



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Animal
Programa de doctorado: Biología Celular y
Molecular

TESIS DOCTORAL

Estudio de la morfología y el desarrollo
del tracto de salida cardíaco en *Xenopus laevis*.
Implicaciones evolutivas

Agustina María Torres Prioris
2017

Directora
Ana Carmen Durán Boyero





UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Animal

TESIS DOCTORAL:

Estudio de la morfología y el desarrollo del tracto de salida cardíaco en *Xenopus laevis*. Implicaciones evolutivas.

Agustina María Torres Prioris

Directora:

Dra. Ana Carmen Durán Boyero

Málaga, 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Agustina María Torres Prioris

 <http://orcid.org/0000-0003-1532-1678>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





Memoria presentada para optar
al grado de Doctor en Biología

Visado en Málaga
Enero de 2017

La Licenciada

Fdo.: Dña. Agustina María Torres Prioris

La Directora

Fdo.: Ana Carmen Durán Boyero





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Ana Carmen Durán Boyero, Catedrática de Zoología del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

ACREDITA

que Dña. Agustina María Torres Prioris, Licenciada en Biología, ha realizado, en el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, las investigaciones que le han conducido a la redacción de la presente Memoria de Tesis Doctoral, titulada **Estudio de la morfología y el desarrollo del tracto de salida cardíaco en *Xenopus laevis*. Implicaciones evolutivas.**

La presente memoria, que recoge los resultados obtenidos, así como su interpretación, reúne los requisitos necesarios para ser sometida al juicio de la Comisión correspondiente. Por tanto, como directora de la tesis, autorizo su exposición y defensa para optar al grado de Doctora en Biología.

Y para que conste en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo la presente acreditación en

Málaga, a 10 de enero de 2017

Prof. Dra. Ana Carmen Durán

Directora de la Tesis





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

*A mis padres
A mi abuelita
A mis hermanos
A Miguel*

“Yo no le canto a la luna
porque alumbra nada más,
le canto porque ella sabe
de mi largo caminar”
Atahualpa Yupanqui



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

Prefacio	1
Agradecimientos	3
Introducción	9
Seno venoso	13
Atrios	15
Ventrículo	17
El tracto de salida cardíaco	18
Desarrollo cardíaco	24
La cardiogénesis y su regulación molecular	27
Objetivos del presente estudio	31
Material y Métodos	33
Material	35
Métodos	36
Obtención del material	36
Fecundación natural	36
Fecundación <i>in vitro</i>	37
Fijación de las muestras	40
Técnicas histológicas e histoquímicas para microscopía óptica	41
Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta	44
Tricómico de Mallory	44
Tricómico de Masson-Goldner	45
Resorcina-fucsina	45
Ácido peryódico de Schiff (PAS)	46
Picrosirio con microscopía de polarización	46
Azul alciano (Scott y Dorling, 1965)	47
Técnicas inmunohistoquímicas	48
Método de la inmunoperoxidasa	49
Método de la inmunofluorescencia	50
Método de inmunofluorescencia <i>in toto</i>	52
Morfología de superficie mediante microscopía electrónica de barrido	53
Cortes semifinos	54
Hibridación <i>in situ</i>	55
Reconstrucciones tridimensionales	58

Resultados	61
Anatomía e histología del corazón adulto de <i>Xenopus laevis</i>	63
Componente proximal del tracto de salida	69
Componente distal del tracto de salida	88
Arterias coronarias en el tracto de salida	97
Desarrollo embrionario del corazón	100
Estadios 26-28	101
Estadios 29-30	104
Estadios 31-32	105
Estadios 33-34	109
Estadios 35-36	109
Estadios 37-38	115
Estadio 39	118
Estadio 40	122
Estadio 41	125
Estadio 42	128
Estadio 43	129
Estadio 44	134
Estadio 45	135
Estadio 46	140
Estadio 47	144
Estadio 48	146
Estadios 49-50	150
Estadios 51-52	152
Metamorfosis e individuos juveniles	156
Discusión	161
Aspectos morfológicos del tracto de salida	169
Aspectos embriológicos	181
Aspectos evolutivos	188
Pigmentación del corazón	191
Conclusiones	195
Conclusions	201
Summary	207
Bibliografía	229

Prefacio

Las investigaciones que han conducido a la redacción de la presente Tesis Doctoral se han realizado en el Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga, en el ámbito de las actividades del grupo “Estudios Cardiovasculares en Vertebrados” - BIO 203 del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI) de la Junta de Andalucía-.

En el transcurso de este trabajo, la autora ha sido beneficiaria de una beca del Subprograma de Formación del Personal Investigador (Subdirección General de Formación y Movilidad de Investigadores, Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I+D+i), referencia BES-2011-04690, desde el 1 de septiembre de 2011 hasta el 31 de agosto de 2015, concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Además, ha recibido una Ayuda al Estudio del Personal Investigador en Formación del III Plan Propio de Investigación de la Universidad de Málaga (año 2012).

El presente trabajo ha estado financiado por los siguientes proyectos: “Evolución morfológica adaptativa del tracto de salida cardiaco de los vertebrados con el paso de la vida acuática a la terrestre”: CGL2010-16417, Ministerio de Ciencia e Innovación.

Además, parte de la financiación de la presente investigación proviene de los siguientes fondos:

“Mioarquitectura y vascularización del corazón primitivo de los gnatostomados: su implicación en los cambios morfológico-adaptativos del sistema circulatorio de los vertebrados durante la evolución”. CGL2014-52356-P, Ministerio de Economía y Competitividad.

Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER).

Financiación, en diversas convocatorias, de la actividad investigadora del Grupo de Investigación por parte de la Secretaría General de Universidades, Investigación y Tecnología (Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo; Junta de Andalucía).

En el transcurso de las investigaciones de la tesis, la autora se desplazó a

las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal, Universidad Miguel Hernández de Elche, desde el 3 al 7 de junio de 2013, con el fin de llevar a cabo la reproducción de animales y la recogida de estadios larvarios y corazones adultos de *Xenopus laevis*.

Además, la doctoranda ha realizado dos estancias breves fuera de la Universidad de Málaga, ambas financiadas por el Subprograma de Ayudas para la Formación del Personal Investigador (Estancias breves) del Ministerio de Ciencia e Innovación. El centro de destino fue el Departamento Biología del Desarrollo del National Institute for Medical Research en Mill Hill-London, actualmente The Francis Crick Institute en London, bajo la supervisión del Dr. Tim J. Mohun. La primera de las estancias (ref. EEBB-I-13-06952), realizada en 2013, fue de 106 días de duración, desde el 5 de septiembre hasta el 15 de diciembre. El propósito de dicha estancia fue ampliar el conocimiento sobre el mantenimiento y cría de *Xenopus laevis* en condiciones de laboratorio, poner a punto técnicas inmunohistoquímicas y moleculares específicas para el presente trabajo, así como aprender a realizar diseños de sondas de ARN y técnicas de hibridación *in situ*. La segunda estancia (EEBB-I-2015-09218), realizada en 2015, de 52 días de duración, desde el 7 de enero hasta el 28 de febrero, tuvo lugar en el mismo departamento antes mencionado. Su finalidad fue el aprendizaje de técnicas de reconstrucciones 3D y generación de imágenes episcópicas de alta definición, así como de técnicas inmunohistoquímicas con fluorescencia y uso del microscopio confocal. Asimismo, parcialmente subvencionada por el proyecto CGL2010-16417, la becaria efectuó otra estancia en el citado centro, de 18 días de duración, desde el 4 al 22 de junio de 2014, para el aprendizaje de cortes en resina y captura de imagen para realizar reconstrucciones 3D.

El Grupo de Investigación en el que se ha realizado el presente trabajo forma parte de los siguientes organismos:

Red de Investigación Cardiovascular (RIC), Instituto de Salud Carlos III.

Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

Fundación Pública Andaluza para la Investigación de Málaga en Biomedicina y Salud (FIMABIS).

Agradecimientos

Son muchos los momentos vividos durante el desarrollo de esta tesis doctoral, por lo que no quiero dejar pasar la oportunidad de expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de una u otra forma a su desarrollo.

A mi Directora la Prof. Dra. Ana Carmen Durán Boyero del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga. En primer lugar me gustaría mostrarle mi más profunda gratitud por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y que haya hecho posible cumplir este sueño. Gracias por su inestimable ayuda y orientación durante la realización de la tesis, así como su gran apoyo, sobre todo en este último año, por compartir su experiencia y conocimientos conmigo y por enseñarme a seguir adelante a pesar de las dificultades.

A los Profesores Dr. Valentín Sans Coma y Dr. Borja Fernández Corujo, por su apoyo en estos años, por sus ideas y consejos a la hora de realizar este trabajo.

Al Prof. Dr. Enrique García Raso, Catedrático de la Universidad de Málaga, quien durante gran parte de la realización de esta Tesis ha sido el Director del Departamento de Biología Animal. A él le agradezco su amabilidad y buena disposición.

A los profesores del Departamento de Biología Animal, Dra. Amelia Victoria de Andrés Fernández, Dra. Carmen Salas Casanova, Dr. Luis Javier Palomo Muñoz, Dr. Sergio Gofas y Dr. Raimundo Real Giménez, por su buena disposición y cordialidad durante todos estos años. A José Zamora, por su disponibilidad y amabilidad.

A la Dra. Eugenia Majón-Cabeza, por animarme a seguir adelante, por hacerme ver que no podemos cambiar a los demás y que sólo podemos superar las cosas mejorando nosotros mismos.

A mis compañeros de laboratorio, por darme tan cálida acogida, con su apoyo y consejos necesarios en los primeros años de investigación. A la Dra. Cristina Rodríguez por toda su gran ayuda durante toda la tesis, por enseñarme a dar los primeros pasos en este laboratorio y en especial por su enorme paciencia para corregir por segunda vez imágenes, flechas, letras, pies de figuras y lo peor, bibliografía. Al próximo Dr. Alejandro López, por su amistad, por tantas tardes de trabajo y tertulia, por ser mi compañero de tesis. A la Dra. María Carmen Fernández por sus consejos y por su ayuda con su ojo experto para mejorar la maquetación de este manuscrito. Y no me olvido de los "niños" Mari Tere, Unzu y Miguel que con sus locuras me ayudaron a que fuera más llevadera esta última etapa.

Al Prof. Dr. Mario Vargas Yáñez, por brindarme su amistad, por tener siempre su puerta abierta al final del pasillo, por hacerme sentir que estoy en mi querida Argentina al menos un ratito y sacarme una sonrisa en los peores momentos. A D. Luis Vida por ser un amigo, por su enorme disponibilidad para ayudarme en cualquiera de mis tareas y por cuidar tan bien mis ranitas. A Inmita, "mi mamá del departamento", gracias por tu hermosa amistad y compañía y por ser mi gran apoyo en los momentos difíciles.

Al Prof. Dr. Ramón Muñoz-Chapuli Oriol, por demostrarme en mi primer año de carrera lo fascinante que es la biología y contagiarme el amor por la ciencia. Además no voy a dejar pasar esta oportunidad para agradecerle por haberme dado la posibilidad de haber formado parte de su grupo de investigación y por ser mi tutor en la tesina de máster. Al Prof. Dr. José María Pérez Pomares, que me enseñó cómo con dedicación y buen hacer todo sale adelante.

A mis compañeros del laboratorio de "Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis", Rita Carmona, Elena Cano, Andrea Matiotti, Adrián Ruiz, Víctor Portillo, María Isabel Castillo, Laura Ariza y Juan Antonio Guadix. Rita, a ti te quiero agradecer la empatía que has mostrado hacia mi, por enseñarme tantas cosas y ayudarme a dar mis primeros pasos en la investigación. A Elenita, gracias por los buenos momentos que compartimos juntas dentro y fuera del laboratorio. A Andrea por hacer tan divertido el día a día, espero que nunca pierdas esa hermosa chispa que te caracteriza. A Adrián por enseñarme tantas cosas y tenerme tanta paciencia en el día a día. A Víctor por su locura y su particular forma de hacer amigos, metiéndose conmigo constantemente, creo que eso me ayudó a ser más fuerte y confiar más en mí misma. A Mary y Laurita por vuestra amistad, alegría y por los hermosos momentos compartidos.

A mis compañeros del Departamento, Ana Luz Márquez, Ángel Mateos, Darío Chamorro, David Romero, Jesús Olivero, Miguel Farfán y Antonio Román, por todas las comilonas compartidas, por vuestra compañía y especialmente por las palabras de aliento para superar esta etapa.

A D. Gregorio Martín, D. David Navas y D. Adolfo Martínez, Técnicos del Servicio de Microscopía del S.C.A.I. Gracias por poner tanto empeño y dedicación en brindar un excelente servicio, vuestra ayuda fue fundamental para obtener mucho de los resultados de esta Tesis. Gracias por los cafecitos y por las tertulias de media mañana, que le daban un pequeño respiro a mi alocada vida. Gracias por vuestra amistad.

I would like to thank Dr. Tim Mohun, Dr. Stuart Smith, Dr. Laurent Dupays, Dr. Robert Wilson and Norma Towers for the support they gave me during three stay in London and for the opportunity they gave me to be part of their team. Stuart, thank you for being the best teacher in the world, Thanks to your enormous help, patience and dedication in

teaching me so many new techniques, I was able to obtain the necessary material to carry out this work. In addition, I would like to thank my friends and colleagues: Alexandrine, Eva and especially Patricia, Jimena, Norberto and Damián. Thank you for the memorable moments, for the laughs and for being such special people. Patricia, gracias por tu enorme ayuda en el instituto, por abrirme las puertas de tu casa y tu familia y por tu hermosa amistad, y como siempre te digo "ya no te puedes librar de la pesada". A Jimena, gracias por tu amistad, ayuda y compañía, por los hermosos momentos vividos y espero poder ir pronto a conocer a mi sobrinito inglés.

A las chicas de la sala de becarios del Departamento de Biología Celular, Raquel, Eli, Alejandra, Diana, Ángela, Mercedes, Vanesa, por su amistad, por acogerme en sus reuniones y compartir tantos hermosos momentos llenos de risas y locuras.

A mis compañeros de carrera Laura, Jose, Patricia, Carlos y Mariana, espero que el destino nos vuelva a juntar en alguna ciudad. Mi querida Laura, gracias por tu hermosa amistad, por tu apoyo y por todos los momentos que estuviste a mi lado. A Jose, gracias por ser mi amigo, por ser mi profe de química y por toda tu ayuda a lo largo de estos años. A Patry, las más conocida de Málaga, por tu amistad y locuras que siempre me hacen reír, por tenerme al día de las cosas que están de moda y documentar nuestras vidas con miles de fotografías. A Carlos, por brindarme tu amistad, por estar siempre atento y por aguantarme tantas tardes en la biblioteca. A mi Marianita, por tu hermosa amistad, por enseñarme que de a poco y con paciencia todo llega a buen puerto. Y claro está que no me olvido de la Dra. Candelas Paniagua, a ti gracias por tantos momentos compartidos, por darme ese punto de alegría mezclado con locura que me hace ver el mundo de una forma menos estructurada, por escucharme y animarme.



Me gustaría dar las gracias a tantas hermosas personas que dejé en Tucumán en aquel febrero de 2004.

A mi querida Luciana Espasa, por su incondicional apoyo a más de 10.000 km, por sentirte tan cerca, sentir tu cariño y tus constantes mensajes de aliento que me daban ánimo para seguir adelante. Siempre recuerdo una canción que decía "Un amigo es uno mismo con el alma en otro cuerpo", de aquellas hermosas noches de folklore. No podemos dejar de lado a mi querido Exequiel Garay que el pobre nos aguantaba a las dos como un campeón, ni a mi otro hermano Miguel y el resto de la familia Espasa.

A mis amigos del grupo misionero, que aunque el tiempo y la distancia nos separaron, los recuerdo con mucho cariño. A mis compañeras del Colegio Santa Catalina, por tantos momentos inolvidables, por estar a pesar de la distancia. A los "chicos del San Francisco", por enseñarme el lado divertido de la vida, con la sencillez y buen humor que los caracteriza.

A mis familiares tucumanos y jujeños, que desde tan lejos me transmiten su esperanza y energía, porque no se olvidan de mí y me hacen sentir que estoy un poquito cerca de aquella vida que se quedó atrás.

Al Clan González Herrera, mi familia consorte, gracias por darme ánimo para seguir adelante y haberme acogido con tanto cariño. Gracias a Antonio y Conchita, por acogernos en su casa y hacerme sentir como una hija más.

Sin lugar a dudas, no podría haber llevado a cabo este trabajo sin el apoyo incondicional de mi familia. Gracias a ellos soy quien soy.

A mis padres, gracias por ser el sostén de mi vida, por darme la oportunidad de vivir y de estudiar en este país y de enseñarme que la vida

es lucha y que el que no lucha, no es feliz. A mi mamá, gracias por darme la vida, por tu amistad, por creer en mí, por ser mi sostén, mi compañera. A mi papá, gracias por tu compañía, por tu esfuerzo constante, por estar siempre a mi lado, por enseñarme tantas cosas, por haberme dado la oportunidad de tener una vida diferente. Los quiero mucho.

A mi querida Buba, creo que una de las cosas más difíciles de emigrar a este país es no estar a tu lado, te quiero tanto que te extraño cada día y espero con anhelo que vengas de nuevo de visita.

A mi hermanita Mocha, gracias por estar a mi lado, por ayudarme en cada momento y ser mi compañera. A mi José, gracias por demostrarme que con mucho esfuerzo todo es posible, por tu constancia y cariño. A mi Juan, gracias por estar siempre, por aguantar lo apretada que es tu hermana y tenerle paciencia y por cuidar de mis ranitas durante las estancias. Y recuerden: "Los hermanos sean unidos porque esa es la ley primera. Tengan unión verdadera en cualquier tiempo que sea, porque si entre ellos pelean los devoran los de afuera."- José Hernández. Los quiero mucho.

Y dejo para el final a mi querido Miguel, la persona que me hace ser la mujer más feliz del mundo. Sin tu enorme paciencia, comprensión y ayuda incondicional no habría sido posible que yo superara esta etapa. Gracias por tenderme tu mano y ser mi compañero de camino, por ayudarme a crecer cada día, por tu ternura y tu cariño, por todo lo que me hace quererte cada día más.

Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El sistema circulatorio de los anfibios consta de un circuito cerrado de venas y arterias que irriga la red periférica de capilares, a través del cual la sangre es impulsada por la acción de una sola bomba de presión: el corazón. El corazón de los anfibios está compuesto por un seno venoso, dos atrios, un ventrículo y un tracto de salida (TS) (Jollie, 1962; Jensen et al., 2014). En las uniones seno-atrial y atrioventricular, así como en el TS, hay válvulas que impiden el reflujo de la sangre (Fig. 1).

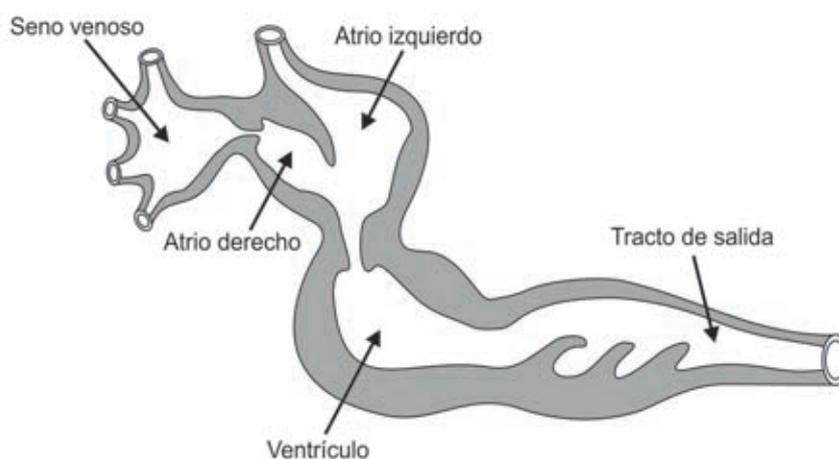


Figura 1. Esquema, en visión lateral, del corazón de anfibios. Modificado a partir de Kardong (1999).

El corazón se encuentra envuelto por una membrana fibrosa denominada pericardio. Éste se halla unido al corazón por el límite anterior del TS y por el límite dorsal del seno venoso (Gaupp, 1899). Dicha membrana es semitransparente (Lawson, 1970) o transparente (Wilkinson, 1992) en ápodos, con melanóforos dispersos en urodelos (Davies y Francis, 1941) y con una gran cantidad de iridióforos y melanóforos en anuros (Lemanski, 1973; Putnam, 1977). El pericardio y el espacio pericárdico desempeñan una función mecánica en la regulación de la función cardiovascular, contribuyendo a la contracción del miocardio (Beloucif et al., 1992; Mebazaa et al., 1998; Cerra et al., 2003). El líquido pericárdico, presente en el espacio

pericárdico, es un ultrafiltrado de plasma enriquecido en moléculas, tales como prostaglandinas, factor natriurético atrial y factores de crecimiento (Miyazaki et al., 1990). Dicho fluido sirve como lubricante entre el pericardio y el epicardio.

La sangre oxigenada procedente de los pulmones y el tegumento entra directamente en el atrio izquierdo. En cambio la sangre venosa que retorna del cuerpo entra al seno venoso y desde allí pasa al atrio derecho. Los atrios, derecho e izquierdo, se contraen de forma asincrónica, lo que permite que la sangre permanezca separada en el ventrículo indiviso. Cuando el ventrículo se encuentra en sístole, la sangre es impulsada a través del TS hacia los arcos sistémicos y pulmocutáneos.

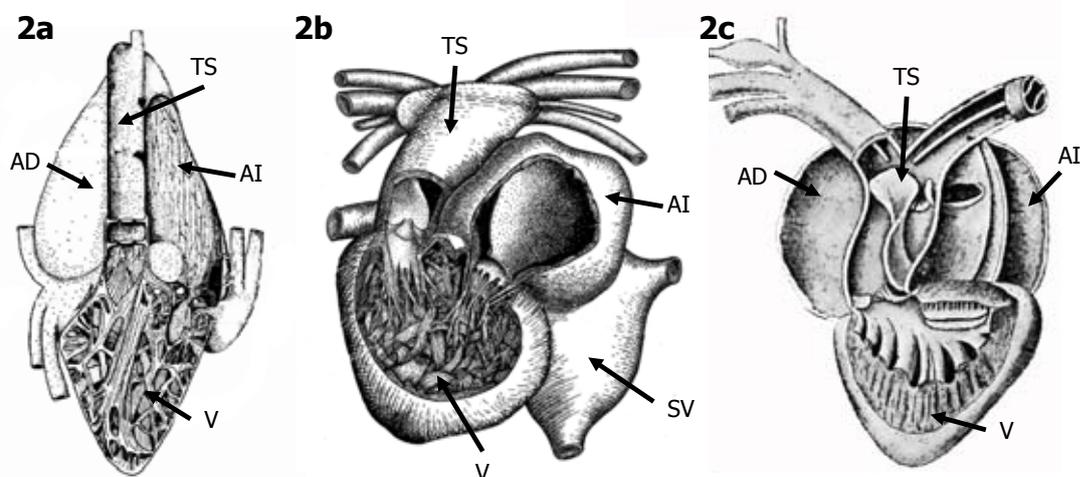


Figura 2. En la figura se muestran esquemas correspondientes a los tres grupos de anfibios actuales. a) Ápodos: *Hypogeophis rostratus* (Lawson, 1966); b) Urodelos: *Salamandra salamandra* (Davies y Francis, 1941); c) Anuros: *Rana pipiens* (Holmes, 1916). AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; SV, seno venoso; TS, tracto de salida; V, ventrículo.

Seno venoso

El seno venoso se sitúa dorsalmente con respecto al ventrículo y se extiende desde el septo transversal hasta los atrios. Esta cámara presenta un aspecto triangular, con una región expandida hacia la izquierda y una región cónica estrecha hacia la derecha. La pared del seno venoso es muy delgada y su musculatura no muestra variaciones en su espesor.

En los anfibios el seno venoso presenta una gran diversidad morfológica. En los ápodos el seno venoso está formado por una pared delgada con engrosamientos musculares distribuidos de forma irregular en la cara interna de la pared. Dicha cámara se divide en dos partes: el seno venoso principal, de mayor tamaño, y el seno venoso izquierdo, relativamente poco desarrollado. En general, no existen pliegues en la pared, ni válvulas que delimiten la unión entre las dos cámaras, como ocurre en *Epicrionops* (Wilkinson y Nussbaum, 1996). En cambio, en *Hypogeophis rotatus* dicha división queda indicada por un par de pliegues oblicuos presentes en la pared interna (Lawson, 1966). El seno venoso principal recibe sangre procedente de la zona anterior del cuerpo a través de la vena yugular común derecha y de la zona posterior del cuerpo a través de las venas cava posterior y renal (Ramaswami, 1944).

En los urodelos la pared dorsal del seno venoso consiste en una densa capa de tejido conjuntivo con algunas trabéculas de células miocárdicas. Ventralmente la pared es más compacta y contiene capas de miocardio intercaladas con tejido conjuntivo (Putnam, 1977). El seno venoso recibe la sangre del cuerpo procedente de los conductos de Cuvier y de la vena cava posterior (Fig. 2). En *Necturus maculosus* y *Siren lacertina* los conductos de Cuvier izquierdo y derecho son de igual tamaño por lo que el seno venoso presenta una simetría bilateral (Putnam y Parkenson, 1985). No se encontraron válvulas en la unión del conducto de Cuvier con el seno venoso (Terhal, 1942). Internamente el seno venoso de los urodelos no es septado.

Sin embargo, *Cryptobranchus alleganiensis* y *Siren lacertina* poseen un septo longitudinal parcial que se origina cercano al orificio de entrada de la vena cava posterior (Putnam, 1977). *Necturus maculosus* presenta un septo completo (Putnam y Parkerson, 1985). El seno venoso se conecta con el atrio derecho por medio de la unión seno-atrial situada en la pared dorsal del atrio, orientada perpendicularmente al plano frontal. No se han observado válvulas en esta región a excepción de *Cryptobranchus alleganiensis*, en donde la unión entre el seno y el atrio se produce a través de un orificio que es oblicuo al plano transversal y que presenta pequeñas papilas en algunos especímenes o bien válvulas en forma de bolsillo dispuestas ventralmente (Putnam y Parkerson, 1985).

En los anuros el seno venoso consiste en un saco de paredes muy delgadas ubicado en la región dorsal del corazón (Bourne, 1902; Holmes, 1916). Dicha cámara presenta una forma triangular, en donde su límite anterior es cóncavo formado por una prolongación de la pared anterior de las venas cavas. El seno venoso recibe el flujo sanguíneo de las venas cavas anteriores y hepáticas derecha e izquierda. Las dos venas cavas que se abren al seno venoso contienen en su margen ántero-lateral un par de válvulas con sus partes libres hacia el lumen del seno (Sharma, 1957). En los anuros, la unión seno-atrial puede estar provista de válvulas que evitan el reflujo sanguíneo durante la sístole atrial. En *Ceratophrys* la unión seno-atrial está provista de dos válvulas membranosas curvadas y engrosadas, una craneal y otra dorsal (Rau, 1924). Rao y Ramanna (1925) en *Rana tigrina* muestran que la unión entre el seno venoso y el atrio está provista de dos válvulas delgadas con forma de aleta. En *Rana pipiens*, Sharma (1957) destaca que dichas válvulas son membranosas y con forma de labio engrosado, compuestas por haces de fibras elásticas y fibras de colágeno. En cambio, Holmes (1916) no halla evidencias de la presencia de válvulas en la unión seno-atrial en *Rana temporaria*.

Atrios

En los anfibios los atrios se sitúan en posición anterior con respecto al seno venoso y dorsal con respecto al ventrículo y el TS. En la mayoría de los anfibios, los atrios son de tamaño similar, a excepción de los anuros y urodelos, en los cuales el atrio izquierdo es mucho más pequeño que el derecho (Bourne, 1902) (Fig. 2). Las paredes de los atrios consisten en una malla de fibras elásticas y de colágeno acompañadas de paquetes de musculatura cardíaca. A diferencia del seno venoso, los atrios presentan trabéculas musculares más desarrolladas, formando en algunos casos grandes crestas que sobresalen hacia el lumen atrial. Los atrios se hallan separados anatómicamente por un delgado septo interatrial que se compone de una delicada red de fibras elásticas y musculares entrelazadas.

En los ápodos el atrio derecho es más pequeño que el izquierdo (Lawson, 1966) (Fig. 2a) y el septo interatrial puede ser completo o incompleto, con o sin fenestraciones (Ramaswani, 1944; Wilkinson y Nussbaum, 1996). En algunos casos se ha observado en el atrio derecho un septo incompleto (Bakker et al., 2015) o septos atriales múltiples como en *Hypogeophis rostratus* (Schilling, 1935). La presencia de un septo atrial derecho parece ser una especialización del grupo de las cecilias, excepto la familia Rhinatrematidae (Bakker et al., 2015). Con respecto a la orientación del septo interatrial, éste puede estar dispuesto en el plano sagital o, como en las familias Indotyphlidae y Typhlonectidae, en el plano frontal (Schilling, 1935; Wilkinson y Nussbaum, 1996). En los urodelos los atrios ocupan una posición topográfica inusual. Tanto el atrio izquierdo como el derecho se sitúan a la izquierda del TS (Fig. 2b). El atrio izquierdo es de pequeño tamaño y cubre antero-ventralmente el seno venoso (Putman y Parkenson, 1985). A causa de la disposición de los atrios, el septo interatrial se ubica de forma totalmente oblicua (Davies y Francis, 1941) y está, además, generalmente

perforado, permitiendo que se mezcle la sangre venosa y arterial (Kerr, 1919; Kingsley, 1926). En *Salamandra maenlosa* el septo es completo, con sus dos terceras partes fenestradas (Langerhans, 1873). El septo interatrial de *Cryptobranchus alleganiensis* es incompleto con un componente perforado contiguo a la abertura atrioventricular y un componente no perforado cercano a la válvula seno-atrial (Noble, 1925; Baker, 1949; Jollie, 1962). En especies no pulmonadas el septo interatrial está ausente (Bruner, 1900; Cords, 1924; Benninghoff, 1933; Putnam y Kelly, 1978). En los anuros el atrio derecho es de mayor tamaño que el izquierdo. El septo interatrial es completo y presenta una configuración en forma de “S” (Fig. 2c) (Sharma, 1961) .

Entre los atrios y el ventrículo se encuentran las válvulas atrioventriculares, que impiden el retroceso de la sangre hacia las aurículas durante la sístole ventricular. Las válvulas atrioventriculares presentan una gran diversidad morfológica en los anfibios. En los ápodos el complejo valvular atrioventriculares se halla formado por un par de válvulas bicúspides membranosas que se continúan con el septo interatrial. Cada una de las válvulas se unen a los músculos papilares y a proyecciones de las trabéculas (Ramaswami, 1944). La mayoría de los urodelos presenta al menos dos válvulas atrioventriculares en forma de bolsillo, excepto *Siren lacertina* que tiene dos válvulas en forma de tipo tapón. En *Cryptobranchus alleganiensis* el complejo valvular atrioventricular está formado por tres válvulas: una dorsal alargada, una ventral con forma de bolsillo y, por último, una pequeña izquierda que brinda protección a la válvula ventral. En *Salamandra salamandra* (Benninghoff, 1921; Terhal, 1942) y *Ambystoma mexicanum* (Terhal, 1942) se han descrito además dos válvulas laterales pequeñas, que parecen tener poca o ninguna función valvular. Las válvulas atrioventriculares se unen a la musculatura del ventrículo mediante un sistema de cuerdas tendinosas (Putnam y Parkerson, 1985). En los anuros el orificio atrioventricular es muy amplio y se halla dividido por el septo interatrial. Dicho orificio está rodeado

por cuatro válvulas, dos grandes en los bordes dorsal y ventral y dos pequeñas dispuestas en los márgenes izquierdo y derecho (Holmes, 1916). En *Rana temporaria* y *Bufo vulgaris* el complejo atrioventricular está formado por tres válvulas, dos grandes con forma de riñón y una más pequeña.

Ventrículo

En general, los anfibios presentan un ventrículo con una forma de pirámide de base triangular, con el ápice en posición dextro-posterior y la base en posición oblicua con respecto al plano transversal. La cámara no presenta interiormente un septo interventricular y está muy trabeculada (Ecker et al., 1882; Gaupp, 1896; Rao y Ramanna, 1925; Davies y Francis, 1941; Sharma, 1957). En los ápodos *Ichthyophis* y *Hypogeophis* existen trabéculas formando una intrincada red (Fig. 2a) que en ningún caso producen la división del ventrículo (Ramaswami, 1944; Lawson, 1966). En el ventrículo de urodelos la disposición de las trabéculas y su tamaño varía entre las diferentes especies. En líneas generales se disponen en grupos de trabéculas que adquieren un espesor similar al de la pared del ventrículo, que se extiende en sentido dorsoventral y antero-posterior (Fig. 2b). En *Siren* y *Necturus* las trabéculas están formadas por un miocardio esponjoso. En la zona media del ventrículo hay un grupo de trabéculas que configuran una especie de tabique interventricular parcial, que divide la cavidad ventricular en dos cámaras asimétricas: una izquierda pequeña y una derecha de mayor tamaño (Baker, 1949; Putnam, 1975, 1977; Putnam y Dunn, 1978; Kardong, 1999). En los anuros el ventrículo está comprimido dorsoventralmente. En su interior se subdivide en cuatro subcavidades: central, antero-lateral izquierda, antero-lateral derecha y posterior (Sharma, 1957). Dichas cavidades presentan trabéculas más cortas y engrosadas con respecto a las descritas anteriormente en ápodos y urodelos (Fig. 2c) (Benninghoff, 1921; Grant y Regnier, 1926; Francis, 1934; Marshall, 1896; Borradaile, 1945; Putnam y Parkerson, 1985; Heinz-Taheny, 2009) .

El ventrículo de los anfibios está formado por miocardio esponjoso el cual carece de arterias coronarias. Sin embargo, existen algunas excepciones. En los ápodos, Schilling (1935) y Sawaya (1941) describen la presencia de una serie de arterias coronarias que se originan a partir de la cavidad ventricular y permean a través del miocardio esponjoso. Esta serie de arterias coronarias retornan sangre desde las capas del miocardio al seno venoso (Lawson, 1959, 1966; Foxon, 1964). En los urodelos, en el seno cono-ventricular drena una vena coronaria mayor que transcurre a lo largo del borde lateral derecho del ventrículo en *Siren lacertina* y *Cryptobranchus alleganiensis*. En la superficie dorsal y ventral del ventrículo, además, circulan coronarias de menor calibre formando un plexo subepicárdico (Putnam, 1977; Putnam y Parkerson, 1985). En cambio, la ausencia total de circulación coronaria en el ventrículo de los anuros está descrita desde el siglo pasado (Ecker et al., 1882; Grant y Regnier, 1926; Foxon y Walls, 1946; Foxon, 1950, 1951).

El tracto de salida cardíaco

La bibliografía sobre la anatomía y fisiología del corazón de los anfibios es extensa y abarca desde mediados del siglo XIX hasta la actualidad, por ejemplo, Boas (1880), Ecker et al. (1882), Marshall (1896) Holmes (1916) Foxon (1947) Graff (1957), Sharma (1961) y Heinz-Taheny (2009). Sin embargo, los aspectos relativos al TS están descritos con una terminología confusa. Uno de los primeros investigadores que trabajó sobre este tema fue Brucke (1852), que aportó descripciones detalladas del TS, en las cuales Fritsch en 1869 detectó varios puntos cuestionables. En cualquier caso, ambos autores fueron los precursores del estudio del TS de los anfibios y sus trabajos constituyen el punto de partida para publicaciones posteriores de investigadores clásicos como Sabatier (1873) y Boas (1882). Algunos autores describen el TS como una estructura tubular impar que denominan

bulbus cordis (Rolleston, 1870; Ecker et al., 1882; Langer, 1894; Johansen y Burggren, 1980; Horb y Thomsen 1999; Blitz et al. 2006) o conus (Morris, 1974). En 1882, Boas publicó un estudio comparativo del TS en diferentes grupos de anfibios, en el cual distingue entre un componente proximal, el conus arteriosus, y otro distal, el truncus arteriosus. Dicha nomenclatura es asumida en trabajos posteriores por autores como Parker y Haswell (1897), Rao y Ramanna (1925), Duellman y Trueb (1930), Sharma (1957), Shelton y Jones (1965), Lawson (1970), Putman (1977), Putman y Parkerson (1985), Hickman (2006) y Heinz-Taheny (2009). Para designar los componentes proximal y distal del TS, otros investigadores utilizan respectivamente los términos bulbus arteriosus y truncus arteriosus (Gaupp, 1899; Peelle, 1931a; Davies y Francis, 1941; Terhal, 1942; Graaf, 1957) o bien pylangium y synangium (Marshall, 1896; Bourne, 1902; Noble, 1931; McMullen, 1938). Peelle (1931a) denomina a la región anterior truncus impar a la región posterior bulbus cordis, generando una confusión con respecto a lo expuesto por otros autores.

A pesar de la confusión terminológica, en general, se acepta que el TS consta de dos componentes, uno proximal y otro distal con respecto al ventrículo. En el tejido fresco, el componente proximal se diferencia del distal por su coloración. La del componente proximal es similar a la que presenta el ventrículo, siendo el componente distal más blanquecino (Peelle, 1931a). Externamente, en los ápodos el TS es muy alargado y similar al tamaño del ventrículo en sentido antero-posterior (Lawson, 1966); en los urodelos y anuros el TS es proporcionalmente más corto que el ventrículo (Putnam, 1977).

La porción proximal es una estructura tubular más o menos recta en ápodos y torsionada en anuros y urodelos (Fig. 3a-c) (Ison, 1967). La zona caudal del componente proximal se conecta con el ventrículo. Dicha porción se extiende unos milímetros en sentido anterior y se produce la primera curva

de derecha a izquierda. De esta manera, en algunos casos esta porción llega a tener una posición casi horizontal con respecto al punto de partida del componente proximal en el ventrículo. La segunda curva del TS tiene lugar en la zona de transición del componente proximal con el distal. Dicha curva se produce en sentido ventro-dorsal, de tal forma que el componente distal y los troncos arteriales quedan ubicados en posición dorsal con respecto al componente proximal (Ison, 1967; Putnam y Parkerson, 1985).

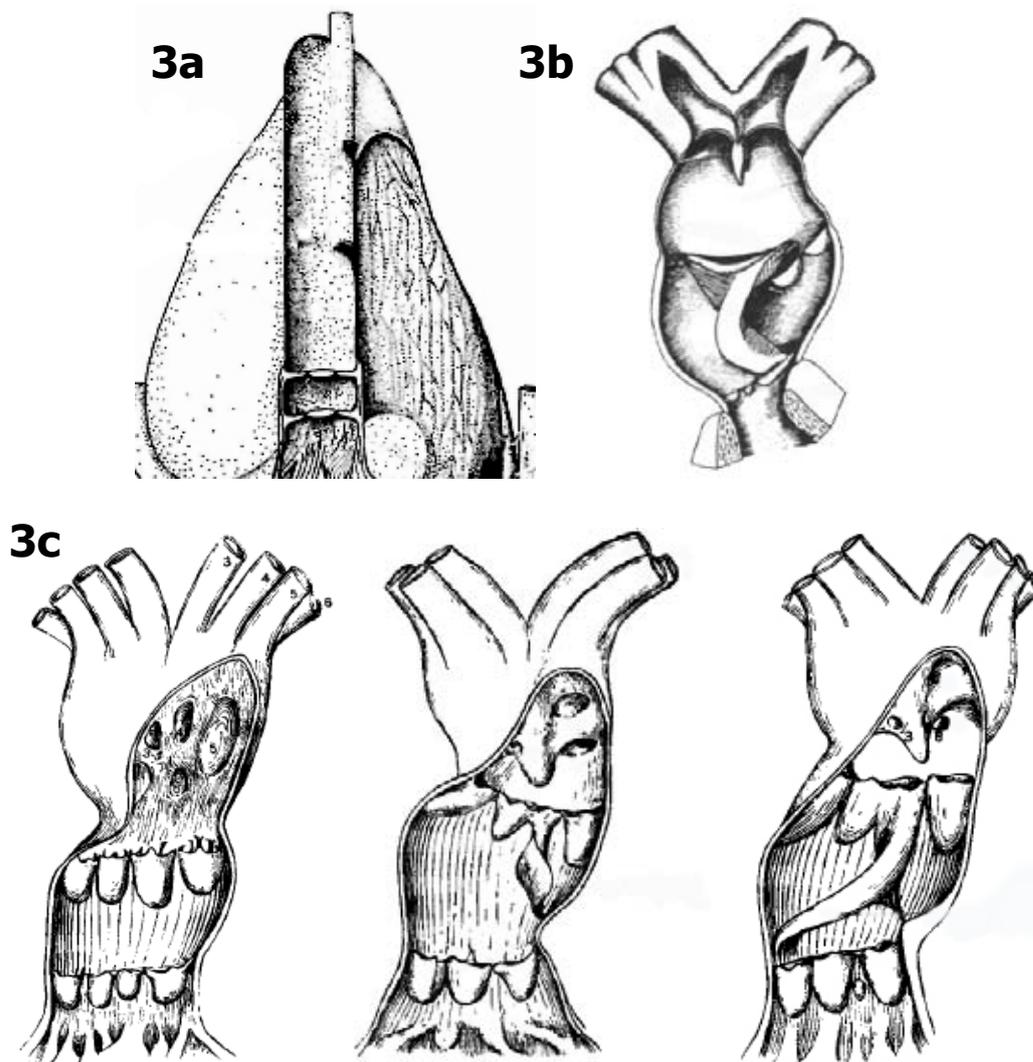


Figura 3. Esquemas correspondientes al tracto de salida de diferentes modelos de anfibios. a) TS ápodos: *Hypogeophis rostratus* (Lawson, 1966); b) TS anuro *Xenopus laevis* (Graaf, 1957); c) TS urodelos: De izquierda a derecha: *Cryptobranchus alleganiensis*, *Amblyostoma opacum*, *Amblyostoma maculatum* (Noble, 1931).

La pared del componente proximal está compuesta por tres capas. La capa externa es el epicardio, constituido por una línea continua de células epicárdicas bajo la que subyace un amplio espacio subepicárdico. La capa intermedia es un miocardio compacto, organizado en dos capas, una interna y otra externa. La capa interna posee musculatura cardíaca dispuesta de forma circular y se extiende desde la unión del componente proximal con el ventrículo hasta el extremo cefálico de dicho componente. La capa externa tiene fibras musculares dispuestas de forma longitudinal en la zona próxima a la unión con el ventrículo y a medida que progresa en sentido anterior, dichas fibras musculares están separadas por fibras elásticas y de colágeno (Davies y Francis, 1941; Morris, 1974).

En general, el componente proximal de anfibios está recorrido internamente por una estructura en forma de lengüeta que recibe diferentes nombres: septo del bulbo (Gaupp, 1899; Peelle, 1932; Davies y Francis, 1941), septo del cono (Sharma, 1961; Ison, 1967), válvula espiral (Bourne, 1900; Holmes, 1916; Noble, 1931; Sharma, 1957; Morris, 1974) y cresta espiral (Terhal, 1942; Hyman, 1992). La cresta espiral divide de forma incompleta el componente proximal del TS en dos cavidades denominadas *cavum aorticum* y *cavum pulmo-cutaneum*. Los ápodos no poseen cresta espiral (Fig. 3a)(Ramaswami, 1944; Lawson, 1966; Bakker et al., 2015). En la mayoría de los urodelos la cresta espiral es completa y atraviesa la porción proximal del TS (Fig. 3c)(Boas, 1882; Noble, 1931; Davies y Francis, 1941). Sin embargo, las salamandras no pulmonadas de los género *Rhyacotritony* y *Cryptobranchus* carecen de cresta espiral (Nel, 1970; Noble, 1931) o dicha cresta es de pequeño tamaño y forma una lengüeta que recorre parcialmente la porción cefálica del TS, como ocurre en *Amblyostoma opacum* (Noble, 1931). Según Bruner (1900), en los urodelos la cresta espiral tiene la función de prevenir el colapso de la porción cefálica del TS. Los anuros presentan una cresta espiral completa que atraviesa el TS describiendo un giro de

180° (Fig. 3b)(Rau, 1924). Tradicionalmente se ha descrito que la cresta interviene en la separación del flujo de sangre oxigenada y no oxigenada (Gaupp, 1899).

Internamente, en los extremos de la porción proximal del TS se insertan sendas filas de válvulas semilunares (Sharma, 1961), una proximal, en el límite del TS con el ventrículo, y otra distal, en el límite entre los componentes proximal y distal del TS. Estas válvulas están dispuestas en hileras transversales (Fig. 3a-c). El número, disposición, forma y tamaño de las válvulas de cada fila varía ampliamente a nivel interespecífico y, en menor grado, intraespecífico (Boas, 1882; Marshall, 1896; Noble, 1931; Peelle, 1931a). Los ápodos presentan tres válvulas en cada fila. Una de ellas se sitúa oblicuamente, en posición dorsal, mientras que las otras dos válvulas tienen una posición ventro-lateral (Ramaswami, 1944; Lawson, 1966). En los urodelos se ha descrito una variabilidad en cuanto al número y tamaño de las válvulas existentes en el componente proximal del TS. Algunas especies presentan tres válvulas proximales y tres distales de similar tamaño como es el caso de *Plethodon glutinosus*; otras especies presentan cuatro proximales y cuatro distales, de igual o diferente tamaño (*Rhyacotriton olympieus*, *Cryptobranchius alleganiensis*) o tres proximales y cuatro distales en *Amblystoma maculatum*, en donde una de ellas es aparentemente un ensanchamiento de la cresta espiral (Noble, 1931). En los anuros los diferentes autores utilizan una gran variedad de términos y descripciones anatómicas que no dejan dilucidar claramente las características de las válvulas presentes en este grupo. En general, el número de válvulas de cada fila oscila entre dos y cuatro; su forma y disposición varía según la especie. En *Rana esculeta* y *Rana platyrhina* hay tres válvulas semilunares anteriores y tres posteriores, donde una de éstas últimas se halla dividida por un septo (Boas, 1882; Gaupp, 1896). En *Rana sphenoccephala* y *Rana temporaria*, a diferencia de las especies anteriormente citadas, aparecen

tres válvulas semilunares anteriores y tres posteriores, siendo una de las tres válvulas posteriores una continuación de la cresta espiral (Holmes, 1927; Peelle, 1931a).

La porción distal del TS suele ser corta, tubular y conecta el TS con los arcos aórticos. En su interior presenta una porción basal no septada (Terhal, 1942), con un bloque endotelial adherido a su pared dorsal (Graff, 1957; Sharma, 1961), y una porción septada más cefálica. El número y disposición de los septos se ha descrito de forma diversa en los diferentes grupos de anfibios (Terhal, 1942; Ison, 1967).

Estructuralmente, la porción distal del TS consta de tres capas. La capa interna o endocardio se compone de una monocapa de células endoteliales de forma escamosa o cúbica. La capa media consiste principalmente en células musculares lisas dispuestas de manera circunferencial intercaladas con tejido conjuntivo fibroso rico en fibras elásticas y fibras de colágeno (Grimes et al., 2010). Finalmente, la capa externa consta de un epicardio de células mesoteliales con un espacio subepicárdico subyacente que contiene tejido conjuntivo rico en fibras de colágeno, fibras nerviosas, vasos linfáticos, pequeñas arterias y venas (Sharma, 1961).

En los ápodos el componente distal presenta un diámetro ligeramente menor que el componente proximal de TS. Internamente se halla dividido en la porción proximal en dos conductos por el septo principal y progresivamente en dirección cefálica se divide por el septo medio en cuatro conductos: dos pulmonares, derecho e izquierdo, y dos sistémico-carotídeos derecho e izquierdo (Ramaswami, 1944). En los urodelos la base del componente distal es indivisa y conforme transcurre hacia la zona distal por medio del septo principal, septo medio pulmonar, septo accesorio y septo aórtico-carotideo, se divide en ocho conductos: dos vasos medios pulmonares, dos vasos laterales, dos vasos aórticos y dos vasos carotídeos que se continúan

con los troncos arteriales tras atravesar el límite anterior del pericardio. En los anuros el componente distal del TS está dividido internamente por un septo horizontal en toda su longitud y más distalmente, por otros dos septos perpendiculares al septo horizontal: el septo aórtico carotídeo y el septo medio intercarotídeo. De esta manera se establecen dos conductos dorsales, que constituyen las bases de los troncos pulmo-cutáneos y dos conductos ventrales que son la base de los troncos aórtico-carotídeos (Sharma, 1961).

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que el límite entre los dos componentes proximal y distal del TS no es estricto, sino que existe un cierto solapamiento entre ellos, de tal forma que se observa una zona de transición formada por miocardio y musculatura lisa (Sedmera et al, 2003; Grimes et al., 2010).

Por último, en la bibliografía se describen tres pares de arcos aórticos en los anfibios adultos (p.ej. Boas, 1882; Oliver, 1909; Noble, 1931; Francis, 1934; Ramaswami, 1944; Baker, 1949). El primer par es el carotídeo, el segundo, el sistémico, y el tercero, el pulmonar. En el grupo de los urodelos se describe, además, un cuarto par de arcos aórticos (Putnam, 1977).

Desarrollo cardíaco

En la embriogénesis de los vertebrados, el sistema cardiovascular se desarrolla de forma muy temprana y es el primer sistema del embrión en alcanzar una actividad funcional (Clark, 1990). El desarrollo embrionario de los anfibios ha sido objeto de numerosas investigaciones tanto descriptivas como experimentales. Los huevos de los anfibios presentan un gran tamaño, un desarrollo rápido, el tejido es prácticamente transparente y son relativamente fáciles de mantener en medios de cultivo. Dichas características permiten la manipulación temprana de genes y proteínas

fundamentales en el desarrollo, con técnicas tales como microdissección, microinyección y explantes. La relativa facilidad de manipulación en los primeros estadios embrionarios les hace especialmente adecuados para descifrar los mecanismos de señalización y las relaciones entre los tejidos que inducen a las células a diferenciarse en los diferentes linajes cardíacos, los patrones y procesos morfogénéticos implicados en la cardiogénesis.

Como ocurre en los vertebrados, el corazón de los anfibios se origina a partir de un par de crestas cardíacas ubicadas a ambos lados de la línea media dorsal del embrión. En esta posición los primordios reciben señales del ectodermo y del endodermo para la formación de los futuros miocardiocitos. Posteriormente las crestas cardíacas se unen en la línea media embrionaria dando lugar al tubo cardíaco primitivo (Abu-Issa y Kirby, 2007). Dicho tubo endocárdico no es recto, sino que está inclinado ventralmente en sus zonas anterior y posterior. Como resultado del proceso el mesodermo contiguo al tejido miocárdico va a formar el mesocardio dorsal y el pericardio. Además, la zona anterior del tubo endocárdico se ensancha para formar el saco aórtico presuntivo que se extiende en dirección cefálica para formar la aorta ventral y bilateralmente para formar el primer par de arcos aórticos. En el extremo posterior del tubo endocárdico se forma el seno venoso el cual se bifurca y se extiende caudalmente por la superficie del primordio dorsal del hígado (Mohun et al., 2000).

La estructura del corazón lineal se mantiene especialmente en la mitad posterior del corazón, mientras el mesocardio dorsal se elonga en la zona posterior para formar los vasos del sistema venoso (Millard, 1949). En las horas siguientes a la formación del seno venoso se desarrollan los senos cardinales comunes (conductos de Cuvier) que atraviesan los lados laterales del endodermo anterior para unirse a las venas cardinales. En la zona ventral del endodermo intestinal, las venas mesentéricas entran en el seno venoso.

Seguidamente la región posterior del tubo cardíaco, atrio y seno venoso presuntivos, se disponen en posición anterior con respecto al ventrículo presuntivo. De esta forma el corazón ya no está alineado a lo largo del eje anteroposterior y presenta una forma de espiral en sentido antihorario. En esta situación el componente distal del TS queda ubicado en una posición media, el componente proximal desplazado hacia el lado derecho del embrión, el ventrículo ligeramente hacia el lado derecho del embrión, el atrio y el seno venoso en una posición media del embrión. En el extremo anterior del TS el endocardio asciende girando unos 90° para unirse a la aorta ventral.

En los siguientes estadios del desarrollo el tubo cardíaco se extiende ligeramente en el sentido antero-posterior y la región del atrio se ubica dorsal al ventrículo. En esta etapa el corazón se halla formado por dos capas celulares, endocardio y miocardio, separadas por una matriz acelular denominada gelatina cardíaca (Davies, 1924). Progresivamente el miocardio primitivo se especializa para formar diferentes estructuras (contráctil, de conducción, septos...), mientras que el endocardio se halla implicado en la formación de las válvulas cardíacas (de la Cruz y Markwald, 1998).

Los cojines endocárdicos son estructuras transitorias que darán lugar a la formación de las válvulas atrioventriculares y de las válvulas del TS a partir de uno de los más complejos sistemas de inhibición de células progenitoras. Inmediatamente después que el corazón primitivo adquiera forma de "S" se produce una expansión regional de la matriz extracelular o gelatina cardíaca que separa el miocardio (externo) del revestimiento endotelial (interno) del corazón. Seguidamente se produce la morfogénesis de los cojines endocárdicos mediante un proceso de transición epitelio-mesénquima. Este proceso ocurre inicialmente en la región atrioventricular y más tarde en el TS.

La cardiogénesis y su regulación molecular

La cardiogénesis es el proceso de diferenciación celular por el cual una población de células mesodérmicas se transforman en los linajes celulares que formarán parte de los tejidos del corazón (García-Martínez et al., 1993). La regulación de las complejas redes genéticas que interactúan durante el desarrollo están mediadas por una gran variedad de factores de transcripción. Dichos factores interaccionan con dominios promotores o inhibidores de los diferentes genes implicados en el desarrollo.

Hace más de tres décadas que Kirby et al. (1983) describió los primeros indicios sobre la importancia de la cresta neural en el desarrollo del corazón. El primer modelo experimental utilizado para realizar experimentos relacionados con las células que migran desde la cresta neural fueron quimeras entre embriones de pollo y codorniz (Bockman y Kirby, 1984; Kirby y Bockman, 1984).

La morfogénesis del tubo cardíaco y la adquisición de las estructuras características del corazón y sus cámaras en los anfibios sigue siendo poco descrita a nivel genético molecular. Esto ocurre en gran medida por la dificultad que presenta la modulación de los genes y una expresión homogénea en esta etapa del desarrollo del corazón (Latinkic et al., 2002; Smith et al., 2005).

Tradicionalmente se cita a Nkx-2.5 o GATA-4 entre los primeros factores de transcripción implicados en la activación del creciente cardíaco. Sin embargo se ha demostrado que reguladores como Mesp1 parecen expresarse preferencialmente en el mesodermo precardiaco durante la gastrulación temprana. Dicho regulador se halla implicado en la correcta migración de los progenitores precardiacos desde la línea primitiva hasta los campos cardíacos (Saga et al., 1999; Chen et al., 2005).

En los anfibios el tejido que conforma el corazón no se especifica hasta después del inicio de la gastrulación. Esta circunstancia ha sido puesta de manifiesto por Jacobson (1961) y Jacobson y Duncan (1968) utilizando urodelos como modelo para identificar la ubicación de los primordios cardíacos en etapas tempranas de la gastrulación.

Los dos primordios cardíacos, puestos de manifiesto por su patrón de expresión positiva para Nkx-2.5, migran y se unen en la línea media ventral (Tonissen et al., 1994; Evans et al., 1995; Cleaver et al., 1996; Newman et al., 2000). El factor Nkx-2.5 se identifica con un marcador de células que provienen del campo cardíaco primario. Nkx-2.5 es inhibido ventralmente por señales que provienen de los tejidos del miocardio prospectivo y dorsalmente por señales de los tejidos del tubo neural, la notocorda y los somitos. En este momento del desarrollo, el corazón es una fina capa de mesodermo situado entre el ectodermo superficial y el endodermo faríngeo. Dicha estructura se halla por detrás de la glándula del cemento y las placas bucofaríngeas, extendiéndose lateralmente unos 90° desde la línea media dorsal donde limita con el mesodermo del arco faríngeo.

La activación de Nkx-2.5 desencadena la cascada de señalización de factores de transcripción precardiogénicos tales como Hand-1 y genes implicados en la diferenciación del tipo de musculatura, tales como MLC2v, en el caso del miocardio, alfa-actina, en los casos de musculatura lisa (Newman et al., 2000). En la porción ventral de los dominios de expresión de Nkx-2.5 se forma el miocardio. Dicho hecho fue demostrado por los experimentos clásicos en embriones de tritón (Ekman, 1925) en los cuales se trasplantaron tejidos dorsales del campo cardíaco primario destinados a formar miocardio a sitios alejados del corazón, donde no hay influencia de señales inhibitoras, obteniéndose como resultado la formación de rudimentarios tubos cardíacos. Los linajes de células de



las regiones laterales del campo cardíaco secundario darán origen al mesocardio dorsal y el pericardio anterior (Raffin et al, 2000).

Otro factor importante es el papel esencial del ácido retinoico en múltiples aspectos de la cardiogénesis y en la progresión de la morfogénesis cardíaca de los anfibios (Collop et al., 2006). Al principio de la cardiogénesis el ácido retinoico altera la expresión de genes claves en las placas de mesodermo lateral, tales como *Nkx-2.5* y *Hand1*. Seguidamente se relaciona su campo de acción con la lateralización izquierda-derecha y la torsión del tubo cardíaco.

Los genes *GATA* son importantes factores de transcripción que intervienen en la función de *Nkx-2.5*. Son capaces, junto con los genes *SRF*, de promover la transcripción de genes implicados en la diferenciación del miocardio (Durocher et al., 1997; Gove et al, 1997; Sepulveda et al, 1998). *SRF* es un cofactor de la miocardina y un factor de transcripción de la familia de las miocardininas, *A-MRTF* y *B-MRTF*, los que son importantes reguladores de genes cardíacos (Wang et al., 2001, 2002; Small et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, el corazón se desarrolla a partir de un precursor tubular lineal que se torsiona a la derecha y sus tejidos se diferencian para formar un órgano multicompartimentado. La torsión del tubo cardíaco es la manifestación más temprana de la asimetría izquierda-derecha. Los procesos de señalización que inducen la lateralización del tubo cardíaco son poco conocidos. Experimentos recientes en el pez cebra sugieren que la proteína morfogenética ósea 4 (*BMP4*) está implicada en la lateralidad del tubo de corazón en desarrollo, ya que se expresa predominantemente en el lado izquierdo del tubo lineal. Además se acepta que la proteína *Xenopus 1* (*Xnr1*) afecta la expresión de *BMP4* en el corazón (Breckenridge et al., 2001).

El concepto de “campo” embrionario es ampliamente utilizado en la biología del desarrollo. Hoy en día, el término “campo” se utiliza para describir “un grupo de células provista de auto-organización y propiedades de autorregulación cuya posición y el destino se especifican con respecto al mismo conjunto formando así una unidad discreta de desarrollo embrionario y por lo tanto dará lugar a un órgano en concreto” (Ingham y Martínez Arias, 1992; Gilbert et al., 2005)

En ratón, la población de células del mesodermo pre-cardíaco del que se forma el tubo cardíaco recto se denomina campo cardíaco primario. Las células que forman el tubo cardíaco antes de que se produzca la torsión contribuyen únicamente al desarrollo del ventrículo izquierdo, parte de la región atrioventricular y parte de las regiones atriales. Para completar el desarrollo del corazón fuentes tardías de precursores cardíacos se incorporan por el polo arterial y el polo venoso del tubo cardíaco. Dichos progenitores contribuyen al desarrollo del TS, el ventrículo derecho (ausente en anfibios), parte de la región atrioventricular, una porción de los atrios y la zona posterior del seno venoso. En la bibliografía se denomina campo cardíaco secundario al nuevo grupo de progenitores que se incorporan al tubo primario (Kelly et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001; Abu-Issa et al., 2004; Van Den Verg et al., 2009). La existencia del campo cardíaco secundario sigue siendo motivo de especulación ya que no hay evidencias sólidas de su existencia en anfibios. Sin embargo, Brade et al. (2007) describen la existencia de dominios que se hallan en la zona anterior a los dominios de expresión de *Nkx-2.5* los cuales se expresa *Islet-1*, típico factor de transcripción asociado del campo cardíaco secundario en el corazón de los mamíferos. Por lo tanto, se cree que los posibles mecanismos que controlan la contribución de las células precursoras en el campo cardíaco secundario de los amniotas podrían ser similares a los que tienen lugar en anfibios.

En los anfibios, a medida que el tubo cardíaco se alarga y se producen dos curvas: una curva hacia la izquierda de la zona distal del TS y una hacia la derecha por la torsión de la zona proximal (Mohun et al., 2000). Otra característica destacada en los anfibios es la adquisición de una forma espiral en la porción proximal del TS que fue descrita mediante microscopía confocal Kolker et al. (2000). Los cultivos de explantes realizados de la zona de los primordios cardíacos demostraron que son necesarias diferentes señales para la formación y torsión del tubo cardíaco. Aunque los déficits en la formación de los explantes sean probablemente debido en parte a la falta de influencias físicas, tales como la hemodinámica y la cavidad del cuerpo, también es posible que los explantes carezcan de señales de las células de la cresta neural cardíaca (Hopwood et al., 1989; Farrell et al., 1999) y de las células epicárdicas (Dettman et al., 1998; Gittenberger-de Groot et al., 1998), que contribuyen a la estructura miocárdica del corazón en amniotas.

Objetivos del presente estudio

Actualmente no está claro si los dos componentes presentes en el TS cardíaco de los anfibios son homólogos a los descritos en el resto de los vertebrados gnatostomados. Prueba de ello es el número y disparidad de términos que se emplean en la bibliografía para designar dichos componentes. Moorman y Christoffels (2003) opinan que el bulbus cordis, que corresponde a todo el TS, equivale al cono arterioso de los peces. Salvo esta afirmación en la bibliografía no hay más referencias al respecto.

Además, se desconoce en detalle el proceso morfogénético por el cual se forma el polo arterioso del corazón en los anfibios.

A tenor de estos antecedentes, los objetivos concretos del presente trabajo fueron:

1. Determinar la estructura de los elementos anatómicos que conforman el TS del corazón adulto en los anuros.

2. Averiguar si los componentes del TS de los anfibios son equivalentes a los identificados en los elasmobranquios y los actinopterigios.

3. Estudiar las etapas de la morfogénesis de los componentes del TS en los anfibios, con el fin de averiguar si dichos componentes se forman de manera homóloga a como lo hacen el cono arterioso y el bulbo arterioso de los elasmobranquios y los actinopterigios.

Para cumplir estos objetivos se ha recurrido a la rana africana de uñas negras, *Xenopus laevis*, uno de los modelos más empleados en estudios del desarrollo cardíaco (Warkman y Krieg, 2007). El empleo de esta especie tiene la ventaja de que los estadios del desarrollo son muy cortos y las larvas son transparentes y de vida libre.

Material y Métodos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

MATERIAL

La presente tesis se ha centrado en el estudio de la morfología y el desarrollo del TS cardíaco de *Xenopus laevis*. Esta especie es un anfibio, perteneciente a la familia Pipidae, cuyo área de distribución abarca el centro y sur de África. Su fácil mantenimiento en el laboratorio, la posibilidad de estimulación hormonal de los animales para obtener puestas en cualquier período del año y la gran cantidad de larvas resultantes hacen que esta especie sea especialmente adecuada para abordar los objetivos de este trabajo.

El material estudiado ha consistido en un total de 18 individuos adultos de *X. laevis* adquiridos al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche, que fueron trasladados a la Universidad de Málaga para su manipulación. Otros 10 individuos fueron proporcionados por el servicio de mantenimiento de animales acuáticos del National Institut for Medical Research (Mill Hill-Londres). Todos los animales utilizados fueron tratados de acuerdo con la normativa vigente según la Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) y mantenidos en instalaciones adecuadas.

Para el estudio del desarrollo del TS se ha examinado un total de 1556 larvas y 42 individuos en fase de post-metamorfosis (Tabla 1), obtenidos en las puestas inducidas en el Laboratorio de Desarrollo Cardiovascular de la Universidad de Málaga proporcionados por el Dr. Tim Mohun (Mill Hill-Londres). Los estadios de desarrollo se han determinado según los criterios establecidos por Nieuwkoop y Faber (1994) para esta especie.

El presente estudio comporta la manipulación y el sacrificio de animales adultos y larvas. Ello se ha realizado en conformidad con la reglamentación sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Directiva 2010/63/eu; Real Decreto 53/2013).

Tabla 1. Número de adultos y larvas de *Xenopus laevis* examinados en función de la edad, técnica de estudio y orientación de los cortes histológicos realizados.

Estadio	MEB	Reconstrucción			Histología						Totales
		3D			Parafina			Criostato			
		S	T	F	S	T	F	S	T	F	
Adulto	9	-	4	-	3	6	4	-	1	1	28
Juvenil	5	1	4	-	8	12	12	-	-	-	42
Estadio 27-28	3	-	1	-	12	16	18	-	-	-	50
Estadio 29-30	5	-	1	-	10	19	18	-	-	-	53
Estadio 31	3	-	1	-	3	9	6	-	-	-	22
Estadio 32	4	-	3	1	-	9	6	-	-	-	23
Estadio 33	5	-	2	1	3	7	6	2	2	6	34
Estadio 34	3	-	2	-	9	12	9	3	3	9	50
Estadio 35	4	-	3	3	12	16	12	3	6	6	65
Estadio 36	9	2	4	3	9	12	14	3	6	6	68
Estadio 37	6	2	4	2	15	16	12	6	6	6	75
Estadio 38	7	2	5	3	10	15	18	3	9	6	78
Estadio 39	2	2	5	3	15	12	16	9	6	3	73
Estadio 40	2	2	5	2	13	16	16	9	9	3	77
Estadio 41	6	2	6	3	14	13	16	9	9	3	81
Estadio 42	4	3	5	4	18	16	18	8	9	6	91
Estadio 43	2	2	5	3	16	10	17	6	12	9	82
Estadio 44	3	3	6	3	17	12	13	6	12	9	84
Estadio 45	6	3	5	2	16	14	20	7	12	6	91
Estadio 46	8	2	4	3	16	13	18	6	9	6	85
Estadio 47	6	3	7	2	12	13	16	8	9	9	85
Estadio 48	5	2	6	3	15	15	18	3	12	9	88
Estadio 49	3	1	3	2	12	18	10	3	12	9	73
Estadio 50	3	1	3	1	8	12	16	3	6	9	62
Estadio 51	-	-	1	-	6	9	12	3	3	6	40
Estadio 52	-	-	-	-	-	3	3	-	1	2	9
Estadio 53	2	-	-	-	1	2	3	-	-	1	9
Estadio 54	-	-	-	-	1	1	2	-	-	1	5
Estadio 55	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	3



MÉTODOS

Obtención del material

Las formas larvarias se obtuvieron mediante dos procedimientos, que se explican a continuación.

- **Fecundación natural**

Para inducir la reproducción se utilizó la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG, del inglés: human chorionic gonadotropin). La cantidad de hCG necesaria para la inducción varía en función de la estación del año, la hora en la que desea la respuesta y la temperatura ambiente (Kay y Peng, 1991; Tinsley y Kobel, 1996). Para estandarizar el protocolo se fijó la hora de inyección a las 18:00 horas y la temperatura ambiente de la sala de trabajo a 20°C. Una vez inyectado, el animal se mantuvo en oscuridad hasta el día siguiente. Para realizar la inyección, se sujetó al animal con su cabeza dirigida hacia la muñeca del manipulador colocando dos dedos entre las patas traseras. La hormona se inyectó vía subcutánea en posterior a la línea lateral y dorsalmente hacia la cabeza. Para preparar la inducción de la reproducción, durante los dos días previos a la fecha prefijada para la puesta, se inyectó una dosis de 50 unidades de hGC a los machos y de 250 unidades a las hembras. El día previsto para la puesta, a los machos se les inyectó una dosis de 100 unidades y a las hembras 500 unidades de hCG. A continuación, se introdujo a los animales en un tanque que contenía agua con 20 cm de profundidad máxima, para favorecer el amplexo, y en oscuridad. Una vez constatada la reproducción, las ranas permanecieron en amplexos durante seis a ocho horas. Seguidamente, se recolectaron los huevos y se colocaron en diferentes placas de Petri en el tampón Marc's

Modified Ringer's al 1% (MMR 10x: CaCl₂ 20 mM, HEPES (pH 7,5) 50 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 1 M; pH 7,5).

Para retirar la cubierta gelatinosa o corion de los huevos fecundados, se preparó una solución de cisteína al 2% (Sigma) en MMR a pH 7,7. En dicha solución se colocaron los huevos, que se agitaron con un suave movimiento circular. Tras una incubación de dos a cuatro minutos en esta solución, se retiraron los huevos que presentaban una tonalidad grisácea-blancuzca. Para aquellos huevos que mantenían íntegra la cubierta, se repitió el lavado con una nueva solución de cisteína. Seguidamente, los huevos se lavaron cinco veces con tampón MMR diluido a la mitad y se descartaron aquéllos que estaban en mal estado.

- **Fertilización in vitro**

El 70-80% de los huevos fecundados se obtuvo mediante una técnica de fertilización in vitro. Para ello, la hembra fue estimulada, primero, durante tres días mediante una inyección de 75 unidades de hCG, y después, 20 horas antes del momento previsto para la puesta, con 800 unidades. Una vez concluida la preparación hormonal, se introdujo a la hembra, aislada, en un tanque que contenía agua a una temperatura media de 23°C y se procedió a la extracción de los óvulos. Se sujetó a la rana con ambas manos y se le presionó ligeramente el vientre con los dedos pulgares desde la zona media del cuerpo hacia su zona posterior, para provocar la salida de los óvulos al exterior. Éstos se recogieron con una pipeta Pasteur de vidrio, evitando así que quedasen adheridos a las paredes de la pipeta. Los óvulos se pasaron a una placa de Petri con tampón de estabilización a fin de evitar su lisis.

Para la obtención de los espermatozoides, el macho fue estimulado 20 horas antes de su sacrificio mediante una inyección de 50 unidades de hCG. El animal fue sacrificado por decapitación. A continuación, se



le practicó una incisión medioventral para abrir la cavidad peritoneal. Se extrajeron los testículos, se limpiaron cuidadosamente y se colocaron en un medio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher) con suero bovino al 10%, conservándose en una incubadora a 28°C. Los testículos se transfirieron a una placa de Petri que contenía los óvulos en tampón MMR 1% diluido a la mitad. En la misma placa los testículos se maceraron con ayuda de unas pinzas, se retiraron los restos de tejido testicular y a continuación se mezcló suavemente el espermatozoides obtenido con los óvulos. La fertilización se constató transcurridos 10-15 min en caso de mantener la placa a temperatura ambiente y a los 20-30 min si se incubó a 17°C.

Seguidamente, se retiró la cubierta gelatinosa de los huevos fecundados sumergiéndolos en la solución de cisteína al 2% referida en el apartado anterior. Se transfirieron a una placa de Petri los huevos necesarios para cubrir la cuarta parte de la superficie de dicha placa, en la que se extendieron para formar una sola capa. Se eliminó el exceso de tampón MMR y se rellenó la placa hasta la mitad con tampón MMR 0,5M fresco.

Las ranas adultas y en fase de post-metamorfosis se sacrificaron por inmersión en una solución de metanosulfato de triclaína (MSS-222, Sigma) al 0,4% en MMR durante 10 min (Torreilles et al., 2009). Para extraer el corazón, al animal se le practicó una incisión medioventral, que se prolongó en ambos extremos desde el centro hacia los laterales. Después se disecó la musculatura de la zona ventral para acceder a la cavidad pericárdica. A continuación, se seccionaron los grandes troncos arteriales, la vena hepática y los conductos de Cuvier. El corazón fue extraído y perfundido, inyectando a través el ápice del ventrículo tampón fosfato (PBS: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₄PO₄) al que se le añadió heparina al 1%. Los restos de sangre y de tampón heparinizado fueron retirados mediante cuatro lavados sucesivos con PBS. Para facilitar la relajación del tejido y detener el corazón en diástole se introdujo en una solución de cloruro de potasio saturado.

En el caso de las larvas, se efectuó en primer lugar una anestesia mediante inmersión en MS-222 0,015% en tampón MMR a pH 7,0. Ello permitió la determinación de los correspondientes estadios de desarrollo, según los criterios expuestos por Nieuwkoop y Faber (1994) como se ha indicado anteriormente. Después, las larvas se transfirieron a una solución de MS-222 al 0,08% en tampón MMR a pH 7,0 para su sacrificio.

Fijación de las muestras

En el presente estudio el material se fijó por inmersión en diferentes soluciones. Se empleó la solución fijadora MEMFA (MOPS/EGTA/sulfato de magnesio/Formaldehído 4%) (MEMFA: 2 ml de MEM 10x, 2 ml de Formaldehído 37%, 16 ml agua; MEM 10x: MPSP 1M, EGTA 20 mM, $MgSO_4$ 10 mM) cuando era necesario mantener un compromiso intermedio entre la conservación de la estructura original y una buena preservación de su antigenicidad. Éste fue el fijador utilizado para aquellas muestras que presentaban una gran cantidad de matriz extracelular hidratada como es el caso de las larvas de estadios tempranos del desarrollo. Cuando la calidad del tejido fijado era indispensable para su observación a microscopía óptica se utilizó paraformaldehído (PFA-Sigma) al 2% o al 4% en tampón fosfato salino (PBS). Las muestras procesadas para microscopía electrónica de barrido requieren un poder de fijación aún mayor que los casos antes mencionados, por lo cual se utilizó una solución de glutaraldehído (GTA-Sigma) al 2%.

Atendiendo a las características de los fijadores citados y en función del destino de la muestra, el material se fijó del modo siguiente:

- Microscopía electrónica de barrido: GTA al 2% en PBS durante 2 h para piezas de pequeño tamaño y en el caso de muestras de un tamaño mayor a 0,5 cm, se colocaron en PFA al 2% en PBS durante 2 h y GTA al 2% en PBS durante una hora.

- Histología convencional, histoquímica e inmunohistoquímica: MEMFA para formas larvarias durante 2 a 4 h, PFA al 4% en PBS para tejido adulto entre 4 y 12 h.
- Reconstrucciones 3D: PFA al 4% en PBS durante 24 h.
- Cortes semifinos: PFA al 4% en PBS durante 24 h.
- Hibridación *in situ*: MEMFA durante 1 h.

En los corazones extraídos de individuos adultos se realizó un pequeño corte en el pericardio para facilitar la fijación. Debido a su pequeño tamaño, las formas larvarias de estadios de desarrollo tempranos se fijaron enteros. En el caso de los renacuajos desde estadio 48 en adelante, se realizó una incisión en la zona ventral del cuerpo para favorecer la difusión de los fijadores en la cavidad corporal.

Técnicas histológicas e histoquímicas para microscopía óptica

Tras la fijación, las muestras destinadas al estudio por microscopía óptica se lavaron en agua destilada para eliminar los restos de fijador. La inclusión se efectuó según la siguiente secuencia: deshidratación mediante inmersión en sucesivos pasos de etanol de gradación creciente (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 96°, 2x100°) en agitación y dos pasos de alcohol n-butílico. Como norma general, todas las soluciones se usaron en una proporción “volumen de tejido/volumen de fijador” superior a 1:70. La duración de los pasos de la inclusión varió en función del estadio de desarrollo de las larvas y de las características del tejido adulto. Para embriones comprendidos entre los estadios 27 al 40 se realizaron pasos de 20 min; para los estadios 41 al 47, pasos de 25 min; para los estadios 47 a 60, pasos de 35 min. En el caso de ranas post-metamórficas y adultas los pasos fueron de 40 y 60 min de duración, respectivamente. Tras el alcohol n-butílico, se efectuaron tres

pasos en el medio de inclusión Histosec (Merck) en una estufa a 60°C, cuya duración fue del doble del tiempo aplicado en los pasos de deshidratación. A continuación, se confeccionaron los correspondientes bloques, orientando las piezas para realizar secciones sagitales, longitudinales y transversales.

Para realizar los cortes se utilizó un micrótopo de rotación convencional Leitz1512. El grosor de los cortes varió entre 5 y 10µm, según el tamaño y el destino de la muestra. Los cortes se pasaron a un baño de agua termostaticado a una temperatura de 38-40°C. Una vez estirados, se montaron en portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina (Sigma) (colocar los portaobjetos 5 min en una solución de HCl 37% al 10% diluido en etanol 100° y 10 min en una solución de Poli-L-lisina al 10%), si los cortes estaban destinados a técnicas histoquímicas, o bien en portaobjetos con un recubrimiento de aminoalquilsilano (Sigma) (colocar durante 12 h los portaobjetos en una solución de NaOH 1%, HCl 1% una hora, 15 min en agua destilada, 15 seg. en una solución de aminoalquilsilano en acetona) o en porta objetos comerciales SUPERFROST® PLUS (Thermo Scientific), si se destinaban a técnicas inmunohistoquímicas. Las secciones se colocaron de manera alterna en distintos portaobjetos para poder aplicar diferentes técnicas en cortes consecutivos. Tras mantenerlas durante 24 h en una estufa a 37°C, las secciones se guardaron a temperatura ambiente, excepto aquéllas destinadas a tinciones inmunohistoquímicas, que se mantuvieron a 4°C.

Como paso previo a la tinción o inmunotinción, se efectuó el desparafinado de los cortes en xileno (3x10 min) y la hidratación en un gradiente alcohólico decreciente (etanol absoluto, 2x5 min; etanol 96°, 2x5 min; etanol 70°, 5 min; etanol 50°, 5 min; agua destilada, 5 min). Una vez teñidas, las secciones se deshidrataron (etanol 96°, 1 min; etanol absoluto, 1 min), se aclararon en eucaliptol durante 15 min y se introdujeron en xileno durante 10 min. Por último, se montaron con cubreobjetos de cristal utilizando

el medio DPX (BDH). Para la observación y la adquisición de imágenes se utilizó el equipamiento siguiente: microscopio Leica DMLS provisto de una cámara digital DFC500; microscopio de muestra virtual Olympus VS120 equipado con el software VS-ASW (Olympus) y el software libre para la visualización de imágenes OlyVIA (Informer Technologies, Inc.).

En algunos casos, dada la sensibilidad de ciertos antígenos a las altas temperaturas, se optó por la criosección. Las muestras extraídas se fijaron en PFA al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 4 h o en MEMFA durante 2 h. A continuación, se lavaron en tres pasos con PBS y se criopreservaron para su congelación y posterior corte en el criostato. La criopreservación se llevó a cabo mediante sucesivos pasos en soluciones de sacarosa al 15% y al 30% en PBS, en las que se mantuvieron las muestras hasta su completo hundimiento, y seguidamente en una solución de sacarosa de 30% y el medio OCT (Sakura Tissue Tek) 1:1 durante 30 min. Por último, el tejido se embebió en OCT y se congeló sumergiendo la muestra en un recipiente con etanol 100° enfriado previamente en un contenedor con nieve carbónica. Mediante un criostato Leica CM 3050S se obtuvieron secciones de 6-10 μm de grosor, que se distribuyeron en portaobjetos previamente alisados. Las preparaciones se guardaron a -80°C hasta su procesado, momento en el que se lavaron en tres pasos de cinco min con tampón salino tris fosfato (TPBS: 24 g de Tris base, 88 g NaCl, 900 ml agua; pH 7,6).

Las muestras fijadas en PFA fueron conservadas de dos formas: en etanol 70° o en metanol absoluto. Para la conservación en etanol 70°, las muestras se sometieron a una cadena de deshidratación a base de etanol 30°, 50° y 70° en pasos de 20 min cada uno y se almacenaron a 4°C. La conservación en metanol se llevó a cabo sometiendo las muestras a una cadena de deshidratación en frío, primero en metanol 25° a 4°C y después en metanol 50°, 75° y 100° a una temperatura de -20°C con pasos de 20 min de duración. Una vez completada la deshidratación, estas muestras se almacenaron a -20°C.

Los bloques de parafina confeccionados se conservaron en una bolsa hermética a una temperatura de 4°C y los bloques criopreservados en OCT se colocaron en el congelador a una temperatura de -80°C. Las muestras fijadas con MEMFA y destinadas a protocolos de hibridación *in situ* se sumergieron en etanol absoluto durante 10 min a temperatura ambiente y seguidamente se pasaron a etanol absoluto a -20°C, para su conservación a esta misma temperatura.

Las tinciones utilizadas fueron las siguientes:

- **Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta**

Esta tinción permite reconocer la estructura general de los elementos celulares presentes en el corte, lo cual es de gran utilidad en el caso de tejidos poco diferenciados como es el caso de las formas larvarias tempranas. La hematoxilina tiñe intensamente los núcleos celulares de color azul oscuro y la eosina, de rosa el resto del tejido. Las preparaciones, desparafinadas e hidratadas, se tiñeron de la siguiente manera: hematoxilina de Delafield, 3 min para tejidos adultos y 2 min para larvas y renacuajos; diferenciación en agua corriente, 15 min; lavado en agua destilada, 1 min; eosina amarillenta al 1%, 1 min para tejidos adultos y 30 segundos para larvas y renacuajos; lavado en agua destilada.

- **Tricrómico de Mallory**

Es una técnica que proporciona una imagen general de los tejidos. Esta tinción colorea de azul el tejido conjuntivo, mientras que la musculatura adquiere una tonalidad rojiza. El protocolo de tinción fue el siguiente: sublimado corrosivo (solución saturada de bicloruro de mercurio), 30 min, tanto para adultos, larvas y renacuajos; paso rápido por agua destilada; fucsina ácida al 1 %, 75 seg para adultos y 50 seg para larvas y renacuajos;



paso rápido por agua destilada; ácido fosfomolibdico al 1%, 75 seg para adultos y 50 seg para larvas y renacuajos; líquido de Mallory durante 85 seg para adultos y 75 seg para larvas y renacuajos; paso rápido por agua destilada.

- **Tricómico de Masson-Goldner**

Al igual que la anterior, esta tinción permite la observación de la estructura general de la muestra y destaca ciertos componentes histológicos. De color pardo-marrón se tiñen las células de la matriz conjuntiva, de color verde el colágeno y de rojo la musculatura. Se siguió el siguiente protocolo, con diferentes tiempos para tejidos de ejemplares adultos y de larvas: hematoxilina de Groat, 3 min para adultos y 2 min para larvas; diferenciación en agua corriente, 10 min; lavado en agua destilada; fucsina Ponceau, 5 min para adultos y 3 min para larvas y renacuajos; lavados en agua acética al 1%; naranja G-fosfomolibdico, 7 min para adultos y 5 min para larvas y renacuajos; lavado en agua acética al 1%; verde luz, 10 min para adultos y 7 min para larvas y renacuajos; lavado en agua acética al 1%; lavado en agua destilada.

- **Resorcina-fucsina**

La tinción de resorcina-fucsina pone de manifiesto las fibras elásticas, que aparecen de color marrón oscuro-negro, mientras que las fibras conjuntivas se tiñen de color rosado y el resto de los tejidos adquiere tonalidades marrones claras. Las preparaciones se sumergieron en una solución de resorcina durante 30 min para tejidos adultos y 40 min en el caso de tejido larvario y renacuajos y, tras escurrir el exceso de colorante, fueron lavadas en etanol 96°. Para mejorar el contraste de las preparaciones se utilizó una solución

alcohólica saturada de ácido pícrico en la que se colocaron los portaobjetos durante unos segundos, lo que proporcionó al tejido una coloración de fondo amarillenta. Finalmente, se lavaron en etanol 96°.

- **Ácido peryódico de Schiff (PAS)**

El ácido peryódico de Schiff es un colorante incoloro que se torna rosa intenso con el contacto de grupos aldehídos, permitiendo la tinción de componentes celulares que contienen hidratos de carbono, como glucógeno, glucoproteínas y proteoglicanos. El protocolo fue el siguiente: ácido peryódico al 1%, 15 min en el caso de adultos y 10 min para tejido larvario; lavado en agua destilada; reactivo de Schiff, 20 min para tejido adulto y 15 min para tejidos larvarios; lavado en etanol 96°.

- **Picrosirio con microscopía de polarización**

La tinción con picrosirio (Junqueira et al., 1979) se utiliza para el reconocimiento específico de las fibras de colágeno. El rojo sirio es un colorante que se adhiere a las moléculas de colágeno, aumentando así su birrefringencia natural al efectuar la observación bajo microscopio de polarización. Esta técnica permite discriminar el colágeno tipo I, de color rojo-anaranjado, del colágeno tipo III, que aparece verde. El protocolo fue el siguiente: solución de picrosirio, 60 min para muestras de tejido adulto y 90 min para las larvas; lavados en ácido clorhídrico 0,01N; lavado en agua destilada. Los cortes fueron observados y fotografiados con un microscopio de polarización Laborlux 12 Pol equipado con una cámara Leica DFC500.

- **Azul alciano (Scott y Dorling, 1965)**

El azul alciano 8GX es un colorante que se adhiere específicamente a polisacáridos ácidos, tales como glucosaminoglucanos, mucopolisacáridos y sialomucinas. Este colorante varía su especificidad de unión a los glucosaminoglucanos en función de la concentración electrolítica presente en la disolución, cuya variación se consigue mediante la adición de cloruro de magnesio. La relación entre la concentración de cloruro de magnesio y la presencia de determinados glucosaminoglucanos en la matriz celular se indica en la siguiente tabla:

Tabla 2. Unión del azul alciano a los glucosaminoglucanos en función de la concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) presente en la disolución.

		[MgCl₂]				
		0,05M	0,3M	0,65M	0,9M	1M
No sulfatados	Ácido hialurónico	+				
Sulfatados	Condroitín sulfato	+	+			
	Dermatán sulfato	+	+	+		
	Heparán sulfato	+	+	+	+	
	Queratán sulfato	+	+	+	+	+

El protocolo fue el siguiente para cada una de las molaridades indicadas en la tabla anterior: agua acética al 3%, 10 min; lavado en agua destilada; solución de azul alciano, 60 min; lavado en agua destilada.

En algunos casos, la tinción de azul alciano se contrastó con el reactivo de Schiff (lavado en agua destilada; ácido periódico 1%, 30 min; lavado en agua destilada; reactivo de Schiff, 15 min), con el fin de poner de manifiesto a la vez los glucosaminoglucanos y los mucopolisacáridos ácidos presentes en el tejido. En otros casos se contrastaron los núcleos celulares con la hematoxilina de Delafield (hematoxilina de Delafield, 2 min; lavado en agua corriente, 3 min; lavado en agua destilada).

Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas en el presente trabajo fueron seleccionadas para identificar diferentes componentes celulares del TS cardiaco.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo monoclonal MF 20 (isotipo IgG2b) (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA), desarrollado en ratón, contra las cadenas pesadas de la miosina del músculo cardiaco y estriado. En este estudio se usó a una dilución 1:5 de la solución comercial.

Anticuerpo monoclonal A4.1025 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA), desarrollado en ratón, contra las cadenas de miosina. En este estudio se usó a una dilución entre 1:500 y 1:1000 de la solución comercial.

Anticuerpo monoclonal anti- α -actina de la musculatura lisa (isotipo IgG2a) (clon 1A4, Sigma), desarrollado en ratón. Este anticuerpo reconoce la isoforma α de la actina. Se empleó una dilución 1:1000 de la solución comercial.

Anticuerpo monoclonal anti- α -actina de la musculatura lisa (isotipo IgG2a) (clon 1A4, Sigma), Cy3 conjugado, desarrollado en ratón. Este anticuerpo reconoce la isoforma α de la actina. Se empleó una dilución 1:1000 de la solución comercial.

Anticuerpo monoclonal Vimentina (clon V9) (Sigma), Cy3 conjugado, desarrollado en ratón. Este anticuerpo reconoce los filamentos de vimentina presentes en los diferentes tejidos. Se empleó una dilución 1:500 de la solución comercial.

Anticuerpo monoclonal Cleaved Caspase-3 (Asp175) (D3E9) (Sigma) desarrollado en conejo. Este anticuerpo detecta los niveles endógenos del fragmento largo de la Caspasa-3, implicada en la ruta de señalización de la apoptosis. Se empleó una dilución 1:200 de la solución comercial.



- **Método de la inmunoperoxidasa**

Para la realización de esta técnica, utilizando un solo anticuerpo primario y peroxidasa como cromógeno, se usó el siguiente protocolo. Una vez desparafinados e hidratados, los cortes se lavaron en tampón tris-fosfato salino (TPBS: 5g/l Tris-Trisma® Base, 7g/l NaCl, 0,48 g/l Na₂HPO₄, 1,18 g/l KHPO₄; pH 7,8) (3x5 min). A continuación, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante la incubación de las secciones en peróxido de hidrógeno al 3% en TPBS durante 30 min. Tras lavar en TPBS (3x5 min), los sitios de unión no específicos se bloquearon durante 30 min con una solución de suero de oveja al 16% (inactivado en un baño termostático a 56°C) y albúmina de suero bovino al 1% en TPBS (SB). A continuación, se procedió al bloqueo de la avidina y la biotina endógenas con el kit de bloqueo de la avidina-biotina endógena (Vector). Para ello se colocaron 4 gotas de la solución de avidina en 600 µl de TPBS y 5 gotas de biotina en 600 µl de TPBS y se incubaron las muestras durante 15 min. Entre la incubación con la solución de avidina y con la solución de biotina se lavó con TPBS (3x5 min). Las secciones se incubaron durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en una solución de suero de oveja al 16%, albúmina de suero bovino al 1% y Triton X-100 al 0,5% en TPBS (SBT), a excepción de las muestras que iban a cumplir la función de control negativo que se incubaron únicamente en SBT. A continuación, los portaobjetos se lavaron en TPBS (3x5 min) y se incubaron entre 30-60 min a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con biotina, específico para las IgG del primer anticuerpo, a una concentración que osciló entre 1:500 y 1:1000 en función de la abundancia del antígeno en el tejido.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, los portaobjetos se lavaron en TPBS (3x5 min) y se incubaron durante 60 min, a temperatura ambiente, en el complejo extravidina peroxidasa (Sigma) a una dilución entre 1:150 y 1:500 en TPBS. Por último, tras una serie de lavados en agitación

con TPBS (3x5 min), la actividad peroxidasa se reveló con una solución de 3'-3'-diaminobencidina (DAB Fast 3.3, Sigma) y urea en agua destilada. Al revelar con DAB, la peroxidasa del complejo avidina-biotina generó un precipitado marrón en caso de inmunoreactividad. Dicha reacción se detuvo tras lavar las muestras en agua corriente.

Para obtener preparaciones permanentes, los cortes se deshidrataron en etanol 96° y en etanol absoluto durante 1 min en cada paso, se aclararon en eucaliptol durante 10 min y, finalmente, en xileno durante 10 min para su posterior montaje con DPX.

Las secciones se observaron y fotografiaron bajo un microscopio Leica DMLS provisto de una cámara Leica DF500.

- **Método de la inmunofluorescencia**

El protocolo para la inmunofluorescencia se llevó a cabo sobre secciones en parafina o criopreservadas. Las secciones en parafina fueron desparafinadas en una secuencia corta (xileno, 2x7 min; etanol absoluto, 2x5 min; etanol 96°, 5 min; etanol 70°, 5 min), para preservar la antigenicidad, e hidratadas con PBS-Tween20 1% (3x5 min). Las secciones de criostato se dejaron a temperatura ambiente hasta que estuvieron completamente secas y posteriormente se lavaron en PBS-Tween20 (3x5 min).

Con el fin de desenmascarar los epítomos, una vez hidratadas las preparaciones, éstas se sumergieron durante 10 min en una cubeta de cristal que contenía tampón citrato a pH 6,0, mantenida en un baño termostático precalentado a 95°C. A continuación, las preparaciones se dejaron enfriar en el mismo tampón hasta alcanzar la temperatura ambiente y se efectuaron dos lavados en PBS-Tween20 de 5 min cada uno.



Para reducir la autofluorescencia natural del tejido y facilitar la interpretación de los resultados, se colocaron las muestras en una solución de sulfato cúprico durante 5 min, tras lo cual se lavó con PBS-Tween20 (3x5 min). Seguidamente, se efectuó el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos con SB suministrado en gota y en el interior de una cámara húmeda, durante 30 min para cortes de criostato y durante 60 min para secciones de parafina. Tras ello, los cortes se incubaron con el primer anticuerpo diluido en SBT, durante toda la noche a 4°C. A continuación, los portaobjetos se lavaron en PBS-Tween20 (2x5 min). En este punto del protocolo, en aquellos casos en los que se utilizó un primer anticuerpo conjugado con un fluorocromo, por lo tanto de marcaje directo, se contratiñó el ADN nuclear con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen) a una concentración de 1:2000 durante 10 min. Se efectuaron lavados en PBS-Tween20 (3x5 min). Las preparaciones se montaron con glicerol-PBS (1:1), o con el medio de montaje Vetashield® (Vector), o con el medio Fluorecence mounting medium (Dako) para proteger la fluorescencia y mantener la señal. Por último, se almacenaron en una cámara seca a 4°C y en oscuridad.

Cuando el anticuerpo primario no era conjugado, las preparaciones se incubaron con anticuerpos secundarios asociados a un fluorocromo. Los anticuerpos secundarios (AlexaFluor; Molecular Probes, Eugene) empleados difieren en función del anticuerpo primario: AlexaFluor 488 IgG2a con anti- α -actina, AlexaFluor 488 IgG1 con A4.1025, y AlexaFluor 568 IgG1 con A4.1025. Todos los anticuerpos secundarios se diluyeron a 1:500 en el tampón SBT y se suministraron en gota durante dos horas en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad.

Para realizar el marcaje de los tejidos con un segundo anticuerpo, fue necesario realizar un nuevo paso de bloqueo de uniones inespecíficas con la solución de SB durante 60 min. Seguidamente se incubaron las muestras con el anticuerpo primario durante dos horas o durante toda la noche. Transcurrida la primera incubación se colocó el anticuerpo secundario junto con DAPI. Finalmente los portas fueron montados con Vetashield® (Vector), o con el medio Fluorecence mounting medium (Dako). Los cortes se observaron en un microscopio confocal Leica SP5 II.

- **Método de inmunofluorescencia *in toto***

Tras fijar las larvas en MEMFA durante una hora, se realizaron lavados con TBS-Tween20 (3x5 min). A continuación, se realizó una pequeña incisión en la pared abdominal de las larvas para permitir la difusión de los anticuerpos. Seguidamente, se lavó con la solución TBT-BSA (3x30 min). Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con la solución TBT-BSA-suero fetal bovino durante 30 min. Tras el bloqueo, se preparó el primer anticuerpo en una solución de TBT, BSA, suero al 10%, saponina al 0,2% y el anticuerpo primario seleccionado. Se incubó toda la noche a 4°C en agitación.

El segundo día se retiró la solución con el anticuerpo primario y se lavó con TBT-BSA (3x30 min) y con TTW-BSA (3x30 min). A continuación, se bloqueó con TBT-BSA-suero fetal bovino durante 60 min. En el caso de una inmunofluorescencia doble y con el segundo anticuerpo no conjugado, se añadió 0,05 mg de saponina. Se incubaron las muestras en el anticuerpo secundario diluido 1:500 a 1:1000 en la solución TTW-BSA-suero al 10% durante toda la noche a 4°C y en agitación.

El tercer día se lavaron las muestras en TTW sin albúmina (4x30 min). Seguidamente, se procedió a su disección y criopreservación para su posterior corte en el criostato.



Morfología de superficie mediante microscopía electrónica de barrido

Las muestras fueron fijadas en una solución volumen/tejido, 1:70, de PFA 1% y GTA 1% en PBS durante 60 min. Después se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio al 2% durante dos horas en oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua destilada y deshidratadas mediante una cadena de alcohol de gradación creciente hasta etanol absoluto con la siguiente secuencia de pasos: 30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 96° y etanol absoluto, durante 30 min en cada paso.

En algunos casos, se procedió a incluir las muestras en parafina y cortarlas mediante el microtomo hasta alcanzar el nivel deseado para la observación de la estructura interna. Para recuperar la muestra del bloque de parafina, se efectuaron tres pasos de 30 min en xileno precalentado a 60°C hasta retirar todos los restos de parafina. Seguidamente, las muestras se introdujeron en etanol absoluto.

Para secar las muestras, se utilizó el método del punto crítico, que consiste en la sustitución del etanol absoluto por dióxido de carbono líquido, de forma que la evaporación rápida de dicho dióxido de carbono en condiciones determinadas permite la desecación de la pieza manteniendo las características morfológicas del tejido. Cada pieza se fijó, con la orientación deseada, sobre una lámina engomada de cobre colocada en un tambor de latón. A continuación, se metalizaron las muestras, recubriéndolas con una fina capa de oro-paladio, por medio de una unidad de pulverización “*sputtering*” iónica JFC 1100 (Jeol). Finalmente, las muestras fueron observadas y fotografiadas mediante un microscopio de barrido Jeol JSM-840 (Jeol) operado a 15 kv.

Cortes semifinos

Las muestras fueron fijadas por inmersión, en una proporción volumen/tejido, 1:70, en una mezcla de PFA 1% y GTA 1% en tampón PB 0,1M pH 7,3-7,4 durante 60 min a 4°C. En el paso siguiente se realizaron tres lavados con tampón PBS durante 30 min a 4°C. Después, se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% en PBS durante dos horas a una temperatura de 4°C. Transcurrido este tiempo las muestras se lavaron en tampón PB durante 15 min.

Para realizar la inclusión de la muestras en resina, fue necesario someterlas a un proceso de deshidratación y contrastado, lo que implica utilizar agentes químicos que no pueden ser atravesados por el haz de electrones emitidos por el microscopio. Este proceso consistió en aplicar un gradiente creciente de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100%) durante 15 min en cada paso. El medio utilizado fue Araldita (10,8 g de Araldita (Electron Microscopy Sciences), 9,2 g de DDSA (Dodecenybernstein-saureanhydrid-MERK), 0,4 g de DMP-30 (2,4,6-tris dimethylaminomethyl-phenol-MERK)).

Para favorecer la penetración de la resina en el tejido y el desplazamiento de la acetona, se colocaron las muestras en una solución 1:1 de acetona-resina durante 60 min. Seguidamente, la muestra se transfirió a resina pura durante una hora a temperatura ambiente. Por último, se confeccionaron los bloques empleando moldes de silicona, que se mantuvieron durante toda la noche en una estufa a 60°C hasta la completa polimerización de la resina.

Los bloques se cortaron con un ultramicrotomo Leica EM FC7, equipado con cuchillas de vidrio. Los cortes, con un grosor aproximado de 0,9 a 1 μ m, se montaron en portaobjetos y se dejaron secar en una estufa a 90°C durante 30 min. Las secciones fueron teñidas con azul de toluidina al 1% (1 g azul de toluidina, 1 g tetraborato de sodio, 100 ml agua) y se observaron y fotografiaron bajo un microscopio Leica DMLS provisto de una cámara Leica DF500.

Hibridación *in situ*

El procesamiento de las muestra se realizó según el protocolo suministrado por el Dr. Stuart Smith (Laboratorio del Dr. Tim Mohun, National Institute for Medical Research, Londres)(readaptación de Sparrow et al., 2000) y se usaron las sondas sintetizadas por el Dr. Smith.

Se utilizaron las siguientes sondas de hibridación:

- Factor de transcripción Nk2 del homeodominio 5 (*Nkx-2.5*)
- Factor de transcripción del homeodominio LIM (*Islet-1*)
- Factor de transcripción twist1 de la familia de bHLH (Hélice-Lazo-Hélice) (*twist1*)
- Cadena ligera de la miosina 2 de *Xenopus laevis* (*XMLC-2*)

El protocolo consiste en una serie de pasos que se realizan en el transcurso de cinco días consecutivos. Durante todo el protocolo se usaron materiales RNAsa-free (eppendorf, falcon, puntas de pipeta). Se esterilizaron con etanol 70° la zona de trabajo y con un ciclo de autoclave todos los tampones no estériles y el material de cristal.

En el primer día se rehidrataron las muestras que fueron previamente fijadas en MENFA durante dos horas y conservadas en metanol absoluto a -20°C, con la siguiente secuencia: 75% y 50% en agua destilada (1x5 min), 25% en TBS-Tween20 (1x5 min)(TBS: NaCl 200 mM, Tris 50 mM, pH7,4, Tween20 0,5% - sistema de filtrado Millipore 0,2 mm) (TTW: TBS-Tween20). Para favorecer la permeabilidad de las membranas y permitir el contacto de la sonda con su diana, se colocaron las muestras en una solución de proteinasa K (1,6 ml del Stock de proteinasa K (150 mg/ml en 20 ml TTW) durante 15 min en agitación. Para detener el proceso de degradación enzimática se

realizó un lavado de 5 min en Trietanolamina 0,1M pH 7-8. Seguidamente se colocaron 2 ml de Trietanolamina con 5 ml de ácido acético anhidro en eppendorff en agitación (2x5 min). Se lavó en TTW (1x5 min). Por la acción de la proteinasa K el tejido perdió consistencia quedó muy frágil por lo cual en el paso siguiente se realizó una post-fijación en MEMFA durante 20 min. Lavado en TTW (3x5 min). Se precalentó el horno de hibridación a 60°C para conseguir la temperatura óptima del siguiente paso y se colocó en su interior una alícuota de tampón de prehibridación de ARN (50% formamide, SSC 5x, 1 mg/ml Torula RNA (Sigma R-3629 Type IX DEAE salt), Denhart's 1x (Denhardt's 50x: 1 g Ficoll400, 1 g Polyvinylpyrrolidone, 1 g BSA, 100 ml agua MilliQ), Tween20 0,1%, EDTA 5 mM pH 8). Seguidamente, se colocaron las muestras en 1 ml de TTW al cual se añadió 250 µl de tampón RNA precalentado y se incubaron durante 15 min en rotación a temperatura ambiente. Tras ello se retiró el tampón y se coloca 1 ml de tampón de hibridación nuevo a 60°C junto con las muestras durante 10 min en el horno de hibridación. A continuación, se retiró el tampón y se colocaron 500 µl del mismo tampón junto con las muestras, permanecieron en el horno de hibridación durante toda la noche (un mínimo de 6 horas). En este paso se utilizó un rotador ligeramente inclinado para tener la certeza que el tampón siempre estuvo en contacto con la muestra.

En el segundo día se precalentó el tampón de prehibridación a 60°C. En cada eppendorff se colocó 0,6 ml de tampón con 1 mg/ml de la sonda seleccionada (Nkx-2.5, Islet-1, Twist-1, XMLC-2) durante toda la noche en el horno de hibridación a 60°C en un rotador inclinado.

En el tercer día se lavó el exceso de sonda durante 20 min en SSC 2x (SSC 20x: 175,3 g de NaCl; 88,2 g de sodio citrato; agua destilada) en el horno de hibridación con rotación a 37°C. Posteriormente se colocaron las muestras en una solución de SSC 0,2x con una mezcla de RNasas (2 µl de

RNasa T1 1000 u/ml (Ambion); 1 µl de RNasa A 1 mg/ml (Roche)) durante 30 min en el horno de hibridación con rotación a 37°C. En el siguiente paso se colocaron las muestras en SSC 0,2x precalentado a 60°C (2x60 min) en el horno de hibridación con rotación a 60°C. Tras la incubación se lavaron las muestras en TTW a temperatura ambiente (1x10 min) y en TBT (TBS: NaCl 5M, Tris 1M pH 7,4, Tween20 0,1%; Albúmina 0,05 g; Tritón X-100) durante 15 min. Seguidamente se colocaron en una solución de TBT con suero fetal bovino al 20% durante 20 min a temperatura ambiente. A la solución anterior se le añadió fosfatasa alcalina conjugada con antidioxigenina a una disolución 1:2000 y se incubó durante toda la noche a 4°C en rotación inclinada. Durante el cuarto día se realizaron varios lavados en TBT (5x60 min) a temperatura ambiente, para retirar los restos de anticuerpo y se expuso la muestra a la reacción de coloración con el tampón de fosfatasa alcalina (2x15 min)(Tris 100mM, pH9,5; MgCl₂ 50mM; NaCl 100mM; Tween20 0,1%; Levamisol 2mM (Sigma)) y NBT/BCIP (2x60 min). Para detener la reacción se lavó con TTW (1x5 min) y seguidamente se deshidrataron las muestras con la siguiente secuencia: etanol-TTW 1:3, etanol-TTW 1:1, etanol-TTW 3:1 y etanol absoluto a -20°C (1x5 min). Se conservaron a -20°C. Estos pasos son fundamentales para la fijación del color y eliminación de uniones inespecíficas.

En el quinto día se rehidrataron las muestras con la secuencia: etanol-TTW 3:1, etanol-TTW 1:1, etanol-TTW 1:3 (1x5 min en cada paso) y TTW (2x5 min). Se post-fijaron en MEMFA durante 60 min y se lavaron en TTW (2x5 min). Para blanquear los tejidos y células pigmentarias presentes en el embrión se realizó un paso de 1 a 4 horas en peróxido de hidrógeno. Seguidamente se deshidrataron las muestras con la siguiente secuencia: 25% etanol-TTW, 50%, 75% y etanol absoluto a -20°C (1x5 min). Finalmente, se conservaron a -20°C.

Los embriones completos se fotografiaron con un estereomicroscopio Leica MZ1F provisto de una cámara Leica DFC500.

Después de la hibridación, las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina para obtener secciones de 5 μ m. Los cortes fueron desparafinados en tres pasos de xileno e hidratados en un gradiente de alcoholes decreciente (etanol absoluto, 96°, 70° y 50° x 5 min), hasta llegar a agua destilada. Posteriormente, se colocaron en una solución al 1% de rojo neutro durante 1 min (1 g de rojo neutro en 100 ml de agua destilada). El excedente de colorante se retiró realizando un lavado en agua corriente. Por último, las muestras se deshidrataron la muestra y se montaron con Eukitt (Sigma).

Las secciones se observaron y fotografiaron bajo un microscopio Leica DMLS provisto de una cámara Leica DF500.

Reconstrucciones tridimensionales

Las muestras se fijaron en PFA al 4% durante 24 horas. Posteriormente se realizaron lavados en agua MilliQ (8x40 min) para retirar totalmente el exceso de fijador. Las muestras se deshidrataron en una cadena de gradación creciente de metanol (50°, 70°, 80°, 85°, 90°, 95° y 100°) a temperatura ambiente y en agitación. En el caso de larvas de estadios anteriores al estadio 49 se realizaron pasos de 30 a 40 min, desde el estadio 50 hasta la post-metamorfosis los tiempos oscilaron entre 40 y 60 min y, finalmente, para los corazones adultos los pasos fueron de 60 min (Mohun y Weninger, 2012a).

Una vez deshidratadas, las muestras se infiltraron en la resina JB-4 Embedding Kit® (100 ml de JB4 solución A (Polysciences, Inc), 1,25 g del catalizador Benzoyl peroxide plasticized, 0,275 g de Eosina solución B (Sigma-Aldrich), 0,055g Naranja de acrilamida (Sigma-Aldrich)). Con la resina fresca

se preparó una solución de la resina JB4 y metanol 50°, en la que se colocaron las muestras, durante 2 horas en el caso de las larvas y entre 4 y 6 horas en muestras que superan los 0,5 cm, a 4°C. Seguidamente, las muestras se sumergieron en resina pura, donde se mantuvieron durante 12 horas a 4°C. Finalmente, se preparó la solución de encastración añadiendo a la solución de infiltración 1 ml del agente acelerante JB4-solution B. En cuanto la viscosidad de la solución preparada aumentó, se rellenaron moldes de polietileno (Polysciences, Inc.) de 6x8x5 mm o de 13x19x5 mm para las pequeñas muestras, o de Teflón a medida para muestras más grandes). En ellos se colocaron cuidadosamente las muestras con la orientación deseada. Transcurridos 6 min, se verificó la orientación de las muestras y se colocó el soporte para cada bloque ejerciendo una ligera presión. Se añadieron algunas gotas extras de resina sobre cada soporte y se cubrió cada bloque con dos gotas de aceite mineral o parafina líquida. Se dejó polimerizar la resina durante 12-24 horas a 4°C o 10-12 horas a temperatura ambiente. Se extrajeron los bloques de los moldes y se colocaron en una bandeja de aluminio en posición invertida durante 24 horas en un horno seco a 100°C. Finalmente, se atemperaron a temperatura ambiente durante 24 horas y se guardaron a 4°C hasta su uso (Mohun y Weninger, 2012a).

Los bloques se cortaron con un microtomo de corte horizontal Leica SM2500. Las imágenes se adquirieron con una cámara de alta resolución Leica CW4000 y se procesaron el software Image-PRO plus (Media Cybernetics). Al finalizar los cortes del bloque se capturó una imagen de un portaobjetos milimetrado, lo que permitió asignar escalas exactas a las muestras.

Como resultado de la captura de imágenes se obtuvo una compilación de fotografías que se trataron con la siguiente sucesión de programas: GrahicConverter, para obtener imágenes negativas de los originales; Adobe Photoshop, para limpiar las imágenes y aumentar su contraste y brillo; Image

J, para identificar correctamente el tamaño de cada uno de los píxeles de la imagen y adjudicar una dimensión real a la reconstrucción; de nuevo Adobe Photoshop, para reducir el tamaño de las imágenes recortando los espacios libres y retirando aquellas que no presentaban una orientación correcta o tenían algún defecto de corte. Finalmente, se cargaron todas las imágenes en el programa OsiriX (Rosset et al., 2004) y se introdujeron los parámetros de dimensionalidad, generándose con ello la reconstrucción 3D (Rosenthal et al., 2004; Mohun y Weninger, 2012 b y c).

Resultados



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Anatomía e histología del corazón adulto de *Xenopus laevis*

En este apartado se detallará la anatomía y estructura del corazón de *X. laevis*, centrando la atención en la descripción minuciosa del tracto de salida (TS) cardíaco.

En esta especie el corazón está alojado en el interior de un pericardio en forma de saco, situado en posición posterior con respecto a la laringe y flanqueado por el hígado y los pulmones. La pared del pericardio presenta numerosos iridióforos (Fig. 4a). La cavidad pericárdica está rellena de una serosidad.

El corazón presenta una orientación ligeramente ventrodorsal, según el eje que discurre desde el ventrículo hasta el límite anterior de la cavidad pericárdica localizado en la base de los troncos arteriales.

El corazón de *X. laevis* consta de un seno venoso, dos aurículas, izquierda y derecha, un ventrículo y un TS (Fig. 4b). Al retirar el pericardio, en la superficie del corazón se observan numerosos melanóforos que contienen pigmentos color marrón-parduzco (Fig. 4c). Estas células son especialmente abundantes en el TS, se disponen de forma dispersa en el ventrículo y están restringidas a las zonas de las paredes de los atrios cercanas al TS (Figs. 4a-c). No se han observado melanóforos en el seno venoso.

El TS parte del lado dextro-ventral del ventrículo, está inclinado hacia el lado izquierdo del corazón y se continúa con los grandes troncos arteriales situados fuera del pericardio. Macroscópicamente, en el TS se distinguen dos porciones: un componente proximal y otro distal (Figs. 4b, c).

Apenas emerge del ventrículo, el TS experimenta una torsión hacia la izquierda y en sentido dorsal. Más adelante, en el límite entre los

componentes proximal y distal, el TS se inclina de nuevo, en este caso ventralmente (Fig. 4c).

El componente proximal es el más largo y presenta un aspecto musculoso, de color semejante al del ventrículo en el material fresco (Fig. 4c) y con numerosos melanóforos dispuestos de forma dispersa. Internamente, el componente proximal del TS presenta en ambos extremos sendas hileras de válvulas que difieren en cuanto a su forma y tamaño. La primera hilera se localiza en la base del componente proximal y la segunda hilera entre dicho componente y el distal (Fig. 5a).

Figura 4. *Xenopus laevis* adulto.

4a: Vista ventral del corazón adulto de *X. laevis* envuelto en el pericardio (flecha blanca). El pericardio es una membrana que presenta numerosos iridioróforos, que se distinguen especialmente por su brillo plateado. Se aprecia la presencia de melanóforos (pequeños puntos negros) distribuidos por la superficie de las diversas cámaras cardíacas. En esta imagen fueron disecados los pulmones para una mejor visualización de las cámaras cardíacas componentes del corazón. AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; H, hígado; TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 500 μm .

4b: Vista ventral del corazón, una vez disecado el pericardio. Se distingue el atrio izquierdo (AI) y atrio derecho (AD), ventrículo (V), el tracto de salida cardíaco. El tracto de salida está formado por el componente proximal y el componente distal, izquierdo y derecho, al que se continúan los troncos arteriales. Las cabezas de flecha verdes indican el límite anterior del pericardio. No se muestra el seno venoso. CDd, componente distal derecho; CDi, componente distal izquierdo; CP, componente proximal; H, hígado. Barra 500 μm .

4c: Vista ventral del tracto de salida cardíaco una vez disecadas las aurículas. Las cabezas de flechas blancas indican el límite cefálico del componente proximal (CP), el cual se continúa con la porción indivisa del componente distal (CD). Conforme continúa su recorrido en dirección cefálica el componente distal se divide en el componente distal derecho (CDd) y el componente distal izquierdo (CDi). Las cabezas de flecha verdes marcan el límite anterior del pericardio. AC, tronco arterial carotídeo; AP, tronco arterial pulmocutáneo; AS, tronco arterial sistémico; E, epicardio; V, ventrículo. Barra 500 μm .

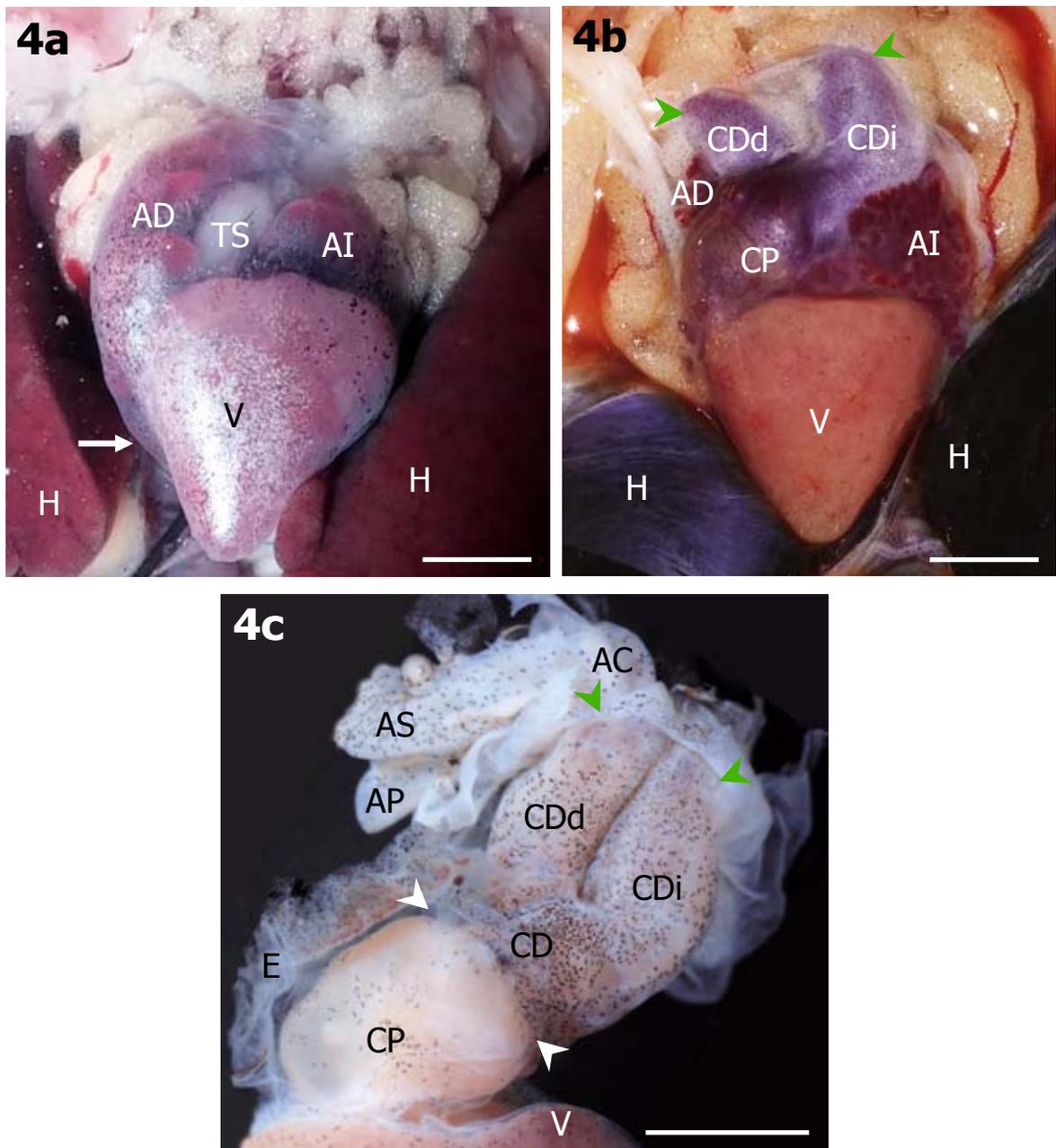


Figura 5.

5a: Vista del tracto de salida abierto por su zona ventral. Micrografía electrónica de barrido. En el componente proximal (CP) del tracto de salida se distinguen dos hileras de válvulas. Los asteriscos señalan la hilera de válvulas proximales. Las estrellas marcan las válvulas distales. Entre las hileras de válvulas discurre la cresta espiral (CE) que separa el componente en cavum aorticum (CAo) y cavum pulmo-cutáneum (CPc). El componente distal (CD) presenta adherido a su pared ventral un bloque endotelial (Be). Las cabezas de flecha señalan el límite cefálico del componente proximal. La flecha indica la salida desde el componente distal de la arteria coronaria. SE, subepicardio. Barra 500 μm .

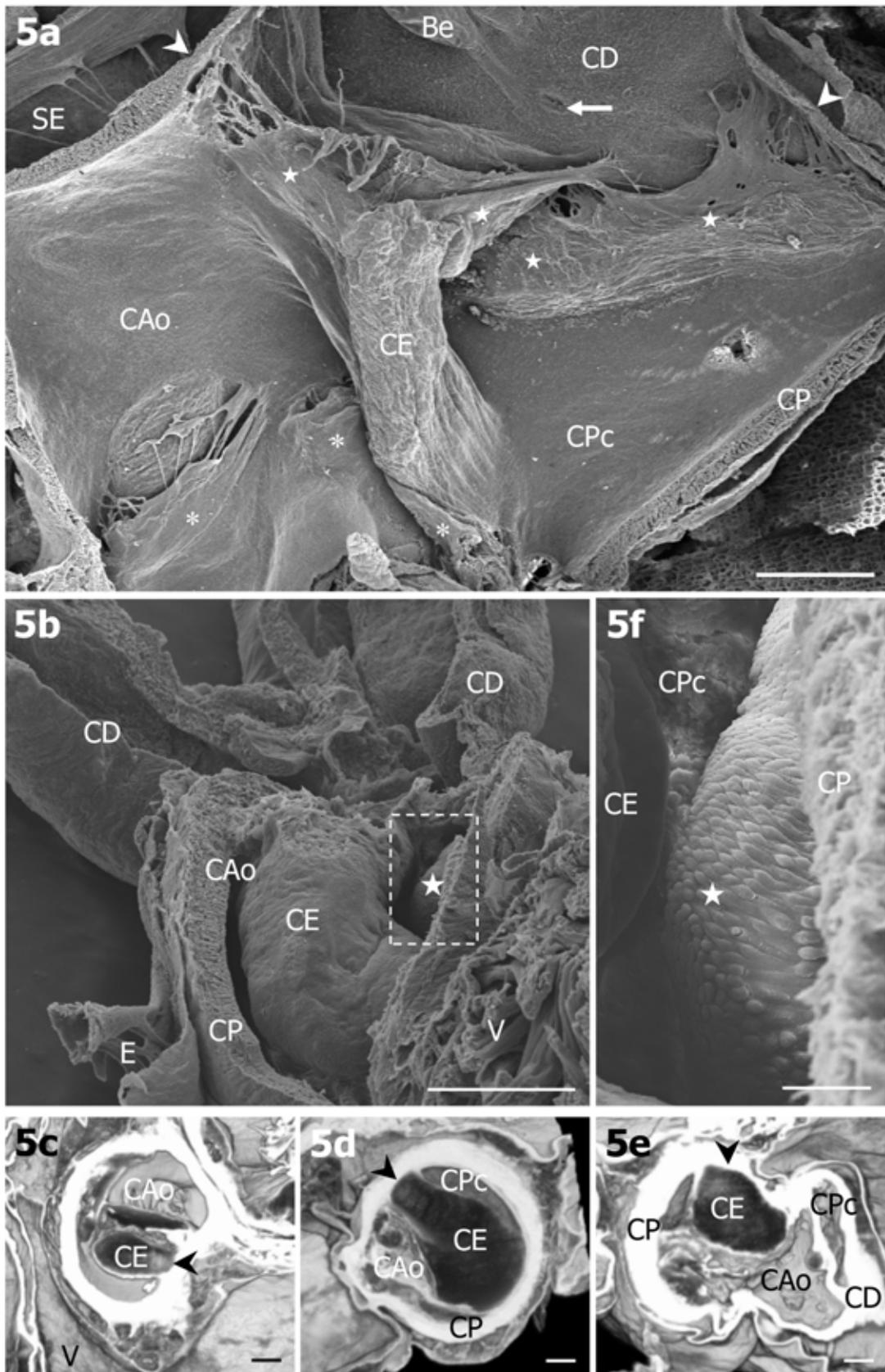
5b: Vista del tracto de salida diseccionado longitudinalmente. Micrografía electrónica de barrido. Se ha disecado parte de la pared ventro-lateral del tracto de salida para dejar expuesta la cresta espiral (CE). La zona que aparece en el recuadro se muestra ampliada en la figura 5f. La estrella marca la cresta de menor tamaño. CAo, cavum aorticum; CD, componente distal; CP, componente proximal; E, epicardio; V, ventrículo. Barra 500 μm .

5c: Reconstrucción tridimensional de la porción caudal del componente proximal del tracto de salida cardíaco con microscopía episcópica de alta definición. Se observa la inserción de la cresta espiral (CE) en el lado izquierdo (cabeza de flecha). CAo, cavum aorticum; V, ventrículo. Barra 200 μm .

5d: Reconstrucción tridimensional de la zona media del componente proximal del tracto de salida. Microscopía episcópica de alta definición. El punto de inserción de la cresta (cabeza de flecha) se encuentra desplazado, en sentido horario, unos 200° con respecto al punto de inserción inicial indicado en la figura 5c. CAo, cavum aorticum; CE, cresta espiral; CP, componente proximal; CPc, cavum pulmonar. Barra 200 μm .

5e: Reconstrucción tridimensional de la porción cefálica del componente proximal (CP) del tracto de salida. Microscopía episcópica de alta definición. La cabeza de flecha señala la inserción cefálica de la cresta espiral (CE), la cual ocurre a unos 270° con respecto del punto inicial de inserción en la porción caudal (véase 5c). CAo, cavum aorticum; CD, componente distal; CPc, cavum pulmonar. Barra 200 μm .

5f: Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de la figura 5b. Micrografía electrónica de barrido. La cresta de menor tamaño indicada con una estrella, se inserta en el lado izquierdo de la pared del componente proximal del tracto de salida. CE, cresta espiral; CP, componente proximal; CPc, cavum pulmonar. Barra 50 μm .



Entre las hileras de válvulas se extiende la denominada cresta espiral (Figs. 5a, b). La porción basal de la cresta está insertada en el lado izquierdo del TS (Fig. 5c). La cresta recorre internamente la pared del TS describiendo un giro de 270° en el sentido de las agujas del reloj (Figs. 5c-e). En el límite entre los componentes proximal y distal, la inserción de la cresta se dispone dorsalmente (Fig. 5e). Además, en algunos individuos, el componente proximal presenta otra cresta de menor tamaño que ocupa una posición sinistro-ventral (Fig. 5f).

El componente distal tiene un color blanquecino en el tejido fresco. En su superficie se aprecian abundantes melanóforos, que aparecen en cantidad superior a la observada en el resto del corazón. Visto externamente, el componente distal se escinde en dos grandes troncos, izquierdo y derecho (Figs. 4c, 6a). La reconstrucción 3D del TS realizada mediante la captura secuencial de imágenes con microscopía episcópica de alta definición ha contribuido a comprender mejor la compleja tabicación interna y progresiva que el componente distal muestra en sentido caudo-cefálico (Fig. 6a). El denominado septo principal divide el componente distal en una porción que se continúa con el cavum aorticum y otra porción en continuidad con el cavum pulmo-cutaneum (Fig. 6b). Otro septo, denominado vertical, que es perpendicular al septo principal, divide el componente distal por un plano medio en tractos derechos e izquierdos. El cavum pulmo-cutaneum se escinde en sendos conductos pulmo-cutáneos derecho e izquierdo (Fig. 6c), mientras que del cavum aorticum se originan los troncos sistémico-carotídeos izquierdo y derecho (Figs. 6d-f). Por tanto, en realidad los troncos izquierdo y derecho en que se escinde macroscópicamente el componente distal, contienen internamente tres vasos que son un tronco pulmo-cutáneo, dorsal, un tronco carotídeo, ventral y un tronco sistémico, de posición intermedia (Figs. 6f, g). Cabe señalar que en su extremo caudal y ventral, el septo vertical presenta un bloque de tejido de aspecto semejante a la cresta

espiral. Dicho bloque, denominado en la bibliografía bloque endotelial, se proyecta hacia el cavum aorticum (Figs. 6c-e).

Componente proximal del tracto de salida

La pared del componente proximal está formada por tres capas. La capa epicárdica es la más externa y consta de un epicardio por debajo del cual existe un espacio subepicárdico. A continuación, hay una capa intermedia de naturaleza miocárdica. La capa interna es la endocárdica, en la que se distingue el endocardio por debajo del cual hay un subendocardio (Fig. 7a).

El epicardio está constituido por una capa de células epiteliales de morfología aplanada que recubren completamente el componente proximal (Fig. 7a).

Bajo el epicardio se sitúa el subepicardio, que forma una delgada capa de tejido conjuntivo inmediatamente subyacente y otra de mayor grosor encarada con la capa miocárdica intermedia. Entre ambas capas conjuntivas se abre un amplio espacio que parece estar ocupado por un material traslúcido, cuya naturaleza no ha podido ser identificada al no teñirse con ninguno de los colorantes empleados en el presente estudio. Se ha observado que este espacio va aumentando progresivamente de tamaño a lo largo de la vida. El tejido conjuntivo del subepicardio presenta abundantes fibras de colágeno tipo I agrupadas formando capas discontinuas dispuestas de forma circunferencial y fibras de colágeno tipo III con una disposición irregular (Fig. 7b), escasas fibras elásticas distribuidas de forma dispersa (Fig. 7c) y fibrocitos. Además, por dicho espacio discurren vasos sanguíneos de diferente calibre (Figs. 7a-f) y melanóforos distribuidos en el seno del tejido conjuntivo, en muchos casos en torno a los vasos (Figs. 7a, c).

Figura 6. Reconstrucción tridimensional del componente distal del tracto de salida.

6a: Vista ventral del corazón, una vez diseccionado el pericardio. Las líneas discontinuas (6b-g) indican los niveles correspondientes a los cortes que se muestran en las figuras 6b-g. AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; CDd, componente distal derecho; CDi, componente distal izquierdo; CP, componente proximal; V, ventrículo. Barra 1cm.

6b: Vista transversal del componente distal. El septo principal separa el componente distal en cavum aorticum y cavum pulmo-cutaneum. En la superficie ventral de septo principal se halla ubicado el bloque endotelial (Be). CAo, cavum aorticum; CPc, cavum pulmonar; E, epicardio. Barra 200 μ m.

6c: Vista transversal del componente distal. El septo vertical divide el cavum pulmo-cutáneo en los troncos arteriales pulmo-cutáneos izquierdo (APi) y derecho (APd). Be, bloque endotelial; CAo, cavum aórtico-carotideo; E, epicardio; M, miocardio. Barra 200 μ m.

6d: Vista transversal del componente distal. El septo vertical, junto con el bloque endotelial (Be), dividen en una posición más caudal los troncos pulmo-cutáneos. Además, se proyecta ventralmente para dividir el cavum aorticum en los troncos arteriales sistémicos izquierdo (ASi) y derecho. APd, tronco arterial pulmo-cutáneo derecho (ASd). APi, tronco arterial pulmo-cutáneo izquierdo; E, epicardio. Barra 200 μ m.

6e: Vista transversal del componente distal. El septo vertical, junto con el bloque endotelial (Be) continúa su trayectoria hasta unirse a la pared ventral del componente distal junto con el bloque endotelial. ACd, tronco arterial carotídeo derecho; ACi, tronco arterial carotídeo izquierdo; APd, tronco arterial pulmo-cutáneo derecho; APi, tronco arterial pulmo-cutáneo izquierdo; ASd, tronco arterial sistémico derecho; ASi, tronco arterial sistémico izquierdo; E, epicardio. Barra 200 μ m.

6f: Vista transversal del componente distal. El septo vertical divide la porción restante del cavum aorticum en dos troncos arteriales carotideos, izquierdo y derecho. ACd, tronco arterial carotídeo derecho; ACi, tronco arterial carotídeo izquierdo; APd, tronco arterial pulmo-cutáneo derecho; APi, tronco arterial pulmo-cutáneo izquierdo; ASd, tronco arterial sistémico derecho; ASi, tronco arterial sistémico izquierdo; E, epicardio. Barra 200 μ m.

6g: Vista transversal del componente distal. Una vez concluida la septación de los troncos arteriales, el componente distal se divide formando dos troncos: componente distal izquierdo y derecho que contienen en su interior los troncos arteriales pulmo-cutáneo, sistémico y carotideo. ACd, tronco arterial carotídeo derecho; ACi, tronco arterial carotídeo izquierdo; APd, tronco arterial pulmo-cutáneo derecho; APi, tronco arterial pulmo-cutáneo izquierdo; ASd, tronco arterial sistémico derecho; ASi, tronco arterial sistémico izquierdo; E, epicardio; P, pericardio. Barra 200 μ m.

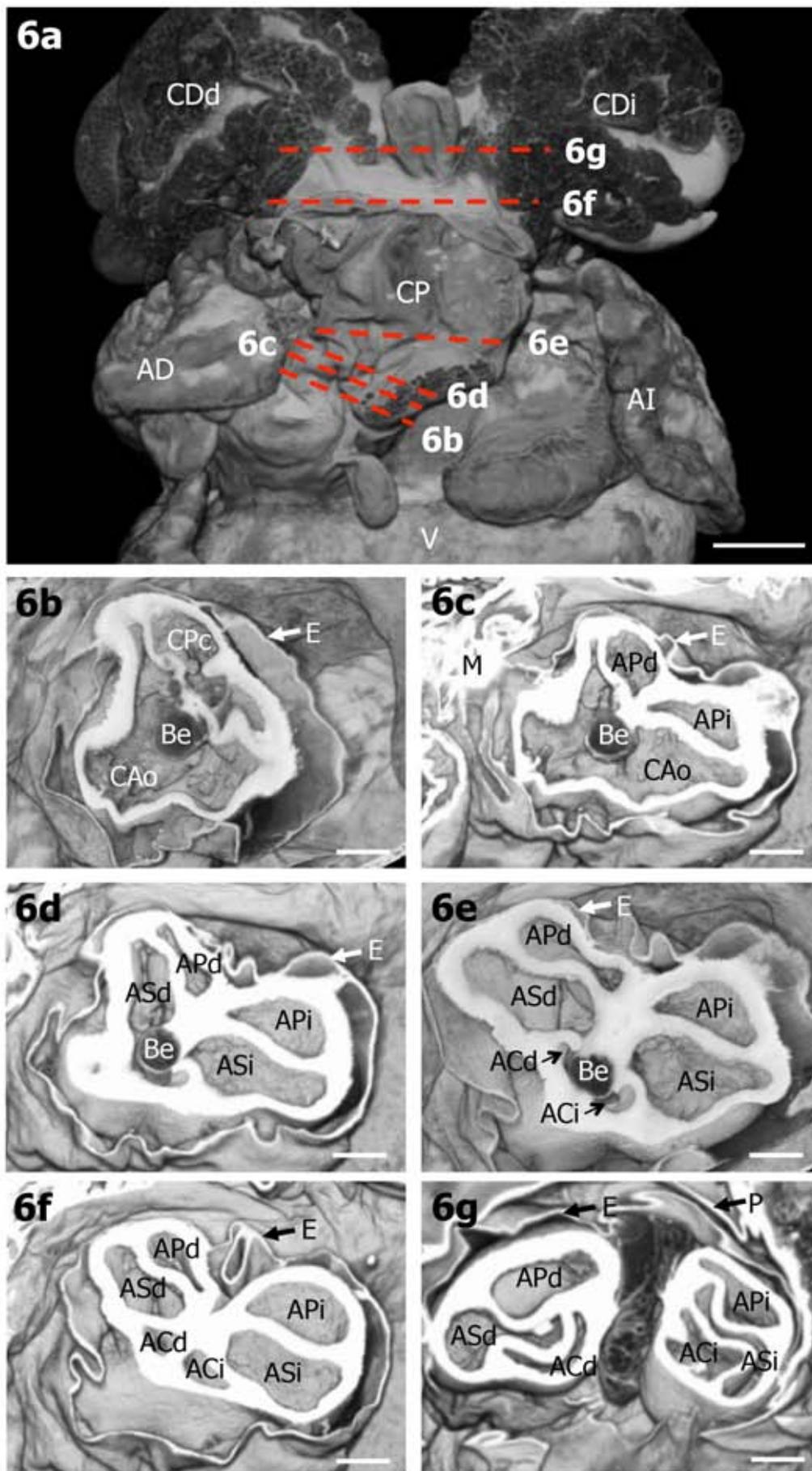


Figura 7. Secciones histológicas del componente proximal del tracto de salida.

7a: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. El epicardio está formado por una capa de células aplanadas que se continúa con un amplio espacio subepicárdico (flecha doble) que contiene abundante tejido conjuntivo. La siguiente capa es un miocardio compacto (M) dispuesto en gruesos paquetes de fibras musculares rodeados de tejido conjuntivo e intensamente irrigado por diferentes perfiles vasculares (cabezas de flechas). Seguidamente se halla el subendocardio rico en tejido conjuntivo y un endocardio formado por una capa continua de células endoteliales. La flecha señala una arteria coronaria en cuya proximidad hay un grupo de melanóforos. E, epicardio; P, pericardio. Barra 20 μm .

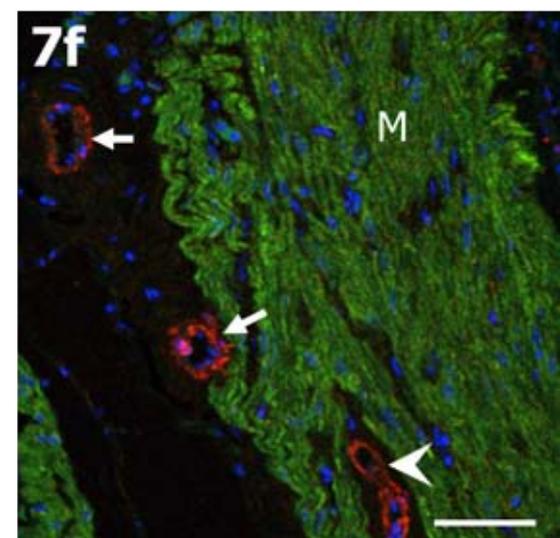
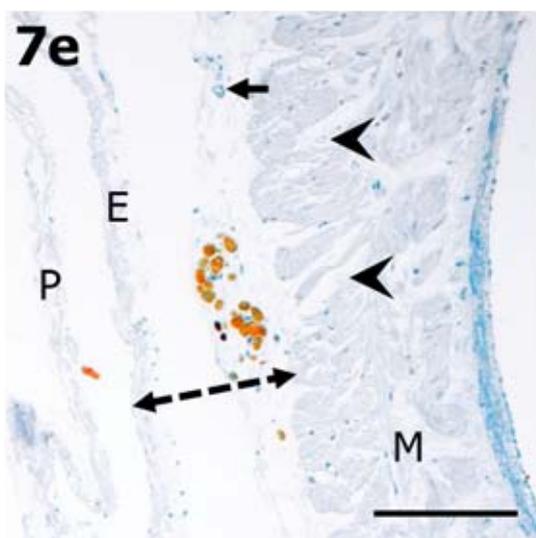
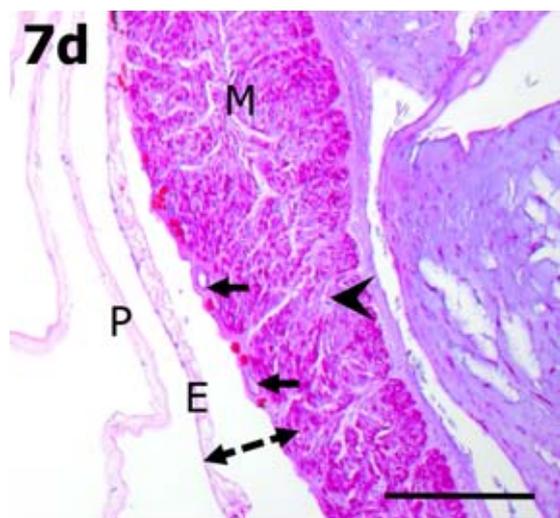
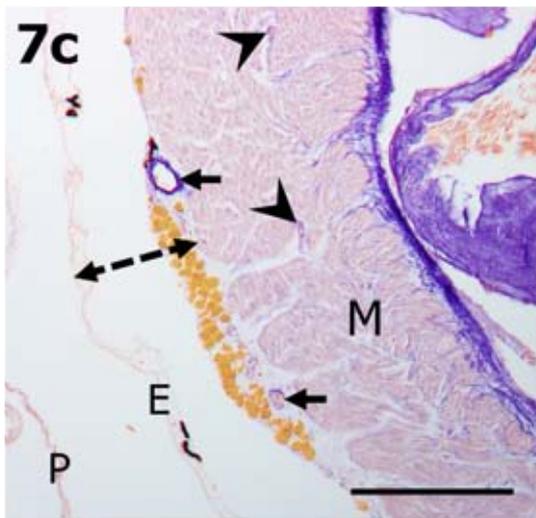
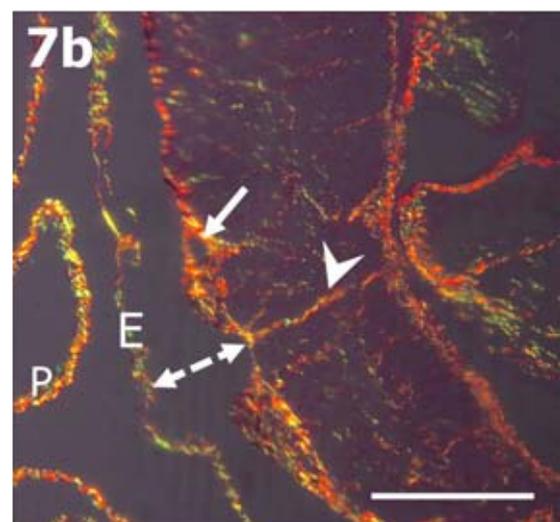
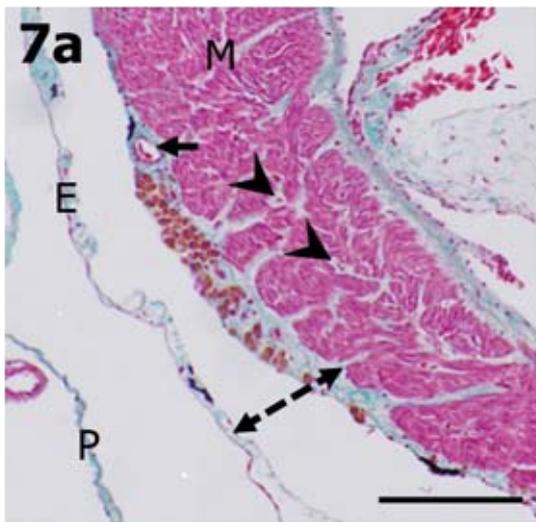
7b: Sección transversal. Picrosirio con microscopía de polarización. El subepicardio y el subendocardio son ricos en fibras de colágeno tipo I. En la capa miocárdica se observa una intrincada red de fibras de colágeno tipo I y tipo III. La flecha señala una arteria coronaria. La cabeza de flecha señala las fibras de colágeno atravesando la capa miocárdica. La flecha doble marca el subepicardio. E, epicardio; M, miocardio; P, pericardio. Barra 20 μm .

7c: Sección transversal. Resorcina-fucsina. La elastina forma delgadas fibras dispuestas de manera dispersa en el subepicardio y formando una lámina más gruesa en el subendocardio. Las cabezas de flechas indican perfiles vasculares. Las flechas señalan arterias coronarias. La flecha doble marca el subepicardio. Nótese los melanóforos dispuestos entorno a la arteria coronaria situada en el subepicardio. E, epicardio; M, miocardio; P, pericardio. Barra 20 μm .

7d: Sección transversal. PAS. La capa miocárdica es rica en glucoconjugados. La cabeza de flecha indica un perfil vascular. Las flechas señalan arterias coronarias. La flecha doble marca el subepicardio. E, epicardio; M, miocardio; P, pericardio. Barra 10 μm .

7e: Sección transversal. Azul alciano 0,05M de MgCl_2 . El subendocardio se tiñe intensamente en comparación con el resto de los tejidos que componen la pared. Las cabezas de flechas indican perfiles vasculares. La flecha señala una arteria coronaria. La flecha doble marca el subepicardio. E, epicardio; M, miocardio; P, pericardio. Barra 20 μm .

7f: Sección transversal. Inmunotinción con los anticuerpos A4.1025 y anti- α -actina. A4.1025, verde; anti- α -actina, rojo; DAPI, azul. Las flechas marcan arterias coronarias ubicadas en el subepicardio. La cabeza de flecha señala una arteria coronaria dentro del miocardio. La flecha doble marca el subepicardio. M, miocardio. Barra 50 μm .



A continuación, se encuentra la capa intermedia, de naturaleza miocárdica, en la cual a su vez se distinguen dos estratos concéntricos de miocardio compacto. Internamente, los paquetes se orientan de manera circunferencial y externamente de forma helicoidal (Fig. 7a). Los paquetes musculares están envueltos en tejido conjuntivo, organizado como una intrincada malla que se extiende por toda la pared del componente proximal, en el que son abundantes las fibras de colágeno tipo I y tipo III. En algunos puntos, fibras de colágeno tipo I atraviesan completamente la capa miocárdica poniendo en contacto las zonas profundas del subepicardio y del subendocardio (Fig. 7b). Asimismo, se distinguen algunas fibras elásticas finas y dispersas (Fig. 7c). Toda la capa miocárdica se tiñe intensamente con el método de PAS (Fig. 7d) y está profusamente irrigada por ramas que provienen de arterias coronarias que recorren el subepicardio (Figs. 7a, c-f). Las capas de miocardio compacto se hallan irrigadas por una red de arterias coronarias y capilares (Figs. 7a, e, c, f), que están ausentes en el miocardio ventricular el cual es de tipo esponjoso.

Bajo el miocardio se halla el subendocardio. En el espacio subendocárdico hay abundante tejido conjuntivo fibroso, con fibras de colágeno tipo I, formando gruesos cordones, y tipo III, dispuestas de forma irregular (Fig. 7b), y con gran cantidad de fibras elásticas que conforman láminas orientadas de forma concéntrica (Fig. 7c). La matriz extracelular del espacio subendocárdico se tiñe intensamente con azul alciano con una concentración 0,05M de cloruro de magnesio (Fig. 7e). La intensidad de la tinción disminuye progresivamente en menor medida cuando se aplica dicho colorante con concentraciones 0,3M y 0,65M de cloruro de magnesio, pero no se tiñe a 0,9M. Por último, la capa más interna es el endocardio. Consta de un solo estrato continuo de células endoteliales aplanadas con núcleos protruyentes, que recubren completamente la superficie luminal (Figs. 7a, e).



Internamente el componente proximal del TS está provisto de sendas hileras de válvulas, proximales y distales. Las válvulas presentan dos componentes: la valva y el seno. La valva es un elemento móvil, que se abre y cierra durante el ciclo cardíaco. El seno es la zona de la pared del TS en donde se inserta la valva. Las valvas tienen una forma semejante a un nido de golondrina (Figs. 5a, 8a, b). En su parte central, son más gruesas que en sus partes laterales, por las cuales se unen a la pared del TS siguiendo una forma semicircular. Las zonas laterales de valvas adyacentes no llegan a contactar distalmente formando comisuras semejantes a las existentes en aves y mamíferos. En *Xenopus*, entre valvas contiguas hay espacios amplios, cuya forma es más o menos trapezoidal (Fig. 8c), en vez de triangular. Además, las valvas experimentan una disminución progresiva de su grosor en sentido caudo-cefálico, es decir, desde su porción basal hacia su borde libre. Cada una de las valvas consta de una cara luminal, expuesta a la luz del TS y una cara parietal, que se encara al seno. Cabe señalar también que los bordes laterales y la cara parietal de la valva se hallan unidos a la pared del seno por medio de cuerdas tendinosas (Figs. 8a, c-e).

En la hilera proximal existen cuatro válvulas que se disponen en posición ventral, izquierda, dorsal y derecha (Figs. 8a, b). De ellas, las válvulas ventral y dorsal son las de mayor tamaño. Cada valva consiste en un núcleo de tejido conjuntivo tapizado por endocardio. Desde el borde libre hasta la zona de inserción proximal, el núcleo central de la valva está estratificado en dos capas, una fibrosa, que se puede calificar de externa, expuesta al lumen del TS, y otra esponjosa (Figs. 9a, b). La capa fibrosa está formada principalmente por fibras de colágeno tipo I que se agrupan en haces formando capas discontinuas dispuestas circunferencialmente. Asimismo, hay fibras de colágeno tipo III cortas y delgadas que carecen de una orientación determinada (Fig. 9c). Además, aparecen fibras elásticas dispuestas circunferencialmente, aunque no están organizadas en láminas

continuas (Fig. 9d). La fibrosa se colorea intensamente con azul alciano con una concentración 0,05M de cloruro de magnesio (Fig. 9e). La intensidad de la tinción disminuye progresivamente cuando se aplica dicho colorante a concentraciones 0,3M y 0,65M. Este colorante no tiñe a 0,9M. Esta capa se tiñe también con el reactivo de Schiff (Fig. 9f). La esponjosa es una gruesa capa que posee fibras de colágeno tipo I y III dispuestas de forma desorganizada (Fig. 9c), formando una red de fibras progresivamente más densa cuanto más cerca de la inserción posterior de la valva en la pared del seno. En esta capa se hallan delgadas fibras elásticas sin una orientación definida (Fig. 9d). En la matriz extracelular, la mayor intensidad

Figura 8.

8a: Vista de la hilera de válvulas proximales del tracto de salida disecado por su zona ventral. Microfotografía electrónica de barrido. Existen cuatro válvulas proximales de posición ventral (vt), izquierda (iz), derecha (dx) y dorsal (d). Sobre la válvula ventral se dispone la cresta espiral. CE, cresta espiral; M, miocardio; V, ventrículo. Barra 900 μm .

8b: Vista oclusal de la hilera de válvulas proximales. Reconstrucción tridimensional del componente proximal con microscopía episcópica de alta definición. Válvulas proximales ubicadas en su posición anatómica. CE, cresta espiral; d, válvula dorsal; dx, válvula proximal derecha; iz, válvula i proximal izquierda; M, miocardio; vt, válvula ventral. Barra 200 μm .

8c: Vista oclusal del componente proximal. Microfotografía electrónica de barrido. Detalle de la comisura que se localiza entre la valva ventral y la valva derecha. Las cuerdas tendinosas (estrellas) unen los bordes laterales de la valva a la pared del componente proximal. vt, válvula ventral. Barra 50 μm .

8d: Vista de la porción lateral de la valva ventral. Microfotografía electrónica de barrido. Las estrellas señalan las cuerdas tendinosas que unen la porción lateral libre de la valva ventral desde la cara interna de la valva hacia la pared de su seno. El asterisco indica la posición de una cuerda tendinosa interna. La zona que aparece en el recuadro se muestra ampliada en al figura 8e. vt, válvula ventral. Barra 300 μm .

8e: Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de la figura 8d. En el interior de la valva ventral discurren cuerdas tendinosas (asteriscos) que unen la pared interna de la valva con su correspondiente seno . vt, válvula ventral. Barra 20 μm .

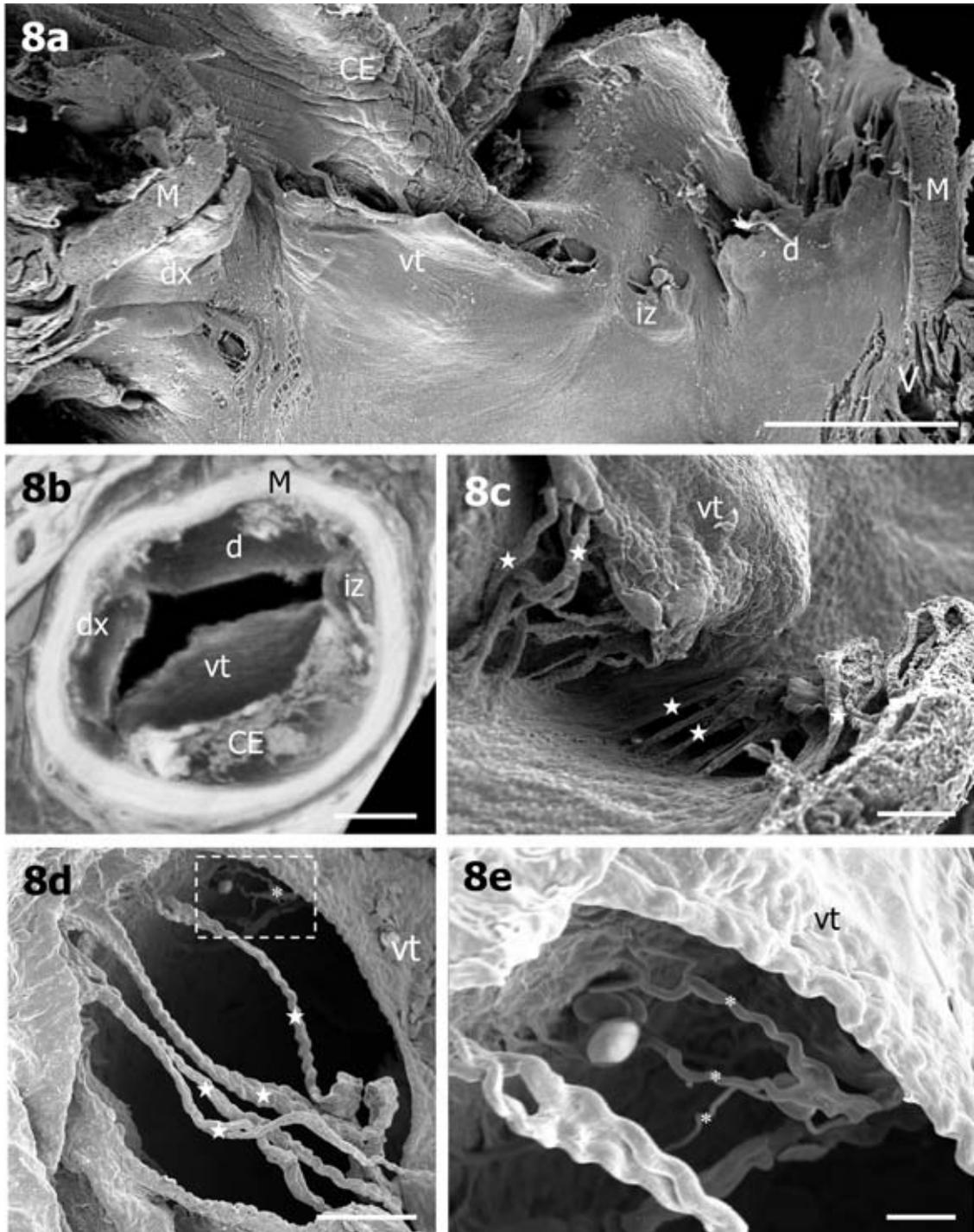


Figura 9. Secciones histológicas de las válvulas de la hilera proximal.

9a: Sección frontal de la zona caudal del tracto de salida. Tricrómico de Masson-Goldner. Se observan dos válvulas de la hilera proximal, ventral (vt) y dorsal (d), formadas por una valva, que es el elemento móvil y el seno, que es la zona de la pared en donde se inserta la valva. Obsérvese el punto de inserción de la cresta espiral en la pared izquierda. La flecha señala una cuerda tendinosa que une la valva a la cresta espiral. CE, cresta espiral; M, miocardio. Barra 200 μm .

9b: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. El cuerpo central de la valva está rodeado por una capa de fibrosa externa (cabeza de flecha), hacia la luz del componente proximal, que presenta gran cantidad de tejido conjuntivo. Barra 200 μm . En el recuadro se muestra en detalle la banda de tejido conjuntivo de la fibrosa externa (cabeza de flecha). Barra 50 μm .

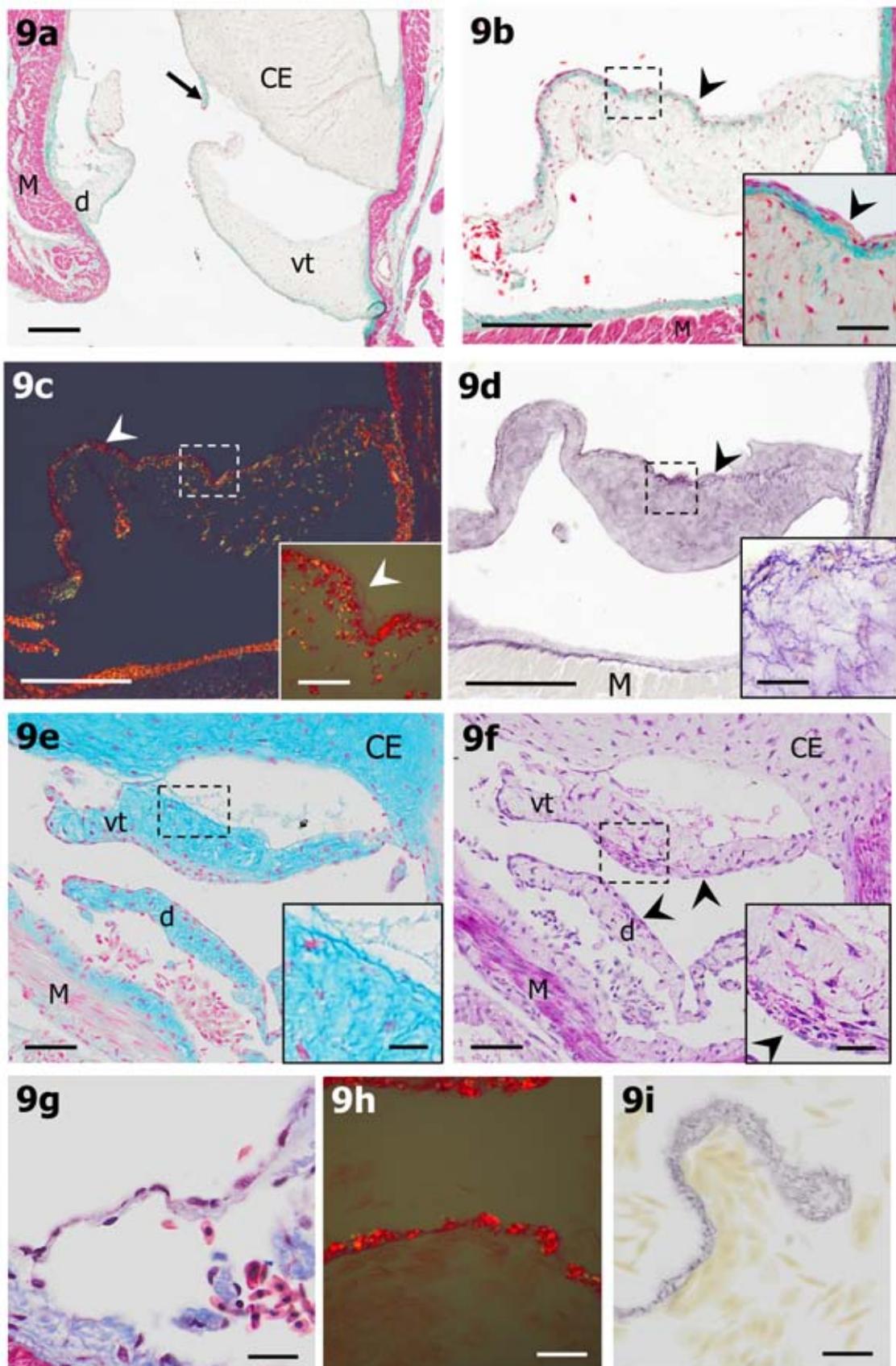
9c: Sección transversal. Picrosirio con microscopía de luz polarizada. La capa fibrosa externa (cabeza de flecha) es especialmente rica en colágeno tipo I y la esponjosa contienen pequeñas fibras de colágeno tipo III y en menor abundancia de tipo I. En las zonas de inserción lateral es abundante el colágeno tipo I y en menor medida el colágeno tipo III. Barra 200 μm . En el recuadro se muestra en detalle la capa fibrosa (cabeza de flecha) en donde las fibras de colágeno tipo I se orientan de forma paralela al borde libre. Barra 50 μm .

9d: Sección transversal. Resorcina-Fucsina. En la capa fibrosa (cabeza de flecha) la elastina se orienta circunferencialmente formando fibras gruesas. En la esponjosa son menos abundantes las fibras elásticas. Barra 200 μm . En el recuadro se muestra en detalle la esponjosa donde la elastina se dispone formando una laxa red de filamentos cortos y delgados. Barra 50 μm .

9e: Sección transversal. Azul alciano 0,05M de MgCl_2 -Rojo neutro. La capa esponjosa fibrosa presenta glucosaminoglucanos no sulfatados, en su matriz. CE, cresta espiral; d, válvula dorsal; M, miocardio; vt, válvula ventral. Barra 50 μm . En el recuadro se muestra en detalle la de la capa esponjosa en la cual la zona que se halla encarada con el seno se tiñe más intensamente. Barra 20 μm .

9f: Sección transversal. PAS. La fibrosa externa (cabezas de flecha) es rica en glucoconjugados. CE, cresta espiral; dl, válvula dorsal; M, miocardio; vt, válvula ventral. Barra 50 μm . En el recuadro se muestra en detalle los acúmulos de glucoconjugados dispuestos alrededor de los núcleos. Barra 20 μm .

9g-i: Secciones longitudinales de las cuerdas tendinosas. **9g:** Tricrómico de Mallory. **9h:** Picrosirio con microscopía de luz polarizada. **9i:** Resorcina-Fucsina. Las cuerdas tendinosas son de naturaleza conjuntiva y tapizadas por alargadas células endocárdicas. Contienen fibras de colágeno tipo I y delgadas fibras de elastinas dispuestas de forma helicoidal. Barra 20 μm .



en la tinción con azul alciano se ha obtenido al aplicarlo a una concentración de cloruro de magnesio 0,05M (Fig. 9e). El componente celular de las valvas es escaso (Fig. 9b). Hacia las zonas laterales de las valvas se observa un adelgazamiento de la esponjosa. Las zonas de inserción son delgadas y están formadas sólo por la fibrosa que, tanto en su cara luminal como en su cara parietal, está cubierta por endocardio. En esta fibrosa aumenta la proporción de colágeno tipo I (Fig. 9c) y de fibras elásticas (Fig. 9d) con respecto a lo que sucede en la parte central de la valva.

En las valvas de la hilera proximal, hay numerosas cuerdas tendinosas que se extienden desde la parte central y, más frecuentemente, desde las partes latero-distales de las valvas hasta la pared del TS (Figs. 9g-i). Unen el borde libre de la valva con la pared del seno y, en el caso de la valva ventral, con la base de la cresta espiral. Las cuerdas tendinosas son de naturaleza conjuntiva (Fig. 9g) y están formadas principalmente por fibras de colágeno tipo I (Fig. 9h), pequeñas fibras elásticas dispersas (Fig. 9i), escasas células del tejido conjuntivo, todo ello tapizado por células endocárdicas.

La hilera distal consta de cuatro válvulas de diferente tamaño, cuya forma es más o menos semilunar. Dichas válvulas se ubican en la base de los troncos sistémico-carotídeos (Fig. 5a) y se disponen en posición sinistro-dorsal, sinistro-ventral, izquierda y derecha (Fig. 10a). En el caso de las válvulas sinistro-dorsal, sinistro-ventral e izquierda, las valvas tienen una forma más o menos semilunar y su tamaño difiere entre los diversos individuos. Las dos terceras partes posteriores de estas valvas se insertan, al igual que las de la hilera proximal, en el componente proximal del TS, mientras que el tercio anterior se ancla en el componente distal. La valva derecha suele ser de mayor tamaño (Fig. 10a). Dicha valva está unida anteriormente, en sus extremos laterales, a la pared del componente distal.



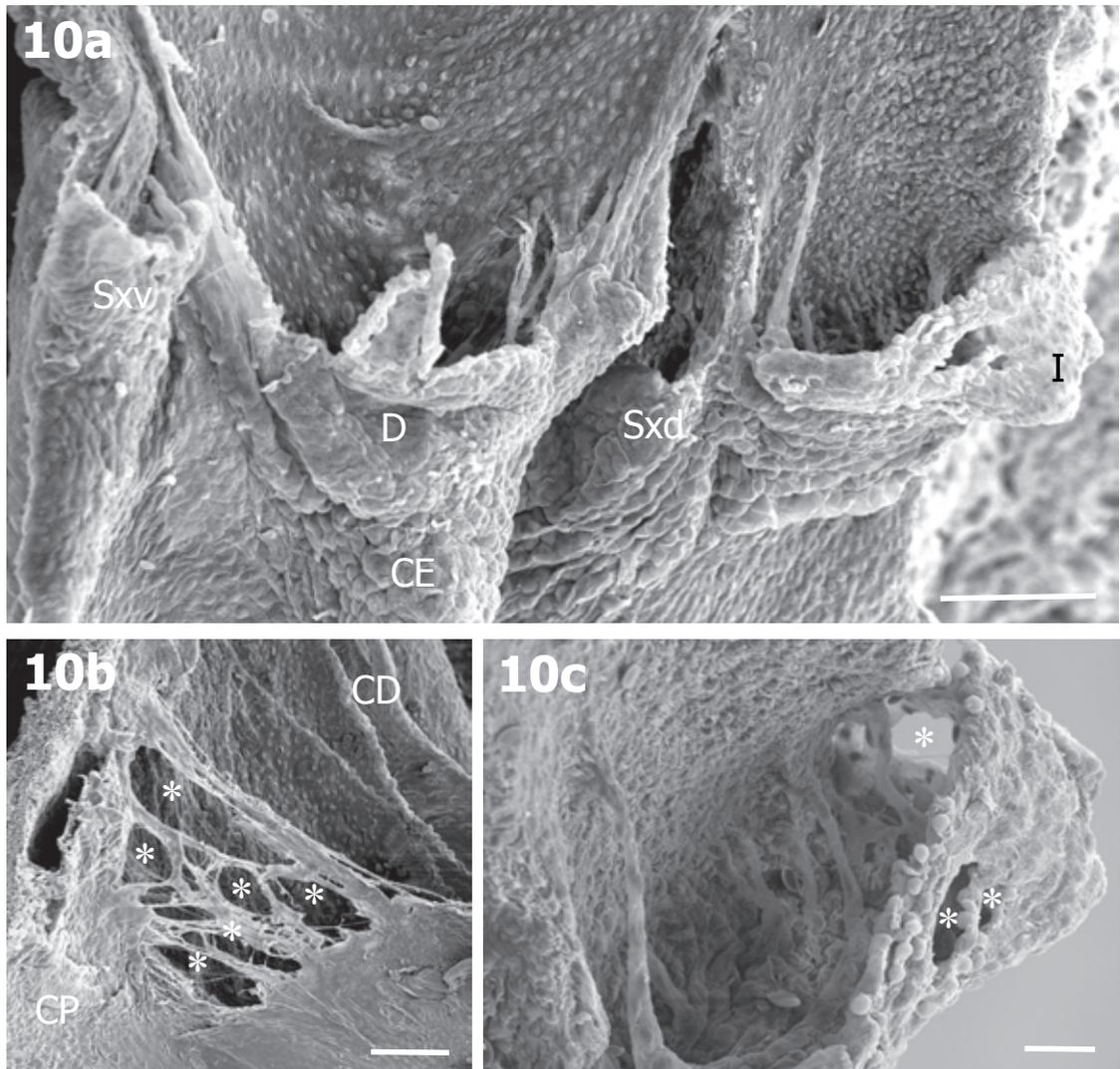


Figura 10. Hilera de válvulas distales del tracto de salida. Microfotografía electrónica de barrido.

10a: Vista de la hilera de válvulas distales del tracto de salida disecado por su zona. Existen cuatro válvulas dispuestas en posición sinistro-ventral (Sxv), izquierda (I), sinistro-dorsal (Sxd) y derecha (D). La válvula derecha se encuentra unida a la cresta espiral (CE). Barra 100 μm .

10b: Detalle de los bordes laterales de la válvula derecha en donde se hallan numerosas fenestraciones. Los asteriscos marcan las fenestraciones. CD, componente distal; CP, componente proximal. Barra 50 μm .

10c: Vista craneal de la válvula izquierda. En los márgenes laterales de la valva se hallan numerosas fenestraciones (asteriscos). Desde la cara interna de la valva salen cuerdas tendinosas que la unen a su correspondiente seno. Barra 100 μm .

Figura 11. Secciones histológicas de las válvulas distales y de la zona de transición entre el componente proximal y el componente distal del tracto de salida.

11a: Sección longitudinal. Tricrómico de Mallory. Las capas que componen la valva son más delgadas que las observadas en la hilera proximal. La fibrosa externa (cabeza de flecha) presenta abundante tejido conjuntivo. En la capa esponjosa, conforme nos desplazamos a la cara interna de la valva, va disminuyendo la cantidad de tejido conectivo. CE, cresta espiral; D, válvula derecha; M, miocardio; Sxv, válvula sinistro-ventral. Barra 200 μm .

11b: Sección transversal. Picrosirio con microscopía de luz polarizada. La cabeza de flecha marca la fibrosa externa, que no presenta fibras de colágeno. La flecha señala la fibrosa interna de la válvula derecha que contiene gruesas fibras de colágeno tipo I. La capa esponjosa es más estrecha que en la hilera proximal y presenta cortas fibras de colágeno tipo I y tipo III. CE, cresta espiral; D, válvula derecha; I, válvula izquierda; M, miocardio; Sxd, válvula sinistro dorsal; Sxv, válvula sinistro-ventral. Barra 200 μm .

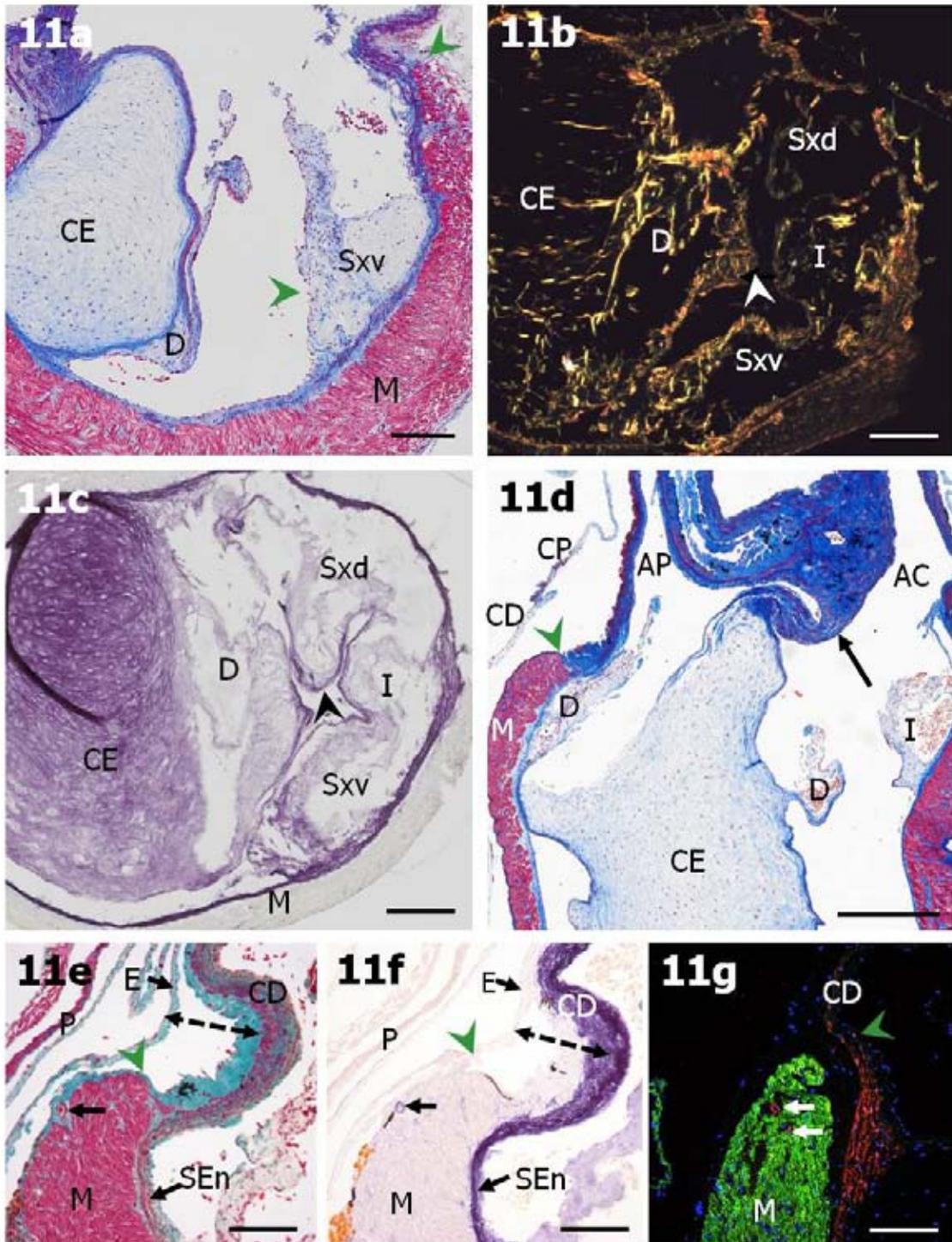
11c: Sección transversal. Resorcina-fucsina. En la fibrosa externa (cabezas de flecha) las fibras elásticas son gruesas y se hallan siguiendo el contorno de la valva. La esponjosa presenta escasas fibras elásticas dispuestas de forma dispersa. CE, cresta espiral; D, válvula derecha; I, válvula izquierda; M, miocardio; Sxd, válvula sinistro-dorsal; Sxv, válvula sinistro-ventral. Barra 200 μm .

11d: Sección longitudinal. Tricrómico de Mallory. La flecha indica la porción por la cual la cresta espiral (CE) se une al septum principal del componente distal. La cabeza de flecha verde indica el límite anterior del componente proximal (CP). Nótese el solapamiento entre el componente proximal y distal (CD). AP, tronco arterial pulmo-cutáneo; AC, tronco arterial carotideo; D, válvula derecha; I, válvula izquierda; M, miocardio. Barra 500 μm .

11e: Sección longitudinal del tracto de salida. Tricrómico de Masson-Goldner. Se observa abundante tejido conectivo en la zona caudal del componente distal (CD). La cabeza de flecha verde señala el límite anterior del componente proximal (CP). La flecha señala una arteria coronaria. La flecha doble señala el espacio subepicárdico. E, epicardio; M, miocardio; P, pericardio. SEn, subendocardio. Barra 100 μm .

11f: Sección longitudinal del tracto de salida. Resorcina-fucsina. En la zona de transición, las laminas de fibras elásticas del componente distal (CD) se continúan por el subendocardio del componente proximal (CP). El subepicardio del componente proximal está recorrido por arterias coronarias (flecha). La cabeza de flecha verde señala el límite anterior del componente proximal. La flecha doble marca el subepicardio. E, epicardio; P, pericardio; SEn, subendocardio. Barra 100 μm .

11g: Sección longitudinal del tracto de salida. Microscopía confocal. Inmunohistoquímica doble con los anticuerpos anti- α -actina y A4.1025. α -actina, rojo; A4.1025, verde; DAPI, azul. Se observa el solapamiento de la musculatura lisa del componente distal con el miocardio del componente proximal. La cabeza de flecha verde señala el límite anterior del componente proximal. Las flechas indican arterias coronarias en el componente proximal. CD, componente distal; M, miocardio. Barra 100 μm .



Las partes laterales de las cuatro valvas son muy delgadas. En ellas se abren múltiples fenestraciones (Fig. 10b) y su borde libre está unido a la pared del TS mediante cuerdas tendinosas (Figs. 10a, c).

En las valvas distales, la parte central es más delgada que en el caso de las valvas proximales. En las valvas sinistro-dorsal, sinistro-ventral e izquierda se distinguen las mismas dos capas existentes en las valvas proximales. Estas capas son una fibrosa, enfrentada al lumen del TS, y una esponjosa (Figs. 11a-d). En la fibrosa predominan las fibras de colágeno tipo I frente a las de tipo III (Fig. 11b) y hay abundantes fibras elásticas (Fig. 11c). La capa esponjosa contiene colágeno tipo I y tipo III distribuido de forma desordenada (Fig. 11b) y escasas fibras elásticas (Fig. 11c). En la valva derecha existe otra capa adicional, encarada a la superficie de la cresta espiral, que constituye una fibrosa de posición interna, con gruesas fibras de colágeno tipo I. En cuanto a las cuerdas tendinosas, su estructura es semejante a la de las cuerdas existentes en la hilera proximal. Los espacios entre valvas adyacentes son estrechos, excepto el que hay entre las valvas sinistro-dorsal y derecha, que es amplio.

Cabe señalar que hay diferencias en la pared de los senos entre las válvulas de las hileras proximal y distal. En la hilera proximal, la pared de los senos posee fundamentalmente miocardio compacto (Fig. 7a). En la hilera distal, el tercio anterior del seno contiene musculatura lisa y no miocardio. En cambio, en los dos tercios posteriores de dicha pared (Fig. 11d), se aprecia un solapamiento entre elementos estructurales de los componentes proximal y distal del TS, que son miocardio compacto y musculatura lisa respectivamente (Figs. 11e-g). Se trata de una zona de transición que ocupa la porción anterior del componente proximal del TS. En el espacio subendocárdico de esta zona están representadas fibras

de colágeno tipo I y III y fibras elásticas (Fig. 11f), aunque estas últimas aparecen en mucha menor cantidad que en el componente distal. Además, en dicha zona de transición, la musculatura lisa disminuye progresivamente en sentido ántero-posterior, hasta sobrepasar apenas la inserción de las valvas de la hilera distal (Fig. 11g).

La cresta espiral tiene un aspecto macizo y, como se ha indicado con anterioridad, se inserta en la pared interna del TS describiendo un giro en espiral (Figs. 5c-e). Distalmente, la cresta adopta una forma de copa que, en vista oclusal, se corresponde con la morfología de una válvula, cuyo seno es la propia pared de la cresta y cuya valva se inserta lateralmente en el componente distal y en el septo principal (Fig. 11d). La cresta espiral está constituida por un núcleo de tejido conjuntivo (Figs. 11a, c, d, 12a-d) tapizado por endocardio. En el borde libre de la cresta, por debajo del endocardio, se aprecian fibras de colágeno tipo I, organizadas en dos capas dispuestas de manera circunferencial (Fig. 12b). Más internamente, hay una banda de fibras de colágeno tipo III, carentes de una orientación determinada. Desde el borde libre de la cresta espiral hacia la zona central se observa una disminución progresiva en la abundancia de las fibras de colágeno, que no están presentes en el núcleo de la cresta (Fig. 12b). En la zona de inserción de la cresta a la pared del componente proximal se concentran abundantes fibras de colágeno tipo I. Con la tinción de resorcina-fucsina y a pocos aumentos, la cresta presenta un intenso color oscuro (Fig. 12c). A mayores aumentos, se aprecia que, en el borde libre, hay láminas elásticas que se orientan concéntricamente con respecto al punto de inserción de la cresta en la pared del componente proximal. En cambio, en la zona central de la cresta las fibras elásticas están organizadas en una compleja red (Fig. 12c).

Figura 12. Secciones histológicas de la cresta espiral y cresta de pequeño tamaño.

12a: Sección transversal de la cresta espiral. Tricrómico de Masson-Goldner. La zona periférica (cabeza de flecha) de la cresta presenta abundante tejido conjuntivo. Conforme nos desplazamos hacia la zona central el tejido conjuntivo es progresivamente más laxo. CE, cresta espiral; M, miocardio. Barra 100 μm . En el recuadro se muestra en detalle de la cresta espiral en donde se observa la zona marginal (cabeza de flecha) rica en tejido conjuntivo y una zona central con células dispersas y escaso tejido conjuntivo. Barra 50 μm .

12b: Sección transversal de la cresta espiral. Picosirio con microscopía de luz polarizada. Las fibras de colágeno tipo I son gruesas y se disponen siguiendo el margen libre de la cresta y las fibras de colágeno tipo III se ubican de una forma desordenada. Las fibras de colágeno son escasas en la zona central de la cresta espiral (CE). Las cabezas de flecha indican la organización en dos capas del colágeno. Barra 100 μm . En el recuadro se muestra en detalle las fibras de colágeno tipo I (color rojo) y tipo III (color verde) del borde libre de la cresta espiral. Barra 10 μm .

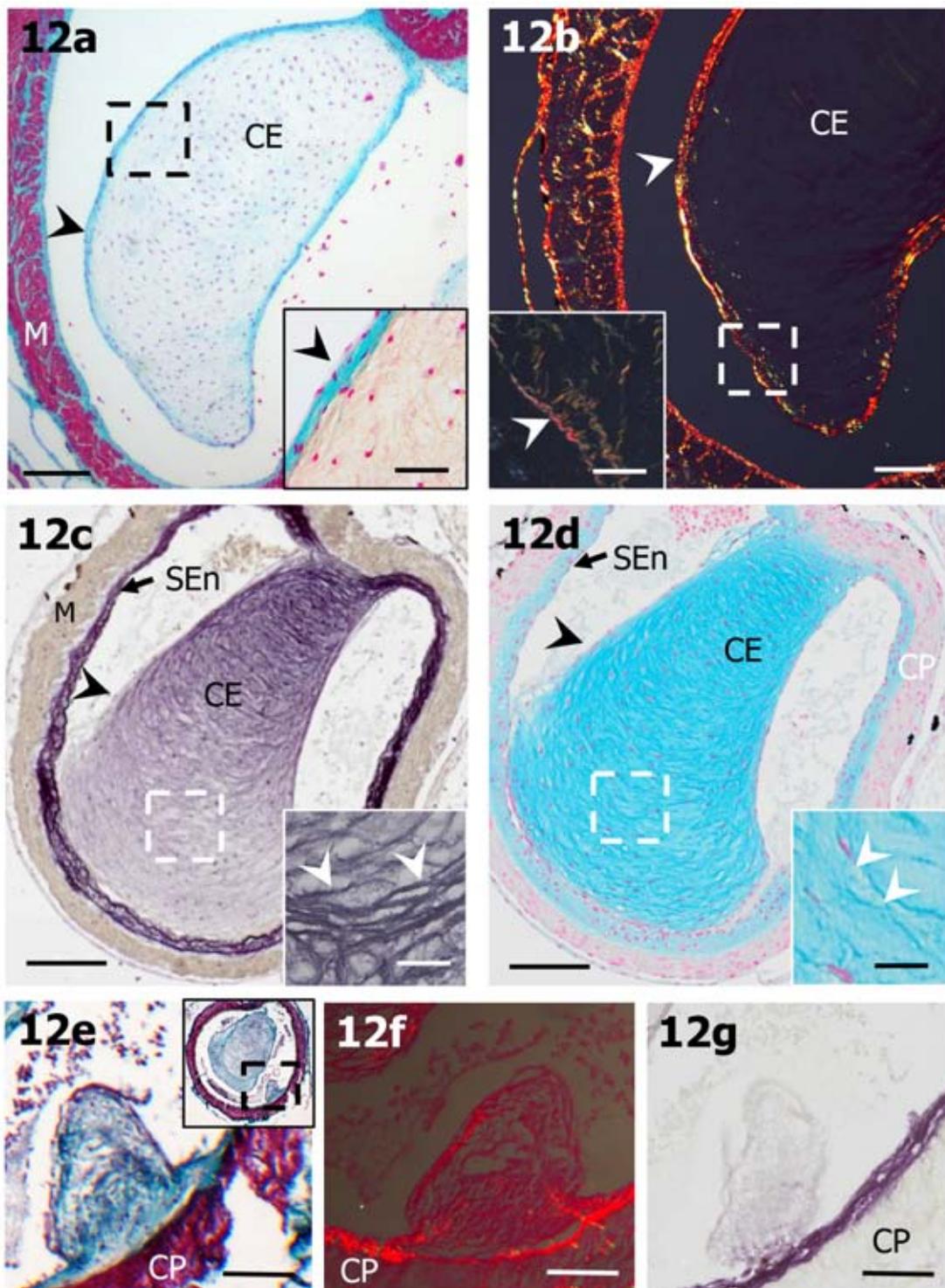
12c: Sección transversal de la cresta espiral. Resorcina-Fucsina. En el margen (cabeza de flecha negra) de la cresta espiral las fibras de elastina se disponen de una forma más laxa que lo observado en la zona central. En la zona central forman una entramada red filamentosa. En la inserción de la cresta a la pared del componente proximal se forma una densa red de fibras de elastina. CE, cresta espiral; M, miocardio; SEn, subendocardio. Barra 100 μm . En el recuadro aparece una ampliación de la zona central de la cresta espiral donde se muestra la disposición en paralelo de las láminas elásticas (cabezas de flecha). Barra 10 μm .

12d: Sección transversal. Azul alciano 0,05M de MgCl_2 - rojo neutro. La zona periférica (cabeza de flecha negra) y la zona central (asterisco) de la cresta espiral se tiñen intensamente. CE, cresta espiral; M, miocardio; SEn, subendocardio. Barra 100 μm . En el recuadro se muestra en detalle la zona central de la cresta espiral en donde los glucosaminoglucanos se disponen entre las láminas de elastina, lo que da una apariencia fibrosa (cabezas de flecha). Barra 10 μm .

12e: Sección transversal de la cresta de pequeño tamaño. Tricrómico de Masson-Goldner. La cresta pequeña se ubica en la zona media del componente proximal (indicado con el recuadro de líneas discontinuas). El cuerpo central de la cresta pequeña está constituido por tejido conjuntivo dispuesto de forma concéntrico con respecto a la zona de inserción de la cresta. CP, componente proximal. Barra 100 μm .

12f: Sección transversal de la cresta pequeña. Picosirio con microscopía de polarización. La capa externa contiene una o dos capas de colágeno tipo I y escasas fibras de colágeno tipo III. No se observan fibras de colágeno en la zona central de la cresta. CP, componente proximal. Barra 100 μm .

12g: Sección transversal de la cresta pequeña. Resorcina-Fucsina. La capa externa presenta delgadas fibras elásticas, las cuales son escasas en la zona central. CP, componente proximal. Barra 100 μm .



Además, en algunos de los individuos estudiados, el componente proximal presenta internamente una pequeña cresta que ocupa una posición sinistro-ventral (Figs. 12e-g). Esta cresta está formada por tejido conjuntivo, cuyos componentes se disponen concéntricamente con respecto a la zona de inserción en la pared del componente proximal (Fig. 12e). El borde libre de la cresta pequeña está tapizado por endocardio, bajo el que se observan fibras de colágeno tipo I (Fig. 12f). En la zona central se disponen de manera dispersa delgadas fibras elásticas (Fig. 12g).

Componente distal del tracto de salida

La pared del componente distal es más delgada que la del componente proximal. En dicha pared se hallan tres capas bien diferenciadas: una capa epicárdica, una capa intermedia y una capa endocárdica.

La capa epicárdica es la más externa. Está formada por un estrato de células epicárdicas aplanadas y un subepicardio subyacente (Fig. 13). En el subepicardio se distingue una zona externa y otra interna entre las cuales existen amplios espacios, desprovistos de células, que contienen un fluido cuya composición no se ha podido determinar. Al igual que sucede en el componente proximal, se ha observado que dichos espacios aparecen en individuos post-metamórficos y van aumentando progresivamente con la edad y la talla de los animales. En la zona externa del subepicardio, situada inmediatamente por debajo de las células epicárdicas, se observan focalmente cúmulos de células adiposas de gran tamaño, dispuestas sin un patrón característico (Figs. 13a, b). Estas células adiposas son más abundantes en la porción cefálica del componente distal que en su porción caudal. Además, en esta zona hay fibras de colágeno tipo I, que forman una o dos capas orientadas de manera circunferencial, fibras de colágeno

tipo III dispersas (Fig. 13d) y delgadas fibras elásticas también orientadas circunferencialmente (Fig. 13e). La zona interna del subepicardio está constituida por tejido conjuntivo rico en fibras de colágeno tipo I y tipo III (Fig. 13d) y con fibras elásticas dispersas (Fig. 13e). Cabe señalar que la cantidad de colágeno presente en el subepicardio del componente distal es mayor que la observada en el componente proximal (comparar Figs. 7b y 13d). En ambas zonas, externa e interna, del subepicardio se aprecian melanóforos, cuya cantidad es mayor que en el componente proximal. Los melanóforos suelen estar en torno a vasos circulatorios o dispersos en el conjuntivo del subepicardio (Figs. 13b, c, e-g).

Más internamente, la pared del componente distal posee una capa intermedia gruesa, con células musculares lisas dispuestas de forma concéntrica y orientadas circunferencialmente (Figs. 13b, c, e, h). Entre la musculatura lisa se observa una densa matriz conjuntiva compuesta por fibras de colágeno tipo I, paralelas a las fibras musculares lisas, y, en menor medida, colágeno tipo III distribuido de forma dispersa (Fig. 13d). Las capas de musculatura lisa se hallan separadas entre sí por gruesas láminas de fibras elásticas (Fig. 13e). Los espacios entre las láminas se tiñen intensamente con PAS (Fig. 13f) y con azul alciano con una concentración 0,05M de cloruro de magnesio (Fig. 13g).

El endocardio tapiza el lumen del componente distal y está constituido por una única capa de células endoteliales cuyos núcleos protruyen hacia el lumen.

Como se mencionó con anterioridad, el componente distal está tabicado internamente por medio de dos septos perpendiculares entre sí. Uno de ellos es el septo principal, que separa el componente distal en un cavum aorticum, dextro-ventral, y un cavum pulmo-cutaneum, sinistro-dorsal (Figs. 14a, b). El otro tabique es el denominado septo vertical. Éste recorre

Figura 13. Componente distal del tracto de salida

13a: Vista del componente distal diseccionado transversalmente. Micrografía electrónica de barrido. El epicardio está formado por una única capa de células a la cual se continúa un amplio espacio, el subepicardio, que contiene una gran cantidad de células adiposas (asteriscos) adheridas a la cara interna del epicardio. La flecha doble marca el espacio subepicárdico. AP, tronco arterial pulmo-cutáneo; AS, tronco arterial sistémico-carotideo; E, epicardio. Barra 200 μm .

13b: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. La capa externa del componente distal es un el epicardio, que está formado por una única capa de células epiteliales aplanadas. Seguidamente se encuentra el subepicardio (flecha doble), que es un amplio espacio que contiene tejido conjuntivo, gran cantidad de células adiposas (asteriscos) adheridas a la cara interna del epicardio y a la cara interna del subepicardio, además de fibrocitos (cabezas de flechas). AP, tronco arterial pulmo-cutáneo; AS, tronco arterial sistémico-carotideo; E, epicardio; P, pericardio. Barra 500 μm .

13c: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. El epicardio es la capa más externa y se halla formada por una capa de células aplanadas. El subepicardio es un amplio espacio flanqueado por tejido conectivo, melanóforos (flechas). Más internamente, hay una gruesa capa de musculatura lisa formando capas concéntricas, en cuya mitad externa posee abundante tejido conectivo entre las fibras musculares. E, epicardio; P, pericardio. Barra 100 μm .

13d: Sección transversal. Picrosirio con microscopía de luz polarizada. El tejido conjuntivo subyacente al epicardio presenta una o dos capas de fibras de colágeno tipo I y fibras de colágeno tipo III dispersas. En la capa encarada con la musculatura lisa, las fibras de colágeno tipo I son abundantes y las fibras de colágeno tipo III se disponen desordenadas en el seno del tejido conjuntivo. La flecha doble marca el subepicardio. E, epicardio; P, pericardio. Barra 100 μm .

13e: Sección transversal. Resorcina-Fucsina. El subepicardio presenta fibras de elastina dispuesta circunferencialmente en la zona más externa y de forma desordenada en la más interna. Las flechas indican la ubicación de los melanóforos en el subepicardio. La flecha doble marca el subepicardio. E, epicardio. Barra 100 μm .

13f: Sección transversal. PAS. Los glucoconjugados se disponen en pequeños acúmulos en la zona externa de las capas de musculatura lisa. La cabeza de flecha indica una arteria coronaria. Las flechas señalan los melanocitos dispuestos tanto en la cara contigua al epicardio como en la encarada a la musculatura lisa del subepicardio. E, epicardio. Barra 100 μm .

13g: Sección transversal. Azul alciano 0,05M de MgCl_2 . El patrón de distribución de los glucoconjugados en la capa de musculatura lisa es semejante al observado en la figura 16e para la elastina. Las flechas señalan los melanóforos presentes en el subepicardio. E, epicardio. Barra 100 μm .

13h: Sección transversal. Microscopía confocal. Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti- α -actina. α -actina, rojo; DAPI, azul. La musculatura lisa del componente distal se dispone en cinco capas concéntricas. Barra 100 μm .

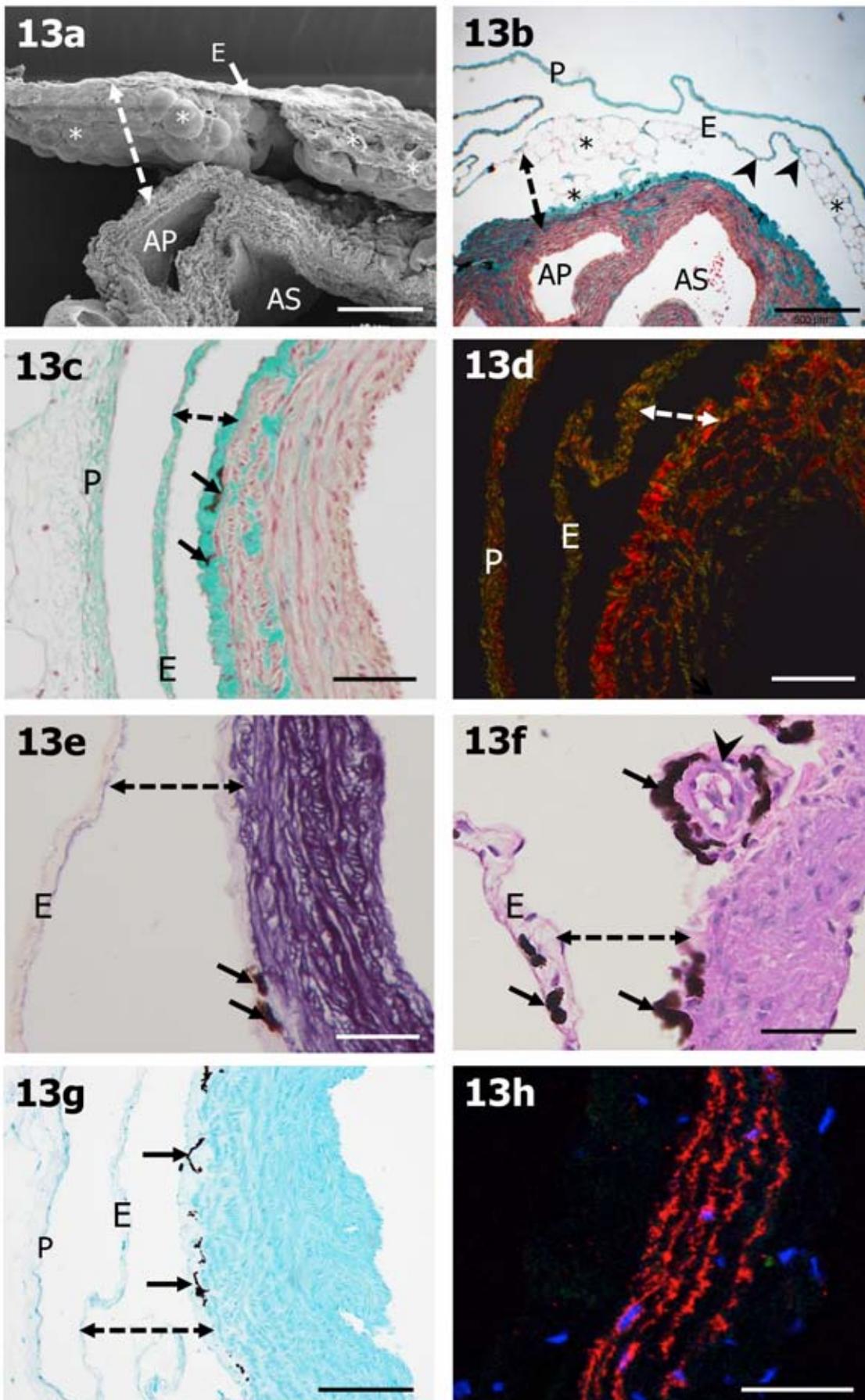


Figura 14. Secciones histológicas del componente distal.

14a: Sección longitudinal. Tricrómico de Mallory. Porción caudal del componente distal. En la figura 6a se indica la ubicación de las secciones. El septo principal se une a la porción cefálica de la cresta espiral (CE) y presenta a sus lados dispuesto el bloque endotelial (Be). Las cabezas de flecha marcan el límite anterior del componente proximal. AC, tronco arterial carotídeo; AP, tronco arterial pulmo-cutáneo; AS, tronco arterial sistémico. Barra 200 μm .

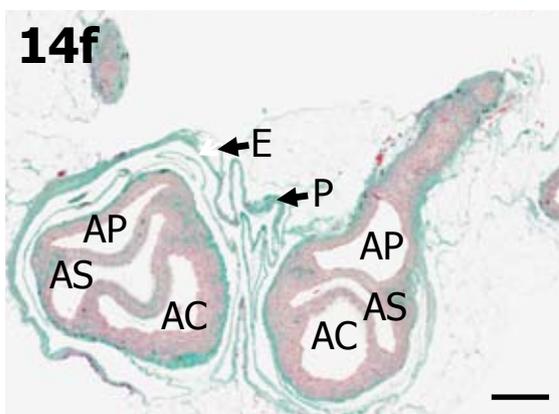
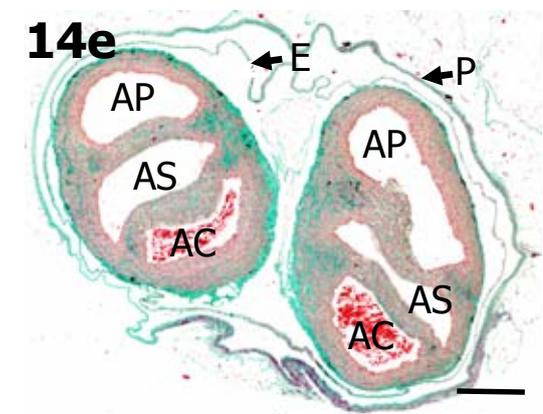
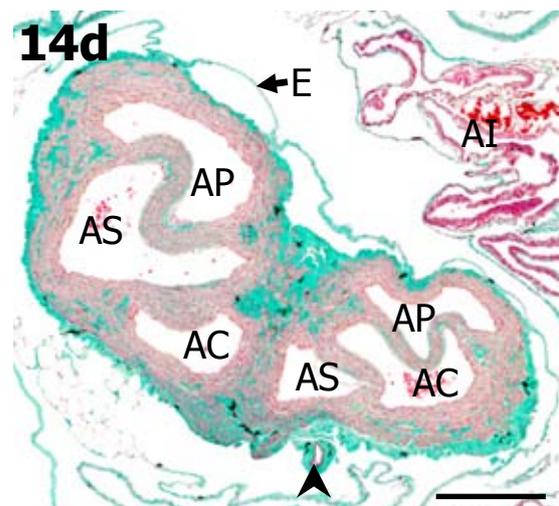
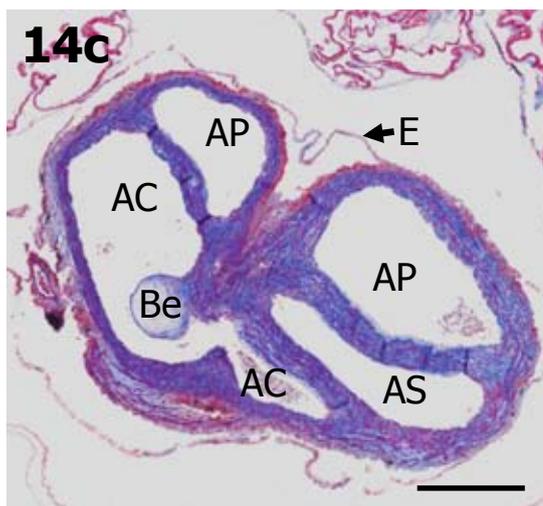
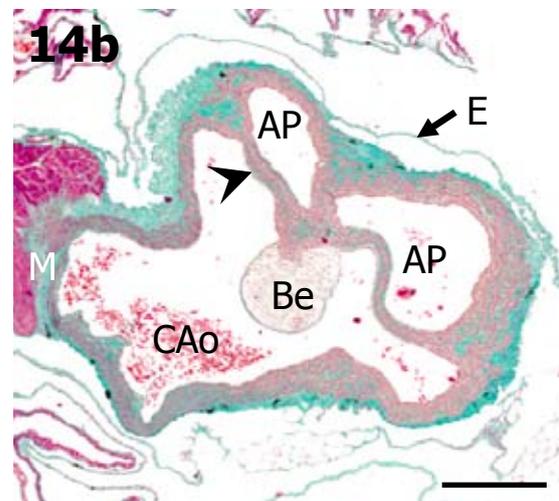
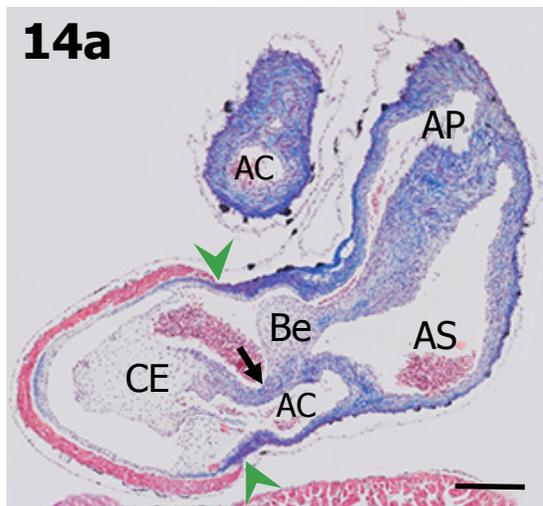
14b: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. El septo vertical divide el cavum pulmo-cutáneo en los troncos Una vez divididos los troncos pulmo-cutáneos el septo vertical se proyecta en sentido ventral y se divide el cavum aorticum en los troncos arteriales sistémico y carotídeo. AP, tronco arterial pulmo-cutáneo; Be, bloque endotelial; Cao, cavum aórticum; E, epicardio. Barra 500 μm .

14c: Sección transversal. Tricrómico de Mallory. Una vez divididos los troncos pulmo-cutáneos el septo vertical se proyecta en sentido ventral y se divide el cavum aorticum en los troncos arteriales sistémico y carotídeo. AC, tronco arterial carotídeo; AS, tronco arterial sistémico; AP, tronco arterial pulmo-cutáneo; Be, bloque endotelial; Cao, cavum aórticum; E, epicardio. Barra 500 μm .

14d: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. Los troncos arteriales están formados pero aún continúan unidos por el septo vertical y comienzan a mostrar evidencias de su separación en el extremo distal. En la porción dorsal es más abundante el tejido conjuntivo en las zonas de intersección de dos troncos contiguos. AC, tronco arterial carotídeo; AI, atrio izquierdo; AP, tronco arterial pulmo-cutáneo; AS, tronco arterial sistémico; E, epicardio. Barra 500 μm .

14e: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. Las dos porciones del componente distal están completamente separada en dos troncos, los cuales contienen en su interior los troncos arteriales pulmo-cutáneo (AP), carotídeo (AC) y sistémico (AS); E, epicardio; P, pericardio. Barra 500 μm .

14f: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. Los dos troncos del componente distal justo antes de atravesar el pericardio. Las dos porciones del componente distal están completamente separada en dos troncos, los cuales contienen en su interior los troncos arteriales pulmo-cutáneo (AP), carotídeo (AC) y sistémico (AS). E, epicardio; P, pericardio. Barra 500 μm .



en sentido céfalo-caudal el componente distal, dividiéndolo en tractos derechos e izquierdos, y su estructura histomorfológica es la de las propias paredes de los troncos arteriales en los que se escinde el componente distal (Fig. 14b). Cerca de la base de dicho componente, el septo vertical está constituido fundamentalmente por la musculatura lisa de las respectivas capas intermedias de los troncos derechos e izquierdos que se yuxtaponen en esa zona (Figs. 14c, d). En el extremo cefálico del componente distal, son elementos conjuntivos propios del subepicardio los que predominan en el septo vertical (Fig. 14d). El margen caudal y ventral de dicho septo adopta la forma de un cojín cilíndrico que se ha designado en la bibliografía con el nombre de bloque endotelial. Su estructura histomorfológica se asemeja a la de la cresta espiral. El bloque endotelial aparece como una estructura maciza de naturaleza conjuntiva (Figs. 14a-c), en la que hay abundantes fibras de colágeno tipo I distribuido en la zona periférica, bajo el endotelio, y escasas fibras de colágeno tipo III en la zona central. En su extremo cefálico, el bloque endotelial está unido, ventralmente, a la cara interna de la pared ventral del componente distal y, lateralmente, a las paredes arteriales que separan las bases, izquierdas y derechas, de los troncos sistémicos y carotídeos. En sentido céfalo-caudal, el bloque se va separando progresivamente de la pared ventral del componente distal y queda como un bloque de tejido más o menos esférico, que se proyecta ventralmente hacia el cavum aorticum (Figs. 14b, c).

Los troncos arteriales que resultan de la división del componente distal no difieren entre ellos estructuralmente. No obstante, los troncos sistémicos poseen un mayor calibre que los troncos carotídeos y pulmo-cutáneos (Figs. 14d-f). Conforme los troncos arteriales discurren en dirección caudo-cefálica, el tejido conjuntivo que forma el subepicardio es progresivamente más abundante y denso. Dicho conjuntivo es especialmente abundante en la zona de bifurcación de los troncos izquierdos y derechos (Figs. 14e, f).

En estas zonas aumenta el contenido de fibras de colágeno tipo I a nivel del subendocardio.

La división interna de cada uno de los troncos, derecho e izquierdo, del componente distal en tres troncos arteriales no es visible externamente. Como se observa en la Fig. 14e, las bases de los troncos sistémicos, carotídeos y pulmocutáneos están tapizadas por un epicardio común.

Tanto a la izquierda como a la derecha, ya fuera de la cavidad pericárdica, el primer tronco arterial que se separa de la base común es el tronco pulmo-cutáneo (Fig. 14f), que adopta una dirección latero-dorsal y después se curva en dirección caudal hacia los pulmones. A continuación, se produce la separación de los troncos arteriales sistémico y carotídeo. El tronco arterial sistémico se inclina hacia la zona dorsal cercana al esófago y seguidamente desciende hacia la cavidad abdominal. El tronco carotídeo se escinde, por su parte, en dos ramas, una denominada lingual y otra que continúa como arteria carótida.

Una vez iniciado su recorrido extrapericárdico, los troncos aórticos presentan una estructura típica de arteria elástica, en la que se distinguen las tres capas características de tales arterias: túnica adventicia, túnica media y túnica íntima (Fig. 15a). La túnica adventicia es la capa externa de los vasos y está formada por tejido conjuntivo laxo con fibras de colágeno tipo I (Fig. 15b), delgadas fibras de elastina (Fig. 15c) y fibroblastos. La túnica media es la capa más gruesa del vaso y se compone sobre todo células musculares lisas orientadas de manera circunferencial que forman varios estratos concéntricos en torno a la luz del vaso (Fig. 15d). Dichos estratos de musculatura lisa están separados por fibras de colágeno tipo I (Fig. 15b) y gruesas láminas de elastina (Fig. 15c). Internamente, la túnica íntima se compone de una sola capa de células endoteliales aplanadas, con núcleos protruyentes, que recubren la luz del vaso (Fig. 15a).

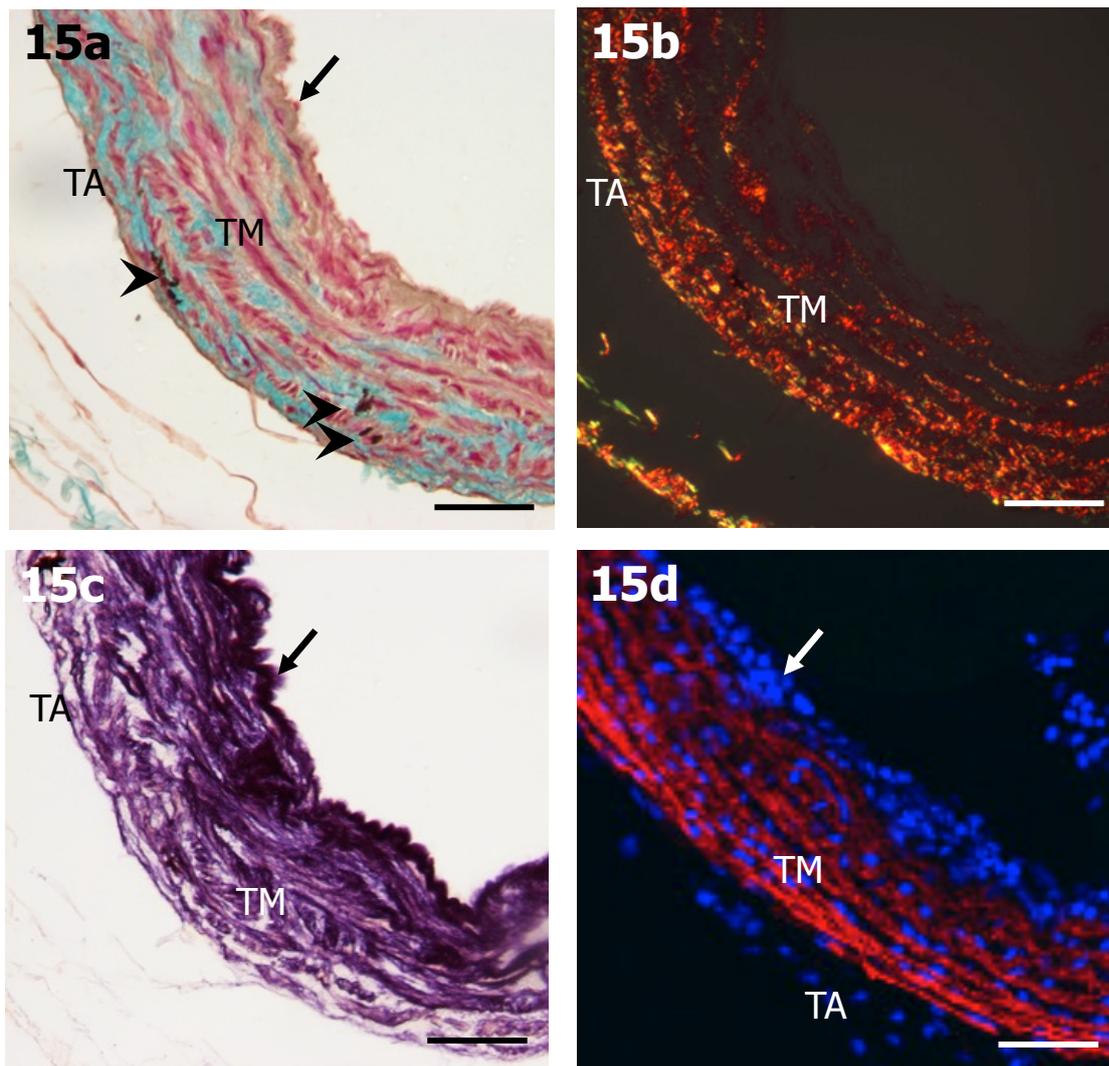


Figura 15. Secciones histológicas del tronco aórtico pulmo-cutáneo.

15a: Sección transversal. Tricrómico de Masson-Goldner. La túnica adventicia (TA), es la capa más externa. La túnica media (TM) consta de capas de musculatura lisa formando láminas concéntricas. Por último la túnica íntima está constituida por un epitelio de células aplanadas con núcleos protruyentes hacia la luz del vaso (flecha). Las cabezas de flecha señalan los melanóforos ubicados en la túnica adventicia y en la túnica media. Barra 50 μm .

15b: Sección transversal. Picrosirio con microscopía de polarización. La túnica adventicia (TA) es rica en fibras de colágeno tipo I. En la túnica media (TM) el colágeno tipo I es abundante y su presencia va disminuyendo conforme nos acercamos a la luz del vaso. Barra 50 μm .

15c: Sección transversal. Resorcina-fucsina. La túnica adventicia (TA) contiene delgadas fibras de elastina orientadas en sentido longitudinal. En la túnica media (TM) las fibras de elastina se disponen formando gruesas láminas que se intercalan con las fibras musculares lisas. La flecha señala la túnica íntima. Barra 50 μm .

15d: Sección transversal. Inmunotinción con el anticuerpo anti- α -actina. Se observa la disposición circunferencial de las fibras de musculatura lisa en la pared del tronco aórtico. La flecha señala la túnica íntima. TA, túnica adventicia; TM, túnica media. Barra 50 μm .

Arterias coronarias en el tracto de salida

En *X. laevis*, el TS está irrigado por arterias coronarias. En 14 ejemplares ha sido posible identificar la presencia de estas arterias. Su origen y ramificación muestra una variación individual. En dos casos, desde la zona ventral del tronco carotídeo izquierdo emerge una arteria que discurre ventralmente durante un corto tramo por el componente distal y, en seguida, se bifurca en sendas ramas, una dorsal y otra ventral, que irrigan dicho componente (Fig. 16a). En otros nueve casos, la arteria coronaria presenta un origen y recorrido semejante al de los ejemplares anteriores, pero la escisión de la coronaria se produce ya en el componente proximal (Figs. 16b-d). En un caso, la arteria coronaria surge desde el tronco carotídeo derecho, en lugar del izquierdo, y continúa como un único vaso que discurre por el lado derecho del componente distal. En otro caso, desde el tronco carotídeo derecho se originan dos arterias coronarias independientes. En el ejemplar restante, la arteria coronaria surge dorsalmente en el límite entre ambos componentes, proximal y distal (Fig. 5a). En general, las arterias coronarias discurren por el subepicardio del TS y, desde esa posición, se ramifican penetrando en el espesor del miocardio del componente proximal (Figs. 16f, g). Con frecuencia hay células pigmentarias cercanas o en torno a los vasos subepicárdicos (Figs. 13f, 16f), que contribuyen a la mejor visualización de su recorrido macroscópicamente (Figs. 16a, b). Una característica que han presentado los 14 ejemplares estudiados es que una de las arterias coronarias que irriga el componente proximal sigue la trayectoria de la zona de inserción de la cresta espiral (Figs. 16e, f). Además, la distribución de las coronarias se restringe al TS, sin llegar a sobrepasar el límite entre el TS y el ventrículo. La irrigación coronaria es especialmente abundante en el espesor de la pared del componente proximal (Fig. 16g).

A diferencia del TS, la pared del ventrículo es totalmente avascular.

Figura 16.

16a: Vista ventral del tracto de salida. La arteria coronaria tiene un recorrido inicial intramuro, que discurre por el subepicardio hasta el punto en donde se escinde en dos ramas, en la zona próxima a la bifurcación de los troncos arteriales del componente distal. La flecha señala en punto de origen de la arteria coronaria en la pared del componente distal izquierdo (CDi). La cabeza de flecha roja señala el punto de bifurcación de la arteria coronaria. Las cabezas de flechas blancas indican el límite anterior del componente proximal (CP). AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; CDd, componente distal derecho; V, ventrículo. Barra 1 mm.

16b: Vista ventro-lateral del tracto de salida. La muestra fue manipulada convenientemente para visualizar el recorrido completo de la arteria coronaria. El componente proximal (CP) se observa desde una vista lateral y el componente distal derecho (CDd) es girado 90° hacia la derecha, por lo cual esta porción se observa en una vista dextro-ventral. La flecha señala el punto desde donde parte la arteria coronaria en una corta trayectoria ventral intramuro. La flecha señala el punto de origen de la arteria coronaria en la pared del componente distal. La cabeza de flecha roja señala el punto de bifurcación de la arteria coronaria. El recorrido de la arteria coronaria va acompañado de numerosos melanóforos. Las cabezas de flecha blanca indican el límite anterior del componente proximal. AD, atrio derecho; CDi, componente distal izquierdo. Barra 1 mm.

16c: Sección transversal. Tricrómico de Mallory. En el tronco carotideo derecho se origina la arteria coronaria. La zona que aparece en el recuadro se muestra ampliada en la figura 16d. AC, tronco arterial carotideo; AP, troncos arteriales pulmo-cutáneos; AS, troncos arteriales sistémicos; E, epicardio. Barra 200 μm.

16d: Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de la figura 16c. Detalle del origen de la arteria coronaria en el tronco arterial carotideo izquierdo. AC, tronco arterial carotideo; E, epicardio. Barra 50 μm.

16e: Sección Transversal del componente proximal a la altura de las válvulas proximales. Resorcina-Fucsina. La zona que aparece en el recuadro con línea continua se muestra ampliada en la figura 16f y el recuadro con líneas discontinuas en la figura 16g. CE, cresta espiral; M, miocardio; V, ventrículo. Barra 200 μm

16f: Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de línea discontinua blanca en la figura 16e y en color verde en la figura 16j. . El componente proximal está irrigado por una amplia red de arterias coronarias que discurren por el subepicardio y que penetran en el miocardio. Las cabezas de flecha indican dos arterias coronarias. Barra 100 μm.

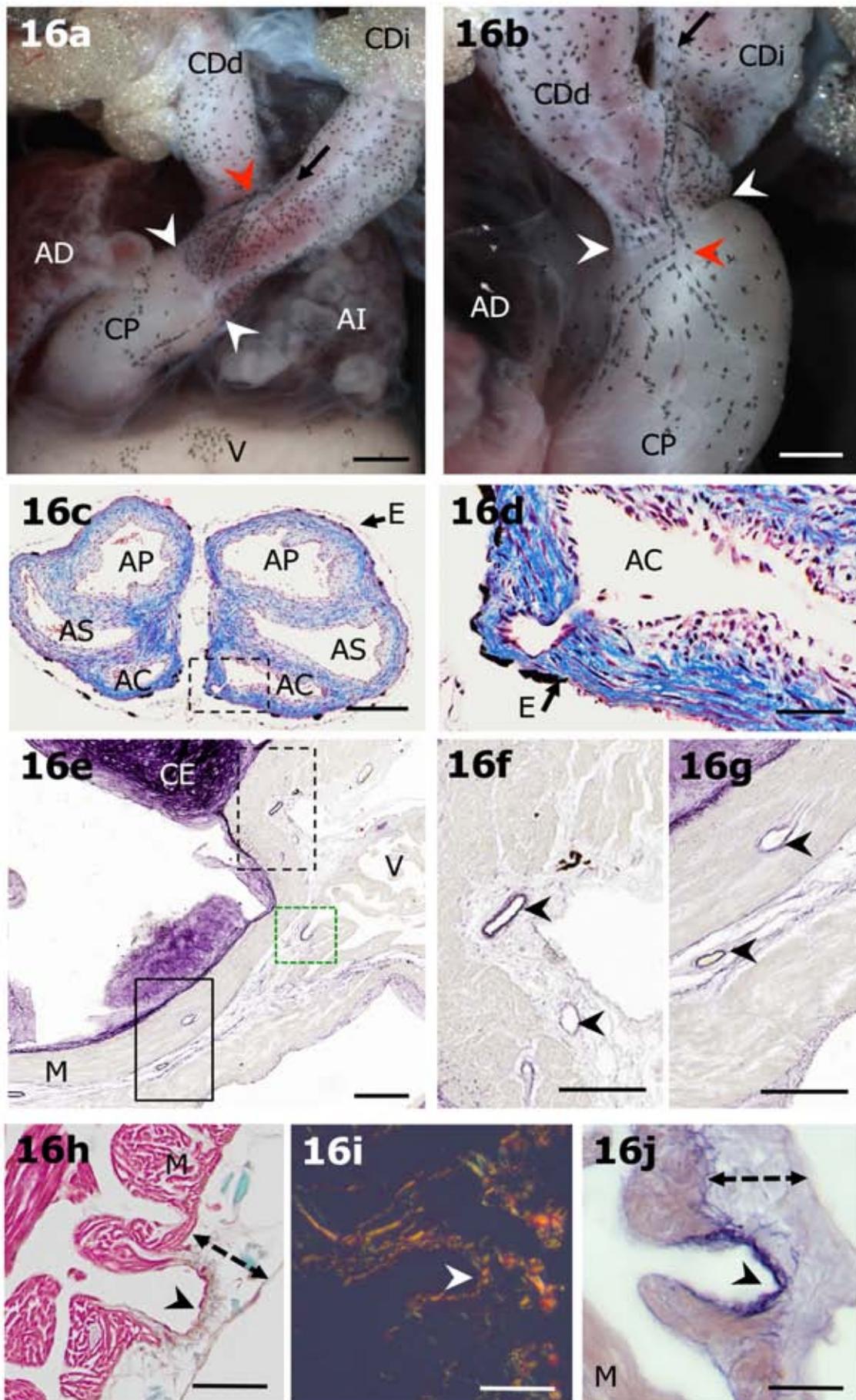
16g: Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de línea continua la figura 16e. Una arteria coronaria discurre por el componente proximal paralela al recorrido de las cresta espiral (cabezas de flecha). Barra 100 μm.

16h: Sección longitudinal de la zona externa del ventrículo. Tricrómico de Masson-Goldner. En la base de los espacios intertrabeculares (cabeza de flecha), los núcleos del endocardio son protruyentes hacia la luz del ventrículo. En muchos casos estas prolongaciones llegan hasta el seno del subepicardio. La flecha doble marca el subepicardio. M, miocardio. Barra 50 μm.

16i: Sección transversal. Picosirio con microscopía de polarización. Las fibras de colágeno tipo I son abundantes en la base de los espacios intertrabeculares (cabeza de flecha). Barra 50 μm.

16j: Sección transversal de la zona externa del ventrículo. Resorcina-fucsina. Los miocardiocitos se disponen formando grandes trabéculas. En la base de los espacios intertrabeculares (cabeza de flecha) se observan abundantes fibras elásticas. La flecha doble marca el subepicardio. M, miocardio. Barra 50 μm.





Está formada por miocardio esponjoso el cual está irrigado exclusivamente a base de la sangre que circula por la luz de la cámara y se introduce a través de los espacios intertrabeculares (Fig. 16h). Estos espacios forman terminaciones ciegas, con forma de saco, tapizadas por células endocárdicas de forma cúbica cuyos núcleos protruyen hacia la luz intertrabecular. Estas terminaciones ciegas llegan a penetrar en el interior del subepicardio y son ricas en fibras de colágeno tipo I y tipo III (Fig. 16i) y en fibras elásticas (Fig. 16j).

Desarrollo embrionario del corazón

En el presente apartado se exponen los resultados derivados del estudio del desarrollo del TS cardíaco de embriones, renacuajos e individuos metamórficos de *X. laevis*. Para la determinación de los estadios del desarrollo se han seguido los criterios de Nieuwkoop y Faber (1994), perfilados con observaciones propias. Dado que en los estadios comprendidos entre el 26 y el 46 los órganos internos se visualizan a través del tegumento, en el caso de los presentes ejemplares se han tenido en cuenta tanto caracteres anatómicos externos como internos que han permitido la asignación, de manera fehaciente, de dichos ejemplares a los respectivos estadios. En el caso de los estadios más avanzados, se ha recurrido también a determinados caracteres anatómicos internos observados en secciones histológicas.

En el presente estudio se emplea el término embrión para hacer referencia a los ejemplares pertenecientes a estadios del desarrollo anteriores al 37. El término renacuajo designa los especímenes comprendidos entre el estadio 37 y el 56. Alrededor del estadio 57 se inicia el proceso de metamorfosis, que abarca hasta el estadio 66. Siguiendo la terminología empleada en la bibliografía especializada, en la presente memoria, a los ejemplares en los que se está produciendo este proceso se les denomina



metamórficos. Por último, al final del presente apartado se exponen los resultados obtenidos de individuos en los que el proceso de metamorfosis ha culminado, pero que aún no han alcanzado la madurez sexual.

Los resultados están expuestos en orden cronológico. En la descripción se han agrupado aquellos estadios en los cuales no se aprecian diferencias significativas en los eventos del desarrollo que atañen al objetivo de este estudio.

A continuación, se exponen los resultados que abarcan desde el momento en el que las células precursoras del corazón primitivo se ubican en la línea media del embrión hasta la situación en individuos en los que ha finalizado la metamorfosis. Dado que no ha sido posible extraer los corazones de los embriones, se ha optado por incluir los embriones completos y orientados para obtener cortes transversales, frontales y longitudinales, aún sabiendo que la orientación del embrión no coincide con la del TS cardíaco.

Una limitación inherente a este estudio consiste en que el propio tejido de la especie estudiada, *X. laevis*, presenta autofluorescencia natural en estadios tempranos del desarrollo. Ello unido a que los anticuerpos utilizados muestran inmunoreactividad a partir del estadio 45 ha hecho necesario que, para la identificación de las células precursoras cardíacas, se haya tenido que recurrir a técnicas de hibridación *in situ*.

- **Estadios 26-28**

En estos estadios, las vesículas ópticas (Fig. 17a) inicialmente protruyen de forma focal y después sufren un aplanamiento. Comienzan a formarse las placodas del cristalino. Se observan los primeros indicios del desarrollo de las placodas olfativas y del estomodeo. Se acentúa la pigmentación en torno a la glándula del cemento, lo que permite su mejor

Figura 17. Estadio 26-28.

17a: Estadio 28. Vista lateral izquierda de un embrión una vez aislado de la membrana que lo recubre. En este estadio aumenta la pigmentación de la glándula del cemento (gc). La aleta caudal recorre el lado dorsal del cuerpo hasta la zona caudal y cubriendo una cuarta parte del lado ventral (asteriscos). La cabeza de flecha indica la yema de la cola. Vo, vesícula óptica. Barra 500 μm .

17b: Estadio 28. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La señal del marcador se halla restringida en este estadio a las zonas en las que se ubican células precardiogénicas (cabeza de flecha) dispuestas de forma bilateral a ambos lados de la línea media y del primer par de arcos aórticos (flecha). gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

17c: Estadio 28. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La señal de expresión del marcador se dispone de manera bilateral a ambos lados de la línea medioventral (cabezas de flecha). gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

17d: Estadio 28. Sección transversal del la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5 y contrastado con rojo neutro. Se aprecia la ubicación bilateral de las células precardiogénicas dispuestas a ambos lados de la línea media ventral. La cabeza de flecha negra marca la zona media ventral. Las cabezas de flecha verdes señalan el límite de expresión de Nkx-2.5. Barra 50 μm .

17e: Estadio 27. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La señal se restringe únicamente a células cardiogénicas que formarán el corazón (cabeza de flecha), las cuales se sitúan a ambos lados de la línea media. gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

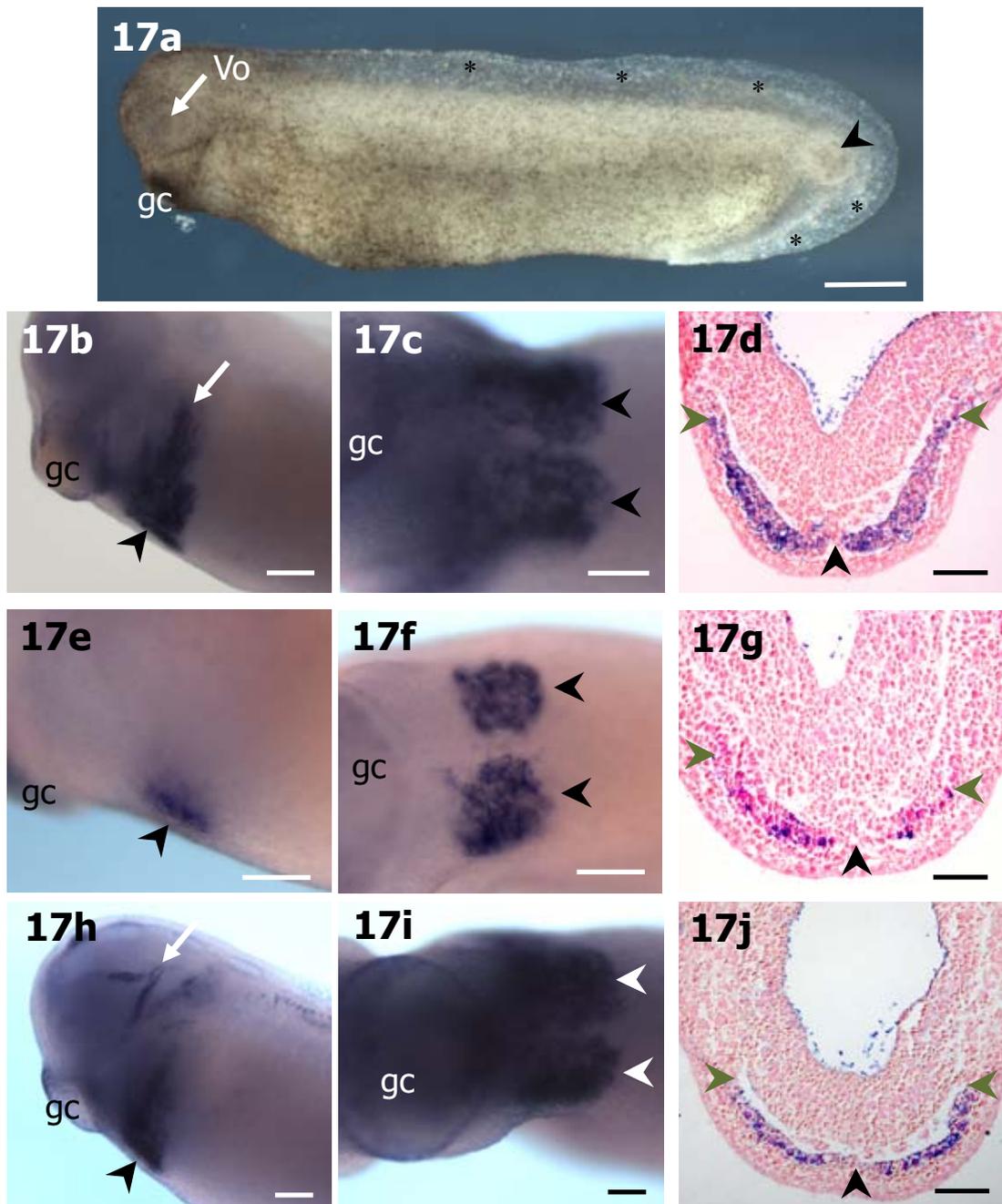
17f: Estadio 27. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. Las cabezas de flecha señalan las células a ambos lados de la línea media, gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

17g: Estadio 27. Sección transversal del la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2 y contrastado con rojo neutro. Se observa la disposición bilateral de las células cardiogénicas que formarán la musculatura cardíaca. La cabeza de flecha negra marca la zona medioventral. Las cabezas de flecha verdes señalan el límite de expresión de XMLC-2. Barra 50 μm .

17h: Estadio 28. Vista lateral izquierda de la parte anterior un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Islet-1. La señal del marcador se halla restringida en este estadio a las zonas en las que se ubican células precardiogénicas (cabeza de flecha) dispuestas de forma bilateral a ambos lados de la línea media y partes del sistema nervioso (flecha). gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

17i: Estadio 28. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Islet-1. La señal de expresión del marcador se dispone formando dos parches a ambos lados de la línea medioventral (cabezas de flecha). gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

17j: Estadio 28. Sección transversal del la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador Islet-1 y contrastado con rojo neutro. Se aprecia la ubicación bilateral de las células precardiogénicas dispuestas a ambos lados de la línea medioventral. La cabeza de flecha negra marca la zona medioventral. Las cabezas de flecha verdes señalan el límite anterior de la expresión de Islet-1. Barra 50 μm .



visualización. Esta glándula ocupa una posición media y ventral en la región cefálica del embrión (Figs. 17a, b). En la región caudal se distingue una membrana transparente que forma una aleta caudal. Ésta se extiende hacia delante por el dorso hasta el final de la región cefálica y por el vientre hasta la posición donde se abrirá el ano en estadios posteriores. En el extremo posterior del cuerpo se identifica claramente la yema de la cola (Fig. 17a).

Con respecto al desarrollo del corazón, se sabe que los precursores cardiogénicos se sitúan bilateralmente por debajo de los bordes antero-laterales de la placa neural. En el presente trabajo, se ha observado, mediante hibridación in situ, que a finales del estadio 26 estas células migran desde su ubicación inicial hasta ocupar una posición bilateral, a ambos lados de la línea medioventral del embrión (Figs. 17b-g) entre la glándula del cemento y el vitelo.

En los estadios 27-28 se reconocen fácilmente las poblaciones de células cardiogénicas por la característica expresión bilateral del gen *Nkx-2.5*, marcador del campo cardíaco primario en el mesodermo precardiaco. Las células que expresan *Nkx-2.5* se disponen bilateralmente, a ambos lados de la línea medioventral (Figs. 17b-d). Además, el marcador *XMLC-2*, específico de la musculatura cardíaca, muestra un patrón de expresión similar al de *Nkx-2.5* en estos estadios (Figs. 17e-g). Cabe destacar que en estos estadios, los genes *Nkx2.5* e *Islet-1* muestran el mismo patrón de expresión en la población de células cardiogénicas (Figs. 17h-j).

- **Estadios 29-30**

En los embriones pertenecientes a estos estadios, la vesícula óptica se encuentra invaginada, pero su porción central es todavía convexa. Vistas externamente, en torno a las vesículas ópticas se aprecia por primera vez un círculo incompleto de pigmento de tonalidad grisácea. En estos estadios la yema de la cola se elonga ligeramente.

En la zona media y dorsal de la capa formada por futuras células miocárdicas comienza a distinguirse una concentración de células que son las precursoras del endocardio prospectivo. La capa de las futuras células miocárdicas se empieza a curvar. Su zona central permanece en posición medioventral y sus bordes laterales se elevan hacia el dorso del embrión. Comienza a apreciarse espacios en torno a las células miocárdicas. Estos espacios constituyen los esbozos de la futura cavidad pericárdica.

- **Estadios 31-32**

Durante estos estadios, el círculo de pigmento que rodea las vesículas ópticas se hace más patente y muestra una forma de herradura. La zona central de la capa retiniana deviene cóncava (Figs. 18a, b). Se distinguen las zonas en donde se van a desarrollar los futuros rudimentos branquiales (Fig. 18b). En el estadio 31 la longitud de la yema de la cola es semejante a su anchura, mientras que a finales del estadio 32 la longitud de dicha yema es una vez y media mayor que su anchura (Fig. 18a).

Las figuras 18c-e, 18f-h y 18i-k muestran los resultados de la hibridación *in situ* para las sondas correspondientes a *Nkx-2.5*, *Islet-1* y *XMLC-2*, respectivamente. Los precursores cardiogénicos, inicialmente bilaterales, se unen en la zona medioventral del embrión. En el estadio 31 se acentúa la curvatura de la capa de miocardio prospectivo, que adquiere la forma de un canal (Fig. 18h) en cuyo interior las futuras células endocárdicas se disponen formando un tubo, el tubo endocárdico (Figs. 18e, h, k). En el estadio 32, los bordes laterales de la capa miocárdica comienzan a fusionarse en sentido caudo-cefálico (Figs. 18 l-n), formándose un tubo recto impar. De forma concomitante, en ambos lados del cuerpo el mesodermo contiguo al miocardio presuntivo acompaña al movimiento de los bordes de la capa miocárdica y se une dorsalmente para constituir el mesocardio dorsal y el techo del pericardio (Figs. 18 m, n). En estos estadios en los que

Figura 18. Estadios 31-32.

18a: Estadio 31. Vista lateral izquierda de un embrión una vez aislado de la membrana que lo recubre. La yema de la cola tiene una longitud similar a su anchura (cabeza de flecha). En este estadio aparecen pigmentos en la vesícula óptica dispuestos en forma de herradura. La flecha señala la vesícula óptica. gc, glándula del cemento. Barra 500 μm .

18b: Estadio 31. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Microfotografía electrónica de barrido. La flecha indica la zona central de la capa retiniana. La cabeza de flecha marca la zona en donde se desarrollarán los rudimentos branquiales. Barra 100 μm .

18c-d: Estadio 31. Vista lateral izquierda (18c) y ventral (18d) de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La señal se restringe al corazón y a los arcos aórticos en desarrollo. La cabeza de flecha señala la zona de expresión del marcador, ocupando el espacio de la línea media. gc, glándula del cemento; M, miocardio. Barra 200 μm .

18e: Estadio 31. Sección transversal de la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5 y contrastado con rojo neutro. Las células precardiogénicas en migración invaden el espacio de la línea media. Las cabezas de flecha verdes señalan el límite de expresión de Nkx-2.5. La flecha marca el endocardio. M, miocardio. Barra 50 μm .

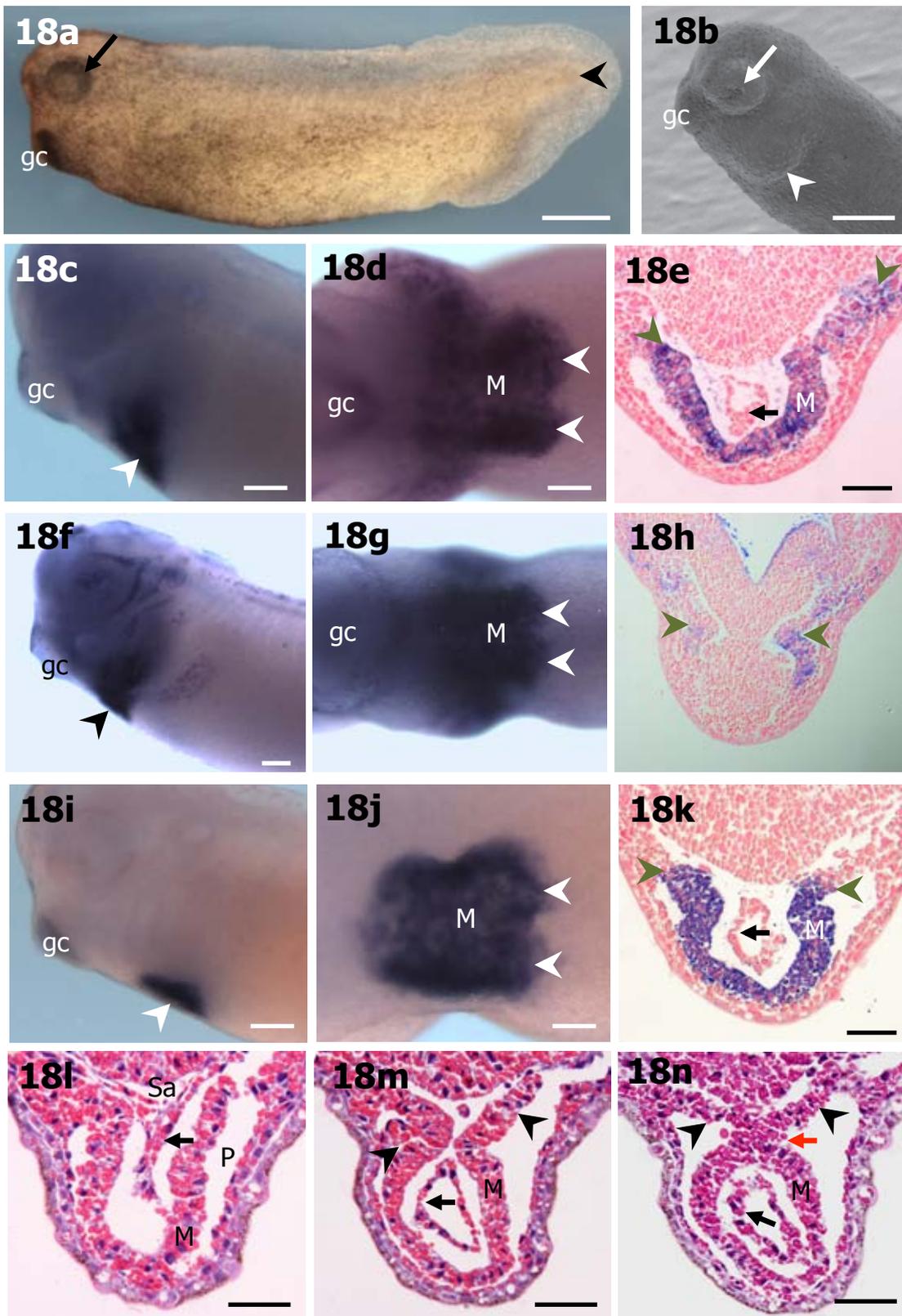
18f-g: Estadio 31. Vista lateral izquierda (18f) y ventral (18g) de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Islet-1. La señal se restringe a la zona en donde se ubica el corazón en desarrollo, arcos aórticos y células nerviosas en formación. 18f: la cabeza de flecha señala la zona de expresión del marcador. 18g: las células precardiogénicas ocupan el espacio de la línea media. Las células del campo cardíaco secundario (cabezas de flecha) y de los arcos aórticos expresan Islet-1. gc, glándula del cemento; M, miocardio. Barra 200 μm .

18h: Estadio 31. Sección transversal de la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador Islet-1 y contrastado con rojo neutro. Las cabezas de flecha verdes señalan el límite dorsal de la expresión de Islet-1. Barra 50 μm .

18i-j: Estadio 31. Vista lateral izquierda (18i) y ventral (18j) de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. 18i: la cabeza de flecha señala la zona de expresión del marcador que se restringe al corazón en desarrollo. 18j: Las células que expresan XMLC-2 se unen en la zona medioventral (cabezas de flecha). gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

18k: Estadio 31. Sección transversal de la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. y contrastado con rojo neutro. La señal del marcador se limita a la zona donde se encuentran los miocardiocitos que forman el corazón. Las cabezas de flecha marcan el límite anterior de la expresión de XMLC-2. La flecha indica la ubicación del endocardio. M, miocardio. Barra 50 μm .

18l-n: Estadio 32. Sección transversal. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. 18l: zona cefálica del corazón, el tubo endocárdico situado en la porción cefálica se ensancha para formar el saco aórtico (Sa). La flecha marca el endocardio. 18m: zona media del corazón, s posible diferenciar una capa miocárdica que contiene internamente una capa endocárdica (flecha). Las cabezas de flecha señalan el techo del pericardio. 18n: zona caudal del corazón, a flecha roja indica el comienzo de la fusión de la capa miocárdica. La flecha marca el endocardio. Las cabezas de flecha señalan el techo del pericardio. M, miocardio; P, cavidad pericárdica. Barra 50 μm .



se está formado tubo de cardíaco, los dominios de expresión de *Nkx-2.5* y *Islet-1* comienzan a separarse y la zona de solapamiento entre ambos marcadores disminuye notablemente en sentido del eje antero-posterior. La señal de *Islet-1* es más anterior a la que presenta *Nkx-2.5*. La señal de los transcritos de *XMLC-2* coincide con la expresión del marcador *Nkx-2.5*.

En el extremo anterior del cuerpo la capa miocárdica permanece abierta y el tubo endocárdico situado en su interior se ensancha hacia la zona anterior para formar el saco aórtico. Éste está situado en el exterior de la cavidad pericárdica (Figs. 18l, m) y se prolonga hacia delante, bifurcándose en dos ramas izquierda y derecha, inicialmente ciegas. Al cabo de un par de horas dichas ramas se extienden para conectarse con el primer par de arcos aórticos (Fig. 18l).

El extremo posterior del tubo endocárdico se ensancha y forma el primordio del seno venoso, que está situado en el interior de la cavidad pericárdica. Esta cavidad no está aislada, sino que se comunica con el resto del celoma del embrión. Caudalmente, el seno venoso se extiende lateralmente y se continúa, ya fuera de la cavidad pericárdica con los conductos de Cuvier que recorren la superficie dorsal del primordio hepático. En estos estadios el corazón primitivo está compuesto por una capa externa, miocárdica, y una interna, endocárdica. Entre ambas capas hay una banda gruesa de gelatina cardíaca carente totalmente de células, que constituye el material extracelular del corazón en desarrollo. Los miocardiocitos tienen una apariencia más o menos cúbica, mientras que las células endocárdicas son aplanadas. Los núcleos de células endocárdicas ocupan la mayor parte del citoplasma y protruyen hacia el lumen. Ambos tipos celulares, las células miocárdicas y las endocárdicas, presentan en su matriz celular gran cantidad de gotas lipídicas y una morfología homogénea a lo largo de todo el eje céfalo-caudal del tubo cardíaco (Figs. 18l-n).



En estos estadios el intestino anterior es un tubo endodérmico sencillo con forma ovalada. En las secciones histológicas correspondientes aún no se ha identificado el primordio del tracto respiratorio.

- **Estadios 33-34**

En el extremo anterior del embrión, donde se abrirá la boca primitiva, se produce una invaginación del estomodeo que tiene forma de un surco vertical estrecho. La zona dorsal del ojo en formación está más pigmentada que la ventral y se comienza a distinguir la placoda del cristalino sobre las vesículas ópticas. Aparecen melanóforos en la parte dorsal de la cabeza y en la zona media lateral formando un arco que se extiende desde la zona dorsal a la zona ventral a ambos lados del cuerpo. La longitud de la cola es aproximadamente el doble que su anchura (Fig. 19a).

El tubo cardíaco continúa su desarrollo, observándose un aumento en la cantidad de células precardiogénicas localizadas en la zona medioventral del embrión (Figs. 19b-e). El tubo cardíaco se curva en los planos sagital y frontal (Figs. 19d, f). La capa miocárdica tiene un grosor semejante a lo largo del tubo cardíaco. En cambio, la gelatina cardíaca es más gruesa en la región del salida, que es anterior y está situada a la derecha con respecto al plano sagital, y más delgada en la región de entrada, posterior e izquierda (Figs. 19f-h). En estos estadios comienza a latir el corazón en desarrollo.

- **Estadios 35-36**

El embrión presenta los ojos casi completamente negros y la fisura corioidea está prácticamente cerrada (Fig. 20a). La invaginación del estomodeo adquiere una forma circular. La glándula del cemento está pigmentada. Externamente, se distingue un par de rudimentos branquiales, de los cuales el anterior presenta en su margen posterior un saliente en forma de yema (Fig. 20b).

Figura 19. Estadios 33-34.

19a: Estadio 33-34. Vista lateral izquierda de un embrión una vez aislado de la membrana que lo recubre. Se produce la invaginación de la zona en donde se formará la boca (flecha). En la zona dorsal del ojo en formación se observa una mayor concentración de pigmentos (cabeza de flecha). La longitud de la yema de la cola es una y media mayor que su anchura. gc, glándula del cemento. Barra 1 mm.

19b: Estadio 33-34. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. El tubo cardíaco continúa su desarrollo curvándose hacia el lado izquierdo del embrión (cabeza de flecha). gc, glándula del cemento Barra 200 μm .

19c: Estadio 33-34. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La expresión del marcador Nkx-2.5 favorece la visualización de las células del campo cardíaco primario que está formando el tubo cardíaco (cabeza de flecha). Barra 200 μm .

19d: Estadio 33-34. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La expresión del marcador permite visualizar el comienzo de los movimientos morfogenéticos que favorecen la formación de la configuración definitiva del corazón (cabezas de flecha). Barra 200 μm .

19e: Estadio 33-34. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La zona anterior del tubo cardíaco es más estrecha (cabezas de flecha). En la zona posterior se ensancha para continuar el desarrollo del seno venoso. Barra 200 μm .

19f: Estadio 33-34. Sección transversal del la zona cefálica del corazón en formación. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. El tubo cardíaco muestra una orientación hacia la derecha. En esta porción la gelatina cardíaca presenta un espesor menor y el lumen del tubo se estrecha. La flecha señala la capa de células endocárdicas. M, miocardio; P, cavidad pericárdica. Barra 50 μm .

19g: Estadio 33-34. Sección transversal del la zona media del corazón en formación. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. El tubo cardíaco continua estando a la derecha del embrión. La flecha señala la capa de células endocárdicas. M, miocardio; P, cavidad pericárdica. Barra 50 μm .

19h: Estadio 33-34. Sección transversal del la zona caudal del corazón en formación. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En esta zona el tubo cardíaco presenta una torsión hacia la izquierda. La cabeza de flecha indica el mesocardio dorsal. La flecha señala la capa de células endocárdicas. M, miocardio; P, cavidad pericárdica. Barra 50 μm .

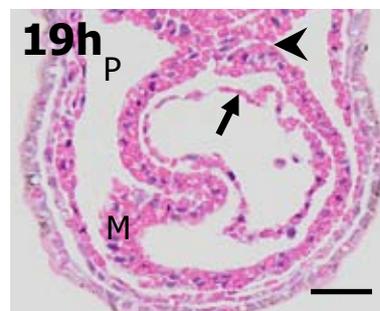
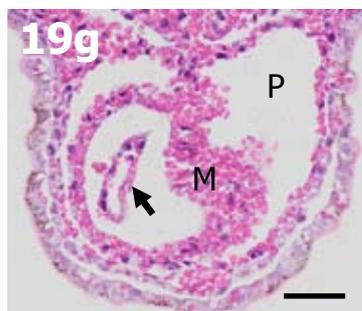
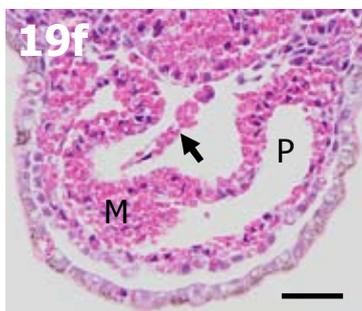
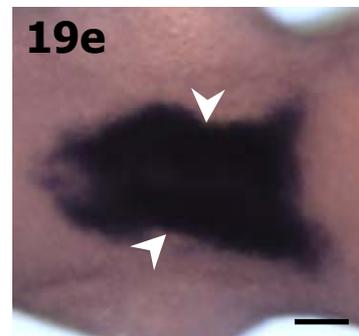
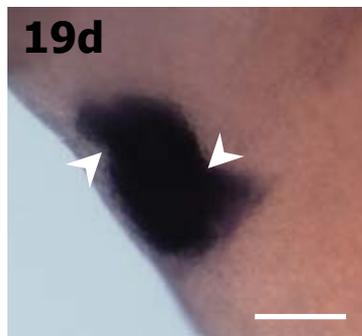
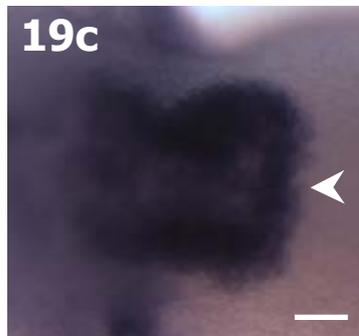
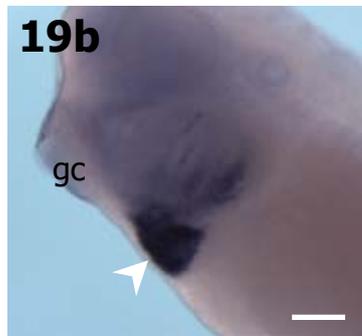


Figura 20. Estadios 35-36.

20a: Estadios 35-36. Vista lateral izquierda de un embrión. Los ojos se encuentran completamente pigmentados y la fisura coroidea se está cerrando (cabeza de flecha). La glándula del cemento (gc) adquiere una pigmentación marrón-parduzca. Los rudimentos branquiales se distinguen a ambos lados del embrión (asteriscos). La flecha roja indica la zona en la que se abrirá, en estadios posteriores, el ano. En estos estadios aparecen melanóforos en la zona dorsal del embrión que se indican con una flecha blanca. Barra 500 μm .

20b: Estadios 35-36. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Microfotografía electrónica de barrido. Los asteriscos indican los dos rudimentos branquiales, de los cuales el rudimento anterior presenta una forma de yema prominente (flecha). Barra 50 μm .

20c: Estadios 35-36. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La señal del marcador es visible en la zona en donde se encuentran las células que forma parte del corazón en formación (cabeza de flecha). El corazón no está alineado a lo largo del eje antero-posterior como en los estadios precedentes. Es posible además observar la señal que se corresponde con el primer y segundo arco branquial. gc, glándula del cemento; O, ojo. Barra 200 μm .

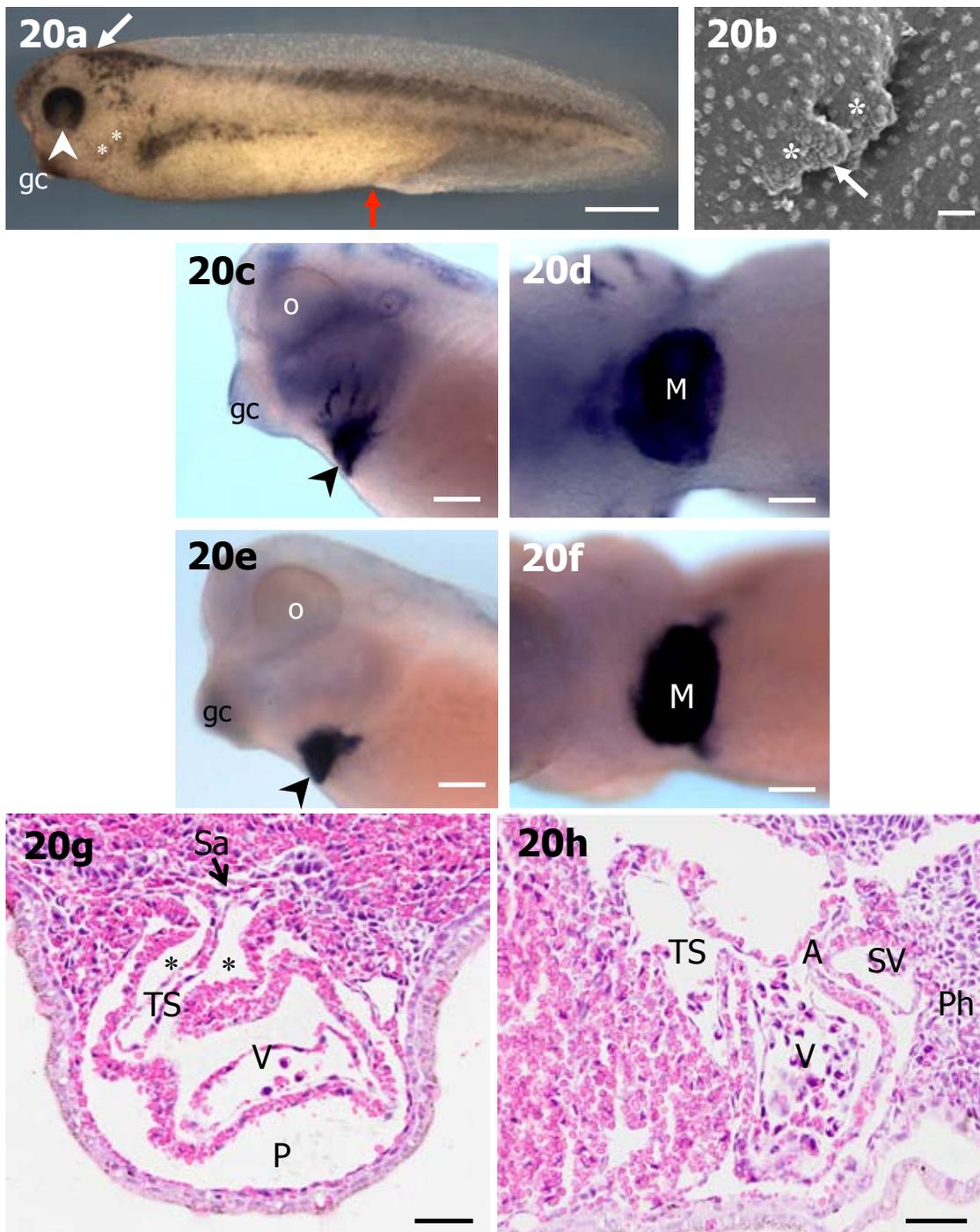
20d: Estadios 35-36. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La señal del marcador permite observar la forma característica de "C" que es patente en este estadio. M, miocardio. Barra 200 μm .

20e: Estadios 35-36. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La señal del marcador es específica para los miocardiocitos que forman el corazón (cabeza de flecha), lo cual permitió realizar un seguimiento de los movimientos morfogenéticos. gc, glándula del cemento; O, ojo. Barra 200 μm .

20f: Estadios 35-36. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La zona posterior del seno venoso adquiere forma de herradura. M, miocardio. Barra 200 μm .

20g: Estadio 35-36. Sección transversal del la zona media del corazón en formación. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En este estadio el corazón adquiere una forma de "C". El tracto de salida (TS) se continúa desarrollando en dirección cefálica hasta conectarse con el saco aórtico (Sa) y, posteriormente, con el primer par de arcos aórticos. Los asteriscos señalan la gruesa banda de gelatina cardíaca presente en el corazón en desarrollo. P, cavidad pericárdica; V, ventrículo. Barra 50 μm .

20h: Estadio 35-36. Sección sagital del la zona media del corazón en formación. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En este estadio es posible visualizar las diferentes regiones en donde se desarrollarán las cámaras: seno venoso (SV), atrio (A), ventrículo (V), tracto de salida (TS). Ph, primordio hepático. Barra 50 μm .



Aparecen melanóforos a lo largo de la zona dorsal del embrión. La yema de la cola se elonga y presenta una membrana transparente que recubre tanto la zona ventral como la dorsal. La longitud de la yema de la cola es aproximadamente tres veces mayor que su anchura (Fig. 20a). A finales del estadio 36 se produce la eclosión del embrión.

Al inicio de estos estadios el tubo cardíaco continúa curvándose adquiriendo una forma de “S” en vista lateral. En cambio, visto dorsalmente, el corazón no está alineado a lo largo del eje antero-posterior, sino que se curva en el sentido contrario a las agujas de reloj, adoptando una forma de “C”. El resultado de estos movimientos morfogenéticos es asimismo patente tras la realización de la hibridación *in situ* (Figs. 20c-f). La posición relativa de las cámaras del corazón en desarrollo es la siguiente. El futuro TS asciende casi verticalmente, girando 90° antes de extenderse en dirección anterior hacia el saco aórtico y conectar con el primer par de arcos aórticos. La porción anterior del TS se sitúa medialmente, mientras que su porción posterior está desplazada hacia el lado derecho (Fig. 20g). En cuanto al ventrículo en desarrollo, su porción anterior se sitúa a la derecha del embrión y su porción posterior a la izquierda (Fig. 20g). La región posterior del tubo cardíaco, que corresponde al atrio y el seno venoso prospectivos, se ubica en posición dorsal e izquierda (Fig. 20h).

La región del TS y el ventrículo se diferencia de la del atrio y el seno venoso por el distinto grosor de sus respectivas capas miocárdicas, siendo la más delgada la de la región del atrio y el seno venoso. La gelatina cardíaca, que se dispone entre el miocardio y el endocardio, está totalmente desprovista de células (Figs. 20g, h). La superficie externa del miocardio se halla en contacto directo con el fluido de la cavidad pericárdica. No se identifica epicardio en estos estadios del desarrollo (Figs. 20g, h). Las paredes dorsales del seno venoso constan de una capa miocárdica

dispuesta sobre el endocardio que extiende hasta la zona de bifurcación de esta cámara. Sin embargo, ventralmente el endocardio del seno venoso contacta directamente con el tejido del primordio hepático. Dicho primordio cierra la mitad ventral de la parte posterior de la cavidad pericárdica (Fig. 20j). Cabe indicar que, en estos estadios, comienzan a identificarse células sanguíneas en el interior del tubo cardíaco (Figs. 20g, h).

- **Estadios 37-38**

En estos estadios, la invaginación del estomodeo se ha hecho más profunda con respecto a los estadios 35-36 y la abertura conserva un aspecto redondeado. Ambos rudimentos branquiales tienen en sus márgenes posteriores unos salientes en forma de yema (Figs. 21a, b). Internamente en los ojos en desarrollo se distinguen las placodas del cristalino sobre las vesículas ópticas. Los melanóforos se transfieren desde la zona dorsal del embrión hacia la aleta que bordea la parte dorsal del tronco y la zona caudal. Las células pigmentarias alcanzan el extremo posterior de la cola a finales del estadio 38. La línea posterior del proctodeo es recta, formando un ángulo obtuso con los miotomos del borde ventral de la cola (Fig. 21a). Los renacuajos se mueven rítmicamente de un lado a otro.

La expresión del marcador Nkx-2.5 se observa en los arcos branquiales cuarto, quinto y sexto, primordio hepático y en todo el corazón en formación (Figs. 21c-e). La señal de expresión del marcador Twist-1 se ubica en las células mesenquimáticas dispuestas en la zona anterior del corazón en formación (Figs. 21 f-h).

En las primeras horas del estadio 37 el tubo cardíaco y la cavidad pericárdica aumentan su tamaño en el eje dorso-ventral. El TS está tapizado internamente por un endocardio compuesto por células aplanadas. La gelatina cardíaca forma una capa cuyo grosor es homogéneo a lo largo

del TS (Fig. 21i). En la zona más cercana al límite anterior de la cavidad pericárdica, las células miocárdicas que forman la capa externa del TS son más redondeadas, se disponen en un par de estratos y contienen gotas lipídicas (Fig. 21i). En el ventrículo prospectivo la capa de gelatina cardíaca se adelgaza y el endocardio está focalmente en contacto con la capa

Figura 21. Estadios 37-38.

21a: Estadio 37-38. Vista lateral izquierda de un embrión. La línea caudal de proctodeo forma un ángulo obtuso (cabeza de flecha). Ambos rudimentos branquiales adquieren forma de yema (fechas). gc, glándula del cemento. Barra 1 mm.

21b: Estadio 37-38. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Ambos rudimentos branquiales presentan forma de yema (flechas). gc, glándula del cemento. Barra 500 μm .

21c: Estadios 37-38. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La señal del marcador permite identificar las células que forma parte del corazón en formación (cabeza de flecha). Además, se observa marca en el primordio hepático y en los arcos aórticos quinto y sexto. Barra 200 μm .

21d: Estadios 37-38. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La señal del marcador permite observar las células cardiogénicas y los arcos aórticos. Barra 200 μm .

21e: Estadio 37-38. Sección transversal de la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5 y contrastado con rojo neutro. La señal del marcador se observa hasta el límite anterior del miocardio (cabezas de flecha) y los arcos aórticos. P, cavidad pericárdica; TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 50 μm .

21f: Estadios 37-38. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Twist. Dicho marcador se expresa en las células derivadas de la cresta neural (cabeza de flecha). Barra 200 μm

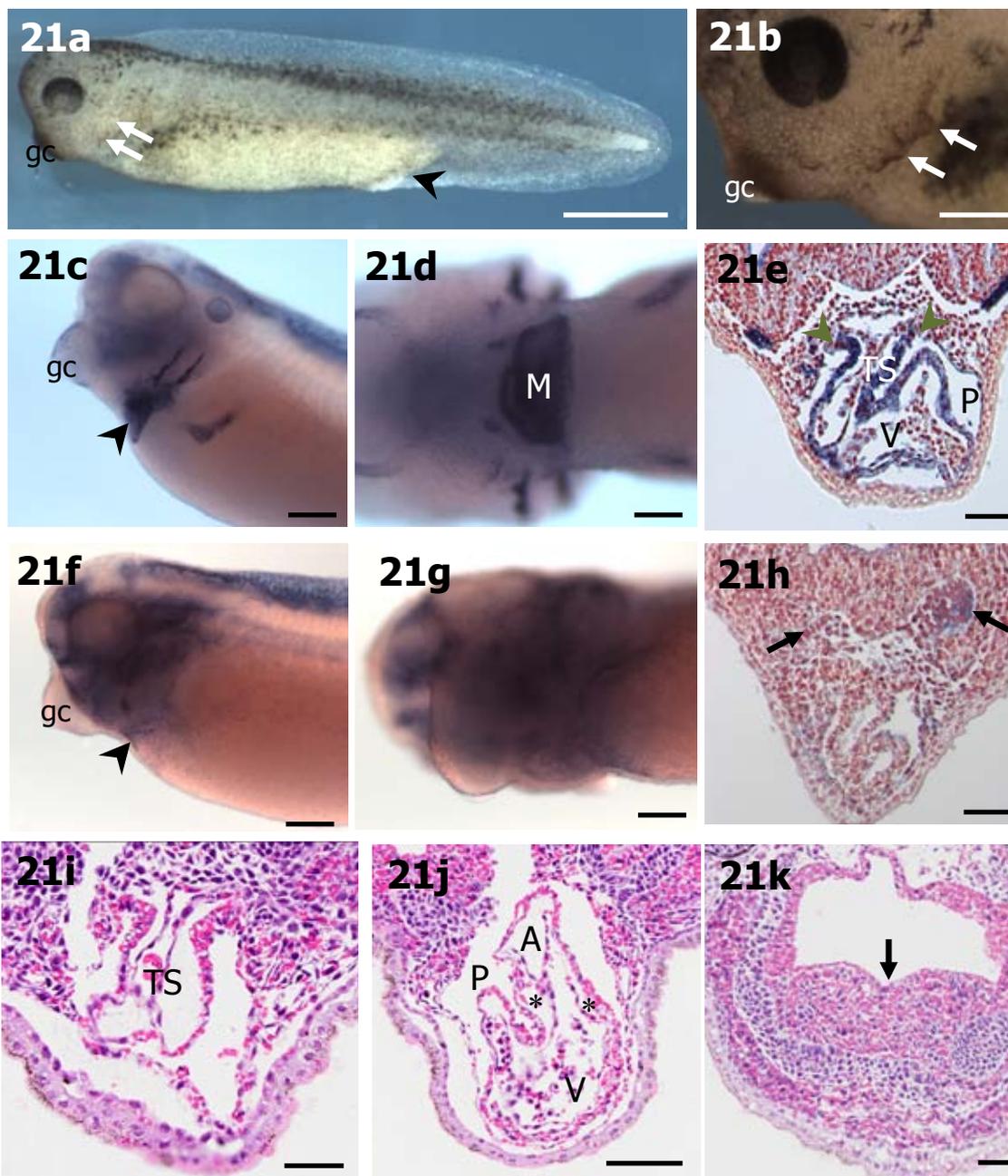
21g: Estadios 37-38. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Twist. La señal se observa específicamente en la zona anterior del corazón. Barra 200 μm .

21h: Estadio 37-38. Sección transversal de la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador Twist y contrastado con rojo neutro. La señal de Twist se ubica en las células mesenquimáticas dispuestas en posición anterior al corazón (flechas). Barra 50 μm .

21i: Estadio 37-38. Sección transversal de la zona media del corazón en formación del embrión. En el tracto de salida aumenta la cantidad de gelatina cardíaca (asteriscos) dispuesta entre el endocardio y el miocardio (M). Los miocardiocitos contienen en su citoplasma una mayor concentración de gotas lipídicas. P, pericardio. Barra 50 μm .

21j: Estadio 37-38. Sección transversal de la zona caudal del corazón en formación. En la zona en donde se formarán las futuras válvulas atrioventriculares se produce un engrosamiento de la gelatina cardíaca (asteriscos). A, atrio; P, cavidad pericárdica; V, ventrículo. Barra 100 μm .

21k: Estadio 37-38. Sección transversal de la zona posterior a los ojos. La flecha señala la zona en la que comienza el desarrollo del surco laringotraqueal. Barra 100 μm .



miocárdica, lo que proporciona un aspecto festoneado a la pared ventricular. En la región atrioventricular se identifican engrosamientos de la gelatina cardíaca que son precursores de los futuros cojines endocárdicos que darán lugar a las válvulas atrioventriculares (Fig. 21j). En estos estadios no se observan células mesenquimáticas en el interior de la gelatina cardíaca. En estos estadios comienza a ser visible los primeros indicios de la formación del surco laringotraqueal (Fig. 21k).

- **Estadio 39**

En el renacuajo la abertura de la invaginación estomodeica se hace más profunda y se extiende a izquierda y derecha. Aparecen grandes melanóforos distribuidos focalmente en áreas características de la cabeza, la cola y el tronco. En la zona cefálica los melanóforos se ubican en la parte dorsal y alrededor de las fosas nasales y de la glándula del cemento. En la región del tronco gran parte de los melanóforos se concentran formando sendas franjas pigmentadas a ambos lados de la línea mediodorsal, que se continúan a lo largo de la cola. En ésta hay manchas pigmentarias alineadas a lo largo del margen ventral de la musculatura (Fig. 22a).

La expresión de los factores de transcripción XMLC-2 y Nkx-2.5 permitieron identificar la posición que ocupan las diferentes cámaras del corazón en desarrollo en este estadio (Fig. 22 b-g). La torsión en espiral del corazón en desarrollo provoca que éste se comprima a lo largo del eje antero-posterior. Así, el ventrículo queda situado en posición ventral con respecto al atrio y al TS (Fig. 22c y f).

Las paredes derecha e izquierda del saco aórtico forman sendos acúmulos de células mesenquimáticas, con un alto contenido de gotas lipídicas que ocupan todo su citoplasma (Fig. 22k). La pared derecha del saco aórtico se encuentra más engrosada que la del lado izquierdo. Las células

mesenquimáticas que la componen parecen desprenderse desde la pared del saco aórtico hacia el interior del TS (Fig. 22k). Dichas células pueden contribuir a la formación de la cresta espiral. Cabe señalar que en este estadio estas células no invaden la gelatina cardíaca de los cojines endocárdicos distales en formación, lo que coincide con las células mesenquimáticas que migran desde el saco aórtico.

El cojín precursor de la cresta espiral continúa su desarrollo en sentido céfalo-caudal, de modo que en su extremo anterior su tamaño es mayor y presenta una mayor cantidad de células endocárdicas que en su extremo posterior (Fig. 22k).

En este estadio, el miocardio ventricular aumenta de grosor y comienza la formación de trabéculas, las cuales están en gran parte confinadas a la curvatura externa de la pared ventrolateral, proyectándose desde allí hacia el lumen ventricular (Fig. 22l). La trabeculación del ventrículo continúa durante estadios sucesivos hasta etapas posteriores a la metamorfosis. Con respecto al TS, la capa miocárdica está formada por una única fila de células cúbicas que contienen una proporción mayor de gotas lipídicas con respecto al resto de las cámaras. Los resultados de la hibridación *in situ* ponen de manifiesto que la capa miocárdica del TS se extiende hasta el límite anterior de la cavidad pericárdica (Figs. 22d y g). En todas las cámaras cardíacas en formación, el endocardio permanece formado por una única fila de células aplanadas, salvo en la zona de los cojines endocárdicos que originarán las válvulas atrioventriculares (Fig. 22m). En esta región se distingue un pliegue del tubo cardíaco que separa las cámaras atrial y ventricular. En los cojines atrioventriculares en desarrollo se aprecia un mayor grosor de la gelatina cardíaca y las células endocárdicas adquieren una morfología cúbica y se organizan en una sola capa compacta. Esta disposición constituye el primer signo de la formación de los cojines endocárdicos precursores de las válvulas atrioventriculares (Fig. 22m).

Figura 22. Estadios 39.

22a: Estadio 39. Vista lateral izquierda de un embrión. Los melanóforos se hallan distribuidos por la zona dorsal de la cabeza y en la glándula del cemento (gc). En el tronco las células pigmentarias se disponen a ambos lados de la línea media dorsal. La cabeza de flecha marca la línea caudal de proctodeo. Barra 1 mm.

22b: Estadio 39. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. La marca se halla en las células cardiogénicas (cabeza de flecha), los arcos aórticos y en los cartílagos en formación de la zona craneal. gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

22c: Estadio 39. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5. El corazón en desarrollo se halla más comprimido que en estadios anteriores. Nkx-2.5 se encuentra presente también en los precursores de la faringe (cabezas de flecha) y en los arcos aórticos. Barra 200 μm .

22d: Estadio 39. Sección transversal de la zona cefálica del corazón en formación del embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Nkx-2.5 y contrastado con rojo neutro. La señal del marcador Nkx-2.5 se extiende hasta el límite anterior del pericardio (cabezas de flecha). La flecha señala el endocardio. M, miocardio; P, cavidad pericárdica. Barra 50 μm .

22e: Estadio 39. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La señal de expresión es exclusiva de las células cardiogénicas (cabeza de flecha), lo que permite comparar los resultados obtenidos con el marcador Nkx-2.5 y delimitar la zona en la que participan las células del campo cardíaco primario. gc, glándula del cemento. Barra 200 μm .

22f: Estadio 39. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La señal de expresión se extiende sobre la porción cefálica del primordio hepático en donde se ubica el seno venoso en formación (cabezas de flecha). Barra 200 μm .

22g: Estadio 39. Sección transversal del la zona cefálica del corazón en formación. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2 y contrastado con rojo neutro. La señal de este marcador coincide con la indicada en la figura 22d para Nkx-2.5. Las cabezas de flecha indican el límite anterior de la expresión de XMLC-2. La flecha señala el endocardio. M, miocardio; P, cavidad pericárdica. Barra 50 μm .

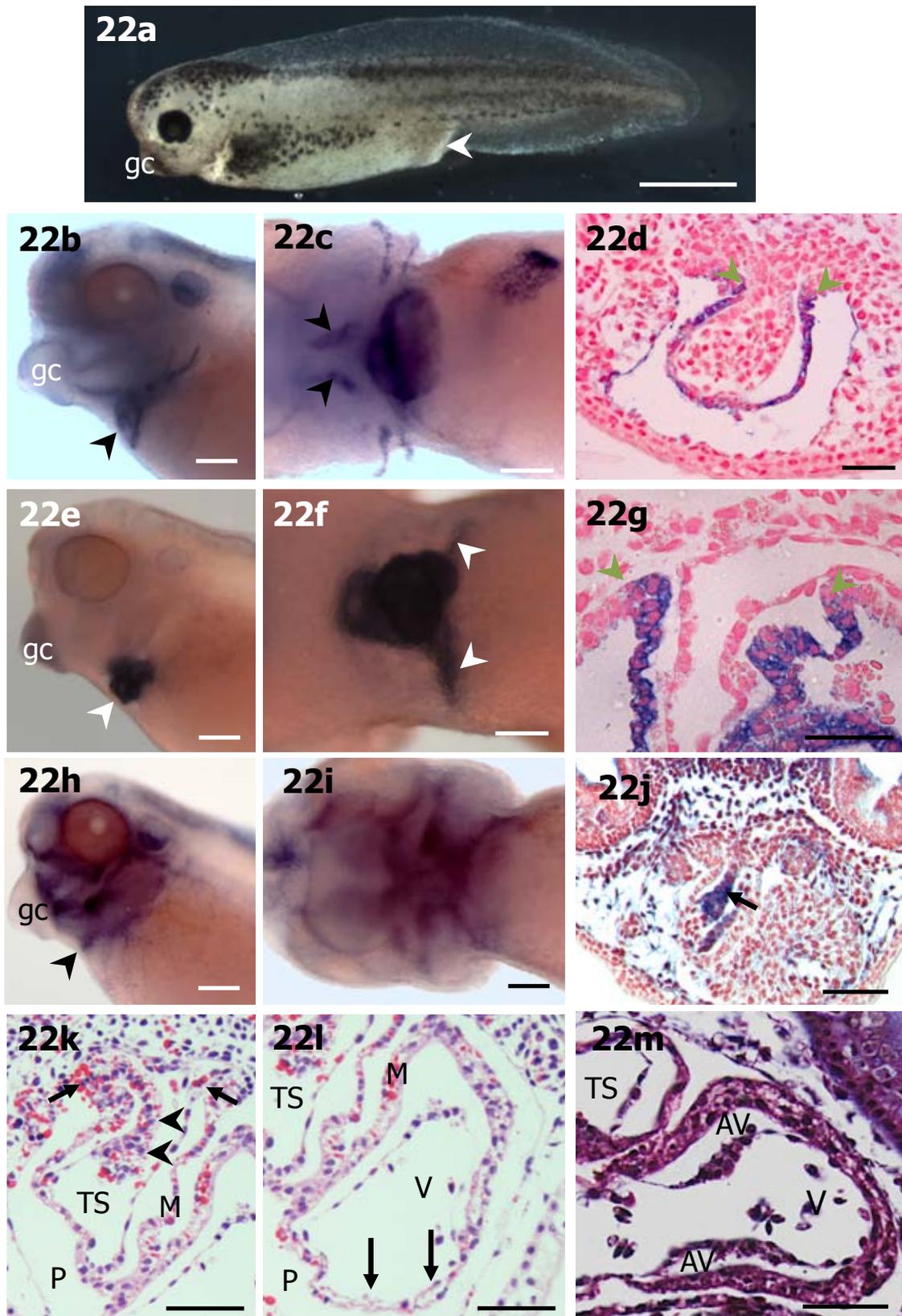
22h: Estadios 39. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador twist. Dicho marcador se expresa en células que derivan de la cresta neural. En el corazón, únicamente se expresa en células del tracto de salida (cabeza de flecha). Barra 200 mm

22i: Estadios 39. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador Twist. La señal se observa débilmente desde esta ubicación anatómica. Barra 200 μm .

22j: Estadio 39. Sección transversal de la zona cefálica del corazón. Hibridación *in situ* con el marcador Twist y contrastado con rojo neutro. La señal de expresión (flecha) se observa específicamente en la zona anterior del corazón, en la posición que ocupará la futura cresta espiral. P, cavidad pericárdica; TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 50 μm .

22k-l: Estadio 39. Sección transversal de la parte anterior del embrión. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En las paredes del saco aórtico es posible visualizar acúmulos de células que contienen en su citoplasma una gran cantidad de gotas lipídicas (flechas). Las cabezas de flecha señalan los cúmulos de células, que migran hacia el interior del tracto de salida (TS). En este estadio se observan las primeras evidencias del desarrollo de las trabéculas ventriculares, con un aumento de la gelatina cardíaca de la pared ventro-lateral (flechas). M, miocardio; P, cavidad pericárdica; V, ventrículo. Barra 50 μm .

22m: Estadio 39. Sección frontal del corazón en desarrollo. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. El endocardio de la zona en donde se formarán la válvulas atrioventriculares (AV) comienza a engrosarse y sus células se agrupan tomando una morfología globosa. TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 50 μm .



- **Estadio 40**

En este estadio los ojos están muy desarrollados y presentan la retina pigmentada. La cavidad óptica encierra el cristalino. Se perfora la membrana bucal y la boca está totalmente abierta (Figs. 23a, b). La longitud de los rudimentos branquiales es dos veces su anchura. Comienza la circulación

Figura 23. Estadios 40.

23a: Estadio 40. Vista lateral izquierda de un embrión. En este estadio se elongan los rudimentos branquiales (flechas). En la zona medio ventral, el proctodeo forma un ángulo de 90° con los miotomos de la cola (cabeza de flecha). gc, glándula del cemento. Barra 1 mm.

23b: Estadio 40. Vista cefálica izquierda de la parte anterior de un embrión. Microfotografía electrónica de barrido. En este estadio se perfora la membrana bucal. Las flechas indican los rudimentos branquiales que son más largos que anchos. La glándula del cemento (gc) es más prominente que en los estadios anteriores. El asterisco marca la boca. O, ojo. Barra 300 μm.

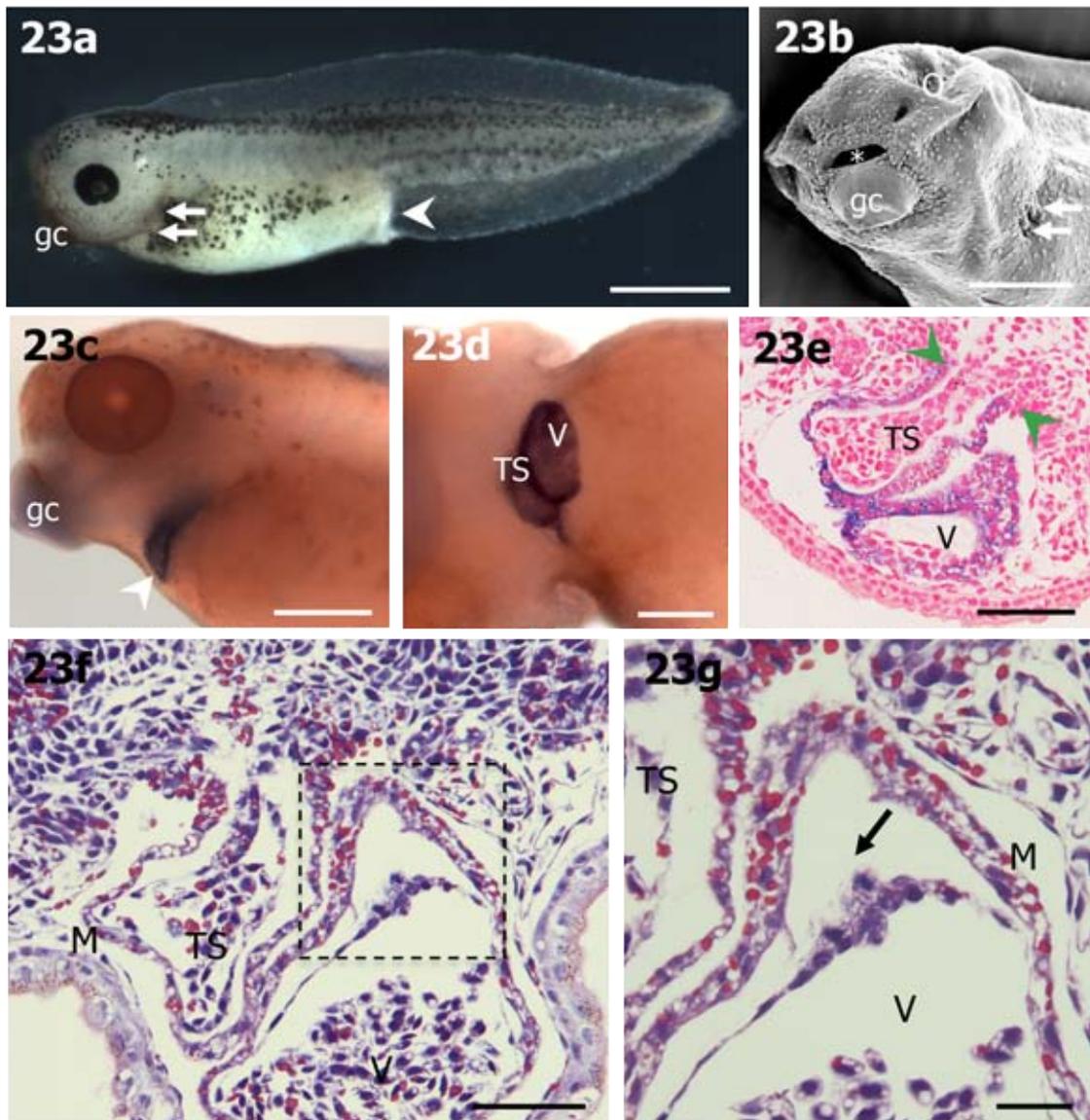
23c: Estadio 40. Vista lateral izquierda de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. En esta imagen se observa que la señal del marcador es específica para células cardiogénicas (cabeza de flecha). gc, glándula del cemento. Barra 400 μm.

23d: Estadio 40. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La señal del marcador permite identificar la posición relativa del corazón en desarrollo. El ventrículo (V) ocupa una posición sinistro-ventral, con el atrio y tracto de salida (TS) en posición ventral. Barra 200 μm.

23e: Estadio 40. Sección transversal de la zona cefálica del embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2 y contrastado con rojo neutro. En esta imagen se indica con cabezas de flecha que la señal del marcador se extiende hasta el extremo cefálico del tracto de salida (TS). V, ventrículo. Barra 100 μm.

23f: Estadio 40. Sección transversal de la zona cefálica del embrión. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En el tracto de salida (TS), las células que conforman la pared de los cojines endocárdicos presentan una morfología globosa. La zona que aparece en el recuadro se muestra ampliada en la figura 23g. M, miocardio; V, ventrículo. Barra 50 μm.

23g: Estadio 40. Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de la figura 23f. Las células endocárdicas cercanas (flecha) al cojín de las válvulas atrioventriculares comienzan a migrar hacia el seno de la gelatina cardíaca. M, miocardio; TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 20 μm.



sanguínea en las branquias. La zona exterior de los miotomos de la cola y el proctodeo forman un ángulo de 90° (Fig. 23a). Se produce una importante retracción del vitelo. Internamente, el endodermo que constituye el suelo de la faringe forma una incipiente invaginación en forma de surco en su superficie ventral, que constituye el primer indicio del futuro surco laringotraqueal. Esta invaginación de origen epitelial constituye el primordio de la tráquea, de los bronquios y de los alveolos pulmonares.

En las figuras 23c-e se muestra el resultado de la hibridación *in situ* para detectar la expresión de *XMCL-2*, que marca específicamente todo el corazón del renacuajo. El ventrículo ocupa una posición sinistro-ventral. El atrio y el TS se ubican dorsalmente con respecto al ventrículo. La hibridación *in situ* pone de manifiesto que los transcritos se extienden hasta el extremo cefálico del TS, donde se encuentra la pared anterior de la cavidad pericárdica (Fig. 23e). En este estadio la pared de la porción distal del TS experimenta cambios con respecto a estadios previos. En esta zona las células del endocardio no muestran una morfología aplanada, sino redondeada y con núcleos voluminosos que ocupan buena parte del citoplasma. Coincidiendo con la localización de estas células endocárdicas de morfología singular, en la capa miocárdica las células conservan un aspecto redondeado y contienen gotas lipídicas, como en estadios previos (Fig. 23f). Es en esta zona del TS donde se formarán los cojines endocárdicos precursores de las válvulas de la hilera distal.

La gelatina cardíaca de los cojines atrioventriculares comienza a poblarse de células mesenquimáticas procedentes del endocardio. El endocardio de esta zona presenta células más o menos redondeadas (Fig. 23g).



- **Estadio 41**

Las branquias son más anchas y aplanadas. El proctodeo adquiere una forma cónica formando un ángulo de 60° con respecto a los miotomos de la cola (Fig. 24a). Ventralmente, en la mitad izquierda de la región del tronco se aprecia una ligera invaginación que constituye el primer indicio de los movimientos de torsión que experimenta el intestino en el curso del desarrollo (Fig. 24b). El surco laringotraqueal, a partir del cual se formará el tracto respiratorio, se hace más profundo y se prolonga caudalmente (Fig. 24c).

Las células mesoteliales celómicas, que recubren la zona derecha del seno venoso, comienzan a migrar y forman un cúmulo cónico de células en la pared derecha del pericardio, que constituye el denominado proepicardio. Dichas células tienen un aspecto globoso y un tamaño mayor que el resto del mesotelio pericárdico. A finales del estadio 41, el cúmulo de células proepicárdicas comienza a proyectarse hacia el ventrículo y contacta con su zona dextro-lateral, estableciéndose un puente tisular que facilita la transferencia de células desde el proepicardio al ventrículo (Figs. 24d, e). Este proceso, que progresa hacia otras cámaras cardíacas, se complementa por la adhesión de grupos de células flotantes que se desprenden del proepicardio y se desplazan en el interior de la cavidad pericárdica hasta contactar con la superficie cardíaca.

En la figura 24f se muestra que la totalidad del TS es de naturaleza miocárdica. En el TS las células endocárdicas que tapizan los cojines distales contienen numerosas gotas lipídicas de pequeño tamaño. Los miocardiocitos de dicha región poseen grandes gotas lipídicas y tienen mayor tamaño que los del resto del TS (Fig. 24g). En la región anterior de estos cojines la gelatina cardíaca comienza a poblarse de células que se sitúan bajo la capa

Figura 24. Estadios 41.

24a: Estadio 41. Vista lateral izquierda de un embrión. El proctodeo forma un ángulo de 60° con los miotomos de la cola (cabeza de flecha). En este estadio aumenta la abundancia de melanóforos en el embrión. gc, glándula del cemento. Barra 1 mm.

24b: Estadio 41. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Se observan los primeros indicios de los movimientos de torsión que sufre el intestino. La flecha marca un pequeño pliegue en la zona ventro-lateral derecha del intestino. Barra 500 μm.

24c: Estadio 41. Sección transversal de la zona anterior del embrión. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. El surco laringotraqueal (flecha) se hace más profundo y se prolonga caudalmente. Barra 100 μm.

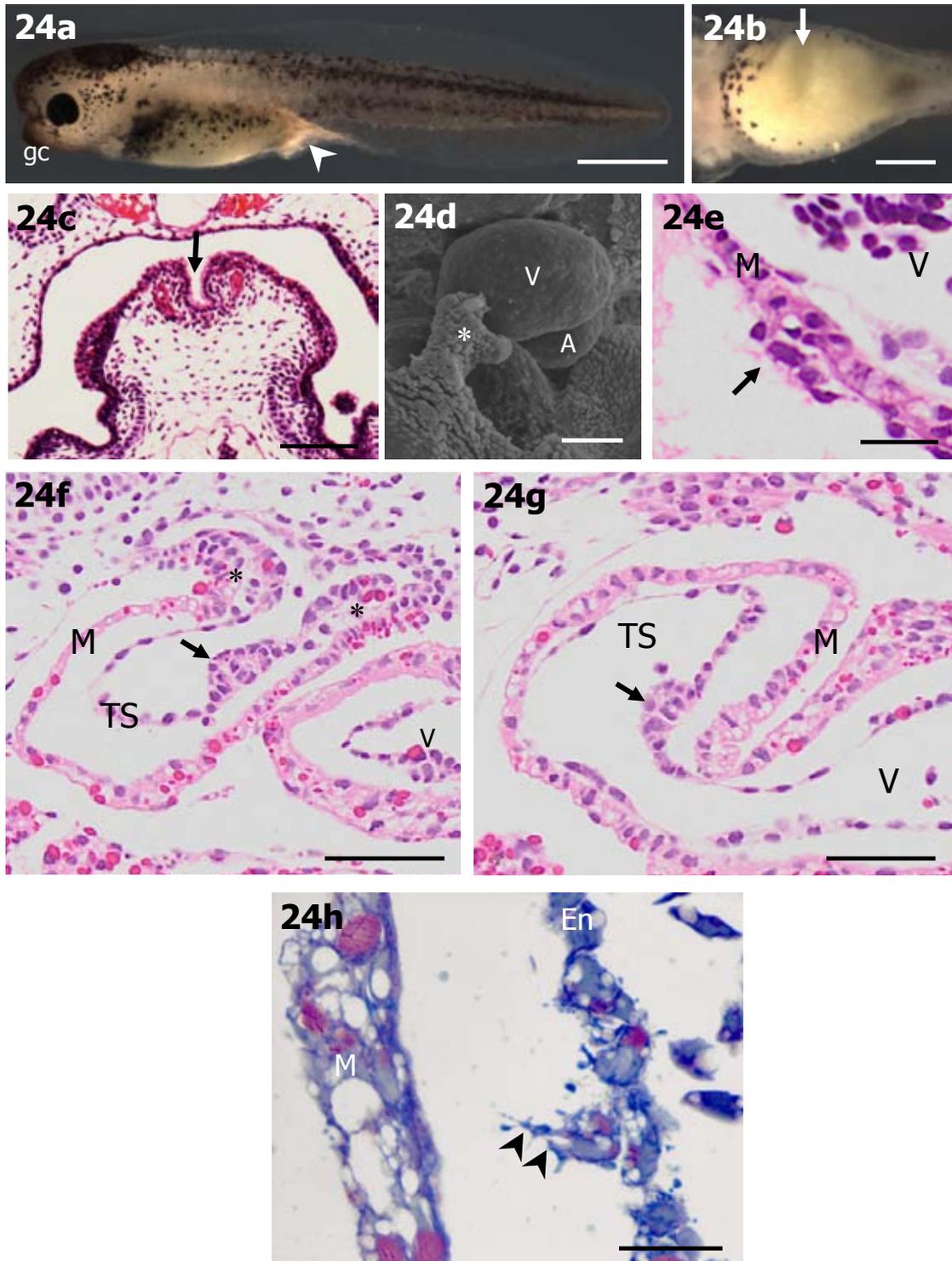
24d: Estadio 41. Vista ventro-caudal derecha de la parte anterior de un embrión. Microfotografía electrónica de barrido. En la zona próxima al seno venoso, las células derivadas del pericardio, que se denominan células proepicárdicas, comienzan a migrar y forman un puente tisular (asterisco) que contacta con el ventrículo (V). A, atrio. Barra 100 μm.

24e: Sección transversal de la zona ventral externa del ventrículo. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. Las células proepicárdicas (flecha) que forman el puente tisular contactan con la zona dextro-lateral del ventrículo (V) y migran por su superficie. M, miocardio. Barra 20 μm.

24f: Sección transversal de la zona anterior del corazón en formación. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. Las células endocárdicas que tapizan los cojines distales del tracto de salida (TS), son de mayor tamaño y presentan una morfología redondeada. Dichas células comienzan a migrar hacia el seno de la gelatina cardíaca por un proceso de transición epitelio-mesénquima. La flecha señala las células endocárdicas del cojín en formación. Los asteriscos marcan los cojines endocárdicos. M, miocardio; V, ventrículo. Barra 50 μm.

24g: Sección transversal de la zona posterior del tracto de salida del corazón en formación. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. Las células que forman la cresta espiral (flecha) alcanzan la porción caudal del tracto de salida (TS). M, miocardio; V, ventrículo. Barra μm.

24h: Sección semifina longitudinal de la zona anterior del tracto de salida. Azul de toluidina. Detalle de las células endocárdicas de los cojines distales del tracto de salida, las cuales comienzan a emitir proyecciones filopodiales (cabezas de flecha) para progresar en la colonización de la gelatina cardíaca. En, endocardio; M, miocardio. Barra 50 μm.



endocárdica (Fig. 24g y h). Estas células presentan numerosas proyecciones citoplasmáticas que se extienden hacia la gelatina cardíaca (Fig. 24h).

En este estadio todas las regiones cardíacas presentan una señal de intensidad semejante frente el anticuerpo A4.1025. Este marcaje coincide con el patrón de expresión de XMLC-2.

El septo interatrial comienza a formarse desde la pared dorsal del atrio hacia el orificio atrioventricular. En las zonas ventrolaterales del ventrículo la gelatina cardíaca ha desaparecido casi por completo y el miocardio se encuentra en contacto con el endocardio.

- **Estadio 42**

En el estadio 42 comienza la formación de los pliegues operculares. El intestino sufre una torsión aproximadamente de 90°. El proctodeo se conecta con la yema del intestino a través de un corto tubo horizontal (Figs. 25a, b). En este estadio el tracto respiratorio está aislado del suelo de la faringe y se bifurca en dos ramas que constituyen los bronquios primarios.

En este estadio el corazón aumenta de tamaño y se producen modificaciones en la posición relativa del TS y del ventrículo. Hacia el principio del estadio 42 el TS y el ventrículo ocupan una posición ventral con respecto al atrio. El ápice del ventrículo se halla inclinado hacia la izquierda. El TS emerge desde el lado derecho del ventrículo y sufre una torsión en su porción proximal, de modo que el eje longitudinal del TS está inclinado hacia la izquierda y hacia atrás (Fig. 25c).

El septo interatrial continúa su desarrollo en dirección dorso-ventral. Está formado por una única capa de células miocárdicas tapizadas por endocardio (Fig. 25d).

En estadio se observa, por primera vez, un corto componente que se interpone entre el límite cefálico del miocardio y la pared anterior del pericardio. Este segmento, que conecta con el saco aórtico, está constituido por células cuya morfología difiere de aquélla de las células miocárdicas contiguas. En el nuevo componente, de posición distal en el TS, no se identifican transcritos de *Nkx-2.5* y *XMLC-2* (Fig. 25e), ni se detecta inmunoreactividad frente al anticuerpo A4.1025 (Fig. 25f). Cabe señalar que los cojines endocárdicos distales sobrepasan el límite cefálico del miocardio (Fig. 25e).

- **Estadio 43**

Hacia el estadio 43 la glándula del cemento pierde la pigmentación característica de los estadios anteriores. Alrededor de los ojos se disponen numerosos melanóforos formando un círculo. Además es visible en este estadio la línea lateral que recorre toda la cola del renacuajo (Figs. 26a, b). El intestino presenta una torsión de 180° en sentido antihorario y se extiende anteriormente hasta el hígado (Fig. 26b). Desde una vista lateral el proctodeo es más estrecho, arqueado o con forma de “S” (Fig. 26a). Internamente, se aprecia un mayor desarrollo del tracto respiratorio, de modo que los extremos de los bronquios se continúan en sendos sacos pulmonares incipientes.

En este estadio el TS está completamente inclinado hacia la izquierda, de modo que adopta una posición prácticamente horizontal con respecto al ventrículo. La porción cefálica del TS se orienta hacia el dorso (Fig. 26c).

Durante este estadio se completa la formación del septo interatrial. Como resultado, se forman dos atrios de distinto tamaño, siendo el derecho notablemente más grande que el izquierdo (Fig. 26d). Los atrios izquierdo y derecho están en continuidad con la vena pulmonar y el seno venoso, respectivamente.

En el TS, la gelatina cardíaca de los cojines endocárdicos distales presenta un aspecto de red y continúa poblándose de células (Fig. 26e). Algunas células flotantes presentes en la cavidad pericárdica toman contacto con el miocardio colindante a los cojines (Figs. 26e, f). Estas células parecen adherirse en la pared miocárdica (Fig. 26f).

Las células mesenquimáticas que se encuentran ubicadas en la pared derecha del saco aórticos migran en sentido céfalo-caudal, por debajo del endocardio, a través de la gelatina cardíaca para formar el cojín precursor de la cresta espiral (Figs. 26g-i). Durante este estadio, continúa el desarrollo

Figura 25. Estadios 42.

25a: Estadio 42. Vista lateral izquierda de un embrión. El intestino presenta una torsión con un ángulo de 90° y el proctodeo se conecta con el intestino, por medio de un corto tubo horizontal (flecha). gc, glándula del cemento. Barra 1 mm.

25b: Estadio 42. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. La flecha marca la invaginación del intestino que sufre una torsión de 90° en sentido horario. Barra 500 μm.

25c: Estadio 42. Vista ventral del corazón en desarrollo. Microfotografía electrónica de barrido. Las trabéculas ventriculares continúan su desarrollo y en este estadio es evidente el aspecto esponjoso que presenta el miocardio ventricular. El tracto de salida (TS) se inclina hacia la izquierda. P, cavidad pericárdica; V, ventrículo. Barra 70 μm.

25d: Estadio 42. Sección transversal de los atrios. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. El septo interatrial en desarrollo (cabeza de flecha) continúa su recorrido en dirección ventral para contactar en estadios posteriores con las válvulas atrioventriculares. AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo; Ph, primordio hepático; P, cavidad pericárdica; V, ventrículo. Barra 20 μm.

25e: Estadio 42. Sección transversal de la zona céfalica del corazón en formación del embrión. Hibridación in situ con el marcador XMLC-2. En este estadio es visible por primera vez un grupo de células diferentes a los miocardiocitos (flechas), que invaden la porción céfalica del tracto de salida (TS). Dichas células se disponen intrapericárdicamente. Las cabezas de flecha indican el límite de los miocardiocitos en la zona anterior del tracto de salida. M, miocardio; V, ventrículo. Barra 25 μm.

25f: Estadio 42. Sección transversal de la zona céfalica del corazón en formación del embrión. Inmunohistoquímica con los anticuerpos A4.1025 y α-actina. anti-α-actina, rojo; A4.1025, verde. En este estadio no hay evidencias de la presencia de células inmunoreactivas ante el anticuerpo anti-α-actina. Las flechas señalan el límite céfalico del miocardio. AD, aurícula derecha; TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 20 μm.

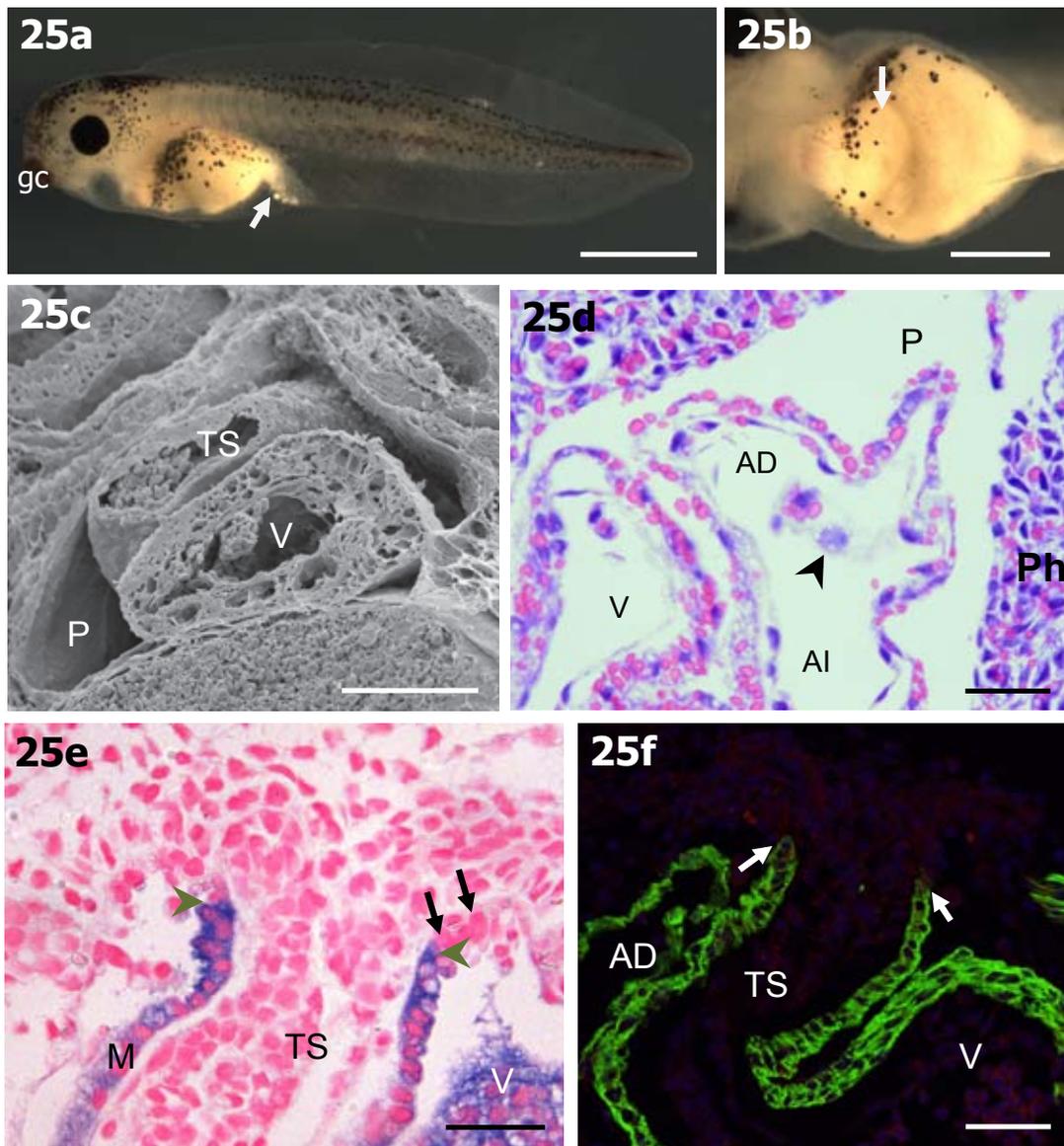


Figura 26. Estadios 43.

26a: Estadio 43 . Vista lateral izquierda de un embrión. La glándula del cemento (gc) pierde progresivamente el color marrón-parduzco que la caracterizaba en los estadios anteriores y va disminuyendo de tamaño. Se disponen numerosos melanóforos formando un círculo alrededor del ojo (cabeza de flecha). En este estadio el proctodeo adquiere una característica forma de "S" (flecha). Barra 1 mm.

26b: Estadio 43. Vista ventral de la parte media de un embrión. El intestino continúa su desarrollo y en este estadio se observa una torsión de 180° en sentido antihorario. Por la torsión la zona cefálica presenta dos porciones ligeramente orientadas hacia la derecha y una porción caudal en forma de "U". Barra 200 µm.

26c: Estadio 43. Vista ventral del corazón en desarrollo. Microfotografía electrónica de barrido. La porción media del tracto de salida (TS) se dispone prácticamente horizontal y ventral, sin embargo las porciones caudal y cefálica del mismo se hallan en posición más dorsal. El ventrículo (V) está ubicado ventralmente con respecto al tracto de salida. Barra 100 µm.

26d: Estadio 43. Sección transversal del corazón. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. El septo interatrial (cabeza de flecha) concluye su desarrollo y se halla unido en su porción caudal a las válvulas atrioventriculares (AV) dorsal y ventral. El septo está formado por una única capa de células musculares recubiertas por células endocárdicas aplanadas. AD, atrio derecho; AI, atrio izquierdo. Barra 50 µm.

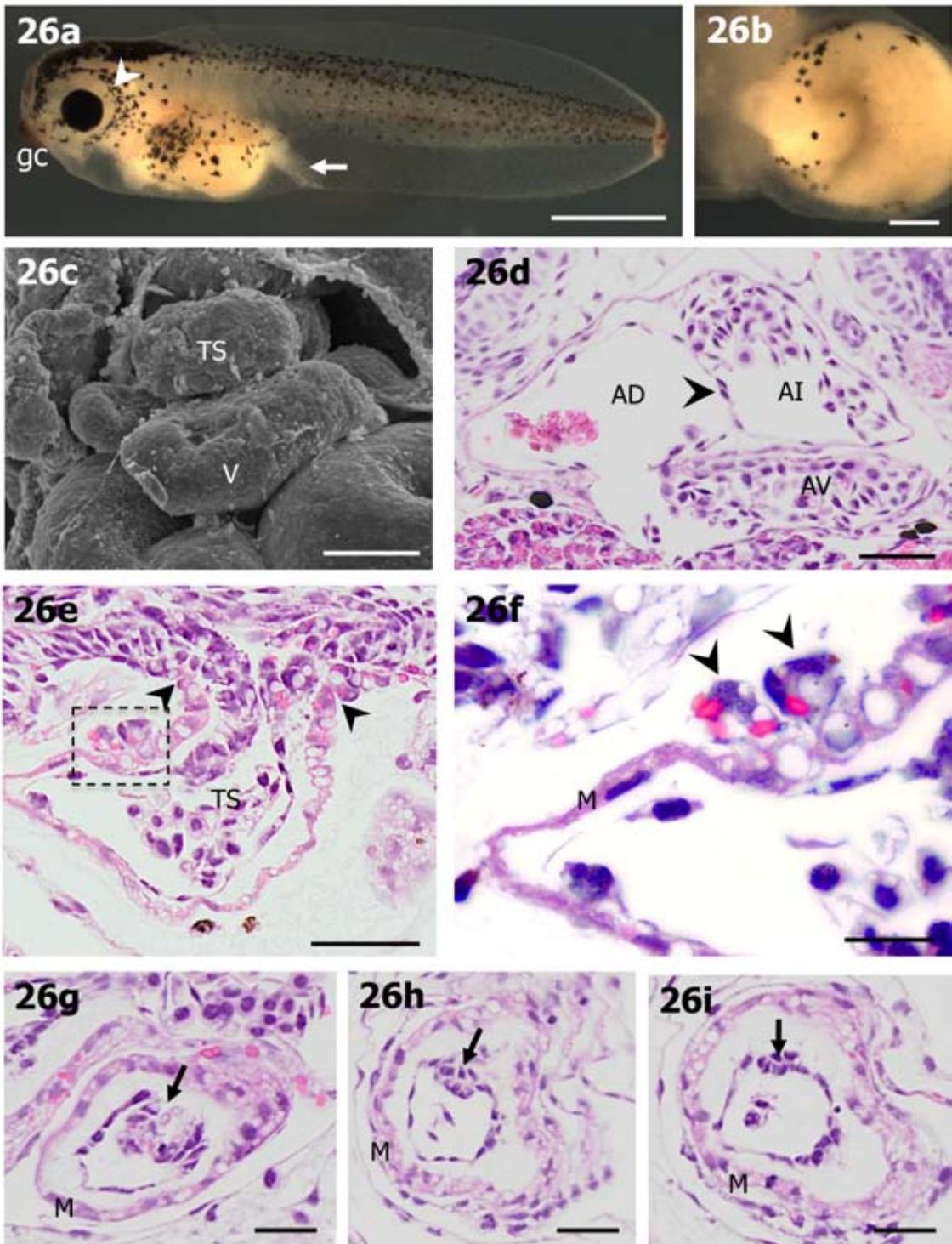
26e: Estadio 43. Sección transversal de la zona media del embrión. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En la porción anterior del tracto de salida (TS), los cojines endocárdicos continúan poblándose de células mesenquimáticas que se desprenden del endocardio y de la porción caudal del saco aórtico. Las cabezas de flecha señalan el límite anterior del pericardio. La zona que aparece en el recuadro se muestra ampliada en la figura 26f. Barra 20 µm.

26f: Estadio 43. Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de la figura 26e. Desde el puente tisular situado en la zona ventro-caudal de la cavidad pericárdica se desprenden hacia la cavidad pericárdica células proepicárdicas que se denominan células flotantes.. Las células flotantes se adhieren al miocardio de la pared del tracto de salida (cabezas de flecha) en donde parecen integrarse entre las células miocárdicas (M) que componen la pared. Barra 50 µm.

26g: Estadio 43. Sección transversal de la porción cefálica del componente proximal del tracto de salida. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. La cresta espiral en desarrollo se inserta en la porción dorsal del componente (flecha). En este punto se observan numerosas células con una morfología globosa. M, miocardio. Barra 25 µm.

26h: Estadio 43. Sección transversal de la porción media del componente proximal del tracto de salida. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En esta zona del componente hay una disminución del número de células con respecto a la zona anterior. La flecha señala el punto de inserción de la cresta al componente proximal. M, miocardio. Barra 25 µm.

26i: Estadio 43. Sección transversal de la porción caudal del componente proximal del tracto de salida. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En esta porción la cresta espiral está formada por escasas células agrupadas en el endocardio. La flecha señala el punto de inserción de la cresta al componente proximal. M, miocardio. Barra 25 µm.



del cojín de la cresta espiral. Este cojín presenta un recorrido helicoidal a lo largo del TS, desde la porción posterior de los cojines endocárdicos, precursores las futuras válvulas distales, hasta la zona proximal del TS (Figs. 26g-i). Dicha cresta se proyecta desde la gelatina cardiaca hacia el lumen del componente proximal.

- **Estadio 44**

A ambos lados de la boca se desarrollan unas protrusiones que formarán los rudimentos tentaculares. Los pliegues operculares sobresalen en mayor medida que en estadios previos. Visto lateralmente, el intestino continúa su torsión en sentido contrario a las agujas del reloj hasta completar un giro de 360°. Como resultado de esta torsión, el intestino parece estar dividido en dos porciones (Figs. 27a, b).

El TS presenta un menor grado de inclinación hacia la izquierda con respecto a la situación en el estadio previo (Fig. 27c). Gran parte de la superficie dextro-dorsal y dorsal del ventrículo y la porción sinistro-dorsal del TS, aparece tapizada por una única capa de células aplanadas que forman un epicardio continuo. En cambio, en la zona sinistro-ventral y ventral del ventrículo se aprecian grupos de células proepicárdicas que emiten largas prolongaciones citoplasmáticas y forman parches discontinuos sobre la superficie de la capa miocárdica.

La gelatina cardíaca de los cojines endocárdicos distales acentúa su aspecto reticular y continúa poblándose de células mesenquimáticas. Dichas células no están en contacto con los miocardiocitos de la pared del TS (Figs. 27d, e). En este estadio se identifican cuatro cojines endocárdicos distales (Fig. 27f), situados en posición dorsal, ventral, izquierda y derecha. De ellos, el cojín derecho está en continuidad con la cresta espiral en formación. Cabe indicar que dicha cresta se extiende caudalmente hasta el

extremo proximal del TS (Fig. 27g). En esta zona las células endocárdicas cambian su morfología de un modo semejante a lo descrito en el caso de la zona distal. Estas células adquieren una forma redondeada e invaden zonas engrosadas de gelatina cardíaca. Todo ello constituye el primer indicio de la formación de los cojines endocárdicos precursores de las válvulas de la hilera proximal (Fig. 27g). Los cojines endocárdicos que darán lugar a las válvulas atrioventriculares continúan poblándose de células, que en este estadio aún no contactan con el miocardio circundante (Fig. 27h).

En la cavidad pericárdica y dispuestas en muchas ocasiones cercanas a la superficie externa del TS, se distinguen células flotantes con gránulos de pigmentos en su citoplasma, cercanas a los cojines endocárdicos distales (Figs. 27d, e).

Cabe señalar que la expresión del marcador de miocardiocitos XMLC-2 se conserva en todas las cámaras del corazón en desarrollo a excepción del nuevo componente del TS (Fig. 27i).

• **Estadio 45**

En el estadio 45 el intestino presenta una vuelta y media de espira y se torsiona en forma de “S”, continuando en sentido posterior (Figs. 28a, b). El opérculo presenta un borde recto que cubre parcialmente las branquias. Los renacuajos comienzan a alimentarse.

En el transcurso de este estadio, continúa el desarrollo del nuevo componente del TS. Hasta el estadio 41, el límite cefálico del miocardio del TS coincidía con el límite anterior del pericardio (Fig. 24f). Sin embargo, a medida que progresa el desarrollo son más claras las diferencias entre los componentes proximal y distal. El componente proximal mantiene la identidad miocárdica que mostraba el TS original, como se pone de manifiesto mediante

Figura 27. Estadio 44.

27a: Estadio 44. Vista lateral izquierda de un embrión. En ambos lados de la boca se desarrollan protrusiones que son el origen de la formación de los tentáculos (flecha). En vista lateral el intestino parece estar dividido en dos porciones (cabezas de flecha). Barra 1 mm.

27b: Estadio 44. Vista ventral de la parte media de un embrión. El intestino continúa su torsión en el sentido contrario de las agujas del reloj, hasta completar un giro de 360°. Esta torsión le da al intestino una apariencia globosa, con dos porciones en la zona anterior y una única con forma de media luna en la zona posterior. Es posible diferenciar por transparencia el ventrículo y tracto de salida del corazón. El asterisco marca el corazón. Barra 400 μm .

27c: Estadio 44. Vista ventral de la parte anterior de un embrión. Microfotografía electrónica de barrido. El ventrículo (V) es la cámara más ventral del corazón en este estadio. El tracto de salida (TS) y los atrios se hallan ubicados en posición dorsal. Barra 20 μm .

27d: Estadio 44. Sección longitudinal de la zona cefálica del tracto de salida. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En los cojines endocárdicos distales se acentúa la morfología cúbica de las células del endocardio y la gelatina cardíaca presenta un aspecto reticulado (asteriscos). Las cabezas de flecha verde señala el límite anterior del miocardio. La flecha marca células flotantes ubicadas en la cara externa de la capa miocárdica. La zona que aparece en el recuadro se muestra ampliada en la figura 27e. M, miocardio. Barra 50 μm .

27e: Estadio 44. Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de la figura 27d. La gelatina cardíaca de los cojines endocárdicos presenta un aspecto reticulado (asterisco). Las cabezas de flecha señalan a dos células flotantes. En, endocardio; M, miocardio. Barra 20 μm .

27f: Sección semifina transversal de la zona cefálica del tracto de salida. Azul de toluidina. En este estadio es posible identificar cuatro cojines endocárdicos en la zona cefálica del tracto de salida (asteriscos). El cojín derecho se continúa con la cresta espiral. M, miocardio. Barra 50 μm .

27g: Estadio 44. Sección frontal de la zona caudal del tracto de salida. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En los cojines endocárdicos de la zona proximal se engrosa la gelatina cardíaca y las células del endocardio comienzan a adquirir una forma globosa (cabezas de flecha). El asterisco señala la posición ventral e izquierda de la cresta espiral. M, miocardio; TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 50 μm .

27h: Estadio 44. Sección semifina frontal del embrión. Azul de toluidina. Se observan las válvulas atrioventriculares (AV) cortadas en un plano transversal. La gelatina cardíaca comienza a poblarse de células mesenquimáticas que migran desde el endocardio. TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 50 μm .

27i: Estadio 44. Sección transversal del embrión en el que se muestra la zona cefálica del corazón en formación. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2 y contrastado con rojo neutro. La señal del marcador persiste en este estadio y su expresión se conserva en todas las cámaras del corazón excepto en el componente distal del tracto de salida (TS). Las cabezas de flecha marcan el límite anterior alcanzado por la marca de XMLC-2. Las flechas señalan el límite anterior de la cavidad pericárdica. A, atrio; TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 50 μm .

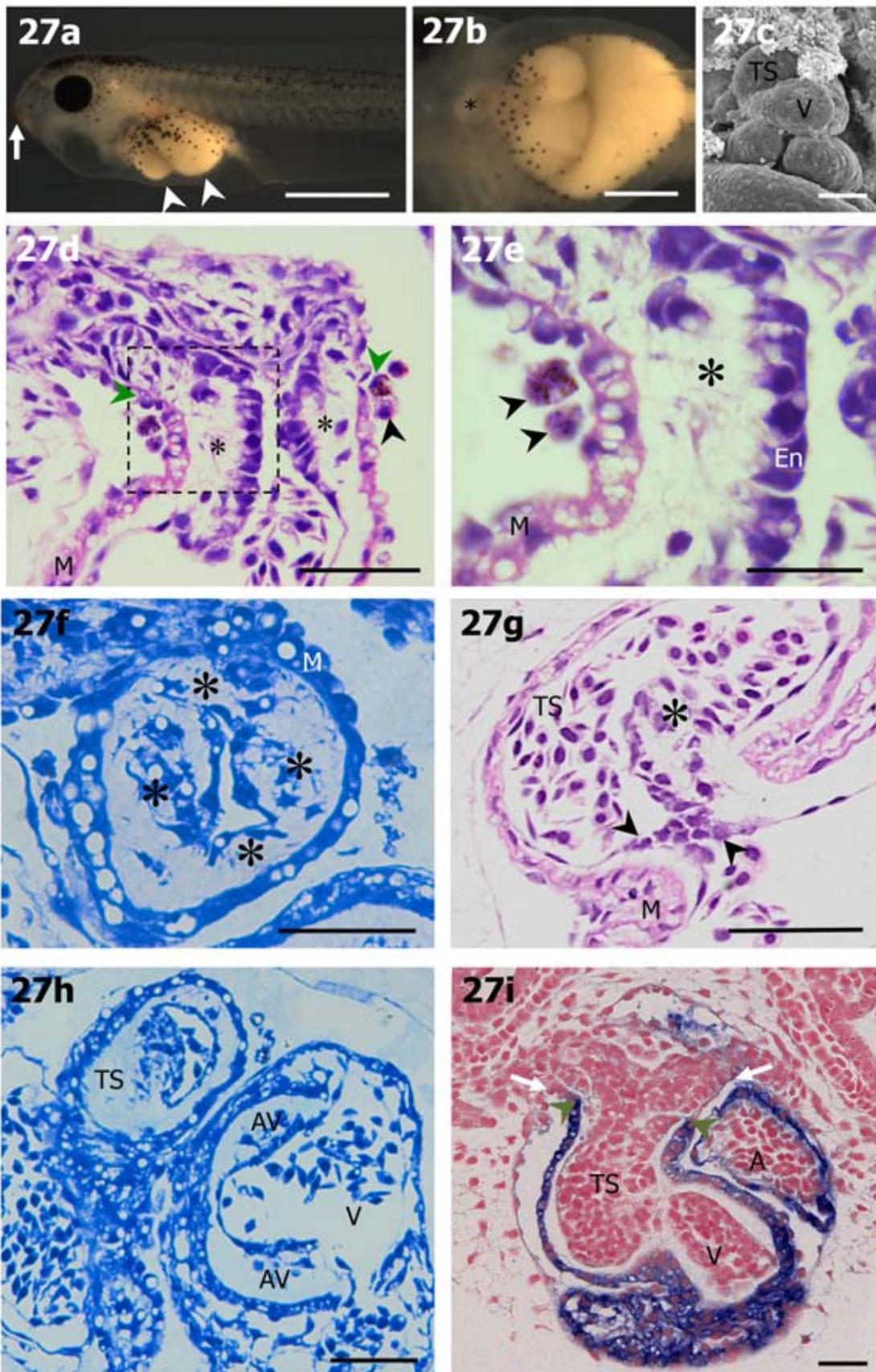


Figura 28. Estadio 45.

28a: Estadio 45. Vista lateral izquierda de un embrión. En este estadio el renacuajo aumenta notablemente de tamaño. La vesícula ótica (vo) es visible, por transparencia, por la presencia de xantóforos que le dan un característico color dorado. Barra 1 mm.

28b: Estadio 45. Vista ventral de la parte media de un embrión. El intestino presenta una vuelta y media de espira y se torsiona en forma de “S”. Barra 500 μm .

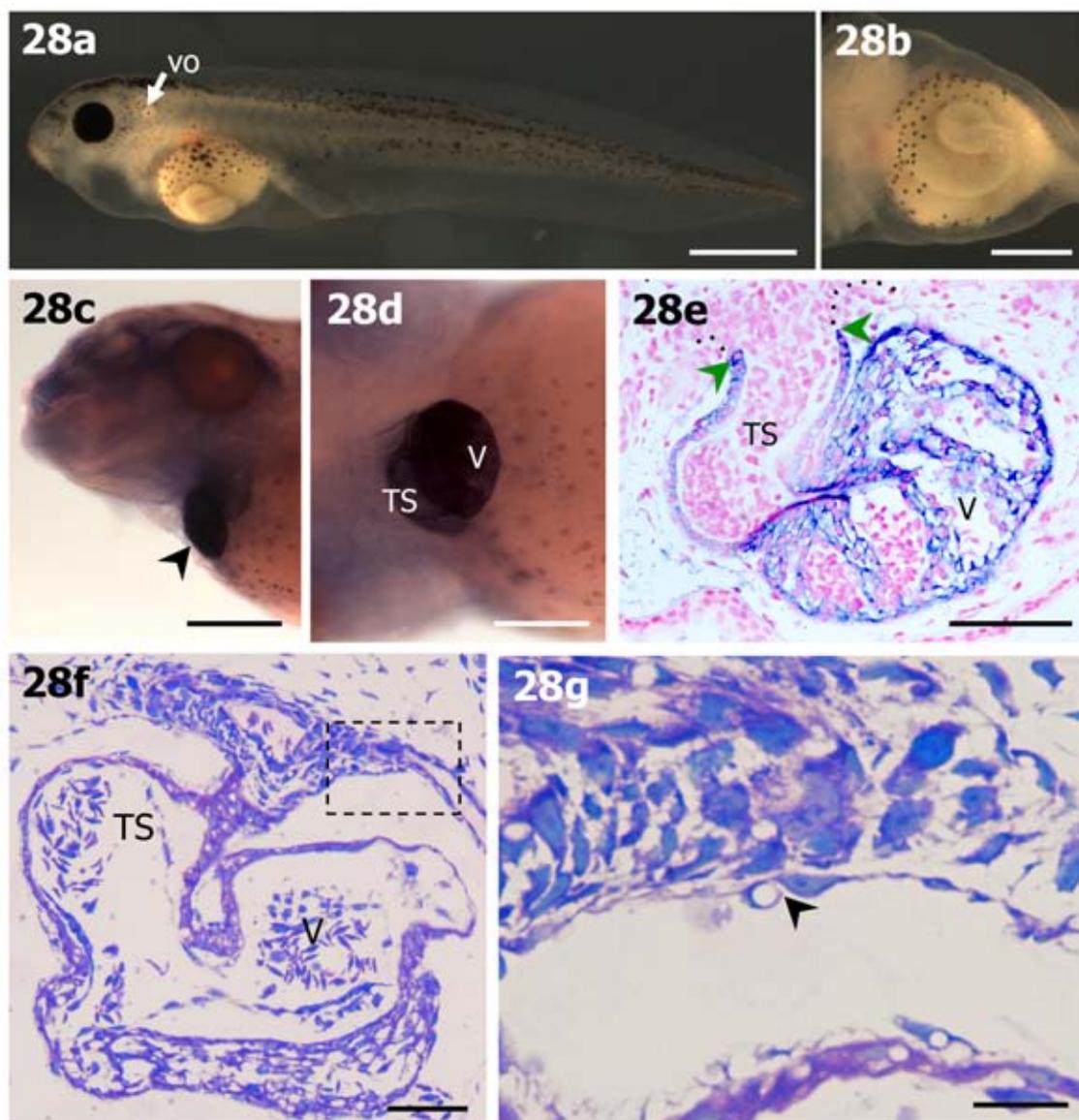
28c: Estadio 45. Vista lateral de la parte anterior de un embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. La señal del marcador es específica para las células miocárdicas, aunque en este caso quedan marcas inespecíficas en la zona cefálica a causa de un excesiva incubación con la sonda de hibridación. Barra 500 μm .

28d: Estadio 45. Vista ventral del embrión. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2. El factor de transcripción XMLC-2 permite identificar el nuevo componente distal que se está desarrollando a partir de células cardiogénicas de una procedencia diferente a las que forman el resto de las cámaras del corazón. TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 100 μm .

28e: Estadio 45. Sección frontal de la zona cefálica del corazón en formación. Hibridación *in situ* con el marcador XMLC-2 y contrastado con rojo neutro. La señal específica del marcador XMLC-2 permite diferenciar claramente las células miocárdicas. Dicha señal se mantiene en todas las cámaras, atrios, ventrículo (V) y tracto de salida proximal (TS). Por el contrario, el nuevo componente ubicado en la posición distal del tracto de salida, no muestra un fenotipo miocárdico, por lo tanto no se halla marcado por XMLC-2 (línea de puntos). Las cabezas de flechas señalan el límite anterior de la marca de XMLC-2. Barra 100 μm .

28f: Estadio 45. Sección semifina frontal del corazón. Azul de toluidina. La pared miocárdica del atrio y del tracto de salida es más delgada que la del ventrículo (V). En la zona caudal del ventrículo continúa la formación de las trabéculas. Nótese la disposición perpendicular de las células del componente distal. La zona que aparece en el recuadro se muestra ampliada en la figura 28g. M, miocardio; TS, tracto de salida. Barra 50 μm .

28g: Estadio 45. Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de la figura 28f. Las células que se encuentran en la zona anterior del tracto de salida presentan una morfología difusa que permite diferenciarlas claramente de las células que forman el epitelio simple plano del pericardio. La cabeza de flecha señala el límite anterior del tracto de salida. Barra 20 μm .



técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicas. Concretamente, en el componente proximal se mantiene la expresión del factor de transcripción XMLC-2 (Figs. 28c-e) y la inmunorreactividad frente al anticuerpo A4.1025, tal y como sucede en todo el TS en estadios previos. Por el contrario, el nuevo componente, distal, no muestra un fenotipo miocárdico. Cabe señalar que en este estadio no se ha observado una diferencia en el calibre de los dos componentes del TS, pero sí en la estructura de sus respectivas paredes. La del componente proximal consta de un endocardio, una capa

intermedia de gelatina cardíaca y una capa miocárdica externa, formada por un estrato de células redondeadas que contienen numerosas gotas lipídicas. La pared del componente distal está constituida por células orientadas perpendicularmente al eje longitudinal del propio componente (Fig. 28f). Más allá del límite anterior del componente distal, las células extrapericárdicas no aparecen ordenadas, sino que están inmersas en una matriz en cuyo seno se disponen de forma laxa (Fig. 28g).

En la zona caudal de ventrículo continúan desarrollándose las trabéculas. Se produce una gran proliferación de miocardiocitos desde la pared ventricular a la vez que la gelatina cardíaca es poblada por células mesenquimáticas que migran desde el endocardio (Fig. 28f).

- **Estadio 46**

Los bordes del opérculo comienzan a adquirir una forma convexa. Aparecen xantóforos (amarillos o anaranjados) en los ojos y el abdomen (Figs. 29a, b). El intestino muestra de dos a dos y media vueltas de espira (Fig. 29b). Se distinguen por primera vez las patas traseras (Fig. 29a), como un acúmulo de células mesenquimáticas.

En este estadio los pulmones se extienden hasta la zona media de la cavidad pleuroperitoneal. A finales del estadio 46 da comienzo la respiración pulmonar. Las cámaras cardíacas presentan sus correspondientes disposiciones definitivas dentro de la cavidad pericárdica. El ventrículo ocupa una posición posterior con respecto al resto del corazón. El TS se sitúa en posición ventral con respecto a los atrios y su eje longitudinal se inclina unos 35° hacia la izquierda. El atrio izquierdo, que ocupaba una posición totalmente dorsal con respecto al ventrículo, se sitúa a su izquierda (Fig. 29c).

En el componente distal del TS son visibles escasas fibras elásticas longitudinales, delgadas y dispuestas de forma concéntricas (Fig. 29d). Dispersas sobre la superficie de dicho componente se observan células grandes y globosas con núcleos voluminosos que ocupan gran parte de su citoplasma. La morfología de estas células se asemeja a la de las células del techo del pericardio (Fig. 29e).

En la base del componente distal se distinguen células mesenquimáticas que forman cúmulos redondeados (Figs. 29f, g). Estas células se corresponden con las marcadas mediante hibridación *in situ* en el estadio 40. A finales del presente estadio estas células progresan en sentido caudal.

Células mesenquimáticas procedentes del endocardio continúan poblando la gelatina cardíaca de los cojines endocárdicos distales. Estas células presentan diferentes morfologías dependiendo de su ubicación. En la zona anterior del cojín son globosas y se encuentran dispersas. Sin embargo, en la zona posterior las células muestran un aspecto estrellado, con numerosas prolongaciones que parecen formar una red que las interconectan (Figs. 29f, h). A finales del estadio 46 los cojines distales comienzan a perder la forma convexa, iniciándose el proceso de excavación. Como se observa en la figura 29f, la porción cefálica de dichos cojines se extiende más allá del límite cefálico del miocardio (Figs. 29f, g). En la zona donde se desarrollarán los cojines proximales, comienza la invasión de la gelatina cardíaca por parte de células mesenquimáticas provenientes del endocardio (Fig. 29h).

Las válvulas atrioventriculares continúan su desarrollo y las células mesenquimáticas inmersas en la gelatina cardíaca toman contacto con el miocardio (Fig. 29i).

Figura 29. Estadio 46.

29a: Estadio 46. Vista lateral izquierda de un embrión. Una de las características destacada de este estadio es la presencia de xantóforos en los ojos y el abdomen. Es posible distinguir en la zona dorso-caudal del abdomen un cúmulo de células blanquecinas que son el primer indicio de la formación de las patas traseras (flecha). Barra 1 mm.

29b: Estadio 46. Vista ventral de la parte media de un embrión. El intestino presenta de dos a dos y media vueltas de espiral. La zona abdominal tiene un característico color anaranjado por la presencia de xantóforos. Se puede observar por transparencia el corazón. V, ventrículo. Barra 500 μm .

29c: Estadio 46. Vista ventral del corazón. Microfotografía electrónica de barrido. Las cámaras cardíacas presentan su posición definitiva. El ventrículo (V) ocupa una posición posterior con respecto al corazón. El tracto de salida (TS) se sitúa en una posición ventral con respecto a los atrios. AI, atrio izquierdo. Barra 400 μm .

29d: Estadio 46. Sección frontal del componente distal. Resorcina-fucsina. Delgadas fibras elásticas dispuestas de forma concéntrica, son visibles por primera vez en este estadio. Ao, arcos aórticos. Barra 50 μm .

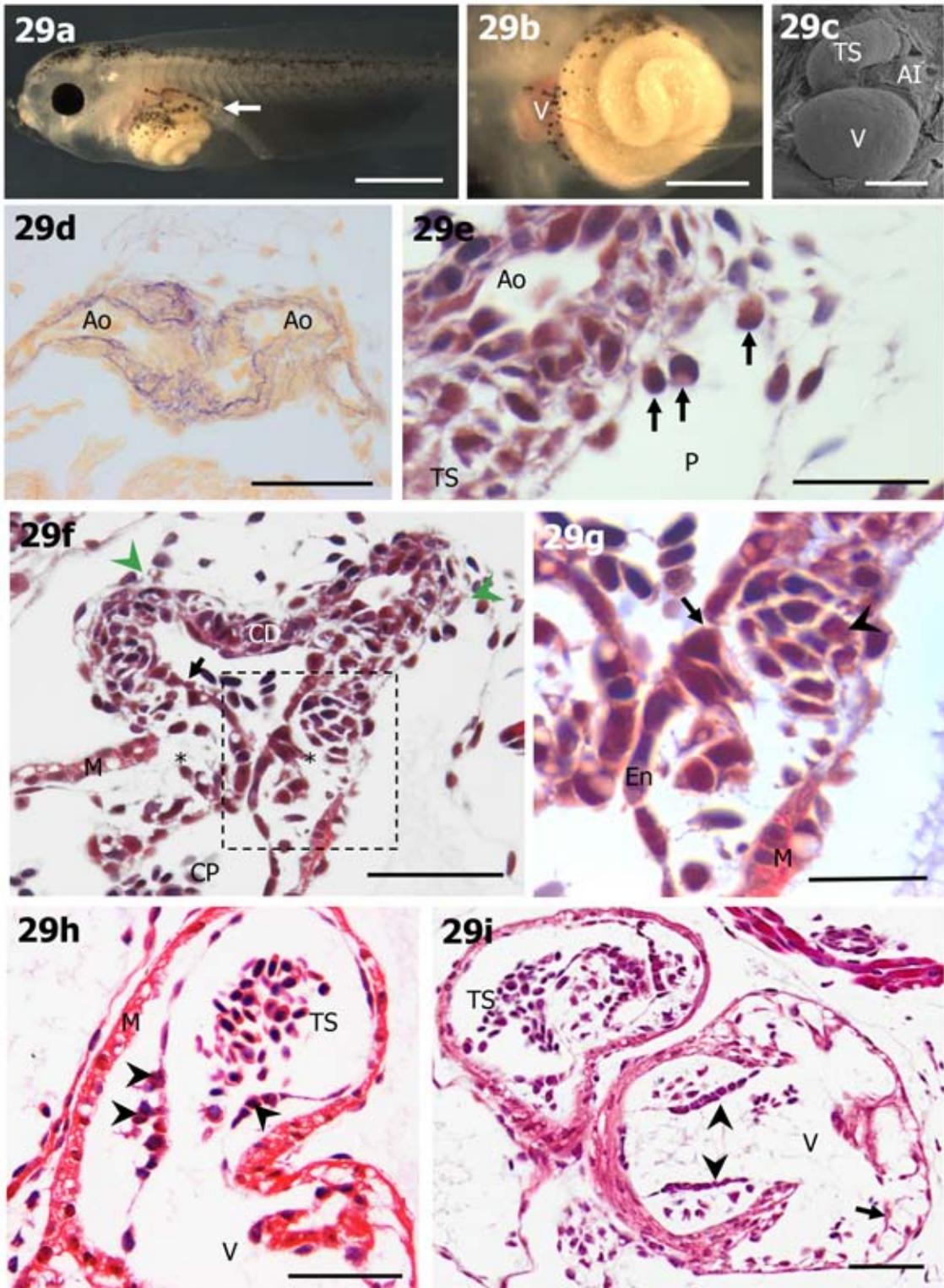
29e: Estadio 46. Sección transversal del embrión en la zona anterior del componente distal. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. Desde el techo del pericardio parecen desprenderse células proepicárdicas (flechas), que van a ser las responsables de cubrir la porción anterior del tracto de salida (TS). Ao, arcos aórticos; P, cavidad pericárdica. Barra 20 μm .

29f: Estadio 46. Sección transversal del embrión en la zona anterior del tracto de salida. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. Se pueden diferenciar las dos porciones: un componente proximal (CP) y un componente distal (CD). Los cojines endocárdicos distales comienzan a excavarse (asteriscos). Dicho acontecimiento se puede observar por la formación de una pequeña oquedad en su porción cefálica (flecha). Las cabezas de flecha señalan el límite anterior del pericardio. La zona que aparece en el recuadro se muestra ampliada en la figura 29g. M, miocardio. Barra 50 μm .

29g: Estadio 46. Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de la figura 29f. Las células mesenquimáticas que provienen del saco aórtico forma cúmulos redondeados ubicados en la zona caudal del componente distal (cabeza de flecha). La flecha marca el punto en el cual comienza el proceso de excavación de las válvulas distales. En, endocardio; M, miocardio. Barra 20 μm .

29h: Estadio 46. Sección frontal de la zona caudal del componente proximal. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. Los cojines que formarán las válvulas proximales comienzan poblarse de células mesenquimáticas (cabezas de flecha) provenientes del endocardio. M, miocardio; TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 50 μm .

29i: Estadio 46. Sección frontal del corazón. Hematoxilina de Delafield-eosina amarillenta. En las válvulas atrioventriculares en formación, las células mesenquimáticas que invaden la gelatina cardíaca. Las cabezas de flecha señalan los cojines que formarán las válvulas atrioventriculares ventral y dorsal. La flecha marca una trabécula en desarrollo. TS, tracto de salida; V, ventrículo. Barra 50 μm .



- **Estadio 47**

Los tentáculos son más largos que anchos. Las patas traseras se distinguen fácilmente en la zona caudo-ventral del abdomen, con forma de yema blanquecina (Fig. 30a). Los xantóforos ubicados en la zona abdominal forman una capa opaca. El intestino muestra de dos y media a tres y media vueltas de espira (Figs. 30a, b). En este estadio se produce una gran

Figura 30. Estadio 47.

30a: Estadio 47. Vista lateral izquierda de un embrión. El embrión aumenta notablemente de tamaño. Las patas traseras (flecha) son visibles en la zona caudo-ventral del abdomen y en este estadio tienen forma de media luna con un color blanquecino. En la zona abdominal los xantóforos forman una capa opaca y los melanóforos migran en dirección dorso-ventral. Barra 1 mm.

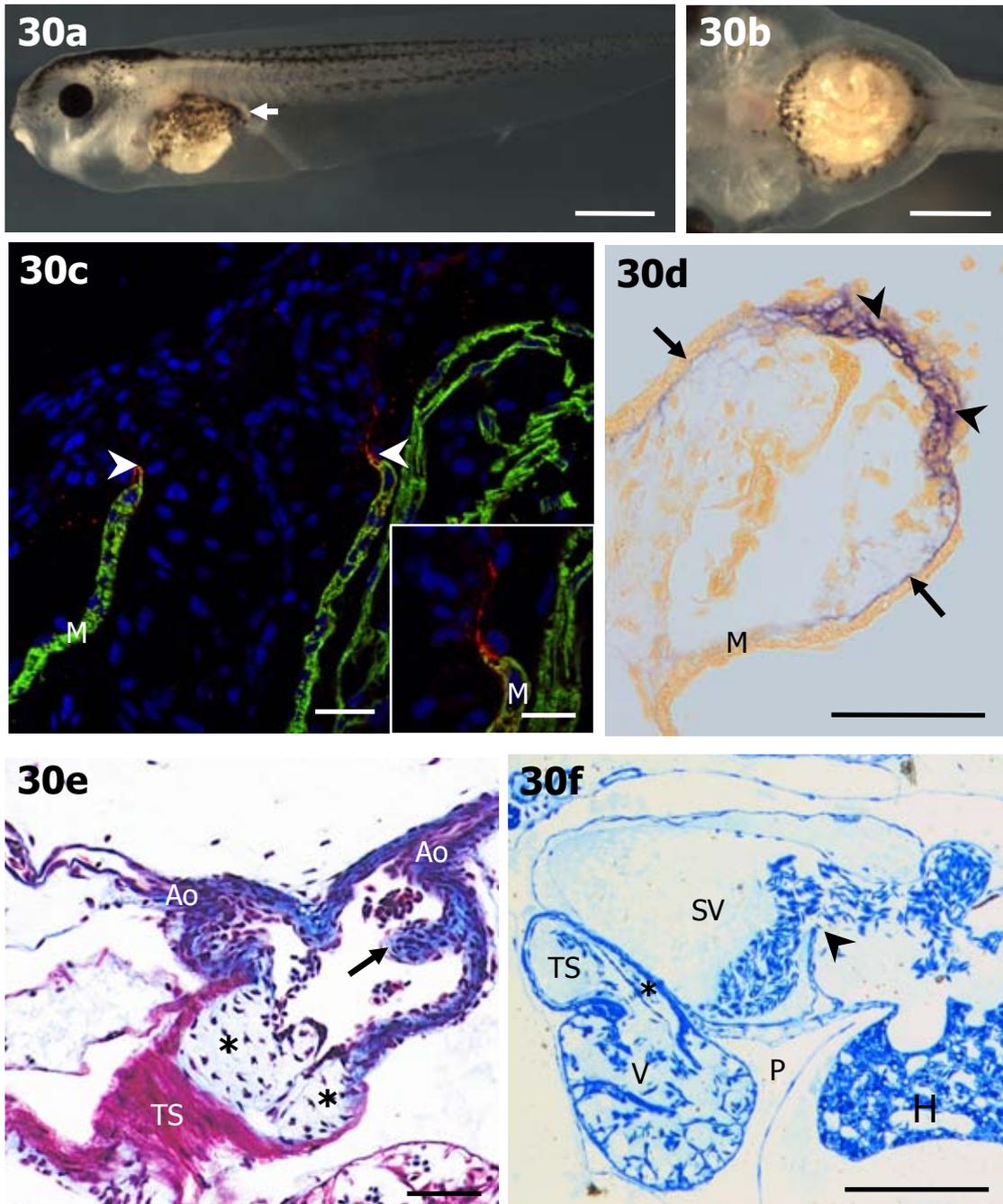
30b: Estadio 47. Vista ventral de la parte media de un embrión. El intestino presenta dos y media a tres y media vueltas de espiral. Barra 500 μm .

30c: Estadio 47. Sección frontal del tracto de salida. Microscopia confocal de fluorescencia. Inmunohistoquímica con los anticuerpos anti- α -actina y A4.1025. α -actina, rojo; DAPI, azul; A4.1025, verde. Durante este estadio es visible por primera vez la señal del anticuerpo anti- α -actina en la porción caudal del componente distal. Las cabezas de flecha marcan la señal del anticuerpo anti- α -actina. M, miocardio. Barra 25 μm . En el recuadro se muestra ampliada la zona en la que se expresa el anticuerpo anti- α -actina. M, miocardio. Barra: 10 μm .

30d: Estadio 47. Sección transversal del tracto de salida. Resorcina-Fucsina. Aumenta la cantidad de fibras elásticas en el componente distal (cabezas de flecha). En la zona cefálica del componente proximal se observan fibras elásticas dispuestas longitudinalmente (flechas). M, miocardio. Barra 25 μm .

30e: Estadio 47. Sección frontal del tracto de salida. Tricrómico de Mallory. Los cojines endocárdicos distales continúan excavándose y en el seno de la gelatina cardíaca aumenta la cantidad de células mesenquimáticas (asteriscos). La flecha señala una proyección que en estadios posteriores favorece la septación del componente distal. Ao, arcos aórticos; TS, tracto de salida. Barra 50 μm .

30f: Estadio 47. Sección semifina frontal del corazón. Azul de toluidina. El septo transversal (cabeza de flecha) continúa abierto en la zona media dorsal, de tal forma que continúan comunicadas la cavidad pericárdica y la cavidad pleuroperitoneal. Los cojines endocárdicos de la porción caudal del tracto de salida (TS) comienzan a ser poblados por células mesenquimáticas (asteriscos). H, hígado; P, cavidad pericárdica; SV, seno venoso; V, ventrículo. Barra 20 μm .



expansión de los lúmenes de la tráquea, los bronquios y los pulmones y el adelgazamiento de las paredes pulmonares anteriores que pasan a ser membranas finas formadas por células aplanadas.

En el transcurso de este estadio el componente distal se torsiona hasta disponerse dorsalmente con respecto al ventrículo. La pared de dicho componente es inmunorreactivo, por primera vez en el curso del desarrollo, ante el anticuerpo anti- α -actina para la musculatura lisa (Fig. 30c). Además, aumenta la cantidad de fibras elásticas, que se extienden hasta la zona caudal de los cojines distales (Fig. 30d).

Los cojines distales continúan su proceso de excavación (Fig. 30e). Por su parte, los futuros cojines proximales contienen un número más elevado de células que siguen migrando desde el endocardio (Fig. 30f). La gelatina cardíaca por encima de dichos cojines es muy delgada, de tal modo que el endocardio prácticamente entra en contacto con el miocardio.

En las secciones histológicas se distinguen sendas proyecciones laterales que parten de la pared del componente distal en dirección al lumen (Fig. 30e). Estas proyecciones van a contribuir, en estadios posteriores, a la formación del septo principal.

En este estadio el septo transversal está más desarrollado, pero aún incompleto en la zona dorsal, por lo que las cavidades pericárdicas y pleuroperitoneal continúan comunicadas entre sí (Fig. 30f).

- **Estadio 48**

El abdomen presenta un brillante color dorado. Son visibles por primera vez los sacos que contienen las patas delanteras (Figs. 31a, b). El esbozo de las patas traseras presenta una forma semicircular, con una orientación lateral (Fig. 31b).

En el componente distal se identifican, por primera vez en este estadio, fibras de colágeno tipo I dispuestas de forma circunferencial. Además, aumenta la cantidad de fibras elásticas. Desde el componente distal las fibras elásticas se extienden por debajo del endocardio, recorriendo el componente proximal hasta sobrepasar la base de los cojines proximales (Fig. 31c). La inmunorreactividad de la pared del componente distal frente al anticuerpo anti- α -actina para musculatura lisa se extiende hacia el componente proximal, donde algunas células situadas en la cara interna de la capa miocárdica presentan marca positiva (Fig. 31d).

Los cojines distales continúan el proceso de excavación. Su borde libre es grueso y redondeado. La profundidad de la zona excavada va aumentando conforme avanza el desarrollo de la valva. A finales de este estadio en estos cojines se aprecia una cara luminal, encarada hacia la luz y tapizada por células endocárdicas aplanadas, y otra parietal, con células endocárdicas redondeadas. Entre ambas caras existe una capa intermedia consistente en una matriz que contiene células mesenquimáticas estrelladas (Fig. 31a).

La gelatina cardíaca de los futuros cojines proximales continúa poblándose de células mesenquimáticas. El estudio histológico ha puesto de manifiesto que, a finales de este estadio, comienza el proceso de excavación, aunque no ha sido posible concretar el número de cojines en desarrollo. No obstante, se ha constatado que la futura valva ventral se forma a partir de la base de la cresta espiral, la cual comienza a excavarse a la vez que el resto de los cojines (Fig. 31f). Por último, cabe señalar que al final del estadio 48 también se aprecian fibras elásticas dispersas en la zona central de la cresta espiral (Fig. 31c).

Figura 31. Estadio 48.

31a: Estadio 48. Vista lateral izquierda de un embrión. El abdomen presenta un brillante color dorado que caracteriza el estadio. En la porción anterior del abdomen es visible por primera vez el saco que contiene las patas delanteras (cabeza de flecha). Las patas traseras presentan una forma semicircular (flecha) Barra 1mm. En el recuadro se muestran las patas traseras ampliadas. Barra 200 μm .

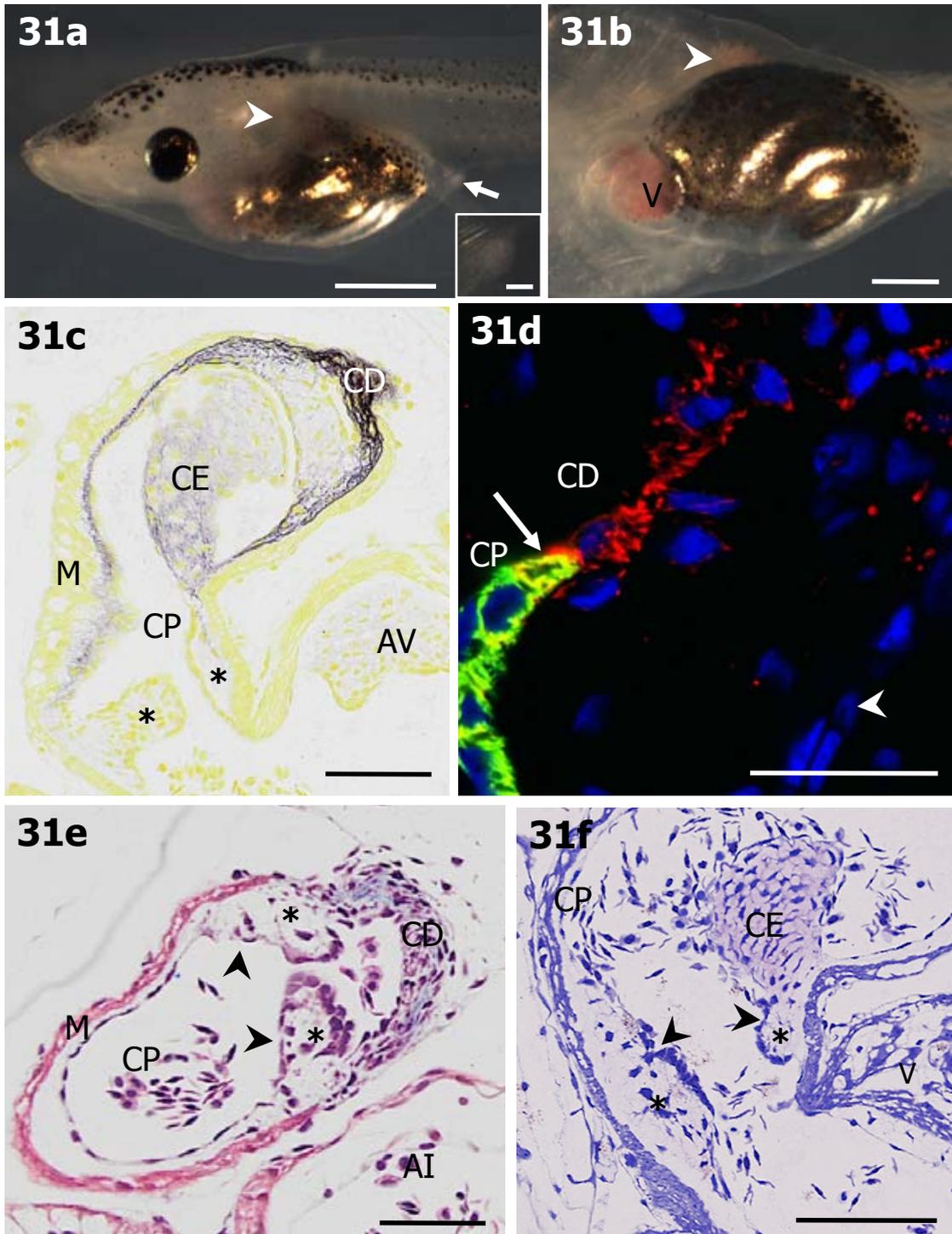
31b: Estadio 48. Vista ventral de la parte media de un embrión. El intestino presenta más de tres vueltas de espira, pero la presencia de los xantófilos no permiten explicar exactamente su recorrido. La cabeza de flecha marca los sacos que contienen las patas delanteras. V, ventrículo. Barra 500 μm .

31c: Estadio 48. Sección transversal del tracto de salida. Resorcina-fucsina. Aumenta la cantidad de fibras elásticas en el componente distal (CD). Las fibras elásticas se hallan presente a lo largo de todo en subendocardio del tracto de salida. En la zona cefálica del componente proximal (CP) se observan fibras elásticas dispuestas longitudinalmente. Estas fibras alcanzan la zona caudal del componente. Los asteriscos marcan los cojines de las válvulas proximales en desarrollo. AV, válvulas atrioventriculares; CE, cresta espiral; M, miocardio. Barra 25 μm .

31d: Estadio 48. Sección frontal del tracto de salida. Microscopia confocal. Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti- α -actina. α -actina, rojo; DAPI, azul; A4.1025, verde. Durante este estadio las células musculares lisas invaden la zona interna del componente proximal (CP). Dicho hecho fue constatado con el resultado positivo de las células musculares lisas ante el anticuerpo anti- α -actina. La flecha señala el límite cefálico del componente proximal. La cabeza de flecha marca los núcleos de la capa endocárdica. CD, componente distal; M, miocardio. Barra 25 μm .

31e: Estadio 48. Sección frontal del tracto de salida. Tricrómico de Mallory. Los cojines endocárdicos distales del tracto de salida continúan excavándose (asteriscos). Las valvas en formación presenta en su cara luminal células aplanadas (cabezas de flechas) y en su cara parietal células redondeadas. En el componente distal (CD) abunda el tejido conectivo fibroso. AI, atrio izquierdo; CP, componente proximal; M, miocardio. Barra 50 μm .

31f: Estadio 48. Sección semifina frontal del corazón. Azul de toluidina. Las células mesenquimáticas continúan poblando el cojín endocárdico de las futuras válvulas proximales (asteriscos). En la posición cefálica del cojín proximal comienzan a ser visibles los puntos en los cuales va a comenzar la excavación (cabezas de flecha). CE, cresta espiral; CP, componente proximal; V, ventrículo. Barra 100 μm .



- **Estadio 49-50**

En estos renacuajos son visibles los primordios de las patas delanteras en la zona antero-dorsal del abdomen (Fig. 32a). Las patas traseras continúan su desarrollo y se elongan notablemente con respecto al estadio anterior adquiriendo, una forma circular en su extremo caudal (Fig. 32b). La

Figura 32. Estadios 49-50.

32a: Estadio 49. Vista lateral izquierda de un embrión. Los primordios de las patas delanteras son visibles en la zona antero-dorsal del abdomen (cabeza de flecha). Las patas traseras adquieren una forma semicircular (flecha). Barra 1 mm.

32b: Estadio 49. Vista ventral de la zona media en donde se observan las patas traseras en desarrollo (cabezas de flecha). Barra 500 μm .

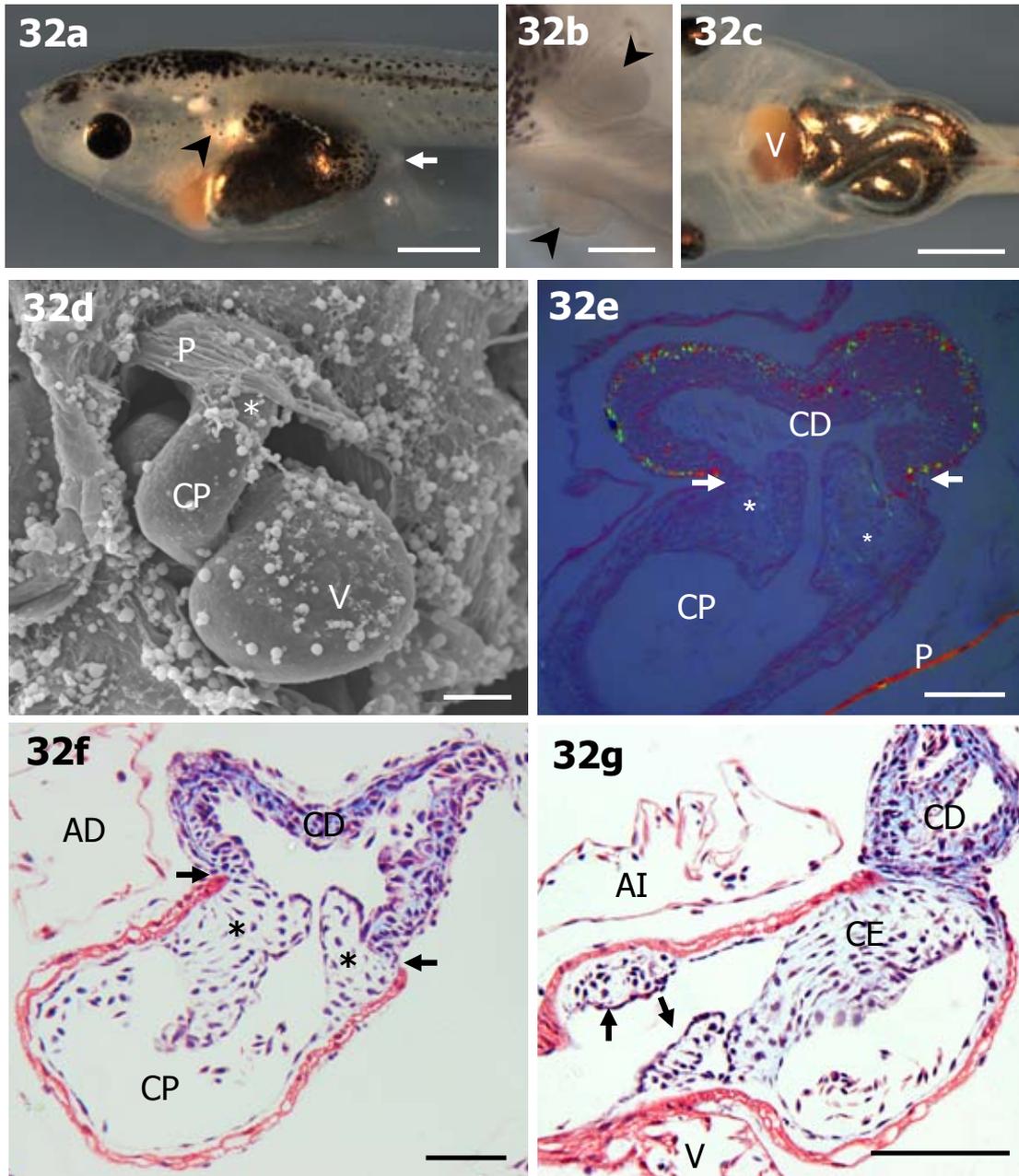
32c: Estadio 49. Vista ventral de la zona media del embrión. El pericardio comienza a poblarse de xantóforos. V, ventrículo. Barra 500 μm .

32d: Estadio 49. Vista ventral del corazón. Microfotografía electrónica de barrido. El ventrículo (V) se ubica con su ápice hacia el lado izquierdo y más ventral. Es posible diferenciar los componente proximal (CP) y distal (asterisco) de tracto de salida. P, pericardio. Barra 100 μm .

32e: Estadio 50. Sección frontal de la porción cefálica del tracto de salida. Pricosirio con microscopía de polarización. En el componente distal es posible visualizar pequeñas y delgadas fibras de colágeno tipo I y tipo III dispuestas de forma circunferencial. Las flechas señalan en límite anterior del componente proximal (CP). Los asteriscos marcan la posición en la que se encuentran las válvulas distales. CD, componente distal; P, pericardio. Barra 50 μm .

32f: Estadio 50. Sección frontal del tracto de salida. En las válvulas distales tiene un aspecto celularizado y prácticamente ha finalizado el proceso de excavación. Las flechas señalan en límite anterior del componente proximal (CP). Los asteriscos marcan las válvulas distales en formación. AD, atrio derecho; CD, componente distal. Barra 50 μm .

32g: Estadio 50. sección sagital del tracto de salida. En la hilera del válvulas proximales continúa el proceso de excavación y los extremos de las valvas en formación presentan un aspecto redondeado (flechas). AI, atrio izquierdo; CE, cresta espiral; CD, componente distal; V, ventrículo. Barra 100 μm .



zona traslúcida de la aleta ventral está colonizada por melanóforos. Otro de los aspectos destacados de este estadio es la aparición de xantóforos en el pericardio (Fig. 32c).

En una vista macroscópica, se diferencian los componentes proximal y distal, siendo este último más corto y de menor calibre (Fig. 32d). Además, en la zona externa de la pared del componente distal se observan células pigmentarias y fibras de colágeno tipo I (Fig. 32e).

En este estadio, los cojines de la hilera distal prácticamente han finalizado el proceso de excavación y las valvas muestran un aspecto muy celularizado. En su extremo apical se observa un grupo de células que protruyen hacia el lumen. En la zona central del cuerpo de la valva hay células mesenquimáticas que se hallan dispuestas de forma desordenada (Fig. 32f).

Durante este estadio avanza el proceso de excavación de los cojines proximales, de manera que las valvas resultantes presentan un aspecto celularizado al concluir el estadio (Fig. 32g).

- **Estadio 51-52**

Los tentáculos son mucho más largos que en los estadios anteriores. Las patas delanteras presentan una forma ovalada y su longitud y anchura son similares (Figs. 33a, b). Las patas traseras al principio del estadio 51 son redondeadas (Figs. 33a, c) y al final del estadio 52 adquieren una forma cónica, con una longitud una vez y media mayor que su anchura. En la superficie latero-caudal de la pata trasera aparecen melanóforos.

En este estadio el septo transversal está completamente formado y separa la cavidad pericárdica de la cavidad pleuroperitoneal. Los pulmones

se extienden dorsalmente y presentan un tamaño tres veces mayor que en el estadio anterior.

Al inicio del estadio 51, el componente distal está escindido en dos troncos, intrapericárdicos, que se disponen lado a lado. Dichos troncos presentan una tabicación interna que varía en sentido céfalo-caudal (Fig. 33d). Justo en el límite anterior del pericardio, los troncos están separados espacialmente. Cada uno de ellos contiene un tracto dorsal, que se continúa con la futura arteria pulmo-cutánea, y un tracto ventral que se escinde en dos vasos que se conectan con las futuras arterias sistémica y carotídea (Fig. 33d). En un segmento más caudal del componente distal, los troncos izquierdo y derecho son adyacentes y están separados por el denominado septo vertical. En el interior de cada uno de los troncos se distingue un tracto dorsal y otro ventral separados por un tabique transversal, que constituye la porción correspondiente del septo principal (Fig. 33e). En su parte basal, el componente distal sólo presenta un tracto dorsal y otro ventral, que constituyen las bases de los troncos pulmo-cutáneos y sistémico-carotídeos, respectivamente. Ambos tractos están separados por el septo principal (Fig. 33f). Este septo no se prolonga más allá del límite entre los componentes distal y proximal y su extremo caudal está en continuidad con la cresta espiral (Fig. 33g).

Desde el punto de vista histomorfológico, tanto la pared de los troncos extrapericárdicos como la del componente distal poseen musculatura lisa. No obstante, ambas difieren en algunos aspectos. En los troncos extrapericárdicos que discurren en el seno del mesénquima de la región ventral a la faringe, la pared consta de tres a cuatro capas de musculatura lisa, entre las que se intercalan fibras de colágeno tipos I y III (Fig. 33h) y láminas de fibras elásticas (Fig. 33i). La luz de estos troncos

Figura 33. Estadios 51-52.

33a: Estadio 51. Vista lateral izquierda de un embrión. Una de las características destacada de este estadio es la presencia de melanóforos recubriendo toda la cavidad abdominal. La zona que aparece en el recuadro de líneas discontinuas se muestra ampliada en la figura 33b y la zona del recuadro de líneas continuas se encuentra ampliada en la figura 33c. Barra 1 mm.

33b: Estadio 51. Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de líneas discontinuas de la figura 33a. Las patas delanteras presentan una forma ovalada, con una longitud y anchura similares. Barra 50 mm.

33c: Estadio 51. Ampliación de la zona delimitada por el recuadro de líneas continuas de la figura 33a. Las patas traseras presentan una forma cónica, con una longitud una vez y media mayor que su anchura. Barra 50 μm .

33d: Estadio 51. Sección transversal del componente distal del tracto de salida. Tricrómico de Mallory. En dirección céfalo-caudal, el componente distal está escindido en tres troncos extrapericárdicos, el tronco arterial carotídeo (AC), el tronco arterial sistémico (AS) y el tronco arterial pulmo-cutáneo (AP). Barra 50 μm .

33e: Estadio 51. Sección transversal del componente distal del tracto de salida. Tricrómico de Mallory. En dirección céfalo-caudal, el componente distal está escindido en dos troncos intrapericárdicos. Los troncos izquierdos y derechos se encuentran separados por el septo vertical. Los troncos dorsales y ventrales están separados por el septo principal (asteriscos). Barra 50 μm .

33f: Estadio 51. Sección transversal del componente distal del tracto de salida. Tricrómico de Mallory. En esta porción del componente distal se puede distinguir el septo principal (asterisco) que divide el componente en un tronco dorsal y otro ventral. Barra 50 μm .

33g: Estadio 51. Sección transversal del componente distal del tracto de salida. Tricrómico de Mallory. El septo principal (SP) se continúa con la cresta espiral (cabeza de flecha) en su porción más caudal. Las flechas marcan la válvula izquierda y la ventral del componente proximal (CP). CD, componente distal. Barra 20 μm .

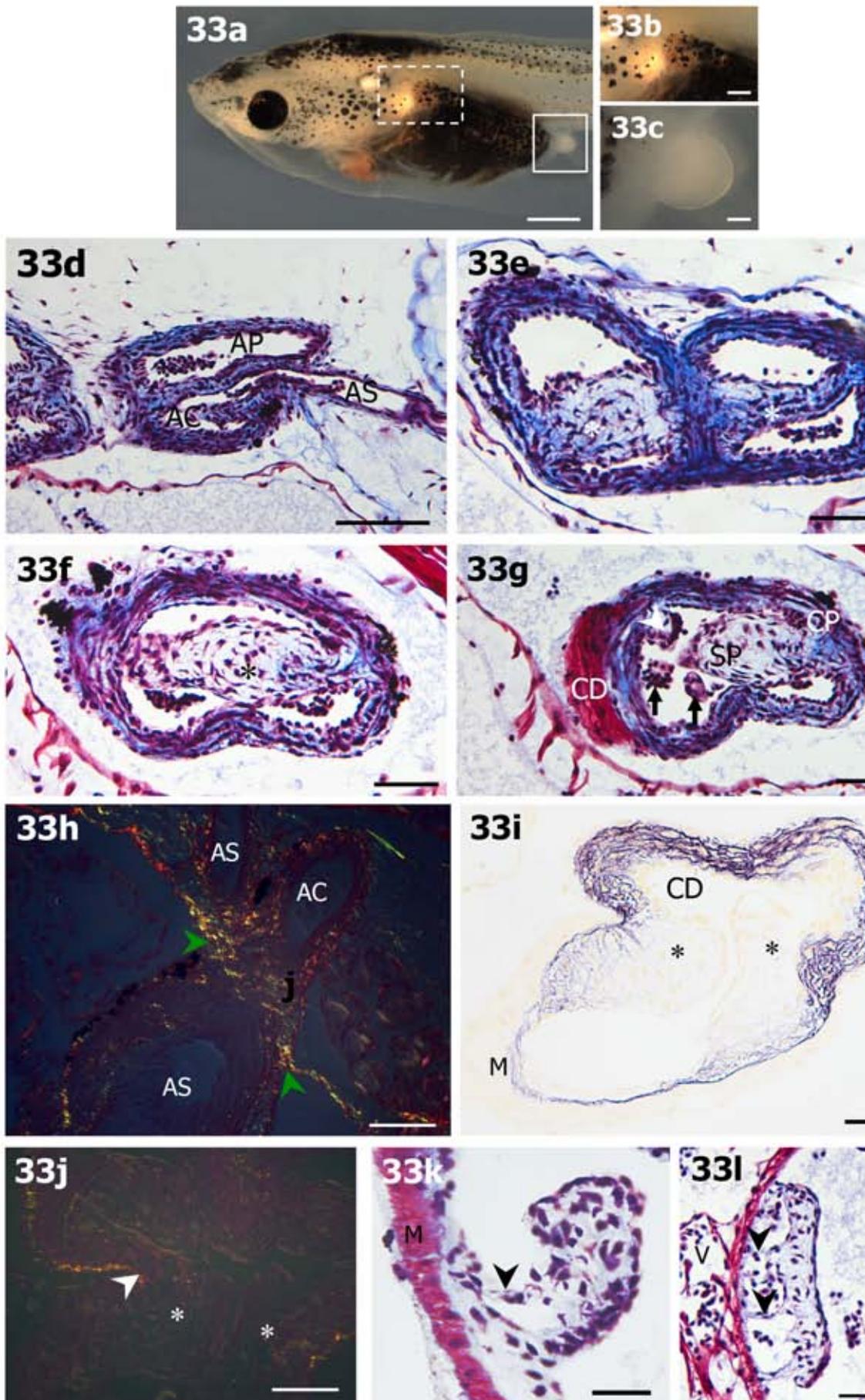
33h: Estadio 52. Sección transversal del componente distal del tracto de salida en el límite anterior del pericardio. Pricrosirio con microscopía de polarización. En la porción extrapericárdica de los troncos arteriales se observa una menor cantidad de fibras de colágeno tipo I. Las cabezas de flecha marcan el límite anterior del pericardio. AC, tronco arterial carotídeo; AS, tronco arterial sistémico. Barra 50 mm.

33i: Estadio 52. Sección frontal del tracto de salida. Resorcina-fucsina. La cantidad de fibras elásticas en el componente distal (CD) es mayor. Son más abundantes las fibras elásticas a lo largo de todo el subendocardio del tracto de salida. Los asteriscos marcan los cojines de las válvulas distales. M, miocardio. Barra 25 μm .

33j: Estadio 52. Sección frontal del tracto de salida. Pricrosirio con microscopía de polarización. En la zona de inserción de las valvas de la hilera proximal (asteriscos) se observan delgadas fibras de colágeno. La cabeza de flecha marca el límite del componente distal y proximal. Barra 25 μm .

33k: Estadio 51. Sección frontal del componente proximal del tracto de salida. Tricrómico de Mallory. Las valvas de la hilera proximal carecen de gelatina cardíaca y se hallan más celularizadas. La cabeza de flecha marca una cuerda tendinosa. M, miocardio. Barra 50 μm .

33l: Estadio 51. Sección frontal de la zona atrioventricular. Tricrómico de Mallory. Las válvulas atrioventriculares prácticamente culminaron su desarrollo y se observan numerosas cuerdas tendinosas (cabezas de flecha). V, ventrículo. Barra 50 μm .



está tapizada por endotelio. Más caudalmente, la pared de los troncos que conforman el componente distal del TS está recubierta externamente por una capa epicárdica. En la pared hay igualmente tres a cuatro capas de musculatura lisa, separadas por fibras elásticas y de colágeno. Además, aparecen fibras de colágeno por debajo del epicardio. Cabe señalar que en el componente distal la cantidad de fibras de colágeno tipo I es menor que en los troncos extrapericárdicos. La luz del componente distal está tapizada por un endocardio de células epiteliales aplanadas. El septo vertical que separa ambos troncos tiene la misma estructura que la pared externa, en la cual el colágeno tipo I está escasamente representado. Por su parte, el septo horizontal es de naturaleza mesenquimática. Su porción central está formada por una matriz que contiene células estrelladas dispuestas de forma laxa y concéntrica. En los extremos laterales, donde el septo se une a la pared del componente distal, hay tejido conjuntivo fibroso. El margen caudal del septo principal consiste en una proyección de tejido mesenquimático tapizado por endocardio.

Las válvulas progresan en su grado de maduración. Las válvulas distales presentan delgadas fibras de colágeno en la zona de inserción de las valvas en la pared del TS (Fig. 33j). Las valvas de la hilera proximal están más celularizadas que en el estadio anterior y carecen de gelatina cardíaca (Fig. 33k). Las valvas de ambas hileras van adquiriendo una forma más o menos semilunar. En la capa intermedia de dichas valvas proliferan las células mesenquimáticas. En este estadio aparecen las primeras cuerdas tendinosas, que discurren desde la cara parietal de las valvas hasta la pared del componente proximal (Fig. 33k). Por su parte, las válvulas atrioventriculares prácticamente han culminado su desarrollo (Fig. 33l).



- **Metamorfosis e individuos juveniles**

Los resultados que se describen en esta apartado incluyen individuos desde el estadio 57, en el cual que se inicia el proceso de metamorfosis, hasta ranas que aún no han alcanzado la madurez sexual, las cuales denominamos juveniles.

Durante el proceso de metamorfosis se producen diferentes cambios estructurales entre los que destacan, la reducción de la cola, desaparición de los tentáculos ubicados a ambos lados de las comisuras bucales y culmina el desarrollo de las patas traseras y delanteras. Internamente, los pulmones aumentan notablemente de tamaño y desaparecen los último vestigios de las formaciones branquiales. En este período prosigue la maduración de las estructuras que conforman el TS cardíaco. Las válvulas proximales y distales del componente proximal continúan formándose y es posible diferenciar el bloque endotelial en la base del componente distal (Fig. 34a).

Una vez finalizado el proceso de metamorfosis, en los individuos juveniles, las válvulas distales y proximales conservan aún un aspecto celularizado y es posible distinguir los componentes que constituyen las válvulas descritas en los adultos, valvas, senos y espacios intervalvares (Fig. 33a). En las válvulas distales, el endocardio y la cresta espiral, se tiñen intensamente ante el colorante azul alciano (Fig. 33a, b). Las válvulas proximales presentan una mayor concentración de fibras elástica en la cara luminal de la valva, al igual que en la base de la cresta espiral (Fig. 33a, c). Las válvulas proximales y en el subendocardio del componente proximal, se tiñen intensamente con azul alciano (Fig. 33d).

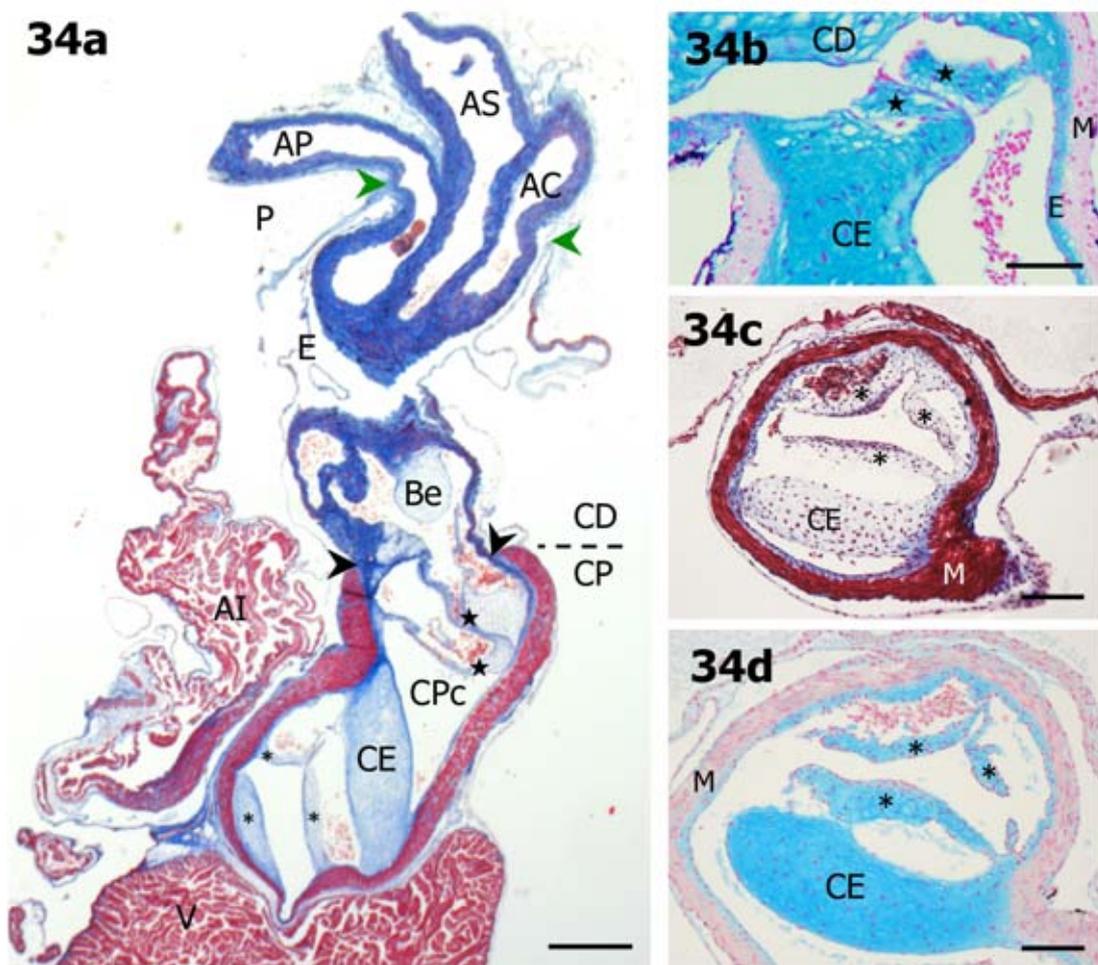
Figura 34. Individuos juveniles

34a: Sección parasagital del tracto de salida cardíaco y de la zona proximal de los grandes troncos arteriales izquierdos. Tricrómico de Mallory. El miocardio (M) aparece teñido de rojo. El resto del tejido y los componentes del conjuntivo en color azul. Las cabezas de flecha negras señalan el límite anterior (cefálico) del miocardio. El componente proximal (CP) es el más largo y en sus extremos se localizan sendas hileras de válvulas, proximales (asteriscos) y distales (estrellas), entre las cuales se extiende la denominada cresta espiral (CE). El componente distal (CD) se divide en tres grandes troncos arteriales, tronco arterial pulmocutáneo (AP), tronco arterial sistémico y tronco arterial carotídeo (AC). Las cabezas de flecha verde marcan el límite anterior del pericardio. AI, aurícula izquierda; Be, bloque endotelial; CPc, cavum pulmocutaneum. E, epicardio; P, pericardio; V, ventrículo. Barra 500 μm .

34b: Sección frontal de la porción cefálica del componente proximal del tracto de salida. Azul alciano. Una de las válvulas (estrellas) de la hilera distal se encuentra unida a la cresta espiral (CE). El componente distal (CD), las válvulas distales del componente proximal y el endocardio (E) están intensamente teñidos a una concentración de 0,3 M del colorante azul alciano. M, miocardio. Barra 200 μm .

34c: Sección transversal del componente proximal del tracto de salida a la altura de las válvulas proximales. Tricrómico de Mallory. La cresta espiral (CE) se inserta en el lado izquierdo del componente proximal. Los asteriscos marcan las válvulas proximales. M, miocardio. Barra 200 μm .

34d: Sección transversal del componente proximal del tracto de salida a la altura de las válvulas proximales. Azul alciano. Las válvulas proximales (estrellas), la cresta espiral (CE) y el endocardio (E) están intensamente teñidos con la tinción de azul alciano. M, miocardio. Barra 200 μm .





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Discusión





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Las modificaciones orgánicas que han acompañado el tránsito evolutivo de la vida acuática a la terrestre han sido objeto de notable interés en el ámbito de la Biología. Es sabido que la aparición de los pulmones conlleva la instauración de un doble circuito de circulación sanguínea en los vertebrados. Entre los vertebrados actuales, además de los amniotas y el grupo parafilético de los anfibios, presentan pulmones algunos peces como los polipteriformes y los dipnoos. De los grupos mencionados, los anfibios se han considerado tradicionalmente como los representantes que mejor ilustran la conquista del medio terrestre por parte de los vertebrados. En concreto, los cambios experimentados por el corazón de los anfibios en concomitancia con dicho tránsito han constituido un tema de interés y ampliamente tratado, sobre todo desde la perspectiva fisiológica.

De forma general se puede describir el corazón de los anfibios como un órgano intrapericárdico que consta de un seno venoso que se abre en el atrio derecho, dos atrios, izquierdo y derecho, separados por un septo interatrial, un ventrículo indiviso y una región o TS que presenta internamente la denominada cresta (o válvula) espiral. A este esquema corresponde la organización del corazón de los anuros, posiblemente el que se ha estudiado con mayor profundidad de entre los distintos grupos de anfibios. Ello obedece al empleo de la rana como modelo animal en una gran diversidad de estudios de embriología y fisiología desde los inicios de estas disciplinas (Burggren y Warburton, 2007). De hecho, la bibliografía sobre la anatomía y el corazón de los anfibios en general y de los anuros, en particular, es muy amplia y comprende desde mediados del siglo XIX hasta la actualidad (p.ej., Boas, 1880; Marshall, 1896; Graff, 1957; Morris, 1974; Langille y Jones, 1977; Sedmera et al., 2003).

Ahora bien, dado que en los anfibios el intercambio de gases puede darse a través de tres superficies diferentes, a saber, la superficie corporal

(como por ejemplo, en algunas salamandras), las branquias (como en la mayoría de las larvas) y los pulmones (como en la mayoría de los anuros adultos), la estructura del corazón también es variable. En los urodelos que carecen de pulmones, el tabique interatrial y la válvula espiral están muy reducidos o incluso ausentes (Noble, 1925). En las salamandras pletodóntidas, en las cuales, además, la respiración cutánea predomina sobre la pulmonar, el atrio izquierdo está ausente. En las salamandras adultas estrictamente acuáticas (ej., *Necturus*) en las que la respiración branquial predomina sobre la pulmonar, el tabique interatrial está perforado o incluso falta. Con respecto al ventrículo, se puede decir que los anfibios son los únicos vertebrados actuales con un ventrículo único, carente de tabicación interna, cuyas paredes presentan numerosas trabéculas. Una excepción la constituyen los urodelos sirénidos que poseen un tabique ventricular incompleto. También existen diferencias en los distintos grupos de anfibios en cuanto a la ramificación de los grandes troncos que emergen del corazón.

Independientemente del origen de la sangre oxigenada y desoxigenada que entra en el corazón, por su interior los dos flujos sanguíneos discurren funcionalmente separados. Al igual que en los dipnoos, la sangre desoxigenada es enviada selectivamente hacia los pulmones, mientras que la sangre oxigenada se dirige hacia el cuerpo. En esta separación juega un papel fundamental la estructura del TS cardíaco.

La bibliografía relativa al TS cardíaco de los anfibios en general, y de los anuros en particular, es muy amplia (p.ej., Gaupp, 1896; Marshall, 1896; Parker y Haswell, 1987; Rao y Ramanna, 1925; Peelle, 1931a, 1932; Sharma, 1957; Bertin, 1958; Johansen y Hanson, 1968; Morris, 1974; Putnam, 1977; Lawson, 1979, Johansen y Burggren, 1980; Putnam y Parkerson, 1985; Moorman y Christoffels, 2003). En ella se describe la organización de esta región cardíaca en diversas especies e incluso se hace



referencia a variaciones anatómicas a nivel interespecífico. No obstante, son pocos los trabajos que abordan el estudio estructural del TS y la información histológica que aportan es escasa (Rao y Ramanna, 1925; Davies y Francis, 1941; Putnam, 1977; Putnam y Parkerson, 1985). En la citada bibliografía queda patente que existe una variación interespecífica notable en la anatomía del TS cardíaco, aunque la gran mayoría de los autores constatan la existencia de dos componentes en el TS, uno proximal y otro distal con respecto al ventrículo. No obstante, hay una notable confusión en cuanto a la interpretación morfológica de dichos componentes, como queda puesto en evidencia por la diversidad de términos utilizados para nombrarlos y, en ocasiones, por la dificultad para hallar la equivalencia entre los diversos términos empleados por los distintos autores para designar un determinado componente.

En 1882, Boas empleó los términos *conus arteriosus* y *bulbus arteriosus* para designar los dos componentes, proximal y distal, del TS, respectivamente. Esa misma nomenclatura ha sido adoptada por Parker y Haswell (1897), Rao y Ramanna (1925), Putnam (1977), Lawson (1979) y Putnam y Parkerson (1985). Otros autores han utilizado los términos *pylangium* y *synangium* (Marshall, 1896; Weichert y Presch, 1981), o bien *bulbus cordis* y *truncus impar* (Gaupp, 1896; Peelle, 1931b, 1932), o *bulbus cordis* y *truncus arteriosus* (Terhal, 1942).

En otros casos, a todo el TS se le denomina como arterial (p.ej., Pirlot, 1976, Weichert y Presch, 1981, Kardong, 2007), simplemente *conus* (Sharma, 1957; Morris, 1974) o *bulbo* (Montagna, 1967), o *bulbus arteriosus* (Bertin, 1958; Johansen y Burggren, 1980; Moorman y Christoffels, 2003). Incluso en un mismo tratado, se emplean indistintamente ambos términos para hacer referencia al TS (Hickman et al., 2006).

El cono arterioso, tomado éste como el componente proximal del TS, está situado a continuación del ventrículo único, tiene aspecto musculoso y está provisto internamente de una válvula espiral que determina la existencia de dos canales por los que la sangre es dirigida hacia unos u otros conductos arterioso (p.ej., Kardong, 2007). Además, en la base del cono arterioso hay unas válvulas semilunares que evitan el retroceso de la sangre hacia el ventrículo. El número de estas válvulas oscila entre tres (Sharma, 1957, 1961) y cuatro (Pirlot, 1976), aunque en muchos trabajos la cantidad no se precisa. También se ha mencionado la presencia de este tipo de válvulas en el extremo cefálico del cono.

En la bibliografía, el componente distal del TS, designado mediante términos muy variados, se ha descrito como un segmento de aspecto menos musculoso que el proximal que se prolonga en lo que se ha venido a denominar “una horquilla aórtica compleja” (Pirlot, 1976) o un tronco arterial (Kardong, 2007). La parte anterior del componente distal se abre en dos troncos, cada uno de los cuales se escinde a su vez en tres arterias, una pulmo-cutánea, otra sistémica y otra carotídea. Excepto en especies sin pulmones, el componente distal está dividido internamente por un septo principal (u horizontal) a lo largo de toda su longitud y, más distalmente, por otros dos septos, perpendiculares al septo horizontal. Así, se establecen dos conductos dorsales, que son las bases de los troncos pulmo-cutáneos, y dos conductos ventrales, que constituyen las bases de los troncos sistémicos-carotídeos.

Con la excepción de Moorman y Christoffels (2003), que opinan que todo el TS cardíaco de los anfibios, que ellos denominan *bulbus cordis*, equivale al cono arterioso de los peces, no se ha hallado en la bibliografía referencia acerca de la posible homología de los componentes del TS cardíaco de los anfibios con los elementos que ocupan una posición relativa



semejante en el corazón de otros grupos de vertebrados, en especial con los pertenecientes a grupos antiguos de vertebrados gnatostomados.

Los resultados obtenidos en estudios recientes sobre el TS en grupos de vertebrados filogenéticamente basales han llevado a reconsiderar algunas de las interpretaciones que se han asumido a lo largo de décadas relativas al significado morfológico del TS en los anfibios, como representantes actuales de los primeros vertebrados pulmonados.

Durante más de un siglo se ha venido aceptando que, en los peces, entre el ventrículo y la aorta ventral se interpone un TS, cuya naturaleza y denominación difiere en los distintos grandes grupos. De hecho, en la mayoría de libros de texto y otras fuentes bibliográficas consta que en los condictios el TS está formado por el cono arterioso, que es de naturaleza miocárdica, como el resto del corazón en los representantes de este grupo. Por el contrario, en los teleósteos el TS es un bulbo arterioso, no miocárdico. No obstante, en los amiiformes y en los elopiformes, grupos antiguos dentro de los actinopterigios, el TS consta de un cono arterioso miocárdico y un bulbo arterioso no miocárdico. Todos estos datos han conducido a una interpretación simplificada de la situación, que se concreta en la idea formulada por Smith (1918). Según este autor, el cono arterioso se ha ido reduciendo progresivamente a lo largo de la historia evolutiva de los actinopterigios hasta quedar vestigial e incluso desaparecer en muchos grupos de teleósteos.

Una serie de estudios realizados en los últimos años han rebatido las ideas clásicas sobre la organización general del TS en los peces. De una parte, se ha constatado la existencia de un cono arterioso en los teleósteos, a partir de resultados obtenidos, en primer lugar, en la dorada (Schib et al., 2002) y posteriormente en un número amplio de especies de teleósteos (Icardo, 2006). Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la coexistencia

de un cono arterioso y un bulbo arterioso en los elasmobranquios (Durán et al., 2008; Rodríguez et al., 2016), los holocéfalos (Durán et al., 2010; Rodríguez et al., 2013), los acipenseriformes (Guerrero et al., 2004), los amiiformes (Grimes et al., 2010), los lepisosteiformes (Grimes et al., 2010) y los polipteriformes (Grimes et al., 2010; Durán et al., 2014). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el TS debe estar constituido por un cono arterioso y un bulbo arterioso desde el principio de la historia evolutiva de los vertebrados gnatostomados (Rodríguez, 2014). Considerando de forma conjunta los resultados expuestos y la controversia sobre la naturaleza del TS cardíaco de los anfibios, se ha suscitado la cuestión acerca de si en éstos se han conservado los constituyentes originales del TS de los vertebrados gnatostomados.

En el presente trabajo se ha estudiado el TS cardíaco de la rana africana *X. laevis*, una especie de anuro de hábitos acuáticos ampliamente utilizada en estudios experimentales. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que, en esta especie, distalmente con respecto al ventrículo se extiende un elemento intrapericárdico, en el que se distingue un componente de pared miocárdica, recubierto por epicardio y provisto internamente de válvulas, seguido de otro componente cuya pared no es miocárdica, sino que posee musculatura lisa. La coincidencia en ubicación y estructura histomorfológica de los citados componentes en esta especie de anuro y en los elasmobranquios sugiere que el TS cardíaco de los anfibios consta, en realidad, de un cono arterioso y un bulbo arterioso, conservándose por tanto el diseño del polo arterioso del corazón que se considera como el original en los primeros vertebrados gnatostomados.

En esta tesis se ha abordado, además, el estudio del desarrollo embrionario del TS cardíaco en *X. laevis*. Se ha constatado que los principales rasgos de dicho desarrollo coinciden con las secuencias observadas



en el caso de los teleósteos (Grimes et al., 2006) y los elasmobranquios (Durán et al., 2008). Todo ello apoya la hipótesis de que los componentes del polo arterioso de los anfibios son homólogos a los de los vertebrados gnatostomados pisciformes.

Aspectos morfológicos del tracto de salida cardíaco

Como se ha indicado con anterioridad, la existencia de dos componentes en el TS, uno proximal y otro distal con respecto al ventrículo, está recogida en buena parte de la bibliografía relativa al corazón de los anfibios. No obstante, en muchas ocasiones las descripciones y la terminología son confusas.

En los ápodos el TS es un segmento recto y alargado que se origina en la posición medio-ventral del ventrículo. En la bibliografía se describe la existencia dos componentes, uno de posición proximal y otro distal. El componente proximal recibe el nombre de conus arteriosus y el distal, truncus arteriosus (Weidersheim, 1879; Ramaswami, 1944; Rathke, 1952; Lawson, 1966; Duellman y Trueb, 1994; Wilkinson, 1996) o bulbus arteriosus (Reese, 1906; Branch, 1935). El conus arteriosus es una porción corta y cilíndrica que contiene internamente una hilera de válvulas semilunares, como ocurre en los géneros *Ureotyphlus*, *Boulengerula*, *Scolecormorphus*, *Gegenophis*, *Siphonops* y *Chthooneperpeton*, o bien dos hileras, como es el caso en *Ichthyophis*, *Herpele*, *Dermophis* y *Hypogeophis*). En cada una de dichas hileras se alinean tres válvulas. Una de las válvulas ocupa una posición dorsal y las dos restantes se ubican en posición ventro-lateral. De estas dos últimas, una se inserta en la pared del conus en un posición más caudal. En el género *Boulengerula* se da la peculiaridad de que una de las válvulas ventro-laterales es notablemente más pequeña que las restantes (Ramaswami, 1944). También cabe mencionar que en el género *Siphonops*,

de las válvulas presentes en la única hilera, dos son dorsales y la restante ocupa una posición ventral (Sawaya, 1941). En *Hypogeophis* e *Ichthyophis glutinosus* una cresta espiral divide el flujo sanguíneo en una cámara carotídea dorsal, con sangre arterial, y una cámara ventral, con sangre venosa (Sarasins, 1880; Marcus, 1935; Schilling, 1935; Acolat, 1939). En *Ichthyophis monochorous*, el denominado pliegue espiral se ubica en la pared dorso-ventral (Ramaswami, 1944).

En los ápodos la información sobre la estructura de la pared del conus y la disposición del miocardio es confusa. Según Lawson (1966), la pared dorsal del conus es ligeramente más gruesa que la ventral. En la pared, el miocardio, de tipo compacto, forma una capa concéntrica continua. Estos datos difieren de las observaciones realizadas por Ramaswami (1944), que describe que la pared ventral es más gruesa que la dorsal. El miocardio está organizado en paquetes que se continúan con la musculatura circular externa del ventrículo. En la capa contigua al miocardio se disponen una o dos láminas de fibras elásticas. Algunas fibras parten desde las trabéculas de la zona central del ventrículo y penetran en la pared del conus. La superficie externa de la pared del conus está cubierta con una extensa red de venas y arterias coronarias.

El truncus arteriosus es el componente distal del TS y presenta un calibre ligeramente menor que el conus arteriosus (Lawson, 1966). Este autor no describe con detalle la estructura histológica del truncus, sino que simplemente indica que consta de musculatura circular dispuesta en torno a una lámina interna de fibras elásticas. En los géneros *Ureotyphlus*, *Boulengerula*, *Dermophis*, *Scolecormorphus* y *Herpele*, el truncus, en su porción caudal, está dividido por un tabique vertical en dos cámaras, izquierda y derecha (Lawson, 1966; Wilkinson et al, 2014). Estas cámaras no son simétricas, siendo la derecha la de mayor tamaño. En una posición



más cefálica, cada una de estas cámaras queda dividida por un tabique oblicuo en una cámara carotídea, medio-ventral, y una cámara sistémico-pulmonar. Conforme discurre el truncus arteriosus en dirección cefálica, en el límite anterior del pericardio, sus cámaras internas se separan, dando lugar a un par de arcos pulmonares y un par de arcos sistémicos-carotídeos.

En los urodelos también se referido en la bibliografía la existencia dos componentes en el TS. El componente proximal ha recibido diferentes denominaciones, tales como bulbus cordis (Davies y Francis, 1941; Terhal, 1942) y conus arteriosus (Putnam, 1977; Putnam y Parkerson, 1985). Para nombrar el componente distal se han utilizado los términos truncus arteriosus (Davies y Francis, 1941; Terhal, 1942; Putnam, 1977; Putnam y Parkerson, 1985) y bulbus arteriosus (Reese, 1906; Branch, 1935). En la mayoría de los urodelos, el componente proximal del TS se origina desde la porción dextro-ventral del ventrículo. A continuación, se curva ligeramente hacia la zona sinistro-dorsal. Posteriormente, en la zona de transición entre el componente proximal y el distal, el TS se curva nuevamente en dirección dorso-ventral.

Internamente, el componente proximal presenta sendas hileras de válvulas con forma de bolsillo, insertadas en la pared en posición caudal y cefálica, respectivamente. Noble (1931) analizó ejemplares de diferentes géneros de urodelos y puso en evidencia la gran variabilidad existente tanto en el número, tamaño y disposición de las válvulas, como en cuanto a la presencia o ausencia de una cresta espiral entre dichas hileras de válvulas. En *Amblystoma maculatum*, *A. mexicanum*, *Salamandra salamandra*, *Anphiuma tridactylum* y *S. lacertina*, la hilera proximal presenta tres válvulas de similar tamaño y una válvula accesorio que se inserta caudalmente con respecto al resto de válvulas. En estas especies, la hilera distal está formada por cuatro válvulas de tamaño similar. Una de las válvulas de la hilera distal está asociada al extremo cefálico de la cresta espiral. Las observaciones

de Noble (1931) fueron corroboradas posteriormente por otros autores (Francis, 1934; Terhal, 1942; Johansen, 1963; Putnam, 1977). *A. musculatum* posee igualmente una cresta espiral entre las dos hileras de válvulas. En *Amblystoma opacum* la cresta espiral es de reducido tamaño, abarcando las dos cuartas partes de la zona cefálica del componente proximal. El resto de especies analizadas por Noble (1931) carecen de cresta espiral y tienen un número variable de válvulas: *R. olympicus*, cuatro en la hilera proximal y cuatro en la distal, *C. alleganiensis* cinco en la hilera proximal y cuatro en la distal y *P. glutinosus* tres válvulas proximales y tres distales de similar tamaño. Por su parte, Putnam and Kelly (1978) sí identificaron una cresta espiral rudimentaria en *Plethodon glutinosus*.

Se ha aducido que el pequeño tamaño o incluso la ausencia de la cresta espiral es un carácter directamente relacionado con la presencia de pulmones muy rudimentarios, como sucede en varios géneros de urodelos en los que predomina la respiración cutánea (Bentley y Shield, 1973; Czopek, 1965; Foxon, 1964; Guimond y Hutchison, 1972, 1976; Holmes, 1975; Johansen y Hanson, 1968; Lawson, 1979; Noble, 1925; Piiper et al., 1976; Simons, 1959; Putnam y Parkerson, 1985). Boas (1882) describe el conus arteriosus de *Salamandra* como un tubo corto con forma espiral, de forma semejante a lo que sucede en *Ceratodus* (= *Neoceratodus*). En trabajos posteriores, Körner (1938) propone que la forma espiral surge secundariamente, como sucede en el curso del desarrollo en *Pleurodeles waltlii*, que en estado larvario y durante la metamorfosis no presenta el conus torsionado, mientras que los adultos de esta especie muestran un conus torsionado en espiral.

La pared del componente proximal en *Cryptobranchus alleganiensis* posee miocardio compacto (Putnam y Parkerson, 1985). Según Terhal (1942), en *Salamandra maculosa*, la pared del componente proximal está constituida por tres capas: epicardio, miocardio y endocardio. En los individuos



juveniles, el epicardio es una capa notablemente más gruesa, especialmente en la zona caudo-ventral del componente proximal, el miocardio consiste en elementos musculares indiferenciados y el endocardio es una capa continua encarada con el lumen. En secciones transversales correspondientes a ejemplares adultos, las fibras musculares de la zona caudal del componente proximal se disponen concéntricamente. En la zona media es más difícil percibir la dirección de las fibras a causa de las curvaturas, caudal y cefálica, del componente proximal. Sin embargo, las fibras parecen estar dispuestas en dos capas, una externa y otra interna. En la capa externa, las fibras se disponen longitudinalmente y en la capa interna presentan una orientación circunferencial. Cabe señalar que Terhal (1942) describe en la cara interna de la zona cefálica del componente proximal la presencia de una fina capa de fibras musculares lisas que quedan separadas del miocardio existente en la cara externa por medio de tejido conjuntivo fibroso. Este autor señala que estas fibras musculares lisas pertenecen al componente distal. Tal disposición, que Terhal (1942) aprecia tanto en larvas tardías como en animales adultos, coincide con las observaciones realizadas en *X. laevis* en la presente tesis. Esta especie muestra también una superposición de musculatura lisa y miocardio en el extremo cefálico del componente proximal, es decir, del cono arterioso, tal y como sucede en el polo arterioso del corazón en otros grupos de vertebrados (Grimes et al., 2010).

En los urodelos el componente distal se denomina generalmente truncus arteriosus en la literatura. La pared del componente distal está formada por abundante tejido conjuntivo fibroso y musculatura lisa, con una disposición concéntrica (Terhal, 1942). Internamente, dicho componente constituye una estructura única en su zona caudal, pero en su zona cefálica está dividido en ocho conductos que constituyen la base de los arcos aórticos (Terhal, 1942). Este autor ha descrito en detalle la tabicación interna del componente proximal en *Cryptobranchus alleganesis*. En esta especie el septo medio

carotídeo junto con el septo medio pulmonar dividen el truncus arteriosus en dos mitades, izquierda y derecha. Los dos septos aórtico-carotídeos se extienden desde el septo medio carotídeo hacia la pared ventral derecha e izquierda del truncus formando el tercer y cuarto par de arcos aórticos. Los dos septos principales se extienden desde el septum medio pulmonar hasta las paredes ventro-laterales derecha e izquierda. Estos septos forman parte del cuarto y quinto par de arcos aórticos. Dos septos accesorios se extienden desde los septos principales o desde el septo medio pulmonar, para conectar con la pared dorso-lateral derecha e izquierda del truncus, contribuyendo así a la formación del quinto y sexto par de arcos aórticos.

En los urodelos, el número de arcos aórticos varía de dos a seis pares. La presencia de cuatro pares de arcos ha sido indicada por Boas (1882) y Francis (1934) en *Salamandra salamandra*, por Noble (1925) en *Ambystoma maculatum*, por Putnam y Sebastian (1977) en *Amphiuma tridactylum* y por Beddard (1903) en *Andrias japonicus*. No obstante, Terhal (1942) observó otras disposiciones en *S. salamandra*, como por ejemplo la existencia de un único quinto arco, ya sea izquierdo ya sea derecho, o incluso algún arco con extremo ciego. En *Ambystoma mexicanum*, Lemanski (1973) señala cuatro pares de arcos aórticos, pero en algunas ocasiones el arco pulmonar se divide para formar un quinto tronco. En *A. tridactylum*, se han descrito cuatro pares de arcos aórticos (Putnam y Sebastian, 1977) o bien tres pares (Baker, 1949; Johansen, 1963). En las especies *Desmognathus fuscus* y *Plethodon cinereus*, McMullen (1938) describe la presencia de cinco pares, a diferencia de Bruner (1900), Cords (1924) y Noble (1925) que señalan la existencia de seis pares de arcos aórticos en estas mismas especies.

En la bibliografía consultada, las únicas referencias relativas al sistema coronario en los urodelos son las aportadas por Putnam y Parkerson (1985). Estos autores describen un sistema venoso bien desarrollado que recorre la



superficie del componente proximal en *Cryptobranchus alleganiensis*, con una vena coronaria izquierda y otra sinistro-ventral que se conectan a la vena coronaria lateral derecha presente en el ventrículo. Además, hay una arteria coronaria que se origina en el componente distal y lo recorre siguiendo una trayectoria primero ventral y después dorsal.

En los anuros el TS emerge de la porción dextro-ventral del ventrículo, según las observaciones de numerosos autores (Bourne, 1902; Kerr, 1921; Marshall, 1896; Borradaile, 1945; O'Donoghue, 1945). En cambio, Foxon (1951), Sharma (1957, 1961) e Ison (1967), en sus trabajos sobre *Leptodactylus*, *Rana pipiens* (= *Lithobates pipiens*) y *Rana temporaria*, respectivamente, han puesto de manifiesto que el TS surge de la porción medio-dorsal derecha del ventrículo. En los ejemplares adultos de *X. laevis* estudiados en el presente trabajo se ha observado que el TS cardíaco, que constituye un segmento intrapericárdico interpuesto entre el ventrículo y los grandes troncos arteriales, se origina en la zona dextro-dorsal del ventrículo. A continuación, discurre con una inclinación de 45° hacia el lado izquierdo del corazón, hasta conectar con los grandes troncos arteriales ubicados en una posición cefálica. Dichas observaciones coinciden con las descritas por Graff (1957) en *X. laevis*. Las diferencias en las descripciones pueden deberse a que los primeros autores mencionados realizaron únicamente observaciones macroscópicas, sin determinar el punto de origen interno del TS. En *X. laevis*, conforme el TS emerge del ventrículo y se dirige hacia la zona ventral, sufre una torsión que orienta el TS hacia la izquierda. Posteriormente se produce una segunda torsión, que inclina el TS en dirección dorsal. Estas observaciones concuerdan con las descripciones realizadas por Ison (1967) en *Rana temporaria*, Sharma (1961) en *Rana pipiens* (= *Lithobates pipiens*) y Graff (1957) en *X. laevis*.

Al igual que en los ápodos y los urodelos, en los anuros el TS cardíaco está formado por dos componentes, proximal y distal, que difieren desde el punto de vista anatómico e histomorfológico.

El componente proximal es el más largo y en sus extremos se localizan sendas hileras de válvulas, proximales y distales, entre las cuales se extiende la cresta espiral. Existe una gran diversidad de aportaciones bibliográficas con respecto al número y disposición de las válvulas del componente proximal. Algunos autores señalan la presencia de tres válvulas semilunares proximales y tres válvulas distales que se insertan en la pared del componente proximal (Boas, 1882; Marshall, 1896; Gaupp, 1899; Peelle, 1931b). Otros autores detallan que una de las tres válvulas distales se forma a partir de la cresta espiral (Rolleston, 1870; Bourne, 1902; Rau, 1924; Peelle, 1931a). Por su parte, Ison (1967) identifica cuatro válvulas proximales y dos distales en *Rana temporaria*, mientras que Graaf (1957) describe en *X. laevis* tres válvulas proximales y cuatro distales. En esta especie, una de las válvulas proximales ocupa una posición ventral y tiene un tamaño mayor que las dos restantes, que son dorso-laterales. Las cuatro válvulas distales son de tamaño similar. Dos de ellas están adheridas a ambos lados de la cresta espiral, de tal forma que una proyecta su margen libre hacia el cavum aórtico y la otra lo proyecta hacia el cavum pulmo-cutáneo. Las dos válvulas restantes están unidas a la pared del componente proximal. En los ejemplares adultos de *X. laevis* examinados en esta tesis se han hallado sendas hileras, proximal y distal, con cuatro válvulas en cada hilera. Las cuatro válvulas se sitúan en posición ventral, izquierda, dorsal y derecha, siendo la dorsal y la ventral las de mayor tamaño. Las cuatro válvulas distales ocupan una posición sinistro-dorsal, sinistro-ventral, derecha e izquierda, respectivamente. La válvula derecha está unida a la cresta espiral, a diferencia de las demás válvulas que se anclan en la pared del componente proximal. Esta descripción tiene algunos aspectos similares a la propuesta



por algunos autores clásicos. Rolleston (1870), Holmes (1916) y Languille (1977) señalan que en el extremo distal hay tres válvulas de tamaño similar, de las cuales una está fusionada con la cresta espiral. Peelle (1931a) en *Rana sphenoccephala* (*Lithobates sphenoccephalus*) identifica cuatro válvulas distales, pero con características y ubicaciones diferentes con respecto a los presentes hallazgos. Dicho autor identifica dos válvulas unidas a la pared del componente proximal, una ventral y otra dorsal, y una tercera válvula, unida a la cresta espiral, que está dividida por el septum principal que se origina en el componente distal. Esta descripción se asemeja a la de Graaf (1957) en *X. laevis*, mencionada anteriormente.

La cresta espiral ha sido descrita como un tabique estrecho, con una porción adherida a la pared del componente proximal y una porción libre, que forma una estructura que puede ser fácilmente desviada por los movimientos de contracción del corazón (Sabatier, 1873; Graaf, 1957; Sharma, 1957, 1961; Morris, 1974). Entre otras consideraciones, Graaf (1957) señala que durante la preparación de las muestras para obtener secciones histológicas, la cresta espiral disminuye su tamaño, se contrae y ocupa aparentemente un espacio menor en el interior del lumen del componente proximal que el que se aprecia en material fresco. Sin embargo, si se sacrifica el animal de una forma adecuada, facilitando la relajación muscular y deteniendo el corazón en diástole, los resultados obtenidos en tejido fresco y fijado son similares. Graaf (1957) aprecia que la cresta espiral es más estrecha en la zona proximal que en la zona distal, lo que atribuye a la diferencia en el grosor de los puntos de unión caudal y cefálico de la cresta a la pared del componente proximal. Según este autor, una estructura unida a la pared por una mayor superficie facilita la relajación rápida del componente durante la diástole ventricular, de tal forma que el aumento de la superficie de unión de la cresta espiral en la porción cefálica es una adaptación para responder rápidamente a la relajación de la musculatura de la pared en esa posición. En

las muestras estudiadas en este trabajo no se aprecia una diferencia notable entre las porciones proximal y distal de la cresta espiral. La apreciación de Graaf se podría atribuir a que, en la zona distal, la cresta espiral se une mediante una mayor superficie a la pared, dada la torsión que se produce en esta porción del TS. De existir tal diferencia, es plausible que contribuya a la dirección del flujo.

Son escasos los trabajos en los que consten descripciones histológicas detalladas sobre la estructura del TS de los anuros y, en particular, sobre su componente proximal (Gaupp, 1899; Rau, 1924; Sharma, 1961). Según la bibliografía consultada, dicho componente está estructuralmente formado por una capa externa, una capa media y una capa interna. La capa externa está constituida principalmente por tejido elástico, con una disposición más compacta en la zona próxima a la capa media. La capa media es la más gruesa y consiste en fibras musculares dispuestas circunferencialmente, que no parecen formar un anillo muscular completo. La capa interna está formada por células endoteliales. En la presente tesis se ha constatado que, en *X. laevis*, la pared del cono arterioso consta, de fuera adentro, de un epicardio, externo, bajo el cual hay un amplio espacio, el subepicardio, seguidamente una capa intermedia de miocardio compacto, después el subendocardio y finalmente el endocardio.

En *X. laevis* el bulbo arterioso consiste en las bases intrapericárdicas de los troncos arteriales que emergen del corazón. Externamente el bulbo arterioso es un tronco único que se escinde en dos. Estos troncos están tabicados internamente, conteniendo los troncos pulmo-cutáneos, sistémicos y carotídeos que, una vez atravesado el límite del pericardio, se continúan con las arterias pulmo-cutáneas, sistémicas y carotideas, respectivamente.

La tabicación del bulbo arterioso comienza en la zona de solapamiento del miocardio y la musculatura lisa. Entre el extremo cefálico del cono

arterioso, donde se encuentra la hilera de válvulas distales y se inserta dorsalmente la cresta espiral, y la porción media de dicha cresta queda un espacio desprovisto de válvulas a través del cual la sangre pasa hacia el cavum pulmo-cutáneo y seguidamente hacia los troncos pulmo-cutáneos. La cresta espiral discurre en dirección cefálica hasta unirse a la base del septo principal. En la porción caudal del bulbo arterioso, dicho septo divide el cavum sistémico-carotídeo y el pulmo-cutáneo en dos mitades. Seguidamente, en la pared del septo principal hay un bloque endotelial, con aspecto similar al de la cresta espiral, que sobresale hacia el lumen del cavum aórtico y del cavum pulmo-cutáneo. En una posición más cefálica, los septos vertical y medio dividen el cavum sistémico-carotídeo en dos troncos. Por lo tanto, la cresta espiral debe facilitar la separación de flujo no tan sólo en el componente proximal, dirigiendo además el flujo hacia el cavum pulmo-cutáneo y seguidamente hacia los troncos pulmo-cutáneos alojados en el bulbo arterioso.

Desde el punto de vista histomorfológico, en la bibliografía se contempla que la pared del componente distal es una continuación de la de los troncos aórticos (Rau, 1924; Sharma, 1961). En la presente tesis, se ha constatado que la pared del bulbo arterioso consta de un epicardio, por debajo del cual se dispone un amplio espacio subepicárdico con abundante tejido conjuntivo. Seguidamente, hay una capa media, formada por fibras musculares lisas con una orientación circunferencial entre las cuales se intercalan láminas de fibras elásticas y fibras de colágeno sobre todo tipo I. Finalmente, la capa más interna es el endocardio que tapiza el lumen del componente distal. Conviene insistir aquí en que la presencia de epicardio constituye una diferencia sustancial entre la pared del bulbo arterioso y sus derivados intrapericárdicos y la pared de los troncos extrapericárdicos, que carecen de esta capa externa. Además, en los ejemplares de *X. laevis* examinados en la presente tesis, del bulbo arterioso emergen arterias

coronarias que primero recorren este componente y después se ramifican por el cono arterioso. En cambio, la pared de los troncos extrapericárdicos no está recorrida por arterias coronarias.

En su estudio sobre la morfología del polo arterioso del corazón realizado en una amplia variedad de especies de vertebrados, incluyendo representantes de condriictios, actinopterigios y tetrápodos, Grimes et al. (2010) comprueban que, en todos los casos, el TS cardíaco consta de tres componentes. Uno de ellos es proximal, miocárdico, y abarca desde el ventrículo hasta la base de las válvulas del TS. Otro es distal, con musculatura lisa, y se extiende desde el límite craneal del componente miocárdico hasta la pared anterior de la cavidad pericárdica. Entre ambos hay un componente intermedio, que rodea y da soporte a las válvulas del TS. Cabe indicar que, aunque estos tres componentes se pueden identificar mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, lo cierto es que el reconocimiento del componente intermedio no es factible desde el punto de vista estrictamente anatómico.

Como se ha mencionado previamente, en los presentes ejemplares de *X. laevis* se ha identificado un componente intermedio, que coincide con el descrito en el trabajo de Grimes et al. (2010). No obstante, hay que puntualizar que, según estos autores, el solapamiento comienza en el extremo cefálico del componente proximal y se extiende por la región donde la cresta espiral contacta con la pared miocárdica del TS. En este punto, las observaciones del presente trabajo discrepan de las de Grimes et al. (2010) ya que en los presentes ejemplares de *X. laevis* la superposición miocardio-musculatura lisa se extiende caudalmente sólo hasta el fondo del seno de las válvulas de la hilera distal y no a lo largo de todo el componente proximal, es decir, el cono arterioso. Cabe señalar que Terhal (1942) observó la presencia de sendas capas de fibras musculares lisas y de miocardio en un segmento



del TS cardíaco en *Salamandra maculosa* y asumió que la musculatura lisa pertenecía al componente distal.

Aspectos embriológicos

Los eventos del desarrollo cardíaco en los anfibios, desde fases muy tempranas cuando sólo existen dos poblaciones de células cardiogénicas hasta la formación de las cámaras cardíacas, se parecen a los procesos equivalentes del desarrollo cardíaco en las aves y los mamíferos. Entre dichas similitudes están la curvatura hacia la izquierda del tubo cardíaco en formación, la presencia de válvulas atrioventriculares para separar el atrio y el ventrículo, la división asimétrica de los atrios en un momento temprano del desarrollo, en donde el lado derecho es de mayor tamaño, y la presencia de trabéculas en el miocardio ventricular. Entre las diferencias está el número de cámaras cardíacas. El corazón de *X. laevis* presenta dos atrios y un ventrículo, en lugar de dos atrios y dos ventrículos, como es el caso de las aves y los mamíferos. La configuración del corazón de los anfibios es de gran interés desde el punto de vista morfogénético y evolutivo, ya que representa un diseño intermedio entre la disposición característica de los peces, con cámaras dispuestas en serie, y el corazón tetracameral de aves y mamíferos.

En este trabajo se ha conseguido establecer la secuencia de eventos que se producen durante el desarrollo que van a dar lugar a la formación del TS cardíaco. Para ello fueron utilizadas diferentes técnicas que permiten poner en evidencia los diferentes procesos implicados en el desarrollo. Los movimientos que se producen durante el desarrollo del corazón de *X. laevis* no dejan de ser similares a los descritos por diferentes autores para otros grupos de vertebrados (De Jong et al., 1990; Muñoz-Chápuli et al., 1994; Didier et al., 1998; Christoffels et al., 2000; Van Den Berg y Moorman, 2009).

En *X. laevis*, la formación del corazón requiere de la interacción espacial de múltiples vías de señalización. La especificación de las células que formarán el corazón ocurre durante la gastrulación, etapa en la cual es fundamental la interacción entre el endodermo anterior y el mesodermo (Sater y Jacobson, 1989; Brade et al., 2007). En los estadios sucesivos estas células forman campos cardíacos bilaterales, derecho e izquierdo, que permanecen separados. Una serie de eventos morfogénéticos complejos permiten que los dos campos cardíacos se muevan hacia su posición final, en la zona media ventral del embrión. Como resultado del presente estudio se identificaron dichas células con los marcadores tempranos del desarrollo *Nkx-2.5* e *Islet-1*, lo que permitió identificar las estructuras cardíacas en formación y los principales movimientos que experimenta el tubo cardíaco lineal. Numerosos investigadores han puesto en evidencia que el factor de transcripción *Nkx-2.5* es un marcador de las células que provienen del campo cardíaco primario (Collop et al., 2006; Gessert y Kühl, 2009; Dorn et al., 2015). De la misma manera, las células que expresan el factor de transcripción *Islet-1* forman parte del campo cardíaco secundario (Cai et al., 2003; Dodou et al., 2004; Brade et al., 2007; Gessert y Kühl, 2009). Brade et al. (2007) señala que, para continuar el desarrollo, es necesaria una expansión del corazón lineal mediante la división e incorporación de células adicionales. En embriones de pollo y ratón se demostró que, después de la formación del tubo lineal, grupos de células se añaden a los polos arterioso y venoso (Stalsberg y DeHaan, 1969; Virágh y Challice, 1973; De la Cruz et al., 1977; Cai et al., 2003; Buckingham et al., 2005; Kelly, 2005; Moorman et al., 2007). Estas células que se añaden al tubo lineal son las que se denominan en la bibliografía como campo cardíaco secundario. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, los marcadores *Nkx-2.5* e *Islet-1* se expresan simultáneamente, por lo que ambos grupos celulares migran a la vez hacia la zona medio-ventral.



Todavía hoy se mantiene la controversia acerca de la existencia real de dos campos cardíacos. Actualmente, las técnicas de señalización celular o rastreo de linajes no permiten determinar específicamente la contribución de cada una de las células que expresan factores tempranos del desarrollo tales como *Nkx-2.5*, *Islet-1*. Sin embargo, si está claro que los patrones de expresión de los marcadores antes mencionados se hallan altamente conservados entre pollo, ratón y *Xenopus* (Yuan y Schoenwolf, 2000; Cai et al., 2003; Brade et al., 2007), por lo que se puede concluir que las células que expresan *Nkx-2.5* e *Islet-1* en *Xenopus* son homólogas a las que expresan dichos marcadores en amniotas.

En los estadios 26-28 las poblaciones de células cardiogénicas se ubican en la zona medio-ventral y la señal de expresión de los marcadores *Nkx-2.5*, *Islet-1* y *XMLC-2* son coincidentes. En el estadio 31-32, las poblaciones celulares, izquierda y derecha, se unen y forman un tubo más o menos recto. En los estadios sucesivos el tubo se va curvando. En primer lugar, en los estadios 33-34, muestra una forma de “S”. Seguidamente, en los estadios 35-36, el corazón se curva adoptando una forma de “C” en vista dorsal. En los estadios 37-38 el corazón continúa su proceso de torsión y la expresión de *Nkx-2.5* se limita a la porción miocárdica, es decir, la porción en la que se coexpresa con el factor de transcripción *XMLC-2* específico de las células miocárdicas. En estos estadios, células que migran desde la cresta neural, marcadas específicamente con *twist-1*, se ubican por delante del límite cefálico de la cavidad pericárdica en formación y, por tanto, anteriormente con respecto al TS. En el estadio 39, la torsión que sufre el corazón en desarrollo conlleva el que se comprima en el eje antero-posterior. En este estadio todo el miocardio expresa los marcadores *Nkx-2.5* y *XMLC-2*. La señal abarca hasta el límite anterior del TS cardíaco. En cambio, la señal del factor de transcripción *Islet-1* se extiende desde la zona media del corazón hasta la zona anterior a la glándula de cemento. Así, las

células que provienen del campo cardíaco primario, marcadas con *Nkx-2.5* y las células del campo cardíaco secundario, que expresan *Islet-1*, se van separando espacialmente para continuar su diferenciación en los tejidos que van a formar el corazón. Asimismo, en el estadio 39, las células provenientes de la cresta neural, marcadas con *Twist-1*, situadas fuera del pericardio, ahora entran en el TS y contribuyen a la formación de la cresta espiral que recorre el componente proximal del TS. En general, estos movimientos de la morfogénesis cardíaca en *X. laevis* son similares a los descritos por Nieuwkoop y Faber (1994), Mohun et al. (2000) y Kolker et al. (2000) en la misma especie y por otros autores en diferentes grupos de vertebrados (Schib et al., 2000; Männer, 2000, 2004; Anderson et al., 2003; Kirby, 2007). Como nuevo dato, en la presente tesis se ha comprobado que células de la cresta neural participan en la formación de la cresta espiral.

Desde el punto de vista estructural, en los estadios 33-34, el tubo cardíaco está formado por una capa miocárdica externa que rodea a una capa de gelatina cardíaca y a un endocardio. En los estadios 35-39, se produce un aumento del número de células que componen el corazón en desarrollo y se diferencian sus cámaras, con lo cual este órgano adquiere su configuración anatómica definitiva. Hacia el estadio 40, se observa un cambio en la morfología de las células endocárdicas situadas en el extremo distal del TS. Estas células tienen una forma redondeada, con núcleos voluminosos, y no aplanadas, como sucede en estadios previos. En cambio, las células miocárdicas conservan una forma redondeada, aunque presentan un notable aumento de gotas lipídicas. En el estadio 42, en el extremo distal del TS, en posición intrapericárdica, aparecen algunas células de morfología singular, que constituyen los primeros indicios de la formación de un nuevo componente. De este modo, en el estadio 42 en el TS se aprecian por primera vez dos componentes, uno proximal y otro distal, que difieren en la morfología de sus células así como en la expresión de los marcadores de los

campos cardíacos. Al contrario de lo que sucede en el componente proximal, en el distal no se expresan *Nkx-2.5* y *XMLC-2*, pero sí *Islet-1*, lo que sugiere que el componente distal es producto de la diferenciación de células que provienen del campo cardíaco secundario. En la bibliografía relativa a los marcadores *Nkx-2.5* y *Islet-1* no existen referencias sobre este hallazgo, ya que generalmente se analizan muestras de estadios muy tempranos y en pocas ocasiones mediante técnicas histomorfológicas (Brade et al., 2007; Deimling y Drysdale, 2009; Gessert y Kühl, 2009).

A partir del estadio 42 todo el miocardio, incluido el del TS cardíaco, presenta inmunorreactividad frente al anticuerpo A4.1025. En cambio, el componente distal no reacciona frente este anticuerpo.

En un trabajo previo sobre el desarrollo cardíaco en el pez cebra, Hu et al. (2000) observaron que, a partir de un determinado estadio, el extremo distal del TS en formación no reaccionaba frente a MF 20, un anticuerpo que se une específicamente a las miosinas características del miocardio, de forma semejante al A4.1025. En cambio, las células de la porción distal del TS pasaban a ser inmunorreactivas frente a un marcador de musculatura lisa. Hu et al. (2001) interpretaron este resultado como una variación fenotípica experimentada por las células de esta zona. Más adelante, Guerrero et al. (2004) realizaron una observación semejante en el curso de un estudio sobre el desarrollo del TS en el esturión. Una causa del cambio fenotípico podría ser la desaparición de miocardiocitos por un proceso de apoptosis (Watanabe et al., 1998), los cuales serían sustituidos por células musculares lisas procedentes del mesénquima cefálico (Hu et al., 2001). En un trabajo posterior, Grimes et al. (2006) demuestran que la aparición de un nuevo componente con características no miocárdicas desplaza el componente miocárdico en dirección caudal. En la presente tesis, los resultados negativos obtenidos con el anticuerpo Caspasa-3, específico de

células que se encuentran en proceso de muerte celular, permiten descartar la existencia de apoptosis en las células del extremo distal del TS. Estos resultados se han confirmado mediante pruebas de TUNEL.

Las observaciones realizadas en este trabajo indican que la aparición del componente distal del TS va acompañada de un notable aumento del número de células en el corazón en formación. Esto sugiere que células que se están diferenciando en la zona distal del TS comienzan a multiplicarse y a formar la nueva estructura diferente a lo que ocurre en la zona que presenta miocardio. En relación con esta idea, Mohun et al. (2000) proponen que el aumento del número de células que tiene lugar en aquellas porciones del corazón formadas por miocardio está relacionado con la reorganización del mismo en varias capas en la zona del TS y el comienzo de la formación de las trabéculas ventriculares a partir del estadio 39. Por lo tanto, posiblemente el aumento del número de células y señales que suprimen la expresión de *Nkx-2.5* en la zona distal de TS, favorecen la diferenciación del nuevo componente, por lo que se puede inferir que el componente distal en *X. laevis* es una estructura derivada del campo cardíaco secundario y que es homólogo a la base de los grandes troncos arteriales de aves y mamíferos.

En lo que respecta al desarrollo del TS, es importante destacar la serie de eventos que permiten la formación de las válvulas del componente proximal y la cresta espiral. Alrededor de los estadios 37-38 la gelatina cardíaca del TS presenta un grosor homogéneo y comienzan a observarse cambios en la capa miocárdica, las células son más redondeadas y con gran cantidad de gotas lipídicas y las células endocárdicas adquieren forma cúbica. Estos cambios indican que a partir de este estadio comienza el proceso de formación de los cojines mesenquimáticos que darán lugar a las válvulas del componente proximal del TS. Durante el estadio 39 células mesenquimáticas provenientes del saco aórtico migran hacia el interior del



TS para formar la futura cresta espiral. Por los resultados obtenidos en el presente trabajo, queda demostrado que las células antes mencionadas son derivadas de la cresta neural, ya que expresan selectivamente el marcador *Twist-1*. Por lo tanto, la entrada de este nuevo grupo de células provenientes de la cresta neural, en estadios próximos a los que es posible ver las primeras señales de formación del componente distal, nos permite especular que estas células pueden ser las responsables de influir en aquellas células que expresan únicamente *Islet-1* e inducir su diferenciación.

Cabe destacar que existe una controversia en la bibliografía con respecto a la posición que ocupa el saco aórtico en relación con la cavidad pericárdica. El trabajo realizado por Mohun et al. (2000) reconoce que el saco aórtico ocupa una posición intrapericárdica. Sin embargo, en las figuras publicadas por Bernardini et al. (1999) se aprecia que el saco aórtico se ubica fuera del pericardio. Estas diferentes interpretaciones no permiten esclarecer cuál es la relación real entre el TS y la unión del corazón a los arcos aórticos. El presente estudio no ofrece evidencias que aclaren la relación. Sin embargo, las observaciones realizadas en los estadios 31-32 sugieren que el saco aórtico se forma por un ensanchamiento de la zona anterior del endocardio del tubo cardíaco en formación. En estadios posteriores se observó que los arcos aórticos se unen al saco aórtico, pero no se pudieron determinar los estadios exactos, ni los mecanismos por los cuales se produce la septación del TS.

En los resultados del presente trabajo se describen las características morfológicas y anatómicas de las válvulas dispuestas en dos hileras en la pared del componente proximal de los individuos adultos. Como se ha dicho anteriormente, las válvulas ubicadas en posición distal comienzan a desarrollarse en el estadio 37-38. Poco después, en el estadio 41, la gelatina es poblada por células mesenquimáticas que provienen del endocardio y

en el estadio 46 comienza el proceso de excavación. Durante este último estadio, los cojines endocárdicos que formarán las válvulas proximales comienzan poblarse de células mesenquimáticas que, por un proceso de transición epitelio-mesénquima, migran hacia la gelatina de los cojines. Finalmente, hacia el estadio 48 comienza el proceso de excavación de las válvulas proximales.

En resumen, en el presente estudio se han estudiado diferentes eventos del desarrollo del TS, como la formación de los componentes distal y proximal, de la cresta espiral, de las válvulas del componente proximal y, finalmente, de la tabicación del componente distal. Como se ha indicado anteriormente, el TS cardíaco está formado por un componente proximal, miocárdico, un componente distal, no miocárdico formado por musculatura lisa. No existe un límite claro entre ambos componentes, sino que se aprecia una zona de solapamiento. Dicha zona comienza a formarse en el estadio 48, cuando algunas células musculares lisas migran desde la base del componente distal hacia la cara interna del miocardio del componente proximal.

Aspectos evolutivos

Las estructuras anatómicas del TS cardíaco de los diferentes grupos zoológicos presentan diversas modificaciones que dificultan la identificación y comparación de sus componentes. Por lo tanto, el estudio pormenorizado del desarrollo de los componentes y el establecimiento del estado primitivo y derivado de cada uno de ellos permite establecer homologías entre los diferentes grupos y a su vez unificar la nomenclatura por la cual se nombran los componentes.



Se ha aceptado clásicamente que el TS cardíaco de los condriictios está formada por una porción intermedia entre el ventrículo y la aorta ventral, denominada cono, que se caracteriza por su naturaleza miocárdica y un número variable de válvulas (Gegenbaur, 1866, Satchell y Jones, 1967, Santer, 1985; Zummo y Farina, 1989). Bajo esta premisa diferentes autores analizaron arquitectónicamente un gran grupo de vertebrados. En las lampreas, agnatos, el corazón está compuesto por un seno venoso, un atrio, un ventrículo, un cono arterioso, a continuación del ventrículo (Moorman y Cristoffels, 2003; Guerrero et al., 2004) y un bulbo arterioso que contiene primitivas fibras elásticas (Wright, 1984). Dos estudios recientes de Durán et al. (2008) y Grimes et al. (2010), demostraron que tanto en holocéfalos como en elasmobranquios, existe un componente intrapericárdico, no miocárdico que se interpone entre el cono arterioso y la aorta ventral, con una estructura de tipo arterial, el cual se denomina bulbo. El corazón de teleósteo está compuesto por un bulbo arterioso no miocárdico y un cono arterioso muy reducido, que parecía estar ausente en varias especies. Sin embargo, en la actualidad, hay suficiente evidencia de que el cono arterioso en los teleósteos no ha desaparecido y que un bulbo arterioso está presente en el polo arterial del corazón de los condriictios (Icardo et al., 2005 y 2006). Por lo tanto, se puede concluir que desde el comienzo de la historia de los vertebrados mandibulados, el TS ha persistido en los diferentes linajes de peces, formado por dos componentes intrapericárdicos, el bulbo en posición distal, no miocárdico y el cono arterioso proximal, miocárdico.

En gnatostomados filogenéticamente basales, la presencia de un bulbo arterioso puede ser considerada como una apomorfía de los actinostergios (Durán et al., 2008). Curiosamente, se ha demostrado que el bulbo arterioso de los peces (que no debe confundirse con el bulbus cordis embrionario de aves y mamíferos) es homólogo a la base intrapericárdica de la aorta y la arteria pulmonar de aves y mamíferos (Grimes et al., 2010). Los peces

pulmonados *Lepidosiren paradoxa*, *Neoceratodus forsteri* y *Protopterus dolloi*, contienen un TS constituido por un largo componente formado únicamente por miocardio, una porción en la cual coexiste miocardio y estructura de tipo arterial (Icardo et al., 2005) y una pequeña porción formada únicamente por musculatura lisa (Grimes et al., 2010).

En los vertebrados filogenéticamente basales, el TS cardíaco es una estructura tubular que conecta el corazón con el sistema circulatorio sistémico. Sin embargo, en vertebrados superiores el TS cardíaco se encuentra parcial o totalmente septado permitiendo conducir de esta forma sangre hacia la circulación pulmonar.

En aves y mamíferos, el TS cardíaco consistente en dos componentes miocárdicos, el cono arterioso proximal y el tronco arterioso distal, en las cuales se forman las válvulas del TS. La estructura completa se denomina ocasionalmente como conotruncus (Thompson et al., 1985; Bartelings y Gittenberger-de Groot 1989)

Más recientemente, se ha demostrado que histomorfológicamente, el TS de los vertebrados está formado por tres componentes, proximal, medio y distal. El componente proximal contiene miocardio y se extiende desde la salida del ventrículo hasta las válvulas distales. El componente distal, que carece de músculo cardíaco, va desde el límite distal de la capa miocárdica hasta el límite anterior de la cavidad pericárdica. Finalmente, el componente medio se caracteriza por una interfaz de músculo liso y miocárdico (Grimes et al., 2010). En el corazón de los peces, el componente histológico distal del TS se corresponde a la porción que llamamos bulbo arterioso. En cambio, la porción que llamamos cono arterioso, incluye los componentes histomorfológicos del TS medio y proximal, en donde ambos están formados por músculo cardíaco .



En vista de los resultados del presente trabajo podemos concluir que el corazón de *Xenopus laevis*, al igual que el resto de los vertebrados, está constituido por un componente proximal que contiene miocardio, al que denominamos como arterioso, un componente medio en el que se superpone musculatura lisa y miocardio. Finalmente, un componente distal constituido únicamente por musculatura lisa. Por lo tanto, las evidencias anatómicas, histomorfológicas y embriológicas apoyan la hipótesis de que el bulbo arterioso de los peces y las porciones intrapericárdicas de las arterias torácicas de los mamíferos son estructuras homólogas al bulbo arterioso de los anfibios.

Pigmentación del corazón

En la bibliografía son abundantes las citas relativas a la presencia de células pigmentarias en el corazón de los vertebrados. En los teleósteos, se han detectado melanóforos en la capa externa del bulbo arterioso de *Gasterosteus aculeatus* y *Pungitus pungitius* (Benjamin et al., 1983, 1984), en el atrio de *Poecilia reticulata* (Woodhead, 1984), en el pericardio parietal de larvas post-natales de esta misma especie (Leknes, 1984), en el subepicardio atrial de *Trachonurus villosus* y en cápsulas con metacercarias en corazones parasitados de *Coregonus lavaretus*. También se han observado estas células en el subepicardio del TS de alevines de *Acipenser naccarii* (Guerrero et al., 2004), en la superficie del corazón de *Polypterus senegalus*, especialmente en el bulbo arterioso (Durán, et al., 2014; Reyes-Moya et al., 2015), y en el subepicardio de varias especies de condriictios, concretamente dos quimeriformes, un escualiforme y dos carcarriniformes (Rodríguez et al., 2014). Asimismo, se ha descrito la existencia de melanocitos en aves y mamíferos. Concretamente en la codorniz estas células se localizan en la zona de las válvulas atrioventriculares (Brito y Kos, 2008). En el ratón los melanocitos están presentes en diferentes localizaciones del corazón

(Mjaatvedt et al., 2005; Brito y Kos, 2008; Yajima y Larue, 2008; Balani et al., 2009; Levin et al., 2009).

Por su parte, en los anfibios, se sabe que existen melanóforos con diferente grado de abundancia distribuidos por la superficie del corazón (Moresco y Oliveira, 2009; Franco-Belussi et al., 2011, 2012). En el presente trabajo, además de abundantes xantóforos durante el desarrollo embrionario, a partir del estadio 49-50 e iridióforos en la superficie del pericardio de individuos juveniles y adultos, se ha detectado una cantidad variable de melanóforos en el subepicardio de todas las cámaras cardíacas, exceptuando el seno venoso. Estas células cargadas de un pigmento pardo-negrusco son especialmente abundantes en el TS cardíaco -sobre todo en su componente distal-, donde además acompañan el recorrido de las ramas de las arterias coronarias, contribuyendo a su mejor visualización macroscópica. Esta disposición en paralelo de los melanóforos y las arterias coronarias se ha detectado asimismo en representantes de elasmobranchios (Rodríguez, 2014), holocéfalos (Sans-Coma et al., 2013), polipteriformes (Reyes-Moya et al., 2015) y acipenseriformes (Guerrero et al., 2004). La mayor abundancia de melanóforos en el componente distal del TS detectada en *X. laevis* coincide con observaciones previas efectuadas en *C. monstrosa* (Sans-Coma et al., 2013) y *Polypterus senegalus* (Reyes-Moya et al., 2015).

En aves y mamíferos se ha demostrado que los melanocitos presentes en el corazón se originan a partir de células de la cresta neural (Nakamura et al., 2006; Brito y Kos, 2008). Cabe indicar que se han sugerido otros precursores para estas células, tales como macrófagos (Zuasti et al., 1989; 1990; Agius y Roberts, 2003) e incluso células epicárdicas (Wessels y Pérez-Pomares, 2004), pero hasta el momento no se ha aportado evidencia experimental en este sentido.



Li et al. (2003) y Sato y Yost (2003) han puesto de manifiesto en el pez cebra que células procedentes de la cresta neural colonizan el corazón en desarrollo y se diferencian como células miocárdicas del atrio, el ventrículo y el TS. Teniendo en cuenta de forma conjunta estos resultados y los obtenidos en aves y mamíferos, Reyes-Moya et al. (2015) sugieren que la hipótesis más plausible acerca del origen de los melanóforos presentes en el corazón de los peces es que son derivados de células de la cresta neural. Algunos estudios han abordado el papel de la cresta neural en el desarrollo del corazón en *X. laevis* (Sadaghiani y Thiébaud, 1987; Martinsen et al., 2004), pero no hacen referencia al origen de los melanóforos cardíacos. No obstante, cabe señalar que en los vertebrados hay células que contienen melanina no tegumentaria que pueblan órganos y/o tejidos internos. Tal es el caso de *Rana esculenta*, en la que se ha constatado la presencia de macrófagos que contienen melanina formada in situ en el bazo y el hígado (Gallone et al., 2002). En el presente trabajo, se ha detectado que, en el corazón, las células pigmentarias aparecen por primera vez en los renacuajos pertenecientes al estadio 44. En un principio, estas células, que parecen proceder del proepicardio, se transfieren a la superficie del seno venoso y en momentos sucesivos del desarrollo se visualizan en el resto de las cámaras cardíacas. En los estadios 42-44, cuando comienza a distinguirse el componente distal del TS cardíaco, se observan melanóforos tanto en la superficie de este nuevo componente como en zonas adyacentes de la superficie interna del pericardio. Curiosamente, como ya se ha indicado, en los adultos de *X. laevis* estudiados en el presente trabajo el seno venoso carece de melanóforos.

Por el momento, no se sabe con certeza la función que desempeñan las células pigmentarias en el corazón de los vertebrados. En mamíferos se ha propuesto que participan en el desarrollo de la válvula atrioventricular (Brito y Kos, 2008), que modifican las propiedades viscoelásticas de las válvulas

cardíacas mejorando su funcionamiento (Balani et al., 2009) e incluso que contribuyen a desencadenar las arritmias auriculares (Levin et al., 2009). Asimismo, en mamíferos se les ha atribuido una actividad antiinflamatoria y de citoprotección (revisado en Plonka et al., 2009). Cabe señalar que la pigmentación de la superficie del corazón y de otros órganos aumentó en el anuro *Eupemphix nattereri* tras administrarle lipopolisacáridos de *Escherichia coli*, lo que sugiere que la melanina desempeña una función bactericida (Franco-Belussi y Olivera, 2011). En el presente trabajo, la presencia de melanóforos en *X. laevis* se ha restringido a la superficie cardíaca. No se han detectado estas células en las válvulas cardíacas. No obstante, no se puede descartar que células sin contenido de pigmentos, pertenecientes al mismo linaje de los melanóforos cardíacos, estén distribuidas por el subepicardio de diferentes áreas del corazón en *X. laevis*. Para comprobar este aspecto, serían necesarios estudios más profundos sobre linajes celulares que no se han contemplado en el presente trabajo.

Conclusiones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Los datos morfológicos obtenidos en ejemplares adultos de *Xenopus laevis* coinciden con observaciones previas que indican que el tracto de salida cardíaco está formado por dos componentes claramente diferenciables, uno proximal de naturaleza miocárdica y otro distal, no miocárdico, que presenta musculatura lisa.
2. Siguiendo la nomenclatura adoptada en grupos de vertebrados filogenéticamente antiguos, los términos apropiados para designar los componentes proximal y distal del tracto de salida cardíaco de los anfibios son cono arterioso y bulbo arterioso, respectivamente.
3. Desde el punto de vista histomorfológico, el tracto de salida de *Xenopus laevis* presenta una porción en la cual se superponen el miocardio del componente proximal y la musculatura lisa del componente distal, al igual que sucede en condriictios, actinopterigios y tetrápodos.
4. En *Xenopus laevis* el componente proximal presenta en ambos extremos sendas hileras de válvulas y está recorrido internamente por la cresta espiral. En cada hilera se alinean cuatro válvulas.
5. En el presente trabajo, se ha detectado la presencia de melanóforos en el subepicardio de todas las cámaras cardíacas, exceptuando el seno venoso, en los ejemplares adultos de *Xenopus laevis*. A tenor de los resultados obtenidos en otros grupos de vertebrados, la hipótesis más plausible acerca del origen de los melanóforos presentes en el corazón de esta especie es que son derivados de células de la cresta neural.

6. A partir de los datos bibliográficos y los resultados del presente trabajo cabe inferir que, en los anfibios, no existe una relación directa entre la presencia de la cresta espiral y el modo de vida del animal. En los ápodos y los urodelos de hábitos estrictamente acuáticos la cresta espiral está ausente, mientras que aquéllos que viven en medio terrestre presentan una estructura semejante a una cresta espiral rudimentaria. En cambio, en los anuros, tanto terrestres como acuáticos, existe una cresta espiral bien desarrollada.
7. El estudio de la morfogénesis del tracto de salida de *Xenopus laevis* ha puesto de manifiesto que el bulbo arterioso se desarrolla tras la formación del cono arterioso embrionario.
8. El patrón de expresión de genes específicos de linajes celulares indica que en la formación de la cresta espiral participan células derivadas de la cresta neural, mientras que en la del bulbo arterioso contribuye el campo cardíaco secundario.
9. La tabicación del bulbo arterioso tiene lugar con posterioridad a la formación de los troncos arteriales extrapericárdicos. No ha sido posible identificar las poblaciones celulares que participan en dicho proceso de tabicación.
10. Los presentes resultados embriológicos relativos al desarrollo de los cojines endocárdicos sustentan la idea de que, en los anfibios, las válvulas conales se desarrollan por un proceso de transición epitelio-mesénquima, al igual que sucede en otros grupos de vertebrados.

11. Las presentes observaciones sobre la morfogénesis del bulbo arterioso sugieren que éste es un componente con entidad propia y no una prolongación de la aorta o una modificación de la porción cefálica del cono, como han propuesto las hipótesis clásicas.

12. Los presentes resultados embriológicos sugieren que el bulbo arterioso de los anfibios es homólogo a las porciones intrapericárdicas de la aorta y de la arteria pulmonar de las aves y los mamíferos.

13. El cono arterioso y el bulbo arterioso, presentes desde el inicio de la historia evolutiva de los vertebrados gnatostomados, están conservados en los primeros tetrápodos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusions



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. The morphological data from adult specimens of *Xenopus laevis* are in accordance with previous observations showing that the cardiac outflow tract consists of two distinct components, a proximal, of myocardial nature, and another distal, non-myocardial, but having smooth muscle.
2. Following the nomenclature assumed for ancient groups of vertebrates, the appropriate terms to designate the proximal and distal components of the amphibian cardiac outflow tract are conus arteriosus and bulbus arteriosus, respectively.
3. From the histomorphological viewpoint, the outflow tract of *Xenopus laevis* has a segment where the myocardium of the proximal component and the smooth musculature of the distal component overlap, as occurs in chondrichthyans, actinopterygians and tetrapods.
4. In *Xenopus laevis* the proximal component has at both ends two rows of valves and it is internally traversed by the spiral crest. Four valves are aligned in each row.
5. The presence of melanophores has been detected in the subepicardium of all the heart chambers, with the exception of the sinus venosus, of adult *Xenopus laevis*. Following the results obtained in other groups of vertebrates, the most plausible hypothesis on the origin of the cardiac melanophores in this anuran species is that these cells are neural crest-derived.

6. From the bibliographical data and the present results, we can infer that in amphibians there is no relationship between the presence of the spiral crest and the way of life of the animal. In the gymnophions and the urodeles with strictly aquatic habits, the spiral crest is absent, while those living in terrestrial environment have a structure similar to a rudimentary spiral crest. However, in the anurans, both terrestrial and aquatic, there is a well-developed spiral crest.
7. The study of the morphogenesis of the outflow tract of *Xenopus laevis* has revealed that the bulbus arteriosus develops after the formation of the embryonic conus arteriosus.
8. The patterns of expression of lineage-specific markers indicate that neural crest-derived cells participate in the formation of the spiral crest and that the secondary heart field contributes to the formation of the bulbus arteriosus.
9. The septation of the bulbus arteriosus occurs after the formation of extrapericardial arterial trunks. We were unable to identify the cell populations involved in the septation process.
10. The present embryological results concerning the development of endocardial cushions support that, in amphibians, the conal valves develop through the epithelial-mesenchymal transition, as occurs in other vertebrates.

11. The present observations on the morphogenesis of the bulbus arteriosus suggest that it is a component with its own entity and not a prolongation of the aorta or a modification of the cephalic portion of the conus, as classical hypotheses have proposed.

12. The present embryological results suggest that the bulbus arteriosus in amphibians is homologous to the intrapericardial portions of the aorta and pulmonary artery of birds and mammals.

13. The conus arteriosus and the bulbus arteriosus, which exist from the beginning of the evolutionary history of the jawed vertebrates, are conserved in the first tetrapods.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Summary



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

The amphibian circulatory system consists of a closed circuit of veins and arteries that irrigates the peripheral network of capillaries, through which blood flows by the action of a single pressure pump: the heart. The heart of the amphibian is composed of a sinus venosus, two atria, a ventricle, and an outflow tract (Jollie, 1962; Jensen et al., 2014). In the sinoatrial and atrioventricular junctions, as in the outflow tract, there are valves that prevent the blood return.

The heart is surrounded by the pericardium. It is attached to the heart anteriorly at the cephalic end of outflow tract and posteriorly at the dorsal limit of the sinus venosus (Gaupp, 1899). The sinus venosus is located dorsally with respect to the ventricle and extends from the transverse septum to the atria. The atria are positioned anteriorly to the sinus venosus and dorsally to the ventricle and the outflow tract. Unlike the sinus venosus, the atria present more developed muscle trabeculae, forming in some cases large ridges that stand out toward the atrial lumen. The atria are anatomically separated by a thin interatrial septum that is composed of a delicate network of elastic and interlaced muscle fibers. The ventricle is dorsal, with a triangular base pyramid shape. The chamber does not internally have a ventricular septum and is highly trabeculated (Davies and Francis, 1941; Sharma, 1957).

The extensive studies on the anatomy and physiology of the amphibian heart extend from the mid-nineteenth century to the present. However, the outflow tract features are described in confusing terminology. In general, it is accepted that the outflow tract consists of two components, one proximal and another distal with respect to the ventricle. The proximal component is a tubular structure connected to the ventricle. This portion extends a few millimeters in anterior direction and forms the first curve from right to left. The second curve of the outflow tract takes place in the proximal to distal component transition zone (Ison, 1967; Putnam and Parkerson, 1985).

In the majority of amphibians, the proximal component is traversed internally by the spiral crest which turns 180° (Rau, 1942). Internally, two transverse rows of semilunar valves are inserted at both ends of the proximal portion of the outflow tract (Sharma, 1961), one proximal to the edge between the outflow tract and the ventricle, and another distal, at the edge between the proximal and distal components of the outflow tract. The number, arrangement, shape, and size of valves in each row vary widely at an interspecific and intraspecific level (Noble, 1931; Peelle, 1931).

The distal component of the outflow tract, which is usually short and tubular, connects the outflow tract to the aortic arches. Two portions can be recognized in the distal component. The basal portion lacks an internal septum (Terhal, 1942) and shows an endothelial block attached to its dorsal wall (Sharma, 1961; Graff, 1957). The cephalic portion is septated.

Cardiac development

In vertebrate embryogenesis, the cardiovascular system develops very early and is the first embryonic system to achieve functional activity (Clark, 1990). The amphibian embryonic development has been described and investigated several times. Amphibian eggs have a large size, fast development, their cover is practically transparent, and are relatively easy to maintain in growth media.

The relative ease of manipulation in early embryonic stages makes them particularly suitable for decoding the signaling mechanisms and relationships between the tissues that induce the cells to differentiate into the different cardiac lineages, and the patterns and morphogenetic processes involved in cardiogenesis.

As in vertebrates, the amphibian heart originates from a pair of cell populations located on both sides of the dorsal midline of the embryo. The

primordia receive signals from the ectoderm and the endoderm for the formation of the future myocardiocytes. Subsequently, the cell populations migrate towards the embryonic midline, giving rise to the primitive cardiac tube (Abu-Issa and Kirby, 2007). Gradually the tube curves and acquires an “S” shape and, in later stages, a “C” shape with the atrium located to the left of the outflow tract. The heart continues its torsion movements until it has a characteristic “U” shape, with the outflow tract on its right, the ventricle located centrally and the atrium on the left. Later on, the chambers acquire their definitive position.

Internally, at the border between the atrium and the ventricle, within the outflow tract, the endocardial cushions develop. These cushions are the precursors that will give rise to the atrioventricular valves and the outflow tract valves, respectively.

Cardiogenesis and its molecular adjustment

Cardiogenesis is a term that describes the process by which mesodermal cells are transformed into cell lineages. These cells will form some tissues of the heart (García-Martínez et al., 1997). During development, there is a complex genetic network, formed by a great variety of transcription factors. These factors interact with promoter domains or inhibitors of the different genes involved in this process.

The concept of embryonic “field” is frequently used in developmental biology. Nowadays, the term “field” is used to describe “a group of cells provided with self-organization and self-regulating properties whose position and fate are specified with respect to the same set, forming a unit of embryonic development that will give rise to an specific organ” (Ingham and Martínez Arias, 1992; Gilbert et al., 1996).

In amphibians, the precardiogenic tissue is specified after the onset of gastrulation. This process has been demonstrated by Jacobson (1961) and Jacobson and Duncan (1968) using urodeles, as a model to identify the location of the cardiac primordia in the early stages of gastrulation. The cell lineages from the lateral regions of the secondary cardiac field will give rise to the dorsal mesocardium and the anterior pericardium (Raffin et al., 2000). The existence of this secondary cardiac field remains a reason for speculation, since there is no solid evidence of its existence in amphibians. However, Brade et al. (2007) described the existence of domains in the area prior to the expression domains of Nkx-2.5, which expresses Islet-1, a typical associated transcription factor of the secondary cardiac field in the heart of the mammals. Therefore, it is believed that the possible mechanisms controlling the contribution of precursor cells in the secondary cardiac field of amniotes could be similar to those that take place in amphibians. During the cardiogenesis process, cells derived from the neural crest also have a role (Hopwood et al., 1989). This role has already been identified by Kirby et al. (1983) more than three decades ago in birds.

Aim of this Study

At present, it is not clear if the two components of the cardiac outflow tract in amphibians are homologous to those described in the rest of the gnathostomata vertebrates.

One of the reasons that contribute to generate confusion is the disparity of terms used in the literature to designate components of the cardiac outflow tract. Moorman and Christoffels (2003) believe that the bulbus cordis is equivalent to the conus arteriosus of fish. Except for this statement, there is no more references on this subject up to date.



In addition, the morphogenetic process by which the arterial pole of the amphibian heart is formed has to be revisited on the light of the new knowledge concerning cardiac development.

Taking into account the background, the main objectives of the present study are:

1. To determine the structure of the anatomical elements that compose the adult cardiac outflow tract in anurans.
2. To determine if these components are equivalent to those identified in elasmobranchs and actinopterygians.
3. To study the morphogenesis of the components of amphibian outflow tract in order to determine if the components of this cardiac region are formed in a homologous manner to the conus arteriosus and bulbus arteriosus of the chondrichthyans.

Material and Methods

The present work has been focused on the study of the morphology and development of cardiac outflow tract in *X. laevis*. This species is an amphibian, belonging to the family Pipidae, whose distribution includes the center and south of Africa. Its easy maintenance in the laboratory, the possibility of hormonal stimulation to obtain settlements at any period of the year and the large amount of resulting larvae make this species especially suitable to address the objectives of this work.

The material used for the descriptions carried out in adult individuals consisted of a total of 28 adult *X. laevis* individuals acquired from the Animal Experimentation Service of the Miguel Hernández University of Elche or provided by the aquatic animal maintenance service of the National Institute

for Medical Research (Mill Hill-London), at present The Francis Crick Institute (London).

All the animals used were handled in accordance with the regulations in force according to the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and maintained in suitable facilities. For the study of the development of cardiac outflow tract, a total of 1,556 larvae and 42 individuals in the post-metamorphosis phase, obtained by the induced outbreaks, by natural fertilization or by in vitro fertilization methodologies, were examined at the Laboratory of Cardiovascular Development of the University of Málaga provided by Dr. Tim Mohun (Mil Hill-London). The stages of development have been determined according to the criteria established by Nieuwkoop and Faber (1994) for this species. The present study involves the manipulation and the sacrifice of adult animals and larvae. This has been done in accordance with the regulations on the protection of animals used for experimentation and other scientific purposes (Directive 2010/63 / eu, Royal Decree 53/2013).

The samples were fixed by immersion in different solutions. The fixer was selected attending to the characteristics of the fasteners and according to the destination of the sample. The pieces destined to electronic scanning microscopy and semi-thin sections with 2% GTA; the pieces were fixed in MEMFA for larval forms and 4% PFA for adult tissue for conventional histology, in situ histochemical hybridization, immunohistochemical and 3D reconstructions.

After fixation, samples were included in paraffin blocks and sliced with a conventional rotating microtome, in sections for later mounting on polylysinslides. Different histological and histochemical techniques were then applied:

* Delafield's haematoxylin-eosin yellow: this stain allows to recognize the general structure of the cellular elements.



* Mallory's trichrome and Masson-Goldner's trichrome: allows the observation of the general structure of the sample and highlights certain histological components, especially connective tissue.

* Resorcin-fuchsin: resorcin staining reveals elastic fibers.

* Schiff Periodic Acid: Schiff's periodic acid is a colorless dye that becomes intensely pink in the presence of aldehyde groups, allowing the staining of cellular components containing carbohydrates, such as glycogen, glycoproteins and proteoglycans.

* Alcian blue: Alcian blue is a dye that specifically binds to acidic polysaccharides, such as glucosaminoglycans, mucopolysaccharides and sialomucins.

* Picrosirius red: this staining is used for the specific recognition of type I and type III collagen fibers, because the dye increases the natural birefringence of the collagen, which is significantly appreciated under the polarization microscope.

The immunohistochemical techniques used in the present study were selected to identify different cellular components of the cardiac output tract. For this purpose, the following antibodies were used: MF20, against heavy chains of myosin of the cardiac and striated muscle; A4.1025, against myosin chains; Anti- α -actin of smooth musculature and anti- α -actin-Cy3, which recognize actin α isoform; Conjugated Vimentin-Cy3, which recognizes filaments of vimentin; Caspase-3, which detects the endogenous levels of the long fragment of Caspase-3, involved in the signaling pathway of apoptosis.

The study of the surface morphology of the structures studied was carried out using the scanning electron microscopy technique, capable of producing high resolution images of the surface of a sample using electron interactions.

The identification of different cell populations involved in the heart formation throughout the development was performed by the technique of *in situ* hybridization. Samples processing were performed according to the protocol supplied by Dr. Stuart Smith (Dr. Tim Mohun's Laboratory, National Institute for Medical Research, London), at present The Francis Crick Institute (London). The probes synthesized by Dr. Smith were used. The protocol consists of a series of steps that are carried out over the course of five consecutive days. On the first day the samples are rehydrated, the membranes are permeabilized and a prehybridization step is performed. On the second day, the specific probes are placed. The different probes were designed to identify the following transcription factors:

NKx-2.5, specifically labels cells that come from the primary cardiac field.

Islet-1, labels cell populations that come from the secondary cardiac field.

GATA 4, labels the cardiac endoderm and induces other growth factors

XMLC-2, an early marker of cardiac or myocardial musculature.

Twist, a specific marker of cardiac cells derived from the neural crest.

On the remaining days of the *in-situ* hybridization protocol, the probe signal is identified and the tissue is whitened to favor the observation of the mark.

Finally, 3-D heart reconstructions were performed, focusing on the outflow tract, as in adult's samples as in different development stages of *X. laevis* hearts. This tool has a triple utility: at first, the capture of serial photographs allows to follow the growth and maturation of the different structures, later with an image analysis we can perform three-dimensional reconstructions of the structures. Finally, the collection of sections embedded in resin allows to make a histological analysis of the tissues.

Anatomy and histology of adult *Xenopus laevis* heart

In the present work, the anatomy and structure of the *X. laevis* heart is detailed, focusing on the detailed description of the cardiac outflow tract. In this species, the heart is located inside a sac-shape pericardium and presents a slightly ventrodorsal orientation, according to the axis that runs from the ventricle to the anterior limit of the pericardial cavity located at the base of the arterial trunks.

The *X. laevis* heart consists of a sinus venosus, two atria, left and right, a ventricle, and an outflow tract. The outflow tract arises from the ventricle dextro-ventral side, it is inclined towards the left side of the heart and continues with the large arterial trunks located outside the pericardium. Macroscopically, two portions can be distinguished: a proximal and a distal one. As soon as it emerges from the ventricle, the outflow tract turns to the left, in a dorsal sense, and then tilts ventrally.

The proximal component is the longest and has a muscular aspect. Its wall is formed by three layers, epicardium, myocardium and endocardium. The epicardium is the outermost layer and consists of a monolayer of flattened epithelial cells. The subepicardium is located underneath these cells. It is formed by large spaces and connective tissue with abundant type I collagen fibers, forming discontinuous layers and type III collagen fibers with an irregular disposition, scarce elastic fibers and fibrocytes. In addition, blood vessels of different caliber flow through this space. Next, (Dorsal ventral, anterior or posterior to it) there is the middle layer, of a myocardial nature, in which two concentric layers of compact myocardium are distinguished, formed by packages that are circumferentially oriented and externally into a helicoidal-shape. The muscular packages are wrapped in connective tissue, where type I and type III collagen fibers are abundant. Also, some fine and dispersed elastic fibers are distinguished. The layers of compact myocardium

are irrigated by a network of coronary arteries and capillaries. Underneath the myocardium is the subendocardium, formed by abundant fibrous connective tissue, with type I collagen fibers, forming thick cords, and type III, arranged irregularly and with a large amount of elastic fibers that form concentric oriented sheets. Finally, the innermost layer is the endocardium consisting of a single continuous layer of flattened endothelial cells.

Internally, there are two rows of valves, one located at the base of the proximal component and the second at its most cephalic zone. Between the rows of valves extends the denominated spiral crest, that runs internally by the outflow tract wall, describing a rotation of 270° clockwise. These valves have a semilunar shape, and between the adjacent valves there are wide spaces, with a trapezoidal shape. In the proximal row, there are four valves that are positioned ventral, left, dorsal and right. Each valve consists of a nucleus of connective tissue lined by endocardium. From the free edge to the proximal insertion zone, the central nucleus of the valve is laminated into two layers, one fibrous, mainly composed of fibers of type I and III collagen and another spongy. The fibrous layer is formed primarily of type I collagen fibers, which are grouped into bundles, forming circumferentially arranged discontinuous layers. Also, there are short and thin type III collagen fibers without a specific orientation. In addition, circumferentially disposed elastic fibers are found. The spongy layer is thick, and has type I and III collagen fibers forming a network of fibers progressively denser the closer to the posterior insertion of the valve in the wall of the breast. In this layer, there are thin elastic fibers without a defined orientation.

The distal row consists of four valves of different sizes, and has a not well defined semilunar shape. These valves are located at the base of the systemic-carotid trunks and are arranged in a sinister-dorsal, sinister-ventral, left and right position. The posterior two-thirds parts of these

leaflets are inserted into the proximal outflow tract component, while the anterior third is anchored to the distal one. Then, multiple fenestrations are opened and their free edge is attached to the outflow tract wall by tendinous cords. In the valves of the proximal and distal row, there are numerous tendinous cords extending from the central part and more frequently from the latero-distal parts of the leaflets to the outflow tract wall. The tendinous cords are conjunctive in nature and consist of type I collagen fibers, small elastic fibers and scarce connective tissue cells, all of them upholstered by endocardial cells.

The central part of the thinner valves is thinner than in the proximal ones. In the sinister-dorsal, sinistro-ventral and left valves, the same two layers exist like in the proximal valves. These layers are fibrous, facing the outflow tract lumen. Also, a spongy layer is found. In the fibrous one, type I collagen fibers predominate compared to type III collagens with abundant elastic fibers. The spongy layer contains type I and type III collagen distributed disorderly with a few elastic fibers.

The spiral crest has a solid appearance and is inserted into the inner outflow tract wall, forming a spiral twist. It consists of a connective tissue nucleus, formed by collagen type I, type III and elastic fibers.

The distal component has a whitish color in fresh tissue. Its wall is thinner than the proximal component. In this wall, there are three well differentiated layers: an epicardial, intermediate and endocardial layer. The epicardial and subepicardial layers have characteristics similar to those described in the proximal component. More internally, the wall of the distal component has a thick intermediate layer, with circumferentially oriented, concentrically arranged smooth muscle cells. Between the smooth muscle, a dense connective matrix composed of type I collagen fibers, parallel to smooth muscle fibers, and, to a lesser extent, type III collagen distributed in

a dispersed form is observed. The smooth musculature layers are separated from each other by thick sheets of elastic fibers. Finally, the endocardium covers the lumen of the distal component and consists of a single layer of endothelial cells whose nuclei stand out the lumen.

The distal component splits into two large trunks, left and right. 3D reconstruction has contributed to a better understanding of the complex internal and progressive distalization in the caudo-cephalic sense. The distal component is internally partitioned by means of two septa which are perpendicular to each other. One is the main septum, which separates the distal component into a dextro-ventral cavum aorticum, and a sinister-dorsal cavum pulmo-cutaneum. The other septum is the so-called vertical septum, dividing the trunks into right and left. The cavum pulmo-cutaneum is split into two right and left pulmonary-cutaneous ducts, while the left and right systemic-carotid trunks originate from the cavum aorticum. The cavum pulmo-cutaneum is split into two right and left pulmonary-cutaneous ducts, while the left and right systemic-carotid trunks originate from the cavum aorticum. The caudal and ventral margin of this septum looks like a cushion with cylindrical shape, which has been called endothelial block in the literature. Histologically, the endothelial block is similar to the spiral crest. It has been possible to identify its origin and its course. In spite of the differences that exist between the individuals, in most of specimens studied, the course of the coronary artery presents an origin in the trunk. From the ventral area of the left carotid artery emerges an artery, that later runs ventrally during a short section through the distal component and then bifurcates into branches, a dorsal and a ventral one, irrigating said component.

The arterial trunks resulting from the division of the distal component do not differ structurally between them. However, the systemic trunks have a greater caliber than the carotid and pulmo-cutaneous trunks. The first arterial trunk that separates from the common base is the pulmo-cutaneous trunk.

The separation of the systemic and carotid arterial trunks is then performed. Once the extrapericardial route has begun, the aortic trunks have a typical structure of elastic artery, in which the three characteristic layers of these arteries are distinguished: tunica adventitia, tunica media, and tunica intima. The tunica adventitia is the outer layer of the vessels and consists of loose connective tissue with type I collagen fibers, thin elastin fibers and fibroblasts. The tunica media is the thickest layer of the vessel and consists mostly of circumferentially oriented smooth muscle cells, forming several concentric strata of smooth musculature separated by type I collagen fibers and thick elastin sheets. Internally, the tunica intima is composed of a single layer of flattened endothelial cells. Unlike the cardiac outflow tract, the extrapericardial trunks are not covered by an epicardium nor do they present coronary arteries in their wall.

Embryological aspects

In this work, we have established for the first time, the sequence of events that occur during the development that will lead to the formation of the cardiac outflow tract. The movements that occur during the development of the *X. laevis* heart, are not similar to those described by different authors for different groups of vertebrates (Van Den Berg and Moorman, 2009).

In *X. laevis*, heart formation requires the interaction of multiple signaling pathways. A series of complex morphogenetic events allow two cell populations forming the two cardiac fields. In stages 26-28, the cardiogenic cell populations are located in the mid-ventral zone and the expression signal of Nkx-2.5, Islet-1 and XMLC-2 markers do overlap. In stage 31-32, the left and right cell populations join and form a relatively straight tube. In successive stages, the tube is bent. First, in stages 33-34, it shows an “S” shape. Then, in stages 35-36, the heart is bent into a “C” shape from the dorsal view. In

stages 37-38, the heart continues its torsion process and the expression of Nkx-2.5 marker is limited to the myocardial portion. At this stage, it is possible to observe cells that migrate from the neural crest, marked specifically with Twist, that are located in the anterior portion of the outflow tract. In stage 39, the torsion that undergoes the developing heart compresses the antero-posterior axis. Expression signals from the Nkx-2.5 and XMLC-2 markers are similar in the myocardial region and both reach the upper limit of the outflow tract. However, the Islet-1 transcription factor signal extends from the middle of the heart to the anterior of the cement gland, so it can be seen that the cells coming from the primary cardiac field, marked with Nkx-2.5 and Islet-1 expressing secondary heart field cells, are separated to continue their differentiation in the tissues forming the heart. At this stage, cells that were positioned anteriorly to the outflow tract now enter the outflow tract and are involved in the formation of the spiral crest, which run along the proximal component of the outflow tract.

From a structural point of view, in stages 33-34, the cardiac tube is formed by an external myocardial layer, which follows to a layer of cardiac shelly and endocardium. In later stages, stages 35-39, the developing heart increases the number of cells that compose it and differentiate the chambers of the heart, which are the sinus venosus, the atria, the ventricle and the outflow tract, acquiring its definitive anatomical configuration. Around stage 40, the cells of the distal portion of the outflow tract exhibit morphological changes, the endocardial cells going from flattened to rounded with bulky nuclei. Matching with the changes produced in the endocardium, the myocardial cells retain their rounded appearance with a remarkable increase of lipid droplets. In stage 42, some cells of singular morphology are observed in the distal area of the outflow tract, arranged in an intrapericardial position. In this new component, the Nkx-2.5 and XMLC-2 markers are not expressed, so this segment seems to be a product of the differentiation of cells that



come from the secondary cardiac field, mainly because they present a positive expression of the Islet-1 marker. These cells undergo a process of differentiation and subsequent proliferation to form the distal component.

Regarding the outflow tract development, it is important to highlight the events that allow the formation of the proximal component valves and the spiral crest. Around the stages 37-38, the cardiac jelly of the outflow tract has a homogeneous thickness and changes in the myocardial layer began. These changes indicate that, at this stage, the process of formation of the mesenchymal cushions starts, which will give rise to the valves of the proximal component of the outflow tract. During stage 39, mesenchymal cells from the aortic sac migrate into the outflow tract to form the future spiral crest. From the results obtained in the present work, we demonstrate that these cells are derived from the neural crest as revealed by the expression of Twist a specific marker for neural crest, as previously described.

These results, describe the morphological and anatomical characteristics of valves arranged in two rows in the wall of the proximal component of adult individuals. As previously stated, valves located distally begin to develop at stage 37-38. Shortly after, in stage 41, the cardiac jelly is populated by mesenchymal cells that come from the endocardium and in stage 46 the process of excavation begins. During this last stage, the endocardial cushions that form the proximal valves begin to be filled with mesenchymal cells that, through a process of mesenchymal epithelial transition, migrate towards the gelatin of the cushions. Finally, the process of excavating the proximal valves begins at stage 48.

The morphological data from adult specimens of *X. laevis* are in accordance with previous observations, showing that the cardiac outflow tract consists of two distinct components, a proximal, of myocardial nature, and

another distal, non-myocardial, but having smooth muscle. Both components overlap in a segment. Following the nomenclature assumed for ancient groups of vertebrates, the appropriate terms to designate the proximal and distal components of the amphibian cardiac outflow tract are conus arteriosus and bulbus arteriosus, respectively. The study of the morphogenesis of the outflow tract of *X. laevis* has revealed that the arterial bulb develops after the formation of the embryonic arterial cone. The *in-situ* hybridization technique allows us to conclude that the patterns of expression of lineage-specific markers indicate that neural crest-derived cells participate in the formation of the spiral crest and that the secondary heart field contributes to the formation of the bulbus arteriosus. The observations on the morphogenesis of the bulbus arteriosus suggests that it is a component with its own entity and not a prolongation of the aorta or a modification of the cephalic portion of the conus, as classical hypotheses have proposed and its septation occurs after the extrapericardial arterial trunks formation.

These embryological results suggests, that the development of endocardial cushions in amphibians, called the conal valves develop through the epithelial-mesenchymal transition, as occurs in other vertebrates. We can also conclude that the bulbus arteriosus in amphibians is homologous to the intrapericardial portions of the aorta and pulmonary.

Pigmentation of the heart

Bibliographical data related to the presence of pigmentary cells in the heart of vertebrates is frequent. In the teleosts, melanophores have been detected in the outer layer of the arterial bulb of *Gasterosteus aculeatus* and *Pungitius pungitius* (Benjamin et al., 1983), in the atrium of *Poecilia reticulata* (Woodhead, 1984), in the atrial subepicardium of *Trachonurus villosus* and in capsules with metacercariae in parasitized hearts of *Coregonus lavaretus*.

These cells have also been observed in the subepicardium of *Acipenser naccarii* fingerlings (Guerrero et al., 2004) on the surface of the heart of *Polypterus senegalus*, especially in the arterial bulb (Reyes-Moya et al., 2014), And in the subepicardium of several species of chondrichthyans, specifically two chimeriformes, one squaliform and two carcarriniformes (Rodríguez, 2014). Also, the existence of melanocytes in birds and mammals has been described. Specifically in quail these cells are located in the area of atrioventricular valves (Brito and Kos, 2008). In mouse, melanocytes are present in different heart locations (Mjaatvedt et al., 2005; Brito and Kos, 2008; Yajima and Larue, 2008; Balani et al., 2009; Levin et al., 2009).

In amphibians, melanophores with different degrees of abundance have been described across the surface of the heart (Moresco and Oliveira, 2009; Franco-Belussi et al., 2011, 2012). In the present work, in addition to abundant xanthophores during embryonic development, from stage 49-50 and iridiophores on the surface of the pericardium of juvenile and adult individuals, a variable amount of melanophores has been detected in the subepicardium of all cardiac chambers, except in the sinus venosus. These cells are loaded with a brown-black pigment and are especially abundant in the cardiac outflow tract, especially in the distal component, where they also accompany the course of the branches of the coronary arteries, contributing to their better macroscopic visualization. This parallel arrangement of melanophores and coronary arteries has also been detected in samples of elasmobranchs (Rodríguez, 2014), holocéfalos (Sans-Coma et al., 2013), polypteriformes (Reyes-Moya et al., 2014) and acipenseriformes (Guerrero et al., 2004). The highest abundance of melanophores in the distal component of the outflow tract detected in *X. laevis* matches with previous observations made in *C. monstrosa* (Sans-Coma et al., 2013) and *Polypterus senegalus* (Reyes-Moya et al., 2014).

In birds and mammals it has been shown that melanocytes present in the heart originate from neural crest cells (Nakamura et al., 2006; Brito and Kos, 2008). Other precursors have been suggested for these cells, such as macrophages (Zuasti et al., 1989; Agius and Roberts, 2003) and even epicardial cells (Wessels and Pérez-Pomares, 2004). Experimental evidence has not been provided yet.

Li et al. (2003) and Sato and Yost (2003) have shown in zebrafish that cells from the neural crest colonize the developing heart and differentiate as myocardial cells from the atrium, ventricle and outflow tract. With these results and those obtained in birds and mammals, Reyes-Moya et al. (2014) suggest that the most plausible hypothesis about the origin of melanophores present in fish heart is that they are derived from neural crest cells. Some studies have researched the role of neural crest in *X. laevis* heart development (Sadaghiani and Thiébaud, 1987; Martinsen et al., 2004) but do not mention the origin of cardiac melanophores. However, it should be noted that in vertebrates there are cells containing non-tegmentary melanin that populate internal organs and / or tissues. This is the case of *Rana esculenta*, in which the presence of macrophages containing melanin formed in situ in the spleen and liver has been observed (Gallone et al., 2002). In the present work, it has been detected that, in the heart, the pigment cells appear for the first time in the stage 44 tadpoles. At first, these cells, which seem to come from the proepicardium, are transferred to the surface of the sinus venosus, and in posterior moments of the development they are visualized in the rest of the cardiac chambers. In stages 42-44, when the distal component of the cardiac outflow tract begins to be distinguished, melanophores are observed on both the surface of this new component and adjacent areas of the inner surface of the pericardium. Curiously, as already indicated, in the adults of *X. laevis* studied in the present study, the sinus venosus lacks melanophores.



The role of pigmentary cells in the heart of vertebrates is uncertain. In mammals it has been proposed that they participate in the development of the atrio-ventricular valve (Brito and Kos, 2008), that modify the viscoelastic properties of the heart valves improving their functioning (Balani et al., 2009) and even contribute to trigger atrial arrhythmias (Levin et al., 2009). Likewise, in mammals they have been attributed an anti-inflammatory and cytoprotection activity (reviewed in Plonka et al., 2009). It should be noted that the pigmentation of the surface of the heart and other organs increased in the anura *Eupemphix nattereri* after administering *Escherichia coli* lipopolysaccharides, suggesting that melanin plays a bactericidal role (Franco-Belussi and Oliveira, 2011). In the present work, the presence of melanophores in *X. laevis* has been restricted to the cardiac surface. These cells have not been detected in the heart valves. However, it cannot be ruled out that cells without pigment content, belonging to the same lineage of cardiac melanophores, are distributed by the subepicardium of different areas of the heart in *X. laevis*. In order to verify this aspect, deeper studies on cellular lineages would be necessary and it are not contained in this work.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Abu-Issa, R., & Kirby, M.L. (2007). Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annual Review Cell Developmental Biology*, 23, 45-68.
- Abu-Issa, R., Waldo, K., & Kirby, M.L. (2004). Heart fields: one, two or more? *Developmental Biology*, 272(2), 281-285.
- Acolat, L. (1939). Variations de l'appareil respiratoire et de l'appareil circulatoire central chez quelques gymnophiones. *Compte Rendue de l'Association d'Anatomique du Nancy*, 3, 3-15.
- Agius, C., & Roberts, R.J. (2003). Melanomacrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 499-509.
- Anderson, R.H., Webb, S., Brown, N.A., Lamers, W., & Moorman, A. (2003). Development of the heart: (2) Septation of the atriums and ventricles. *Heart*, 89(8), 949-958.
- Bader, D., Masaki, T., & Fischman, D.A. (1982). Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *Journal Cell Biology*, 95(3), 763-770.
- Baker, C.L. (1949). The comparative anatomy if the aortic arches of de urodeles and their relation respiration and degree of metamorphosis. *Journal Tennessee Academy of Science*, 24, 12-40.
- Bakker, D.M., Wilkinson, M., & Jensen, B. (2015). Extreme variation in the atrial septation of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of Anatomy*, 226(1), 1-12.
- Balani, K., Brito, F.C., Kos, L., & Agarwal, A. (2009). Melanocyte pigmentation stiffens murine cardiac tricuspid valve leaflet. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(40), 1097-1102.
- Bartelings, M.M., & Gittenberger-de Groot, A.C. (1989). The outflow tract of the heart embryologic and morphologic correlations. *International Journal of Cardiology*, 22(3), 289-300.
- Beddard, F.E. (1903). On some points in the anatomy, chiefly of the heart and vascular system, of the *Japanese salamander, Andrias japonicus*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 2, 298-315.
- Beloucif, S., Takata, M., Robotham, J.L. (1992). Influence of pericardial constraint on atrio-ventricular interactions. *The American Journal of Physiology*, 263, 125-134.
- Benjamin, M., Norman, D., Santer, R.M., & Scarborough, D. (1983). Histological,

- histochemical and ultrastructural studies on the bulbus arteriosus of the sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* and *Pungitius pungitius* (Pisces: Teleostei). *Journal of Zoology*, 200, 325-346.
- Benjamin, M., Norman, D., Scarborough, D., & Santer, R.M. (1984). Carbohydrate-containing endothelial cells lining the bulbus arteriosus of teleosts and the conus arteriosus of elasmobranches. *Journal of Zoology*, 202, 383-392.
- Benninghoff, A. (1921). Beiträge zur vergleichenden Anatomie und Entwicklungsgeschichte des Amphibien Herzens. *Morphologisches Jahrbuch*, 51, 355-412.
- Benninghof, A. (1933). Das Herz. En Bolk, L., Göppert, E., Kallius E., Lubosch, W. Handbuch. der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere. Bd. 6. Berlin, Wien: Urban und Scharzenberg, pp. 467-556.
- Bentley, P.J., & Shield, J.W. (1973). Respiration of some urodele and anuran amphibian-I. In water, role of the skin and gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 46(1), 17-28.
- Bernardini, G., Prati, M., Bonetti, E., & Scari, G. (1999). Atlas of *Xenopus* development. Milan: Springer Science & Business Media.
- Bertin, L. (1958). Appareil circulatoire. En Grassé, P. *Traité de Zoologie*. (Vol. 13 - fasc. 2). Paris: Masson, pp. 1399-1458.
- Blitz, I.L., Andelfinger, G., & Horb, M.E. (2006). Germ layers to organs: using *Xenopus* to study "later" development. *Seminars in cell & Developmental Biology*, 17(1), 133-145.
- Boas, J.E.V. (1880). Über Herz und Arterienbogen bei *Ceratodus* und *Protopterus*. *Morphologisches Jahrbuch*, 6, 321-354.
- Boas, J.E.V. (1882). Über den Conus arteriosus und die Arterien der Amphibien. *Morphologisches Jahrbuch*, 7, 509-551.
- Bockman D.E., & Kirby M.L. (1984). Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science*, 223, 498-500.
- Borradaile, L.A. (1945). *Manual of Elementary Zoology*. 11 ed. London: Oxford University Press.
- Bourne, G. (1900). *Comparative Anatomy of Animals* (Vol. 1). London: George Bell and Sons.
- Bourne, G.C. (1902). *An introduction to the study of comparative anatomy of animals*. London: George Bell and Sons.

- Brade, T., Gessert, S., Kühl, M., & Pandur, P. (2007). The amphibian second heart field: *Xenopus* islet-1 is required for cardiovascular development. *Developmental Biology*, 311(2), 297-310.
- Branch, H.E. (1935). *A Laboratory Manual of Cryptobranchusa Ileganiensis*. New York: Vantage Press.
- Breckenridge, R.A., Mohun, T.J., & Amaya, E. (2001). A role for BMP signaling in heart looping morphogenesis in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 232(1), 191-203.
- Brito, F.C., & Kos, L. (2008). Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 21(4), 464-470.
- Brücke, E. (1852). Beiträge zur vergleichenden Anatomie und Physiologie des Gefäßsystems der Amphibien. *Denkschriften der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien*, 3.
- Bruner, H.L. (1900). On the heart of lungless salamanders. *Journal of Morphology*, 16, 323-336.
- Buckingham, M., Meilhac, S., & Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 826-837.
- Burggren, W.W., & Warburton, S. (2007). Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *Ilar Journal*, 48(3), 260-269.
- Cai, C.L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.H., Pfaff, S.L., Chen, J., & Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*, 5(6), 877-889.
- Camenisch, T.D., Runyan, R.B., & Markwald, R.R. (2010). Molecular regulation of cushion morphogenesis. In Rosenthal, N., & Harvey, R.P., *Heart development and regeneration*. London: Elsevier Inc. pp. 363-407.
- Cerra, M.C., Amelio, D., Tavolaro, P., Palma, A., Marciano, V., & Farina, F. (2003). Pericardium of the frog, *Rana esculenta*, is morphologically designed as a lymphatic space. *Journal of Morphology*, 257(1), 72-77.
- Chen, J.A., Voigt, J., Gilchrist, M., Papalopulu, N., & Amaya, E. (2005). Identification of novel genes affecting mesoderm formation and morphogenesis through an enhanced large scale functional screen in *Xenopus*. *Mechanisms of Development*, 122(3), 307-331.

- Christoffels, V.M., Habets, P.E., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W.H., Bao, Z.Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R., & Moorman, A.F. (2000). Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Developmental Biology*, 223(2), 266-278.
- Clark, E.B., & Hu, N. (1990). Hemodynamics of the developing cardiovascular system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 588(1), 41-47.
- Cleaver, O.B., Patterson, K.D., & Krieg, P.A. (1996). Overexpression of the tinman-related genes XNkx-2.5 and XNkx-2.3 in *Xenopus* embryos results in myocardial hyperplasia. *Development*, 122(11), 3549-3556.
- Collop, A.H., Broomfield, J.A., Chandraratna, R.A., Yong, Z., Deimling, S.J., Kolker, S.J., Weeks, D.L., & Drysdale, T.A. (2006). Retinoic acid signaling is essential for formation of the heart tube in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 291(1), 96-109.
- Cords, V.E. (1924). Das Herz eines lungenlosen Salamanders (*Salamandrina perspicillata*). *Anatomischer Anzeiger*, 57, 205-213.
- Czopek, J. (1965). Quantitative studies on the morphology of respiratory surfaces in amphibians. *Acta Anatomie*, 62, 296-323.
- Davis, C.L. (1924). The cardiac jelly of the chick embryo. *Anatomical Record*, 27, 201-202.
- Davies, F., & Francis, E.T.B. (1941). The heart of the salamander (*Salamandra salamandra*, L.), with special reference to the conducting (connecting) system and its bearing on the phylogeny of the conducting systems of mammalian and avian hearts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 231(578), 99-130.
- De Jong, F., Geerts, W.J.C., Lamers, W.H., Los, J.A., & Moorman, A.F.M. (1990). Isomyosin expression pattern during formation of the tubular chicken heart: A three-dimensional immunohistochemical analysis. *The Anatomical Record*, 226(2), 213-227.
- De la Cruz, M.V., Gomez, C.S., Arteaga, M.M., & Argüello, C. (1977). Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *Journal of Anatomy*, 123(3), 661.
- De la Cruz, M.V., & Markwald, R.R. (1998). *Living morphogenesis of the heart*. Boston: Birkhäuser.
- de Lange, F.J., Moorman, A.F., Anderson, R.H., Männer, J., Soufan, A.T., de Gier-de



- Vries, C., & Christoffels, V.M. (2004). Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circulation Research*, 95(6), 645-654.
- Deimling, S.J., & Drysdale, T.A. (2009). Retinoic acid regulates anterior–posterior patterning within the lateral plate mesoderm of *Xenopus*. *Mechanisms of Development*, 126(10), 913-923.
- Dettman, R.W., Denetclaw, W., Ordahl, C.P., & Bristow, J. (1998). Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Developmental Biology*, 193(2), 169-181.
- Didier, D.A., LeClair, E.E., & Vanbuskirk, D.R. (1998). Embryonic staging and external features of development of the chimaeroid fish, *Callorhinchus milii* (Holocephali, Callorhinchidae). *Journal of Morphology*, 236(1), 25-47.
- Dodou, E., Verzi, M.P., Anderson, J.P., Xu, S.M., & Black, B.L. (2004). Mef2c is a direct transcriptional target of Irf1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*, 131(16), 3931-3942.
- Dorn, T., Goedel, A., Lam, J.T., Haas, J., Tian, Q., Herrmann, F., Bundschu, K., Dobrev, G., Schiemann, M., Dirschinger, R., Guo, Y., Kühl, S., Sinnecker, D., Lipp, P., Laugwitz, K., Kühl, M., & Moretti, A. (2015). Direct Nkx2-5 Transcriptional Repression of Isl1 Controls Cardiomyocyte Subtype Identity. *Stem Cells*, 33(4), 1113-1129.
- Duellman, W.E., & Trueb, L. (1930). *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Duellman, W.E., & Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians*. United States of American: Johns Hopkins University Press.
- Durán, A.C., Fernández, B., Grimes, A.C., Rodríguez, C., Arqué, J.M., & Sans-Coma, V. (2008). Chondrichthyans have a bulbus arteriosus at the arterial pole of the heart: morphological and evolutionary implications. *Journal of Anatomy*, 213, 597-606.
- Durán, A.C., Reyes-Moya, I., Fernández, B., Rodríguez, C., Sans-Coma, V., & Grimes, A.C. (2014). The anatomical components of the cardiac outflow tract of the gray bichir, *Polypterus senegalus*: their evolutionary significance. *Zoology*, 117(6), 370-376.
- Durán, A.C., Reyes-Moya, I., Torres-Prioris, A., Machuca, A., Fernández, B., & Sans-Coma, V. (2013). Pigmentation of the Heart in the Bichir, *Polypterus senegalus*. 10th ICVM. *Anatomical Record*, 296 (Vol esp 1): P-078.

- Durán, A.C., Rodríguez, C., Gil de Sola, L., Fernández, B., Arque, J.M., & Sans-Coma, V. (2010). Intimal thickening of coronary arteries in the rabbitfish, *Chimaera monstrosa* L. (Chondrichthyes: Holocephali). *Journal Fish Diseases*, *33*, 675-682.
- Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J., & Nemer, M. (1997). The cardiac transcription factors Nkx2.5 and GATA-4 are mutual cofactors. *The EMBO Journal*, *16*(18), 5687-5696.
- Ecker, A., Wiedersheim, R., & Gaupp, E.W.T. (1882). *Anatomie des frosches*, (Vol. 2). Braunschweig: Vieweg.
- Ekman, G. (1925). Experimentelle Beiträge zur Herzentwicklung der Amphibien. *Wilhelm Roux Archiv für Entwicklungsmechanik de Organismen*, *106*, 320-352.
- Evans, S.M., Yan, W., Murillo, M.P., Ponce, J., & Papalopulu, N. (1995). tinman, a *Drosophila* homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of genes in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of tinman. *Development*, *121*(11), 3889-3899.
- Farrell, M., Waldo, K., Li, Y. X., & Kirby, M. L. (1999). A novel role for cardiac neural crest in heart development. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *9*(7), 214-220.
- Foxon, G.E.H., & Walls, E.W. (1946). The radiographic demonstration of the mode of action of the heart of the frog. *Journal of Anatomy*, *81*(1), 111-117.
- Foxon, G.E.H. (1947). The Mode of Action of the Heart of the Frog. *Proceedings of the Zoological Society of London*, *116*(3-4), 565-574.
- Foxon, G.E.H. (1950). A description of the coronary arteries in dipnoan fishes and some remarks on their importance from the evolutionary standpoint. *Journal of Anatomy*, *84*(2), 121-131.
- Foxon, G.E.H. (1951). A radiographic study of the passage of the blood through the heart in the frog and the toad. *Proceedings of the Zoological Society of London*, *121* (3), 529-538.
- Foxon, G.E.H. (1964). Cardiac physiology of urodele amphibian. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *13*(1), 47-52.
- Francis, E.T.B. (1934). *The anatomy of the salamander*. Oxford: Clarendon Press.
- Franco Belussi, L., de Souza Santos, L.R., Zieri, R., & de Oliveira, C. (2011). Visceral pigmentation in four *Dendropsophus* species (Anura: Hylidae): Occurrence



- and comparison. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 250(2), 102-110.
- Franco-Belussi, L., de Souza Santos, L.R., Zieri, R., & De Oliveira, C. (2012). Visceral pigmentation in three species of the genus *Scinax* (Anura: Hylidae): distinct morphological pattern. *The Anatomical Record*, 295(2), 298-306.
- Franco-Belussi, L., & de Oliveira, C. (2011). Lipopolysaccharides induce changes in the visceral pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae). *Zoology*, 114(5), 298-305.
- Fritsch, G. (1869). Zur vergleichenden Anatomie der Amphibienherzen. *Archiv f. Anatomie, Physiologie u. Wissenschaftl. Medizin: Jahrg.* pp. 654-758.
- Gallone, A., Guida, G., Maida, I., & Cicero, R. (2002). Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system. *Pigment Cell Research*, 15, 32-40.
- Garcia-Martinez, V., & Schoenwolf, G. C. (1993). Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Developmental Biology*, 159(2), 706-719.
- Gaupp, E. (1896). Lehre vom Nerven und vom Muskelsystem. En Ecker, A., Wiedersheim, R. *Anatomie des Frosches Bd 1*. Braunschweig: Vieweg.
- Gaupp, E. (1899). Lehre vom Nerven und vom Gefäßsystem. En Ecker, A., Wiedersheim, R. *Anatomie des Frosches Bd 2*. Braunschweig: Vieweg.
- Gegenbaur, C. (1866). Zur vergleichenden Anatomie des Herzens. *Jenaische Zeitschrift für Medizin und Naturwissenschaft*, 2, 365-383.
- Gessert, S., & Kühl, M. (2009). Comparative gene expression analysis and fate mapping studies suggest an early segregation of cardiogenic lineages in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 334(2), 395-408.
- Gilbert, S.F. (2005). *Biología del desarrollo*. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Gittenberger-de Groot, A.C., Vrancken Peeters, M.P., Mentink, M.M., Gourdie, R.G., & Poelmann, R.E. (1998). Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circulation Research*, 82(10), 1043-1052.
- Gove, C., Walmsley, M., Nijjar, S., Bertwistle, D., Guille, M., Partington, G., & Patient, R. (1997). Over-expression of GATA-6 in *Xenopus* embryos blocks differentiation of heart precursors. *The EMBO Journal*, 16(2), 355-368.

- Graaf, A.R.D. (1957). Investigations into the Distribution of Blood in the Heart and Aortic Arches of *Xenopus Laevis* (Daud). *Journal of Experimental Biology*, 34(2), 143-172.
- Grant, R.T., & Regnier, M. (1926). *The comparative anatomy of the cardiac coronary vessels*. *Heart*, 13, 285-317.
- Grimes, A.C., Durán, A.C., Sans-Coma, V., Hami, D., Santoro, M.M., & Torres, M. (2010). Phylogeny informs ontogeny: a proposed common theme in the arterial pole of the vertebrate heart. *Evolution & Development*, 12(6), 552-567.
- Grimes, A.C., Stadt, H.A., Shepherd, I.T., & Kirby, M.L. (2006). Solving an enigma: arterial pole development in the zebrafish heart. *Developmental Biology*, 290(2), 265-276.
- Grimes, A.C., Stadt, H.A., Shepherd, I.T., & Kirby, M.L. (2006). Solving an enigma: arterial pole development in the zebrafish heart. *Developmental Biology*, 290(2), 265-276.
- Guerrero, A., Icardo, J.M., Durán, A.C., Gallego, A., Domezain, A., Colvee, E., & Sans-Coma, V. (2004). Differentiation of the cardiac outflow tract components in alevins of the sturgeon *Acipenser naccarii* (Osteichthyes, Acipenseriformes): implications for heart evolution. *Journal of Morphology*, 260 (2), 172-183.
- Guimond, R.W., & Hutchison, V.H. (1976). Gas exchange of the giant salamanders of North America. En G. M. Hughes, *Respiration of Amphibious Vertebrates*. New York: Academic Press, pp. 313-338.
- Guimond, R.W., & Hutchison, V.H. (1972). Pulmonary, branchial and cutaneous gas exchange in the mudpuppy, *Necturus maculosus* (Rafinesque). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 42, 367-392.
- Heinz-Taheny, K.M. (2009). Cardiovascular physiology and diseases of amphibians. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 12(1), 39-50.
- Heine, H. (1976). Relationships between endocardial cushion development and hemodynamics in embryonic heart. Experimental study on *Xenopus laevis* larvae. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*, 70(2), 755.
- Hickman, C.P., Roberts, L.S., Larson, A., Ober, W.C., & Garrison, C. (2006). *Integrated Principles of Zoology* (Vol. 15). New York: McGraw-Hill.
- Holmes, S.J. (1916). *The biology of the frog*. 3^a ed. London: Macmillan.
- Holmes, S.J. (1927). *The biology of the frog*. 4^a ed. New York: Macmillan.
- Holmes, E.B. (1975). A reconsideration of the phylogeny of the tetrapod heart.

- Journal of Morphology*, 147(2), 209-228.
- Hopwood, N.D., Pluck, A., & Gurdon, J.B. (1989). A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell*, 59(5), 893-903.
- Horb, M.E., & Thomsen, G.H. (1999). Tbx5 is essential for heart development. *Development*, 126(8), 1739-1751.
- Hu, N., Sedmera, D., Yost, H.J., & Clark, E.B. (2000). Structure and function of the developing zebrafish heart. *The Anatomical Record*, 260(2), 148-157.
- Hu, N., Yost, H.J., & Clark, E.B. (2001). Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *The Anatomical Record*, 264(1), 1-12.
- Hyman, L.H. (1992). *Hyman's comparative vertebrate anatomy*. Chicago: University of Chicago Press.
- Icardo, J.M. (2006). Conus arteriosus of teleost heart: dismissed, but not missed. *Anatomical Record*, 288, 900-908.
- Icardo, J.M., Brunelli, E., Perrotta, I., Colvee, E., Wong, W.P., & Ip, Y.K. (2005). Ventricle and outflow tract of the African lungfish *Protopterus dolloi*. *Journal of Morphology*, 265(1), 43-51.
- Ingham, P.W., & Arias, A.M. (1992). Boundaries and fields in early embryos. *Cell*, 68(2), 221-235.
- Ison, R.E. (1967). The structure of the conus arteriosus of adult *Rana temporaria* L. (Amphibia). *Journal of Natural History*, 1(4), 49-499.
- Jacobson, A.G., & Duncan, J.T. (1968). Heart induction in salamanders. *Journal of Experimental Zoology*, 167(1), 79-103.
- Jacobson, A.G. (1961). Heart determination in the newt. *Journal of Experimental Zoology*, 146(2), 139-151.
- Jensen, B., Moorman, A.F.M., & Wang, T. (2014). Structure and function of the hearts of lizards and snakes. *Biological Reviews*, 89(2), 302-336.
- Johansen, K., & Burggren, W. (1980). Cardiovascular function in the lower vertebrates. En Bourne, G.H. *Hearts and Heart-like Organs*, New York: Academic, pp. 61-117.
- Johansen, K., & Hanson, D. (1968). Functional anatomy of the hearts of lungfishes and amphibians. *American Zoologist*, 8(2), 191-210.
- Johansen, K. (1963). Cardiovascular Dynamics in the Amphibian *Amphiuma*

- tridactylum* (Cuvier). *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*, 60 (217), 1-82.
- Jollie, M. (1962). *Chordate Morphology*. New York: Reinhold.
- Junqueira, L.C., Bignolas, G., & Brentani, R.R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, 11(4), 447-435.
- Kardong, K.V. (1999). *Vertebrados: Anatomía Comparada, Función, Evolución*. 2ª ed. Madrid: Mc. Graw-Hill Interamericana.
- Kardong, K.V. (2007). *El sistema circulatorio. Vertebrados: Anatomía comparada, función y evolución. En Kardong, K.V., 4ª. ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, pp. 415-464.*
- Kelly, R.G., Brown, N.A., & Buckingham, M.E. (2001). The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Development Cell*, 1, 435-440.
- Kelly, R.G. (2005). Molecular inroads into the anterior heart field. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(2), 51-56.
- Kerr, J.G. (1919). *Text-book of Embryology* (Vol. 2). Vertebrata with the exception of mammalia. London: MacMillan & Company Limited.
- Kerr, J.G. (1921). *Zoology for medical students*. London: MacMillan & Company Limited.
- Kingsley, J.S. (1926). *Outlines of the comparative anatomy of vertebrates*. 3ª ed. Philadelphia: P. Blakiston's Son & Company.
- Kirby L.M. (2007). *Cardiac development*. New York: Oxford University Press.
- Kirby M.L., & Bockman D.E. (1984). Neural crest and normal development: a new perspective. *Anatomical Record*, 209, 1-6.
- Kirby M.L., Gale T.F., & Stewart D.E. (1983). Neural crest cells contribute to aorticopulmonary septation. *Science*, 220, 1059-1061.
- Kolker, S.J., Tajchman, U., & Weeks, D.L. (2000). Confocal imaging of early heart development in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 218(1), 64-73.
- Körner, F. (1937). Das Herz der Schwanzlurche. *Jenaische Zeitschrift für Medizin und Naturwissenschaft*, 71, 37-174.
- Langer, A. (1894). Über die Entwicklungsgeschichte des Bulbus cordis bei Amphibien und Reptilien. *Morphologisches Jahrbuch*, 21, 40-68.



- Langerhans, P. (1873). Notiz zur Anatomie des Amphibienherzens. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoology*, 23, 457-458.
- Langille, B.L., & Jones, D.R. (1977). Dynamics of blood flow through the hearts and arterial systems of anuran amphibia. *The Journal of Experimental Biology*, 68(1), 1-17.
- Latinkić, B.V., Cooper, B., Towers, N., Sparrow, D., Kotecha, S., & Mohun, T.J. (2002). Distinct enhancers regulate skeletal and cardiac muscle-specific expression programs of the cardiac alpha-actin gene in *Xenopus embryos*. *Developmental Biology*, 245(1), 57-70.
- Lawson, R. (1966). The anatomy of the heart of *Hypogeophis rostratus* (Amphibia, Apoda) and its possible mode of action. *Journal of Zoology*, 149(3), 320-336.
- Lawson, R. (1970). The caecilian cardiovascular system and intra-amphibian relationships. *Journal of Zoology*, 160(2), 199-229.
- Lawson, R. (1959). The anatomy of *Hypogeophis rostratus* (Cuvier): Apoda or Gymnophiona. Tesis Doctoral. University of Durham.
- Lawson, R. (1979). The comparative anatomy of the circulatory system. En M.H. Wake. *Hyman's Comparative Vertebrate Anatomy*. 3ª ed. Chicago: University of Chicago Press, pp. 448-554.
- Lemanski, L.F. (1973). Heart development in the Mexican salamander, *Ambystoma mexicanum*. I. Gross anatomy, histology and histochemistry. *Journal of Morphology*, 139(3), 301-327.
- Leknes, I.L., (1984) Ultrastructure of the parietal pericardium in teleosts. *Journal of Anatomy*, 138, 703-712.
- Levin, M.D., Lu, M.M., Petrenko, N.B., Hawkins, B.J., Gupta, T.H., Lang, D., Buckley, P., Jochems, J., Liu, F., Spurney, C.F., Yuan, L.J., Jacobson, J.T., Brown, C.B., Huang, L., Beermann, F., Margulies, K.B., Madesh, M., Eberwine J.H., Epsetein, J.A., Patel, V.V., & Yuan, L.J. (2009). Melanocyte-like cells in the heart and pulmonary veins contribute to atrial arrhythmia triggers. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(11), 3420-3436.
- Li, Y.X., Zdanowicz, M., Young, L., Kumiski, D., Leatherbury, L., & Kirby, M.L. (2003). Cardiac neural crest in zebrafish embryos contributes to myocardial cell lineage and early heart function. *Developmental Dynamics*, 226(3), 540-550.
- Männer, J. (2000). Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping

- process. *The Anatomical Record*, 259(3), 248-262.
- Männer, J. (2004). On rotation, torsion, lateralization, and handedness of the embryonic heart loop: new insights from a simulation model for the heart loop of chick embryos. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in molecular, Cellular and Evolutionary Biology*, 278(1), 481-492.
- Marcus, H. (1935). Zür stammesgeschichte der Herzens. *Gegenbaur's Morphologisches Jahrbuch*, 76, 92-103.
- Marshall, A.M. (1896). *The Frog: an introduction to anatomy, histology, and embryology*. New York: MacMillan and Company Limited.
- Martinsen, B.J., Frasier, A.J., Baker, C.V., & Lohr, J.L. (2004). Cardiac neural crest ablation alters Id2 gene expression in the developing heart. *Developmental Biology*, 272(1), 176-190.
- McMullen, E.C. (1938). The morphology of the aortic arches in four genera of *Plethodontid salamanders*. *Journal of Morphology*, 62(3), 559-597.
- Mebazaa, A., Wetzel, R.C., Doddo, J.M., Redmond, E.M., Shah, A.M., Maeda, K., & Robotham, J.L. (1998). Potential paracrine role of the pericardium in the regulation of cardiac function. *Cardiovascular Research*, 40(2), 332-342.
- Millard, N. (1949). The Development of the Venous System of *Xenopus laevis*. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 32(1), 55-99.
- Miyazaki, T., Pride H.P., & Zipes D.P. (1990). Prostaglandins in the pericardial fluid modulate neural regulation of cardiac electrophysiological properties. *Circulation Research*, 66, 163-175.
- Mjaatvedt, C.H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R.A., Kern, M.J., Eisenberg, C.A., Turner, D., & Markwald, R.R. (2001). The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Developmental Biology*, 238, 97-109.
- Mjaatvedt, C.H., Kern, C.B., Norris, A., Fairey, S., & Cave, C.L. (2005). Normal distribution of melanocytes in the mouse heart. *Anatomical Record*, 285A, 748-757.
- Mohun, T.J., Leong, L.M., Weninger, W.J., & Sparrow, D.B. (2000). The morphology of heart development in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 218(1), 74-88.
- Mohun, T.J., & Weninger, W.J. (2012a). Embedding embryos for high-resolution episcopic microscopy (HREM). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012, 678-680.



- Mohun, T.J., & Weninger, W.J. (2012b). Episcopic three-dimensional imaging of embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012, 641-646.
- Mohun, T.J., & Weninger, W.J. (2012c). Generation of volume data by episcopic three-dimensional imaging of embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012, 681-682.
- Moorman, A.F., & Christoffels, V.M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes and evolution. *Physiological Reviews*, 83(4), 1223-1267.
- Moorman, A.F., Christoffels, V.M., Anderson, R.H., & Van den Hoff, M.J. (2007). The heart-forming fields: one or multiple?. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences*, 362(1484), 1257-1265.
- Moresco, R.M., & De Oliveira, C. (2009). A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. *South American Journal of Herpetology*, 4(1), 1-8.
- Morris, R.W. (1974). Function of the anuran conus arteriosus. *The Journal of Experimental Biology*, 61(2), 503-520.
- Montagna, W. (1967). Comparative anatomy and physiology of the skin. *Archives of Dermatology*, 96(4), 357-363.
- Muñoz-Chápuli, R., Andrés, A.V., & Dingerkus, G. (1994). Coronary artery anatomy and elasmobranch phylogeny. *Acta Zoologica*, 75(3), 249-254.
- Nakamura, T., Colbert, M.C., & Robbins J. (2006). Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. *Circulation Research*, 98, 1547-1554.
- Nel, N.E. (1970). The anatomy of the heart of the plethodonid salamander *Ensatina eschscholtzii eschscholtzii* Gray. *Annales Universitatis Stellenbosch*, 45(2): 1-18.
- Newman, C.S., Reecy, J., Grow, M.W., Ni, K., Boettger, T., Kessel, M., Schwartz, R.J., Krieg, P.A. (2000). Transient cardiac expression of the tinman-family homeobox gene, XNkx 2-10. *Mechanisms of Development*, 91, 369-373.
- Nieuwkoop, P.D., & Faber, J. (1994). *Normal table of Xenopus laevis (Daudin): A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. Utrecht: Routledge.
- Noble, G.K. (1925). The integumentary, pulmonary and cardiac modifications correlated with increased cutaneous respiration in the amphibian: A solution the 'hairy frog' problem. *Journal of Morphology*, 40(2), 341-416.

- Noble, G.K. (1931). *The Biology of the Amphibia*. New York: McGraw-Hill.
- O'Donogue, C.H. (1945). *An introduction to zoology*. London: George Bell and Sons.
- Oliver, K.K. (1909). The structure of the truncus arteriosus in species of the Genera *Hyla*, *Linnodynastes*, *Chiroleptes*. *Proceedings Royal Society Victoria*, 22, 198-308.
- Opitz, J.M., & Clark, E.B. (2000). Heart development: an introduction. *American Journal of Medical Genetics*, 97(4), 238-247.
- Parker T.J., & Haswell W.A. (1897). *Text book of Zoology*. London: Macmillan and Company limited.
- Peelle, M.L. (1931a). The truncus arteriosus of American frogs, *Rana sphenoccephala*, *Palustris*, *Pipiens*, *Clamitans* and *Catesbeiana*, as contrasted to European Species. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University. Series VI. Zoology*, 1(2), 55-93.
- Peelle, M.L. (1931b). Further studies on the Truncus arteriosus of rana. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University. Series VIII, Zoology*, 1(2), 95-98.
- Peelle, M.L. (1932). The structure of the truncus arteriosus in four species of Japanese anurans. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University. Series VI. Zoology*, 1(4), 181-190.
- Plonka, P.M., Passeron, T., Brenner, M., Tobin, D.J., Shibahara, S., Thomas, A., Slominski, A.L., Kadekaro, D., Hershkovitz, E., Peters, J.J., Nordlund, Z., Abdel-Malek, K., Takeda, R., Paus, J.P., Ortonne, V.J., Hearing, Schallreuter K.U., & Nordlund, J.J. (2009). What are melanocytes really doing all day long?. *Experimental Dermatology*, 18(9), 799-819.
- Piiper, J., Gatz, R.N., & Crawford, E.C. (1976). Gas transport characteristics in an exclusively skin-breathing salamander, *Desmognathus fuscus* (Plethodontidae). En Hughes G.M., *Respiration of amphibious vertebrates*. New York: Academic Press, pp. 339-356.
- Pirlot, P. (1976). *Morfología evolutiva de los cordados*. Barcelona: Editorial Omega.
- Putnam, J.L. (1975). Septation in the ventricle of the heart of *Siren intermedia*. *Copeia*, 1975(4), 773-774.
- Putnam, J.L. (1977). Anatomy of the heart of the Amphibia. I. *Siren lacertina*. *Copeia*, 1977(3), 476-488.
- Putnam, J.L., & Dunn, J.F. (1978). Septation in the ventricle of the heart of *Necturus*

- maculosus*. *Herpetologica*, 34(3), 292-297.
- Putnam, J.L., & Kelly, D.L. (1978). A New Interpretation of Interatrial septation in the Lungless Salamander, *Plethodon glutinosus*. *Copeia*, 1978(2), 251-254.
- Putnam, J.L., & Parkerson Jr, J.B. (1985). Anatomy of the heart of the amphibia II. *Cryptobranchus alleganiensis*. *Herpetologica*, 41(3), 287-298.
- Putnam, J.L., & Sebastian, B.N. (1977). The fifth aortic arch in *Amphiuma*, a new discovery. *Copeia*, 1977(3), 600-601.
- Raffin, M., Leong, L.M., Ronés, M.S., Sparrow, D., Mohun, T., & Mercola, M. (2000). Subdivision of the cardiac Nkx2.5 expression domain into myogenic and nonmyogenic compartments. *Developmental Biology*, 218(2), 326-340.
- Ramaswami, L.S. (1944). An account of the heart and associated vessels in some genera of *Apoda* (Amphibia). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 114(1-2), 117-139.
- Rao, C.R.N., & Ramanna, B.S. (1925). Notes on the conus arteriosus of some genera of *Engystomatidae* and certain examples of *Rana* and *Bufo*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 95(4), 1445-1478.
- Rathke, H. (1952). Bemerkungen über mehere Korpelthiere der *Caecilia annulata*. *Archiv für Anatomie und Physiologie*, 1852, 335-349.
- Rau, A.S. (1924). Observations on the anatomy of the heart, lungs and related parts of *Ceratophrys*. *Journal of Anatomy*, 58(4), 306-327.
- Reese, A.M. (1906). Anatomy of *Cryptobranchus alleganiensis*. *American Naturalist*, 40, 287-326.
- Reyes-Moya, I., Torres-Prioris, A., Sans-Coma, V., Fernández, B., & Durán, A.C. (2015). Heart Pigmentation in the Gray Bichir, *Polypterus senegalus* (Actinopterygii: Polypteriformes). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 44(6), 475-480.
- Rodríguez, C. (2014). Diversidad morfológica y desarrollo embrionario del tracto de salida cardiaco de los Condriictios. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Rodríguez, C., Lorenzale, M., Linares, A., López-Unzu, M.A., Sans-Coma, V., Durán, A.C. (2013). The bulbus arteriosus of the holocephalan heart. 10th ICVM. *Anatomical Record*, 296 (Vol. esp. 1): P-277.
- Rodríguez C., Fernández B., Olivero, J., Salmerón, F., Torres-Prioris, A., Sans-Coma, V., Durán, A.C. (2016). The relative length of the cardiac bulbus arteriosus reflects phylogenetic relationships among elasmobranchs. *Zoologischer*

Anzeiger, 263, 84-91.

- Rolleston, G. (1870). *Forms of animal life*. Oxford: Clarendon Press.
- Rosenthal, J., Mangal, V., Walker, D., Bennett, M., Mohun, T.J., & Lo, C.W. (2004). Rapid high resolution three dimensional reconstruction of embryos with episcopic fluorescence image capture. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 72(3), 213-223.
- Rosset, A., Spadola, L., & Ratib, O. (2004). OsiriX: an open-source software for navigating in multidimensional DICOM images. *Journal of Digital Imaging*, 17(3), 205-216.
- Sabatier, A. (1873). *Études sur le coeur et al circulation centrale dans la serie des Vertebrates*. Montpellier and Paris.
- Sadaghiani, B., & Thiébaud, C.H. (1987). Neural crest development in the *Xenopus laevis* embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy. *Developmental Biology*, 124(1), 91-110.
- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J., & Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*, 126(15), 3437-3447.
- Santer, R.M. (1985). Morphology and innervation of the fish heart. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 89, 1.
- Sans-Coma V., Linares A., Rodríguez C., Torres-Prioris A., Fernández B. & Durán A.C. (2013). Distribution of pigment cells in the heart of the Rabbitfish, *Chimaera monstrosa* (Chondrichthyes: Holocephali). 10th ICVM. *Anatomical Record*, 296 (Vol. esp. 1): P-076.
- Sarasins P.F. (1890). Zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der *Ichthyophis glutinosus* (Linne). *Ergebnisse naturwissenschaftlicher Forschungen auf Ceylon* 2 parts 1-4.
- Satchell, G.H., & Johnes, M. (1967). The function of the conus arteriosus in the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*. *Journal of Experimental Biology*, 46(2), 373-382.
- Sater, A.K., & Jacobson, A. G. (1989). The specification of heart mesoderm occurs during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development*, 105(4), 821-830.
- Sato, M., & Yost, H.J. (2003). Cardiac neural crest contributes to cardiomyogenesis in zebrafish. *Developmental Biology*, 257(1), 127-139.
- Sawaya, P. (1941). Contribuição para o estudo do fisiologi do sistema circulatório do

- amfibio *Siphonops annulatus* (Mikan). *Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras, Universidade de São Paulo. Zoologia*, 5, 209-233.
- Schib, J.L., Icardo, J.M., Durán, A.C., Guerrero, A., López, D., Colvée, E., De Andrés, A.V. & Sans-Coma, V. (2002). The conus arteriosus of the adult gilthead seabream (*Sparus auratus*). *Journal of Anatomy*, 201, 395-404.
- Schilling, C. (1935). Das Herz von *Hypogeophis* und seine Entwicklung. *Morphologisches Jahrbuch*, 76, 52-91.
- Scott, J.E., & Dorling, J. (1965). Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. *Histochemistry and Cell Biology*, 5(3), 221-233.
- Sedmera, D., Reckova, M., Sedmerova, M., Biermann, M., Volejnik, J., Sarre, A., & Thompson, R.P. (2003). Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284(4), 1152-1160.
- Sepulveda, J.L., Belaguli, N., Nigam, V., Chen, C.Y., Nemer, M., & Schwartz, R.J. (1998). GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 18(6), 3405-3415.
- Sharma, H.L. (1957). The anatomy and mode of action of the heart of the frog, *Rana tigrina* daud. *Journal of Morphology*, 100(2), 313-343.
- Sharma, H.L. (1961). The circulatory mechanism and anatomy of the heart of the frog, *Rana pipiens*. *Journal of Morphology*, 109, 323-349.
- Shelton, G., & Jones, D.R. (1965). Pressure and volume relationships in the ventricle, conus and arterial arches of the frog heart. *Journal of Experimental Biology*, 43(3), 479-488.
- Simons, J.R. (1959). The distribution of the blood from the heart in some amphibians. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 132, 51-64.
- Small, E.M., Warkman, A.S., Wang, D.Z., Sutherland, L.B., Olson, E.N., Krieg, P.A. (2005). Myocardin is sufficient and necessary for cardiac gene expression in *Xenopus*. *Development*, 132, 987-997.
- Smith, S.J., Ataliotis, P., Kotecha, S., Towers, N., Sparrow, D.B., & Mohun, T.J. (2005). The MLC1v gene provides a transgenic marker of myocardium formation within developing chambers of the *Xenopus* heart. *Developmental Dynamics*, 232(4), 1003-1012.

- Smith, S.J., & Mohun, T.J. (2011). Early cardiac morphogenesis defects caused by loss of embryonic macrophage function in *Xenopus*. *Mechanisms of Development*, 128(5), 303-315.
- Smith W.C. (1918). On the process of disappearance of the conus arteriosus in Teleosts. *Anatomical Record*, 15, 65-71.
- Sparrow, D.B., Cai, C., Kotecha, S., Latinkic, B., Cooper, B., Towers, N., Evans, S.M., & Mohun, T.J. (2000). Regulation of the tinman homologues in *Xenopus* embryos. *Developmental Biology*, 227(1), 65-79.
- Stalsberg, H., & DeHaan, R.L. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Developmental Biology*, 19(2), 128-159.
- Terhal, H.J.J. (1942). *On the heart and arterial arches of Salamandra maculosa Laur. and Ambystoma mexicanum Shaw during metamorphosis*. Haarlem: J. Enshédé.
- Tonissen, K.F., Drysdale, T.A., Lints, T.J., Harvey, R.P., & Krieg, P.A. (1994). XNkx-2.5, a *Xenopus* gene related to Nkx-2.5 and tinman: evidence for a conserved role in cardiac development. *Developmental Biology*, 162(1), 325-328.
- Thompson, R.P., Sumida, H., Abercrombie, V., Satow, Y., Fitzharris, T.P., & Okamoto, N. (1985). Morphogenesis of human cardiac outflow. *The Anatomical Record*, 213(4), 578-586.
- Torreilles, S.L., McClure, D.E., & Green, S.L. (2009). *Evaluation and refinement of euthanasia methods for Xenopus laevis*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(5), 512-516.
- Van Den Berg, G., & Moorman, A.F. (2009). Concepts of cardiac development in retrospect. *Pediatric Cardiology*, 30(5), 580-587.
- Virágh, S., & Challice, C.E. (1973). Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse. *Journal of Ultrastructure Research*, 42(1-2), 1-24.
- Waldo, K.L., Kumiski, D.H., Wallis, K.T., Stadt, H.A., Hutson, M.R., Platt, D.H., Kirby, M.L. (2001). Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*, 128, 3179-3188.
- Waldo, K.L., Hutson, M.R., Ward, C.C., Zdanowicz, M., Stadt, H.A., Kumiski, D., Abu-Issa, R., & Kirby, M.L. (2005). Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. *Developmental Biology*, 281(1), 78-90.
- Wang, D., Chang, P.S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J.A., Small, E., Krieg,

- P.A., Olson, E.N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*, 105, 851-862.
- Wang, D.Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schrott, G., Richardson, J.A., Nordheim, A., Olson, E.N. (2002). Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 99, 14855-14860.
- Warkman, A.S., & Krieg, P.A. (2007). *Xenopus* as a model system for vertebrate heart development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(1), 46-53.
- Watanabe, M., Choudhry, A., Berlan, M., Singal, A., Siwik, E., Mohr, S., & Fisher, S.A. (1998). Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development*, 125(19), 3809-3820.
- Weidersheim, R. (1879). *Die Anatomie der Gymnophionen*. Jena: G. Fischer.
- Weichert, C.K., & Presch, W. (1981). *Elementos de anatomía de los cordados*. 4ªed. Buenos Aires: McGraw-Hill.
- Wessels, A., & Pérez-Pomares, J.M. (2004). The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anatomical Record*, 276, 43-57.
- Wilkinson, M. (1992). Novel modification of the tetrapod cardiovascular-system in the west African Caecilian *Herpele squalostoma* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae). *Journal of Zoology*, 228, 277-286.
- Wilkinson, M., & Nussbaum, R.A. (1996). On the phylogenetic position of the Uraeotyphlidae (Amphibia: Gymnophiona). *Copeia*, 1996(3), 550-562.
- Wilkinson, M. (1996). The heart and aortic arches of Rhinatrematid caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 118, 135-150.
- Wilkinson, M., Kok, P.J., Ahmed, F., & Gower, D.J. (2014). *Caecilita* Wake & Donnelly, 2010 (Amphibia: Gymnophiona) is not lungless: implications for taxonomy and for understanding the evolution of lunglessness. *Zootaxa*, 3779(3), 383-388.
- Woodhead, A.D., (1984). Aging changes in the heart of a poecilid fish, the guppy *Poecilia reticulatus*. *Experimental Gerontology*, 19, 383-391.
- Wright, G.M. (1984). Structure of the conus arteriosus and ventral aorta in the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*: microfibrils, a major component. *Canadian Journal of Zoology*, 62(12), 2445-2456.

- Ya, J., van den Hoff, M.J., de Boer, P.A., Tesink-Taekema, S., Franco, D., Moorman, A.F., & Lamers, W.H. (1998). Normal development of the outflow tract in the rat. *Circulation Research*, 82(4), 464-472.
- Yajima, I., & Larue, L. (2008). The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment cell & Melanoma Research*, 21(4), 471-476.
- Yuan, S., & Schoenwolf, G.C. (2000). Islet-1 marks the early heart rudiments and is asymmetrically expressed during early rotation of the foregut in the chick embryo. *The Anatomical Record*, 260(2), 204-207.
- Zhang, Z., Huynh, T., & Baldini, A. (2006). Mesodermal expression of Tbx1 is necessary and sufficient for pharyngeal arch and cardiac outflow tract development. *Development*, 133(18), 3587-3595.
- Zuasti, A., Jara, J.R., Ferrer, C., & Solano, F. (1989). Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Research*, 2(2), 93-99.
- Zuasti, A., Ferrer, C., Aroca, P., & Solano, F. (1990). Distribution of extracutaneous melanin pigment in *Sparus auatus*, *Mugil cephalus*, and *Dicertranchus labrax* (Pisces, Teleostei). *Pigment Cell Research*, 3(3), 126-131.
- Zullich, R. (1930). Über das Herz von *Salamandra maculosa*. *Morphologisches Jahrbuch*, 65, 178-228.
- Zummo, G., & Farina, F. (1989). Ultrastructure of the conus arteriosus of *Scyliorhinus stellaris*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 252(2), 158-164.

