resultados que se expresan en la Tabla III. No obstante, de acuerdo con Mandarin y col (1987), consideramos que el volumen cardíaco es más preciso que la medición lineal para establecer el desarrollo cardíaco y debe de ser un índice accesorio para la clasificación embrionaria en Estadios

CONCLUSIONES

- 1ª El seno venoso, debido a la expansión laterodorsal realizada por la porción derecha del atrio común, queda totalmente invaginado en el mismo, siendo considerable el desarrollo de ambas valvas del seno venoso, en especial la derecha

- 2ª La valva derecha del seno venoso, en su extremo caudal, está fusionada al complejo valva izquierda, septum primum y septum intermedium en construcción elaborándose el septum sinus venosum

- 3ª. El septum primum presenta un notable desarrollo, fusionándose caudalmente con las almohadillas endocárdicas, mientras que cranealmente delimita el foramen primum

- 4ª El septum secundum es patente en la porción craneal y dorsal del espacio interseptovalvular, siendo su desarrollo escaso

- 5ª Las crestas dextrodorsal y sinistroventral del cono bulbi presentan un marcado grado de desarrollo, no apreciándose el distingo citoestructural propuesto por Grant. La cresta dextrodorsal desciende más que la sinistroventral, fusionándose la primera al cojinete lateral derecho mientras que la segunda lo hace a la cara bulbar del septum inferior

- 6^a Las crestas del tronco, a nivel de la porción distal de éste, están fusionadas construyéndose el tabique aortopulmonar que delimita las luces de ambos vasos
- 7^a Persiste la comunicación interventricular a expensas del foramen interventricular secundario, absorbiendo el bulbus cordis la porción del ventrículo primitivo comprendida entre el foramen interventricular primario y secundario, parte que se integra para construir el futuro ventrículo derecho
- 8^a Se establecen valores medios máximos morfométricos cardíacos en los embriones humanos del Estadio 16 de O'Rahilly
- 9^a Consideramos que el volumen cardíaco es más preciso que la medición lineal para establecer el desarrollo cardíaco y debe de ser un índice accesorio para la clasificación embrionaria en Estadios

BIBLIOGRAFÍA

Alcalá Santaella R (1929) Manual de Embriología General y Especial 1ª Edición, Madrid, Javier Morata

Álvarez L , Aranega A , Saucedo R , Contreras J A , (1987) The Quantitative Anatomy of the Normal Human Heart in Fetal and Perinatal Life International Journal of Cardiology, 17 51-72

Anderson R H , Wilcox B R , (1993) The Surgical Anatomy of Ventricular Septal Defects Associated with Overriding Valvar Orifices Journal of Cardiac Surgery, 8. 130-142.

Anderson R H , Wilkinson J L , Becker A.E. (1978) The Bulbus Cordis, a Misunderstood Region of the Developing Human Heart Its Significance to the Classification of Congenital Cardiac Malformations. Birth Def , 14. 1-28

Arey L B , (1965) Developmental Anatomy Philadelphia, Saunders W B Co , p. 378

Arráez Aybar L A , Mérida Velasco J R , Rodríguez Vázquez J.F , Jiménez Collado J (1994) A Computerised Technique for Morphometry and 3D Reconstruction of Embriological Structures Surgical Radiologic Anatomy, 16. 419-422

Assami I (1972) Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Vorhofseptums im Lupenpreparatorisch-Photographische Darstellung Z Anat. Entwickl Gisch, 139. 55-70

Baer von K E. (1828). Ueber Entwicklungsgeschichte der Thiere 2 vols Bornträger, Königsberg

Bacon R L. (1945). Self Differentiation And Induction of the Heart of Amblistoma. J Exptl Zool , 98 87-121

Bally-Cuif L , Wassef M (1995) Determination Events in the Nervous System of the Vertebrate Embryo Curr Opin Genet Dev , 5 450-458

Barniville H L (1914) The Morphology and Histology of a Human Embryo of 8,5 mm , J Anat Physiol , 49 1-71.

Bartelings M M , Gittenberger de Groot (1988) The Arterial Orifice Level in the Early Human Embryo Acta Morphol Neerl. Scand., 24. 181-192

- Benítez A. (1974). Contribución al Estudio del Desarrollo del Tabique Interauricular en Embriones Humanos Tesis doctoral, Cádiz, Facultad de Medicina
- Benítez A , Copano J A , García J.D , López A (1975). La Gelatina de Davis, Factor Fundamental de la Septación Cardíaca, I; Origen y Desarrollo del Septum Primum Interatriorum An Desarr., 19 9-16
- Bernstein E (1996): The Cardiovascular System En Nelson Textbook of Pediatrics, 15th Ed , Behrman R E , Kliegman R M , Arvin A M (Eds), Philadelphia, W B Saunders
- Biben C, Harvey, R.P. (1997): Homeodomain Factor Nkx2-5 Controls Left / Right Asymmetric Expression of 6HLH gene eHand During Murine Heart Development Genes Dev , 11 1357-1369
- Boas, J.E V (1880) Uber den Conus Arteriosus bei Butirinus und Beianderen Knochenfishen Morphol Jharb., 6 527
- Bolender D.L , Markwald R R (1991) Endothelial Formation and Transformation in Early Avian Heart Development. Induction by Proteins Organized into Adherons En The Development of the Vascular Systems, Feinberg R N , Sherer G K , Auerbach R. (Eds.), Issues Biomed , 14. 109-124, Karger, Basel.
- Bolender R (1992) Biological Stereology History, Present State, Future Directions. Micros Res Tech., 21 255-261
- Born G. (1883): Die Plattenmodelliermethode Arch Mikros Anat. Entw. Mech , 22 584-599
- Born G (1888): Uber die Bildung der Elappen Ostien und Scheideuande un Säugetierhersen Anat Anz , 3 602-612
- Born G. (1889): Beitrage zur Entwicklungsgeschichte des Säugetierherzen. Arch microsk Anat , 33 284-378.
- Bremer J L. (1932) The Presence and Influence of two Spiral Streams in Hearts of Chick Embryos Am J Anat , 49 409
- Carlson B M (2000) Embriología Humana y Biología del Desarrollo, 2ª Ed Madrid Ediciones Harcourt S A .

Chan-Thomas P S (1993): Expression of Homeobox Genes Msx-1 (Hox-7) and Msx-2 (Hox-s) During Cardiac Development in the Chick, *Dev Dyn*, 197 203-216

Christie G A. (1963). The Development of the Limbus Fossae Ovalis in the Human Heart A New Septum *J Anat*, 97 45-54

Chuang H H, Tseng M.D (1957): An Experimental Analysis of Determination and Differentiation of the Mesodermal Structures of Neurula in Urodeles. *Scienza Quimica, Pekin*, 6 669-708

Clark E B (1986) Cardiac Embryology Its Relevance to Congenital Heart Disease *Am. J Dis. Child*, 140 41

Clark E B (1996): Pathogenetic Mechanism of Congenital Cardiovascular Malformations Revisited, *Sem Perinatol*, 20 465

Crossin K L y Hoffman S (1991) Expression of Adhesion Molecules During the Formation and Differentiation of the Avian Endocardial Cushion Tissue *Dev. Biol*, 145 277-286

Davis C L (1924) The Cardiac Jelly of the Chick Embryo *Anat Rec.* 27 201-202

Davis C L (1927): Development of the Human Heart from his First Appearance to the Stage Found in Embryos of 20 Paired Somites *Carnegie Inst. Wash Publ* 380, *Contrib. Embryol* 19 245-284

Delesse M. (1848): Procédé Mécanique pour Déterminer la Composition des Roches *Ann Mines*, 13 379-388

Doerr W (1955) Die Formale Entstehung die Wichtigsten Missbildungen des Arteriellen Herzens *Beitr Path Anat*, 115 1

Domenech Mateu J, Reig Villalonga J (1980) Defectos de Tabicación Interventricular y Doble Salida del Ventrículo Derecho Producidos Experimentalmente en Embrión de Pollo *Rev Esp Cardiologia*, 33

Duboule, D (1994) *Guidebook to the Homeobox Genes* Oxford, Inglaterra, Oxford University Press

Eisenberg L M., Markwald R R. (1995) Molecular Regulation of Atrioventricular Valvuloseptal Morphogenesis *Circ Res* 77: 1-6

Ekman G (1925): Experimentale Beitrage zur Herzentwicklung der Amphibien Roux Arch Entw Kech 106 320-352.

Elias H., Hyde DM (1983) A Guide to Practical Stereology Basilea, Karger, p 305

Fischel A. (1935). Compendio de Embriología Humana 1ª Ed , Editorial Labor S A , Barcelona

Foxon GEH (1954). Problems of the Double Circulation in Vertebrates. Biol Rev , 30 196

Frazer JE (1916) The Formation of the Pars Membranacea Septi J Anat Physiol., 51: 19-29

Frick H (1969): La Anatomía Cuantitativa. Rama Nueva y Antigua de la Morfología Munch Med., Wochenschrift.

García Bellido (1999) Morphogenesis in Vertebrate Evolution European Journal of Anatomy 3 (Supl. 1). 7-8.

Gaunt W.A , Gaunt PN (1978) Three Dimensional Reconstruction in Biology London, Pitman

Gegenbauer C (1866) Zur Vergleichenden Anatomie des Herzens Jenaische Z Med Naturw , 2. 365-383

Gillum, RF (1994): Epidemiology of Congenital Heart Disease in the United States Am Heart J , 127 919-927

Goerttler, K (1956). Hemodynamische Untersuchungen uber Entstehung der Missbildungen des Arteriellen Herzebedes Virchow Arch. 328: 391.

Grant R (1953) Architectonics of the Human Heart. Am Heart J , 46 405

Grant R (1962) The Embryology of the Ventricular Flow Pathways in Man Circulation, 25. 756-779.

Grobstein C. (1962): Interactive Processes in Cytodifferentiation J Cell Comp. Physiol , 60 35-40

Haan de RL (1962) Differentiation of the Atrioventricular Conducting System of the Heart Circulation, 24 458-470

Haan de R L (1965) Morphogenesis of the Vertebrate Heart En Organogenesis, de Haan R L y Ursprung H (Eds) New York, Holt, Rinehart y Winston, p 377-419

Haeckel E (1866). *Generelle Morphologie der Organismen* Berlin, Reimer

Haeckel E (1874) *Die Gastraea-Theorie, die Phylogenetische Klassifikation des Tierreichs und Homologie der Kiemblätter* Jena Z Naturwiss, 8 1-55

Haller von A (1758) *Sur la Formation du Coeur dans le Poulet* Lausanne.

Hamilton H L (1952) *Lillie's Development of the Chick* New York Holt

Hamilton W J, Mosman H W (1973) *Embriología Humana* 4ª ed Editorial Interamericana, México

Harvey W (1628) *Exercitatio Anatomica de Moto Cordis et Sanguinis in Animalibus* Sumptibus Francofurt, Gulielmi Fitzeri

Harvey R.P (1996) NK-2 homeobox Genes and Heart Development *Dev Biol.*, 178 203

Heuvel van den H, Ingham P W (1996) "Smoothing" the Path for Hedgehogs *Trends Cell Biol*, 6 451-453

Herrmann B G ed (1995) *The Brachyury Gene* *Sem Dev Biol*, 6 381-435

His W (1880-1885) *Anatomie Menschlicher Embryonen* Leipzig, Vogel

His W. (1886): *Beitrage zur Anatomie des Menschlichen Herzens* Leipzig, Vogel

His W. Jr (1893) *Die Thatigkeit des Embryonalen Herzens und Deren Bedertung für die Lehre van der Herzbewegung beim Erwachsenen.* *Arb Med Klin*, Leipzig, 14-50

Hoschstetter F (1891) *Entwicklungsgeschichte des Gefäß-Systems* *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte von Merkel und Bonnet*

Hoschstetter F. (1906) *Handbuch der Vergleichenden und Experimentellen Entwicklungslehre der Wirbelthiere*, von O Hertwig, Vol III, 2 21-166

Howard C V , Reed M G (1998) Unbiased Stereology. Tridimensional Measurement in Microscopy New York, Springer p 264

Hyde D M , Magliano D.J., Reus E , Tyler N K , Nichols S , Tyler W S (1992) Computer-Assisted Morphometry Point, Intersection and Profile Counting and Three-Dimensional Reconstruction Micros Res Tech , 21 262-270.

Jacobson A.G (1959) Influence of Ectoderm and Endoderm on Heart Differentiation in the Men Develop Biol., 2 138-154

Jacobson, AG (1961) Heart Determination in the Newt J Exp Zool. 146 139-151

Jiménez Collado J (1974) Características y Propiedades Fundamentales de las Áreas Cardíacas Ciencia, 39 7-13

Jiménez Collado J (1981) Mecanismo Causal y Diferenciación Cardíaca. Discurso de Ingreso Académico de Número Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia

Jiménez Collado J (1993) Determinación y Diferenciación Cardíaca Discurso de Ingreso Académico de Número. Real Academia Nacional de Medicina, Madrid

Jiménez Collado J , Puchades Orts A (1977) Analyse Expérimentale de la Régulation Cardiaque sur l'Embryon de Poulet Act Anat , 98 62-70

Jiménez Collado J , Sobrado Pérez J , Álvarez Vázquez C (1983) Estadios Iniciales de la Morfodiferenciación Cardíaca Trab Inst Embriol , 2 49-108

Johnson R L , Tabin C. (1995). The Long and Short of Hedgehog Signaling Cell, 81 313-316

Kaufman M H , Brune R M , Davidson D R , Baldock R A (1998) Computer Generated Three-Dimensional Reconstruction of Serially Sectioned Mouse Embryos. Journal of Anatomy, 193 323-336

Keibel F , Mall F P. (1912). Manual of Human Embryology Vol 2, Philadelphia, J P Lippincott

Keith A (1906) Malformations of the Bulbus Cordis En Studies in Pathology W Bullock (Ed.): Aberdeen, Aberdeen Univ Studies, 21 57-74

- Keith A (1924) Fate of the Bulbus Cordis in the Human Heart *Lancet*, 2, 1267-1273.
- Kingsley D M. (1994) The TGF- β Superfamily New Members, New Receptors and New Genetic Test of Function in Different Organism *Genes Dev.*, 8 133-146.
- Kirby M L. (1988). Role of Extracardiac Factors in Heart Development *Experientia*, 44 944-951
- Kirby M.L., Waldo K L (1990) Role of Neural Crest in Congenital Heart Disease *Circulation*, 82 332-340
- Klatt (1921) Citado por Huxley J S. (1924): Constant Differentiation Growth Ratios and their Significance *Nature*, 114 895-896
- Kolliker von A (1861). *Entwicklungsgesichte des Menschen und der Hoheren Leipzig, Thiere*
- Kramer T.C (1942) The Partitioning of the Truncus and Conus and the Formation of the Membranous Portion of the Ventricular Septum in the Human Heart *Am J Anat.*, 71: 343-370
- Laird A K, Tyler S A , Barton A.D. (1965). Dynamics of Normal Growth *Growth*, 29 233-248.
- Langer A (1894-1895) Zur Entwicklungsgeschichte des Bulbus Cordis bei Voegeln und Saugehieren. *Morphol Jahrb* , 22 99-112
- Langman J (1969) *Embriología Médica 2ª Ed México, Interamericana*
- Lev M , Saphir O (1945): A Theory of Transposition of the Arterial Trunk Based on the Phylogenic and Ontogenic Development of the Heart *Arch Path* 39 172
- Lin Q , Schwarz J , Bucana C , Olson E.N (1997) Control of Mouse Cardiac Morphogenesis and Myogenesis by Transcription Factor MEF2. *Science* 276 1404
- López Rodríguez A (1951) Tabicación Auricular en el Corazón Humano *Arch Esp Morf* , 14 275-325

- López Rodríguez A (1960) Estudio del Desarrollo de los Tabiques Cardíacos *Med. Clin* , 35 292-301
- Los J A (1960) Die Entwicklung des Septum Sinus Venosi Cordis Die Herzentwicklung des Menschen, von Einer Vergessenen Struktur aus Untersucht *Z Anat EntwGesch.*, 122 173-196
- Loud A V , Anversa P (1984) Biology of Disease Morphometric Analysis of Biologic Processes *Lab. Invest* , 50 250-261.
- Mall F P (1912) On the Development of the Human Heart *Am J Anat* , 13 249-298
- Mandarim de Lacerda C A , Passos M A R F , Sampaio F J B (1987) Etude Quantitative du Coeur chez deux Embryons Humains Jumeaux de 14 mm. V-C (Stade 18) *Acta Anatomica*, 130 224-227.
- Mangold O (1956) Experiments zur Analyse der Herzentwicklung bei Triton *Naturwiss* , 43 287
- Massagué J , Attisano L , Wrana F L., (1994) The TGF- β Family and its Composite Receptors *Trends Cell Biol* , 4 172-178
- McBride R.E , Moore G W , Hutchins G M (1981) Development of the Outflow Tract and Closure of the Interventricular Septum and Crista Supraventricularis in Normal Human Cardiogenesis. *Anat. Records*, 194 417-428.
- Mierop van L H.S , Alley R.D , Kausel H.W , Stranahan A (1962) The Anatomy and Embryology of Endocardial Cushion Defects *J Thorac Cardio Surg* , 43 71-83
- Minaya Bernedo A. (1997) Análisis Descriptivo y Morfométrico Cardíaco en Embriones Humanos de 15 mm Tesis Doctoral, Madrid
- Mitram E , Shimon (1990) Activin Can Induce the Formation of Axial Structures and is Expressed in the Myoblast of the Chick Cell, 63: 495-501.
- Morris E.W T (1965) Embryology of Some Congenital Cardiac Anomalies *Torax*, 20 158.
- Morriss-Kay G (1992) Retinoic Acid and Development. *Pathobiology*, 60 264-270

Nakajima Y. (1998) An Autocrine Function for Transforming Growth Factor (TGF) in the Transformation of Atrioventricular Canal Endocardium into Mesenchyme during Chick Heart Development. *Dev Biol.*, 194. 99-113.

Netter F H., Mierop van L H S (1969). *Embriología del Corazón En Colección Ciba de Ilustraciones Médicas Tomo V, Corazón, Ciba-Geigy Corporations (Eds), Barcelona, Salvat Ediciones*

Nieuwkoop P D (1946) Experimental Investigations of the Origin and Determination of the Germ Cells, and on the Development of the Lateral Plates and Germ Ridges in Urodeles. *Arch. Neerland Zool* , 8 1-205

Nieuwkoop P D (1973). The "Organisation Center" of the Amphibian Embryo its Origin, Spatial Organisation and Morphogenetic Action *Adv Morph* 10. 1-39

Ogders, P.N B. (1934) The Formation of the Venous Valves, the Foramen Secundum and the Septum Secundum in the Human Heart *J Anatomy*, 69 412-422

Ogders P.N.B (1938) The Development of the Pars Membranacea Septi in The Human Heart *J Anat* , 72 247-259

Olson E N., Srivastava D. (1996). Molecular Pathway Controlling Heart Development *Science*, 272 671-676

O'Rahilly R (1973) Developmental Stages in Human Embryos Part A Embryos of the First Three Weeks (Stages 1-9) Washington D C , Carnegie Inst Publ , 631

O'Rahilly R , Muller F. (1987) Developmental Stages in Human Embryos Washington D C , Carnegie Institute of Washington Publications, 637

O'Rahilly R , Muller F. (1998) *Embriología y Teratología Humanas* Barcelona, Masson S A

Orts Llorca, F (1934) Beschreibung eines Menschlichen Embryo mit 4 Urwirbel Paaren *Z. Anat Entwgesch.*, 103. 765-792.

Orts Llorca F (1960) The Plexiphorme Phase of the Developing Heart of Embryo at 21±1 Day Carnegie Institution of Washington Year book

Orts Llorca F (1963) Influence of the Endoderm on Heart Differentiation during the Early Stages of Development of the Chicken Embryo Wilh Roux Arch Entw. Mech Org , 54 533-531

Orts Llorca F. (1964) Influence of the Ectoderm on Heart Differentiation and Placement in the Chicken Embryo Wilh Roux Arch Entw Mech. Org , 55 162-180

Orts Llorca F. (1986) Anatomía Humana, T III 6ª Ed Editorial Científico Médica, Barcelona

Orts Llorca F., Domenech Mateu J M , Puerta Fonollá J (1979) Innervation of the Sinu-Atrial Node and Neighbouring Regions in Two Human Embryos J Anat , 128 365-375

Orts Llorca F , Jiménez Collado J (1967) La Técnica de los Isótopos Radiactivos en Embriología Archiv Fac. Med., 12: 387-394

Orts Llorca F , Jiménez Collado J. (1967) Potencial Morfogénico y Organización Regional del Área Cardíaca en el Embrión de Pollo Anales Desarrollo, 14 3-12

Orts Llorca F , Jiménez Collado J (1969) The Development of Heterologous Grafts, Labeled with Thymidine H3 in the Cardiac Area of the Chick Blastoderm Develop Biol , 19 213-227.

Orts Llorca F , Jiménez Collado J. (1970) The Development of Heterologous Grafts of the Cardiac Area (Labeled with Thymidine H3 to the Caudal Area of the Chick Blastoderm. Arch d'Anat , d'Hist et d'Embryo Nor. et Exp , 53 (1 / 4) 115-123

Orts Llorca F , Jiménez Collado J (1971) Determination of Typical Curvatures in Culturing Heart Zur Archiv Anat Angerth , 23. 19-34

Orts Llorca F , Jiménez Collado J , Ruano Gil D (1960) La Fase Plexiforme del Desarrollo Cardíaco en el Hombre Embriones de 21±1 Días Anales Desarrollo, 8 79-98

Orts Llorca F., López Rodríguez A. (1951) Sur la Fermeture du Foramen Subseptale Comptes Rendus de l'Association des Anatomistes, Nancy, G Thomas, p. 774-776.

Orts Llorca F , Mari M (1952) Contribución al Estudio del Desarrollo del Corazón Med Clin , 18 2

Orts Llorca F , Puerta Fonollá J., Sobrado Pérez J (1982) The Formation, Septation and Fate of the Truncus Arteriosus in Man J Anat , 134 41-56

Orts Llorca F (1970). Curvature of the Heart its First Appearance and Determination. Acta Anat , 77: 454-468

Orueta A (1968) Procesos Morfogenéticos que Conducen al Cierre del Tabique Interventricular en el Embrión Humano Tesis Doctoral, Hospital General, 9 (5), 563-593

Patten B M (1931) The Closure of the Foramen Ovale American J Anat , 48. 19-44

Patten B M (1960). Persistent Interatrial Foramen Primum Am J Anat , 107. 271-280.

Patten B M (1964) Fundaments in Embriology McGraw-Hill Bock Co New York.

Pernkoff E , Wirtinger W (1936) Das Wensen der Transposition im Geniet des Hrzens, ein Versuch der Erklarung auf Entwicklungsgeschichter Virchow Arch , 295 143

Pexieder T (1973) The Tissue Dynamics of Heart Morphogenesis I Quantitative Investigation A: Method and Values from Areas without Cell Death Foci. Ann Embryol Morphol , 6 325-334.

Pexieder T (1978) Development of the Outflow Tract of the Embryonic Heart En Morphogenesis and Malformation of the Cardiovascular System Rosenquist G C and Bergsma D (Eds) Birth Defects, Original Article Series, Alan Liss Inc , New York p 29-68

Pexieder T. (1981) Mechanisms of Cardiac Morphogenesis and Teratogenesis Perspect Cardiovasc. Res., Vol. 5, New York, Raven Press

Pexieder T, Wenink A C G , Anderson R H (1989) A Suggested Nomenclature for the Developing Heart Int J Cardiol , 25 255-264

Puerta Fonollá, J , Orts Llorca F (1978) Origin and Development of the Septum Primum Acta Anat , 100 250-257

Rawles M.E (1936): A Study in the Localization of Organ Forming Areas in the Chick Blastoderm of the Head Process Stage *J Exptl Zool* , 72 271-315

Robertis de E M , Oliver G , Wright C V E (1990) Homeobox Genes and the Vertebrate Body Plan *Sci Am* , 263(1) 46-52

Rose C (1889). Zur Entwicklungsgeschichte des Säugetierherzens *Morphol J B* , 15 436-456

Rokitanski von C (1875) Die Defecte der Scheidewände des Herzens W Brausmuller, Viena

Salisbury J R , Whimster W.F (1993): Progress in Computer Generated Three-Dimensional Reconstruction. *J Pathol.*, 170 223-227

Scharf J H (1970) Funktionsformen der Morphokinese En Struktur und Funktion, Leipzig, Verlag G.T.

Schott J J (1998) Congenital Heart Disease Caused by Mutations in the Transcription Factor Nkx2-5 *Science*, 108-111

Scott M P (1992) Vertebrate Homeobox Nomenclature *Cell*, 71 551-553

Serra J (1982): Image Analysis and Mathematical Morphology Academic Press, London

Serra J (1986b). Introduction to Mathematical Morphology *Computer Vision Graphics Image Process*, 35: 283-305

Sissman N J (1970) Development Landmarks in Cardiac Morphogenesis, Comparative Chronology *Am J Cardiology*, 25 (2) 141-148

Sokal R R , Rohlf F J (1981) Biometry The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. New York, Freeman, p 859

Spemann H , Falkenberg H (1919) Über Asymmetrische Entwicklung und Situs Inversus Viscerum bei Zwillingen und Doppelbildungen Wilhelm Roos *Arch Entwickl Mech Org* , 45. 371-422

Spitzer G L. (1929) Versuch einer Erklärung des Smetanaschen Falles von Transposition des Kammerostien des Herzens auf des Phylogenetischen Theorie der Herzessbildungen *Z Kreislauff* , 21· 523

Srivastava D , Cserjesi P , Olson E N (1995) A Subclass of 6HLH Proteins Required for Cardiac Morphogenesis *Science*, 270 1995.

Streeter G L (1942) Development Horizons in Human Embryos Descriptions of Age Group XI, 13-20 Somites and Age Group XII, 21-29 somites. *Contrib Embryol.*, Carnegie Inst , Washington, 30 211-245

Streeter G L (1945) Development Horizons in Human Embryos Description of Age Group XIII, Embryo about 4 or 5 mm Long and Age Group XIV, Period of Indentation of the Lens Vesicle *Contrib Embryol* , Carnegie. Inst., Washington, 31 27-63.

Streeter G L (1948) Development Horizons in Human Embryos Description of Age Group XV, XVI, XVII, and XVIII, Being the Third Issue of a Survey of the Carnegie Collection *Contrib. Embryol* , Carnegie Inst , 32: 133-203

Streeter G L (1951) Development Horizons in Human Embryos Description of Age Group XIX, XX, XXI, XXII and XXIII Being the Fifth Issue of a Survey of the Carnegie Collection. *Contrib Embryol.*, Carnegie Inst , 34 165-196

Tandler J (1912) The Development of the Human Heart *En Human Embryology Kiebel y Mall Philadelphia*, J B Lippincott ,Vol 2, p 534-570

Taussig H B (1960)· *Congenital Malformations of the Heart*, Vol 1, Harvard University Press, Cambridge

Teal S I , Moore G W., Hutchins G M. (1986) Development of Aortic and Mitral Valve Continuity in the Human Embryonic Heart *Am J Anat* , 176 447-460

Thompson A W (1948). *On Growth and Form* N York, MacMillan, p 1-21

Thurkow E W , Wenink A C G (1993) Development of the Ventriculoarterial Segment of the Human Embryonic Heart A Morphometric Study. *Anat Rec* , 236, 664-670.

Tuchmann-Duplessis H (1970) *Embryologie*, Second Cahier, Masson S A , Paris

Vries de P, Saunders J. (1962) Development of the Ventricles and Spiral Outflow Tract in the Human Heart A Contribution to the Development of the Human Heart from Age Group IX to Age Group XV Contrib Embryol, Carnegie Inst Wash, 37: 87-114

Waterston D (1918) Development of the Heart in Man Trans Roy Soc Edinburgh, 52. 257

Weibel E R (1979) Stereological Methods Practical Methods for Biological Morphometry. London, Academic Press

Wenink A.C.G, Chon Y (1984) The Value of Graphic Reconstruction Comparison with Scanning Electron Microscopy Anat Rec, 210 537-540

Wilkie A O.M (1995). Functions of FGF's and Their Receptors Curr Biol, 5 500-507

Wolff C.F. (1759): *Theoria Generationis*. Berlin, Halae ad Salam

Yamauchi A (1965) Electron Microscopic Observations on the Development of S -A. and A.-V. Nodal Tissues in the Human Embryonic Heart Z Anat Entw. Gesch, 124 562-587

Zhou X. (1993) Nodal is a Novel TGF- β -like Gene Expressed in the Mouse Node During Gastrulation Nature, 361 543-547