

# Estandarización de los periodos morfogenéticos de la cardiogénesis de rata Wistar (*Rattus norvegicus*).

## Standardization of the morphogenetic periods of the cardiogenesis of Wistar rat (*Rattus norvegicus*).

Natalya Ramírez-Soto<sup>1,a</sup>, Nicolás Laverde-Sudupe<sup>2,a</sup>, Freddy Moreno-Gómez<sup>3,a</sup>

1. Estudiante de Enfermería, Semillero de Innovadores en Salud ISSEM.
2. Estudiante de Medicina, Semillero de Innovadores en Salud ISSEM.
3. Odontólogo, Magíster en Ciencias Biomédicas, Doctor (c) en Humanidades, Profesor Departamento de Ciencias Básicas de la Salud.

a. Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana Cali (Colombia).

### CORRESPONDENCIA

Natalya Ramírez Soto

ORCID ID <https://orcid.org/0000-0001-6854-3560>

Facultad de Ciencias de la Salud

Pontificia Universidad Javeriana Cali (Colombia).

E-mail: [natalia15@javerianacali.edu.co](mailto:natalia15@javerianacali.edu.co)

### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores del artículo hacen constar que no existe, de manera directa o indirecta, ningún tipo de conflicto de intereses que pueda poner en peligro la validez de lo comunicado.

RECIBIDO: 13 de marzo de 2021.

ACEPTADO: 29 de mayo de 2021.

### RESUMEN

**Objetivo:** Describir los procesos morfogenéticos de la cardiogénesis de rata Wistar (*Rattus norvegicus*) de un bioterio de Cali (Colombia). **Materiales y métodos:** Estudio observacional descriptivo de corte transversal en el que se describieron los cuatro períodos morfogenéticos del desarrollo del corazón (campo cardiogénico, tubo cardíaco, asa cardíaca y tabicación y compartimentalización), a través de preparaciones histoquímicas en hematoxilina-eosina, de 76 embriones obtenidos de 22 hembras (una para cada día de gestación) desde el día nueve de desarrollo intrauterino. **Resultados:** Se realizó una aproximación comparativa entre los estadios gestacionales en días de la rata Wistar y las semanas de desarrollo del corazón en humanos, siendo para el campo cardiogénico 3 y 9, para el tubo cardíaco 4 y 11, para el asa cardíaca 4 y 12 y para tabicación y compartimentalización 5 y 13, respectivamente, con algunas variaciones respecto a la literatura reportada. **Conclusiones:** La identificación de los procesos morfogenéticos de la cardiogénesis de rata Wistar (*Rattus norvegicus*) de un bioterio de Cali, permitirá establecer una línea de base espaciotemporal para el estudio embrionario comparativo del desarrollo del corazón humano. La estandarización de los cuatro períodos de la cardiogénesis en un biomodelo de rata Wistar permitirá realizar estudios sobre la etiopatogénesis de las anomalías congénitas cardíacas mediante embriología comparada. La identificación de la edad gestacional en la que se dan los procesos morfogenéticos contribuye a la reducción del número de muertes innecesarias de biomodelos de rata Wistar en futuros estudios.

**Palabras clave:** Rata Wistar, embriología, biología del desarrollo, histología, cardiogénesis, corazón.

### ABSTRACT

**Aim:** To describe the morphogenetic cardiogenesis processes of the Wistar rat (*Rattus norvegicus*) in a vivarium located in Cali (Colombia). **Materials and methods:** observational-descriptive study of cross-section where the four morphogenetic processes of the heart development (cardiogenic field, cardiac tube, cardiac loop and septum and compartmentalization) were described, through histochemical preparations in hematoxylin-eosin, of 76 embryos obtained from 22 females (one for each gestation day) from the ninth day of intrauterine development. **Results:** A comparative approximation was carried out between the gestational stages of the Wistar rat in days, and the weeks of heart development in humans, being 3 and 9 for the cardiogenic field, 4 and 11 for the cardiac tube, 4 and 12 for the cardiac loop and 5 and 13 for the septum and compartmentalization respectively, with a few variations due to reported literature. **Conclusions:** Identifying the morphogenetic processes of the cardiogenesis of the Wistar rat (*Rattus norvegicus*) in a vivarium located in Cali will allow the establishment of a space-time based line for the comparative embryonic study of the human heart development. The standardization of the four cardiogenetic periods in a Wistar rat biomodel enables the investigators to perform studies about the etiopathogenesis of congenital cardiac anomalies through comparative embryology. The identification of the gestational age where the morphogenetic processes take place contributes to diminish the unnecessary deaths of Wistar rat biomodels in future studies.

**Key words:** Wistar rat, embryology, developmental biology, histology, cardiogenesis, heart.

Ramírez-Soto N, Laverde-Sudupe N, Moreno-Gómez F. Estandarización de los periodos morfogenéticos de la cardiogénesis de rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *Salutem Scientia Spiritus* 2021; 7(4):30-37.



La Revista *Salutem Scientia Spiritus* usa la licencia Creative Commons de Atribución – No comercial – Sin derivar:

Los textos de la revista son posibles de ser descargados en versión PDF siempre que sea reconocida la autoría y el texto no tenga modificaciones de ningún tipo.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios de embriología comparada en biomodelos murinos, se han centrado en la descripción de los procesos secuenciales que incluyen la histogénesis (conformación de tejidos embrionarios a través de los procesos celulares de división, proliferación, crecimiento, diferenciación, migración y muerte celular programada), la organogénesis (asociación de los tejidos) y la morfogénesis (integración morfofuncional de los diferentes sistemas). Estos eventos embrionarios y fetales pueden variar en el tiempo de acuerdo a diferentes aspectos epigenéticos propios del medio ambiente de los bioterios como la alimentación, la temperatura, la humedad y la altura sobre el nivel del mar, entre otros; todos ellos con la capacidad de generar adaptaciones morfogénicas durante la gestación producto del estrés metabólico y del estrés psicológico generado a las hembras gestantes durante el desarrollo de los diferentes experimentos.<sup>1</sup>

En la literatura se puede encontrar la descripción de diferentes eventos de la cardiogénesis (campo cardiógeno, tubo cardíaco, asa cardíaca y tabicación y compartimentalización) en rata Wistar.<sup>2</sup> Sin embargo, se hace necesario –de acuerdo a lo manifestado anteriormente– que cada bioterio estandarice su biomodelo desde el punto de la biología del desarrollo, que funcionará como un referente estandarizado. El cual posteriormente será extrapolado al desarrollo humano para ser empleado en el estudio de la etiopatogénesis de anomalías congénitas cardíacas.

En los seres humanos, la cardiogénesis se ha descrito a partir de cuatro fases sucedáneas que implican:

1. La formación de un campo cardiógeno a partir de la migración de las células progenitoras desde la línea primitiva del epiblasto hacia la hoja esplácnica del mesodermo intraembrionario lateral para conformar el primer campo cardiógeno, los cuales recibirán una oleada migratoria de células progenitoras cardíacas pluripotenciales, desde el mesodermo faríngeo, para constituir el tracto de salida anterior y el segundo campo cardiógeno.
2. La diferenciación de los dos cordones angioblásticos en cada campo cardiógeno que dan paso a los dos tubos cardíacos, que se encuentran constituidos por el endocardio y el miocardio, además de un recubrimiento externo de células mesoteliales (epicardio).
3. La conformación de un único tubo cardíaco central, tras la fusión de los dos tubos cardíacos laterales, el cual se curva hacia la derecha para conformar el asa cardíaca, mientras se incorpora a la cavidad pericárdica por delante del intestino primitivo anterior y por debajo de la membrana bucofaríngea. En este proceso, se empiezan a diferenciar el tronco arterioso, el bulbo cardíaco, el seno venoso, el ventrículo primitivo y el atrio primitivo, estos últimos conectados por el canal

atrioventricular del septo atrioventricular.

4. El proceso de tabicación y compartimentalización, a partir de la proliferación de los tabiques primarios y secundarios que separan el atrio en derecho e izquierdo y del septo inter-ventricular que separa el ventrículo derecho del izquierdo.<sup>3-7</sup>

Por otro lado, la utilización de los biomodelos murinos, específicamente de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*), en estudios experimentales de embriología comparada, ha venido creciendo en los últimos 100 años. Su tiempo de gestación corto (además de su alta capacidad de proliferación y adaptación a la vida en los bioterios), y la similitud de procesos bioquímicos con los seres humanos, ha favorecido su uso en investigación sobre la morfogénesis cardíaca, asociado a la alta tasa de correspondencia espacial (desarrollo morfológico y funcional) y temporal (días, semanas y meses de desarrollo) entre el biomodelo murino y los seres humanos.<sup>1</sup>

Es por ello, que el objetivo de este estudio fue describir los procesos morfogénicos de la cardiogénesis de rata Wistar (*Rattus norvegicus*) de un bioterio de Cali (Colombia) para estandarizar y conocer el proceso reproductivo del biomodelo (tiempos de desarrollo de los cuatro períodos morfogénicos de la cardiogénesis), con el propósito final de estandarizar el estudio de anomalías congénitas cardíacas, evitar al máximo las muertes innecesarias y garantizar el respeto por los derechos del animal bajo principios éticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal que describió los procesos morfogénicos de la cardiogénesis de rata la Wistar (*Rattus norvegicus*) para correlacionar el comportamiento del tiempo de gestación y el desarrollo embrionario del corazón (campo cardiógeno, tubo cardíaco, asa cardíaca y tabicación y compartimentalización), a través de preparaciones histoquímicas con hematoxilina eosina de 76 embriones obtenidos de 22 hembras (una para cada día de gestación) desde el día nueve de desarrollo intrauterino.

Este estudio hace parte del proyecto de investigación “Atlas histológico del desarrollo embrionario –estadios de Witschi– de la rata albina Wistar (*Rattus norvegicus*)”, avalado por el Comité Institucional de Ética para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación de la Universidad ICESI –CIECUAE– (registro CIECUAE-029/2013), y cuya muestra fue obtenida y manejada en el bioterio de la Universidad ICESI. Una vez confirmado el estado de preñez y pasadas 24 horas, el primer biomodelo fue eutanizado. De allí en adelante, cada 24 horas, se eutanizó un biomodelo de acuerdo a la correspondencia con el día de gestación hasta completar los 22 biomodelos equivalentes a los 22 días de gestación. Cabe anotar que durante todo el tiempo que duró el

trabajo de campo, fueron atendidas las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud del Ministerio de la Protección Social de Colombia, además del Estatuto Nacional de Protección de los Animales para el cuidado de animales de experimentación. Los biomodelos en todo momento tuvieron el libre suministro de agua limpia y alimento (Rodentina® Purina®), la eliminación adecuada de excretas, un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas respectivamente, una temperatura entre 20°C y 24°C y unas condiciones de humedad del 55%-65%. Los biomodelos, se mantuvieron todo el tiempo en jaulas individuales de polycarbonato dentro del bioterio, fueron vacunados y recibieron la atención médica veterinaria de rutina.

Las hembras fueron eutanzadas mediante sedación profunda con anestesia inhalatoria de Isoflurano al 100% (Isoflurano USP® Baxter®) mediante vaporizador a concentración alveolar media 1,5% como dosis de inducción y 1,0% como dosis de mantenimiento. Posteriormente se aplicó una dosis letal de pentobarbital sódico (Penthal® INVET®) 20 mg/100 gr de peso corporal en el cuadrante inferior derecho del abdomen a través de la piel con la precaución de no punzar el intestino, la vejiga o el útero gestante. Una vez eutanzadas las hembras y comprobado el cese de latido cardíaco, se procedió a extraer el útero bicornio de la cavidad abdominal, para lo cual se levantó la piel de la parte baja del tórax con una pinza, se seccionó la piel y la musculatura en una sola intención con una tijera de tal forma que quedó un corte en forma de V. Se levantó el colgajo por encima del diafragma para exponer completamente la cavidad abdominal y se sujetó el animal arqueando la región dorsal para proyectar los órganos y extraer los dos cuernos uterinos y los ovarios –fijados al extremo distal de los cuernos uterinos– con un corte a nivel del cérvix y la parte superior de la vagina.

Una vez obtenidos los cuernos uterinos, los embriones y sus respectivas placentas fueron extraídos uno a uno de la cavidad uterina. Las carcasas de las hembras fueron desechadas de acuerdo a las normas de bioseguridad y manejo de material biológico anatomopatológico; los embriones fueron dispuestos de forma individual en una solución de formol buferado (100 ml de formol al 37%, 900 ml de agua destilada, 0,4 ml de sodio-fosfato monobásico y 0,65 ml de sodio-fosfato dibásico) para su fijación.<sup>8</sup>

Las muestras de los embriones, debidamente rotulados, fueron enviadas a un laboratorio para su procesamiento histológico y obtener de esta manera 21 preparaciones histoquímicas; procesadas con hematoxilina-eosina de diferentes cortes inespecíficos coronales, sagitales y transversales del esquema corporal de los embriones: las preparaciones fueron observadas, analizadas y fotografiadas en un microscopio óptico de luz a diferentes aumentos. Se incluyeron las preparaciones que correspondían a embriones desde el día 9 hasta el día 22 de desarrollo, de acuerdo a la literatura reportada (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de embriones por cada día de desarrollo

Día de desarrollo	Número de embriones
9	2
10	2
11	7
12	2
13	12
14	2
15	4
16	12
17	3
18	2
19	6
20	7
21	10
22	12

## RESULTADOS

De los 76 embriones obtenidos en la investigación, se trabajó con los cortes coronales de las preparaciones histoquímicas correspondientes a los embriones de los días 11 (tres preparaciones), 13 (cinco preparaciones), 15 (dos preparaciones) y 16 (cuatro preparaciones) en los que se pudieron identificar los cuatros periodos morfogenéticos por los que pasa el corazón durante su desarrollo. En los embriones del día 10 no se observaron cambios histológicos significativos respecto al día 11.

Tras las descripciones del desarrollo embrionario de ratones, de ratas y de humanos, llevadas a cabo por Witschi,<sup>9</sup> Theiler<sup>10</sup> y el Instituto Carnegie<sup>11</sup> respectivamente, los estudios de embriología comparada han podido correlacionar las diferentes etapas embrionarias desde la implantación del blastocisto hasta la organogénesis; lo que ha permitido la conversión de días gestacionales (ratón y rata) a semanas gestacionales (humanos). Para el caso de la cardiogénesis, los procesos morfogenéticos son bastante similares y han podido ser homologados por diferentes estudios;<sup>12,13</sup> precisamente, los resultados de este estudio serán discutidos con la revisión de la literatura de Núñez-Patiño *et al.*,<sup>2</sup> la cual tuvo como objetivo la descripción del estado del arte de la cardiogénesis en biomodelos de rata Wistar para establecer un paralelo con la formación de las estructuras cardíacas durante la cardiogénesis humana (Tabla 2).

En la Figura 1 se observa un embrión de 11 días de desarrollo, cuya preparación histoquímica a una magnificación de 4X permite

Tabla 2. Cardiogénesis comparada\*

Períodos	Días rata Wistar (literatura)	Semana ser humano (literatura)	Días rata Wistar (este estudio)
Campo cardiogéno	9	3	-
Tubo cardiaco	11	4	11-12
Asa cardiaca	12	4	12-13
Tabicación	13	5	14-15
Corazón morfofuncional	14	6	16-22

\*Núñez-Patiño et al2

identificar la histogénesis de la pared cardiaca del tubo cardiaco. No fue posible identificar el período de campo cardiogéno a través de cortes generales e inespecíficos en las preparaciones correspondientes a los embriones de 9 y 10 días de desarrollo. En la Figura 2, se observa un embrión de 12 días de desarrollo cuya preparación histoquímica a una magnificación de 4X permite identificar la histogénesis de la pared cardiaca y la luz de lo que será la futura cavidad cardiaca del tubo cardiaco. En la Figura 3 se observa un embrión de 13 días de desarrollo cuya preparación histoquímica a una magnificación de 4X permite identificar la histogénesis de la pared cardiaca y las luces de los que serán el atrio y el ventrículo primitivos del asa cardiaca. En la Figura 4 se observa un embrión de 15 días de desarrollo cuya preparación histoquímica a un aumento de 4X permite identificar la pared cardiaca, los dos ventrículos, el septo ventricular del corazón en proceso de cavitación y compartimentalización. En la Figura 5 se observa un embrión de 16 días de desarrollo cuya preparación histoquímica a 4X permite identificar la pared cardiaca, los dos ventrículos y el septo ventricular del corazón funcional.

## DISCUSIÓN

Tal como se mencionó, el desarrollo embrionario del corazón o cardiogénesis consiste en un proceso descrito a partir de cuatro períodos: La diferenciación del campo cardiogéno, la conformación de dos tubos cardiacos, la configuración del asa cardiaca y la tabicación y compartimentalización del corazón funcional.

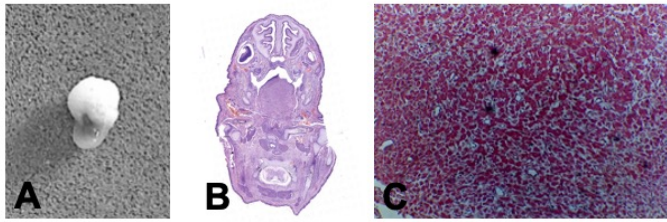
En los seres humanos, debido al aumento de tamaño del cuerpo, la necesidad de obtener mayor cantidad de nutrientes y oxígeno y de eliminar desechos metabólicos y gas carbónico, aumenta desde finales de la segunda semana, lo cual demanda la constitución morfofuncional de un sistema circulatorio desde mediados de la tercera semana y el funcionamiento del corazón a inicios de la cuarta. El primordio del corazón empieza a formarse al inicio de la tercera semana de desarrollo en la hoja esplácnica del mesodermo intraembrionario lateral. Ahí, dos campos cardiogénos, a lado y lado de la línea media en una vista dorsal, se forman por proliferación y acumulación de células mesodérmicas, las cua-

les se fusionan para constituir dos cordones angioblásticos, uno por cada campo. Posteriormente, estos cordones angioblásticos se canalizan en la medida que se constituye un endotelio muy delgado.<sup>3-6</sup>

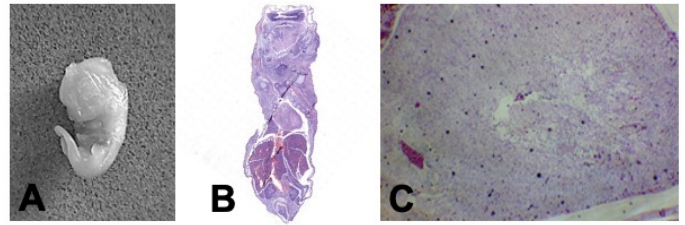
De acuerdo a la literatura y para el caso de la rata Wistar, el corazón se empieza a formar en el día 9 con la conformación del primer campo cardiogéno a partir de la migración de las células cardiacas progenitoras desde la línea primitiva del epiblasto hacia la hoja esplácnica del mesodermo intraembrionario, y del segundo campo cardiogéno a partir de la migración de las células progenitoras cardiacas pluripotenciales desde el mesodermo faríngeo, las cuales, dada su capacidad pluripotencial, originan todos los linajes de células cardiacas.<sup>14</sup> Una vez diferenciados, la inducción mediante señales de Bmp2, Bmp4 y Fgf ante la ausencia de señales de transducción Wnt3 y Wnt8 (inhibidas por *crested* y *cerberus*) provenientes desde el endodermo subyacente, provoca que las células cardiacas progenitoras se diferencien a mioblastos cardíacos y las células endocárdicas en angioblastos en la medida que los dos campos morfogénicos se expanden de forma simétrica a lo largo de la línea media del embrión. Los angioblastos proliferan y coalescen para formar cúmulos celulares aislados o angioquistes, los cuales se cavitan y fusionan para conformar dos tubos revestidos de endotelio y rodeados por mioblastos que son denominados cordones angioblásticos o primordios cardiacos (a lado y lado de la línea media), y cuyos extremos se conectan con vasos sanguíneos del cuerpo del embrión a través de una entrada posterior o polo venoso y una salida anterior o polo arterioso. Todo este proceso, desde la diferenciación celular en los campos cardiogénos, se encuentra regulado por factores de transcripción pertenecientes a las familias Nkx2.5 (responsable inicial de la cardiogénesis inducido por las proteínas Bmp y Fgf), ASXL1 y 2, GATA4, Hand1, Hand2, T-box y MEF2.<sup>15-17</sup>

En este estudio no fue posible identificar la conformación de los campos cardiogénos y de los cordones angioblásticos debido a la técnica histoquímica empleada y a los cortes inespecíficos de los embriones. De esta forma, solo fue posible identificar la presencia del tubo cardiaco en las preparaciones de los embriones del día

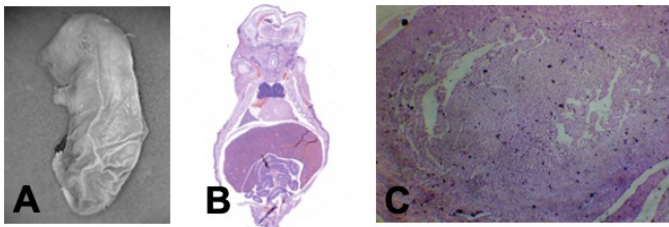
## Periodos morfogenéticos de la cardiogénesis de rata Wistar



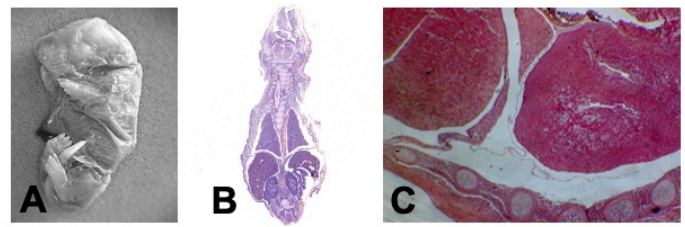
**Figura 1.** A. Fotografía de embrión de rata Wistar de 12 días de desarrollo intrauterino. B. Preparación histológica procesada con hematoxilina-eosina a 1X en la que se observa un corte coronal anterior en un plano frontal. C. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 4X en la que se observa la pared cardiaca del tubo cardiaco temprano. Fuente: Autores.



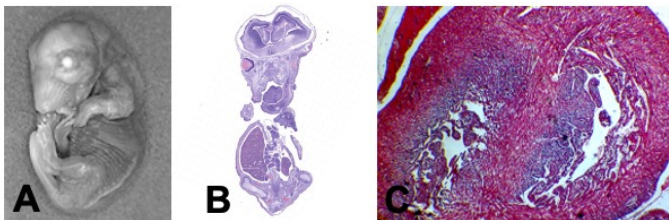
**Figura 2.** A. Fotografía de embrión de rata Wistar de 12 días de desarrollo intrauterino. B. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 1X en la que se observa un corte coronal anterior en un plano frontal. C. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 4X en la que se observa la pared cardiaca del tubo cardiaco tardío. Fuente: Autores.



**Figura 3.** A. Fotografía de embrión de rata Wistar de 13 días de desarrollo intrauterino. B. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 1X en la que se observa un corte coronal anterior en un plano frontal. C. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 4X en la que se observa la pared cardiaca del asa cardiaca. Fuente: Autores.



**Figura 4.** A. Fotografía de embrión de rata Wistar de 15 días de desarrollo intrauterino. B. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 1X en la que se observa un corte coronal anterior en un plano frontal. C. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 4X en la que se observa la pared cardiaca del corazón. Fuente: Autores.



**Figura 5.** A. Fotografía de embrión de rata Wistar de 16 días de desarrollo intrauterino. B. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 1X en la que se observa un corte coronal anterior en un plano frontal. C. Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 4X en la que se observa la pared cardiaca del corazón funcional (tabicado y compartimentalizado). Fuente: Autores.

11 y 12 de gestación, lo cual se corresponde con el día 11 para rata Wistar y la semana 4 para seres humanos, de acuerdo a lo reportado en la literatura.<sup>2</sup>

Ya en la cuarta semana de desarrollo ocurren el segundo y el tercer período de la cardiogénesis. Una vez conformados los cordones angioblásticos o tubos cardiacos endoteliales y con el plegamiento lateral del embrión, los mismos se fusionan en la línea media en el extremo cefálico para extenderse en sentido caudal. En la medida que se van fusionando, del mesodermo intraembrionario esplácnico externo se diferencia el miocardio primitivo y del interno el endotelio, separados por un tejido conectivo laxo rico en ácido hialurónico denominado gelatina cardiaca. El miocardio primitivo dará origen a la túnica media o muscular y el endotelio a la túnica íntima o endocardio. El pericardio visceral o epicardio, se forma desde células mesoteliales derivadas de la superficie externa del seno venoso cuando el corazón entra en la cavidad pericárdica con el plegamiento cefalocaudal del embrión, con lo que queda constituida la pared cardiaca del tubo cardiaco que presenta cinco dilataciones: el tronco arterioso, el bulbo cardiaco, el ventrículo primitivo, el atrio primitivo y el seno venoso.<sup>3-6</sup>

En la rata Wistar, los dos cordones angioblásticos se fusionan para formar el tubo cardiaco en el día 11, el cual se encuentra

constituido por un revestimiento interno (endocardio), una pared de músculo estriado cardíaco y gelatina cardíaca (miocardio), y un recubrimiento externo de células mesoteliales (epicardio). Este proceso de fusión y conformación del tubo cardíaco se encuentra regulado tanto por la expresión de los factores de transcripción Nkx2.5, GATA4 y MEF2 como la modificación epigenética específica de ciertas histonas (H3K4me1 o H3K4me3) al promover la expresión de dichos genes, los cuales median los cambios morfogenéticos esenciales de este período. El tubo cardíaco, por su entrada posterior o polo venoso, se alarga en sentido cefalocaudal para desarrollar el tronco arterioso, el bulbo cardíaco, el ventrículo primitivo, el atrio primitivo y el seno venoso; mientras por su salida anterior o polo arterioso se organiza cefálicamente el tronco arterioso que, junto con el bulbo cardíaco, el denominado conotrongo o bulbo arterial del corazón.<sup>18-22</sup> Es en este preciso momento en el que las células de la cresta neural, provenientes del romboencéfalo (rombómeros 6 y 8), a la altura de los tres primeros pares de somitas y a través del tercero, cuarto y sexto par de arcos faríngeos, migran por la pared cardíaca para participar más adelante en la tabicación y compartimentalización del corazón funcional mediante la diferenciación de los tabiques o septos, la remodelación de las válvulas cardíacas y la constitución del conotrongo, el cual dará origen, desde el tracto de salida ventricular, al tronco pulmonar y a la aorta.<sup>23</sup>

En los biomodelos de ratas Wistar de este estudio se evidenció que el tubo cardíaco estaba constituido entre los días 11 y 12 de desarrollo, de tal forma que puede apreciarse en dicha estructura, seccionada transversalmente, la presencia de las tres tunicas que constituyen el corazón en este período: desde la cavidad cardíaca hacia la cavidad pericárdica, el endocardio, el miocardio y el epicardio o pericardio seroso visceral. En el ser humano, estos mismo se puede apreciar durante la cuarta semana de desarrollo embrionario luego del plegamiento lateral y cefalocaudal.<sup>2</sup>

Posteriormente, el tubo cardíaco cambia su configuración pegándose sobre sí mismo (dado el rápido desarrollo del bulbo cardíaco y el ventrículo primitivo) para dar paso a la asa cardíaca y para invaginarse hacia la cavidad pericárdica, momento en el que el tronco arterioso se continúa con el arco aórtico para dar origen a los arcos aórticos hacia cefálico y con el seno venoso que recibe a las venas umbilical (corión), vitelinas (saco vitelino) y cardinal común (embrión) hacia caudal.<sup>3-6</sup>

En rata Wistar se ha visto que, con la elongación y morfodiferenciación de los diferentes segmentos del tubo cardíaco (asociado a la expresión de Nkx2.5, MEF2 y ácido retinoico), el mismo se curva hacia la derecha, para conformar el asa cardíaca mientras se incorpora en la cavidad pericárdica por delante del intestino primitivo anterior y por debajo de la membrana bucofaríngea. Durante este proceso, las células de la cresta neural inducen la proliferación del miocardio para dar paso a los cojinetes o

almohadillas endocárdicas (proyecciones de la gelatina cardíaca revestida de endocardio), que al confrontarse contralateralmente conforman el septo y el canal atrioventricular que separa el atrio primitivo del ventrículo primitivo. Todo este proceso del paso de tubo cardíaco a asa cardíaca en el día 12 del desarrollo en la rata Wistar, se encuentra regulado por Nkx2.5, GATA4 y MEF2, que inducen los factores reguladores morfogenéticos caderina N, Hand1 y Hand2 (los cuales son expresados para la diferenciación de los ventrículos), Pitx2 (factor de transcripción responsable de la lateralidad izquierda) y Xin1.<sup>19-21,25-27</sup>

En los embriones observados en este estudio se comprobó, mediante un corte transversal del corazón, la configuración del asa cardíaca en embriones del día 13 de desarrollo, en los que se pudo apreciar dos luces (separadas por un septo o tabique continuo) compatibles con la cavidad cardíaca del tubo cardíaco plegado, además de las tres tunicas cardíacas bien diferenciadas. De forma comparada, estos procesos, en los seres humanos, ocurren finalizando la cuarta semana.<sup>2</sup>

Finalmente, plegado el corazón, el mismo pasará por un proceso de tabicación y compartimentalización, con lo que el corazón funcional quedará morfológicamente constituido. A la mitad de la cuarta semana el atrio primitivo y el ventrículo primitivo se encontrarán separados por el septo o tabique atrioventricular, cuyos cojinetes endocárdicos dorsal y ventral circunscriben el canal atrioventricular que conecta ambas cavidades. Posteriormente, a lo largo de la quinta semana, con la migración de células mesenquimáticas y la configuración de los atrios derecho e izquierdo en paralelo a los ventrículos derecho e izquierdo, el septo atrioventricular será dividido para dar origen a los canales atrioventriculares derecho e izquierdo, en donde los extremos de los cojinetes serán remodelados para configurar las válvulas cardíacas mitral y tricúspide respectivamente. En este sentido, la división del atrio primitivo para dar paso a los atrios derecho e izquierdo, ocurre al finalizar la cuarta semana a expensas del septo o tabique interatrial, el cual sufre todo un proceso de remodelación que inicia con la proliferación en sentido cefalocaudal del primer tabique dividiendo el atrio primitivo parcialmente, de tal forma que en su extremo caudal, al no unirse al septo atrioventricular, se forma el primer agujero que conecta los atrios derecho e izquierdo. Por otro lado, en su extremo cefálico, el primer tabique se perfora para conformar el segundo agujero en la medida que continúa su proyección caudal hasta unirse con el septo atrioventricular para cerrar el primer agujero. En este punto los dos atrios quedan conectados a través del segundo agujero. Un segundo tabique se desarrolla desde el mismo punto y en el mismo sentido que el primer tabique, pero a su derecha, extendiéndose hacia la parte media del septo atrioventricular sin unirse a él, cambiando la configuración del segundo agujero, el cual pasa a llamarse agujero o foramen oval. Para el caso del ventrículo primitivo, desde la pared cardíaca más caudal prolifera un cojinete cardíaco en

sentido caudocefálico que se une al septo atrioventricular, para configurar el septo interventricular que separa totalmente los ventrículos derecho e izquierdo al final de la séptima semana.<sup>3-6</sup>

Para la rata Wistar, una vez constituida la fase de asa cardiaca y separado el atrio primitivo del ventrículo primitivo, se ha observado que en el día 13 proliferan los tabiques primarios y secundarios que separan el atrio en derecho e izquierdo comunicados inicialmente por el foramen oval y prolifera el septo interventricular que separa de forma definitiva el ventrículo derecho e izquierdo. Una vez conformada el asa cardiaca, las células de la cresta neural inducen genes efectores de la tabicación que actúan en la gelatina cardiaca y generan las cuatro cavidades cardiacas a partir de la proliferación y remodelación de los cojinetes cardiacos mediante las transiciones epiteliomesenquimáticas inducidas por el factor de crecimiento transformante beta TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, las proteínas morfogénicas de hueso BMP2A y BMP4, la proteína de dedo de zinc slug y la cinasa tipo receptor de activina ChALK2, los cuales a su vez están reguladas por la presencia de la calreticulina en el retículo endoplasmático para el control de calidad de dichas proteínas y su posterior liberación.<sup>19-21,25-28</sup>

Es importante manifestar que este período de tabicación y compartimentalización de la cardiogénesis se encuentra regulado por niveles altos de serotonina, la cual regula la histogénesis de los tejidos cardiacos.<sup>28</sup> Por tanto, una madre gestante sometida a estrés verá sus niveles de serotonina afectados, lo que se constituye en un factor desencadenante de afectación del desarrollo embrionario y por lo tanto activación de los mecanismos de muerte y reabsorción fetal.<sup>1</sup>

En este estudio, este proceso de tabicación y compartimentalización se pudo confirmar para rata la Wistar en los embriones de los días 14 y 15 de desarrollo. En las preparaciones histoquímicas, se pueden identificar dos luces compatibles con los dos ventrículos, el septo interventricular y las tres tunicas completamente diferenciadas.<sup>28</sup> De igual forma, hacia la luz se identifica un complejo sistema de haces musculares que, revestidos de endotelio, conforman las trabéculas carnosas que darán origen a los músculos papilares y a las cuerdas tendinosas que se insertan en las valvas de las válvulas atrio ventriculares mitral y tricúspide. En comparación, en los seres humanos estos procesos ocurren en la quinta semana para tener un corazón completamente funcional en la sexta semana de desarrollo.<sup>2,30-34</sup>

### CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta la descripción de los cortes inespecíficos de preparaciones histoquímicas con hematoxilina-eosina de embriones de rata Wistar y respecto a los días de gestación, se plantea una tabla comparativa en la que se evidencia el desarrollo del corazón en días en rata la Wistar (según la literatura), en semanas en seres

humanos y en días en rata Wistar (este estudio) para los períodos de la cardiogénesis. Así, se logró concluir que existe un patrón de extensión de un día en el biomodelo estudiado respecto a la literatura, lo cual puede estar asociado a las condiciones ambientales del bioterio, a las diferencias en la escala temporal y en la expresión génica de cada especie, y a la carga de estrés a la que se somete a los biomodelos, lo cual puede alterar las secuencias espaciotemporales de la morfogénesis.

Se recomienda realizar cortes específicos para el estudio de la cardiogénesis en rata la Wistar, que permitan profundizar en los resultados descritos en este estudio y poder crear una línea de base, a partir del biomodelo de este bioterio en particular, que permita el estudio embrionario comparativo sobre la etiopatogénesis de anomalías congénitas cardiacas en el contexto de la medicina traslacional. En este sentido, la identificación y estandarización de la edad gestacional en la que ocurren los procesos morfogenéticos (para el caso específico de este estudio, de la cardiogénesis), se contribuye a la reducción del número de muertes (muchas veces innecesarias) de biomodelos de rata Wistar en futuros estudios.

### AGRADECIMIENTOS

Este estudio derivó del proyecto de investigación “Atlas histológico del desarrollo embrionario –estadios de Witschi– de la rata albina Wistar (*Rattus norvegicus*)”, el cual fue financiado a través de la Convocatoria Interna de Investigaciones Capital Semilla 2014-2015 de la Pontificia Universidad Javeriana Cali (Colombia).

### REFERENCIAS

1. Cuellar L, Zafra D, Moreno S, Rosero D, Martínez C, Moreno F. Determinación del tiempo de gestación y desarrollo embrionario en rata Wistar (*Rattus norvegicus*) de un bioterio de Cali (Colombia). *Salutem Scientia Spiritus* 2019; 5(1):14-20.
2. Núñez-Patiño R, Yepes N, Solorza-Kasperson M, Moreno F. Cardiogénesis: Bases estructurales y moleculares a partir del modelo de rata Wistar. *Salutem Scientia Spiritus* 2017; 3(1):37-45.
3. Sadler TW. Embriología médica de Langman. Décimasegunda edición. Lippincot Williams & Wilkins: Barcelona; 2012
4. Carlson BM. Embriología humana y biología del desarrollo. Quinta edición. Elsevier: Barcelona; 2014.
5. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Embriología clínica. Décima edición. Elsevier: Barcelona; 2016.
6. Scott G. Biología del desarrollo. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires; 2006.
7. Arteaga S, García MA. Embriología humana y biología del desarrollo. Editorial Médica Panamericana: México; 2013.
8. Greenwald SE, Brown AG. Histology and staining. En: Zouridakis G y Moore J (editors). *Biomedical Technology and Devices Handbook*. CRC Press: London; 2004.

9. Witschi E. Development: Rat. In: Growth including reproduction and morphological development. Altman PL and Dittmer DS (editors) Fed Am Soc Exp Biol: Washington DC; 1962. p. 304-14.
10. Theiler K. The house mouse: atlas of mouse development. Springer-Verlag: NY; 1972.
11. O'Rahilly R. Early human development and the chief sources of information on staged human embryos. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1979; 9(4):273-80.
12. Arráez-Aybar LA, Turrero-Nogués A & Marantos-Gamarra DG. (2008). Embryonic cardiac morphometry in Carnegie stages 15-23, from the Complutense University of Madrid Institute of Embryology Human Embryo Collection. Cells Tissues Organs. 2008; 187:211-20.
13. Krishnan A, Samtani R, Dhanantwari P, Lee E, Yamada S, Shiota K, Donofrio MT, Leatherbury L, Lo CW. A detailed comparison of mouse and human cardiac development. Pediatr Res. 2014; 76:500-7.
14. Ramkisoensing A, Pijnappels D, Askar SF, Passier R, Swildens J, Goumans MJ *et al.* Human embryonic and embrionario mesenchymal stem cells differentiate toward three different cardiac lineages in contrast to their adult counterparts. PLoS One. 2011; 6(9):e24164. DOI: 10.1371/journal.pone.0024164
15. McGinley AL, Li Y, Deliu Z, Wang QT. Additional sex combs-like family genes are required for normal cardiovascular development. Genesis. 2014; 52(7):671-86. DOI: 10.1002/dvg.22793
16. Guo Y, Zhang X, Wei Y, Guo C, Li R, Xu X *et al.* Cardiogenesis-related gene expression during adipose mesenchymal stem cells differentiating into cardiomyocyte. Cell Research. 2008; 18(Suppl 151):350-9. DOI: 10.1038/cr.2008.241
17. Reichman DE, Park L, Man L, Redmond D, Chao K, Harvey RP, Taketo MM, Rosenwaks Z, James D. Wnt inhibition promotes vascular specification of embryonic cardiac progenitors. Development. 2018; 8:145(1). DOI: 10.1242/dev.159905.
18. Dupays L., Mohun T., Spatiotemporal regulation of enhancers during cardiogenesis. Cell. Mol. Life Sci. 2017; 74:257-265. DOI 10.1007/s00018-016-2322-y
19. Chan HC., Lau YT., Ding Q., Kit Li., Wong M., Shaw PC., Yaaye MM., Tsang ST. PinX1t, a Novel PinX1 Transcript Variant, Positively Regulates Cardiogenesis of Embryonic Stem Cells. J Am Heart Assoc. 2020; 9:e010240. DOI: 10.1161/JAHA.118.010240
20. Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. Heart. 2003; 89(7):806-14. DOI: 10.1136/heart.89.7.806
21. Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. Dev Biol 2003; 258:1-19. DOI: 10.1016/S0012-1606(03)00112-X
22. Xu H, Baldini A. Genetic pathways to mammalian heart development: Recent progress from manipulation of the mouse genome. Semin Cell Dev Biol. 2007; 18(1):77-83. DOI: 10.1016/j.semcdb.2006.11.011
23. Gómez-Gómez M, Danglot-Banck C, Santamaría-Díaz H, Kinkel-Riera C. Desarrollo embriológico y evolución anatomofisiológica del corazón (Primera Parte). Rev Mex Pediatr. 2012; 79(2):92-101.
24. Salazar-García M, Sánchez-Gómez C, Contreras-Ramos A, Carrillo-Ávalos B, Revilla-Monsalve MC, Palomino-Garibay MA. Los segmentos cardíacos primitivos, su implicación en la cardiogénesis normal aplicada a la cardiología pediátrica. Arch Cardiol Méx. 2006; 76 (Suppl 4):46-57.
25. Anderson RH, Webb S, Brown NA, Lamers W, Moorman A. Development of the heart: (3) Formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. Heart. 2003; 89(9):1110-8. DOI: 10.1136/heart.89.9.1110
26. Suzuki HR, Solursh M, Baldwin HS. Relationship between fibronectin expression during gastrulation and heart formation in the rat embryo. Dev Dyn. 1995; 204(3): 259-77. DOI: 10.1002/aja.1002040305
27. Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart. The origin and regulation of cardiac progenitor cells. Curr Top Dev Biol. 2010;90(C):1-41. DOI 10.1016/S0070-2153(10)90001-X
28. Karimzadeh F., Opas M. Calreticulin Is Required for TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition during Cardiogenesis in Mouse Embryonic Stem Cells. Stem Cell Reports. 2017; 8:1299-1311
29. Manjarrez-Gutiérrez G, Camacho-Calderón N, Mercado-Camargo R, de Oca AB, Arvizu-Flores A, Hernández-Rodríguez J *et al.* Characterization of serotonergic cells in embrionario heart tissue. Cir y Cir (Cir Ciruj). 2009; 77(6):395-400.
30. Lopez III A., Wang S., Larina I. Embryonic Mouse Cardiodynamic OCT Imaging. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 2020; 7:42. DOI:10.3390/jcdd7040042.
31. Wu M. Mechanisms of trabecular formation and specification during cardiogenesis. Pediatr Cardiol. 2018 ; 39(6): 1082–1089. DOI:10.1007/s00246-018-1868-x.
32. Asp M., Giacomello S., Larsson L., Wu G., Fürth D., Qian X., Wärdell E. *et al.* A Spatiotemporal Organ-Wide Gene Expression and Cell Atlas of the Developing Human Heart. Cell Press. 2019; 179 (7), 1647-1660. DOI: 10.1016/j.cell.2019.11.025.
33. Battista NA., Douglas DR., Lane AN., Samsa LA., Liu J., Miller LA. Vortex Dynamics in Trabeculated Embryonic Ventricles J. Cardiovasc. Dev. Dis. 2019, 6, 6; doi:10.3390/jcdd6010006
34. Jallerat Q., Feinberg AW. Extracellular Matrix Structure and Composition in the Early Four-Chambered Embryonic Heart. Cells 2020; 9:285. DOI:10.3390/cells9020285.