

Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud



**Casa abierta al tiempo**

Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

*“Estudio de los cambios topológicos y de los procesos  
celulares del miocardio del conus durante la septación  
cardiaca”*

Tesis

Que para obtener el grado en Doctor en Ciencias Biológicas y  
de la Salud

Presenta:

***M. en Biol. Exp. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga***  
**2141801007**

Co Directores:

**Dra. Concepción Sánchez Gómez**

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Asesor:

**Dr. Humberto González Márquez**

Ciudad de México, Diciembre de 2019

Co-Directores:

**Dra. Concepción Sánchez Gómez**

Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y  
Teratogénesis Experimental  
Hospital Infantil de México, Federico Gómez  
csg@yahoo.com.mx

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
legq@xanum.uam.mx

Asesor:

**Dr. Humberto González Márquez**

Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
hgm@xanum.uam.mx

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la dirección de la Dra. Concepción Sánchez Gómez

El Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro PFP-20-93, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo.

El proyecto fue apoyado por el programa de Fondos Federales del Hospital Infantil de México, Federico Gómez No. HIM-2013-060

## Miembros del Jurado

El jurado designado por las Divisiones de ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en B.E. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga, el día 22 de enero de 2020.

### **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Presidente

Profesor Investigador C, TC

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



### **Dra. Concepción Sánchez Gómez**

Secretario

Investigador en Ciencias Medicas

Laboratorio de Investigación en Biología

del Desarrollo y Teratogénesis Experimental

Hospital Infantil de México, Federico Gómez



### **Marcela Salazar García**


Vocal

Investigador en Ciencias Medicas

Laboratorio de Investigación en Biología

del Desarrollo y Teratogénesis Experimental

Hospital Infantil de México, Federico Gómez



### **Dr. Humberto González Márquez**

Vocal

Profesor Investigador C, TC

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



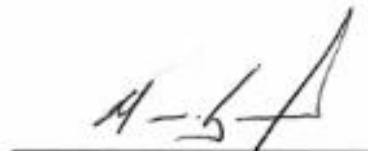
### **Dr. Mario García Lorenzana**

Vocal

Profesor Investigador C, TC

Departamento Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



## *Dedico este trabajo*

*A la memoria de mis abuelos Francisca Muñoz y Roberto Lechuga*

*A mi madre, afortunado de que aún este conmigo*

*A mis hijos Brenda y Oswaldo, son mi inspiración*

*A mis hermanos Ivi y Edgar*

*A Jessica Salazar, mi sol de todos los días, siempre me recuerda que primero hay que sonreír*

*A mis tías, primos, primas y sobrinos Lechuga, afortunado de ser parte de esa gran familia*

*A mis tutores Dra. Concepción Sánchez, Dr. Luis Quiroz, Dr. Humberto González. Solo puedo decirles ¡Gracias!*

*A la Universidad Autónoma Metropolitana, por todo lo que me ha dado*

*A todos mis profesores de la Licenciatura y Maestría en Biología Experimental*

*A mi terquedad, por hacer que se cumplan mis sueños de la infancia, Dr. Lazzarini*

*Al Dr. Rubén Román Ramos, sin su apoyo institucional no hubiera podido aplicar al programa de Doctorado, Gracias, misión cumplida*

*A los miembros del Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, del Hospital Infantil de México Federico Gómez*

*A mis ex alumnos (próximos doctores): Ricardo, Omar, Lorena, Adyeni, Areli*

*A los cientos de embriones de pollo utilizados en este trabajo, gracias*

## Resumen

La información sobre la génesis de los tractos de salida ventriculares es un tema controversial. Actualmente se considera que los tractos de salida ventriculares se originan de un primordio embrionario único (constituido histológicamente por miocardio, denominado **conus**), por un proceso de reducción longitudinal y septación. La reducción del **conus** se estimó hasta en 2/3 partes de las dimensiones originales y la septación ocurriría justo en el centro del lumen conal, originando de esta manera dos conductos tubulares transitorios: el cono-pulmonar y el cono-aórtico, ambos conductos posteriormente se transformarían en el tracto de salida de los ventrículos correspondientes. Sin embargo, las características histológicas de la continuidad fibrosa mitroaórtica, un componente del tracto de salida del ventrículo izquierdo del corazón maduro, no concuerda con las características de tejido tipo miocardio del supuesto cono-aórtico. Para responder a esa incógnita se han propuesto varios procesos celulares que expliquen la desaparición del miocardio del cono-aórtico. Las propuestas incluyeron: reabsorción del miocardio, desdiferenciación hacia tejido fibroso, y apoptosis del miocardio. Sin embargo estudios experimentales sugieren que la reducción y correcta alineación del conotrunko con las grandes arterias, se debe a un proceso de apoptosis masiva del miocardio del **conus**, **truncus** o ambos. Además recientemente se ha desarrollado el concepto de 1º y 2º campos cardiacos. El primer campo, se representa por las células que forman el corazón en etapa de “tubo recto” y se propone que desarrollará al ventrículo izquierdo y al segmento atrial. Posteriormente se adicionan nuevas poblaciones celulares desde un 2º

campo, causando la aparición del **conus** y el **truncus**. Se menciona que el destino del miocardio del conotronco será el miocardio del ventrículo derecho. Dejando sin sustento la reducción longitudinal por apoptosis masiva del conotronco. Por lo anterior nos propusimos investigar los cambios topológicos del miocardio del **conus** y su relación en el desarrollo del canal atrioventricular durante la septación cardiaca, para tratar de proponer un modelo de desarrollo cardiaco que explique la formación de los tractos de salida ventriculares. Utilizamos técnicas de marcaje selectivo de tinta china/carbón en corazones en desarrollo del embrión de pollo que por sus características de manipulación *in ovo* es posible hacer estudios longitudinales. Marcamos los límites anatómicos del miocardio del **conus**, en sus paredes: ventral, dorsal, derecha e izquierda, después rastreamos el destino de todo el miocardio conal en el corazón maduro. También marcamos el cojín ventrosuperior del canal atrioventricular. Estudiamos el patrón de distribución de células en apoptosis. Por tinciones de rutina, analizamos los cambios topológicos del miocardio, del tejido mesenquimal, así como del lumen del **conus** y del canal atrioventricular. Posteriormente hicimos inmunodetección de proteínas que participan en las uniones ocluyentes, adherentes y comunicantes entre el miocardio conal. Encontramos que el **conus** termina de integrarse al corazón en estadio 22HH, es una estructura derecha y el canal atrioventricular es izquierdo. El miocardio del **conus**, tenía estructura tubular similar a la letra "O", en estadios 24HH-28HH, el miocardio perdió continuidad en una región dorso-izquierda, los bordes libres de miocardio, se fueron desplazando en sentidos opuestos hasta formar una estructura similar a la letra "U", los extremos libres siguieron desplazándose en dirección ventral, hasta finalmente transformarse en gran parte

de la pared libre del ventrículo derecho. Por otro lado los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular se acercaron paulatinamente (22HH-24HH), hasta fusionarse para formar el tabique medio del canal atrioventricular (26HH), el tejido mesenquimal adyacente a la zona de apertura del miocardio conal y el cojín ventrosuperior del canal atrioventricular formaron un continuo en la zona de apertura impidiendo el corto circuito cardiaco. Las marcas plásticas colocadas en el cojín ventrosuperior, se encontraron en la valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda, en la continuidad fibrosa mitroaórtica y en una porción lisa y paramedial del tabique interventricular; lo que sugiere que los cojines del canal atrioventricular se transformaron en el tracto de salida del ventrículo izquierdo y en gran parte del esqueleto fibroso del corazón. Los procedimientos de inmunodetección, focalizados en la zona de apertura del **conus** sugieren que solo las uniones comunicantes, dejan de expresarse conforme el miocardio del **conus** de la pared dorsoizquierda pierde continuidad tubular. Es probable que la pérdida de adhesión celular del miocardio conal sea mediada por la fosforilación de  $\beta$ -Catenina en Thr<sup>393</sup>. Con esta información, proponemos que los tractos de salida ventriculares se originan desde primordios embrionarios distintos: el tracto de salida del ventrículo derecho por la transformación del **conus**, y el tracto de salida del ventrículo izquierdo se origina desde el tabique medio del canal atrioventricular. Estos hallazgos pueden aportar información para interpretar la etiología de las cardiopatías congénitas troncoconales, grupo de cardiopatías de mayor incidencia a nivel mundial.



## Abstract

Information on the genesis of ventricular outflow tracts is a controversial issue. Currently, ventricular outflow tracts are considered to originate from a single embryonic primordium (histologically constituted by myocardium, called **conus**), by a process of longitudinal reduction and septation. The reduction of the **conus** was estimated up to 2/3 of the original dimensions and the septation of interruption just in the center of the conical lumen, thus originating two transient tubular ducts: the pulmonary cone and the aortic cone, both posterior conductors they would become the exit tract of the corresponding ventricles. However, the histological features of mitroaortic fibrous continuity, a component of the left ventricular outflow tract of the mature heart, do not match the characteristics of the myocardial tissue of the supposed cone-aortic. To answer this question, several mobile processes have been proposed that explain the disappearance of the myocardium from the aortic cone. The proposals included: myocardial reabsorption, dedifferentiation to fibrous tissue, and myocardial apoptosis. However, experimental studies that reduce and correct the alignment of the conotron with the great arteries, must a process of massive apoptosis of the myocardium of the **conus**, trunk or both. In addition, the concept of 1st and 2nd cardiac fields has recently been developed. The first field is represented by the cells that form the heart in the "straight tube" stage and is proposed to develop the left ventricle and the atrial segment. Subsequently, new cell populations are added from a 2nd field, causing the appearance of the **conus** and the trunk. It is mentioned that the fate of the conotron myocardium will be the right ventricular myocardium. Leaving the longitudinal reduction by massive

apoptosis of the conotron without sustenance. Therefore, we set out to investigate the topological changes of the myocardium of the **conus** and its relationship in the development of the atrioventricular canal during cardiac septation, to try to propose a cardiac development model that explains the formation of the ventricular outflow tracts. We use selective marking techniques of Chinese ink / charcoal in developing hearts of the chicken embryo that, due to its in ovo handling characteristics, longitudinal studies are possible. We mark the anatomical limits of the **conus** myocardium, on its walls: ventral, dorsal, right and left, then trace the fate of the entire conal myocardium in the mature heart. We also mark the ventrosuperior cushion of the atrioventricular canal. We study the pattern of distribution of cells in apoptosis. By routine stains, we analyze the topological changes of the myocardium, mesenchymal tissue, as well as the lumen of the **conus** and the atrioventricular canal. Subsequently we did immunodetection of proteins that participate in occluders, adherent and communicating junctions between the conal myocardium. We found that the **conus** finishes integrating with the heart in stage 22HH, it is a right structure and the atrioventricular canal is left. The myocardium of the **conus**, had a tubular structure similar to the letter "O", in stages 24HH-28HH, the myocardium lost continuity in a dorso-left region, the free myocardial edges, moved in opposite directions until forming a similar structure to the letter "U", the free ends continued to move in the ventral direction, until finally becoming a large part of the free wall of the right ventricle. On the other hand, the ventrosuperior and dorsoinferior cushions of the atrioventricular canal gradually approached (22HH-24HH), until they merged to form the middle septum of the atrioventricular canal (26HH), the mesenchymal tissue adjacent to the opening

zone of the conal myocardium and the ventrosuperior cushion of the atrioventricular canal formed a continuum in the opening zone preventing the short cardiac circuit. The plastic marks placed in the ventrosuperior cushion were found in the anteroseptal leaflet of the left atrioventricular valve, in the mitroaortic fibrous continuity and in a smooth and paramedial portion of the interventricular septum; which follows that the atrioventricular canal cushions became the left ventricular outflow tract and largely the fibrous skeleton of the heart. Immunodetection procedures, focused on the opening area of the **conus**, suggest that only the communicating junctions cease to express themselves as the **conus** myocardium of the back-left wall loses tubular continuity. The loss of cellular adhesion of the conal myocardium is likely to be mediated by the phosphorylation of  $\beta$ -Catenin in Thr393. With this information, we propose that ventricular outflow tracts originate from different embryonic primordia: the outflow tract of the right ventricle due to the transformation of the **conus**, and the outflow tract of the left ventricle originates from the middle septum of the atrioventricular canal. These findings can provide information to interpret the aetiology of congenital congenital heart disease, a group of heart diseases with the highest incidence worldwide.

## Abreviaturas

Ad	Atrio derecho
Ai	Atrio izquierdo
Ao	Arteria aorta
Ap	Arteria pulmonar
Canal-AV	Canal atrioventricular
H&E	Hematoxilina-eosina
Marcaje-stc	Marcaje selectivo de tinta china/carbón
RtVd	Región trabéculada del ventrículo derecho
RtVi	Región trabéculada del ventrículo izquierdo
TeV	Tracto de entrada ventricular
TeVd	Tracto de entrada del ventrículo derecho
TeVl	Tracto de entrada del ventrículo izquierdo
TiV	Tabique interventricular
TsV	Tracto de salida ventricular
TsVd	Tracto de salida del ventrículo derecho
TsVi	Tracto de salida del ventrículo izquierdo
Vd	Ventrículo derecho
Vi	Ventrículo izquierdo
vAVd	Válvula atrioventricular derecha
vAVl	Válvula atrioventricular izquierda

# Índice

Resumen	<a href="#">6</a>
Abstract	<a href="#">9</a>
Abreviaturas	<a href="#">12</a>
1. Introducción	<a href="#">16</a>
1.1. Anatomía del corazón	<a href="#">16</a>
1.1.1. El corazón	<a href="#">16</a>
1.1.2. El segmento ventricular	<a href="#">17</a>
1.1.3. Los tractos de salida ventriculares	<a href="#">17</a>
1.1.4. Regiones trabeculadas ventriculares	<a href="#">19</a>
1.1.5. Tractos de salida ventricular	<a href="#">19</a>
1.1.6. El esqueleto fibroso del corazón	<a href="#">21</a>
1.2. Desarrollo embrionario del corazón	<a href="#">22</a>
1.2.1. Desarrollo temprano	<a href="#">22</a>
1.2.2. Corazón asa en C y asa en S	<a href="#">25</a>
1.2.3. La septación cardiaca	<a href="#">26</a>
1.2.4. Desarrollo y septación del <i>conus</i>	<a href="#">27</a>
1.2.5. Desarrollo de los cojines del canal AV	<a href="#">29</a>
1.3. Teorías sobre la remodelación del conotrongo	<a href="#">31</a>
1.3.1. Acortamiento del <i>conus</i>	<a href="#">31</a>
1.3.2. Apoptosis del conotrongo	<a href="#">31</a>
1.4. Técnicas para evidenciar células en apoptosis	<a href="#">33</a>
1.5. Uniones celulares	<a href="#">34</a>

1.5.1. Uniones ocluyentes	<a href="#">34</a>
1.5.2. Uniones adherentes	<a href="#">36</a>
1.5.3. Uniones comunicantes	<a href="#">36</a>
2. Planteamiento del problema	<a href="#">38</a>
3. Hipótesis	<a href="#">39</a>
4. Justificación	<a href="#">40</a>
5. Objetivos	<a href="#">41</a>
5.1. Objetivo General	<a href="#">41</a>
5.2. Objetivos específicos	<a href="#">41</a>
6. Material y métodos	<a href="#">42</a>
6.1. Animales	<a href="#">42</a>
6.2. Marcas plásticas	<a href="#">42</a>
6.3. Marcaje selectivo	<a href="#">43</a>
6.4. Procedimientos histológicos	<a href="#">44</a>
6.5. Inmunodetección	<a href="#">44</a>
6.6. Microscopia electrónica de barrido	<a href="#">45</a>
6.7. Diagrama de flujo de los métodos	<a href="#">45</a>
7. Resultados	<a href="#">46</a>
7.1. Cambios topográficos e histológicos del <i>conus</i> y del canal AV	<a href="#">46</a>
7.2. Patrón apoptótico durante la septación del <i>conus</i>	<a href="#">53</a>
7.3. Destino de las paredes conales	<a href="#">58</a>
7.4. Marcaje del cojín ventrosuperior del canal atrioventricular	<a href="#">59</a>
7.5. Cambios en la matriz extracelular de la zona adyacente a la apertura del <i>conus</i>	<a href="#">62</a>

7.6. Cambios en la uniones ocluyentes, adhesivas y comunicantes del miocardio de la pared dorsoizquierda	<a href="#">63</a>
8. Discusión	<a href="#">68</a>
8.1. Origen y destino del miocardio conal	<a href="#">69</a>
8.2. Remodelación del <i>conus</i> durante la septación cardíaca	<a href="#">70</a>
8.3. Uniones celulares del miocardio en la zona de apertura conal	<a href="#">71</a>
8.4. Apoptosis y desarrollo del <i>conus</i> .	<a href="#">73</a>
8.5. Septación del <i>conus</i>	<a href="#">74</a>
8.6. Participación de los cojines del canal atrioventricular en la génesis del tracto de salida del ventrículo izquierdo	<a href="#">75</a>
9. Conclusiones	<a href="#">78</a>
10. Perspectivas	<a href="#">79</a>
11. Referencias	<a href="#">80</a>
12. Anexo I. Artículo Científico	<a href="#">89</a>

# I. Introducción

## 1.1. Anatomía del corazón

### 1.1.1. El corazón

El corazón, órgano principal del aparato circulatorio, es un músculo hueco compuesto de cuatro cámaras, funciona como una bomba aspirante e impelente de la sangre, anatómicamente se ubica en la porción inferior del mediastino, entre los pulmones y por delante de la columna vertebral (**Arteaga et al., 1987**) (**Figura 1A**). Se considera que la silueta del corazón tiene forma de triángulo invertido, la base es una línea imaginaria ubicada entre la unión de los atrios y los ventrículos, incluyendo la porción inicial de las grandes arterias, la punta del triángulo se representa por la punta del corazón, también conocida como ápex cardiaco (**Anderson y Becker 1982**) (**Figura 1B y C**). Además, se reconocen dos bordes: el borde agudo que corresponde a la pared derecha de la silueta cardiaca y el borde obtuso formado por la pared izquierda de la silueta (**Figura 1C**). Recorriendo desde la porción central de la base, hacia la punta, se puede distinguir el surco interventricular anterior. Para su estudio, el corazón se divide en tres segmentos fácilmente distinguibles: el segmento atrial, el segmento ventricular y el segmento arterial (**Arteaga et al., 1987**). El segmento atrial se constituye por ambos atrios, derecho (**Ad**) e izquierdo (**Ai**); los atrios se encuentran separados por un tabique muy delgado llamado tabique interatrial; los atrios reciben la sangre procedente de las venas pulmonares y de las venas cava inferior y superior, posteriormente la sangre pasará al segmento ventricular, por medio de los orificios atrioventriculares que contienen una válvula que regula el paso de sangre evitando



así la regurgitación. El segmento ventricular está formado por los ventrículos derecho (**Vd**) e izquierdo (**Vi**), también se encuentran separados por un tabique que es mayoritariamente muscular, y una porción pequeña de tejido fibroso que separa al **Ad** del **Vi**, En conjunto se conoce como tabique interventricular (**TiV**). Finalmente, el segmento arterial, incluye a la arteria pulmonar (**Ap**) y la arteria aorta (**Ao**); la **Ap** recibe la sangre venosa procedente del **Vd** para llevarla hacia los pulmones. Por su parte la **Ao** recibe la sangre arterial procedente del **Vi** y la distribuye a todo el cuerpo, incluyendo al propio corazón.

### **1.1.2. El segmento ventricular**

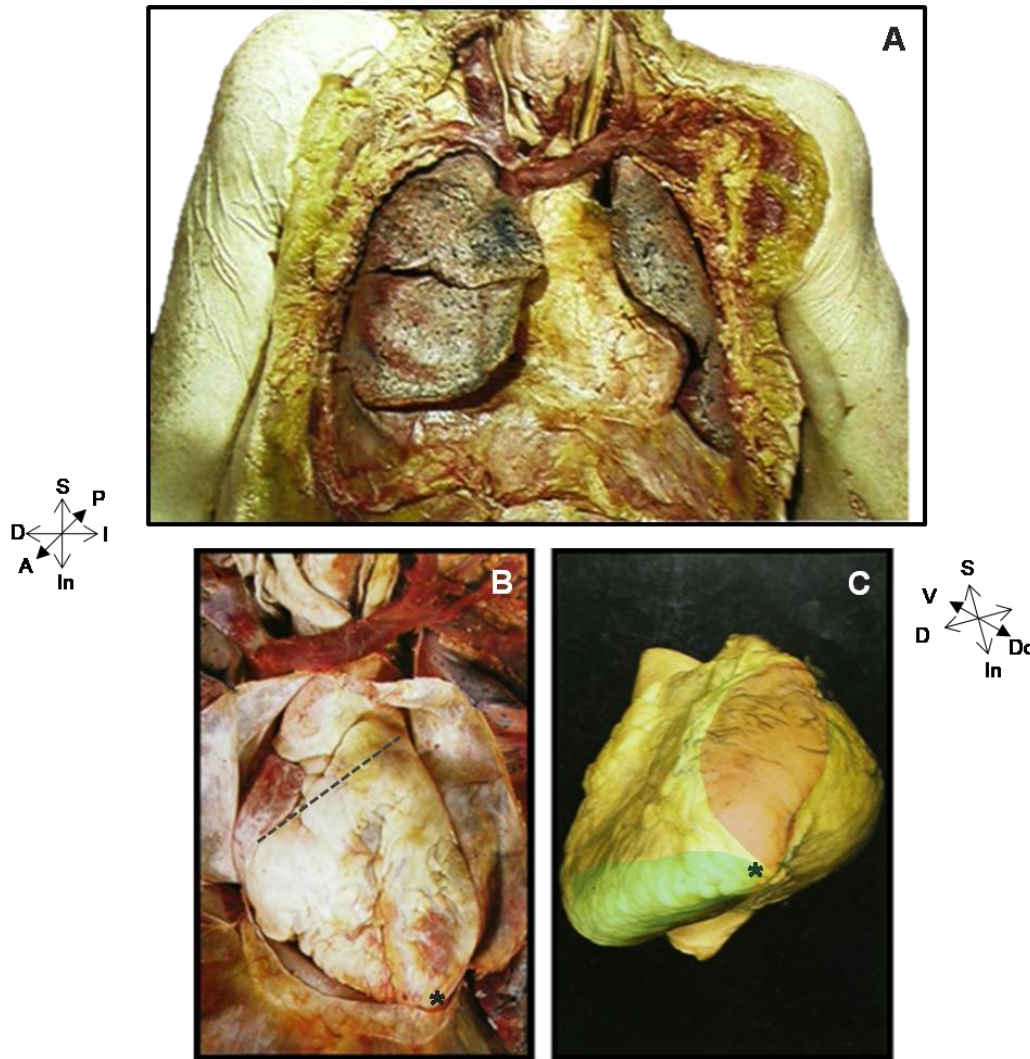
Ambos ventrículos tienen las mismas características anatomofuncionales: 1) Un tracto de entrada ventricular que aloja una válvula atrio-ventricular y su aparato tensor músculo tendinoso, la válvula regula el paso de sangre del atrio al ventrículo. 2) Una región trabéculada y 3) un tracto de salida ventricular que contiene a la válvula ventrículo-arterial que regula el paso de sangre del ventrículo a la arteria correspondiente (**Anderson y Becker 1982; Arteaga et al., 1987**).

### **1.1.3. Los tractos de entrada ventriculares**

El tracto de entrada ventricular del **Vd** se caracteriza por contener la válvula atrioventricular derecha o tricúspide, los límites anatómicos del tracto, incluyen desde la inserción de los músculos papilares anclados en la zona trabéculada, hasta el anillo valvular insertado en el esqueleto fibroso del corazón (**Figura 2B**). Por otro lado, el tracto de entrada ventricular del **Vi** aloja a la válvula atrioventricular izquierda o mitral, sus límites anatómicos también corresponden a

la línea de inserción de los músculos papilares de su aparato tensor valvular, hasta el anillo valvular que también se integra al esqueleto fibroso del corazón (**de la Cruz and Markwald 1998**) (Figura 2C).

**Figura 1**



**Figura 1.** El corazón. A) Situación espacial. B) Silueta cardíaca, con una línea punteada se muestra la base cardíaca y con asterisco la punta. En C, se adicionó digitalmente color azul para identificar el borde agudo y en color rojo el borde obtuso, con un asterisco se muestra la punta. Modificada de Anderson y Becker (1982).

#### **1.1.4. Regiones trabeculadas**

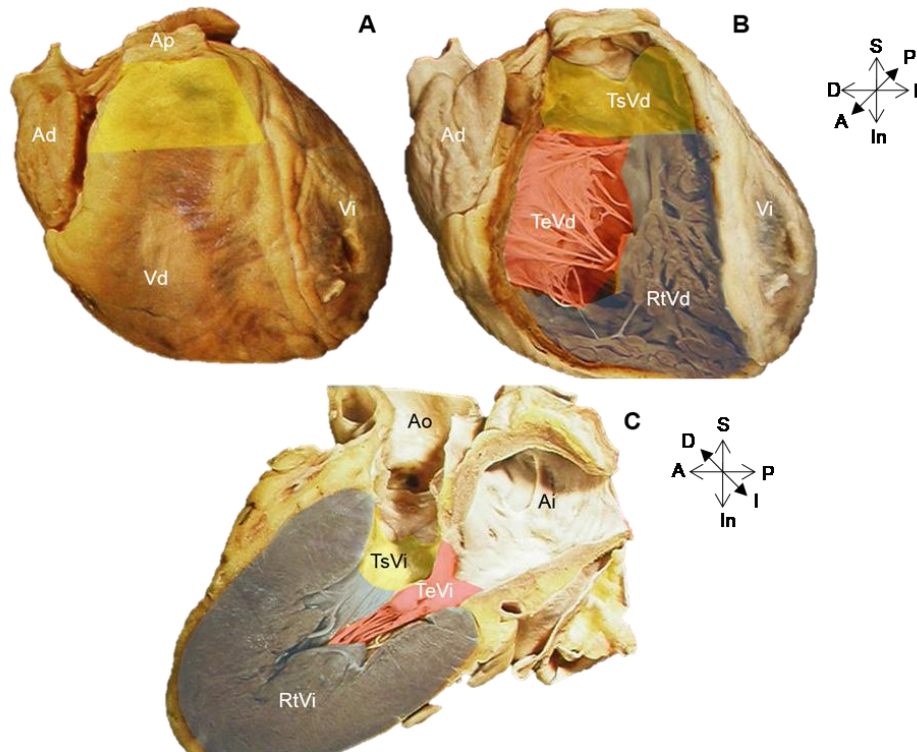
La región trabeculada del **Vd** se caracteriza por presentar trabéculas musculares gruesas, que se extienden desde la inserción de los músculos papilares hasta la punta ventricular (**Arteaga et al., 1987**). Algunas estructuras musculares destacadas son: la trabécula septomarginalis, la banda moderadora, la cresta supraventricular y los músculos papilares anterior y papilar del cono. Por el contrario, la región trabeculada del **Vi**, se caracteriza por trabeculaciones delgadas, los músculos papilares anterolateral y posteromedial, son fácilmente diferenciables (**Figuras 2B y C**).

#### **1.1.5. Tractos de salida ventriculares**

El tracto de salida del **Vd**, también se conoce como infundíbulo, se encuentra anterior y superior respecto del tracto de salida del **Vi**, superficialmente tiene forma de un cono truncado (**Figura 2A**), internamente sus límites anatómicos se encuentran desde el anillo de inserción de la válvula pulmonar, hasta el borde libre de la cresta supraventricular, se compone de 3 paredes de características musculares: la región subvalvular de la pared libre anterior del **Vd**, la cresta supraventricular y el limbo anterior de la trabécula septomarginalis (**Figura 2B**). El tracto de salida del **Vi**, también llamado vestíbulo, no es perceptible desde la anatomía superficial, se encuentra posterior e inferior respecto del tracto de salida del **Vd**, sus límites anatómicos son desde el anillo de inserción de la **Ao**, hasta el borde libre de la valva anteroseptal de la válvula mitral (la valva anteroseptal es una estructura anatómica compartida por el tracto de salida y el tracto de entrada del **Vi**). Sus paredes son mixtas: musculares y fibrosas; la porción muscular

corresponde a una porción lisa y paramedial del **TiV**, las porciones fibrosas corresponden al tabique atrioventricular y la continuidad fibrosa mitroaórtica (**Figura 2C**).

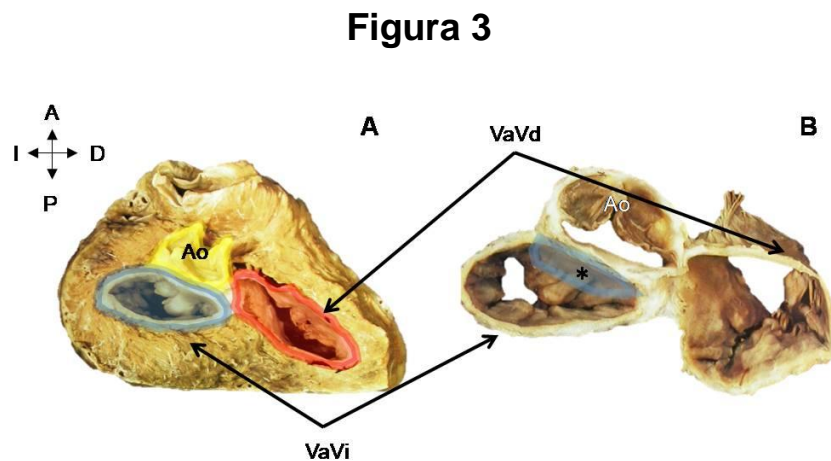
**Figura 2**



**Figura 2.** Tractos de entrada, zonas trabéculadas y tractos de salida ventriculares. A) Digitalmente se muestra la región del tracto de salida del Vd. B y C) Disección de la pared libre de ambos ventrículos, se observa el tracto de entrada en rojo, sombreado en azul la región trabéculada y en amarillo el tracto de salida ventricular. En C) se puede observar que la continuidad fibrosa mitroaórtica, forma parte de los tractos de entrada y salida ventricular. Modificada de Anderson y Becker (1982).

### 1.1.6. El esqueleto fibroso del corazón

Es una estructura de características fibrosas que se ubica en el centro del corazón, se compone de tres anillos continuos de tejido fibroso: 1) la válvula atrioventricular derecha, 2) la válvula atrioventricular izquierda incluyendo a la continuidad fibrosa mitroaórtica y 3) la válvula aórtica. La zona de convergencia entre los anillos se denomina cuerpo fibroso central, estructura que tiene relación con el tabique atrioventricular que separa al **Ad** del **Vi**. También del anillo aórtico, emergen tres puntales que corresponden a las zonas de inserción de las válvulas sigmoideas aórticas (**Figura 3A y B**). Es relevante destacar que la válvula pulmonar no forma parte del esqueleto fibroso (**Figura 3B**). Se piensa que la función del esqueleto fibroso es darle soporte estructural a las válvulas atrioventriculares y aórtica, anclándolas en la masa muscular (**Saremi et al., 2017**).



**Figura 3.** El esqueleto fibroso cardíaco. En A) se colorearon digitalmente los componentes del esqueleto cardíaco: azul y rojo válvulas atrioventriculares derecha e izquierda, en amarillo el anillo de inserción de la válvula ventrículo-arterial izquierda. En B se ha disecado el esqueleto fibroso, es posible apreciar la formación de una unidad anatómica, digitalmente se ha adicionado color azul a la continuidad fibrosa mitroaórtica.

Modificada de Anderson y Becker (1982). Abreviaturas: vAVd= Válvula atrioventricular derecha, vAVi= Válvula atrioventricular izquierda. Brújula: A= Anterior, D= Derecha, P= Posterior, I= Izquierda.

---

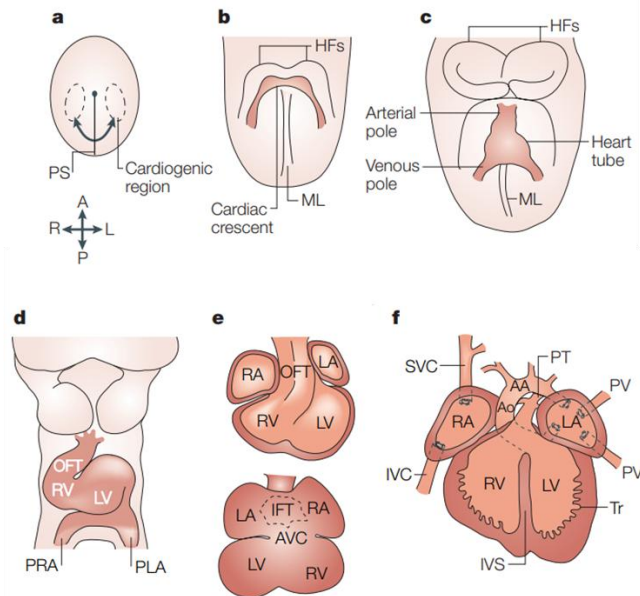
## **1.2. Desarrollo embrionario del corazón**

### **1.2.1. Desarrollo temprano**

En aves y mamíferos, el corazón es el primer órgano en adquirir capacidades funcionales, aunque anatómicamente se encuentre en estado primordial. Los primeros indicios del desarrollo cardíaco se observan representados por dos grupos de células que están determinadas para diferenciarse en miocardio, se ubican en el epiblasto en posiciones contralaterales respecto de la línea primitiva (**Figura 4a**), fueron nombradas pre-áreas cardiogénicas (**Rawles 1943**). Durante la gastrulación las células que constituyen las pre-áreas cardiogénicas migran a través de la línea primitiva. Estas células, ahora mesodermales continúan migrando lateralmente, reuniéndose en una región anterior de la gástrula llamada: mesodermo esplácnico; estas células mesodermales van a diferenciarse en células cardíacas en respuesta a señales inductoras desde el endodermo, como la proteína morfogenética del hueso (**Mikawa 1999**). En el mesodermo, hay cinco factores de transcripción que se consideran genes primordiales involucrados en el desarrollo cardíaco, son genes altamente conservados a través de la evolución: NKX2.5, Mef2, GATA, Tbx y Hand (**Olson 2006**). Esta red de genes controla el destino de las células cardíacas, activando otros genes que codifican proteínas para la morfogénesis cardíaca. Las células pre-cardíacas se consideran multipotentes y se diferenciarán en células miocárdiales, endoteliales y del

músculo liso (**Epstein et al., 2010**). Las células pre-cardiacas migran en dirección cefalomedial, para formar la creciente cardiogénica que tiene forma de herradura (**Figura 4b**). En esta etapa las células que conforman la creciente cardiogénica expresan mayoritariamente la proteína NKX2.5, la cual produce entre otras, la expresión de la proteína ligera de la miosina (**Lints et al., 1993**). Después, la creciente cardiogénica se desplaza en dirección ventromedial, ahí se fusiona para formar un tubo en forma de T invertida (**Figura 4c**), esta estructura es conocida como “corazón en tubo recto” (**Stalberg y DeHaan 1969**). En esta etapa, el corazón histológicamente se constituye por una capa tubular de miocardio revestida de endocardio y entre ambos tejidos los separa una abundante matriz extracelular llamada gelatina cardiaca (**Davis 1927**).

**Figura 4**



**Figura 4.** Morfogénesis del corazón. a. pre-áreas cardiogénicas presentes en la etapa de blástula. En b. formación de la media luna cardíaca con células diferenciadas en

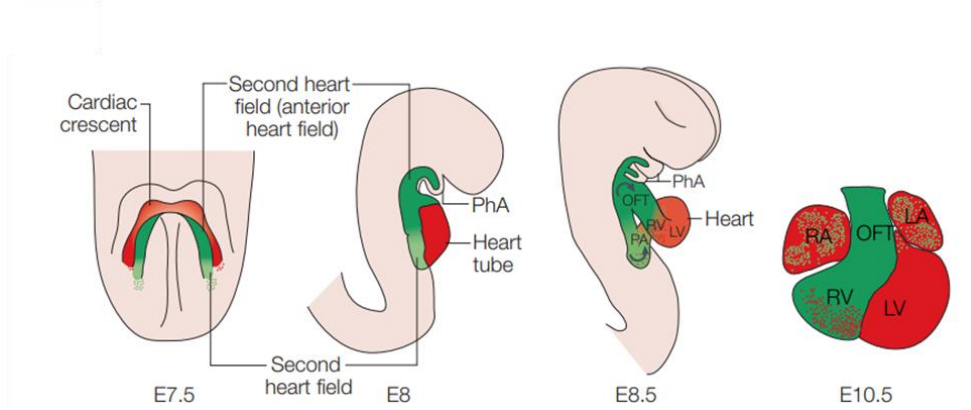
miocardio. c. formación del corazón en tubo recto por fusión de la creciente cardiogénica en el centro de la línea media embrionaria. d. formación del asa en C. e. formación del corazón con cuatro cámaras aún con comunicación entre ellas. f. Corazón con cámaras separadas. Abreviaturas: PT= tronco pulmonar, Ao= aorta, RA= atrio derecho, LA= atrio izquierdo, RV= ventrículo derecho, ventrículo izquierdo, AA= arco aórtico, AVC= canal atrioventricular, IFT= tracto de entrada, IVC= vena cava inferior, IVS= tabique interventricular, OFT= tracto de salida, PLA= atrio izquierdo primitivo, PRA= atrio derecho primitivo, PV= vena pulmonar, SVC= vena cava superior, Tr= Trabécula. ML= línea media, HFs= Pliegues cefálicos. Tomada de Buckingham et al. (2005).

---

En los años 20 del siglo pasado, se propone el “modelo preformista” de la cardiogénesis en el hombre (se utilizaron productos de abortos espontáneos). El modelo describe, qué en el corazón en tubo recto, existen todas las estructuras del corazón maduro, y que paulatinamente crecen a sus proporciones finales (**Davis 1927**). En contraparte, los experimentos de marcaje selectivo con tinta china/carbón (**marcaje-stc**) en embriones de pollo *in vivo*, permitieron establecer estudios longitudinales, que llevaron a proponer un concepto más dinámico del desarrollo cardiaco, el cual describe que en el corazón en tubo recto, solo se encuentran las regiones trabéculadas del **Vd y Vi** en posición céfalo caudal (**de la Cruz et al., 1989, 1991**). Sin embargo recientemente existe amplia información experimental en ratones transgénicos, donde se reporta que en corazón en tubo recto, solo contiene el miocardio correspondiente al primordio del **Vi** y parte del segmento atrial. Con esta información, se ha propuesto que las células de la creciente cardiogénica ahora se nombren: primer campo cardiogénico (**Zaffran et al., 2004; Buckingham et al., 2005**).



**Figura 5**



**Figura 5.** Primer y segundo campos cardiogénicos. En rojo se representa a la creciente cardiogénica, se propone como el precursor del miocardio del ventrículo izquierdo y segmento atrial. En verde, el segundo campo cardiogénico, el cual se adiciona paulatinamente desde el conotrunko, se propone que forma el ventrículo derecho. Abreviaturas: PhA= arcos faríngeos, OFT= tracto de salida, RV= ventrículo derecho, LV= ventrículo izquierdo, PA= atrio primitivo, RA= atrio derecho, Atrio izquierdo. Modificado de Buckingham et al. (2005).

### 1.2.2. Corazón asa en C y asa en S

Actualmente se acepta que al corazón en tubo recto, se adicionan cuatro nuevos segmentos. Dos segmentos se incorporan desde el extremo caudal (tractos de entrada ventriculares y primordios atriales), y dos más, desde su extremo cefálico (el **conus** y el **troncus**), causando que el corazón se pliegue hacia la derecha del embrión, para adquirir una forma en C (asa en C) y posteriormente se tuerce hasta tomar una forma de S (asa en S), **Figura 4D**. Los segmentos inicialmente caudales se movilizan a una posición céfalo-izquierda. El **conus** queda en posición céfalo-derecha, por su parte el **troncus** se orienta medialmente, su extremo distal se interna al cuerpo del embrión y se continúa con el saco aórtico

(Stalberg y DeHaan 1969; Castro-Quezada et al., 1972; de la Cruz et al., 1977, 1989). El **conus** y el **truncus** se originan desde una fuente celular diferente, el segundo campo cardiogénico (Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001; Buckingham et al., 2005), localizado en una posición dorsal al primer campo cardiogénico (Figura 5).

### 1.2.3. La septación cardiaca

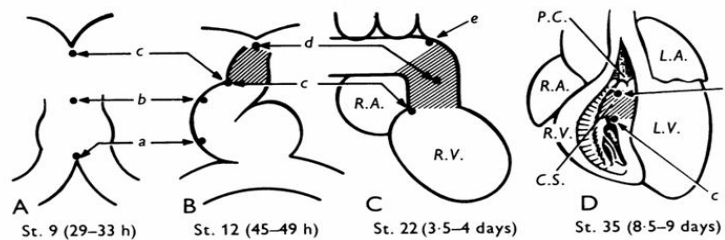
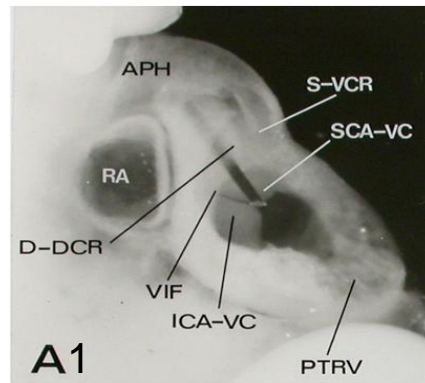
La septación cardiaca inicia en la etapa de asa en S, generalmente se ha descrito que ocurre por engrosamiento de la matriz extracelular, la cual se va poblando paulatinamente por células de tipo mesenquimal, originadas principalmente por transición epitelio-mesenquima que eventualmente formaran un septo para dividir al corazón, generando de esta forma la circulación de doble vía, característica de las aves y los mamíferos (Manner et al., 1993). Adicionalmente, Kirby et al., (1983) demuestra que la septación del **truncus** se origina por la adición de poblaciones celulares procedentes de una porción de la cresta neural (estadio 18-19HH), ubicada entre la vesícula ótica y la tercer somita; las células inicialmente migran a través de los arcos faríngeos 3º, 4º, y 6º para después invadir la porción distal del conotrongo. Así las células de la cresta neural cardíaca formaran el tabique aortopulmonar, el cual eventualmente dividirá al **truncus** en la **Ap** y la **Ao** (Kirby et al., 1983).

### 1.2.4. Desarrollo y septación del **conus**

Experimentos de **marcaje-stc** realizados hace más de 40 años, utilizando como modelo al embrión de pollo, demostraron que el **conus** se adiciona al corazón en

la etapa de tubo recto (estadio 12) de la clasificación de **Hamburger y Hamilton (1951)**, posteriormente en el estadio 14HH aparece el **troncus**, que junto con el **conus** forman el conotronco, en la porción cefálica del corazón (**de la Cruz et al., 1977**). Estudios clásicos describen que la región del **conus** entre los estadios 12HH-16HH, se constituye por una capa continua de miocardio en forma de tubo, revestido de endocardio y entre ellos coexiste una abundante matriz extracelular carente de células. Conforme avanza el desarrollo, la matriz extracelular adquiere la forma de dos abultamientos rectos llamados “crestas del **conus**” una con orientación dextrodorsal y la otra sinistroventral (**de la Cruz 1977; Thompson et al., 1987**), al incrementar de tamaño, las crestas se van poblando de células principalmente por transición epitelio mesénquima (**Eisenberg y Markwald, 1995**), y paulatinamente van separando al **conus** en dos nuevos conductos independientes: “cono-pulmonar” y “cono-aórtico” (**Goor et al., 1972**), también se les conoce como: “cono anterior” y “cono posterior (**Kramer 1942; DeVries y Saunders 1962; Pexieder 1978; de la Cruz et al., 1977**), ver **Figura 6**.

**Figura 6**



**Figura 6.** A<sub>1</sub>. Corazón estadio 22HH con disección para mostrar al cono anterior y cono posterior, se observan las crestas derecha e izquierdas del *conus* (D-DCR y S-VCR respectivamente). Introdujeron un cabello para mostrar la separación del *conus* en dos conductos separados. A-D, esquemas de los resultados de marcaje selectivo del *conus*. En D, el cono anterior se transforma en el tracto de salida del Vd. Abreviaturas: SCA-VC= cojín ventrosuperior del canal atrioventricular, ICA-VC= cojín dorsoinferior del canal atrioventricular, VIF= pliegue ventrículo-infundibular, R.A= atrio derecho, L.A.= atrio izquierdo, R.V.= ventrículo derecho, L.V.= ventrículo izquierdo, PTRV= región trabeculada ventricular, S-VCR= cresta sinistroversal del *conus*, D-DCR= cresta dextrodorsal del *conus*. APH= polo arterial, St= estadio, PC= piso pulmonar. Modificado de: de la Cruz et al., (1977; 1998).

De esta manera, el **conus** pasa de ser un conducto único de forma tubular con forma similar a la letra “O”, hacia dos conductos “∞”. Mediante **marcaje-stc de la**

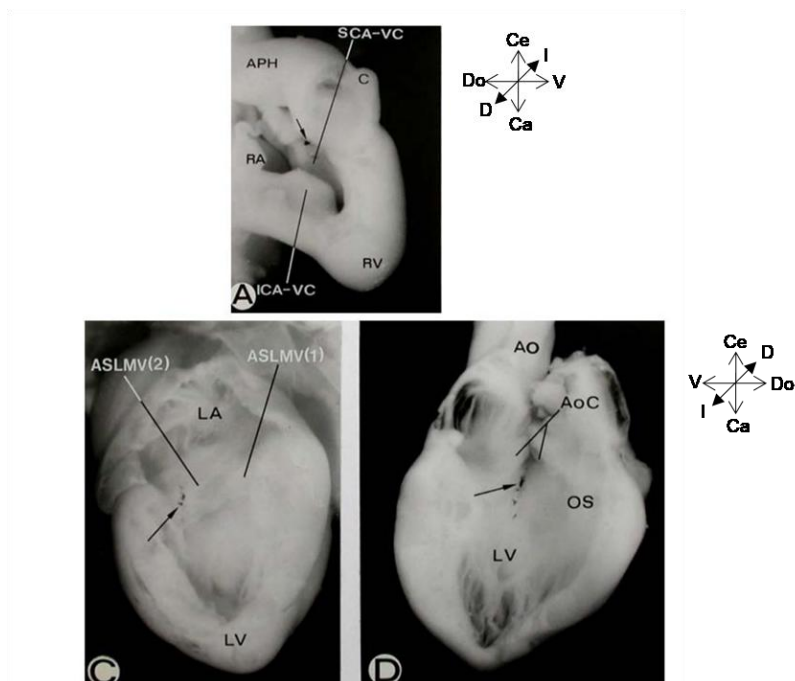
**Cruz y cols. (1977)**, describieron el destino del miocardio de la pared derecha del **conus** (parte del cono-pulmonar), encontraron que las marcas plásticas colocadas en los embriones de estadio 22HH, se habían desplazado en el corazón maduro, a lo largo del tracto de salida del **Vd (Figura 6A-D)**. El destino del cono-aórtico solo se había descrito sobre cortes histológicos en embriones humanos, y la idea generaliza de inicios del siglo pasado, era que el cono-aórtico se transformaría en el tracto de salida del **Vi (Kramer 1972)**. Incluso los experimentos de marcaje del cono-pulmonar fue una base lógica mas no experimental para mantener la idea que el precursor del tracto de salida del **Vi** es la pared izquierda del **conus** (parte del cono-aórtico). Sin embargo recientemente describimos en franca discordancia con la idea clásica de la reducción y septación, que todo el miocardio del **conus** se transforma en miocardio de gran parte de la pared libre anterior del **Vd (Lazzarini et al., 2012)**.

#### **1.2.5. Desarrollo de los cojines del canal atrioventricular**

Durante el estadio 17HH del desarrollo del embrión de pollo, la gelatina cardiaca del canal atrioventricular (**canal-AV**) se va poblando de células de tipo mesenquimal, principalmente derivadas por transición epitelio-mesenquimal. Más tarde se hacen evidentes dos eminencias nombradas cojines del **canal-AV**, uno de los cojines se encuentra en posición ventrosuperior y el otro en posición dorsoinferior. Conforme avanza el desarrollo, ambos cojines se expanden paulatinamente hasta fusionarse en el centro del canal (durante la etapa 26HH), al fusionarse los cojines forman el tabique intermedio del **canal-AV**. Debido a su posición central en el **canal-AV**, el tabique medio produce la formación de la unión

atrioventricular derecha e izquierda. Después el **canal-AV** se desplaza hacia la derecha para alinearse con el **TiV** aun en desarrollo. Concomitante con la formación del tabique medio, aparecen dos cojines más, de apariencia pequeña, localizados en los extremos laterales de los conductos derecho e izquierdo del **canal-AV** (**de la Cruz et al., 1983**). Evidencia experimental sugiere que el cojín dorsoinferior contribuye al desarrollo del tabique atrioventricular y a las regiones vecinas con los tabiques interatrial e interventricular, también participa en el desarrollo de la valva septal de la válvula atrioventricular derecha. Por otro lado el cojín ventrosuperior participaría en la formación de la valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda, también en la formación del tabique membranoso atrioventricular y algunas zonas vecinas del tabique interatrial (**de la Cruz et al., 1982; García-Peláez et al., 1984**) ver (**Figura 7**). La participación de los cojines laterales del **canal-AV** es controversial.

**Figura 7**



**Figura 7.** Marcaje selectivo del cojín ventrosuperior del canal-AV. En A se observa el marcaje selectivo del cojín ventrosuperior del canal-AV. En B y C, se muestra el destino final de las marcas plásticas: la valva anteroseptal (ASML), la línea de inserción de la valva (flechas negras) y una porción lisa del tabique interventricular. Abreviaturas: APC= polo arterial, SCA-VC= cojín ventrosuperior del canal atrioventricular, ICA-VC= cojín dorsoinferior del canal atrioventricular, C= conus, RA= atrio derecho, RV= ventrículo derecho, ASLMV(2)= continuidad fibrosa mitroaórtica, ASLMV(1)= valva anteroseptal de la válvula mitral, LA= atrio izquierdo, LV= ventrículo izquierdo, Ao= aorta, AoC= cúspides aorticas, OS= septum de salida. Modificado de: de De la Cruz M y Markwald R (1998).

---

### **1.3 Teorías de la remodelación del conotrongo**

#### **1.3.1 teoría del acortamiento del miocardio del *conus***

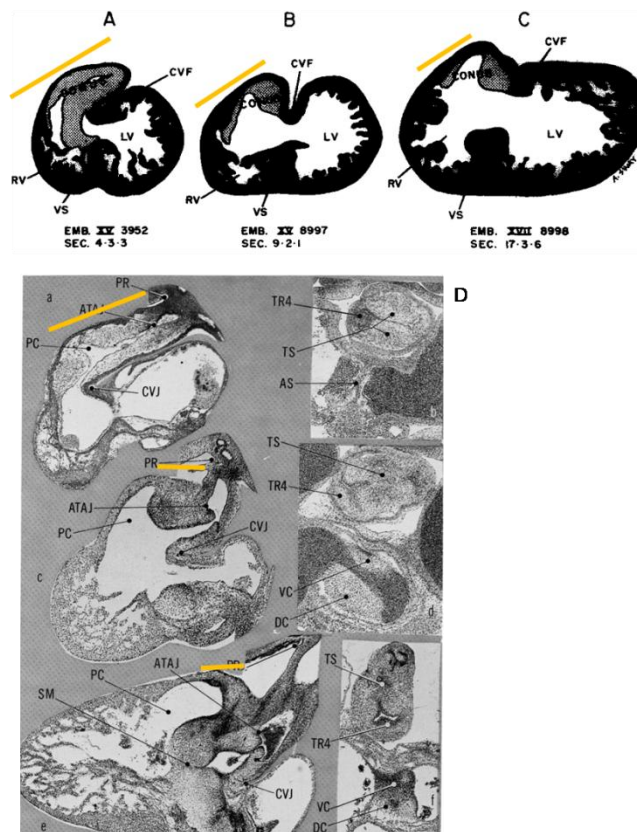
Estudios morfométricos realizados en embriones humanos sugieren que el **conus** reduce sus dimensiones longitudinales llegando a solo un tercio de su longitud original (**Goor et al., 1972**), ver **Figura 7**. También otros estudios donde utilizaron modelos de aves y de mamífero, abonaron información que concuerda con el acortamiento longitudinal y rotación del **conus (Figura 6A-D)**, el **truncus** o ambos (**de la Cruz et al., 1977; Thompson et al. al., 1987; Ya et al., 1998**). Esta idea perduro por cerca de 30 años sin ninguna explicación sobre los mecanismos celulares que explicaran la reducción longitudinal.

#### **1.3.2. Apoptosis del conotruncus**

La muerte celular programada, también conocida como apoptosis, es un mecanismo celular ampliamente expresado durante el desarrollo embrionario, para la eliminación y remodelación de tejidos (**Saunders, 1966; Menkes et al., 1970**). La

presencia de apoptosis durante el desarrollo de los tejidos cardíacos se ha reportado ampliamente (**Pexieder 1975; Poelmann et al., 1998; Watanabe et al., 1998, 2001;**). En la década de 1970, **Pexieder (1972a; 1972b; 1975)** realizó un estudio sobre la apoptosis durante el desarrollo y propuso una lista de más de 30 focos de células en apoptosis, los llamó “sitios de degeneración celular”. Uno de los focos de muerte, correspondió a la región del conotronco. Por otro lado se ha relacionado a la apoptosis del **conus**, como un mecanismo para incrementar el volumen ventricular. Recientemente **Watanabe** y colaboradores (**1998, 2001**) sugieren que la apoptosis masiva del miocardio del conotronco, es la causa del acortamiento longitudinal, la rotación y la correcta alineación de las conexiones ventrículo-arterial.

**Figura 7**





**Figura 7.** Acortamiento del *conus*. En A-C, esquema de la disminución de la longitud del *conus*. D, secciones sagitales de embriones humanos, donde se observa la disminución longitudinal del miocardio conal. Digitalmente se adicionaron líneas amarillas, para evidenciar la reducción conal. Abreviaturas: RV= ventrículo derecho, LV= ventrículo izquierdo, VS= septum interventricular, CVF= flanco conoventricular, CVJ= unión conoventricular, ATAJ= unión aorticotruncal, PR= reflexión del pericardio, TS= septum truncal, TR4= cresta truncal 4, AS= septum atrial, DC cojín dorsal del canal atrioventricular, PC= cono pulmonar, SM= septum membranoso, TR= cresta truncal, VC= cojín ventral del canal atrioventricular. Modificada de Goor et al. (1972).

---

#### **1.4 Técnicas para evidenciar células en apoptosis**

Las técnicas utilizadas para la detección de células en procesos apoptóticos están basadas fundamentalmente en los cambios morfológicos que ocurren en las células afectadas. EL ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) expone células en apoptosis, al polimerizar la enzima “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT), que cataliza la adición de nucleótidos dUTP (digoxigenina-nucleótidos), en los extremos libre 3’OH. Los nucleótidos polimerizados forman un oligómero compuesto por digoxigenina-nucleótidos con nucleótidos no marcados. Por último los fragmentos de ADN que se han etiquetado con la digoxigenina-nucleótidos son revelados por medio del anticuerpo anti-digoxigenina acoplados a fluoresceína. Los tejidos deben ser observados mediante microscopios laser confocal o de epifluorescencia para excitar la fluoresceína e identificar celular positivas para apoptosis. LysoTracker Red (LTR). Es un reactivo supravital que permite identificar, células en apoptosis en el órgano intacto. Este reactivo interactúa con los cuerpos apoptóticos producidos por fragmentación del núcleo celular. Mediante esta técnica se ha

utilizado previamente para estudiar la apoptosis en embriones de pollo, ratón y rata (**Watanabe et al., 1998**).

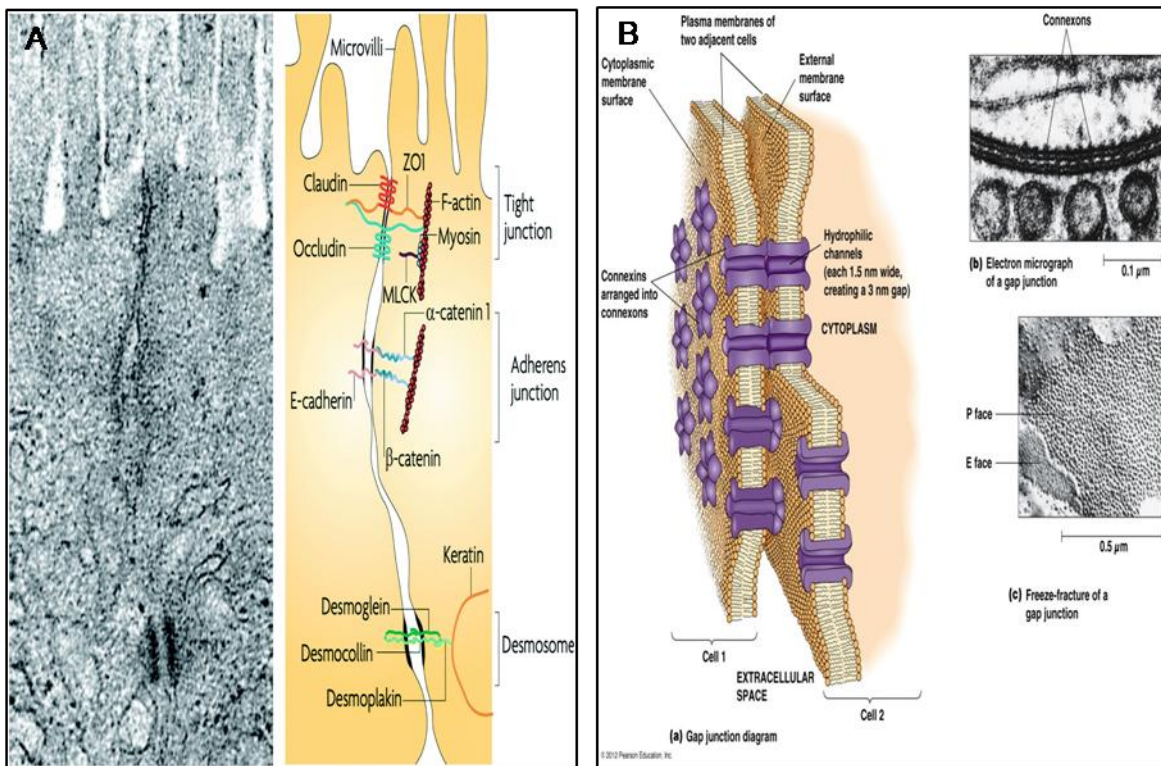
## **1.5 Uniones celulares**

### **1.5.1 Unión ocluyente**

Las uniones estrechas u ocluyentes se encuentran en el vértice que forman las membranas plasmáticas laterales entre células adyacentes (**Figura 8A**). Las uniones ocluyentes rodean a cada célula lo que confiere un sello formado por proteínas, la unión impide la difusión de iones y solutos entre las células. Las uniones estrechas se constituyen principalmente por dos familias de proteínas con características transmembranales: claudinas y occludinas (**Van Itallie y Anderson 2014**); forman complejos homodímeros claudina-claudina y occludina-occludina entre dos células adyacentes. La función de las occludinas es poco clara, ya que los ratones nulos para occludinas son viables, con uniones ocluyentes funcionales y sin defectos notables en la integridad de la barrera epitelial intestinal (**Saitou et al., 1998**). Las claudinas y las occludinas internamente se unen directamente a proteínas citoplasmáticas intermediarias que a su vez, se unen al citoesqueleto de actina (**Umeda et al., 2004**);). Las proteínas intermediarias se agrupan en una familia llamada proteínas de la zona ocluyente (ZO-1, -2, -3), cingulina y proteínas adicionales (**Zihni et al., 2016**). Las proteínas de la zona ocluyente (**ZO**) presentan dominios con multifunción, pueden interactuar con claudinas (PDZ1), occludina (U5 + GUK) y otras moléculas de señalización (**Fanning y Anderson 2009**). El dominio PDZ1 de ZO-1 es esencial para una organización adecuada de la unión ocluyente así como para el complejo de unión asociado al citoesqueleto (**Rodgers**

y Fanning 2011). La unión ocluyente, también juega un papel en la regulación de la proliferación celular. ZO-1 y ZO-2 se unen a la proteína de unión a ácidos nucleicos asociada al factor de transcripción ZO-1 (ZONAB) de manera dependiente de la densidad celular. Algunos genes blanco de ZONAB, incluyen el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y la ciclina D1, que controlan la proliferación celular (Tsapara et al., 2006; González-Mariscal et al., 2014).

**Figura 8**



**Figura 8.** Uniones celulares. A y B. Microfotografía por microscopía electrónica de transmisión y esquema de las uniones ocluyentes y adhesivas. En B esquema y microfotografías por microscopía electrónica de transmisión de las uniones comunicantes. Modificada de Golovkine et al. (2018).

### 1.5.2 Unión adherente

La unión adherente, mantiene la adhesión célula-célula, regula la organización del citoesqueleto de actina (**Figura 8A**) y es considerado un centro para la señalización celular y la regulación de la transcripción génica (**Takeichi 2014**). El tipo principal de proteína presente en las uniones adherentes son la E-cadherina, contienen cinco dominios de repetición de cadherina extracelular, las que participan en la unión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia una cadherina en la superficie celular opuesta (**Shapiro y Weis 2009**). El dominio citoplasmático de E-cadherina forma un complejo ternario con  $\beta$ -catenina, un miembro de la familia de proteínas Armadillo y con  $\alpha$ -catenina; a su vez, la  $\alpha$ -catenina se une a la actina F de manera dependiente de la fuerza (**Buckley et al., 2014**). El complejo cadherina-catenina también se asocia con microtúbulos (**Franz y Ridley 2004**;). La proteína p120-Catenina también se une al complejo ternario de cadherina y regula la vida media de la E-cadherina en la membrana plasmática. La adhesión de E-cadherina se fortalece mediante el reclutamiento de la proteína mecanosensible vinculina, que se une a una conformación de  $\alpha$ -catenina dependiente de la fuerza. La fuerza mecánica une el complejo ternario E-cadherina con el citoesqueleto de actina y fortalece la adhesión entre las células, lo que enfatiza la importancia del entorno mecánico de los tejidos para regular la estructura y la función de las uniones célula-célula.

### 1.5.3 Uniones comunicantes

Las uniones comunicantes son canales citoplasmáticos intercelulares compuestos de una disposición de proteínas transmembranales. Estas proteínas forman

hemicanales que, aunque no están alineadas, forman un canal para las moléculas citosólicas (como el glutamato y el ATP) al medio extracelular (**Saez 2003**). Estos canales permiten el intercambio de iones intracelulares, segundos mensajeros y pequeños metabolitos (de 1 a 2 kDa), permitiendo el paso del potencial de acción a través de las células adyacentes (**Goodenough y Paul 2009**). Por lo que se les consideran conductos de transferencia de corriente eléctrica y una ruta fundamental para coordinar la señalización celular (**Ribeiro-Rodrigues et al. 2017**). (**Figura 8B**). En el miocardio los principales solutos (iones, metabolitos, cAMP, IP3) difunden por estas uniones de manera uniforme, pasando de miocardiocito en miocardiocito permitiendo de esta manera una distribución electroquímica homogénea a todo lo largo de la fibra muscular, lo que permite la rápida propagación de los potenciales de acción y por ende la contracción armoniosa del tejido cardiaco (**Carmeliet 2019**). En las uniones comunicantes la proteína predominante es la Conexina 43 (Cx43) nombrada así por su peso molecular 43kDa (kDa). Presenta un dominio transmembranal y un dominio extracelular. Seis proteínas Cx43 se asocian en grupos para formar un hemicanal, los hemicales de células adyacentes pueden unirse por interacción homóloga para formar un “túnel comunicante” (**Vinken 2015**).

## II. Planteamiento del Problema

El origen de los componentes embrionarios del corazón es un tema no terminado. La génesis de los tractos de salida ventriculares y de las válvulas atrioventriculares es controversial. El entendimiento del desarrollo cardiaco es imprescindible, debido a sus repercusiones clínicas, de conocimiento básico, incluso del proceso evolutivo. Recientemente descubrimos que el miocardio del **conus** se transforma en gran parte del **Vd**, incluyendo su tracto de salida, sin embargo, quedó sin concluir los procesos morfogénéticos involucrados en la pérdida de continuidad tubular, así como el origen del tracto de salida del **Vi**.

### **III. Hipótesis**

Si se marcan selectivamente las paredes de miocardio del conus, y el mesenquima del canal atrioventricular, en un estado inicial del desarrollo (estadio 22HH) y posteriormente se encuentran rastros de las marcas en estructuras anatómicas del corazón maduro (36HH), entonces estas estructuras tendrían un origen embrionario en las estructuras con marcaje selectivo. En este proceso, los cambios en el espacio, la apoptosis y la integridad de uniones celulares tendrán un patrón diferencial y una función remodeladora.

## IV. Justificación

Los defectos congénitos son una de las principales causas de muerte perinatal, la incidencia de defectos cardiacos afectan a 8 de cada 1,000 nacidos vivos, de los cuales las cardiopatías congénitas del tipo troncoconales afectan alrededor de 2 de cada 1,000. Por lo que es relevante conocer el desarrollo normal de los tractos de salida ventriculares para entender la embriopatogenia de las cardiopatías congénitas causadas que afectan el desarrollo de las conexiones ventrículo arterial. Los datos obtenidos podrán aportar información necesaria para estudios moleculares así como estrategias de tratamientos de corrección *in útero*.



## V. Objetivo general

Investigar los cambios topológicos del **conus**, y su relación en el desarrollo de los cojines del canal atrioventricular y los mecanismos morfogénicos involucrados en la pérdida de continuidad de la pared dorsoizquierda del miocardio conal, durante la septación cardíaca.

### 5.1 Objetivos específicos

1. Rastrear el destino de las paredes del miocardio del **conus** y su relación con los cojines del **canal-AV**.
2. Determinar el patrón espacio temporal de cardiomiocitos apoptóticos del **conus** y del **canal-AV**.
3. Investigar los cambios espacio temporales de las uniones comunicantes, estrechas y ocluyentes, del miocardio de la región dorsoizquierda del **conus**.
4. Investigar los cambios espacio temporales de los cambios de la matriz extracelular de la zona dorsoizquierda del **conus**.

## VI. Material y métodos

### 6.1. Animales

Se obtuvieron huevos fértiles de gallina (*Gallus gallus*) libres de patógenos específicos de la granja ALPES (Puebla, México). Los huevos fueron incubados a 37.8 °C y 60 % de humedad relativa hasta obtener embriones en estadio 22HH. Posteriormente se abrió una ventana de 1 cm<sup>2</sup> en la superficie superior del cascaron, y se disecaron la membrana alantoidea y el pericardio para exponer el corazón, se realizó **marcaje-stc** en las distintas paredes del miocardio conal, con algunas modificaciones como describe **de la Cruz y cols. (1977)**. Los embriones fueron manipulados conforme la Norma Oficial Mexicana (**NOM-062-ZOO-1999**). Adicionalmente la metodología fue aprobada por el comité de ética del Hospital Infantil de México, Federico Gómez con número de proyecto **HIM-2013-060**.

### 6.2. Marcas plásticas

Las marcas plásticas fueron preparadas con algunas modificaciones de la técnica descrita por **Seichert (1965)**. Se prepararon filamentos de vidrio de aproximadamente 10 µM de diámetro y 10 cm de longitud. Se calentaron al rojo vivo dos varillas de vidrio unidas por uno de sus extremos y posterior estiramiento súbito. Después los filamentos fueron cubiertos con una mezcla de gelatina acuosa al 5% (1 ml) y carbón activado (0,17 g), se mezclaron en un tubo Eppendorf y se agitaron suavemente en agua tibia (70 °C) durante 3 minutos.

### 6.3. Experimento de marcaje selectivo

Fueron utilizados embriones en estadio 22HH, con las características anatómicas normales para la edad de gestación, aleatoriamente se formaron cinco grupos: *G I*. Para determinar el destino prospectivo del miocardio de la pared derecha del **conus**. Un filamento cubierto con carbón/gelatina fue insertado por algunos segundos, en el miocardio del límite anatómico entre el **conus** y la región trabéculada ventricular. Otro filamento fue insertado en el límite anatómico entre el **conus** y el **troncus**, el cual se representa por un ángulo recto que se forma entre ambas estructuras. Al retirar los filamentos se verificó que dejaron un tatuaje oscuro en el lugar seleccionado (**Figura 8 A y B**). El destino prospectivo del miocardio del resto de las paredes del **conus** fue determinado colocando marcas plásticas en la zona media. *G II*. Para determinar el destino del miocardio de la pared ventral. *G III*. Para determinar el destino prospectivo de la pared dorsal. *G IV*. Para determinar el destino de la pared izquierda. *G V*. Para marcaje del cojín ventrosuperior del **canal-AV**. En todos los grupos, después de colocar las marcas plásticas los embriones fueron fotografiados *in ovo* usando un microscopio estereoscópico Lumar V12 (Carl Zeiss, Alemania). Después la ventana del cascaron fue cubierta con Parafilm y los huevos fueron regresados a la incubadora en las mismas condiciones iniciales de incubación. Posteriormente se disecaron los corazones marcados durante el proceso de septación cardiaca (24-36HH). Solo los embriones con las características anatómicas normales y con apropiada silueta cardiaca fueron considerados en este experimento.

## 6.4. Procedimientos histológicos

Se disecaron los corazones de embriones en estadios (24-31HH) de los grupos GI-GIV y 36HH del GV, posteriormente se fijaron en formalina neutra por 24 hrs. Después los tejidos fueron deshidratados por series graduales de alcohol, aclarados con xileno (Sigma, USA) y embebidos en medio de inclusión de parafina (Tissue-Tek, USA), se obtuvieron cortes transversales seriados mediante un micrótopo (Leica, Alemania). Los cortes fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina y eosina (**H&E**).

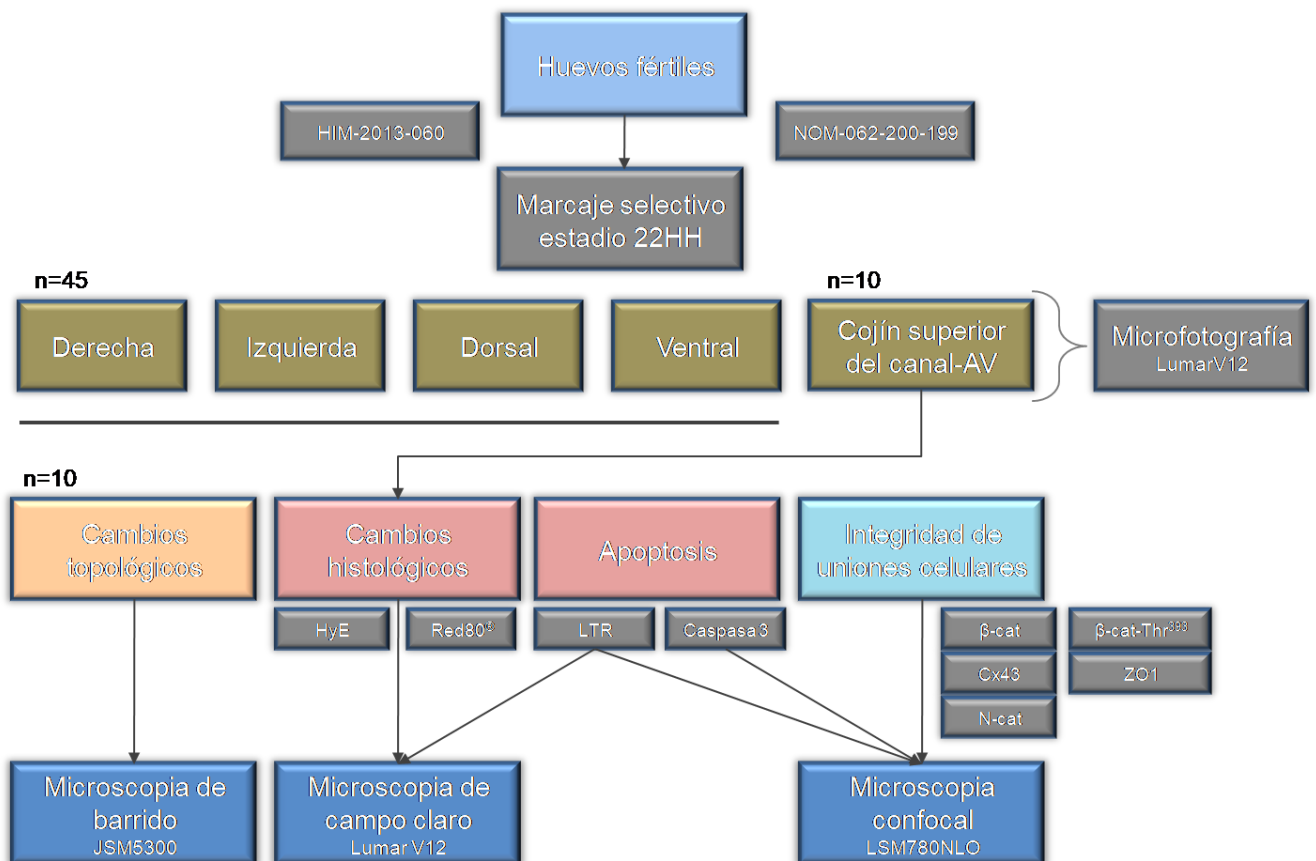
## 6.5. Inmunodetección

Cortes histológicos transversales de corazones embrionarios de GI (estadios 26-28HH) fueron re-hidratados y permeabilizados con Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) en PBS por 30 minutos y se expusieron a bloqueador universal de proteínas por 5 minutos (Dako, USA). Después los tejidos fueron incubados con anticuerpos para identificar proteínas de unión celular como: anti  $\beta$ -catenina (Santa Cruz Biotechnology USA, SC-32732), anti p- $\beta$ -catenina Thr<sup>393</sup> (Santa Cruz Biotechnology USA, SC-32962), anti N-cadherina (Santa Cruz Biotechnology USA; SC-7939), anti Cx43 (Santa Cruz Biotechnology USA, SC-6560); proteínas de la matriz extracelular: anti colágeno (Santa Cruz Biotechnology USA, SC-28655); y para apoptosis: anti caspasas 3-8-9, (Santa cruz Biotechnology USA, SC-7272; SC-5263; SC-56076). Posterior a varios lavados con PBS se adicionó anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, USA). Las muestras fueron observadas bajo un microscopio confocal LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Alemania).

## 6.6 Microscopia de barrido

Embriones GI de estadio 22-28HH fueron fijados con glutaraldehído al 10% por 24 hrs. Después se deshidrataron con CO<sub>2</sub> líquido con un aparato de punto crítico Samdri 789A (Tousimins Research Co., USA) y fueron cubiertos con polvo de oro de 350 nm, en un aparato Denton Vacuum Desk 1A (Cherry Hill Industrial Centre, USA). Las muestras fueron fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5300 (JEOL, Japón) a 15 kV y a diferentes magnificaciones.

## 6.7 Resumen de los métodos en diagrama de flujo



## VII. Resultados

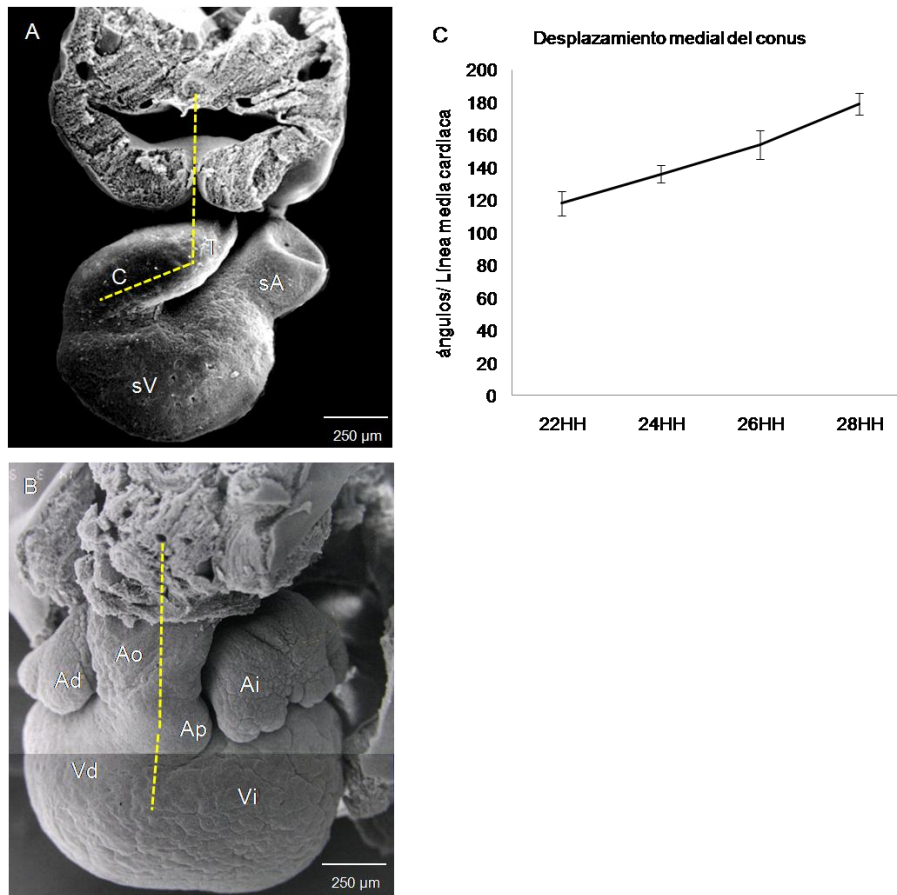
Con el fin de estudiar el destino del miocardio y septación del **conus**, los cambios topográficos e histológicos entre el **conus** y su relación con los tejidos del **canal-AV**, hicimos **marcaje-stc**, cortes trasversales seriados, y microscopia de barrido, esta estrategia nos permitió visualizar ambas estructuras durante el proceso de septación del corazón. También estudiamos el patrón espacio temporal de los procesos apoptóticos del **conus**. Además, estudiamos los cambios en la expresión *in situ* de las proteínas: **ZO1**,  $\beta$ -catenina, **Cx-43**; (proteínas representativas de las uniones ocluyentes, estrecha y comunicantes, respectivamente) de la zona de apertura del miocardio del **conus**, así como los cambios en la matriz extracelular adyacente a la zona de apertura del miocardio conal.

### 7.1 Cambios topográficos e histológicos del **conus** y del canal-AV

Inicialmente el **conus** (estadio 12HH) es una estructura anatómica con forma tubular localizada sobre la línea media del corazón, posteriormente, ya en etapa de asa en S, (estadio 22HH) el **conus** adquiere una posición a la derecha respecto de la línea media cardiaca. Medimos el ángulo de inclinación desde la línea media del embrión y una línea que atraviesa el lumen del **conus** (**Figura 9A**). En la etapa 22HH, tenía una apertura de 120°, y aumentó a 140° en la etapa 24HH, 160° en la etapa 26HH y 180° en la etapa 28HH (**Figura 9B y C**). El **conus** pasó de ser una estructura derecha para posicionarse paulatinamente en la línea media del corazón; por el contrario, encontramos que el primordio de los atrios en

estadio 22HH, fue una estructura anatómica izquierda respecto de la línea media del corazón, y durante los estadios 24-28HH, el primordio invadió la porción derecha de la base cardiaca.

**Figura 9**



**Figura 9.** Desplazamiento del *conus*. En A) el *conus* en estadio 22HH, tiene una posición derecha respecto de la línea media del cuerpo. En B) el *conus* se ha desplazado a una posición mediana. C) grafico que muestra los cambios en el ángulo formado por el *conus* con la línea medial del cuerpo. Abreviaturas: Ad= atrio derecho, Ai= atrio izquierdo, Ao= aorta, Ap= arteria pulmonar, C= *conus*, SA= segmento atrial, Vd= ventrículo derecho, Vi= ventrículo izquierdo.

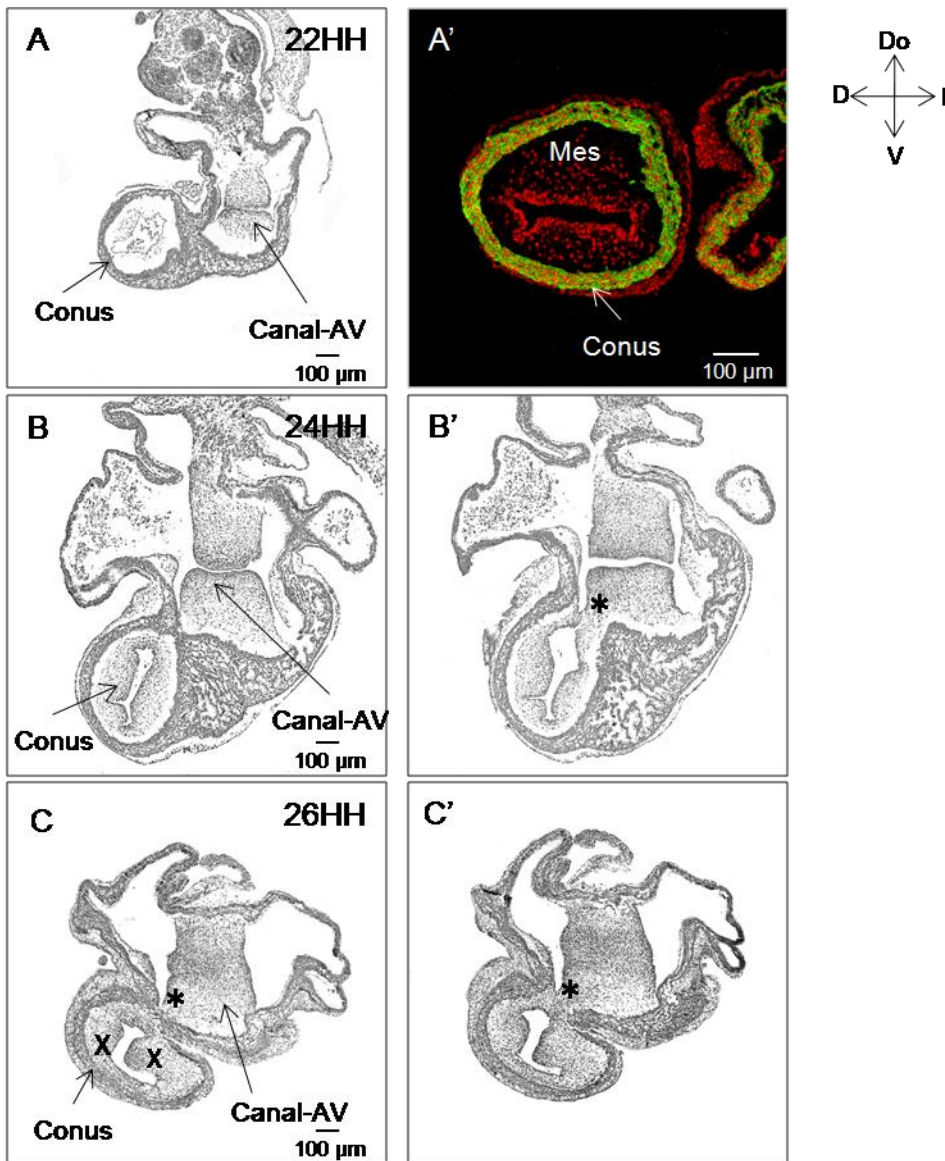
Las preparaciones histológicas de los corazones en el plano transversal, mostraron que en la etapa 22HH, el lumen del **conus** y del **canal-AV** estaban en posiciones contralaterales (**Figura 10A**). El **conus** tenía una estructura tubular formada por una capa delgada de miocardio continuo y revestido por endocardio (**Figura 10A**). Entre ambos tejidos, fue evidente la abundante matriz extracelular (gelatina cardiaca) con algunas células tipo fibroblasto. La distribución de la gelatina cardiaca del **conus** fue continua en las zonas adyacentes al miocardio. No observamos la formación de dos crestas en el lumen del **conus** (**Figura 10A**). Respecto del **canal-AV**, observamos la presencia de los dos cojines que lo constituyen: el ventrosuperior y el dorsoinferior (**Figura 10A**). En la etapa 24HH, el **conus** se había movido de una posición derecha a una posición ligeramente ventral y hacia la izquierda, mientras que el **canal-AV** se había movido de una posición izquierda hacia la derecha (**Figuras 10A y B**). Además, en el miocardio del **conus** de la pared dorsoizquierda se observó un adelgazamiento del miocardio que indica la pérdida de continuidad del miocardio tubular (**Comparar Figuras 10B con C**). La gelatina cardiaca del **conus** todavía se observaba revistiendo por completo al miocardio, a pesar de que el miocardio perdió continuidad y los extremos libres se separaban paulatinamente (**Figura 10B**). En esta etapa aun fue imperceptible la formación de dos crestas separadas. Tanto la gelatina cardiaca del **conus** como los cojines del **canal-AV** eran más voluminosos, con una población celular más grande que en el estadio 22HH. En la etapa 26HH, el **conus** se había desplazado aún más hacia la línea media cardiaca y el **canal-AV** se movió hacia la derecha (**Comparar Figuras 10A, con 10B y 10C**). El miocardio del **conus** se había engrosado, pero en la zona de apertura de la pared



dorsoizquierda se había adelgazado, hasta perder la estructura tubular cerrada (paso de una estructura en forma de “O”, a una forma en “U”), a pesar que fue visible la presencia de un canal que comunicaba los lúmenes de ambos tractos (entrada y salida embrionarios), la gelatina cardiaca del **conus** siguió presentando una estructura circular continua (forma en “O”), evitando de ésta forma el corto circuito cardiaco (**Figura 10C**). De manera interesante, durante la pérdida de continuidad del miocardio del **conus**, observamos la existencia de una continuidad estructural entre el dominio izquierdo de la gelatina cardiaca del **conus** con el cojín ventrosuperior del **canal-AV**, la continuidad estructural abarcó cerca de la mitad de la zona de apertura del **conus** (**Figuras 10C y C**). En la etapa 28HH, el miocardio de la pared dorsoizquierda del **conus** continuó perdiendo continuidad tubular, mostró una zona de apertura más amplia (**Comparar Figuras 11A y B**). La pérdida de contacto del miocardio fue corroborada por inmunodetección de miosina del músculo esquelético (**Figuras 11 A' y B**). Los cojines derecho e izquierdo del **canal-AV** fueron evidentes (**Figuras 11A y B**). En esta etapa (28 HH), los cojines del **canal-AV** habían formado el tabique medio y fue evidente la formación incipiente de los conductos atrioventriculares derecho e izquierdo. En el estadio 30HH, el miocardio del **conus** se había transformado desde una estructura tubular cerrada, para adquirir la forma de un canal (**Figura 11C**). Las crestas del **conus** dextrodorsal y sinistroventral, originalmente incipientes, habían aumentado de volumen y estaban en proceso de fusión, la fusión no ocurrió en el centro del lumen, por el contrario, la fusión ocurrió en la porción dorsal del **conus** (**Figura 11C**). También, el cojín izquierdo del **canal-AV** se había remodelado para formar una estructura mesenquimal que se asemeja a la valva mural de la válvula

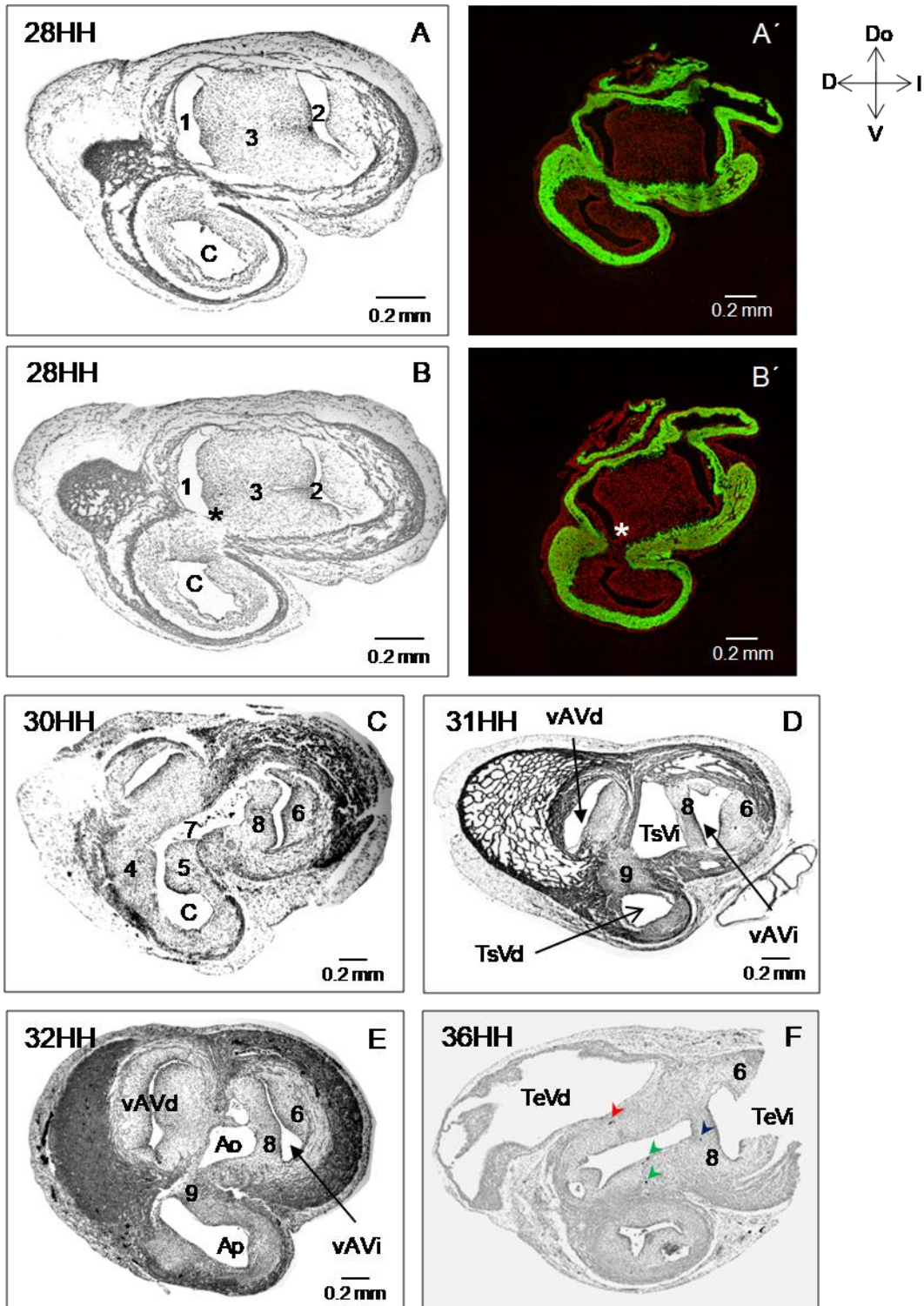
atrioventricular izquierda, mientras que el tabique medio del canal-AV, formaban una incipiente valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda (**Figura 11C**). Durante el estadio 30HH, fue evidente la formación de un canal alargado, cuyos bordes estaban representados por la superficie dorsal de las crestas conales (en el proceso de fusión), la superficie derecha de la valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda y el agujero interventricular (**Figura 11C**). Más tarde, en la etapa 31HH, las crestas del **conus** se fusionaron, y se formó un conducto, “el cono-pulmonar” (**Figura 11D**), como consecuencia, el canal alargado se transformó en el tracto de salida del Vi, clásicamente interpretado como el “cono-aórtico” (**Figura 11D**). La fusión de las crestas del **conus** formó una estructura de constitución histológica mixta (tejidos mesenquimatoso y de miocardio) que separaba los tractos de entrada y salida Vd. En la etapa 32HH, en la zona de fusión de las crestas del **conus**, se transformo por completo en tejido muscular, por otro lado el miocardio del **conus** había adquirido la forma de una lámina que abarcó gran parte de la pared anterior del Vd (**Figura 11E**). Así mismo, el tracto de salida del Vi se desarrollo completamente, mostrando la valva anteroseptal, la continuidad fibrosa mitroaórtica y la porción muscular del TiV (**Figura 11E**).

**Figura 10**



**Figura 10.** Cambios topológicos e histológicos del *conus* y el **cana-AV**. En A, el *conus* y el canal-AV son estructuras contralaterales en estadio 22HH. En A' se observa inmunodetección de la cadena ligera de la miosina en color verde. En B y C, el *conus* se va desplazando hacia la derecha y el canal-AV se desplaza hacia la izquierda. En estadio 24 se observa la pérdida de continuidad del miocardio en una zona dorso izquierda del miocardio conal, comparar B-C con B-C'. Abreviaturas: Mes= tejido mesenquimal, canal-AV= canal atrioventricular. Brújula: Do= Dorsal, I= Izquierda, V= Ventral, D= Derecha.

Figura 11



**Figura 11.** Los tractos de salida ventriculares se desarrollan a partir de diferentes primordios. (A, B) Secciones histológicas en la etapa 28HH. Se observa la zona de apertura en la pared dorsoizquierda del *conus* (\*) aun más amplia a nivel más caudal. La formación del tabique medio del canal-AV (3) por la fusión de los cojines dorsal y ventral del canal AV originó los orificios atrioventriculares derecho (1) e izquierdo (2). En A', B', Inmunolocalización de miosina del músculo esquelético (verde) corrobora la pérdida de continuidad de miocardio (\*). En C, son visibles las crestas dextrodorsal (4) y sinistroventral (5) del *conus*. También es visible la valva anteroseptal (8) en la válvula AV izquierda. Así como un canal que comunica a los tractos de salida ventriculares (7). En D y E, etapas 31 y 32HH. Las crestas del *conus* se han fusionado en la porción dorsal del *conus*, forman la cresta supraventricular inmadura (9). La fusión de las crestas conales, forman un solo conducto que corresponde al tracto de salida del Vd (TsvD). En F, se observan las marcas plásticas del marcaje-stc realizado inicialmente en estadio 22HH sobre el cojín ventrosuperior del canal-AV. Las marcas plásticas se encuentran en la valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda (cabeza de flecha azul), en la continuidad fibrosa mitroaórtica (cabeza de flecha verde) y en la porción del tabique atrioventricular (cabeza de flecha roja). Abreviaturas: C= *conus*, vAVd= válvula atrioventricular derecha, vAVi= válvula atrio ventricular izquierda. vAo= válvula aórtica, TeVd= tracto de entrada del ventrículo derecho, TsVd= tracto de salida del ventrículo derecho, TsVi= tracto de salida del ventrículo izquierdo. 1= Orificio atrioventricular derecho, 2= Orificio atrioventricular izquierdo, 3= Tabique medio del canal atrioventricular, 4= Cresta derecha del *conus*, 5 Cresta izquierda del *conus*, 6= Valva mural de la válvula atrioventricular izquierda, 7= Canal que comunica al tracto de salida del ventrículo derecho con el tracto de salida del ventrículo izquierdo. 8= Valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda. Brújula: Do= Dorsal, I= izquierda, V= Ventral, D= Derecha.

---

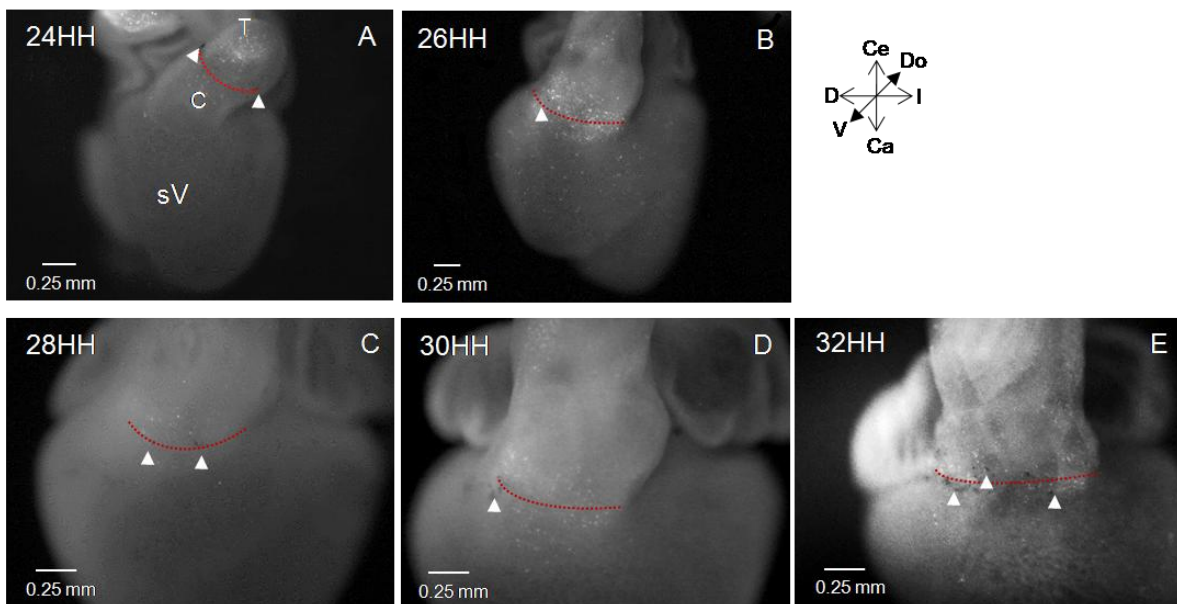
## 7.2 Patrón apoptótico durante la septación

Investigamos el patrón apoptótico desde la anatomía de superficie y mediante cortes histológicos para visualizar de la región conal y del **canal-AV**. Las células en apoptosis fueron reveladas mediante el reactivo Lysotracker<sup>®</sup>, las cuales

fueron visibles como puntos rojos brillantes, la señal roja corresponde a los cuerpos apoptóticos característicos de las etapas finales de la apoptosis. Durante la etapa 24HH encontramos las primeras células apoptóticas dentro de la región del **troncus**, adyacente a las marcas plásticas colocadas en el límite entre el **conus** y el **troncus**. Con los cortes histológicos corroboramos que las primeras células en apoptosis se encontraban entre el límite del **conus** con el **troncus**. Identificamos que las células apoptóticas eran de tipo mesenquimal, localizadas hacia el lumen del **troncus**. No observamos apoptosis en células del miocardio del **conus** (**Figuras 12A y 13A**). Durante el estadio 26HH, las marcas apoptóticas superficiales se observaron compactadas en una banda de aproximadamente 40 mm de espesor, uno de los extremos de la banda de células en apoptosis coincidió con las marcas plásticas del límite entre el **conus** y el **troncus**. Internamente observamos en el miocardio del **conus** dos pequeñas zonas contralaterales con cerca de 3-5 células en apoptosis, que correspondieron a las paredes derecha e izquierda (**Figuras 12B y 13B**). Más tarde en el estadio 28HH, superficialmente se observaron pocas células apoptóticas en el miocardio de la pared derecha en comparación con las células en apoptosis asociadas al límite entre el **conus** y el **troncus** (**Figura 12C**), internamente se observaron algunas células en apoptosis dispersas a lo largo de la pared derecha (**Figuras 12C y 13C**). En la etapa 30HH, se observaron células apoptóticas en el miocardio de la pared originalmente izquierda del **conus**. Entre los estadios 30-32HH, la señal apoptótica se observó debajo de la zona subvalvular de la arteria pulmonar (**Figura 12D y E**). En estas etapas, las secciones histológicas mostraron algunas células apoptóticas en el miocardio del **conus**, y un gran número de células

apoptóticas presentes en el epicardio (**Figura 13D, 8E y 8E**). De manera interesante, no se encontraron células apoptóticas en el área adyacente a la abertura del miocardio conal con el reactivo LTR, para corroborar, también hicimos inmunodetección para la proteína caspasa 3 activa, y no encontramos ningún cardiomiocito de la zona de apertura con tinción positiva (**Figura 13B y 14A y B**), en contraste, mostramos como control positivo del anticuerpo, la inmunodetección en células mesenquimales durante la fusión de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del **canal-AV** (**Figura 14C**).

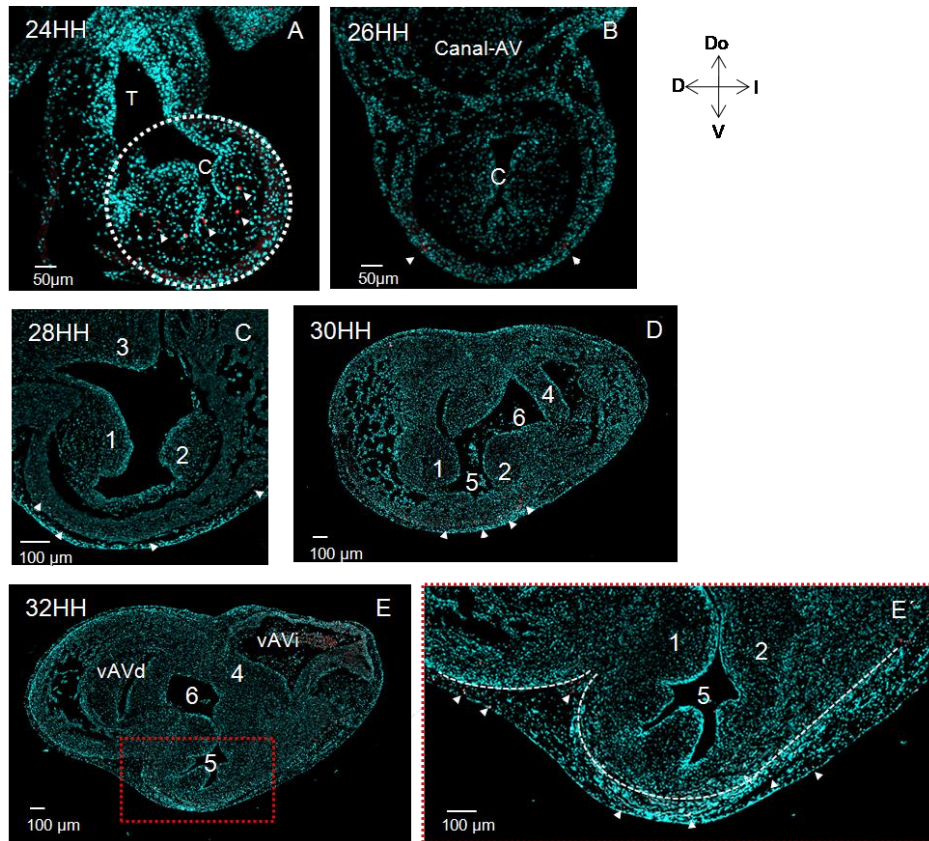
**Figura 12**



**Figura 12.** Estudio de la distribución de células en apoptosis en el corazón intacto. En A, primeras células apoptóticas adyacentes al límite conotruncal, delimitado digitalmente con puntos rojos, la marca plástica está señalada por la punta de flecha. B, las células en apoptosis se incrementan y se alojan justo en el límite conotruncal. C las células en apoptosis permanecen afectando al *truncus*. D y E, las células en apoptosis, continúan afectando al límite conotruncal, algunas células en

apoptosis se observan en el miocardio del *conus*. Bújala: Ce= cefálico, Do= dorsal, I= Izquierda, Ca= Caudal, V= Ventral, D= derecha.

**Figura 13**



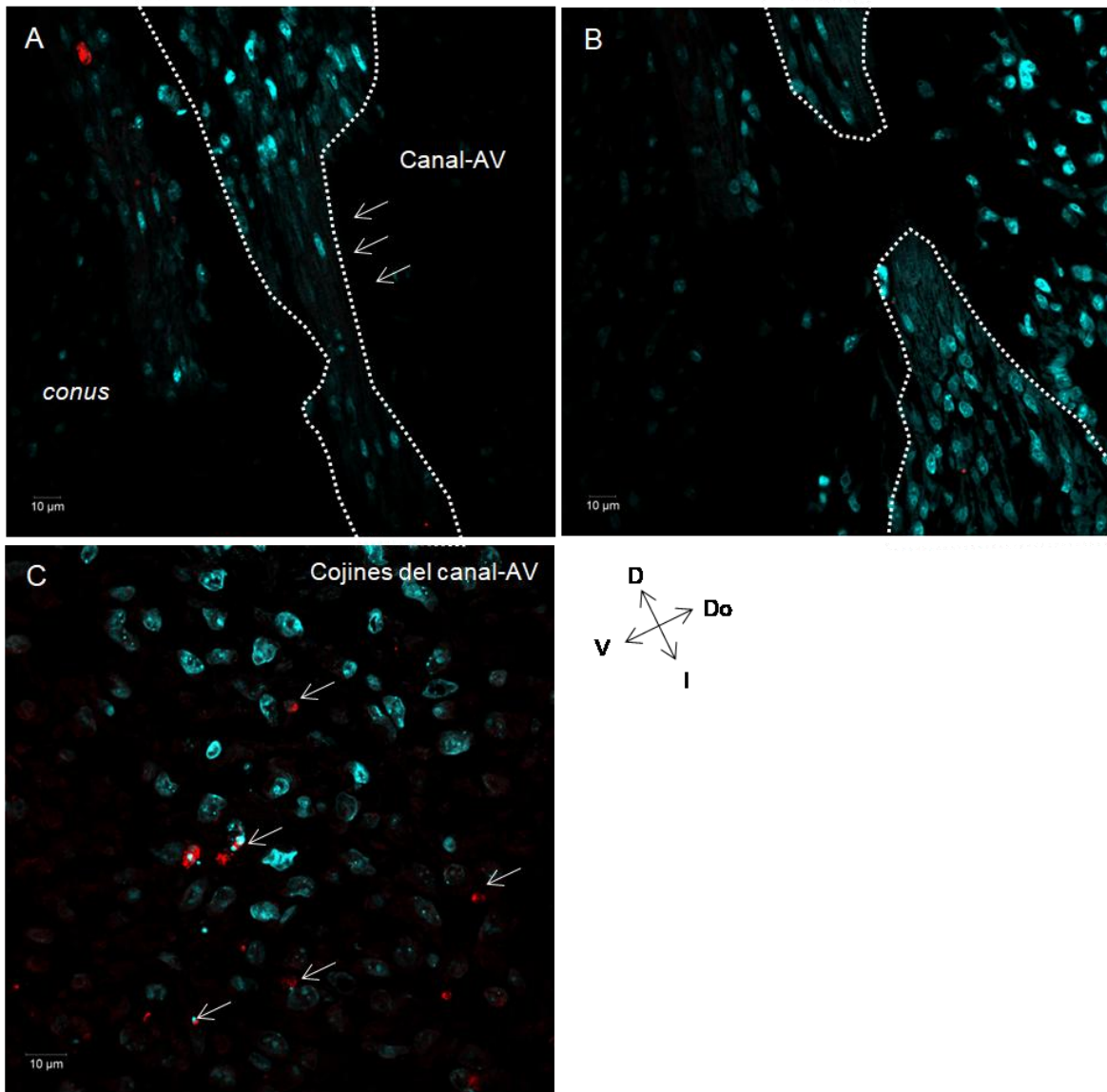
**Figura 13.** Preparaciones histológicas para evidenciar células en apoptosis. En A se observan las primeras células apoptóticas afectando al tejido mesenquimal del *truncus*, señaladas por cabeza de flecha. En B se observan de 3-4 células en apoptosis de las paredes laterales del miocardio conal. En C siguen observándose algunas células apoptóticas en el miocardio del *conus*. En D, E y E' las células en apoptosis dejaron de observarse en el miocardio y ahora se observan en el epicardio. En color cian los núcleos celulares, tinción LTR en rojo. Abreviaturas: C= *conus*, canal-AV= Canal atrioventricular, T= *truncus*, vAVd= Válvula atrioventricular derecha, vAVi= Válvula atrioventricular izquierda, 1= Cresta derecha del *conus*, 2= Cresta izquierda del *conus*, 3= Tabique medio del canal



atrioventricular, 4= Valva anteroseptal de la válvula atrio ventricular izquierda. 5= Tracto de salida del ventrículo derecho, 6= Tracto de salida del ventrículo izquierdo. Brújula: Do= Dorsal, I= izquierdo, V= ventral, D= Derecha

---

**Figura 14**



**Figura 14.** Inmunodetección de la proteína caspasa-3 estadio 28HH. En A, ninguna célula del miocardio del *conus* es positiva para caspasa-3, se delimitó digitalmente el miocardio, las flechas muestran el adelgazamiento del miocardio. En B, el miocardio ha perdido continuidad tubular. C, control positivo para

caspasa-3, con flechas se muestran células mesenquimales durante la fusión de los cojines del canal-AV. Núcleos celulares en color cian, expresión de caspasa-3 en rojo. Abreviaturas: Canal-AV= Canal atrioventricular

---

### 7.3 Destino de las paredes conales

Para determinar el destino prospectivo del miocardio de la pared derecha del **conus**, se hicieron **marcaje-stc** en el miocardio en los límites anatómicos del **conus** y se rastrearon hasta el corazón maduro (**Figura 16**). Las marcas plásticas inicialmente insertadas (estadio 22HH) en la superficie derecha del límite cono-ventricular (**Figura 15A**), se movilizaron en sentido contrario a las manecillas del reloj, y hacia la línea media embrionaria, en el corazón maduro (36HH) las marcas plásticas fueron localizadas en el miocardio de la región ventricular apical relacionada con el surco interventricular anterior (**compare A con A' en la Figura 15**). Por el contrario, el **marcaje-stc** realizado en el miocardio del límite cono-tronco, fueron visibles en el corazón maduro (36HH), en la porción derecha de la base cardíaca incluyendo la región subvalvular de la arteria pulmonar (**compare B con B' en la Figura 15**). El miocardio de las paredes izquierda, ventral y dorsal del **conus**, se distribuyeron a diferentes porciones anatómicas, exclusivas del **Vd**. El **marcaje-stc** posicionado en el miocardio de la pared ventral (**Figura 16A**), en el corazón maduro, permaneció en el mismo plano, pero se desplazó ligeramente en dirección caudal, abarcando gran parte de la zona subvalvular de la **Ap** (**Figura 16 A'**). Por otro lado el **marcaje-stc** de la pared dorsal, en el corazón muro las marcas plásticas se desplazaron en sentido contrario a las manecillas del reloj, y

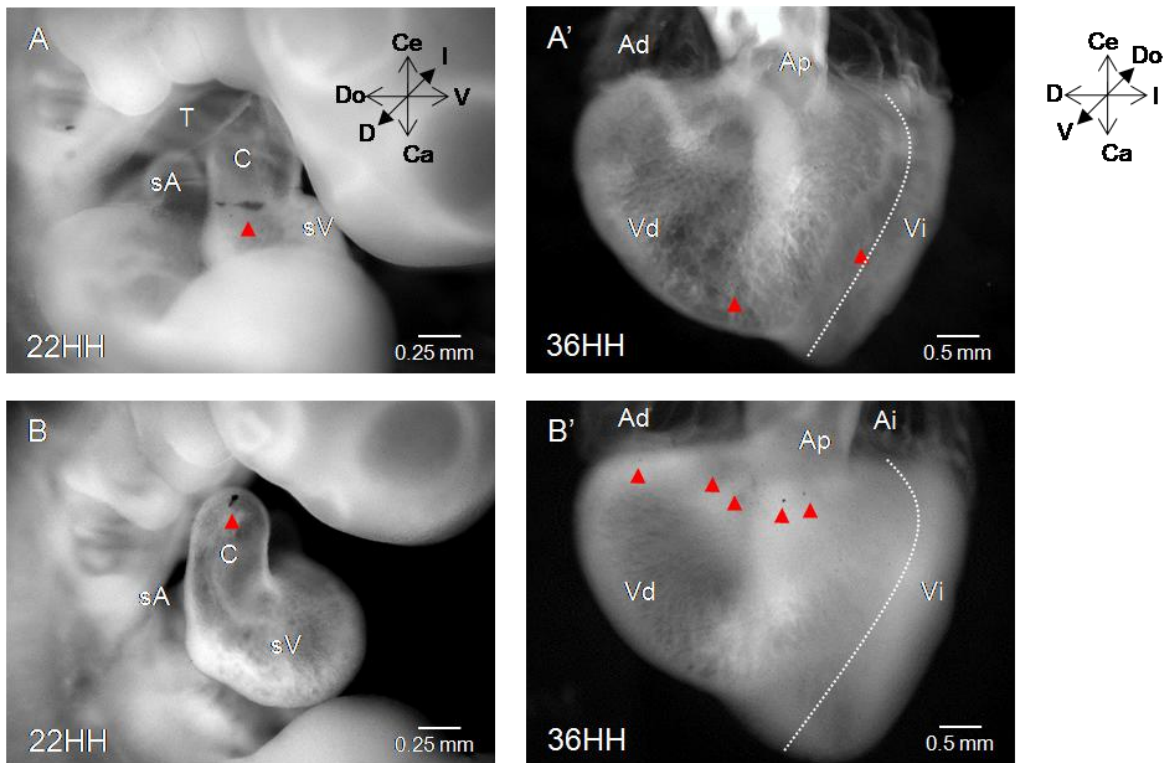
hacia la línea media del embrión, en estadio 36HH las encontramos en el miocardio del tercio medio de la pared libre del **Vd** (**Figura 16B y B'**). Por el contrario, el **marcaje-stc** del miocardio de la pared izquierda (**Figura 16C**), en el corazón maduro las marcas plásticas mostraron un comportamiento irregular; en la mayoría de los corazones (90%), las marcas plásticas se desplazaron gradualmente en sentido contrario a las manecillas del reloj, y en el corazón maduro, fueron localizadas en el miocardio entre el borde agudo del corazón hasta la porción media del la zona subvalvular de la **Ap.** (**Figura 16C'**). En algunos corazones (9%), las marcas plásticas se desplazaron a favor de las manecillas del reloj y en el corazón maduro se alojaron en una pequeña porción que correspondiente a la pared izquierda del tracto de salida del **Vd**. Cerca del 1% de los corazones, el **marcaje-stc**, se fragmentó en dos piezas. Cada una de las marcas plásticas se desplazaron en direcciones opuestas, y en el corazón maduro, una de las marcas plásticas se localizo en el miocardio entre el borde agudo y la zona subvalvular de la **Ap.** La marca plástica restante, fue encontrada en la pared izquierda del tracto de salida del **Vd** (**Figura 16C'**).

#### **7.4. Marcaje del cojín ventrosuperior del canal atrioventricular**

También hicimos un experimento piloto de **marcaje-stc** sobre el cojín ventrosuperior del **canal-AV**. Al igual que describieron anteriormente (**de la Cruz et al., 1982 y García–Peláez et al., 1984**), nosotros también encontramos, que en algunos corazones las marcas plásticas se localizaron de manera dispersa, en tres entidades anatómicas del tracto de salida del **Vi**: en la valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda, en la continuidad fibrosa mitroaórtica, y en una

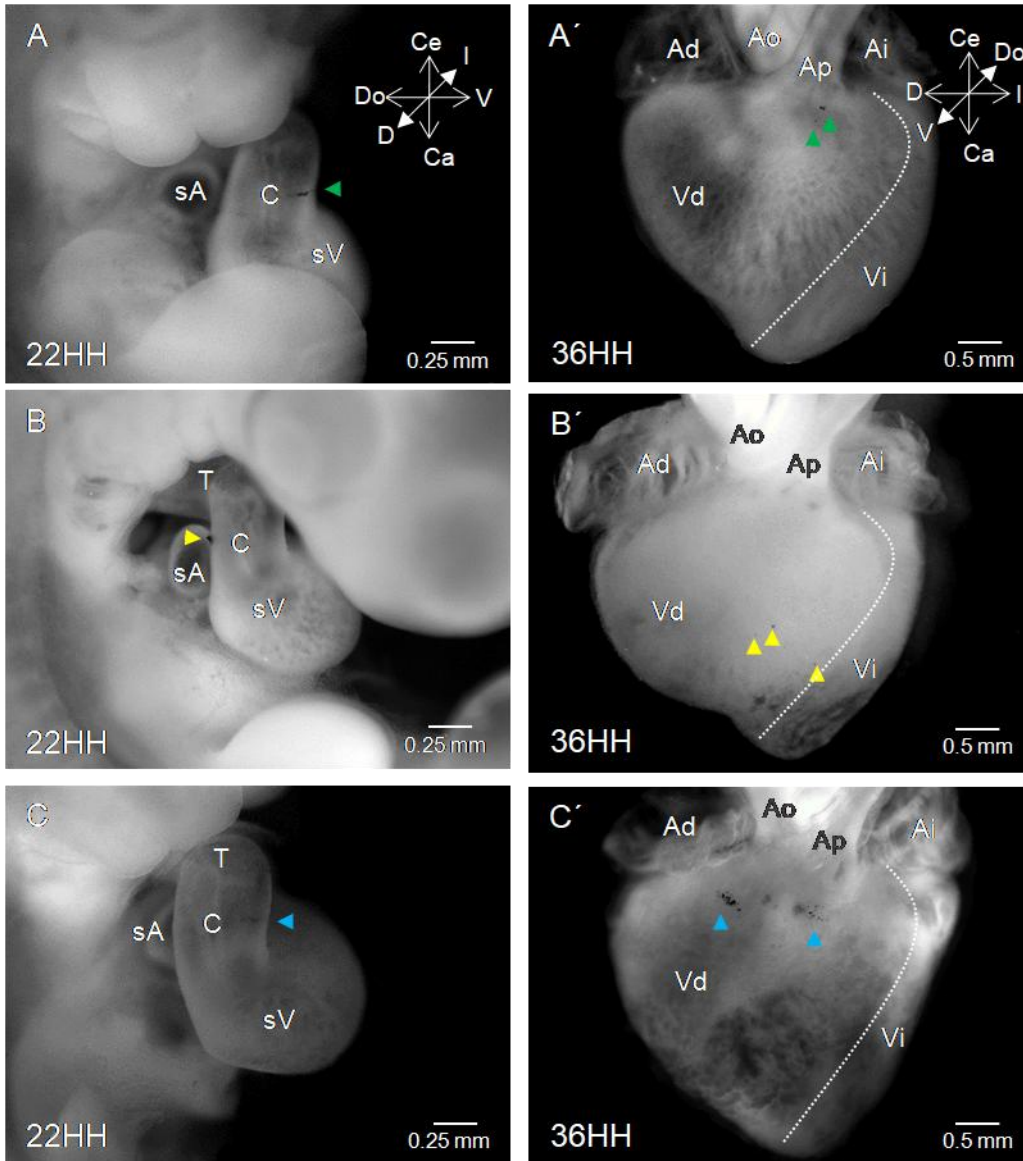
porción del tabique interventricular cercano a la valva no coronaria, con características de miocardio liso y ubicación paramedial, característica del tabique membranoso atrioventricular. Inclusive algunas marcas plásticas se observaron en el anillo valvular (**Figura 11F**).

**Figura 15**



**Figura 15.** Marcaje selectivo de la pared derecha del *conus*. En A, marcaje del límite cono-ventricular. En B, marcaje del límite cono-tronco. En el corazón maduro el marcaje del cono-ventricular se desplazó a zonas de la pared libre relacionadas con el surco interventricular anterior y con la punta del ventrículo derecho. A'. En B', el marcaje del límite conotronco, se desplazó a todo lo largo de la porción derecha de la base cardiaca. Abreviaturas: Ad= Atrio derecho, Ai= Atrio izquierdo, Ap= Arteria pulmonar, C= *Conus*, sA= Segmento atrial, sV= Segmento ventricular, Vd= Ventrículo derecho, Vi= Ventrículo izquierdo. Brújulas: Ce= Cefálico, Do= Dorsal, I= Izquierdo, Ca= Caudal, V= Ventral, D= Derecha.

**Figura 16**



**Figura 16.** Marcaje selectivo de las paredes conales, ventral, dorsal, e izquierda en A, B y C. Al final del experimento, el marcaje de la pared ventral se movilizó a la pared libre adyacente a la zona subvalvular A'. Las marcas de la pared dorsal, se desplazaron hacia porciones de la pared libre relacionadas con la punta del Vd B'. el marcaje de la pared izquierda, en algunos corazones, se dividió en dos marcas plásticas y ambas se desplazaron en sentidos opuestos, hasta alojarse en la porción derecha de la base cardiaca, y la otra en la pared izquierda del tracto de salida del Vd C'. Abreviaturas: Ad= Atrio derecho, Ai= Atrio izquierdo, Ao= Aorta,

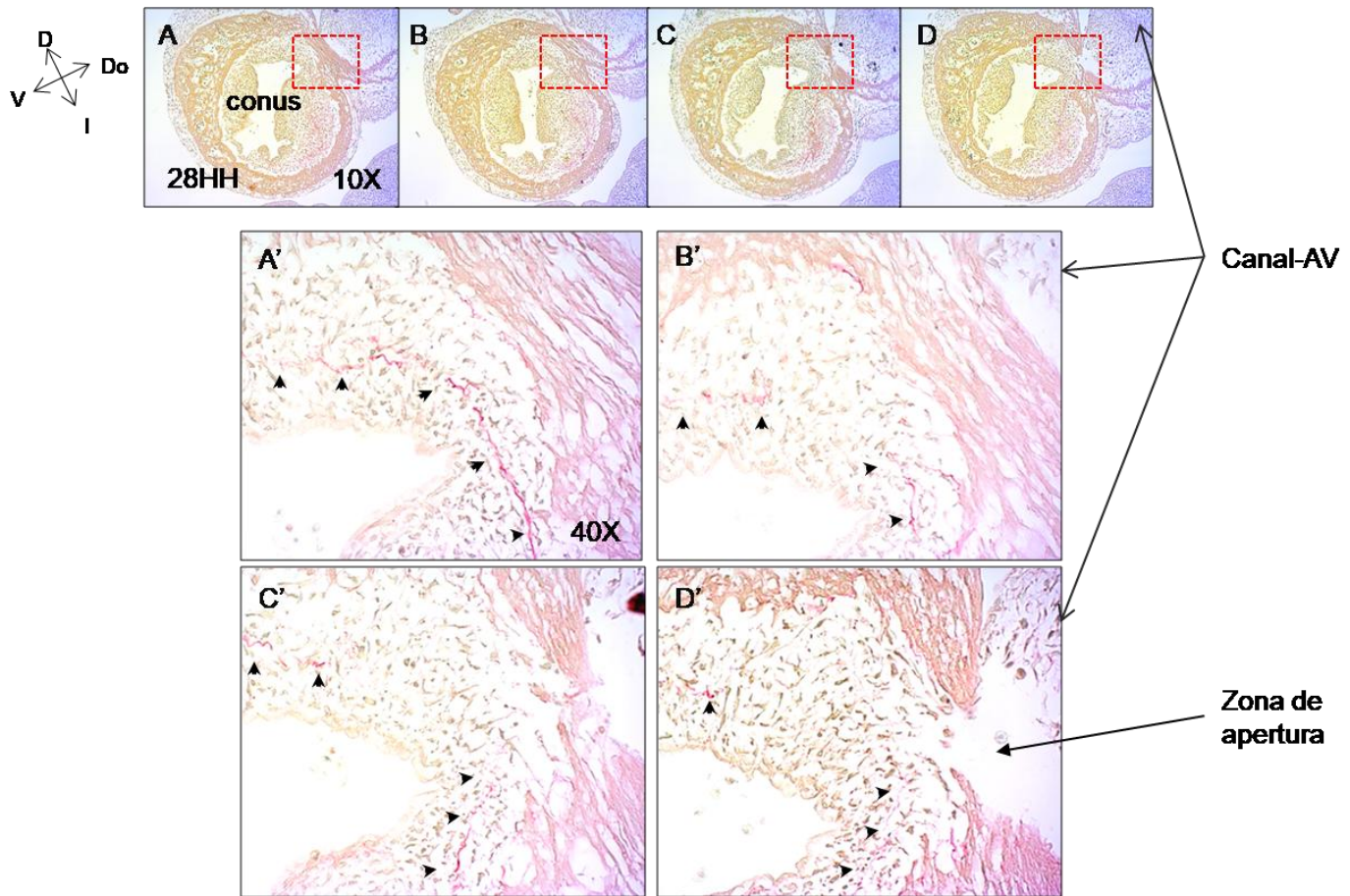
AP= Arteria pulmonar, C= *Conus*, sA= Segmento atrial, sV= Segmento ventricular, T= Tronco, Vd= Ventrículo derecho, Vi= Ventrículo izquierdo. Brújulas: Ce= Cefálico, Do= Dorsal, I= Izquierda, Ca= Caudal, V= Ventral, D= Derecha.

---

### **7.5 Cambios en la organización de la matriz extracelular de las zonas adyacentes al miocardio de la zona de apertura del *conus*.**

Estudiamos la presencia de colágeno mediante tinción Direct Red 80, en corazones estadio 26-28HH. Encontramos tinción positiva para fibras de colágeno, inmersa en la gelatina del *conus* y en proximidad con el miocardio (**Figura 17A y A´**), las fibras formaban un círculo delgado que en algunas zonas se hacía más ancho y en otras zonas se adelgazaba para de inmediato recuperar la tinción positiva. Cuando analizamos la tinción en la zona de apertura del miocardio del *conus*, pudimos observar que la tinción se perdía paulatinamente justo debajo del constante adelgazamiento del miocardio de la zona de apertura (**Figura 17 B y B´**). La pérdida del colágeno ocurrió desde una zona central justo donde iniciara la apertura del miocardio, y perdiéndose en sentidos opuestos (**Figura 17 C y C´**). De tal forma que una vez que el miocardio perdió continuidad, la tinción para colágeno fue escasa en comparación con la tinción de zonas alejadas de la zona de apertura (**Figura 17 D y D´**).

Figura 17



**Figura 17.** Tinción Direct Red 80. En A-D) Vistas panorámicas del *conus* mostrando la pérdida de continuidad tubular del miocardio. A' se muestra la presencia de tinción positiva para colágeno, inmerso en las crestas del *conus*, formaron un semicírculo en la zona adyacente a la apertura del miocardio. En B'-D') se aprecia la pérdida de colágeno, adyacente a la zona de apertura (flechas). Abreviaturas: C= *conus*, Canal-AV= Canal atrioventricular.

### 7.6 Cambios en las uniones comunicantes, ocluyentes y adhesivas del miocardio de la pared dorso izquierda del *conus*

Para evidenciar las uniones comunicantes utilizamos el anticuerpo contra la proteína **Cx43**, en corazones en estadio 26-28HH. Encontramos que el miocardio del *conus*, adyacente al pericardio presentó inmunolocalización de uniones

comunicantes entre los miocardiocitos de las paredes derecha, izquierda y ventral del **conus**. Por el contrario el miocardio adyacente al lumen, la inmunolocalización fue menor. De manera interesante el miocardio de la pared dorsoizquierda, específicamente en la zona de la pérdida del miocardio del **conus**, la proteína **Cx43** dejó de expresarse por completo, sugiriendo que las uniones comunicantes no estaban presentes entre los miocardiocitos de la zona de apertura (**Figura 18A y B**). Para evidenciar uniones ocluyentes utilizamos el anticuerpo contra la proteína **ZO1**, proteína intermediaria de la unión ocluyente. La inmunolocalización de la proteína **ZO1** no presentó señal positiva en los estadios del desarrollo estudiados (26-28HH), sin embargo si nos fue posible observar inmunolocalización de la proteína **ZO1** en secciones de corazones de pollo y ratón adultos (datos no mostrados). Finalmente para las uniones adherentes utilizamos inicialmente un anticuerpo contra la proteína N-cadherina, sin embargo al igual que para la proteína **ZO1**, no encontramos expresión de la proteína en ninguna de las etapas estudiadas, a pesar que también fue posible observar su expresión en el corazón adulto del pollo y ratón (datos no mostrados). Después utilizamos un anticuerpo para la proteína intermediaria de la unión adherente “ $\beta$ -catenina”, encontramos que se expresó de manera cortical en las células del miocardio de todas las paredes conales, incluyendo la zona de apertura de la pared dorsoizquierda (**Figura 18A**). Incluso después de iniciar la apertura del miocardio, en las células de los extremos de miocardio libres, la expresión de  $\beta$ -catenina, continuó en los mismos parámetros de intensidad de fluorescencia y en la misma distribución subcelular, que en células alejadas de la zona de apertura del miocardio (**Figura 18 B y C**). También exploramos la inmunodetección de la fracción fosforilada de la



proteína  $\beta$ -catenina en Thr<sup>393</sup>, de manera global encontramos que las células positivas mostraron la característica tinción nuclear, sugiriendo una función como factor de (Song 2003). En la zona de apertura del miocardio, pudimos apreciar de 3 a 4 células con tinción positiva nuclear franqueando la zona de apertura central constituida de alrededor de 20 células negativas para  $\beta$ -catenina Thr<sup>393</sup> (Figura 20).

Figura 18

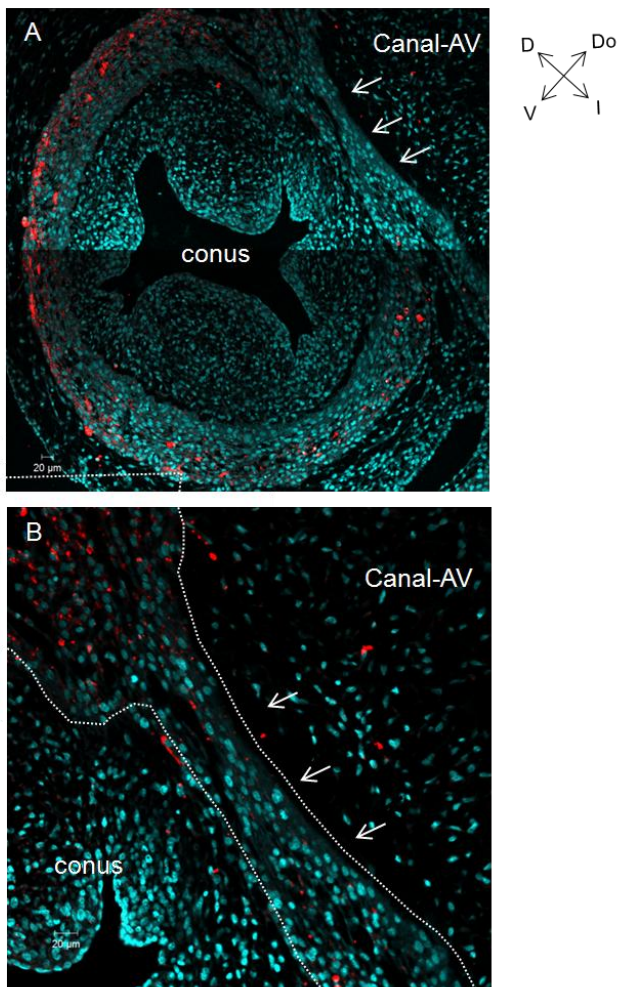
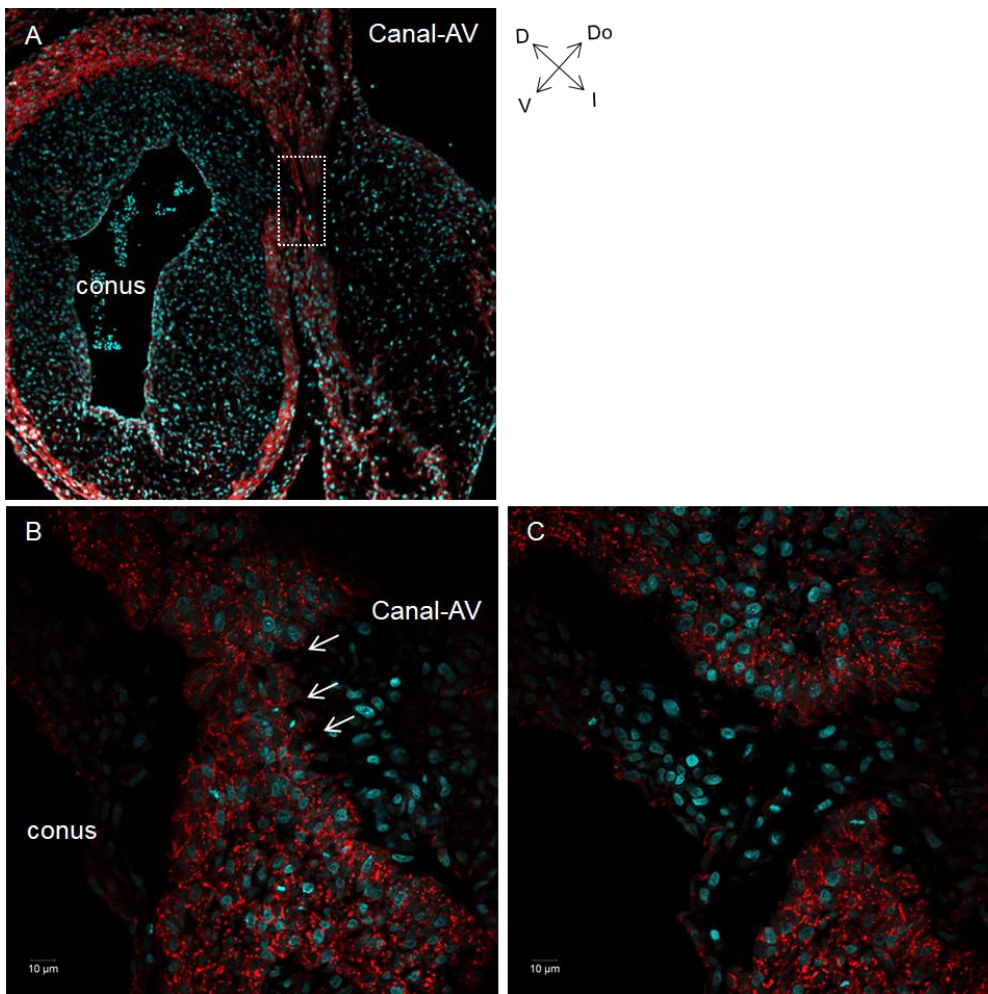


Figura 16. Inmunodetección por microscopia Confocal de la proteína Cx43, Uniones comunicantes. En A, vista panorámica del *conus*, se observa expresión de Cx43 difusa a lo largo de todo el miocardio del *conus*, a excepción de la zona

de apertura. En B) Magnificación 40X, las flechas señalan la zona de apertura del miocardio conal. La proteína Cx43 dejó de expresarse entre el miocardio de la zona de apertura. Con líneas punteadas se resalto el miocardio. Color cian= núcleos celulares y en color rojo la proteína Cx43. Abreviaturas: Canal-AV= Canal atrioventricular. Brújula: Do= Dorsal, V= Ventral, D= Derecha, I= Izquierda.

**Figura 19**



**Figura 17.** Inmunodetección de la proteína  $\beta$ -catenina. Uniones adherentes. El Campo óptico fue posicionado en la porción dorsoizquierda del *conus* (A). En B (amplificación a 40X), la distribución sub-celular de la proteína  $\beta$ -catenina se observa de manera cortical. Se observa el adelgazamiento del miocardio conal (flechas) flanqueado por la gelatina cardiaca de las crestas del *conus* y de los

cojines del canal A-V. En C, el miocardio ha perdido continuidad tubular y se observan los extremos libres de miocardio inmersos en la gelatina cardiaca. No se aprecian cambios en la distribución sub-celular de la proteína  $\beta$ -catenina. Color cian= Núcleos celulares. Rojo=  $\beta$ -catenina. Abreviaturas: Canal-AV= Canal atrioventricular. Brújula: Do= Dorsal, V= Ventral, D= derecha. I= izquierda.

**Figura 20**

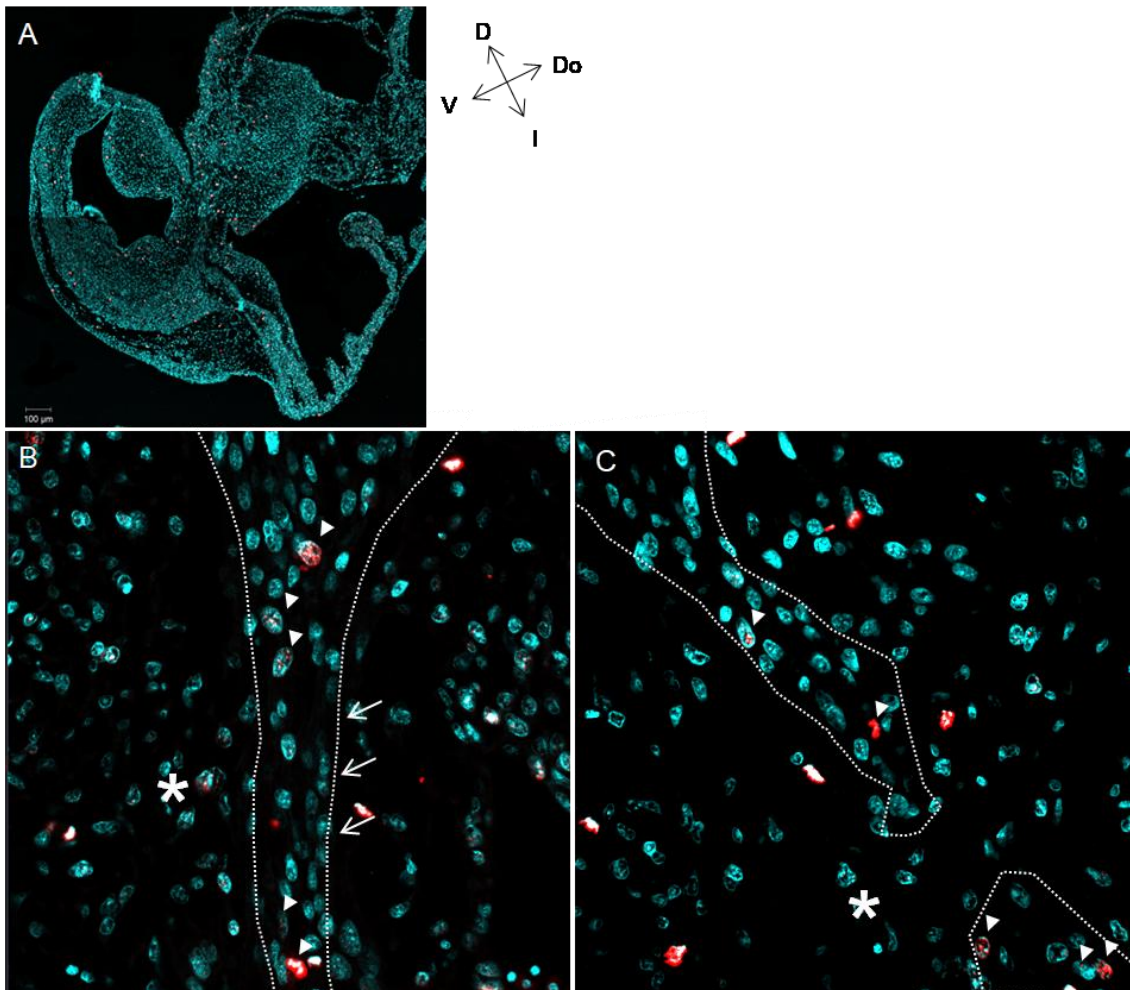


Figura 20. Inmunodetección de p- $\beta$ -catenina, estadio 28HH. En A imagen panorámica a nivel de la zona de apertura del miocardio conal. En B) se delimitó digitalmente el miocardio, se observan células miocárdicas positivas para p- $\beta$ -catenina (cabezas de flecha), flanqueando la zona de apertura (\*). En C) el miocardio ha perdido continuidad tubular, y en los extremos libres es posible identificar algunas células positivas para p- $\beta$ -catenina

## 8. Discusión

Los conocimientos sobre los componentes embrionarios y los procesos morfogénéticos implicados en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares, y sus troncos arteriales son controvertidos. Es probable que las discrepancias sean causadas en parte, porque muchos informes describen resultados experimentales sin especificar la región del tracto de salida embrionario estudiada: proximal (**conus**), intermedia (**tronco**) o distal (saco aórtico). La distinción de estos segmentos es relevante porque, aunque en etapas iniciales de la cardiogénesis el **troncus** y el **conus**, son morfológica e histológicamente similares, cada uno de ellos tiene una manifestación anatómica diferente en el corazón postnatal (**Kramer 1942; de Vries & Saunders 1962; Grant 1962; Goor et al., 1972; Thompson y Fitzharris 1979; Orts-Llorca et al., 1982; Van Praagh 1985; Thompson et al., 1987; Ya et al., 1998; Anderson et al., 2003; García-Peláez y Arteaga 2007; Sánchez-Gómez 2005**). Aunque generalmente se afirma que el **conus** participa en el desarrollo de ambos tractos de salida ventriculares (**Kramer 1942; de Vries y Saunders; Anderson et al., 1974; de la Cruz 1977**), otros autores sugieren que el cojín ventrosuperior del **canal-AV**, participa en el desarrollo del tracto de salida del **Vi** (**de la Cruz et al., 1982, García-Peláez y Arteaga-Martínez 1984**). Por lo cual, nos propusimos investigar, el destino del miocardio del **conus**; los cambios en el tejido mesenquimatoso de las crestas del **conus** y de los cojines del **canal-AV**. También exploramos la apoptosis durante la transformación del **conus** en estructuras maduras.

## 8.1 Origen y destino del miocardio conal.

Recientemente, se ha desarrollado el concepto del primer campo y segundo campos cardiogénicos (**FHF y SHF**). El **FHF** está representado por el corazón en tubo recto y se piensa que da origen al **Vi** y a los atrios, por otro lado el **SHF** se va adicionando gradualmente al corazón en tubo recto, en la etapa de asa en S, se representa por el conotronco, finalmente se transformaría en el **Vd** (**Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001; Buckingham et al., 2005**). Estos nuevo hallazgos han generado controversia, por un lado, se conocía que las células precursoras del **Vd** en el embrión de pollo ya estaban presentes en el corazón en tubo recto (**de la Cruz MV et al., 1989**). Además, se ha señalado que el **conus** aparece durante el corazón asa en C y se integra completamente al corazón asa en S (estadio 22HH), y posteriormente se transformaría en ambos tractos de salida ventriculares (**de la Cruz et al., 1977**). En el embrión de ratón por medio de seguimiento genético, se ha demostrado que el **FHF** da lugar al miocardio del **Vi** y los atrios (**Buckingham et al., 2005**). Asimismo, se ha demostrado que el **SHF** es una fuente celular a partir de la cual se desarrollan el conotronco en embriones de pollo y ratón (**Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001; Zaffran et al., 2004; Kelly et al., 2001, 2010;**). Nuestros experimentos de **marcaje-stc** de las paredes conales, muestran que el miocardio conal se redistribuye gradualmente hacia diferentes regiones de la pared libre del **Vd**, desde el ápice hasta la base cardíaca (**Figuras 14, 15**). Por otro lado nuestros estudios morfométricos y topológicos muestran incremento longitudinal del **conus** y un desplazamiento gradual desde una posición derecha a una posición ventral definitiva (**Figura 9**).

## 8.2 Remodelación del *conus* durante la septación cardíaca

Se acepta universalmente que los tractos de salida ventriculares se desarrollan mediante la fusión de dos crestas mesenquimales en el centro del lumen del *conus*, para originar dos conductos: el cono-pulmonar y el cono-aórtico; también se les conoce como: cono anterior y cono posterior (**Kramer 1942; de Vries y Saunders 1962; Netter y Van Mierop 1969; Anderson et al., 1974; de la Cruz et al., 1977; Pexider 1978**). En contraste, en absoluta discrepancia con esta idea, recientemente descubrimos que el miocardio conal se transforma en gran parte de la pared libre del **Vd**, lo cual cuestiona la existencia del cono-aórtico. Para validar esta idea, estudiamos los cambios de los tejidos del *conus* y del **canal-AV**, mediante cortes histológicos seriales en el plano transversal (estadios 22-34HH), lo que nos permitió visualizar las relaciones entre ambas estructuras. Observamos eventos importantes que no han sido reportados hasta el momento; primero, aunque es común la descripción de dos crestas mesenquimales independientes, nosotros no identificamos dos crestas independientes en estadio 22HH, ya que las crestas no presentaron límites anatómicos precisos, por el contrario, observamos asociado al miocardio, un cinturón continuo de tejido mesenquimal y hacia la luz, las crestas presentan algunas evaginaciones que se proyectan hacia el cinturón continuo sin llegar a romper la continuidad (**Figuras 10 y 11A-B**). Más tarde entre las etapas 26-28HH las crestas conales aumentaron de tamaño en la porción dorsal del lumen conal, y se acercaron paulatinamente una a la otra. Estos resultados apoyan la idea que la función principal del tejido mesenquimal del *conus* es una función valvular, evitando así el retorno de sangre al segmento ventricular (**Patten et al., 1948; Liu et al., 2012**), en lugar de una función

meramente septal (**de la Cruz et al., 1977**). También, nuestros datos muestran que entre las etapas 23-28HH, el miocardio de una pequeña porción de la pared dorso izquierda del **conus** perdió continuidad tubular, independiente de apoptosis del miocardio, sus extremos libres se separaron gradualmente uno del otro hasta pasar de una estructura tubular a una lamina que comprende gran parte del la pared libre del **Vd** (**Figuras 10, 11 y 14**), en contraste la fusión de los cojines del canal-AV se realiza mediante apoptosis en la zona de contacto, evento ampliamente reportado por otros autores (**Figuras 13B y 14**). Además, la apertura progresiva del miocardio conal observada en las secciones histológicas y nuestro **marcaje-stc in vivo** de las paredes conales (**Figuras 15A-B y 16A-C**), sugieren que el miocardio del **conus** es el precursor embrionario de la pared libre del **Vd**, así como a su tracto de salida ventricular (**Figuras 15A-B, 16A-C y 11C-E**). Previamente Rana y colaboradores (2007) reportaron que la pared libre del **Vd**, se originaba desde el miocardio del conotrongo, sin embargo nuestros datos muestran que es el miocardio del **conus**, pero no del **troncus**, el que participa en este proceso.

### **8.3 Uniones celulares del miocardio en la zona de apertura conal**

En el corazón de organismo adultos, se produce actividad mecánica y eléctrica armoniosa entre los cardiomiocitos individuales que garantizan la excitación coordinada y el rendimiento contráctil del miocardio (**Sheikh et al., 2009**). Las uniones celulares entre cardiomicitos ocurre en los discos intercalares, los cuales son estructuras altamente reguladas y complejas de adhesión célula-célula. Proporcionan la rápida propagación de la señal eléctrica para producir la

contracción en todo el corazón, también permite que los cardiomiocitos permanezcan unidos a pesar de las fuerzas mecánicas propias del latido cardiaco (Vermij et al., 2017). Los cardiomiocitos del corazón adulto son células muy alargadas, se unen entre si, por sus extremos más cortos, sin embargo en nuestros experimentos de inmunodetección de uniones celulares, encontramos que los cardiomiocitos de los estadios estudiados sus uniones célula-célula tienen forma semi-circular (**Figuras 18 y 19**), abarcando toda la circunferencia celular. La proteína N-cadherina uno de los componente principales de las uniones adherentes, en su dominio intracelular se une a  $\beta$ -catenina, proteína que puede activar la vía de señalización Wnt, al translocarse al núcleo celular cuando Wnt se une a su receptor Frizzled, para iniciar la transcripción de los factores de transcripción de la familia TCF/LEF, a pasar de su relevancia durante el desarrollo embrionario, en nuestros datos, la inmunodetección para N-cadherina fue negativo, sin embargo los resultados para la proteína  $\beta$ -catenina mostraron la distribución de los complejos de unión adherente entre los cardiomiocitos. En la zona de apertura del miocardio conal, no encontramos cambios en la distribución subcelular en células de la zona de apertura en comparación con células alejadas de la zona de apertura (**Figura 17**).  $\beta$ -catenina puede regularse dinámicamente, y la fosforilación de  $\beta$ -catenina produce la relocalización parcial de  $\beta$ -catenina desde los complejos de unión célula-célula para aumentar su actividad transcripcional (Song et al., 2003). Sin embargo en ninguno de los estadios analizados, observamos expresión de la proteína  $\beta$ -catenina dentro de los núcleos celulares. Pero cuando utilizamos un anticuerpo para  $\beta$ -catenina fosforilada en Thr<sup>393</sup>, pudimos observar algunas células con tinción positiva flanqueando la zona de



apertura del **conus** (Figura 20). Es conocido que la proteína  $\beta$ -catenina, fuera de los complejos de unión celular, tiene un papel central en la proliferación, diferenciación, polaridad, morfogénesis y desarrollo celular (Peters et al., 1999). Es probable que la activación de  $\beta$ -catenina por fosforilación en Thr<sup>393</sup>, proporcionó la capacidad de separación coordinada entre los cardiomiocitos de la zona de apertura, concomitante las células del miocardio del **conus** fuera de la zona de apertura permanecen fuertemente unidas unas a otras, para no perder las características tisulares de sincitio funcional, a pesar que se estén movilizando para transformarse desde un tubo a una lamina, he invadir el segmento ventricular (Figuras 10, 11, 15 y 16).

#### 8.4 Apoptosis y desarrollo del **conus**.

La apoptosis masiva del miocardio es un proceso morfogenético que se propone para explicar la reducción longitudinal del conotronco (Watanabe et al., 1998, 2001). Sin embargo, debido a la metodología de transfección viral empleada, no les permitió distinguir entre el miocardio del **conus** y **truncus**, así Watanabe y sus colegas concluyeron que ambas estructuras embrionarias desaparecían casi por completo, causando un acortamiento longitudinal del conotronco (Watanabe et al., 1998, 2001). En contraste, por marcaje **marcaje-stc**, nos fue posible distinguir el miocardio del **conus** del miocardio del **truncus**, con esa estrategia describimos un patrón apoptótico espacio-temporal, concordante con lo descrito por Cheng (Cheng et al., 2002). Al igual que Cheng, encontramos que el **truncus** fue la estructura principalmente afectada por la apoptosis. También observamos que la

apoptosis en el dominio conal cambió de manera secuencial, en el estadio 24HH, afectó a células del mesénquima conal (**Figura 13A**), después y en menor medida, afectó algunas células del miocardio lateral del **conus** (estadios 26-30HH) (**Figuras 13B, C y D**), para finalmente afectar a células del epicardio (estadio 32HH) (**Figuras 13E y E'**). Estos resultados sugieren que el acortamiento del miocardio del **conus** (**Goor et al., 1972; de la Cruz et al., 1977; Thompson et al., 1987; Ya et al., 1998**), sea una interpretación errónea, incluso la descripción del **SFH** apoya la idea de la transformación del **conus** en gran parte de la pared libre del Vd. Por el contrario es probable que la apoptosis del miocardio del **conus**, contribuya a la remodelación fina, que permita la transformación del **conus** de forma tubular a una lámina que se distribuye en la superficie del VD.

### **8.5 Septación del conus**

Es aceptado universalmente que durante la septación del **conus**, las crestas derecha e izquierda del **conus** se van acercando paulatinamente hasta fusionarse justo en el centro del lumen conal para formar el cono-pulmonar y el cono-aórticas (**Kramer 1942; de Vries y Saunders 1962; Aderson et al., 1974; de la Cruz 1977; Asami 1969; Netter y Van Mierop 1969; Piexieder 1978**). Sin embargo, el análisis topográfico del miocardio y mesénquima conal, identificamos una pequeña zona de la pared dorso izquierda del miocardio tubular, donde se perdía continuidad y se exponían dos terminaciones de miocardio libres, inmensas y flanqueadas por tejido mesenquimal del **conus** y del cojín ventrosuperior del canal-AV evitando de esta manera el corto circuito sanguíneo. Alrededor del estadio 30HH el miocardio del **conus** paso de una estructura tubular similar “O” a

tener la forma de un canal “U” en la zona dorsal de la estructura conal abierta se desarrollaron dos eminencias de tejido mesenquimal que se acercaban una a la otra (**Figuras 6C y 6C'; 7A y 7C**). Más tarde, en el estadio 31 las eminencias se fusionaron, pero no en el centro del lumen conal. La fusión separó al tracto de entrada del tracto de salida del Vd. (**Figura 7D y E**). Estos resultados, además de mostrar que el cono-pulmonar es una interpretación equivocada de la literatura, concuerdan con hallazgos previos donde se demuestra que la cresta supraventricular se desarrolla a partir de la fusión de las crestas conales (**de la Cruz 1998**).

#### **8.6 Participación de los cojines del canal atrioventricular en la génesis del tracto de salida del ventrículo izquierdo**

En los años ochenta, un grupo de investigadores realizaron **marcaje-stc in vivo** del cojín ventrosuperior del **canal-AV** en el corazón del embrión de pollo (etapa 22HH). Las marcas plásticas las encontraron alojadas en la porción libre de la valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda y en una pequeña región del tabique interventricular de características membranosas; con esa información concluyeron que el cojín ventrosuperior del **canal-AV**, era uno de los precursores del tracto de salida del **Vi** (**De la Cruz et al., 1982; García-Peláez et al., 1984**), y que junto con el supuesto cono-aórtico, también participaba en la formación del tracto de salida. Sin embargo no pudieron explicar la convergencia entre ambas estructuras anatómicas que condujeran a la formación del tracto de salida del **Vi**. Por otro lado, el análisis de nuestras secciones histológicas en el plano transversal, nos permitió observar los cambios topográficos y las relaciones entre

los cojines del **canal-AV** y del miocardio y mesénquima del **conus**. Mediante esta estrategia pudimos observar como los cojines del **canal-AV** aumentaban de volumen y se poblaban cada vez de más de células, hasta que ambas estructuras se fusionaran para formar el tabique medio del **canal-AV** (**Figuras 6C y 6C**). Posteriormente el tabique medio se remodela, se adelgaza y se aplana, adquiere una forma arco (**Figura 7A y C**). Más tarde, en la etapa 30HH, dos protuberancias contra laterales del mesénquima conal se acercan para finalmente fusionarse y en el estadio 31HH, una porción del el tabique medio se ha transformado en la incipiente valva septal de la válvula atrioventricular izquierda (**Figura 7C**). La apertura del miocardio del **conus** y las proyecciones del mesénquima conal aun en proceso de fusión, causan la formación de un canal largo y estrecho que comunica a ambos tractos de salida ventriculares (**Figura 7C**). Más tarde, en la etapa 31-32HH, las proyecciones del mesénquima del **conus** se fusionaron y han adquirido la apariencia de la cresta supraventricular. La valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda, mantenía una estructura fibrosa y dividió el orificio del tracto de entrada del orificio del tracto de salida del **Vi** (**Figura 7D y 7**). Estos resultados sugieren fuertemente que al fusionarse las protuberancias mesenquimales del **conus** en sus porciones dorsales forman la cresta supraventricular, sin embargo al hacerlo solo en sus porciones dorsales y no en el centro de la luz conal, formaron el tracto de salida del **Vd**, con características totalmente musculares. Por otro lado, nuestro marcaje del cojín ventrosuperior del **canal-AV**, concuerda con lo reportado previamente (**de la Cruz et al., 1982; García Peláez et al., 1984**), sin embargo nosotros observamos el destino de las marcas plásticas mediante cortes histológicos, y pudimos apreciar que las marcas

plásticas se distribuyeron en la valva anteroseptal de la válvula atrioventricular izquierda, en la continuidad fibrosa mitroaórtica en una porción lisa y paramedial del tabique interventricular asociada a la valva no corona. Estas estructuras anatómicas, son los límites anatómicos del tracto de salida del **Vi**. Es probable que en conjunto, el tabique medio del **canal-AV** así como los cojines laterales derecho e izquierdo del **canal-AV**, se transformen en el esqueleto fibroso del corazón (**Figuras 3, 10, 11**). Nuestros hallazgos refutan la idea del concepto de cono aórtico como precursor del tracto de salida del **Vi** y muestran evidencia de un origen embrionario distinto para ambos tractos de salida ventriculares. Las descripciones anatómicas del esqueleto fibroso cardíaco (**Figura 3**) apoyan la idea que los tractos de salida ventriculares se originan de primordios distintos, ya que el esqueleto fibroso cardíaco incluye a las válvulas: mitral, tricúspide, aórtica, al tabique atrioventricular y la continuidad fibrosa mitroaórtica, formando una unidad anatomofuncional, pero excluye la válvula pulmonar (**Anderson y Becker 1982**). La nueva información obtenida en la presente investigación proporciona un marco de referencia para los enfoques moleculares del origen de los tractos de salida ventriculares. Además, proporciona bases embriológicas sólidas para mejorar el diagnóstico y el tratamiento quirúrgico de los defectos congénitos que afectan estas estructuras anatómicas del corazón.

## 9. Conclusiones

En este trabajo se propone un nuevo modelo para explicar el desarrollo de los tractos de salida ventriculares, anteriormente se pensaba que se originaban por la reducción longitudinal y septación del **conus**, originando así el cono-aórtico y cono pulmonar, sin embargo nosotros encontramos que el miocardio del **conus** no reduce sus dimensiones longitudinales durante la septación, por el contrario se transforma en gran parte de la pared libre del ventrículo derecho. El **conus** inicialmente constituido de miocardio en forma tubular, pierde continuidad en una porción dorsoizquierda y los extremos libres de miocardio se desplazan en sentidos opuestos, hasta transformarse en una lamina que corresponde a gran parte del miocardio del ventrículo derecho. La fusión de las crestas del **conus** no forma los conos-aórtico y cono-pulmonar ya que la fusión de las crestas conales solo originan el tracto de salida del ventrículo derecho. Las características fibrosas del tracto de salida del ventrículo izquierdo se desarrollan a partir del tabique medio del canal atrioventricular. Por lo tanto, los tractos de salida ventriculares se originan desde primordios embrionarios distintos. La apertura del miocardio de la pared dorsoizquierda del **conus**, podría estar mediada por remodelación del mesenquima conal, translocación nuclear de  $\beta$ -catenina, y pérdida de uniones comunicantes entre los miocardiocitos de la zona de apertura.

## **10. Perspectivas**

Con el nuevo modelo del desarrollo de los tractos de salida ventriculares, sería interesante tratar de describir anatómicamente la embriopatogenia de las cardiopatías congénitas del tipo troncoconales. Nuestro modelo propone que el tracto de salida del ventrículo izquierdo se origina del tabique medio del canal atrioventricular, sin embargo es necesario realizar experimentos de marcaje selectivo con tinta china/carbón, para dilucidar la participación de los cojines ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular en la génesis del tracto de salida del ventrículo izquierdo, ya que eventualmente ambos cojines se fusionan y forman el tabique medio del canal atrioventricular

## 11. Referencias

**Anderson et al.** (1974). Morphogenesis of bulboventricular malformations. I: Consideration of embryogenesis in the normal heart. *British Heart J.* 36: 242–255.

**Anderson y Beaker.** (1982). Atlas fotográfico de anatomía cardiaca. Doyma S.A. Barcelona.

**Anderson et al.** (2003). Development of the heart: (3) formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. *Heart*; 89 (9):1110–1118. PMID: 12923046

**Arteaga et al.** (1987). Anatomía y fisiología normal del corazón. En: *CARDIOLOGIA PEDIATRICA*, editado por Julio A Fernández. Ediciones CEA, S.A. (Grupo Jarpyo). Madrid, España. Pp 1-39.

**Buckingham et al.** (2005). Biolding the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6(11):826-35.

**Buckley et al.,** (2014). Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science (New York, NY)* 346:1–21.

**Carmeliet E.** (2019). Conduction in cardiac tissue. Historical refrections. *Physiol. Rep.* Jan; 7 (1): e13860

**Castro-Quezada et al.** (1972). Experimental study of the formation of the bulboventricular loop in the chick. *J Embryol Exp Morphol.* 27:623-37

**Cheng et al.** (2002). Spatiotemporal and tissue specific distribution of apoptosis in the developing chick heart. *Dev Dyn.* 2002, 223:119–133. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1244> PMID: 11803575



**Davis** (1927). Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Carnegie Contrib Embryol.*

**de la Cruz and Markwald** (1998). Embryological development of the ventricular inlets. Septation and atrioventricular valve apparatus. In: de la Cruz M y Markwald R, eds. *Living Morphogenesis of the heart*. Birkhauser. Boston. Pp:85-98.

**de la Cruz et al.** (1977). Experimental study of the development of the truncus and the **conus** in the chick embryo. *J Anat*; 123: 661-686.

**de la Cruz MV et al.** (1982). Morphogénese du septum interventriculaire. *Coeur*. 1982; 13: 443–448.

**de la Cruz et al.** (1983). The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to the development of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. *Am J Anat* 166:63-72.

**de la Cruz et al.** (1989). The primitive cardiac regions in the straight tube heart (stage 9-) and their anatomical expressions in the mature heart: an experimental study in the chick embryo. *J Anat*. 165:121-31.

**de la Cruz et al.** (1991). The developmental components of ventricles: their significance in congenital malformations. *Cardiol Young* 1:123-8.

**de la Cruz MV** (1998). Embryological development of the outlet of each ventricle. In: *Living morphogenesis of the heart*. De la Cruz MV and Markwald R editors. *Living morphogenesis of the heart*. Boston, Basel, Berlin: Birkhauser; pp. 131–156.

**de Vries y Saunders.** (1962). Development of the ventricles and spiral outflow tract in the human heart. *Contrib Embryol*. 37:87–114. 8.

**Eisenberg y Markwald.** (1995). Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res.* 77(1): 1–6. PMID: 7788867

**Epstein et al.,** (2010) Cardiac development and implications for heart disease. *N Engl J Med*;363:1638—47.

**Fanning y Anderson** (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci.* 1165:113–120.

**Franz y Ridley** (2004). p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. *J biol chem.* 279:6588–6594.

**García-Peláez et al.** (1984). Contribution of the superior atrioventricular cushion to the left ventricular infundibulum. Experimental study on the chick embryo. *Acta Anat.* 118: 224–230.

**García-Peláez y Arteaga.** (2007). Estudio experimental del desarrollo del truncus arteriosus del corazón de embrión de pollo. *Arch Mex Anat Nueva Época* 2 (1): 21–30. 17.

**Golovkine et al.** (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Takes a Multi-Target Approach to Achieve Junction Breach. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

**González-Mariscal et al.** (2014) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Seminars in cell & developmental biology.* 36:213–223.

**Goodenough y Paul DL** (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a002576

**Goor** et al. (1972). The conotruncus. I. Its normal inversion and conal absorption. *Circulation*. 46: 375–84.

**Grant Robert P.** The embryology of ventricular flow pathways in man. *Circulation*. 1962; 25: 756–779.

**Hamburger and Hamilton** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. morphol.* 88:49-92. PMID: 24539719.

**Kelly** et al. (2001). The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev. Cell* 1, 435–440.

**Kelly y Evans** (2010). The second heart field. In “Cardiac Development and Regeneration,” (R. P. Harvey and N. Rosenthal, eds.), pp. 143–169. Academic Press, Oxford.

**Kirby** et al. (1983). Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*. 1059-1061

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

**Lazzarini R.** (2012). Determinación del destino prospectivo de las paredes del cono y el significado de la proliferación y apoptosis del miocardio. Estudio experimental en embrión de pollo. Tesis maestría en Biología Experimental. UAM-I.

**Lints** et al. (1993). Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119:419-31.

**Liu et al.** (2012). Biomechanics of the chick embryonic heart outflow tract at HH18 using 4D optical coherence tomography imaging and computational modelling. *PLoS One*. 2012; 7(7): e40869 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040869> PMID: 22844414

**Manner et al.** (1993). Correlation between the chick embryonic heart flexures and cardiac development. An experimental study in the chick embryos. *Anat Embryol*. 188:269-85.

**Menkes et al.** (1970). Researches on the formation and the elastic structure of the aortopulmonary septum in the chick embryo. *Rev. Roum. Embryol. Cytol*. 2:79-91.

**Mikawa** (1999) Cardiac lineages. In: Harvey RP, Rosenthal N, editors. *Heart development*. San Diego, CA: Academic Press; 1999. p. 19—33.

**Mjaatvedt et al.**, (2001). The outflow of the heart is recruited from a novel heart forming field. *Dev Biol*. 238;97-109.

**Netter y Van Mierop** (1969). Embryology. In: Netter FH, editor. *CIBA Collection of Medical Illustrations*. Ardsley, New Jersey: CIBA Pharmaceutical Co. Vol. 5, p119–125.

**Olson** (2006) Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*;313:1922—7.

**Orts-Llorca et al.** (1982). The formation, septation and fate of the truncus arteriosus in man. *J Anat*. 1982; 134(1): 41–56. 12.

**Patten et al.** (1948). Valvular action in the embryonic chick heart by localized apposition of endocardial masses. *Anat Rec*. 102(3): 299–311. PMID: 18098423

**Peters** et al. (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* volumen 401, pages345–350.

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

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

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

**Pexieder T.** (1978). Development of the outflow tract of the embryonic heart. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 14(7):29-68.

**Poelmann** et al. (1998). Neural crest cell in outflow tract septation of the embryonic chicken hearts: Differentiation and Apoptosis. *Dev Dyn.* 212, 373- 384.

**Raules M.** (1943). The heart-forming areas of the early chick blastoderm. *Physiol Zool* 16:22-44.

**Ribeiro-Rodrigues** et al. (2017). Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication—gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *J Cell Sci* 130:3619–3630

**Rodgers y Fanning.** (2011). Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken);* 68:653–660.

**Saez** et al. (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359–14002.

**Saitou** et al., (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *The Journal of cell biology*. 141:397–408.

**Sánchez-Gómez** et al. (2005). Histological study of the proximal and distal segments of the embryonic outflow tract and great arteries. *Anat Rec*. 2005; 83(1): 202–211.

**Saremi** et al. (2017). Fibrous Skeleton of the Heart: Anatomic Overview and Evaluation of Pathologic Conditions with CT and MR Imaging. *RadioGraphics*. Vol. 37, No. 5.

**Saunders** (1966). Death in embryonic system. *Science*, 154:604-612

**Seichert V.** (1965). Study of the tissue and organ anlage shifts by the method of plastic linear marking. *Folia Morphologica*. 13:228-238.

**Shapiro y Weis** (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:1–21.

**Sheikh** et al., (2009). Cell-cell connection to cardiac disease. *Trends Cardiovasc Med* 19(6):182–190.

**Song** et al. (2003). CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem*. Jun 27;278(26):24018-25.

**Stalberg y DeHaan** (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol* 19:128-59.

**Takeichi M.** (2014) Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 15:397–410.

**Thompson et al.** (1987). Morphogenesis of the truncus arteriosus of the embryo heart: movements of autoradiographic tattoos during septation. *Anat rec* 218:434-40.

**Thompson y Fitzharris.** (1979). Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: tissue reorganization during septation. *Am J Anat*. 156: 251–264.

**Tsapara et al.** (2006). The heat-shock protein Apg-2 binds to the tight junction protein ZO-1 and regulates transcriptional activity of ZONAB. *Mol Biol Cell*. 17:1322–1330.

**Umeda et al.** (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *The Journal of biological chemistry*. 279:44785–44794.

**Van Itallie y Anderson** (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in cell & developmental biology*. 36:157–165.

**Van Praagh R.** (1985). Cardiac embryology: the conotruncus. *Heart Vessels*. 1(4): 193–194.

**Vermij et al.,** (2017). Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc Res* 113(3):259–275.

**Vinken M** (2015) Introduction: connexins, pannexins and their channels as gatekeepers of organ physiology. *Cell Mol Life Sci* 72:2775–2778

**Waldo** et al., (2001). Conotruncal myocardial arises from a secondary heart field. *Development*. 128:3179-3188.

**Watanabe** et al., (1998). Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development* 125, 3809-3820.

**Watanabe** et al., (2001). Apoptosis Is Required for the Proper Formation of the Ventriculo-Arterial Connections. *Dev. Biol.* 240, 274-288.

**Ya** et al. (1998). Normal development of the outflow tract in the rat. *Circ Res.* 82: 464–472.

**Zaffran** et al. (2004). Right ventricular myocardium derivates from anterior heart field. *Circ Res*;95:261–8.

**Zihni** et al. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews Molecular cell biology.* 17:564–580.



## 12. Anexo I. Artículo Científico

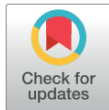
### RESEARCH ARTICLE

# The proximal segment of the embryonic outflow (conus) does not participate in aortic vestibule development

Roberto Lazzarini<sup>1</sup>, Luis Enrique Gómez-Quiroz<sup>2</sup>, Humberto González-Márquez<sup>2</sup>, Laura Villavicencio-Guzmán<sup>3</sup>, Marcela Salazar-García<sup>3</sup>, Concepción Sánchez-Gómez<sup>1,3\*</sup>

**1** Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México, **2** Departamento Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Ciudad de México, México, **3** Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, Hospital Infantil de México, Federico Gómez, Ciudad de México, México

\* [csgomez\\_2000@yahoo.com](mailto:csgomez_2000@yahoo.com)



## Abstract

### Objective

There is no consensus on the embryonic components or morphogenetic processes involved in mature ventricular outflow tract development. Our goal was to use *in vivo* labelling to investigate the prospective fate of the myocardium of each conal wall. The conal and atrio-ventricular cushion mesenchyme changes during transformation into mature structures and their role in apoptosis were also investigated.

### Methods

Plastic labels were placed at the cephalic and caudal conal limits of chicken embryo hearts (stage 22HH) and traced up to stage 36HH. Histological analyses, scanning electron microscopy and apoptotic detection using Lysotracker-Red were performed. The conal longitudinal length and medial displacement were registered. Muscle myosin was identified by immunofluorescence.

### Results

Labels positioned in the myocardium of each conal wall moved to the right ventricle (RV), shifting from the arterial subvalvular myocardial zone to the apex. No labels were found in the aortic vestibule. At stage 22HH, the conus was a tubular structure composed of myocardium and endocardium with scarce mesenchyme. The dorso-left conal myocardial wall gradually lost continuity and the free ends separated, while the myocardium was distributed to the RV free wall (24HH-28HH). At stage 22HH, conal crests were not observed, but they were apparent at the dorsal zone of the conus at stage 26HH; towards stage 30HH, they fused to form the supraventricular crest, and the pulmonary infundibulum was evident. The ventro-superior cushion of the AV canal was reorganized into the fibrous and muscular structures lined the aortic vestibule.

### OPEN ACCESS

**Citation:** Lazzarini R, Gómez-Quiroz LE, González-Márquez H, Villavicencio-Guzmán L, Salazar-García M, Sánchez-Gómez C (2018) The proximal segment of the embryonic outflow (conus) does not participate in aortic vestibule development. PLoS ONE 13(12): e0209930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930>

**Editor:** Leonard Eisenberg, New York Medical College, UNITED STATES

**Received:** September 5, 2018

**Accepted:** December 13, 2018

**Published:** December 31, 2018

**Copyright:** © 2018 Lazzarini et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The data are all contained within the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Children's Hospital of Mexico Federico Gomez. Grant number HIM-2013-060 to CS-G and the Scholarship for postgraduate studies Universidad Autónoma Metropolitana Grant number -36970 to RL. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

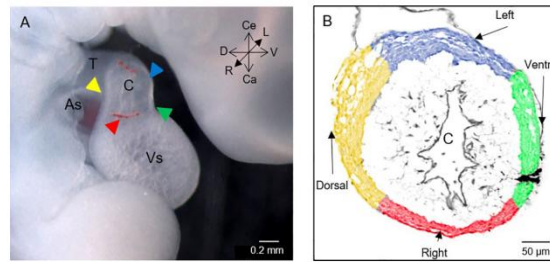
**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Conclusions

The posterior conus is an erroneous concept. The conal myocardium is reorganized in the free wall of the RV. Internally, the conal lumen is transformed into the pulmonary infundibulum. The aortic vestibule is formed from the ventro-superior cushion of the AV canal. Thus, the ventricular outflow tracts have different embryonic origins.

## Introduction

It is generally accepted at present that the ventricular outflow tracts of the postnatal tetracavitary heart consist of three well-defined anatomical regions: arterial trunks (pulmonary and aortic trunks), arterial valves (valvar leaflets and their supporting annulus) and subvalvular intracardiac ventricular outflow tracts (pulmonary infundibulum and aortic vestibule) [1]. In agreement with this idea, it has been pointed out that the embryonic outflow also consists of three segments: distal, intermediate and proximal [2]. The distal segment corresponds to the aortic sac with a vascular composition, while the intermediate and proximal segments of the developing outflow comprise the truncus and conus, both of which are covered by a myocardial sleeve. Additionally, the concept of the first (FHF) and second (SHF) heart fields has recently been developed [3–5]. The straight heart tube represents the FHF, while the SHF originates the latter, which gradually converges into the heart tube during the torsion and looping process and is the cellular source from which the embryonic outflow, inflow and atria are derived. Despite this new anatomical approach of the embryonic and postnatal heart, and the discoveries in the two heart fields, there is still no consensus on the embryonic components involved in the genesis of the intrapericardial arterial trunks. Additionally, the information about each element that forms the mature intracardiac ventricular outflow tracts is controversial. There is also no agreement on the morphogenetic processes involved in the development of each of these cardiac structures. Most classic authors of cardiac embryology indicate that the truncus is involved in all [6–15] or only in a part of the vascular extension of the great arteries, including the aortic and pulmonary valves formation [2, 16]. However, in 2005 we concluded that the truncus is involved only in the development of the pulmonary and aortic insertion annulus and valves, but it does not form the entire vascular region of the great arteries, which is derived from the aortic sac [17]. This statement was supported by at least two findings in the chick embryo heart: 1) The ultrastructural and experimental evidences of myocardial cell differentiation in to connective tissue in the truncus [18]. 2) The high incidence of persistent truncus arteriosus associated with anomalies of the aortic arches resulted from the neural crest cells between the third and right fourth aortic arches region depleted [19, 20]. Regarding the embryogenesis of the ventricular outflow tracts, it has been widely reported that the conus decreases its longitudinal dimensions during developmental progression, and its final anatomical representation in the adult heart is limited to the subvalvular area of the intracardiac RV infundibulum [8, 9, 21]. Additional classical and current descriptive studies mention that the conus is initially a tubular structure, with a smooth myocardial wall, without trabeculae, and with a lumen lined circumferentially by cardiac jelly, covered by endocardium. Later, in the advanced loop stage, endocardial ridges develop inside the intermediate and proximal segments of the developing outflow via the endothelial to mesenchymal transformation process [22]. It has also been reported that the right and left endocardial crest divide the conus into an anterior and posterior conduit. The anterior conus will transform into the pulmonary infundibulum (located between the free edge of the supraventricular crest and the pulmonary valve



**Fig 1. Spatial situation of the myocardial conal walls.** (A) Right sagittal view of the cephalic portion of a stage 22HH chicken embryo showing the different regions that make up the heart and the location of the conal walls in the organ in situ. Arrowheads: yellow = dorsal wall; green = ventral wall; red = right wall; blue = left wall. (B) Cross-section of the middle zone of the conus at stage 22HH, haematoxylin-eosin stain. Digitally, colours were impressed to the conal walls myocardium as described in section A. Observe a black label immersed in the myocardium of the ventral conal wall. Abbreviations: As = atrial segment; C = conus; Ca = caudal; Ce = cephalic; D = dorsal; L = left; R = right; T = truncus; V = ventral; Vs = ventricular segment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g001>

supporting annulus). In contrast, the posterior conus will form the aortic vestibule (located between the mitral-aortic fibrous continuity and the aortic valve supporting the annulus) [6, 7, 23, 24]. In this context, classic *in vivo* labelling studies in the chick embryo heart by De la Cruz et al [24] demonstrated that the conus is fully developed in the advanced loop stage (Stage 22HH). The conus-ventricular limit was described as the transition zone between a smooth conal region, which contrasts with a ventricular trabecular zone. And the boundary between the conus and the truncus was considered the angular junction between the proximal caudo-cephalic and the distal ventro-dorsal segments of the heart tube (Fig 1A).

The differential arrangement of the right and left endocardial conal crests, contrasting with the upper and lower endocardial truncal crests, was further recognized to facilitate the distinction between the conus and the truncus. This description of the chick embryonic heart at stage 22HH by De la Cruz et al [24] is similar to the “dog-leg bend” described in the mouse heart of embryos with 42 somites by Anderson and cols [15]. The de la Cruz delimitation of the anterior conus by differential labelling with a gelatin-Indian ink mixture and tracing of its precise fate throughout the mature heart has confirmed that the anterior conus provides the origin for the right ventricular outflow tract and inferred that the posterior conus will form the aortic vestibule [24]. However, recent studies utilizing cell tracing with a fluorescent dye in the chicken embryo have led to the conclusion that the embryonic outflow forms both the trabecular free wall and the infundibulum of the right ventricle [25].

The idea of the fate of the posterior conus as a precursor of the aortic vestibule has been maintained until the present. However, in the 1980s, two groups of researchers labelled the ventro-superior cushion of the atrioventricular canal (AV canal) in the chicken embryo heart [26, 27]. These researchers found that this cushion was involved in the formation of the fibrous (mitroaortic continuity) and muscular walls of the aortic vestibule, but in no case was a convincing explanation provided for the role of the posterior conus.

Most classic authors point out in humans [9, 21] and birds [13, 24] that the conus undergoes longitudinal reduction; in fact, it has been suggested that the conus completely disappears [10, 12, 13, 23]. Moreover, Watanabe et al by viral transfection of the chicken embryo heart, reported reduction of the cono-truncus myocardium by apoptosis during transformation of the embryonic outflow into the mature anatomical structures [28, 29]. However, they did not mention whether apoptosis was present in the conus, truncus or both regions. Additionally, in

murine animal models, the right ventricle (RV) is now known to develop completely from the second heart field [30], which has been identified in embryonic stages as the cono-truncus and a part of the pharyngeal mesoderm [31, 32]. This new information raises questions concerning the fate of the conus as a precursor of both ventricular outflow tracts. Due to all these controversies, by *in vivo* labelling of the chicken embryo heart and histological analysis, we aimed to investigate the reordering of the myocardium of each conal wall and the changes in the mesenchymal tissue of the conus and the AV cushions during their transformation into mature structures. The role of apoptosis was also investigated. We demonstrated that the conus was not divided in two conducts, nor did it display apoptosis. Rather, the conal myocardium participates in the formation of the right ventricle free wall, including the pulmonary infundibulum. Additionally, we identified the ventro-superior cushion of the AV canal as the embryonic precursor of the aortic vestibule.

## Materials and methods

### Nomenclature

In this work, we used the classic conus and truncus nomenclature because although it is obsolete among embryologists, it is still used in the field of paediatric cardiology and pathology. Additionally, one of the basic principles of anatomical states is that all structures within the body should be described as observed in the anatomical position of the subject facing the viewer [33]. In accordance with this principle, the walls of the proximal segment of the embryonic outflow classically known as the conus are named based on their relative positions within the embryo, following the axis symmetry but not their supposed prospective fate as is customary. Thus, we designated right and left conal walls as the classically denoted anterior and posterior conal walls, while the conal walls conventionally considered right and left in this paper were designated as dorsal and ventral walls, respectively (Fig 1).

### Embryos

Fertilized Bovans chicken eggs were obtained from the local poultry farm ALPES (Puebla, México). The eggs were incubated at 37.8°C and 60% relative humidity until they reached stage 22HH [34]. The eggshells were disinfected with 70% alcohol and then windowed to stage the embryos. Having exposed the heart by dissection of the allantoic and pericardial membranes, the myocardial conal walls were differentially labelled based on the description by de la Cruz et al [24]. The animal use protocols and study procedures were based strictly on the Mexican Official Guidelines (NOM-062-ZOO-1999). In addition, the research, ethics, and biosafety Children's Hospital of Mexico Federico Gomez committees approved this project (HIM-2013-060).

### Plastic labels preparation

Plastic labels were made with a gelatine-activated charcoal mixture with some modifications of the Seichert technique [35]. With this purpose, thin ( $\leq 10 \mu\text{m}$  in diameter) and long (10 cm) filaments were prepared by heating to red hot and extensively stretching a glass rod. India ink (0.1 mL), an aqueous pure 5% gelatine mixture (1 mL) and activated charcoal (0.17 g) were mixed in an Eppendorf tube and gently stirred in warm water (70°C) for 3 min. The liquid mixture was used to varnish the 10  $\mu\text{m}$  glass filaments. Once the mixture of black coloured gelatine had solidified, the varnished filaments were stored in a sterile petri dish under refrigeration. To label the embryonic chicken hearts *in vivo*, small black coloured glass fragments (0.5 mm) were cut and inserted into the previously chosen tissue.

### Labelling experiments

Embryos at stage 22HH, when the conus completes development and the truncus can be certainty identified, were randomly separated into four groups. **GI**. To determine the prospective fate of the classically designated anterior conus, a fine glass filament covered with a gelatine-activated charcoal mixture was inserted for 15 seconds in the myocardium at the boundary between the smooth conal region and the ventricular trabeculated zone. Another filament was inserted at the angular junction between the conus and the truncus. The filaments were subsequently drawn out, leaving a dark tattoo immersed in the myocardium. To place the labels, a 1 cm<sup>2</sup> window was opened in the egg shell. The vitelline and pericardial membranes were immediately dissected to expose the heart. The prospective fate of the myocardium of the remaining conal walls was determined by placing a label into the myocardium in the middle area of the conus (Stage 22HH) with the following distribution: **GII**. At the ventral conal wall. **GIII**. At the dorsal conal wall **GIV**. At the left conal wall. After labelling, the embryos in the four groups were photographed *in ovo* using a Carl Zeiss stereomicroscope Lumar V12 and a digital camera Axiocam MRC (Carl Zeiss, Germany). Once the window of the shell was covered with Parafilm, the eggs were returned to the incubator and maintained at 37.8°C and 90% relative humidity to acquire embryos at various representative stages of the process of cardiac septation (24–36HH). The labelling procedure causes mortality, and therefore only those embryos that showed a normal morphology and heart with no apparent defects were selected. Forty normal GI hearts from each stage (24–36HH) and twenty GII–GIV hearts from each stage were counted to identify the myocardial conal fate and histological analysis. Additionally, GI embryos were assessed using scanning electron microscopy, morphometric, apoptosis and immunofluorescence analyses. The total hearts acquired at each stage were: GI = 45, GII–GIV = 30 (Table 1).

### Prospective fate of the myocardial wall of the conus

Mature labelled hearts (stage 36HH) that had completed cardiac septation, great vessel branching, and valve leaflet development were photographed using the same equipment as at the beginning of the experiments (n = 30 in each group). Photographs were used to identify the final location of the labels, define the prospective fate of each myocardial wall of the conus and design a destination map of the conal walls.

### Histological procedures

Six representative labelled fixed hearts at each stage (24–36HH) from GI–GIV previously photographed were dehydrated through a graded series of alcohols to 100%. The hearts were

**Table 1. Embryonic hearts acquired and number of hearts used for each stage.**

Conal Wall labelled	HH Stage	Myocardial conal fate	Histological analysis	Morphometric analysis		Apoptosis analysis	IF Analysis
				Conus Length	Conal Rotation		
GI Right GII Ventral GIII Dorsal GIVLeft	22HH	n = 30	n = 6	n = 20+	n = 20+	n = 6*	n = 6*
	24HH	n = 30	n = 6	n = 20+	n = 20+	n = 6*	n = 6*
	26HH	n = 30	n = 6	n = 20+	n = 20+	n = 6*	n = 6*
	28HH	n = 30	n = 6	n = 20+	n = 20+	n = 6*	n = 6*
	30HH	n = 30	n = 6	n = 20+	n = 20+	n = 6*	n = 6*
	32HH	n = 30	n = 6	n = 20+	n = 20+	n = 6*	n = 6*
	36HH	n = 30	n = 6	n = 20+	n = 20+	n = 6*	n = 6*

Total hearts acquired: GI = 45 at each stage, GII–GIV = 30 at each stage. + Captured images from GI labelled hearts.

\* Fresh GI labelled hearts.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.t001>

cleared in xylene (Sigma, USA) and embedded in Paraplast wax (Tissue-Tek, USA) to obtain 5  $\mu\text{m}$  serial transverse sections. The sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) to investigate the topographical changes in the conus and the AV canal. A description of the conal myocardium and mesenchymal tissue at the conus and AV cushions was also provided.

### Morphometric analysis

To define the conus length changes and the conus displacement during cardiac septation (stages 22–36HH), photographs of GI hearts in the frontal view at stages 22–36HH were used. In the first case (conal length), the distance between the central zone of initially compact black tattoo of the plastic label to the half zone of the dispersed black spots immersed in the myocardial ventricular tissue were measured. In the second case (conus displacement), the opening of the angle between the middle line of the embryo (neural tube) and the sagittal line drawn up throughout the developing conus was registered, using the ImageJ programme ( $n = 20$  captured images at each stage).

### Statistical analysis

For conus length changes and displacement values, data are present as means. Analyses were performed using the Student's test and ANOVA with Prism software. Differences were considered to be significant at  $p \leq 0.01$ .

### Scanning electron microscopy

Ten embryonic GI hearts at different stages (22–36HH) previously fixed and photographed were used for scanning electron microscopy analysis. A group of this hearts ( $n = 5$ ) was dissected in a transversal plane at the level of the base of the heart to observe the lumen of the conus and the AV canal. In both cases (dissected and complete hearts), the samples were dehydrated and desiccated under liquid  $\text{CO}_2$  with a critical-point drying apparatus Samdri 789A (Tousimins Research Co., MD, USA) and sputter-coated with 350 nm gold in a Denton Vacuum Desk 1A apparatus (Cherry Hill Industrial Centre, NJ, USA). Photographs were obtained using a JEOL Scanning Electron Microscope JSM 5300 (JEOL, Tokyo, Japan) at 15 kV and at different magnifications. Photographs acquired were used to illustrate the gradual displacement of the conus from its original right position to a definitive ventral position, previously measured in the GI hearts captured images.

### Apoptotic pattern at the embryonic outflow

Live hearts of embryos labelled at the stage 22HH at the conal limits (GI) and re-incubated until they reached stage 24–36HH were used to evidence the apoptotic pattern in the embryonic outflow during cardiac septation ( $n = 5$  at each stage). The hearts were isolated in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl) supplemented with the vital dye LysoTracker Red (50 nM, LTR). After a 30 minutes incubation at 37°C, the hearts were washed (PBS) and fixed for 4 hours (4% formaldehyde in PBS). After extensive washing (PBS), LysoTracker fluorescence was visualized using an epifluorescence stereomicroscope Lumar V12 (Carl Zeiss, Germany) using a rhodamine filter. Special emphasis was placed on the anatomical regions between the labels previously inserted in the conal limits. Specimens were photographed and processed to histological analysis. Serial transverse sections (5  $\mu\text{m}$ ) were obtained for careful analysis under a CONFOCAL LSM-780 NLO microscope (Carl Zeiss, Germany).

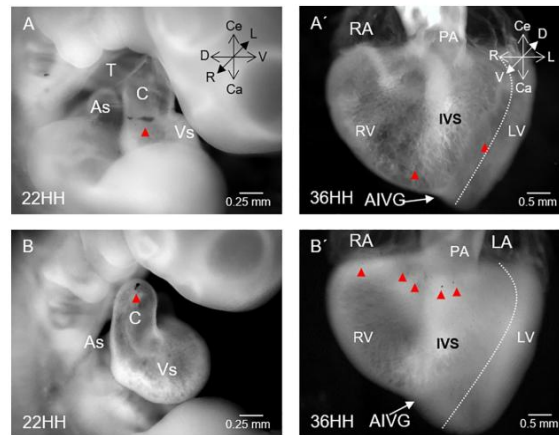
### Immunofluorescence

Representative transversal histological sections from GI embryonic hearts (Stages 24-36HH) were washed and permeabilized with Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) in PBS and treated with serum-free protein block (Dako, USA). Tissues sections were incubated with a mouse anti skeletal muscle myosin antibody (Santa Cruz Biotechnology USA, SC-32732) and secondary rabbit anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, USA). The sections were then observed under a CONFOCAL LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Germany). Controls for immunofluorescence experiments included the use of the secondary antibody alone.

### Results

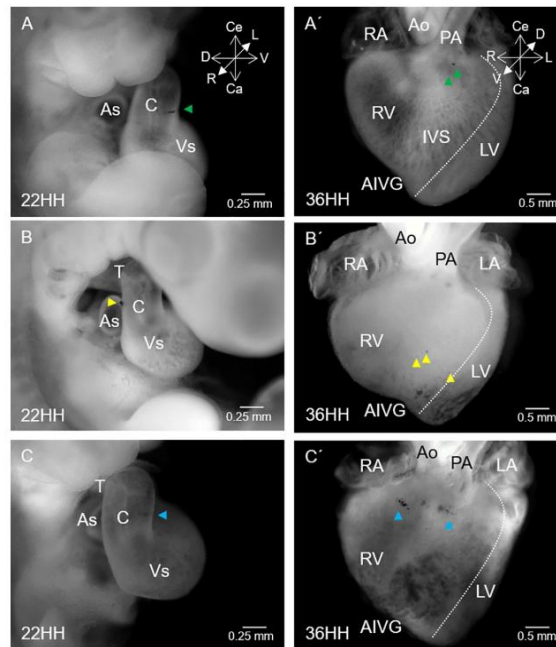
#### Prospective fate of the myocardial wall of the conus

To determine the prospective fate of the right conal wall (classically denoted anterior conus), plastic black labels were placed in the myocardium at each boundary of conus and traced up to the mature heart (Fig 2). Labels initially inserted at the right surface of the conus-ventricular limit (Fig 2A) turned counter-clockwise towards to the embryonic middle line and in the mature heart (St 36HH) were distributed in the myocardium of the apical ventricular region in relation to the anterior interventricular groove (compare A with A' in Fig 2). In contrast, labels placed at the beginning at the conus-truncus border, at stage 36HH, were located across the entire length of the right region of the cardiac base to the level of the sub-valvular pulmonary region (compare B with B' in Fig 2).



**Fig 2. Prospective fate of the right conal wall (classically denoted anterior conus).** (A) Representative images of embryonic heart at stage 22HH showing a black label inserted in the myocardium on the right surface of the cono-ventricular boundary (red arrowhead). (A') Embryonic heart at stage 36HH. Visualization of small dark spots (red arrowheads) distributed in the myocardium of the apical ventricular region in relation to the anterior interventricular groove (AIVG). (B) Embryonic heart at stage 22HH with a black label inserted in the myocardium on the right surface of the conus-truncus border (red arrowheads). (B') Embryonic heart at stage 36HH showing small dark spots (red arrowheads) distributed in the myocardium from the right region of the cardiac base to the subvalvular pulmonary region. The dotted white line indicates the limit of the right ventricular-free wall. Abbreviations: AIVG = anterior interventricular groove; As = atrial segment; C = conus; IVS = interventricular septum; LA = left atrium; LV = left ventricle; PA = pulmonary artery, RA = right atrium; RV = right ventricle; T = truncus, Vs = ventricular segment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g002>



**Fig 3. Prospective fate of the myocardium of the ventral, dorsal and left conal walls.** (A) Embryonic heart at stage 22HH showing a black label inserted in the myocardium at the medial zone of the ventral conal wall (green arrowhead). (A') Embryonic heart at stage 36HH with small dark granules (green arrowheads) distributed in the myocardium of the sub-valvular region of the pulmonary artery. (B) Embryonic heart at stage 22HH with a black label inserted in the myocardium of the dorsal conal wall (yellow arrowhead). (B') Embryonic heart at stage 36HH showing small dark spots (yellow arrowheads) distributed in the myocardium along the middle third of the free wall of the right ventricle. (C) Embryonic heart at stage 22HH with a black label inserted in the myocardium of the medial zone of the left conal wall. (C') Embryonic heart at stage 36HH. Visualization of some small dark spots (blue arrowheads) distributed in the myocardium between the acute border of the heart and the pulmonary infundibulum. The dotted white line indicates the limit of the right ventricular-free wall. Abbreviations: AIVG = anterior interventricular groove; Ao = aorta; As = atrial segment; C = conus; IVS = interventricular septum; LA = left atrium; LV = left ventricle; PA = pulmonary artery; RA = right atrium; RV = right ventricle; T = truncus; Vs = ventricular segment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g003>

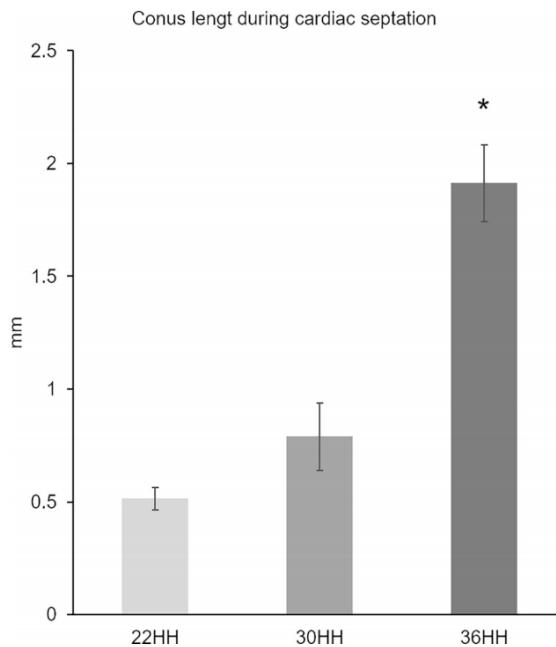
The myocardium of the left, ventral and dorsal conal walls was distributed to different anatomical portions exclusive of the right ventricle. Specifically, labels inserted in the myocardium of the ventral conal wall (Fig 3A) consistently remained in the same plane, revealing a limited displacement during development and in the mature heart were distributed in the myocardium of the sub-valvular region of the pulmonary artery (Fig 3A'). Labels inserted at the beginning in the myocardium of the dorsal wall of the conus (Fig 3B) turned counter-clockwise to the embryonic middle line, and labels in the mature heart were distributed in the myocardium along the middle third of the free wall of the right ventricle (Fig 3B'). In contrast, the labels placed at the beginning in the myocardium of the left conal wall (Fig 3C) showed an irregular behaviour. In almost all the hearts (90%), the labels gradually shifted counter-clockwise over time, and at the end of the experiment (Stage 36HH), they were distributed in the ventricular



myocardium from the acute border of the heart to the middle portion of the pulmonary infundibulum (Fig 3C). In some hearts (9%), the labels shifted clockwise and were distributed in a small portion corresponding to the left wall of the outflow tract of the right ventricle. Only 1% of the hearts showed an initial label in the myocardium of the left conal wall, in which the label was fragmented into two pieces. Each piece of the label was shifted in the opposite direction, and in the mature heart, one label appeared in the myocardium between the acute border of the heart and the pulmonary infundibulum. The other piece of label was found in the left wall of the right ventricular outflow tract. It is important to mention that labels inserted in the left, ventral and dorsal conal walls at the level of the conus-truncus border, in the mature heart were also distributed in the RV myocardium but in a more superior position than those inserted in the medial zone of the conus.

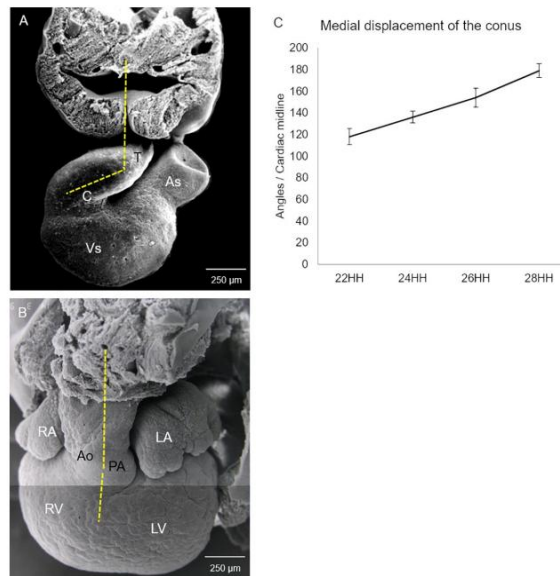
### Morphometric analysis

In agreement with the results of the selective labelling experiments, the conus length registered during cardiac septation showed a differential growth of the conus during its transformation into mature structures. We observed that the conus length at stage 22HH was 0.51 mm (sd  $\pm$  0.049), at stage 30HH 0.78 mm (sd  $\pm$  0.150) and at stage 36HH, it had increased to 1.930 mm (sd  $\pm$  0.170). Between stages 22 to 36HH, the increase in conus length was statistically significant (Fig 4).



**Fig 4. Increase in conus length during cardiac septation.** Increase in conus length during cardiac septation was statistically significant between stages 22–36HH. Data are expressed as means (standard deviation) using \* $p \leq 0.01$  for comparisons.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g004>



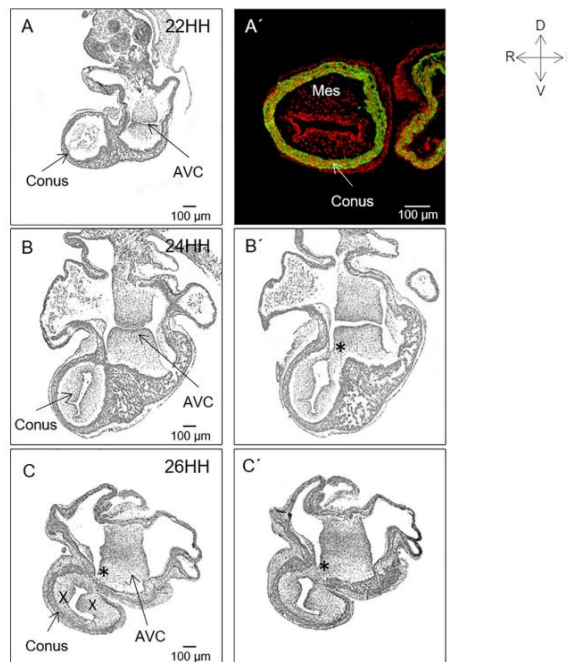
**Fig 5. Conus gradual medial displacement during cardiac septation.** Frontal views of the embryonic heart. (A) Stage 22HH visualization of the right extra cardiac initial position of the conus. (B) Stage 28HH visualization of the conus completely integrated into the right ventricle, occupying a ventral inferior position. (C) Graphic. Data are expressed as means (standard deviation) using  $p \leq 0.01$  for comparisons. Abbreviations: Ao = developing aorta; As = atrial segment; C = conus; LA = left atrium; LV = left ventricle; PA = developing pulmonary artery; RA = right atrium; RV = right ventricle; T = truncus, Vs = ventricular segment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g005>

### Conus remodelling during cardiac septation

To investigate how the conal myocardium remodels and moves from its originally right position to a ventral position in the mature heart, topologic and histological changes in the conus and AV canal during heart septation were registered. The results obtained in the captured images from GI hearts showed that angle from the middle line of the embryo and the sagittal line drawn up throughout the developing conus gradually increased. At stage 22HH, it had an opening of 120°, and it increased to 140° at stage 24HH, 160° at stage 26HH and 180° at stage 28HH (Fig 4C). Scanning electron microscopic images of embryonic hearts in the frontal view showed that the conus was completely integrated into the right ventricle at stage 28HH, occupying a ventral position from below the valvular floors of the developing pulmonary artery and aorta (compare A with B in Fig 5).

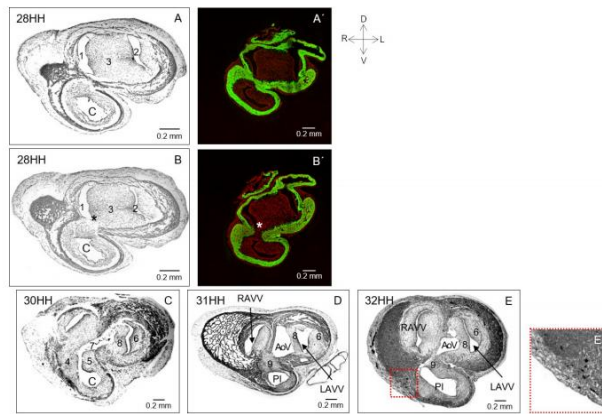
Serial histological sections of the embryonic hearts in the transverse plane showed that at stage 22HH, the lumen of the conus and the AV canal were in a contralateral position (Fig 6A). At this stage, the conus had a tubular structure formed by a thin layer of continuous myocardium (corroborated by the immunolocalization of skeletal muscle myosin) and was internally lined by endocardium (Fig 6A and 6A'). Inside the conus, we observed a homogeneous distribution of mesenchymal tissue formed by an abundant extracellular matrix with some fibroblast-type cells but without an apparent bulge arrangement (Fig 6A). At stage 24HH, the conus had moved from a right position to a slightly left and ventral position while the AV



**Fig 6. Conal myocardium and mesenchymal remodelling.** Adjacent cephalo-caudal sections of the embryonic heart from stages 22HH to 26HH. (A) Stage 22HH. The lumen of the conus and the AV canal are side by side. (A') Immunolocalization of the skeletal muscle myosin (green). Observe the tubular structure of the conal myocardium, the homogeneously distributed mesenchymal tissue (Mes), and the endocardium (red nucleus). (B, B') Stage 24HH. The conus is in a slightly left and ventral position with respect to the AV canal. (B). A small myocardial notch (\*) is observed at the left-dorsal conal wall. (C, C'). Stage 26HH. Observe the loss of continuity at the thinned left-dorsal myocardial conal wall (\*) and the incipient endocardial conal crest (X). Abbreviations: AVC = atrioventricular canal; Mes = mesenchymal tissue.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g006>

canal had moved from a left to a right position (Fig 6B). In addition, in a histological section closer to the ventricular segment, a small notch was observed in the myocardium of the left-dorsal wall of the conus that marked the beginning of the loss of continuity of the myocardium of that conal wall (Fig 6D). Mesenchymal tissue of the conus was still observed as a continuous layer, without signs of any incipient conal crest. The cushions of the AV canal and the mesenchymal tissue of the conus were more voluminous, with a larger cell population than at stage 22HH (Fig 6B and 6B'). At stage 26HH, the conus had been displaced to the left, and the AV canal was moved to the right (compare A, A' with C, C' in Fig 6). The myocardium of the ventral conal wall had thickened, but a small portion of myocardium at the left-dorsal wall had thinned, and in the zone adjacent to the cushions of the AV canal, the conal myocardium was losing continuity. Analysis of subsequent histological sections showed an increase in the conal myocardium opening in the cephalo-caudal direction (compare C with C' in Fig 6). Additionally, the mesenchymal tissue of the conus began to show signs of separation in two incipient conal crests. At this stage (26HH), the ventro-superior and dorso-inferior cushion of the AV



**Fig 7. Pulmonary vestibule and the aortic infundibulum develop from different embryonic components.** (A, B). Adjacent cephalo-caudal histological sections of the embryonic heart at stage 28HH. Observe a wider opening zone at the originally left-dorsal myocardial conal wall (\*). The voluminous mesenchymal structure separating the incipient right (1) and left (2) atrioventricular orifices corresponding to the ventro-superior and the dorso-inferior cushions of the AV canal during the fusion process (3). (A', B') Skeletal muscle myosin immunolocalization (green) corroborating the left-dorsal myocardial conal wall loss of continuity (\*). (C) Stage 30HH. Visualization of the well-developed dextrodorsal (4) and sinistroventral (5) crests within the conus (C). The incipient mural leaflet of the left AV valve (6) is also evident. Note the elongated canal (7) bordered by the dorsal surface of the conal crest (4 and 5) and the right surface of the incipient anteroseptal leaflet of the left AV valve (8). (D, E). Stage 31 and 32HH. Mature heart showing the fused conal crests forming the immature supra-ventricular crest (9). The single conal conduct corresponds to the pulmonary infundibulum (PI). The aortic vestibule (AoV) behind the developing anteroseptal leaflet of the left AV valve (8) is well developed. E'. Amplification of the red box in E. Observe traces from the label as some fine charcoal granules immersed in the myocardium of the pulmonary infundibulum (40X). Abbreviations: RAVV = Right atrioventricular valve; LAVV = Left atrioventricular valve.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g007>

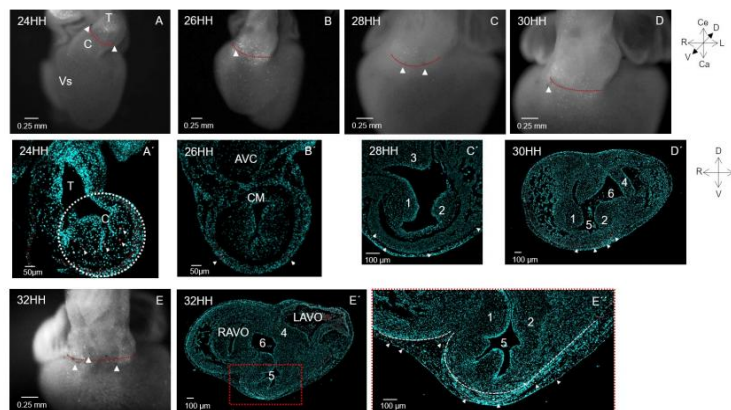
canal were already fused. The conal crest and the fused AV cushions mesenchyme were in contact at the opening of the myocardial conal wall (Fig 6C and 6C').

At stage 28HH, the myocardium of the left-dorsal wall of the conus continued losing tubular continuity, thus showing a wider opening zone in an dorso-ventral direction (compare A with B in Fig 7). The loss of contact of the myocardium at the conal left-dorsal wall was corroborated by skeletal muscle myosin immunolocalization (Fig 7A' and 7B'). Contact between the mesenchymal tissue of the conal crest and that of the fused cushions of the AV canal had increased, without leaving any signs of separation between them. The right and left cushions of the AV canal were evident (Fig 7A and 7B). At this stage (28 HH), the recently fused AV cushions had formed a voluminous mesenchymal structure that separated the incipient right and left AV orifices. At stage 30HH, the myocardium of the conus had been transformed from a closed tubular structure in the form of a letter "O" to acquire the shape of a letter "U" (Fig 6C). The originally incipient dextrodorsal and sinistroventral conal crests had increased in volume and were fused at the level of conus-truncus border but not at the level of the AV valves (Fig 7C). Likewise, the left cushion of AV canal had been remodelled to form a mesenchymal structure that resembled the mural leaflet of the left AV valve, while the dorso-inferior and ventro-superior AV cushions in the process of fusion were forming an incipient anteroseptal leaflet of the left AV valve (Fig 7C). In this heart (stage 30HH), an elongated canal was evident, the edges of which were represented by the dorsal surface of the conal crest (in the fusion

process), the right surface of the incipient anterosseptal leaflet of the left AV valve and the inter-ventricular foramen (Fig 7C). Later, at stage 31HH, the mesenchymal conal crests were fused, and a single pulmonary conal conduct was formed (Fig 7D). The elongated canal bordered by the conal crests, the right surface of the anterosseptal leaflet of the left AV valve and the inter-ventricular septum were transformed in the aortic vestibule (Fig 7D). At stage 32HH, the conal myocardium had acquired the shape of a myocardial cell sheet (Fig 7E). The already fused conal crest formed a structure of mixed histological constitution (mesenchymal and myocardial tissues) that separated the right ventricular inlet from the completely myocardial pulmonary infundibulum. Likewise, the aortic vestibule bordered by the fibrous anterosseptal leaflet of the left AV valve and the myocardial interventricular septum was completely developed (Fig 7E).

### Apoptotic pattern at the embryonic outflow

To investigate whether the conus is affected by apoptosis, as is frequently affirmed, and to determine whether the loss of continuity of the left-dorsal conal wall depended on this process, the spatio-temporal pattern of apoptotic cells at the conus during cardiac septation was registered. In all the stages studied (22-32HH), positive apoptotic cells were observed predominantly at the conus-truncus border, identified by the previously placed plastic labels; only a few apoptotic cells were detected at the conus (Fig 8A-8D). Transverse histological sections of the embryonic heart allowed us to distinguish that the apoptotic cells at stage 24HH corresponded exclusively to the mesenchymal tissue of the endocardial conal crest; no traces of



**Fig 8. Apoptotic pattern at the embryonic outflow.** (A-E) Representative images of embryonic hearts (stages 24-32HH) that have been previously labelled at the conus truncus limit and treated with LysoTracker Red. Visualization of positive apoptotic cells, mainly at the level of the previously labelled conus-truncus border, dotted red line. (A'-E') Histological transversal sections of embryonic hearts treated with LysoTracker Red at the conus level. In this case, the apoptotic cells correspond to the red dots with white arrowheads. (A') Stage 24HH, apoptotic cells were observed in the conal mesenchyme. (B') Stage 26HH, some apoptotic cells were observed in the myocardium of the ventral conal wall. No apoptotic cells were detected in the myocardium of the thinner left-dorsal conal wall between the conal mesenchyme (CM) and the atrioventricular cushions (AVC). (C') Stage 28HH. Observe few apoptotic cells immersed in the myocardium of the ventral conal wall. (D'-E') Stages 30 and 32HH. Visualization of apoptotic cells principally in the epicardium. Abbreviations: LAVV = left atrioventricular oprifice; RAVV = right atrioventricular orifice. 1. Dextrodorsal conal ridge; 2. sinistroventral conal ridge; 3. fused atrioventricular cushions; 4. septal leaflet of the mitral valve; 5. pulmonary infundibulum; 6. aortic vestibulum.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g008>

apoptosis were observed in the conal myocardium (Fig 8A). In contrast, at stage 26HH, some apoptotic cells were observed in the myocardium of the ventral conal wall (Fig 8B). Later, at stage 28HH, several apoptotic cells were detected dispersed in the myocardium of the originally definite right conal wall compared to the apoptotic cells at the conus-truncus limit (Fig 8C). At stage 30HH, apoptotic cells were registered at the myocardium of the originally left conal wall. Between stages 30–32HH, the apoptotic signal was observed below the valvular aortic and pulmonary floors (Fig 8D and 8E). At these stages, the histological sections showed fewer apoptotic cells in the conal myocardium, but a large number of positive apoptotic cells were identified in the epicardium (Fig 8D', 8E' and 8E"). Surprisingly, no apoptotic cells were found in area adjacent to the conal myocardium opening (Fig 8B').

## Discussion

The embryonic components and morphogenetic processes involved not only in the development of the intracardiac pulmonary infundibulum and aortic vestibule, but also in the formation of the extracardiac trunks of the great arteries are controversial. In our opinion, the discrepancies are caused, in part, because many reports describe results without specifying the region of the embryonic outflow tract (proximal or conus), intermediate (or truncus) or distal (aortic sac) are involved. This information is a key point because although initially the truncus and conus are morphologically and histologically similar, each has a different anatomical manifestation in the postnatal heart (6–17). Additionally, although it is generally stated that the conus participates in the development of the pulmonary infundibulum and aortic vestibule [6, 7, 23, 24], some researches involve the ventro-superior cushion of the AV canal in the development of the aortic vestibule [26, 27]. Therefore, our goal was to investigate, by selective *in vivo* labelling, the prospective fate of the myocardium of the right, left, ventral and dorsal conal walls. The changes in the mesenchymal tissue of the conus and AV cushions and the role of apoptosis in conus transformation into mature structures were also explored.

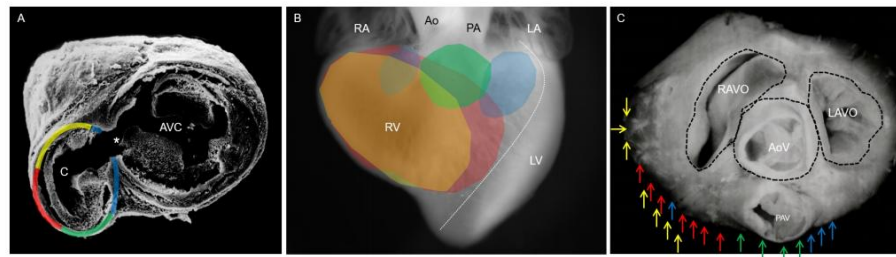
## Origin and fate of the conal myocardium

Recently, the concept of the FHF represented by the straight heart tube and the second heart field (SHF) originating later and gradually converging into the straight heart tube during the torsion and looping process has been emerging [3–5]. This new finding has led to controversy about the prospective fate of the straight heart tube. On the one hand, it was accepted that the precursor cells of the RV in the chicken embryo are already present in the straight heart tube [36]. Furthermore, it has been pointed out that the conus appears in the “C” shaped looped heart and completes development in the advanced looped heart (stage 22HH) to form both ventricular outflow tracts [24]. In this case, it is inferred that the RV would derive from the FHF, while the conus would develop from the SHF. Findings in the mouse embryo are discordant with these statements. Through genetic tracking, it has been demonstrated that the FHF gives rise to the myocardium of the LV and the atria [5]. Likewise, the SHF has been identified as the cellular source from which the conus and truncus develop in both chicken and mouse embryos [3, 4, 30, 31, 32, 37]. Our *in vivo* labelling in the chick embryo heart of the conal walls (stage 22HH to 36HH) show that the conal myocardium is gradually distributed into different regions of the RV free wall, from the apex to the cardiac base, below the arterial valves (Figs 2, 3 and 8B). Our morphometric and topological studies that show a length increase in the conus and its gradual movement from its original right position to a definitive ventral position (Fig 5C) agree with our *in vivo* labelling results. These findings, confirm that in the chick embryo the conus completes development at stage 22HH [24], and indicate that the RV myocardium both in birds and in mammals, is not formed by cell populations present at the straight heart

tube as indicated in pioneering *in vivo* labelling studies in the chick embryo heart [36], really the RV myocardium is developed from the region of the SHF that represents only the conus at stage 22HH.

### Conal remodelling during cardiac septation

It is universally accepted that ventricular outflow tracts develop via the fusion of two mesenchymal crests in the lumen centre of the conus to originate two conduits: the anterior or pulmonary and the posterior or aortic conuses [6, 7, 23, 24, 38–40]. In contrast, in absolute discrepancy with this idea, we found that the conal myocardium participated in formation of the RV free wall, including its outflow. This proposal questions the existence of the posterior conus. Thus, to understand how the conal myocardium changed to be distributed along the RV ventral wall and the fate of the supposed posterior conus, serial histological sections of the embryonic heart in the transverse plane were analysed (stages 22–34HH). We confirmed our *in vivo* labeling and morphometric findings (Figs 5–7). However, when analysing the conal and AV canal mesenchymal tissue changes, we observed important events that had not yet been reported in the development of the conus. First, although it is common to describe the presence of two mesenchymal endocardial crests inside the conus from stage 22HH, we actually observed a gradual development of the conal mesenchyme. It was initially scarce and homogeneously distributed between the myocardium and endocardium (22HH). Later, at stage 24HH, the conal mesenchyme maintained a homogenous distribution but increased in volume. Between stages 26–28HH the conal ridges had developed in the dorsal zone of the conal lumen. These results support the idea that the mesenchymal tissue that internally covers the conus at earlier stages has a valvular function to prevent blood return to the ventricular segment, but it does not participate in conus septation [41–43]. Additionally, we found that at stage 22HH the conus had a tubular structure, which was externally covered by a thin layer of continuous myocardium and internally lined by endocardium with a thin extracellular matrix (Fig 6A and 6A'). In no histological section did we observe the presence of two well formed conal crests between stages 22–24HH. Between stages 23–28HH, the myocardium of the left dorsal conal wall lost continuity. The free borders of the conal myocardium gradually separated from each other until they formed a myocardial cell sheet (compare Fig 6B' and 6C' with Fig 7, Fig 9A). The absence of apoptosis in the opening region of the myocardium of the left dorsal conal wall indicated that the loss of continuity of that conal wall occurred independently of programmed cell death. Additionally, the



**Fig 9. Fate map of the conal walls based on the labelling experiments.** (A) Micrograph obtained using a scanning electron microscope of a 26HH chicken embryo heart dissection. The results show the partial displacement of the conus on the way to its final ventral position and the discontinuity of the dorsal-left wall conal myocardium (\*). (B) Frontal view of the chicken embryo heart at stage 36HH, depicting the myocardial conal wall distribution exclusively throughout the right ventricle (RV). The white dotted line marks the edge of the free wall of the right ventricle. (C). Chicken postnatal heart dissection showing differential fate of each of the conal walls in the right ventricle below the arterial and atrioventricular valves. The black dotted line denotes the fibrous skeleton where the pulmonary valvular ring (PA) is excluded.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209930.g009>

progressive opening of the left-dorsal conal wall observed in the histological sections agreed with our *in vivo* labelling of the same conal wall (Figs 2 and 3). Taken together, these findings provide unequivocal evidence that the conus is the embryonic precursor of the RV, including the pulmonary infundibulum (Fig 9B). Likewise, although Rana et al [25] reported that the RV free wall forms from the “outflow myocardium”, we based on our *in vivo* labelling results; conclude that only the conus but not the truncus participates in this process.

### Apoptosis and conus development

Massive myocardial apoptosis is a morphogenetic process that is proposed to explain the longitudinal reduction of the embryonic outflow [28, 29, 44]. However, due to the impossibility of distinguishing the conal and truncal myocardium by viral transfection, Watanabe and colleagues concluded that both embryonic structures disappear almost completely, causing a longitudinal shortening of the embryonic outflow tract [28, 29]. In contrast, by selective labelling, we distinguished the conus from the truncus myocardium and found a spatiotemporal apoptotic pattern concordant with that described by Cheng in 2002 [45]. As Cheng we found that during development, the truncus was mostly affected by apoptosis and that apoptotic focus began to appear by stage 26HH in small clusters at the myocardial conus-truncus border. (Fig 8A–8E). We also observed that apoptosis in the conal domain shifted sequentially, starting in the conal mesenchyme (Fig 8A), later occurring in the lateral myocardium of the developing conus (Fig 8B'–8D'), and finally being detected in the epicardium (Fig 8E"). These results suggest that apoptosis does not participate in conal resorption but contributes to the fine remodeling that allows conal transformation in a large part of the RV free wall. We can also suppose that in the truncus apoptosis is linked to the arterial valves remodeling.

### Conus septation

Septation of the conus occurs in the chicken embryo between stages 26–32HH. In this context, it is universally known that during this process, the conal crests fuse in the centre of the conal lumen to form the aortic and pulmonary conuses [6, 7, 23, 24, 38–40]. However, when analysing the development of the conal mesenchyme, we simultaneously found that the myocardium of the left dorsal conal wall was opening between stages 26–28HH, and two well developed conal crests had developed in the dorsal zone of the conus lumen (Figs 6C and 6C', 7A and 7C). Later, between stages 30–32HH, the conal crests increased in volume and cellularity, approaching each other (30HH) to finally fuse (31HH) on the dorsal surface, but not at the centre of the conal lumen, as has been consistently clammed (Fig 7C). Interestingly, between stages 31 to 32HH, we observed that when the conal crests were fused, two ducts were not formed, but rather the fused crests formed a mesenchymal structure that separated the incipient inflow and outflow tracts of the RV (Fig 7D and 7E). These results, in addition to refuting the existence of the posterior conus, agree with previous findings obtained by *in vivo* labelling of the chick embryo heart showing that the supraventricular crest develops from the fused conal crests [46]. The initially mesenchymal supraventricular crest is gradually transformed into a myocardial structure by “myocardialization”. At present, there is no consensus regarding the characterization of this process. It is possible that the mesenchyme could serve as a scaffold for cardiomyocyte migration from the ventricular walls, the AV canal and / or the interventricular septum. Alternatively, mesenchymal cells could be transformed in myocardiocytes.

### Importance of AV cushions in the development of the aortic vestibule

In addition to separating the primitive inlet in two conducts, the AV cushions participate in AV valve development. In the eighties, a group of researchers *in vivo* labelled the ventral



(superior) cushion of the AV canal in the chick embryo heart (stage 22HH). In the mature heart, the labels were found, surprisingly, in both components of the aortic infundibulum, i.e., the free region of the anteroseptal leaflet of the left AV valve and the muscular region of the interventricular septum separating the aortic vestibule and the pulmonary infundibulum [26, 27]. These researchers could not explain the role of the posterior conus, the supposed precursor of the aortic vestibule. However, using transverse histological sections, we could observe the conal crest formation and a volume increase as well as more cellularity in the AV cushions at stage 26HH, which led to the fusion of both AV cushions (Fig 6C and 6C). Almost immediately, the cushion mesenchyme was remodelled, thinned and flattened, thus acquiring the shape of a thick arch (Fig 7A and 7C). Later, at stage 30HH, the voluminous conal crests were almost in contact. In this heart, the concave edge of the mesenchymal arch resulting from the fusion of the ventral (superior) and dorsal (inferior) AV cushions had acquired the shape of an incipient septal leaflet of the left AV valve (Fig 7C). The right surface of the incipient septal leaflet of the left AV valve represented the edge of the aortic vestibule, which in this stage was observed as a long narrow canal that was continuous with the pulmonary infundibulum because the conal ridges had not yet fused (Fig 7C). Later, at stage 31-32HH, the already fused conal crests had the location and appearance of the partially muscularized supraventricular crest. The septal leaflet of the left AV valve was thinner, maintained a fibrous structure and delimited the individualized LV outflow (Fig 7D and 7E). These results further confirmed that when fused, the conal crests formed the myocardial supraventricular crest [46], leading to the conclusion that the ventricular outflow tracts originated from different embryonic components. The distal part of the conus with the fused conal crest participates in the development of the completely myocardial pulmonary infundibulum, while the predominantly mesenchymal aortic vestibule is formed from the ventro-superior cushion of the AV canal, as previously evidenced by *in vivo* labelling [26, 27]. Additionally, based on our results for the differential development of the conal and AV cushions mesenchyme, and new evidence of a differential endocardium to mesenchyme transformation molecular regulation pathway [47], we suggest the use of the classic conal crest and AV cushions nomenclature.

Our findings refuting the existence of the posterior conus and showing evidence of a distinct embryonic origin for both outflow tracts are in agreement with the anatomic description of the cardiac fibrous skeleton (Fig 9C) that includes the mitral, tricuspid and aortic valves with the mitral-aortic fibrous continuity but excludes the pulmonary valve [48]. Additionally, these same results allow us to speculate that persistence of the conus as a tubular structure would lead to the development of a univentricular heart, defined by Anderson as a heart with absence of the posterior interventricular septum [49].

The new information obtained in the present investigation, provides a frame of reference for the molecular approaches of the origin of the pulmonary infundibulum and the aortic vestibule. Additionally, it provides solid embryological bases for the improved diagnosis and surgical treatment of the congenital defects that affect these anatomical structures of the heart.

## Acknowledgments

The authors want to thank the Confocal Microscopy Core at DCBS-UAM for their assistance with image acquisition and analysis.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Roberto Lazzarini, Concepción Sánchez-Gómez.

**Data curation:** Roberto Lazzarini.

**Investigation:** Laura Villavicencio-Guzmán, Marcela Salazar-García, Concepción Sánchez-Gómez.

**Methodology:** Roberto Lazzarini.

**Supervision:** Luis Enrique Gómez-Quiroz, Humberto González-Márquez, Concepción Sánchez-Gómez.

**Visualization:** Roberto Lazzarini.

**Writing – original draft:** Roberto Lazzarini, Concepción Sánchez-Gómez.

**Writing – review & editing:** Concepción Sánchez-Gómez.

## References

1. Anderson RH, Mohun T, Spicer DE, Bamforth SD, Brown NA, Chaudhry B, et al. Myths and realities relating to development of the arterial valves. *J. Cardiovasc. Dev Dis.* 2014; 1: 177–200
2. Anderson RH, Mori Shumpei, Spicer DE, Brown NA and Mohun TJ. Development and morphology of the ventricular outflow tracts. *World J Pediatr Congenit Heart Surg.* 2016; 7 (5): 561–577. <https://doi.org/10.1177/2150135116651114> PMID: 27587491
3. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodríguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, et al. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol.* 2001; 238(1): 97–109. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0409> PMID: 11783996
4. Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, et al. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development.* 2001; 128(16): 3179–3188. PMID: 11688566
5. Buckingham ME, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 826–835 <https://doi.org/10.1038/nrg1710> PMID: 16304598
6. Kramer TC. The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the interventricular septum in the human heart. *Am J Anat.* 1942; 71: 343–370.
7. de Vries PA & Saunders JB. Development of the ventricles and spiral outflow tract in the human heart. *Contrib Embryol.* 1962; 37:87–114.
8. Grant Robert P. The embryology of ventricular flow pathways in man. *Circulation.* 1962; 25: 756–779. PMID: 13901166
9. Goor D A, Dische R and Lillehei CW. The conotruncus. I. Its normal inversion and conal absorption. *Circulation.* 1972; 46: 375–84. PMID: 5046031
10. Thompson RP, Fitzharris TP. Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: tissue reorganization during septation. *Am J Anat.* 1979; 156: 251–264. <https://doi.org/10.1002/aja.1001560206> PMID: 506953
11. Orts-Llorca F, Puerta Fonolla J and Sobrado J. The formation, septation and fate of the truncus arteriosus in man. *J Anat.* 1982; 134(1): 41–56.
12. Van Praagh R. Cardiac embryology: the conotruncus. *Heart Vessels.* 1985; 1(4): 193–194. PMID: 3831027
13. Thompson RP, Abercrombie V, Wong M. Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: movements of autoradiographic tattoos during septation. *Anat Rec.* 1987; 218: 434–440. <https://doi.org/10.1002/ar.1092180411> PMID: 3662044
14. Ya J, van den Hoff MJ, de Boer PA, Tesink-Taekema S, Franco, D., Moorman AF, et al. Normal development of the outflow tract in the rat. *Circ Res.* 1998; 82: 464–472. PMID: 9506707
15. Anderson RH, Webb S, Brown NA, Lamers W, Moorman A. Development of the heart: (3) formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. *Heart.* 2003; 89 (9):1110–1118. PMID: 12923046
16. Isabel García-Peláez, Arteaga Martínez M. Estudio experimental del desarrollo del truncus arteriosus del corazón de embrión de pollo. *Arch Mex Anat Nueva Época* 2007; 2 (1): 21–30.
17. Sánchez Gómez C, Pliego Pliego L, Contreras Ramos A, Munguía Rosas MA, Salazar García M, García Romero HL, et al. *Anat Rec.* 2005; 83(1): 202–211.
18. Argüello C, de la Cruz MV and Sánchez GC. Ultrastructural and experimental evidence of myocardial cell differentiation into connective tissue cells in embryonic chick heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1978; 10: 307–315. PMID: 642021

19. Kirby ML, Gale TF, Stewart DE. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*. 1983; 220:1059–1061 PMID: [6844926](#)
20. Nishibatake M, Kirby ML, Van Mierop LH. Pathogenesis of persistent truncus arteriosus and dextroposed aorta in the chick embryo after neural crest ablation, *Circulation*, 1987 Jan; 75 (1): 255–64. PMID: [3791607](#)
21. Davis C L. Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Contrib Embryol*. 1927; 19: 245–284.
22. Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res*. 1995; 77(1): 1–6. PMID: [7788867](#)
23. Anderson R H, Wilkinson J L, Arnold R and Lubkiewicz K. Morphogenesis of bulboventricular malformations. I: Consideration of embryogenesis in the normal heart. *British Heart J*. 1974; 36: 242–255.
24. de La Cruz MV, Sanchez GC, Arteaga MM, Argüello C. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J Anat* 1977; 123: 661–686. PMID: [885781](#)
25. Rana MS, Horsten NC, Tesink-Taekema S, Lamers WH, Moorman AF, van den Hoff MJ. Trabeculated right ventricular free wall in the chicken heart forms by ventricularization of the myocardium initially forming the outflow tract. *Circ Res*. 2007; 100:1000–1007. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000262688.14288.b8> PMID: [17347476](#)
26. De la Cruz MV, Quero-Jiménez M, Arteaga M, Cayré R. Morphogénese du septum interventriculaire. *Coeur*. 1982; 13: 443–448.
27. García-Peláez I, Díaz-Góngora G, Arteaga-Martínez M. Contribution of the superior atrioventricular cushion to the left ventricular infundibulum. Experimental study on the chick embryo. *Acta Anat*. 1984; 118: 224–230. PMID: [6720242](#)
28. Watanabe M, Choudhry A, Berlan M, Singal A, Siwik E, Mohr S et al. Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development*. 1998; 125: 3809–3820. PMID: [9729489](#)
29. Watanabe M, Jafri A, Fisher SA. Apoptosis is required for the proper formation of the ventriculo-arterial connections. *Dev Biol*. 2001; 240: 274–288. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0466> PMID: [11784063](#)
30. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res*. 2004; 95: 261–268. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000136815.73623.BE> PMID: [15217909](#)
31. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell*. 2001; 1: 435–440. PMID: [11702954](#)
32. Kelly RG. The second heart field. *Curr Top Dev Biol*. 2012; 100: 33–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387786-4.00002-6> PMID: [22449840](#)
33. Anderson RH, Spicer DE, Hlavacek AJ, Hill A, Loukas M. Describing the cardiac components attitudinally appropriate nomenclature. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013; 6(2): 118–123. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9434-z> PMID: [23225360](#)
34. Hamburger V and Hamilton H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951; 88: 49–92. PMID: [24539719](#)
35. Seichert V. Study of the tissue and organ anlage shifts by the method of plastic linear marking. *Folia Morphologica*. 1965; 13: 228–238. PMID: [14333209](#)
36. de la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Palomino MA. The primitive cardiac regions in the straight tube heart (Stage 9) and their anatomical expression in the mature heart: An experimental study in the chick embryo. *J Anat*. 1989; 165: 121–131. PMID: [17103606](#)
37. Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, et al. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol*. 2000; 223(2): 266–278. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9753> PMID: [10882515](#)
38. Asami I. The development of the interventricular septum in the human heart, with special reference to bulbus-torsion. *Z Anat Entwicklungsgesch*. 1969; 128(1): 1–17. PMID: [5772005](#)
39. Netter FH and Van Mierop LHS. 1969. Embryology. In: Netter FH, editor. *CIBA Collection of Medical Illustrations*. Ardsley, New Jersey: CIBA Pharmaceutical Co. Vol. 5, p119–125.
40. Pexieder T. Development of the outflow tract of the embryonic heart. *Birth defects*. 1978; 14: 29–68.
41. Patten BM, Kramer TC, Barry A. Valvular action in the embryonic chick heart by localized apposition of endocardial masses. *Anat Rec*. 1948; 102(3): 299–311. PMID: [18098423](#)
42. Nomura-Kitabayashi A, Phoon CK, Kishigami S, Rosenthal J, Yamauchi Y, Abe K, et al. Outflow tract cushions perform a critical valve-like function in the early embryonic heart requiring BMPRIA-mediated signaling in cardiac neural crest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H1617–H1628. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00304.2009> PMID: [19717734](#)

43. Liu A, Yin X, Shi L, Li P, Thornburg KL, Wang R, et al. Biomechanics of the chick embryonic heart out-flow tract at HH18 using 4D optical coherence tomography imaging and computational modelling. *PLoS One*. 2012; 7(7): e40869 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040869> PMID: 22844414
44. Molin DGM, DeRuiter MC, Wisse LJ, Mohamad A, Doetschman T, Poelmann RE, et al. Altered apoptosis pattern during pharyngeal arch artery remodelling is associated with aortic arch malformations in Tgf beta 2 knock-out mice. *Cardiovasc Res*. 2002; 56: 312–32. PMID: 12393102
45. Gang Cheng, Andy Wessels, Gourdie Robert G., and Robert P. Thompson. Spatiotemporal and tissue specific distribution of apoptosis in the developing chick heart. *Dev Dyn*. 2002, 223:119–133. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1244> PMID: 11803575
46. de la Cruz MV. Embryological development of the outlet of each ventricle. In: *Living morphogenesis of the heart*. De la Cruz MV and Markwald R editors. Living morphogenesis of the heart. Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser; 1998. pp. 131–156.
47. Bosada FM, Devasthali V, Jones KA, Stankunas K. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling enables developmental transitions during valvulogenesis. *Development*. 2016 Mar 15; 143(6):1041–54 <https://doi.org/10.1242/dev.130575> PMID: 26893350
48. Anderson and Becker. *Atlas fotográfico de anatomía cardiaca*. Doyma S.A. Barcelona. 1982.
49. Anderson RH, Becker AE, Wilkinson JL, Gerlis LM. Morphogenesis of univentricular hearts. *Br Heart J*. 1976, 38, 553–572.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00085

Matricula: 2141801007

Estudio de los cambios topológicos y de los procesos celulares del miocardio del conus durante la septación cardiaca.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 22 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ  
DR. MARIO GARCIA LORENZANA  
DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ  
DRA. MARCELA SALAZAR GARCIA  
DRA. CONCEPCION SANCHEZ GOMEZ



ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA

ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con caracter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunico al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DR. MARIO GARCIA LORENZANA

VOCAL

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL

DRA. MARCELA SALAZAR GARCIA

SECRETARIA

DRA. CONCEPCION SANCHEZ GOMEZ