

Tesis de Posgrado

Análisis descriptivo y experimental de los procesos de diferenciación del área cardíaca de *Bufo arenarum*

Paz, Dante Agustín

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Paz, Dante Agustín. (1987). Análisis descriptivo y experimental de los procesos de diferenciación del área cardíaca de *Bufo arenarum*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2048_Paz.pdf

Cita tipo Chicago:

Paz, Dante Agustín. "Análisis descriptivo y experimental de los procesos de diferenciación del área cardíaca de *Bufo arenarum*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2048_Paz.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

ANALISIS DESCRIPTIVO Y EXPERIMENTAL DE LOS PROCESOS
DE DIFERENCIACION DEL AREA CARDIACA DE
Bufo arenarum.

AUTOR: **Dante Agustín Paz**

DIRECTOR DE TESIS

Prof. Dr: **ARMANDO PISANO'**

LUGAR DE TRABAJO

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES EMBRIOLOGICAS
(CONICET)

**Tesis presentada para optar al título de Doctor en
Ciencias Biológicas**

1987

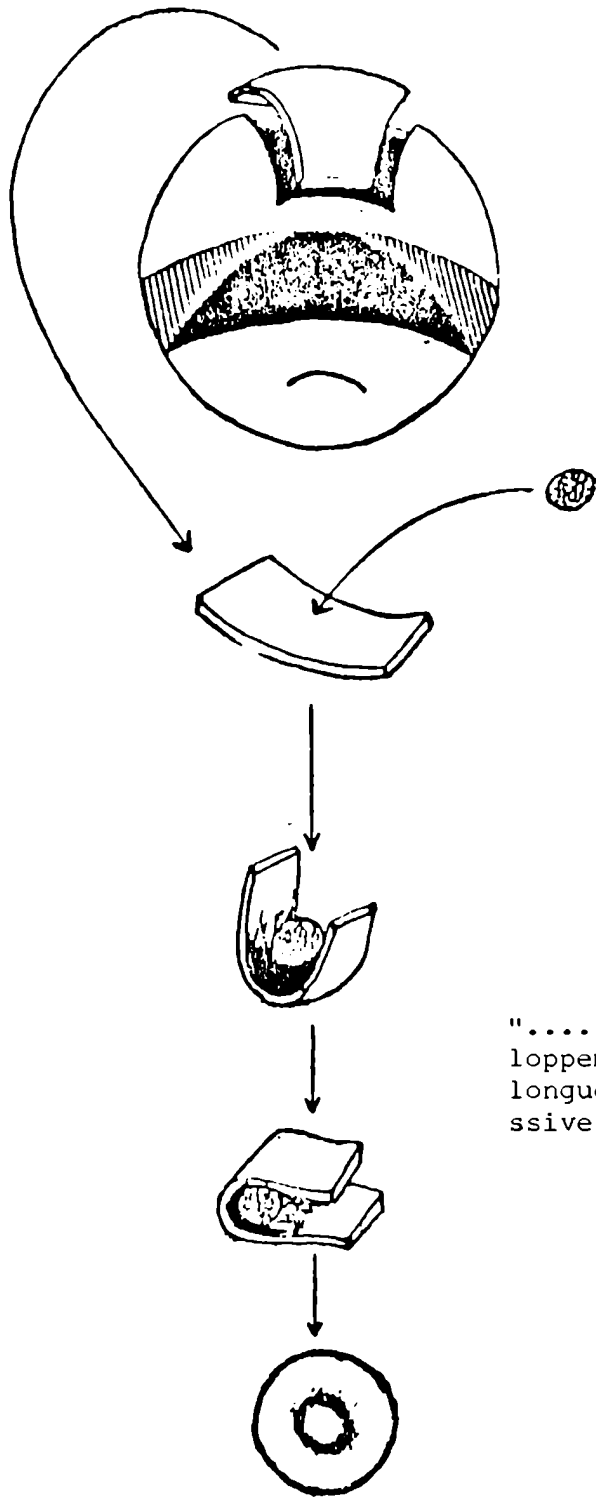
- 2048 -
ej. 2

A mis Padres,

quienes con sus esfuerzos permitieron el logro de mi carrera científica.

A Ana

que me acompaña y comprende mi labor.



".... on peut considérer le développement des organes comme une longue chaîne d'inductions successives et réciproque" (WOLFF).

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Armando PISANÓ por haberme guiado en la realización de éste trabajo, ofreciendome todos sus conocimientos científicos y técnicos y, fundamentalmente, por haber sido siempre mi maestro y amigo.

A la Dra. Dora RENGEL quién me ha brindado en varias ocasiones su serena crítica y una palabra de estímulo.

A la Dra. Cristina MAGGESE quien como asesora supo sugerirme la pauta necesaria para el desenvolvimiento de mi Carrera Doctoral.

A todo el personal del LABINE que en todo momento me brindó apoyo y amistad y en modo particular a las Sras. Ana Maria BARCIULLI y Rosa SPADACCINI, por la ayuda material que me han proporcionado en la realización del manuscrito.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que a través de becas de estudio y perfeccionamiento, me permitió los medios necesarios para llevar a cabo mi labor científica.

INDICE

	pág.
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	1
PRIMERA PARTE	
INTRODUCCION.....	3
SEGUNDA PARTE	
MATERIALES Y METODOS.....	14
2.1. Parte descriptiva.....	15
2.1.1. Método para obtención de embriones.....	15
2.1.2. Método para microscopía óptica.....	16
2.1.3. Método para microscopía electrónica de barrido.....	17
2.2. Parte experimental.....	18
2.2.1. Eliminación total del endodermo.....	18
2.2.2. Trasplante de endodermo de distintas áreas	18
2.2.3. Cultivo en "sandwich".....	18
2.2.4. Cultivo <u>in vitro</u> de mesodermo presuntivo cardíaco y endodermo, en diferentes medios salinos.....	19
2.2.5. Cultivo <u>in vitro</u> de mesodermo del área car díaca de embriones en distintos estadios de desarrollo.....	19
2.2.6. Cultivo <u>in vitro</u> de mesodermo presuntivo cardíaco junto con endodermo anterior.....	20
2.2.7. Cultivo <u>in vitro</u> de mesodermo presuntivo cardíaco en contacto con endodermo de dis- tintas áreas de embriones del mismo estadio	20
2.2.8. Cultivo <u>in vitro</u> de mesodermo presuntivo cardíaco en contacto con endodermo anterior de embriones en distintos estadios del de- sarrollo.....	22
2.2.9. Medios condicionados.....	22
2.2.10. Regeneración explantes.....	24
2.2.11. Trasplantes.....	24

TERCERA PARTE

RESULTADOS.....	26
3.1. Observaciones descriptivas.....	27
3.2. Observaciones experimentales.....	48
3.2.1. Explante de todo el endodermo.....	48
3.2.2. Trasplante de endodermo.....	49
3.2.3. Cultivos <u>in vitro</u> . Medios salinos.....	55
3.2.4. Cultivo de mesodermo del área cardíaca <u>ex</u> plantado de distintos estadios de desarro llo.....	57
3.2.5. Acción inductora del endodermo anterior...	59
3.2.6. Acción inductora de distintas áreas endo- dérmicas sobre la diferenciación cardíaca	61
3.2.7. Acción inductora de endodermo de distin- tos estadios embrionarios.....	63
3.2.8. Medios condicionados.....	65
3.2.9. Cultivos de explantes en "sandwich".....	66
3.2.10. Regeneración del esbozo cardíaco.....	69

CUARTA PARTE

DISCUSION.....	80
4.1. Análisis de los resultados.....	81
4.1.1. Conceptos inherentes a la inducción.....	81
4.1.2. Conceptos inherentes a la regeneración....	83
4.2. Interpretación del análisis descriptivo.....	84
4.3. Interpretación de los ensayos experimentales	88
4.3.1. Explantes - trasplantes - cultivos.....	88
4.3.2. Regeneración.....	92

QUINTA PARTE

CONCLUSIONES.....	94
-------------------	----

SEXTA PARTE

APENDICE.....	98
---------------	----

SEPTIMA PARTE

BIBLIOGRAFIA.....	103
-------------------	-----

OCTAVA PARTE

ADDENDUM.....	115
---------------	-----

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

A listado de tablas.

	pág.
I. Resumen de las reacciones histoquímicas durante el desarrollo cardíaco de <u>Bufo arenarum</u>	47
II. Resultados obtenidos al trasplantar endodermo de distintas áreas de embriones en estadio de surco neural, en el área faríngea de embriones en el mismo estadio.....	54
III. Resumen de los resultados obtenidos cultivando mesodermo cardíaco solo y mesodermo cardíaco en presencia de endodermo circundante de embriones en distintos estadios de desarrollo.....	60
IV. Resultados obtenidos al cultivar mesodermo presuntivo cardíaco de embriones en estadio de surco neural (estadio 14) en contacto con endodermo anterior de embriones en distintos estadios de desarrollo..	64

B listado de figuras.

1. Representación esquemática de la metodología utilizada al cultivar mesodermo presuntivo cardíaco junto con endodermo de la región anterior.....	21
2. Cultivo de mesodermo presuntivo cardíaco en presencia de endodermo anterior de embriones en estadios distintos de desarrollo.....	23
3. Corte transversal de placa neural temprana (estadio 13) de <u>B. arenarum</u>	28
4. Corte transversal de placa neural tardía (estadio 13) de <u>B. arenarum</u>	29
5. Corte transversal de botón caudal de <u>B. arenarum</u> .	31
6. Corte transversal de un embrión de <u>B. arenarum</u> en estadio de Botón Caudal.....	32
7. Corte transversal de un embrión de <u>B. arenarum</u> en estadio de respuesta muscular.....	34 a
8. Corte transversal de un embrión de <u>B. arenarum</u> en estadio de respuesta muscular.....	34 b

	pág.
9. Corte transversal de un embrión de <u>B. arenarum</u> al finalizar el estadio de respuesta muscular.....	35
10. Embrión de <u>Bufo arenarum</u> en estadio de latido cardíaco.....	36
11. Embrión de <u>Bufo arenarum</u> en estadio de latido cardíaco.....	37
12. Corte transversal de un embrión de <u>B. arenarum</u> en estadio de latido cardíaco.....	38
13. Corte transversal de un embrión de <u>B. arenarum</u> en estadio de circulación branquial.....	40
14. Corte transversal de un embrión de <u>B. arenarum</u> en estadio de boca abierta.....	41
15. Corte transversal de un embrión de <u>Bufo arenarum</u> en estadio de circulación branquial.....	42
16. Corte transversal de un embrión de <u>Bufo arenarum</u> en estadio de circulación branquial.....	43
17. Corte transversal de un embrión de <u>Bufo arenarum</u> en estadio de circulación en la aleta de la cola.	45
18. Embrión de <u>B. arenarum</u> al que en estadios neurales se le explantó todo el endodermo.....	50
19. Embrión normal (control). Corte transversal a nivel del corazón.....	50
20. Embrión de <u>B. arenarum</u> que recibió el trasplante, en el área faríngea, de endodermo de la región media de otro embrión.....	52
21. Embrión de <u>Bufo arenarum</u> que recibió el trasplante en el área faríngea, de endodermo de la región posterior de otro embrión.....	52
22. Embrión de <u>Bufo arenarum</u> del mismo grupo experimental de la fig. 21.....	53
23. Cultivo de mesodermo del área cardíaca sola y del mesodermo del área cardíaca en presencia de endodermo adyacente.....	58
24. Cultivos de mesodermo presuntivo cardíaco de néurulas en presencia de endodermo anterior, de la región media y de la región posterior de embriones en el mismo estadio.....	62

	pág.
25. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". Endodermo organizado en tubo y mesodermo diferenciado en células mesenquimáticas.....	67
26. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". Se aprecia el endodermo y las células mesenquimáticas.....	67
27. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". Idem anterior...	68
28. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". El mesodermo ha quedado aislado del endodermo.....	68
29. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". Control. Ectodermo banal y mesodermo no diferenciado.....	70
30. Grupo. Cultivo en "sandwich". Idem anterior.....	70
31. Grupo 2. Cultivo en "sandwich". Ectodermo y mesodermo no diferenciado.....	71
32. Grupo 3. Cultivo en "sandwich". Endodermo y mesodermo no diferenciado.....	71
33. Embrión de <u>B. arenarum</u> (corte sagital) dos horas después del explante del área cardíaca.....	73 a
34. Embrión control de <u>B. arenarum</u> (corte sagital) en estadio de botón caudal.....	73 b
35. Embrión de <u>B. arenarum</u> (corte sagital) dos horas después del explante del área cardíaca y del endodermo ubicado inmediatamente por encima.....	73 c
36. Corte transversal de un embrión de <u>Bufo arenarum</u> al que, en estadio de botón caudal, se le explantó solamente el área cardíaca.....	74
37. Corte transversal de un embrión de <u>Bufo arenarum</u> al que, en estadio de respuesta muscular, se le explantó el área cardíaca.....	75
38. Corte transversal de un embrión de <u>Bufo arenarum</u> al que, en el estadio de botón caudal, se le explantó el área cardíaca y el endodermo adyacente	77
39. Corte transversal de un embrión control de <u>Bufo arenarum</u> . El corazón está totalmente desarrollado.....	77

	pág.
40. Vista de una larva de <u>B. arenarum</u> a la que se le trasplantó el esbozo cardíaco.....	78
41. Corte transversal de una larva de <u>B. arenarum</u> a la que se trasplantó un esbozo cardíaco.....	78

RESUMEN

RESUMEN

La diferenciación tisular, la constitución de la forma y la aparición de la función de los distintos órganos embrionarios, dependen de complicados procesos que involucran interacciones específicas entre las varias células y entre grupos celulares de distinto significado.

No escapa de esta vasta problemática, la diferenciación del área cardíaca para la que intervienen interacciones celulares y más específicamente mecanismos de inducción embrionaria. Por lo tanto hemos considerado de interés realizar un estudio tanto descriptivo como experimental en la tentativa de reconocer los episodios morfológicos y, por lo menos parcialmente, bioquímicos, que se verifican durante el desarrollo del corazón de Bufo arenarum, anfibio de amplia distribución en el país y muy usado para ensayos de carácter experimental.

Cabe señalar que en esta especie, salvo dos someras comunicaciones en Congresos, el Tema que nos hemos propuesto desarrollar no había sido todavía tratado.

La primera parte comprende un estudio descriptivo tanto de los procesos de diferenciación del área cardíaca como así también de la formación del corazón embrionario; las observaciones han sido realizadas con el empleo de microscopio óptico y en ocasiones con microscopía electrónica de barrido. Además el análisis en algunos casos ha sido completado con técnicas histoquímicas específicas.

Se puso de manifiesto que si bien los procesos de diferenciación del área cardíaca de Bufo arenarum siguen el esquema descrito para otras especies anfibias, demuestran ciertas diferencias no sólo en los tiempos de aparición de los episodios, sino también en las expresiones morfológicas descriptas especialmente para Anfibios Urodelos.

El análisis histológico e histoquímico, demuestra por primera vez en Anfibio, la presencia de una "gelatina cardíaca" que si bien puede homologarse a la observada en Aves, parece poseer diferente composición química.

En la segunda parte del trabajo, se ha encarado, de manera experimental, el análisis de los procesos inductores que se verifican durante la diferenciación cardíaca. El estudio, realizado tanto con técnicas de explantes y trasplantes, como así también de cultivo organotípico, ha puesto en evidencia la importancia del endodermo en función de inductor para que se verifique el desarrollo del corazón. Más específicamente y según resulta de los ensayos esta capacidad estaría limitada al área más anterior del endodermo, es decir a la que corresponde al endodermo faringeo.

Además se ha demostrado fehacientemente que la capacidad inductora se encuentra limitada a estadios embrionarios tempranos; los resultados de ensayos que han utilizado el endodermo anterior de embriones en estadio de respuesta muscular o más avanzados, no le asignan más capacidad inductora.

Resulta sumamente interesante haber constatado, mediante el empleo de distintas metodologías de cultivo, que la inducción del endodermo anterior sobre el área presuntiva cardíaca, se verificaria sin un intimo contacto entre las dos hojas embrionarias, dado que un factor o factores liberados en el medio parecerían actuar sobre el área presuntiva cardíaca e inducir su diferenciación.

El explante del mesodermo del área cardíaca de embriones en distintos estadios de desarrollo por lo menos hasta el de botón caudal ha comprobado que se verifican procesos de regeneración. Estos últimos resultados demostrarían que también en Bufo arenarum, el corazón se diferencia dentro de un "campo cardíaco", situación morfológica adecuada para que el mesodermo adyacente al explante del esbozo del corazón, se diferencie en estructuras cardíacas.

PRIMERA PARTE

INTRODUCCION

1 - Introducción.

1.1. - Un organismo representa el corolario de una serie de manifestaciones, morfológicas y bioquímicas, que se verifican a lo largo del desarrollo según una secuencia impuesta por un patrón específico. Tanto en las especies gonocóricas, como así también en las hermafroditas, la penetración del espermatozoide en el ovocito, marca el comienzo de una actividad que se resuelve en procesos que si bien se compenetran y superponen, no es posible encuadrar, por su complejidad, en esquemas rígidos. No obstante, existen etapas bien definidas que proporcionan pautas exactas de determinados acontecimientos: una vez que se verifica la penetración del espermatozoide en el ovocito seguida por el movimiento respectivo de los dos pronúcleos masculino y femenino y su fusión (cariogamia) los cromosomas que han recuperado su fase 2n se disponen de modo tal que se inicia la primera división mitótica. De la cigota por lo tanto se obtendrán en un comienzo dos blastómeros y, finalmente, por una serie de sucesivos clivajes, numerosas células cuya ordenada disposición obedece a una específica información. En etapas más avanzadas y debido a la diferenciación de los diversos tipos celulares, reconocible por sus características propias, se constituirá el complejo cariz histofisiológico del organismo.

El conjunto de los procesos de diferenciación celular representa uno de los más atractivos problemas de la biología moderna. Según se sabe, cada tipo celular se caracteriza por la presencia de proteínas particulares y, en la actualidad, prevalece el concepto que, en el ámbito de una determinada especie, las células poseen una misma información genética.

Durante muchos años se sostuvo la hipótesis de que la información necesaria para la construcción de un organismo se encontraría contenida sólo en el genoma; esta hipó

tesis en la actualidad ha sido descartada dado que se considera insuficiente una eventual acción aislada del genoma (Løvtrup, 1983) y la biología molecular confirma cada vez más este concepto. En base a estos datos vuelve a ser reconsiderado lo enunciado por Brachet (1921), es decir que el desarrollo ontogenético representaría un proceso epigenético creativo, dependiente de otros procesos "causalmente" relacionados entre sí. Este concepto corroboraría lo propuesto por la teoría "epigenética", la que, en oposición a la "preformista", sostiene que el desarrollo embrionario se debe a la constitución sucesiva de nuevas formas, que no preexisten en el ovocito (Løvtrup, 1983).

Expresado en otros términos, el desarrollo de un organismo, además de la actividad génica específica, dependería de otros factores tales como diferencias regionales citoplasmáticas en la célula huevo y, en lo sucesivo, de interrelaciones de estímulos inductores que tienden a asegurar el armónico verificarse de las diferentes etapas del desarrollo. En función de estos factores, cada tipo celular se diferenciará en el momento oportuno y en la ubicación correcta (Markert y Ursprung, 1973).

La morfogénesis cardíaca representa un valioso parámetro para el análisis de eventos que acontecen durante la diferenciación celular en el período de la organogénesis; queremos dar énfasis al hecho de que durante el desarrollo del área cardíaca se verifican no sólo interrelaciones celulares, sino también procesos de inducción embrionaria y cambios en la matriz extracelular. Cualquier alteración en la secuencia de los acontecimientos, tanto de carácter morfológico como bioquímico, dará como resultado, en este caso, malformaciones cardíacas de distinto tipo.

Cabe señalar al respecto que si bien el empleo de modernas técnicas histológicas e histoquímicas han permitido un adecuado análisis de la génesis cardíaca en Vertebrados (De Haan, 1968; Mamasek, 1968, 1969; Hendrix y Morse, 1977; Orts Llorca et al, 1982; Icardo, 1983; Hiruma y Hirakow, 1985;

García Martínez y Hurlé, 1986) para los Anfibios urodelos los datos que se poseen al respecto son escasos y todavía más lo son para los Anfibios anuros de los que sólo se poseen informaciones esporádicas (Copenhaver, 1955; Willens, 1955; Lemanski, 1973).

Los primeros estudios inherentes a la formación del corazón en Anfibios datan de la segunda mitad del siglo pasado y se caracterizan por las discrepancias en que incurren. Bastará recordar que el territorio involucrado en la formación del corazón en Urodelos había sido considerado, según el caso, de origen:

a) totalmente endodérmico (Marshall, 1890. Houssay, 1893).

b) de origen mixto, en cuanto el miocardio se formaría a expensas del mesodermo, mientras que el endocardio proveniría del endodermo (Brachet, 1898, 1903).

c) de otra fuente de discutible interpretación (Johnson, 1903; Sampson, 1904).

d) Mollier (1906) señala, después de un estudio detallado de secciones seriadas del área cardíaca de embriones de Rana sp., que el corazón tendría su origen de un primordio par, constituido por áreas tanto de la somáto como de la esplácnopleura del mesodermo.

El actual mapa de los territorios presuntivos de gástrulas de Anfibios urodelos ubica en áreas superficiales, respectivamente localizadas en ambos lados del eje anteroposterior del embrión, dos grupos celulares que corresponderían al mesodermo presuntivo cardíaco. Durante los complejos movimientos gastrulares, estos dos grupos penetran a la altura de los labios laterales del blastoporo e insinuándose entre ecto y endodermo, migran hacia la región anterior, junto con el remanente manto mesodérmico (Nakatzuji, 1975; Balinsky, 1978). Al promediar los estadios neurales, debido a sucesivos desplazamientos, forman, al unirse ventralmente, un esbozo único que, en estadio de botón caudal se encontrará localizado por debajo del endodermo faríngeo (Copenhaver, 1926).

El método de las marcas coloreadas propuesto por Vogt (1929) ha permitido ampliar la posibilidad de reconocer, con mayores detalles, el desarrollo del esbozo cardíaco de Ambystoma punctatum. Willens (1955) aplicando en estadios de néurula, azul nilo y/o rojo neutro en algunas áreas de las láminas laterales mesodérmicas, pudo reconocer los movimientos que sufren a lo largo de las varias etapas del desarrollo. Según sus observaciones el mesodermo lateral de una néurula, ubicado inmediatamente por debajo del área posterior del futuro encéfalo, constituiría el mesodermo presuntivo cardíaco: con posterioridad, migraría hacia áreas ventrales hasta ubicarse en el sitio donde se diferencia el corazón. En otros términos, el mesodermo de las láminas laterales ubicado a la derecha y a la izquierda, respectivamente, del embrión representaría la única fuente de formación del corazón dado que no intervendrían otras hojas embrionarias u otros territorios mesodérmicos.

En lo referente a los Anfibios anuros, los resultados obtenidos con técnicas de coloración vital (Nakatsuji, 1975; Keller, 1975, 1976; Smith y Malacinski, 1983; Cleine y Slack, 1985) sugieren que los procesos gastrulares difieren en algunos aspectos de los descritos para Urodelos. La principal diferencia radica en que en estos últimos el presuntivo mesodermo se localiza superficialmente mientras que en Anuros se ubicaría en posición más interna. Esto implicaría que los movimientos gastrulares que conducen a la posición final del mesodermo sean distintos entre Urodelos y Anuros; según Keller (1976) en estos últimos (Xenopus laevis) la migración hacia la región ventral del mesodermo presuntivo cardíaco, ocurriría en estadios menos avanzados del desarrollo que en Urodelos.

Copenhaver (1926) describe el desarrollo del corazón de Ambystoma punctatum (Anfibio urodelo) correlacionándolo con los estadios embrionarios descritos por Harrison para esta especie y constata que en el estadio de tubo neural, la lámina de mesodermo lateral de un lado todavía no se ha unido, en la línea media ventral, con la del opuesto. Esta fusión

se verifica recién en el estadio de botón caudal avanzado, en áreas ubicadas por debajo de la futura zona faríngea, dando lugar al denominado "esbozo cardíaco".

En una primera etapa del desarrollo, el corazón de los Anfibios "sensu lato" se presenta como un tubo recto que en estadios posteriores sufre una flexión en forma de "S". Durante este último proceso se verifican constricciones de modo tal que queda subdividido en: 1) seno venoso; 2) atrio; 3) ventrículo; 4) cono arterial.

Consideramos oportuno destacar, en cuanto lo utilizaremos como parámetro útil en la interpretación de nuestros resultados, que el análisis microscópico del desarrollo del corazón en Aves, ha puesto de manifiesto la presencia, en el tubo cardíaco, de un material amorfo ubicado entre endo y miocardio que, por sus características ha sido llamado "gelatina cardíaca" (Davis, 1924); en estadios iniciales del desarrollo se encuentra homogéneamente distribuido, en cambio en estadios más avanzados se localiza en sitios especializados, (Gessner et al. 1965; Hurle y Ojeda, 1977; Nakamura y Manasek, 1981).

Según Barry (1948) la gelatina cardíaca de Aves tendría importancia para las rítmicas contracciones del corazón embrionario, en cuanto la específica elasticidad de la gelatina cardíaca, permitiría que la luz del endocardio se abriera después de cada contracción favoreciendo el llenado diastólico. La viscosidad de la gelatina impediría además la deformación que hubiera de producirse por el paso de la corriente sanguínea; al mismo tiempo, facilitaría la expulsión de la sangre hacia adelante, más considerando que el corazón embrionario en estas etapas no posee válvulas adecuadas para ese proceso (Barry, 1948; Patten at al., 1948); más específicamente se atribuye a los glicosaminoglicanos presentes en la gelatina cardíaca, la responsabilidad de la elasticidad y viscosidad necesarias (Icardo, 1983).

En los Anfibios, tanto Anuros como Urodelos, ha sido descrito un espacio amplio, entre endo y miocardio, ocupado por material amorfo homologado a la "gelatina car-

díaca" de Aves (Jaffee, 1962). No obstante, es muy poco lo que se sabe en este caso en lo referente a sus posibles funciones y a su composición química. Lemanski (1973) en un estudio histoquímico del desarrollo cardiaco de Ambystoma mexicanum (Urodelo) señala la presencia de mucopolisacáridos sin precisar su composición química y su distribución a lo largo del desarrollo.

El problema de la diferenciación cardíaca encierra, en sí mismo, una amplia temática embriológica que posee como común denominador el concepto de la inducción embrionaria. La formación de los distintos órganos, la diferenciación citológica de las células que los constituyen y la gradual aparición de sus específicas funciones representan fascinantes temas de actualidad, de difícil interpretación.

La inducción reviste un rol de suma importancia para la Ontogénesis de los Vertebrados; el concepto surgido luego de una extensa serie de investigaciones experimentales, puede ser definido como el resultado de acciones específicas que un esbozo embrionario (inductor) ejerce sobre otro esbozo (territorio competente) todavía no determinado y al que orienta hacia una muy precisa diferenciación. Desde un punto de vista más amplio, un inductor existe en cuanto existen uno o más sistemas susceptibles de funcionar frente al inductor.

Los cambios que se producen en el territorio competente por la presencia del inductor, son generalmente drásticos; de un esbozo embrionario, pluripotencial e indiferenciado, el territorio competente se transforma en un esbozo diferenciado con nuevas propiedades, con una distinta orientación espacial de sus células, con características estructurales específicas y una activación diferencial del genoma que permite la síntesis de proteínas particulares en el nuevo territorio diferenciado.

Los primeros resultados experimentales atribuyeron al área cardíaca presuntiva de Anfibios, la capacidad de autodiferenciarse en corazón (Ekmann, 1921). Estos resultados no fueron aceptados por Stöhr (1924, 1929) quien usando en Bombi-

nator la metodología del explante y del trasplante, reconoce que la diferenciación del área cardíaca en Anfibios se correlaciona con la presencia de células de territorios endodérmicos y mesodérmicos adyacentes al futuro esbozo del corazón. Por otra parte, Copenhaver (1926), utilizando la metodología del trasplante en embriones de Ambystoma (Urodelo), en el estadio de botón caudal, obtiene corazones bien desarrollados a partir de presuntivos esbozos cardíacos sin la presencia de estructuras endodérmicas, por lo que considera que, por lo menos en esta especie, el corazón es capaz de autodiferenciarse.

El análisis experimental aportó evidencias cada vez más concretas de que el endodermo ubicado en la cercanía del área cardíaca influye en la diferenciación del corazón.

Bacon (1945) reemplaza el esbozo cardíaco de una néurula de Ambystoma punctatum con mesodermo de la zona marginal de gástrula, área ésta que no participa en la formación del corazón; en este caso en presencia de endodermo limitrofe a la región cardíaca, se diferencia en tejido cardíaco. Como prueba complementaria, explanta mesodermo de la zona marginal de gástrula y lo mantiene, experimentalmente, en contacto con endodermo del área cardíaca de néurula, utilizando el método del "sandwich"; en varios casos obtiene desarrollo de tejido cardíaco que hasta se torna pulsátil. Cabe señalar que en Ambystoma el mesodermo, por lo menos en el estadio de néurula, aún no se ha puesto en contacto con el endodermo del piso de la faringe, es decir, el inductor. Explantes de porciones laterales de labio blastoporal mantenidos en cultivo proporcionan resultados discordes en cuanto en algunos casos diferencian tejido que puede presentar pulsaciones; según señala Jacobson (1960) es probable que los ensayos realizados por Bacon incluyan otros territorios adyacentes al mesodermo cardíaco.

El conjunto de los resultados obtenidos por Bacon no pueden interpretarse como concluyentes. Por una parte indicarían que el endodermo ubicado en la región anterior del embrión, dorsalmente al territorio cardíaco, es capaz de inducir

las células mesodérmicas competentes para que se diferencien en células cardíacas; por otra parte demostrarían que el endodermo adyacente al área cardíaca no sería esencial para evidenciar la expresión de las potencialidades cardíacas del mesodermo presuntivo del corazón. Debe recordarse que, al respecto, obtiene diferenciación del corazón a partir de mesodermo presuntivo de una néurula, mantenido en cultivo sin la presencia de otros territorios.

Resultados en favor de una acción inductora del endodermo en la diferenciación cardíaca, son los de Balinsky (1939), Nieuwkoop (1947) y Jacobson (1960) quienes respectivamente explantan en distintas especies de Urodelos todo el endodermo de las varias etapas de néurula, obteniendo embriones sin corazón.

Los ensayos de Jacobson (1960, 1961) proporcionan datos todavía más convincentes. Utilizando la técnica del cultivo en "sandwich" propuesta por Holtfreter (1933), comprueba, en Taricha torosa, que manteniendo en explante mesodermo presuntivo del corazón, se diferencian estructuras cardíacas sólo en un 14% de los casos; sin embargo, cultivándolo en contacto con endodermo de la región anterior, correspondiente al área faríngea, se obtiene en el 100% de los ensayos, diferenciación de tejido cardíaco hasta con contracciones rítmicas.

Jacobson y Duncan (1968), utilizando técnicas de cultivo "in vitro" confirman estos resultados y señalan además, que el homogenado de regiones anteriores endodérmicas resulta para la diferenciación cardíaca un inductor tan eficaz, como el tejido endodérmico íntegro.

Una prueba decisiva de la acción inductora, por parte del endodermo, para que se diferencie el área cardíaca presuntiva, por lo menos en Anfibios urodelos, la proporcionan los resultados obtenidos utilizando un grupo de Ambystoma mexicanum caracterizados por un gen recesivo (cardiac lethal) designado con la letra "c" (Humphrey, 1968).

Los embriones mutantes se obtienen por

cruza de padres heterocigotos(+/c) y pueden ser distinguidos de los normales (+/c; +/+) recién en el estadio 34 en el que estos últimos presentan latidos cardíacos. Los embriones mutantes pueden vivir de 15 á 30 días y sus movimientos natatorios normales sugieren que el gen "c" no afecta al músculo esquelético.

Los embriones homocigotos c/c no presentan latidos cardíacos en estadios en que éstos son visibles en los embriones normales; el análisis histológico revela en este caso, sólo una pared miocárdica monoestratificada (Lemanski, 1973c). Cabe señalar además que el esbozo cardíaco de un embrión mutante (c/c) trasplantado en la región cardíaca de embriones normales (+/c; +/+) se diferencia en un corazón hasta con latidos cardíacos (Humphrey, 1972); en cambio, realizando el trasplante a la inversa, es decir cuando el esbozo cardíaco de embriones normales (+/+; +/c) se trasplanta en el área cardíaca de un embrión mutante (c/c), la diferenciación cardíaca no se verifica.

El conjunto de estos resultados permite emitir la hipótesis que la falla en el desarrollo del corazón se debería a una deficiencia de inducción por parte del endodermo o, por lo menos, a un efecto inhibitorio del tejido que rodea al área cardíaca. No se excluye la posibilidad que el endodermo de embriones mutantes se diferencie rápidamente, perdiendo su capacidad de inducir el tejido cardíaco (Kulikowsky y Manasek, 1977). En este último caso el análisis histológico del endodermo de regiones anteriores de los embriones mutantes, demuestra una mayor diferenciación, aún cuando de difícil interpretación, que el endodermo de embriones normales de un mismo estadio (Lemanski, 1977).

El análisis bioquímico y ultraestructural del corazón de embriones mutantes, revela además una disminución en el contenido de proteínas contráctiles y una falta de organización de las miofibrillas (Lemanski et al 1976; Lemanski y Fuldner, 1977; Lemanski, 1978; Fuldner et al 1984).

En definitiva, la información bibliográfica demuestra que para los procesos de diferenciación del mesodermo presuntivo cardíaco en Anfibios, existen todavía numerosos

interrogantes y dudas tanto desde un punto de vista morfológico, como así también bioquímico. Es de suponer que análisis descriptivos comparativamente realizados entre estadios distintos y en modo particular ensayos de caracter experimental, podrán aportar datos de interés no sólo inherentes al problema de la diferenciación cardíaca en Anfibios, sino también en lo inherente a las interrelaciones celulares.

1.2. Por lo expuesto hemos considerado oportuno realizar un estudio, descriptivo y experimental, de los acontecimientos que se verifican durante el desarrollo del órgano cardíaco de un Anuro, utilizando como modelo experimental, Bufo arenarum, anfibio de amplia difusión geográfica en nuestro país.

Con el objeto de tener un parámetro adecuado de lo que ocurre en esta especie en condiciones normales, el estudio en su primera etapa ha focalizado y tratado de analizar las características del desarrollo cardíaco en comparación con lo descrito al respecto para Urodelos. A las observaciones morfológicas se han apoyado, en algunos casos, los resultados obtenidos mediante técnicas histoquímicas que han permitido una mayor y mejor comprensión de los hechos que se verifican a lo largo del complejo juego de las interrelaciones celulares y de las inducciones durante la diferenciación cardíaca.

En la segunda parte, la diferenciación del área cardíaca de Bufo arenarum ha sido tratada desde un punto de vista experimental en modo particular para reconocer el eventual inductor y delimitar el área involucrada en los procesos inductivos y su potencialidad a lo largo del desarrollo del corazón.

SEGUNDA PARTE

MATERIALES Y METODOS

2. 1. Parte descriptiva

2.1.1. Método para obtención de embriones

Los ejemplares adultos de Bufo arenarum, capturados en los alrededores de la ciudad de Buenos Aires, se mantuvieron en peceras de vidrio, en un ambiente con humedad y temperatura adecuadas, hasta el momento en que se indujo la ovulación. Con este fin se inyectó una suspensión de hipófisis homóloga, mantenida según Pisanó (1956), en la cavidad abdominal de hembras aclimatadas a 25°C con un fotoperíodo de 12 horas de luz durante 24-48 horas antes del estímulo hormonal. Al comenzar la oviposición se desmedulaba la hembra y las tiras ovocitarias, extraídas de los ovisacos y colocadas en cápsulas de Petri humedecidas, se fertilizaron con el agregado de un macerado de testículo que previamente se observaba al microscopio, para constatar la motilidad y movilidad de los espermatozoides. Aproximadamente 5 minutos después, se añadía una cantidad suficiente de solución de Holtfreter standard (ver apéndice), de modo tal de dejar completamente sumergidos los trozos de tiras ovocitarias y permitir su imbibición.

Los embriones distribuidos en número de 200 por cápsulas de Petri de 20 cm. de diametro se desarrollaron en solución de Holtfreter standard a temperatura ambiente (22°-24°C) y los estadios embrionarios se identificaron teniendo en cuenta la tabla de Del Conte y Sirlin (1952)

Al alcanzar los estadios que se precisaban para el ensayo, los embriones se trataban brevemente con una solución de ácido tioglicólico al 1% neutralizado con NaOH, (pH. 7.2) con el fin de eliminar las membranas gelatinosas que los recubren.

Con el objeto de reconocer eventuales anomalías que pudiesen ocurrir a partir de la fertilización del ovocito, se controlaron con frecuencia hasta comenzar la segmentación, las tiras ovocitarias fertilizadas. Cabe señalar que la morfología del ovocito, cambiante por los eventos que se verifi-

can con la activación (contacto de la cabeza del espermatozoide con el cortex ovular) ofrece, al respecto, parametros seguros. En efecto en el ovocito de Bufo arenarum, de forma subsférica, se distinguen claramente 2 hemisferios: uno que representa el "casquete animal" y que se caracteriza por una cantidad considerable de pigmento melánico y el otro, más claro por la escasa cantidad de pigmento, que se denomina "casquete vegetativo".

El impacto del espermatozoide sobre la superficie ovular, provoca una serie de procesos morfológicos y bioquímicos propios de la activación. A raíz de que se forma la "membrana de fertilización", el huevo, rotando en el espacio perivitelino y obligado por el peso del vitelo ubicado en el polo vegetativo, se posiciona con el polo animal hacia arriba; este movimiento se verifica entre los 30 y 50 minutos después de la fertilización y su aparición se considera como uno de los parámetros para determinar que ocurrió la fertilización.

2.1.2. Método para microscopía óptica

Los embriones con mucho contenido de vitelo fueron fijados en el líquido de Ancel y Vintemberger (1948) o en 1,5% de glutaraldehído en buffer cacodilato (0.1 M, pH 7.4). En los casos de embriones más avanzados o larvas se usó el líquido de Bouin.

Los embriones sometidos a técnicas histoquímicas para poner en evidencia mucopolisacáridos, se fijaron en la mezcla de formol al 10% y cloruro de cetil-piridinum al 10% en agua; este fijador no permite la difusión de sustancias muy solubles y su uso resulta recomendable para técnicas histoquímicas de carbohidratos (Pearse, 1980).

La inclusión para las piezas que ulteriormente se analizaban con microscopía óptica se realizó en una mezcla de parafina-cera de abeja (56°C) y los cortes seriados de 6 micras se trataron respectivamente y según lo imponía el ensayo experimental, con las coloraciones que se consignan a continuación:

- 1. Hematoxilina alcohólica de Ehrlich-eosina acuosa.
- 2. Solución tricrómica de Mallory.
- 3. Alcian Blue 1% en ácido clorhídrico 0.1N, pH 1.0 (Troyer, 1980).
- 4. Alcian Blue 1% en ácido acético al 3%, pH 2,5 (Pearse, 1980).
- 5. Reacción de PAS precedida o no por la oxidación con ácido peryódico al 1% en solución acuosa (Lillie, 1951).
- 6. Tratamiento con hialuronidasa (0,5 gr de hialuronidasa testicular por ml de buffer fosfato-citrato pH 5.8) y sucesiva coloración con Alcian Blue pH 2.5 (Troyer, 1980).
- 7. Azul de bromofenol-mercurio para tinción de proteínas (Bonhag, 1955).

Los cortes fueron deshidratados en una serie ascendente de alcohol, clarificados en xilol y montados en el medio sintético Pearmount (Fisher, Sci.).

Para la determinación cuantitativa, si bien aproximada, de los carbohidratos, se tuvo especial cuidado en mantener uniformes los parámetros técnicos como fijación, espesor de los cortes, tiempo de coloración, etc.

2.1.3. Método para microscopía electrónica de barrido

Los embriones en los distintos estadios utilizados para nuestros ensayos han sido fijados en glutaraldehído al 2,5% en buffer cacodilato (0.1M, pH 7.7) durante 24 hs a 4°C y lavados varias veces en el mismo buffer. En algunos casos, tanto el ectodermo como el pericardio se separaban de los territorios circundantes mediante delicadas agujas de vidrio, en otros casos se realizaban cortes macroscópicos con el objeto de poner en evidencia la estructura interna del corazón en desarrollo. Todas las piezas fueron deshidratadas en una serie ascendente de acetona, desecadas de acuerdo con la técnica del punto crítico, revestidas con oro-paladio y observadas al microscopio electrónico de barrido JEOL 25 S II que se operó entre los 5 y 15 KW.*

* Agradecemos el servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Odontología de la U.B.A.

2.2. Parte experimental

2.2.1. Eliminación total del endodermo

Para realizar la faz técnica de estos ensayos se colocaban en cápsulas de parafina negra conteniendo solución Holtfreter madre, estadios de placas neurales cuya membrana vitelina se separaba mecánicamente mediante pinzas de relojero de puntas finas. Con la ayuda de una aguja de vidrio, preparada según Spemann, se realizaba un corte en la línea media ventral de la néurula y con un ansa de cabello, se eliminaba el endodermo, tratando de no dañar el mesodermo presuntivo cardíaco. Al verificarse el cierre de la herida, los embriones, con la ayuda de una pipeta doble, eran trasladados a cápsulas de Petri con base de agar y mantenidos en solución salina de Holtfreter standard que se renovaba día por medio.

2.2.2. Trasplante de endodermo de distintas áreas

Embriones en estadio de placa neural o botón caudal, eran ubicados en cavidades previamente practicadas en el fondo de cápsulas de parafina negra que contenían solución Holtfreter madre estéril. Con el auxilio de agujas de Spemann se trasplantaba endodermo de la región media, o bien de la región posterior de un embrión en placa neural o botón caudal, en el área faríngea de otro embrión en estadio de placa neural. Una vez cerrada la herida, los embriones se colocaban en cápsulas de Petri con fondo de agar y solución Holtfreter standard que diariamente se sustituía con solución fresca.

2.2.3. Cultivos en "Sandwich"

Embriones en estadio de placa neural fueron puestos en cavidades previamente practicadas en el fondo de cápsulas de parafina negra que contenían solución Holtfreter madre estéril. Con la ayuda de agujas de vidrio (agujas de Spemann) se explantaba el mesodermo presuntivo cardíaco y se lo ponía res-

pectivamente en contacto con endodermo anterior (grupo 1), con endodermo de la región media (grupo 2) o con endodermo del área posterior (grupo 3) también explantados, envolviendolos con ectodermo de áreas posteriores, es decir ectodermo banal (Holtfreter, 1933). Los "sandwich" presionados con puentes de vidrio por algun tiempo, se pasaban luego a cápsulas con fondo de ágar y solución Holtfreter standard estéril, que se renovaba diariamente.

2.2.4. Cultivo in vitro de mesodermo presuntivo cardíaco y endodermo, en diferentes medios salinos.

Embriones en estadio de placa neural, surco neural o rotación, se colocaban, respectivamente, en cavidades previamente practicadas en el fondo de cápsulas de parafina negra, que contenían solución Holtfreter madre estéril. Con el auxilio de agujas de Spemann se explantaba el área correspondiente al mesodermo cardíaco, junto con el endodermo circundante y se cultivaba según la metodología de la "gota pendiente" descrita por Andrew y Gabie (1969) levemente modificada. Es decir: los explantes, transferidos para su lavado a cápsulas estériles, que contenían, según el caso, Holtfreter madre, Holtfreter standard o Niu y Twitty (ver apéndice) se pasaban luego a un cubreobjeto cuyo centro contenía una gota de una de las tres soluciones de cultivo y, en las esquinas, una mezcla de parafina y vaselina caliente. Acto seguido se apoyaba de manera invertida un portaobjetos excavado sobre el cubreobjetos, presionando los bordes por encima de la parafina-vaselina. Con esta misma mezcla se sellaba el cubreobjeto en toda su periferia. Los cultivos, mantenidos a temperatura constante (18-20°C) se examinaban diariamente con microscopía de contraste de fases.

2.2.5. Cultivo in vitro de mesodermo del área cardíaca de embriones en distintos estadios de desarrollo.

Desde el estadio de la placa neural (estadio 13) hasta el estadio de circulación branquial (estadio 20)

la presuntiva área mesodérmica cardíaca sufre, morfológicamente, variaciones significativas. Por lo tanto se consideró oportuno explantar, en cada una de estas etapas embrionarias, el mesodermo cardíaco y mantenerlo en cultivo. La metodología consistió en explantar con el auxilio de una aguja de vidrio y un ansa de cabello, el territorio mencionado el que se trataba de hacer desarrollarse en la solución de Niu-Twitty, utilizando en la mayoría de los casos el método de la gota pendiente. Con el objeto de establecer comparaciones, algunos explantes se mantuvieron en cápsulas de Petri de 2,5 de diámetro que contenían 2 ml de solución de Niu-Twitty a la que se le agregaba gentamicina (5mg/ml). Todos los cultivos han sido mantenidos a temperatura constante y se examinaron diariamente con microscopía de contrastes de fases.

2.2.6. Cultivo in vitro de mesodermo presuntivo cardíaco junto con endodermo anterior.

Con el objeto de verificar el efecto del endodermo anterior (endodermo faríngeo) sobre la diferenciación del mesodermo presuntivo cardíaco de embriones en estadio de placa neural, hasta estadio de circulación branquial, se mantuvo en contacto mesodermo presuntivo cardíaco con endodermo de la región anterior (área faríngea) (ver fig. 1). La metodología empleada es la misma que se utilizó en los ensayos anteriores.

2.2.7. Cultivo in vitro de mesodermo presuntivo cardíaco en contacto con endodermo de distintas áreas de embriones del mismo estadio.

Dado que al utilizar la metodología de explantes y trasplantes pudimos comprobar una diferente acción inductora de las distintas áreas del endodermo, consideramos oportuno explantar mesodermo presuntivo cardíaco de embriones en estadio de surco neural y cultivarlo in vitro respectivamente con endodermo de la región anterior, media o posterior de otros embriones del mismo estadio. La metodología del explante y del cul

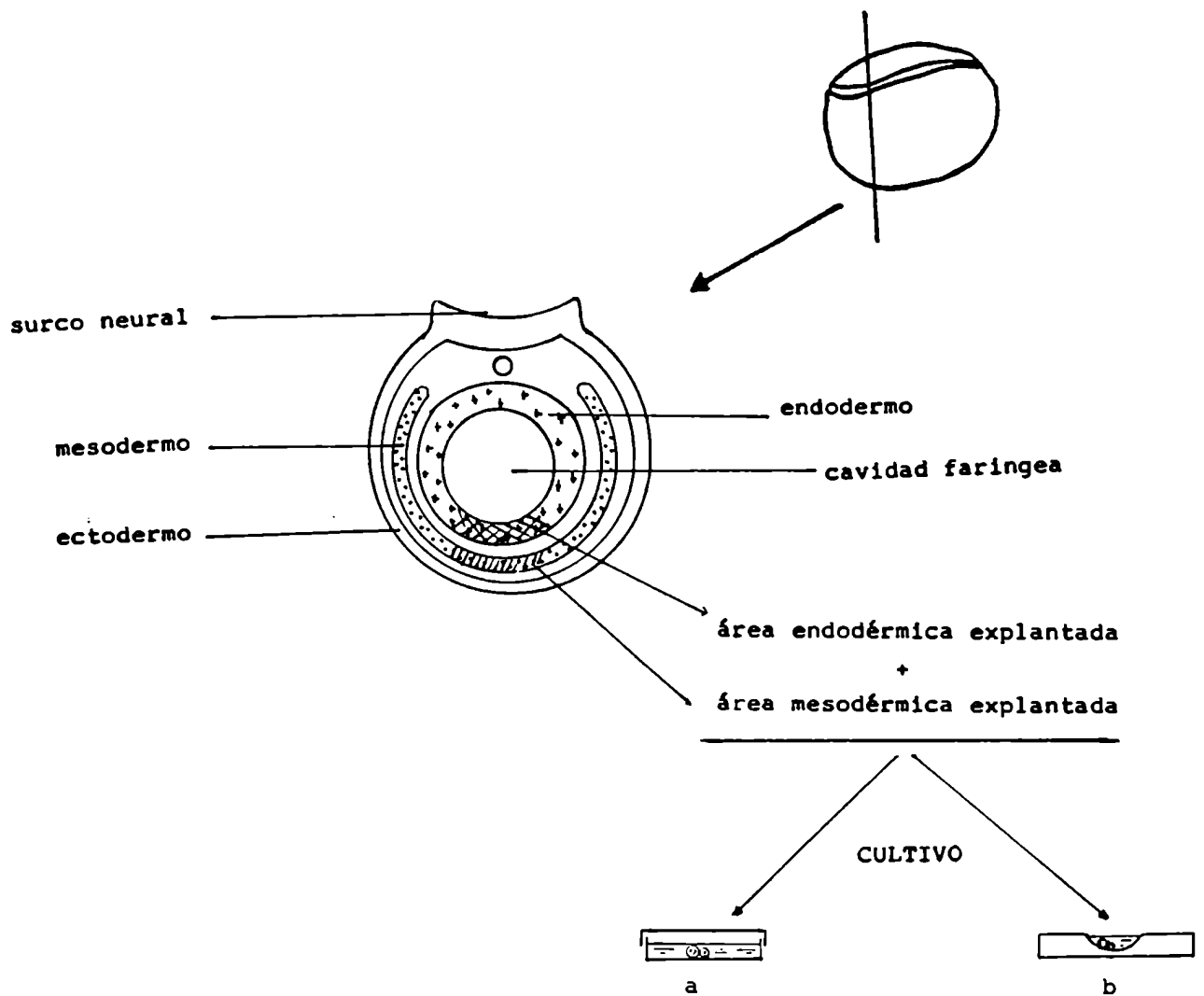


Fig. 1: Representación esquemática de la metodología utilizada al cultivar mesodermo presuntivo cardíaco junto con endodermo de la región anterior. a: en cápsula de Petri; b: en gota pendiente.

tivo es la misma de los casos ya descritos (2.2.5).

2.2.8. Cultivo in vitro de mesodermo presuntivo cardíaco en contacto con endodermo anterior de embriones en distintos estadios del desarrollo.

Con el objeto de comprobar si la acción inductora del endodermo es privativa de un determinado estadio del desarrollo embrionario o bien si el endodermo de embriones en distintos estadios tiene un mismo efecto sobre el mesodermo presuntivo cardíaco, hemos cultivado porciones de endodermo de la región anterior de embriones en sucesivos estadios del desarrollo, en contacto con el mesodermo presuntivo cardíaco explantado de embriones en estadio de surco neural (fig. 2). La metodología es similar a la descrita en puntos anteriores.

2.2.9. Medios condicionados

Con el objeto de conocer si la acción inductora del endodermo se verifica a través del íntimo contacto entre inductor y territorio competente o bien si el inductor libera sustancias difusibles al medio, que actuarían a nivel del territorio competente, hemos realizado una serie de ensayos utilizando la metodología propuesta por Niu y Twitty (1953) denominada "medios condicionados". Consiste en cultivar mesodermo presuntivo cardíaco de embriones en estadio de surco neural, en presencia (pero no en contacto) de endodermo anterior de otros embriones en el mismo estadio. El cultivo se realizó en "gota pendiente" siguiendo los lineamientos generales ya descritos. En otra serie de ensayos se introdujo una modificación a la metodología que consistió en cultivar el endodermo por 4 días, luego retirarlo y cultivar en la misma solución salina, el mesodermo presuntivo cardíaco.

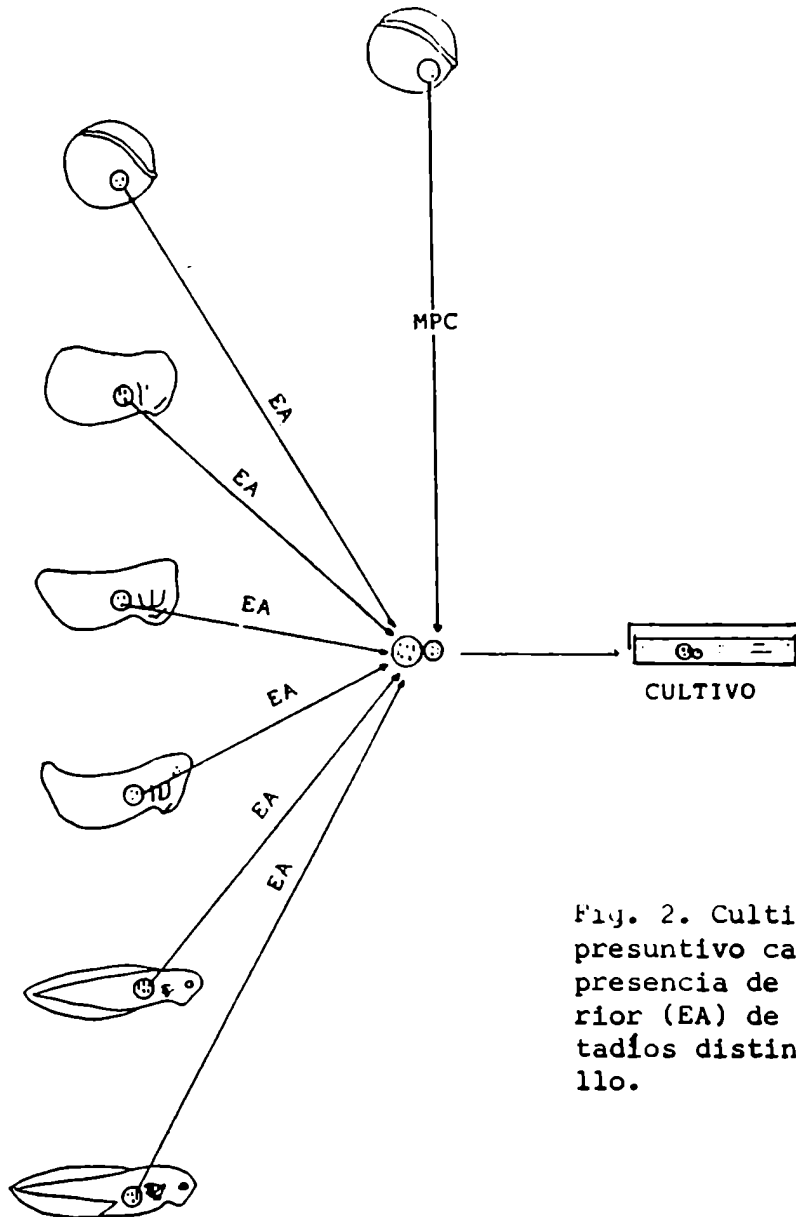


Fig. 2. Cultivo de mesodermo presuntivo cardíaco (MPC) en presencia de endodermo anterior (EA) de embriones en estadios distintos de desarrollo.

2.2.10. Regeneración: explantes.

Con el objeto de reconocer eventuales procesos de regeneración del esbozo cardíaco de Bufo arenarum, hemos realizado una serie de ensayos en los cuales hemos explantado el área cardíaca de embriones en estadio de botón caudal, respuesta muscular y latido cardíaco.

Básicamente se realizaron dos tipos de ensayos: en un primer grupo experimental, se explantó el mesodermo cardíaco solo, tratando de no dañar el endodermo ubicado inmediatamente por encima. En el segundo grupo experimental, el explante interesó tanto el mesodermo cardíaco como el endodermo anterior. En los dos casos los explantes se realizaron en solución salina de Holtfreter madre estéril y al cerrar la herida, los embriones eran trasladados a solución Holtfreter standard estéril. Se fijaron algunos embriones operados de ambos grupos a las dos horas del cierre de la herida, elegidos al azar y también controles a fin de confirmar la extensión del explante, es decir si el área explantada interesó sólo el mesodermo cardíaco o bien si se había explantado el mesodermo cardíaco junto con endodermo adyacente.

2.2.11. Trasplantes

En el caso de los explantes mencionados en el punto anterior, el esbozo cardíaco explantado de embriones en estadio de botón caudal, fué trasplantado en el área ventral de otro embrión del mismo estadio.

Para la realización de los trasplantes, los embriones receptores fueron ubicados en apropiadas cavidades practicadas en el fondo de cápsulas de parafina negra, de modo tal que quedara accesible el área ventral posterior del embrión que debía recibir el trasplante. En esta área, con el auxilio de una aguja de Spemann, se introducía el material animal a trasplantar, es decir el esbozo cardíaco. Se trataba luego de cerrar la herida con puentes y manubrios de vidrio. El trasplante se realizó en solución salina de Holtfreter madre estéril y, al ce-

rrar la herida, los embriones se trasladaron a cápsulas de Petri con solución salina de Holtfreter standard estéril que se renovaba diariamente.

TERCERA PARTE

RESULTADOS

3.1. Observaciones descriptivas

El análisis descriptivo de los procesos que se verifican durante el desarrollo del corazón de Bufo arena-rum, no había sido realizado hasta el momento y por lo tanto, a los efectos de tener un parámetro valedero para la interpretación de los resultados experimentales tuvimos que realizar un estudio inherente al desarrollo del corazón desde el estadio de placa neural, hasta el comienzo de las etapas larvales. El estadio de placa neural representa una fase embrionaria muy adecuada para nuestro estudio, dado que permite localizar el mesodermo presuntivo cardíaco en un periodo temprano de la organogénesis.

- Estadio 13 (Placa neural). La morfología interna que presentan los embriones al inicio de este estadio no es análoga a la que ofrecen los embriones próximos a alcanzar el estadio subsiguiente, es decir el de surco neural. En efecto, un corte transversal de los primeros demuestra que a nivel del futuro esbozo cardíaco, las láminas laterales mesodérmicas, si bien durante los procesos de gastrulación han podido avanzar desde el blastoporo hacia la región anterior entre ecto y endodermo, no han migrado todavía hacia la línea media ventral (fig. 3). Cabe señalar que en cada lámina mesodérmica, biestratificada y rica en plaquetas vitelinas, no se reconoce aún la somatopleura y la esplacnopleura. El análisis de cortes histológicos de embriones en estadio casi terminal de placa neural, constata, en cambio, que las láminas laterales mesodérmicas se han extendido y fusionado en la línea media ventral; sin embargo, aún no hay indicios de diferenciación de estructuras cardíacas (fig. 4).

- Estadios 14 - 15 (Surco neural, Rotación). La néurula pierde su forma subsférica y se alarga; estos movimientos involucran a las tres hojas embrionarias. En el mesodermo, a nivel del futuro esbozo cardíaco, los dos estratos celulares que lo componen se encuentran separados por una reducida hendidura que durante el ulterior desarrollo se tornará más amplia, ubicando a la somatopleura más externamente y a la esplac-

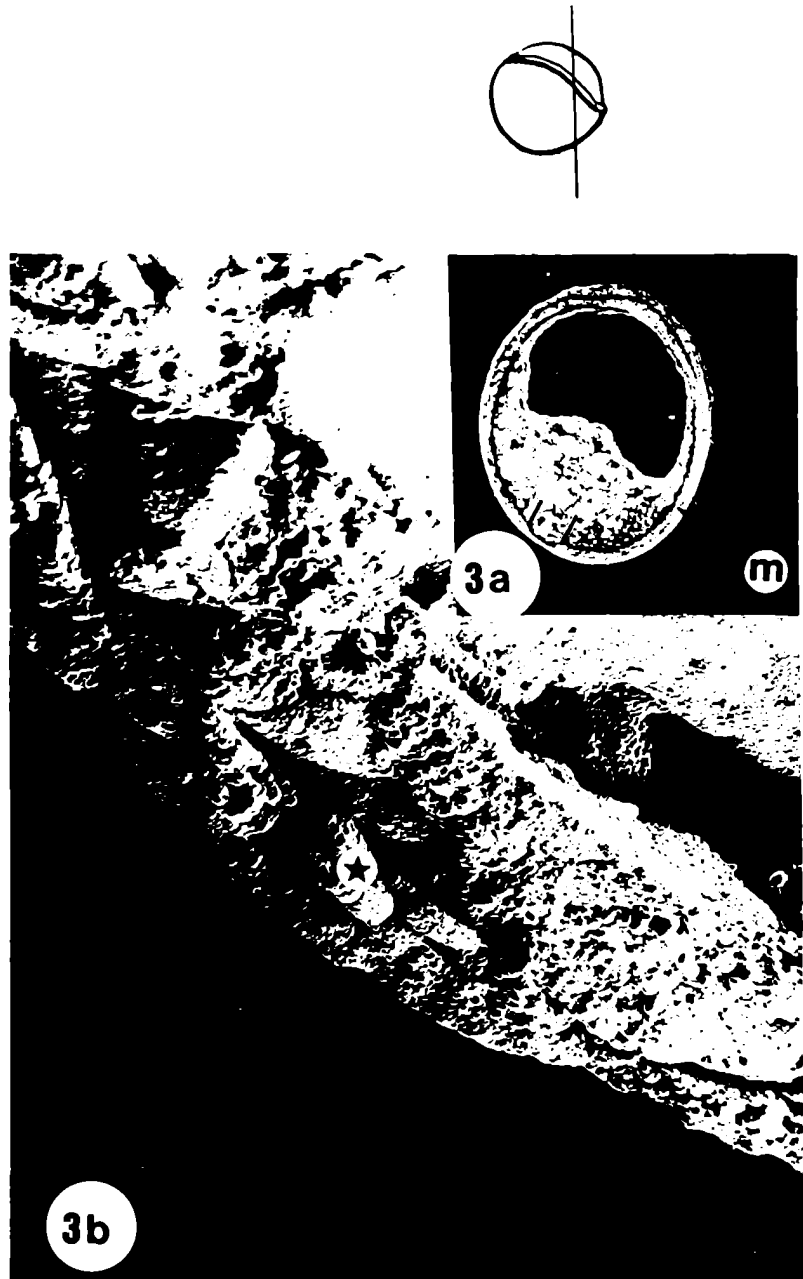


Fig. 3. Corte transversal de placa neural temprana (estadio 13) de B. arenarum. 3a. Se observa que el mesodermo de las dos láminas laterales no se ha fusionado en la línea media ventral, quedando libre una zona. Las líneas indican el margen. m = mesodermo. x 50. 3b. Detalle de una lámina lateral mesodérmica (★) ubicada entre ecto y endodermo. SEM. x 300.

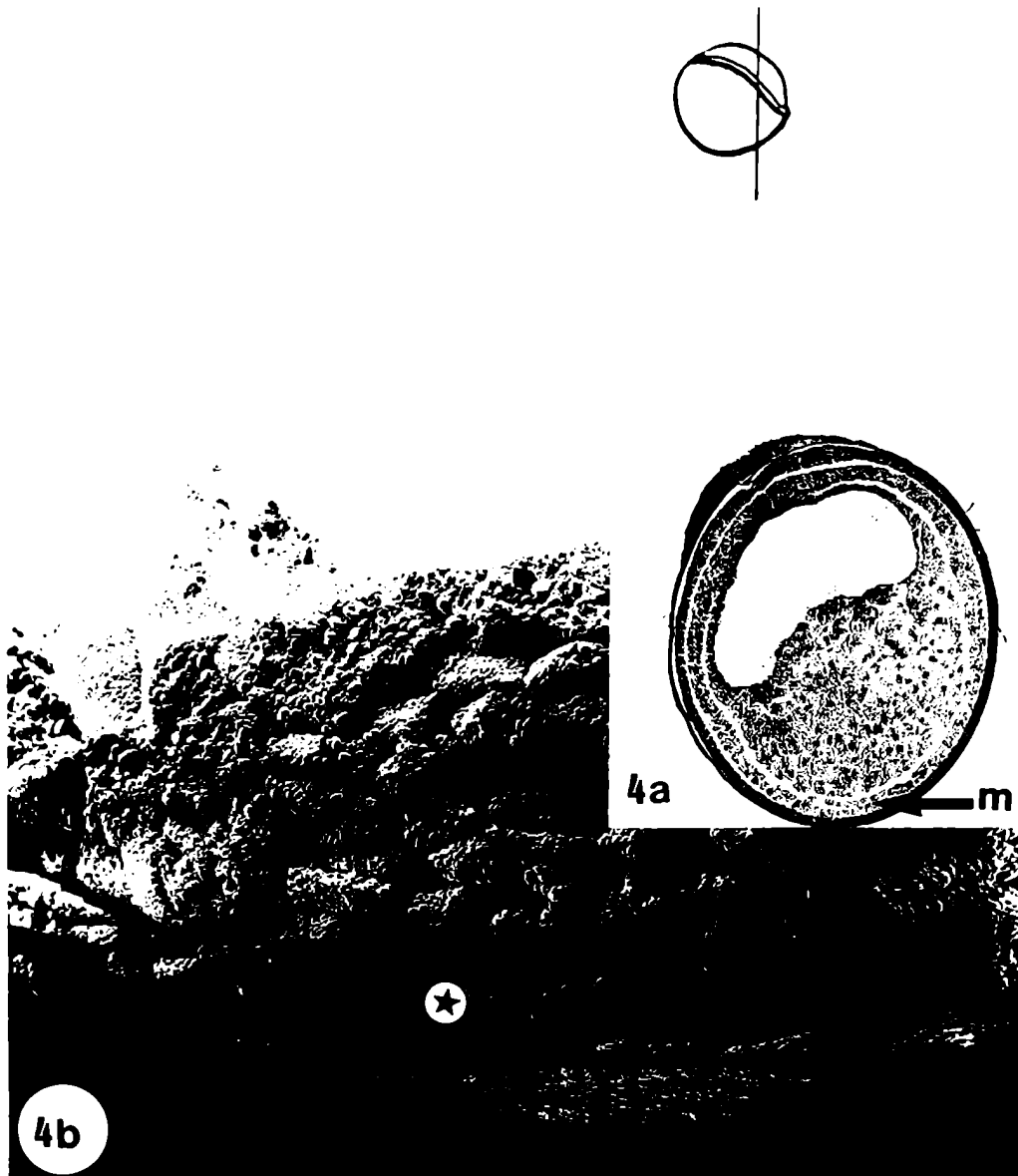


Fig. 4. Corte transversal de placa neural tardía (estado 13) de B. arenarum. 4a. El mesodermo de las láminas laterales se ha fusionado en la línea media ventral. m = mesodermo. x 80. 4b. Detalle del área ventral, se observa que el mesodermo forma un estrato continuo (★). SEM. x 250.

nopleura en posiciones más internas.

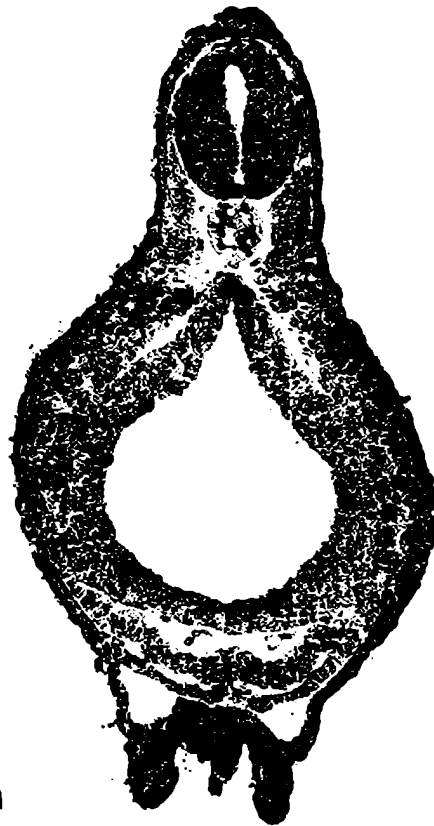
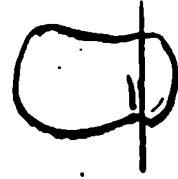
- Estadios 16 - 17 (Tubo neural, Brote caudal). Durante el desarrollo de estos estadios embrionarios se verifica una diferenciación morfológica en el mesodermo a nivel del área cardíaca; en efecto, la inicial separación entre esplacno y somatopleura aumenta todavía más. Este espacio constituirá la cavidad pericárdica, limitada dorsalmente por la esplacnopleura (que dará lugar al miocardio). Se verifican además, diferencias citológicas entre las dos láminas mesodérmicas: la esplacnopleura, que a este nivel también se denomina "lámina pre-miocardial", adquiere un aspecto característico por las células de forma piramidal, altas y de núcleos alternados (fig. 5), que la diferencian de las regiones circundantes. La somatopleura, a nivel cardíaco, no sufre, citológicamente, modificaciones significativas dado que sus células quedan de forma cuboide.

Al promediar el estadio de tubo neural, un grupo celular de origen mesodérmico se ubica entre el mesodermo pre-miocrdico y el endodermo anterior; representa el origen del endocardio, más específicamente el revestimiento endotelial de las cavidades del corazón. Cuando inicia el estadio de brote caudal, las células endocárdicas se agrupan en forma de pequeños túbulos. (fig. 6).

Los cortes histológicos, tanto de embriones en estadio de tubo neural, como así también de brote caudal, tratados con azul de bromofenol-mercurio o bien con la reacción de PAS, adquieren una intensa coloración azul en el primer caso y magenta en el segundo. Estos cuadros cromáticos se deben a la presencia de numerosas plaquetas vitelinas que al mostrar avidez por los colorantes usados, indicarían su riqueza en proteínas y carbohidratos.

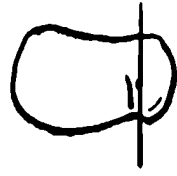
Cabe señalar que la matriz celular muestra una débil reacción para proteínas y carbohidratos; por otra parte, el alcian blue, en los márgenes de pH en los que ha sido empleado, no constata presencia de mucopolisacáridos.

- Estadio 18 (Respuesta muscular). Los cortes histológicos a nivel del esbozo cardíaco muestran un par-



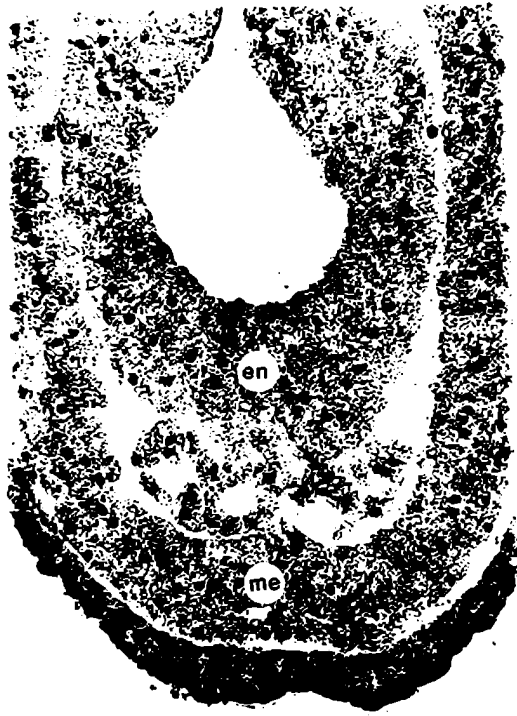
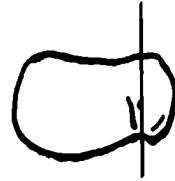
5a

Fig. 5a. Corte transversal de botón caudal de B. arenarum. Se observa un grupo de células endocárdicas inmediatamente por encima de la esplacnopleura (más interna) y somatopleura (más externa) separadas por una incipiente cavidad celómica. x 100.



5b

Fig. 5b. Idem 5a. Mayor aumento. El grupo de células endocárdicas forma pequeños túbulos (flechas) limitados dorsalmente por el endodermo y ventralmente por el mesodermo esplácnico. x 250.



6

Fig. 6. Corte transversal de un embrión de B. arena-
rum en estado de Botón Caudal. Detalle de túbulos
endocárdicos entre endodermo (en) y mesodérmo cardía
co (me). x 250.

ticular y significativo movimiento del mesodermo pre-miocárdico que sufre un repliegue. Debido a esta nueva disposición morfológica se formará un canal abierto dorsalmente, en cuya luz se encuentran células endocárdicas que se ordenan en túbulo (fig. 7). Al promediar este estadio, el movimiento de repliegue del mesodermo pre-miocárdico avanza de modo tal que los bordes del canal abierto llegan casi a unirse dorsalmente a las células endocárdicas y por debajo del endodermo faríngeo (fig. 8). La unión de los bordes libres del canal favorece la formación de un mesocardio dorsal cuya vida es efímera (fig. 8).

Al finalizar el estadio de respuesta muscular el corazón se presenta como un tubo recto, compuesto por tres láminas concéntricas mesodérmicas: el endocardio, se dispone más internamente, el pericardio más externamente y entre las dos el miocardio (fig. 9).

- Estadio 19 (Latido cardíaco). En este estadio los plegamientos del tubo cardíaco terminan luego de haber proporcionado al corazón su forma característica. Inicialmente se verifica un plegamiento del tubo hacia la derecha el que, en etapas sucesivas, se repliega hacia arriba y adelante. Al completar el movimiento que coincide con la finalización de este estadio, en el corazón que se presenta en forma de "S", se caracterizan cuatro regiones: anteriormente, el cono arterial en continuidad con la aorta ventral; le sigue el ventrículo que se diferencia en el sitio en donde se ha verificado la primera inflexión, resultando la cámara más voluminosa y todavía ubicada en posición lateral con respecto al eje longitudinal del embrión (fig. 10, 11) integra el tubo cardíaco, el atrio que termina en el seno venoso en continuidad con las venas vitelinas.

El análisis histológico demuestra una significativa disminución, en que al volumen se refiere, de las células miocárdicas que se tornan cuboides y con núcleo central (fig. 12). También disminuye significativamente el número de las plaquetas vitelinas y se verifica, a medida que ocurren los procesos morfológicos, un paulatino aumento de intensidad de la coloración de la matriz celular, en presencia de azul de bromo-



7

Fig. 7. Corte transversal de un embrión de E. arena-
rum en estadio de respuesta muscular. Un movimiento
particular del mesodermo cardíaco forma un canal en
donde se ubican las células endocárdicas. x 100.



Fig. 8. Corte transversal de un embrión de B. arena- rum en estadio de respuesta muscular. El mesodermo se ha plegado circundando a las células endocárdicas dispuestas en túbulo. Las flechas indican la cavidad pericárdica. x 250.



9a

Fig. 9a. Corte transversal de un embrión de B. arena-rum al finalizar el estadio de respuesta muscular. El corazón se presenta como un tubo recto compuesto por tres láminas mesodérmicas concéntricas. x 100.

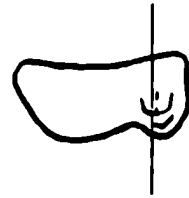
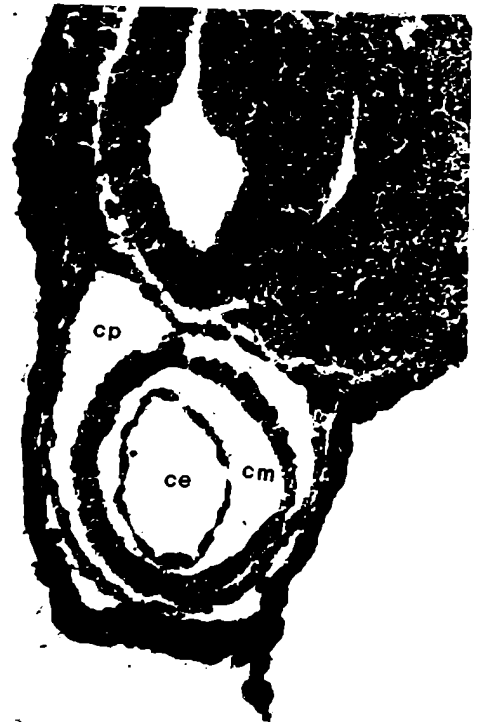


Fig. 9b. Idem fig. 9a. Mayor aumento. cp: cavidad pericárdica; cm: cavidad miocárdica; ce: cavidad endocárdica. x 250.



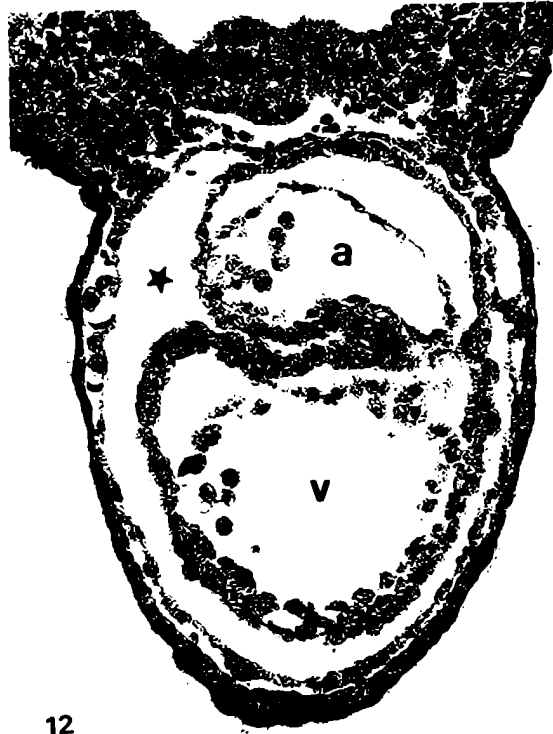
9b



Fig. 10. Embrión de Bufo arenarum en estado de latido cardíaco, se ha quitado el ectodermo de la región ventral y el pericardio para poder apreciar el ventrículo (v) orientado a la derecha. co: cavidad oral; b: branquias en desarrollo; e: endodermo de la región media. SEM. x 150.



Fig. 11. Embrión de Bufo arenarum en estadio de latido cardíaco. Idem fig. 10. a mayor aumento. Se aprecian las células miocárdicas a nivel del ventrículo (v). e = endodermo de la región media. SEM. x 450.



12

Fig. 12. Corte transversal de un embrión de B. arenarum en estadio de latido cardíaco. Se aprecia el ventrículo (v), el atrio (a) y la cavidad pericárdica (★). x 250.

fenol o con el método de PAS.

El material amorfo que la cavidad miocárdica contiene, se tiñe moderadamente con el Alcian blue a pH 2.5, lo que revelaría la presencia de mucopolisacáridos sulfatados. La distribución de esta reacción histoquímica aparece homogéneamente a lo largo de todo el tubo cardíaco.

- Estadíos 20 - 21 - 22 (Circulación branquial, Boca abierta, Circulación en la aleta caudal). Las cavidades del corazón en estos estadíos son bastante evidentes y un corte histológico transversal demuestra que una abertura comunica el ventrículo con la aurícula. Células tanto miocárdicas como endocárdicas se ubican en la abertura y constituyen los esbozos de las válvulas atrioventriculares (fig. 13).

Al promediar el estadío 21, las células miocárdicas pierden su aspecto en empalizada y adquieren una forma subesférica con un núcleo relativamente voluminoso ubicado en el centro; por otra parte, desde estas células se proyectan algunas prolongaciones citoplasmáticas.

El análisis histológico de embriones en estadío 21 y 22 (boca abierta y circulación en la aleta de la cola), demuestra que en la pared ventricular se han formado grupos de células miocárdicas que se proyectan hacia la cavidad y que representan el comienzo de la formación de los tabiques ventriculares (fig. 14).

En estos dos últimos estadíos además, la matriz extracelular ubicada entre endocardio y miocardio se tiñe con alcian blue a pH 2.5, todavía más que en los estadíos anteriores; no obstante, la coloración no es homogénea, sino que aparece con mayor intensidad a nivel del cono arterial, del seno venoso y del canal aurículoventricular (fig. 15 y 16), mientras que las paredes ventriculares no muestran o muestran muy escasa afinidad para el colorante empleado.

Según nuestros resultados, en Bufo arenarum, al igual que en Vertebrados superiores, algunas células mesenquimáticas se ordenan por migración entre la aurícula y el ventrículo, dividiendo el canal aurículoventricular en dos par-

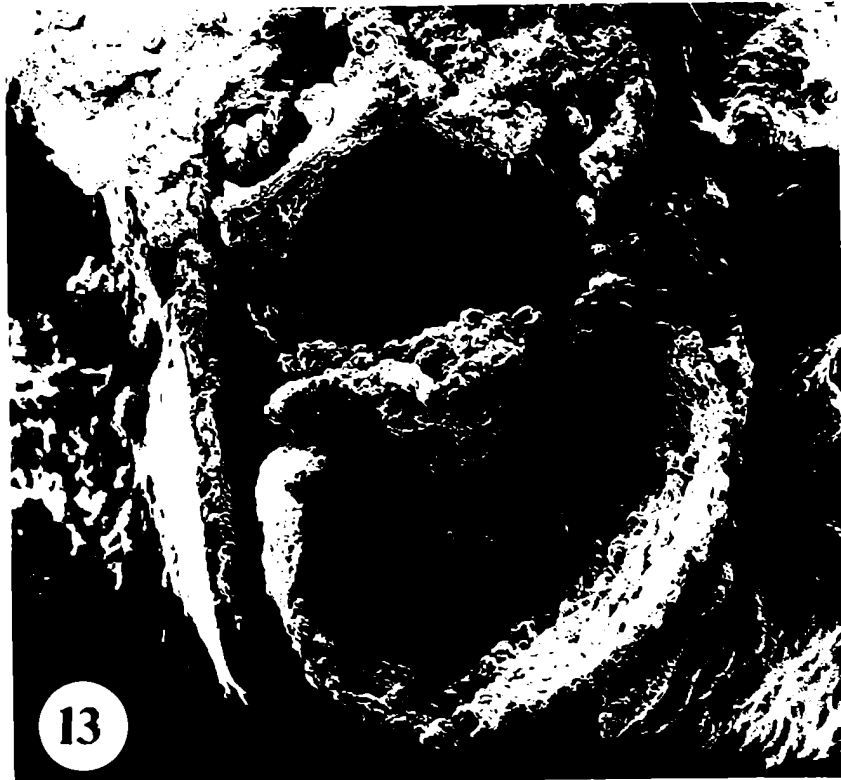
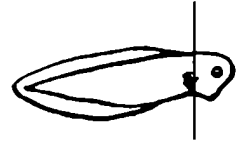
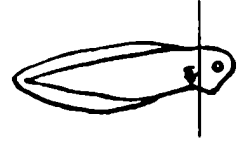
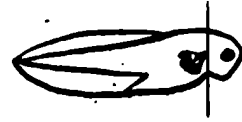


Fig. 13. Corte transversal de un embrión de B. arenarum en estadio de circulación branquial. Se observa el ventrículo, el atrio y el canal atrioventricular. SEM. x 200.



14

Fig. 14. Corte transversal de un embrión de B. arena-rum en estadio de boca abierta. Se evidencian, en la pared ventricular, grupos de células miocárdicas que representan el comienzo de la formación de los tabiques ventriculares (flechas); la coloración de azul de bromofenol-mercurio es intensa a nivel de las plaquetas vitelinas. x 312.



15. Fig. 15. Corte transversal de un embrión de Bufo arenarum en estadio de circulación branquial. La coloración con Alcian blue a pH 2.5 se hace evidente entre endocardio (e) y miocardio (m) a nivel del canal auriculoventricular. Alcian blue pH 2.5/ rojo neutro. x 250.



Fig. 16. Corte transversal de un embrión de Bufo arenarum en estado de circulación branquial. Al igual que en la fig. 13, la coloración con Alcian blue a pH 2.5 se limita al espacio entre endocardio (e) y miocardio (m). Alcian blue pH 2.5/ rojo neutro. x 250.

tes, lo que concuerda con lo señalado por Markwald *et al.* (1978) en aves. Esta diferenciación se verificaría en presencia de un alto contenido de glicosaminoglicanos.

Cabe señalar que el tratamiento de los cortes con hialuronidasa, previo a la reacción con alcian blue a pH 2.5, disminuye notablemente la coloración, en modo particular a nivel del tronco arterial y del seno venoso; persiste una débil coloración a lo largo de la lámina basal del endocardio. Por otra parte a nivel del canal aurículoventricular, la escasa disminución de la coloración demostraría que existen mucosustancias resistentes a la enzima empleada.

Las plaquetas vitelinas, en escasa cantidad, se colorean con azul de bromofenol-mercurio y débilmente con PAS (fig. 17). Con alcian blue a pH 1.0 no se verifican reacciones significativas.

- Estadíos 23 - 24 - 25 (Pliegue opercular, Opérculo cerrado en el lado derecho, Opérculo completo). Las paredes del ventrículo y de las aurículas se encuentran formadas por dos o tres láminas celulares y presentan trabéculas extensas.

El endocardio se adosa a la cara interna del miocardio, reduciendo en gran medida el área ocupada por la gelatina cardíaca. Tanto la matriz celular del miocardio como así también la del endocardio, muestran una intensa afinidad por la reacción de PAS o el azul de bromofenol.

Las plaquetas vitelinas, en escasa cantidad y de reducido volumen, se colorean débilmente con las reacciones de caracterización empleadas.

En la matriz extracelular los mucopolisacáridos reaccionan con el alcian blue a pH 2.5, verificándose una intensa y específica coloración. De modo análogo a lo que sucede en estadíos embrionarios anteriores, ésta se produce a nivel del tronco arterial y de las válvulas cardíacas. Cabe señalar que a partir del estadio 24 (opérculo derecho cerrado) el alcian blue marca, en la cara interna de las trabéculas ventriculares, una línea continua de coloración que se intensifica en el estadio sucesivo (estadio 25).

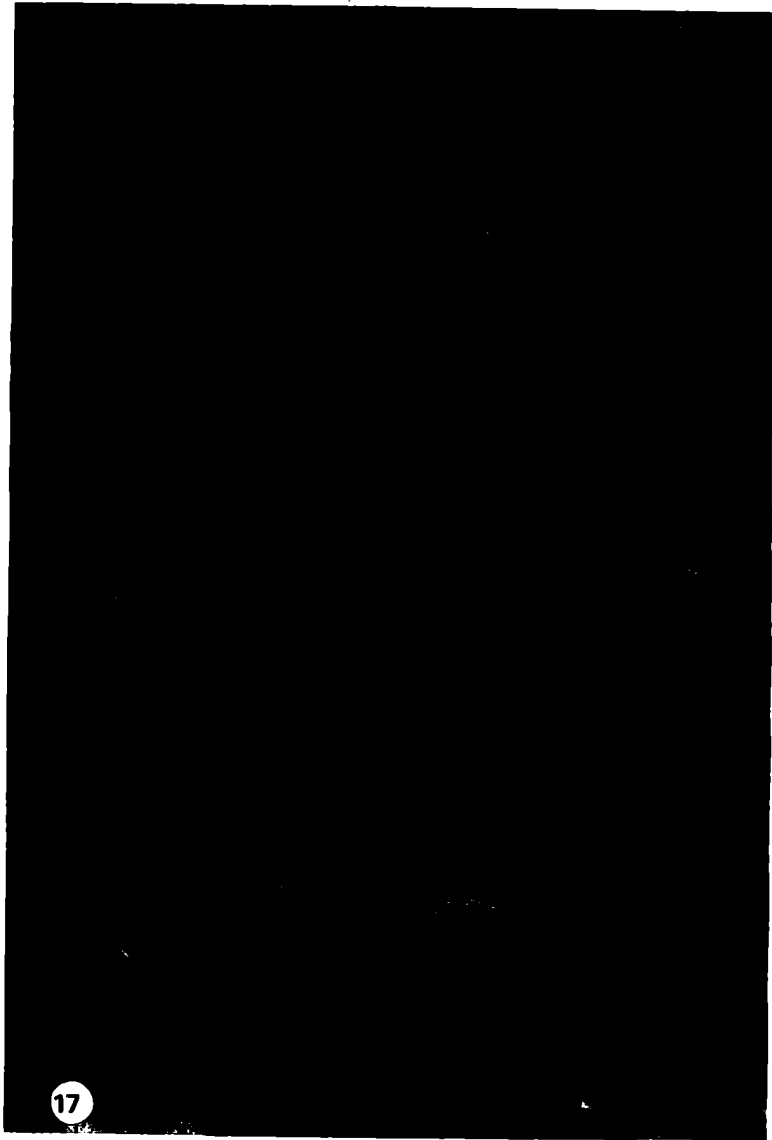


Fig. 17. Corte transversal de un embrión de Bufo arenarum en estadio de circulación en la aleta de la cola. Se observan proyecciones de la pared miocárdica hacia la luz del tubo (*); la coloración con azul de bromofenol-mercurio es intensa en los núcleos y débil en las plaquetas vitelinas (flechas). x 800.

En estos estadios el tratamiento con hialuronidasa, previo a la reacción con alcian blue pH 2.5. reduce notablemente la coloración, tanto a nivel del tronco arterial como a nivel de las válvulas cardíacas. Luego del tratamiento enzimático, las trabéculas ventriculares no muestran ninguna reacción (ver tabla I).

TABLA 1. Resumen de las reacciones histoquímicas durante el desarrollo cardíaco de Bufo arenarum.

estadios	17-18	19-20	21-22	23-24	25
plaquetas vitelinas					
Azul de bromo-fenol-mercuro	++	+	+	+-	--
Ac. peryodico-Schiff	++	++	+	+-	--
Alcian blue (pH 2.5)	--	--	--	--	--
Alcian blue (pH 1.0)	--	--	--	--	--
matriz citoplasmática de células miocárdicas					
Azul de bromo-fenol-mercuro	--	+-	+	++	++
Ac. peryodico-Schiff	+-	+-	+	+	+
Alcian blue (pH 2.5)	--	--	--	--	--
Alcian blue (pH 1.0)	--	--	--	--	--
espacio endocárdico-miocárdico					
Azul de bromo-fenol-mercuro	--	--	--	--	--
Ac. peryodico-Schiff	--	--	--	--	--
Alcian blue (pH 2.5)	--	+	+	++	++
Alcian blue (pH 1.0)	--	--	--	--	--

REFERENCIAS: ++, reacción intensa; +, reacción moderada; +-, reacción escasa; -- no hay reacción.

3. 2. Observaciones experimentales.

- Criterio adoptado para evaluar la diferenciación cardíaca.

Para evaluar la diferenciación cardíaca en embriones sometidos a explantes o trasplantes, se tuvo en cuenta, en primer lugar, la presencia de latidos cardíacos observables al microscopio binocular.

En Bufo arenarum los latidos cardíacos se manifiestan en el estadio 20 que los embriones mantenidos a temperatura de 22-23°C, alcanzan aproximadamente 96 hs después de la fertilización. Dado que en muchos casos experimentales se hacía dificultoso determinar con precisión el estadio de los embriones por las malformaciones que por lo menos externamente, pueden presentar, hemos considerado como positivos los casos en los que los latidos cardíacos se presentaban antes del séptimo día, es decir, cuando los controles habían superado el estadio de pliegue opercular y presentaban latidos rítmicos.

Por otra parte debe tenerse en cuenta que por la escasa diferenciación cardíaca, los latidos en la mayoría de los casos resultan muy débiles y difíciles de apreciar; por lo tanto ha sido preciso recurrir a la observación histológica para poder corroborar la diferenciación del tubo cardíaco y la presencia de elementos formes de la sangre, que demostrarían el funcionamiento del corazón y su participación en la circulación general del cuerpo.

La observación macroscópica y el análisis histológico utilizados comparativamente o en paralelo, proporcionan un fehaciente parámetro y permiten una interpretación coherente aún cuando se obtengan, a raíz de los explantes o trasplantes formas muy anómalas.

3.2.1. - Explante de todo el endodermo.

Según ha sido constatado, el explante de todo el endodermo de néurulas de Urodelos, efectuado en el

estadio de placa neural, no permitiría la diferenciación cardíaca (Balinsky, 1939; Jacobson, 1960). Con el objeto de comprobar si en Bufo arenarum se verificaran resultados similares, se realizaron explantes de endodermo en estadios de placa neural o surco neural, siguiendo la metodología señalada en la sección 2.2.1.

Si bien los embriones al desarrollarse presentan diferentes tipos de anomalías, consignamos que entre las más frecuentes se destacan procesos de hidropesía y un deficiente desarrollo o ausencia de las branquias.

De 42 embriones operados, sobrevivieron a la operación 31 ejemplares, sin embargo sólo 3 presentaron latidos cardíacos esporádicos; los restantes 28 embriones no presentaron latidos cardíacos por lo menos detectables a la observación macroscópica.

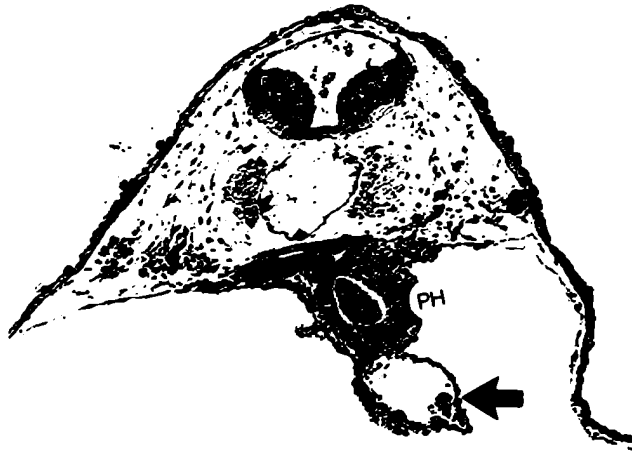
Cabe señalar que en algunos casos las escasas células endodérmicas que quedan luego del explante, tratan de organizarse a nivel de la faringe (fig.18); además, si bien con menor frecuencia, es posible que a niveles correspondientes a la ubicación del corazón, se forme un tubo de origen mesodérmico, de paredes unicelulares y sin elementos formes en su interior (fig. 18).

3.2.2. - Trasplante de endodermo.

El análisis de los procesos inductores que se verifican durante el desarrollo del corazón de Bufo arenarum, ha sido realizado utilizando, según se señaló en material y métodos, 3 tipos de trasplante de endodermo.

1) En la primera serie experimental, porciones de endodermo de la región "anterior" o faríngea de embriones en estadio de placa neural, se trasplantaron en la misma área de otros embriones, en el mismo estadio, con el objeto de descartar que las eventuales anomalías dependiesen de la metodología.

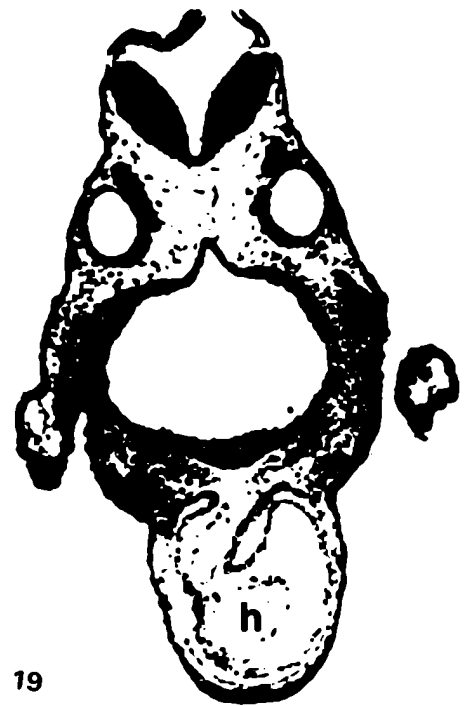
Los embriones no presentan, macroscópicamente, alteraciones de importancia, sólo se destaca un desigual desarrollo de las branquias externas. De los 30 embriones



(Fig. 18. Embrión de B. arenarum al que en estadios neurales se le explantó todo el endodermo. Restos de esta hoja embrionaria se han organizado a nivel de la faringe (ph). Flecha: corazón. x 125.

18

Fig. 19. Embrión normal (control) Corte transversal a nivel del corazón (h). ph: faringe. x 125.



19

que recibieron este tipo de trasplantes, 26 se desarrollaron hasta estadios avanzados y menos uno, todos presentaron latidos cardíacos (ver tabla II).

El análisis histológico revela que, en la mayoría de los casos, a pesar de verificarse una apreciable hipertrofia de la faringe, la diferenciación cardíaca es normal; en efecto sólo en pocos casos; el anómalo desarrollo de la faringe interfirió el plegamiento del tubo cardíaco con el resultado de una anómala disposición de las cavidades del corazón, sin afectar la diferenciación tisular.

2) En el segundo grupo experimental, endodermo de la región "media" de embriones en estadio de surco neural, fué trasplantado en el área faríngea de otros embriones del mismo estadio. De los 38 embriones operados, 25 lograron alcanzar estadios avanzados pero sólo 6 presentaron latidos cardíacos.

El estudio histológico de los embriones de este grupo experimental, pone en evidencia que, al igual que en el grupo anterior, la faringe se presenta hipertrófica y con elementos celulares amorfos en su interior (fig. 20).

Por otra parte 11 de los embriones presentaron elementos de origen mesodérmico, organizados a nivel del corazón, pero sólo 7 constituyeron un tubo cardíaco con participación en la circulación (fig. 20) y en la mayoría, el corazón estaba representado por un tubo de paredes pluricelulares. Debido a su estructuración resulta difícil sin embargo reconocer el ventrículo, las aurículas etc; la cavidad pericárdica es amplia, limitada por un pericardio monocelular que se adosa a la pared del cuerpo.

3) Los embriones del 3er. grupo experimental, que recibieron en el área faríngea el trasplante de endodermo "posterior" de otros embriones en estadio de surco neural, presentan anomalías externas análogas a las observadas en los embriones del grupo 1, es decir, hidropesía, escaso desarrollo de branquias, etc. Es de destacar que ningún embrión de este grupo, mostró latidos cardíacos (tabla II).

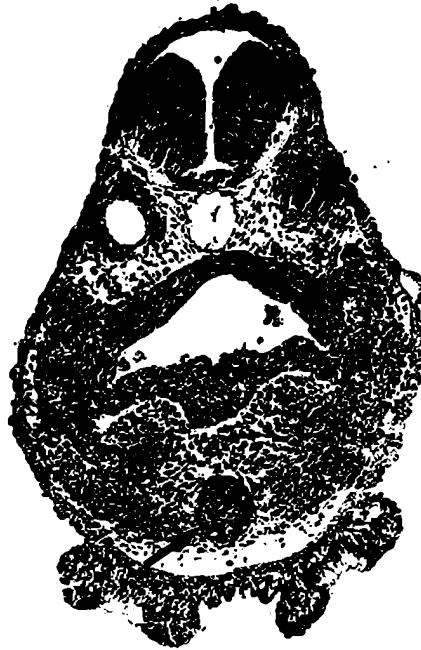
• 20



Fig. 20. Embrión de Bufo arenarum que recibió el trasplante, en el área faringea, de endodermo de la región media de otro embrión (ver texto). Se aprecia la faringe (ph), corazón (h) y pericardio (p) x 125.

Fig. 21. Embrión de Bufo arenarum que recibió el trasplante, en el área faringea, de endodermo de la región posterior de otro embrión (ver texto). La faringe se presenta hipertrófica (ph) y a nivel del área cardíaca no se verifica diferenciación del corazón (flecha). x 125.





22

Fig. 22. Embrión de Bufo arenarum del mismo grupo experimental de la figura 21. Se aprecia la faringe hipertrófica (ph) y una estructura tubular a nivel cardíaco pero sin diferenciación (flecha). x 125.

Trasplante	Nº operados	Sobre- vivientes	Con latido cardíaco	Con diferen- ciación car- diaca	Con circula- ción sangui- nea
Endodermo de la región faríngea	30	26	25	26	25
Endodermo de la región media	38	25	6	11	7
Endodermo de la región posterior	30	24	-	2	-

Tabla II. Resultados obtenidos al trasplantar endodermo de distintas áreas de embriones en estadio de surco neural, en el área faríngea de embriones en el mismo estadio.

La imagen histológica revela hipertrofia de la faringe y corrobora que no hubo diferenciación del corazón (fig. 21). En su lugar, se encuentran en la mayoría de los casos, numerosas células mesenquimáticas incapaces de ordenarse en estructuras que tengan un significado (fig. 21); sólo en algunos casos grupos de células mesodérmicas se ordenan en cordones más o menos irregulares (fig. 22).

3.2.3. - Cultivos in vitro. Medios salinos.

Los resultados de Jacobson y Duncan (1968), demuestran que el mesodermo presuntivo cardíaco de embriones de Ambystoma tigrinum (Urodela) según si ha sido mantenido en cultivo en el medio salino propuesto por Holtfreter o, respectivamente, en el de Niu y Twitty, ofrece un cuadro de desarrollo distinto. En base a estos resultados, hemos considerado oportuno antes de iniciar los ensayos, reconocer la solución salina más apropiada para la diferenciación cardíaca de Bufo arenarum. Nuestro análisis experimental se orientó al estudio del mesodermo presuntivo cardíaco (MPC) de embriones en estadios de placa neural, surco neural o rotación (estadios 13, 14 y 15) cultivado junto con el propio endodermo adyacente. En la figura 22a se esquematizan los resultados obtenidos usando respectivamente la solución de Holtfreter o la de Niu y Twitty.

En los grupos de ensayos en los que se utilizó la solución salina de Niu y Twitty pudimos comprobar (Fig. 22a) que resulta muy apropiada para la diferenciación del mesodermo presuntivo cardíaco aislado, tanto de embriones en estadio de placa neural, como así también de embriones en estadio de surco neural o de rotación. Se pudo apreciar además, que en estos casos no existen diferencias apreciables entre Holtfreter standard y Holtfreter madre las que, por otra parte, representan un medio salino de cultivo relativamente menos adecuado por lo menos para nuestros ensayos.

Debido a estos resultados hemos considerado oportuno realizar los ensayos experimentales utilizando co-

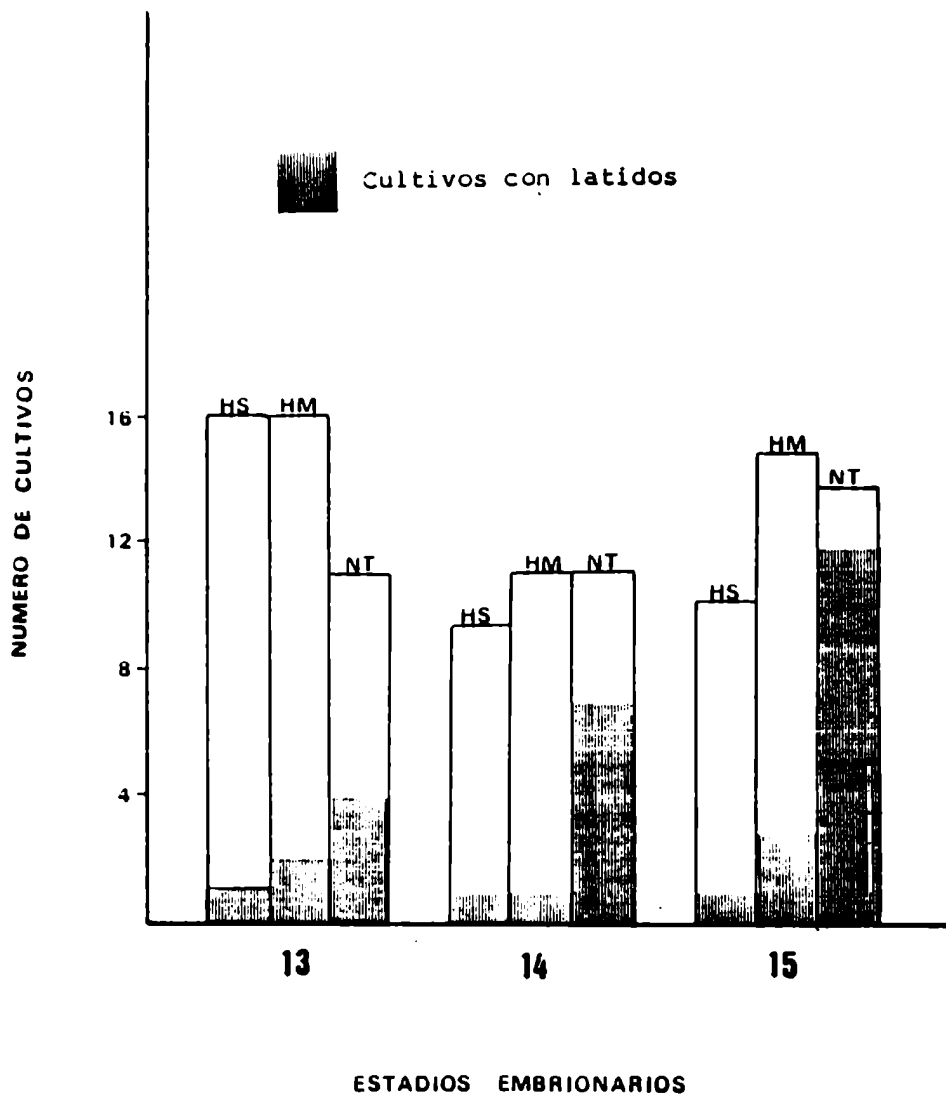


Fig. 22a. Resultados obtenidos de cultivos de mesodermo presuntivo cardíaco junto con endodermo anterior mantenidos en tres medios salinos distintos. HS: Holtfreter standard; HM: Holtfreter madre; NT: Niu-Twitty.

mo medio de cultivo la solución propuesta por Niu y Twitty.

3.2.4. Cultivo de mesodermo del área cardíaca explantado de distintos estadios de desarrollo.

Con el objeto de comprobar el grado de determinación del mesodermo cardíaco en diferentes etapas del desarrollo, es decir la capacidad de auto diferenciarse sin la intervención de otros territorios, hemos cultivado, en explante, mesodermo de áreas cardíacas de embriones en distintos estadios de desarrollo.

Según los resultados que hemos obtenido, el cultivo de mesodermo presuntivo cardíaco explantado de estadios neurales (placa neural, surco neural, rotación) al diferenciarse no presenta latidos cardíacos; en cambio, cuando el explante interesa mesodermo de embriones en estadio de botón caudal (fig. 23) un 30% (4/11, número de casos positivos/número total de explantes de este tipo) presenta contracciones rítmicas entre 5 y 6 días después de comenzado el cultivo. Cuando el mesodermo presuntivo cardíaco se explanta de estadios más avanzados, el porcentaje de casos positivos aumenta, mientras que disminuye el tiempo en que tardan en aparecer los latidos. En efecto, el 78% de los cultivos de mesodermo presuntivo explantado de embriones en estadio de respuesta muscular, presenta latidos al 2º día; en cambio en los cultivos de mesodermo cardíaco de embriones en estadio 18 (latido cardíaco), los latidos se manifiestan a las pocas horas.

Estos resultados permiten emitir la hipótesis que por lo menos en Bufo arenarum el mesodermo presuntivo del corazón se encuentra determinado al promediar el estadio de botón caudal (estadio 17) (fig. 6).

El análisis histológico de los cultivos no demuestra organización cardíaca cuando el territorio mesodérmico es explantado de estadios neurales o de botón caudal; en estos casos las células se suelen disponer en varios estratos o, lo que es más frecuente, se agrupan adquiriendo el conjunto for-

ma subesférica.

En cambio, si el explante del area en estudio se realiza en la etapa de respuesta muscular o en etapas más avanzadas, se organiza, al promediar el cultivo, una forma tubular hasta con plegamientos, pero sin la presencia de las típicas cavidades del corazón. Cabe señalar que la disposición tubular del corazón en el desarrollo normal, se verifica desde la respuesta muscular (ver 3.1.).

3.2.5. - Acción inductora del endodermo anterior.

Con el objeto de constatar la capacidad inductora del endodermo sobre la diferenciación del territorio cardíaco, se explantó el mesodermo del área cardíaca de embriones en distintos estadios de desarrollo y se lo mantuvo en cultivo in vitro junto con endodermo de áreas anteriores.

Señalamos que en el caso de embriones en estadio 13 (placa neural) las áreas explantadas corresponden a los bordes libres del mesodermo de las láminas laterales y respectivamente al endodermo de áreas dorsolaterales y laterales de la futura zona faríngea (fig. 3a y 3b). En estadios más adelantados, las áreas explantadas corresponden en cambio al mesodermo ubicado en el sitio definitivo de diferenciación del corazón y en lo que al endodermo se refiere al piso de la faringe (fig. 4a, 4b, 5 y 6).

El analisis comparativo de los resultados asigna a los explantes de areas cardíacas mesodérmicas pertenecientes a estadios de placa neural, escaso porcentaje de diferenciación cardíaca (2 casos positivos sobre 15 cultivos) mientras que en el estadio de surco neural constata un 50% de cultivos con latidos (tabla 3) y en el estadio de rotación determina que puede lograrse un 80% de casos de diferenciación cardíaca. Este ultimo porcentaje lo proporcionan también los cultivos de mesodermo de embriones de estadios más avanzados (tabla III).

ESTADIOS Embrionarios	MESODERMO CARDIACO			MESODERMO CARDIACO + ENDODERMO ANTERIOR		
	Número Casos	Casos Posit.	Porc %	Número Casos	Casos Posit.	Porc. %
13	14	0	0	15	2	13,3
14	12	0	0	16	8	50
15	15	1	6,6	15	12	80
16	19	0	0	16	12	75
17	11	4	36	13	11	85
18	14	11	78	13	11	85
19	12	11	91	9	8	89
20	15	13	86	12	0	83

TABLA III

Resumen de los resultados obtenidos cultivando mesodermo cardíaco solo y mesodermo cardíaco en presencia de endodermo circundante de embriones en distintos estadios de desarrollo.-

3.2.6. - Acción inductora de distintas áreas endodérmicas sobre la diferenciación cardíaca.

Con el objeto de verificar si las varias regiones endodérmicas son capaces de inducir la diferenciación cardíaca o si esta posibilidad se encuentra limitada sólo a la región anterior, se realizaron una serie de cultivos de mesodermo presuntivo cardíaco de embriones en estadio 14 (rotación), juntamente con endodermo explantado, respectivamente, de la región anterior, media o posterior de otros embriones del mismo estadio.

Según los resultados obtenidos, los cultivos de mesodermo presuntivo cardíaco en presencia de endodermo de la región más anterior, presentan contracciones rítmicas en un alto porcentaje (80%) corroborando lo que habíamos observado en experimentos anteriores (fig. 24). En cambio, cuando el mesodermo presuntivo cardíaco se mantiene en contacto con endodermo de áreas más posteriores, disminuye significativamente el número de cultivos que presentan latidos. Consignamos al respecto, por mayores detalles, que el mesodermo presuntivo cardíaco mantenido en cultivo en presencia de endodermo de la región media del embrión, presenta un 45% de casos con latidos; en cambio cuando el mesodermo presuntivo cardíaco se desarrolla en contacto con endodermo de regiones posteriores, la aparición de los latidos cardíacos es muy esporádica o nula.

En el análisis de los resultados de este tipo de cultivos, hemos tenido en cuenta también el tiempo transcurrido entre el momento en que se realiza el explante hasta el momento en que se visualizan los latidos. Los resultados, sintetizados en la figura 24, muestran que casi el 50% de los cultivos de mesodermo presuntivo cardíaco mantenido en contacto con endodermo anterior, manifiestan evidentes signos de latidos al tercer día después del explante, porcentaje que se eleva al 85%, a partir del 8º día del ensayo.

Cuando el mesodermo presuntivo cardíaco se cultiva en cambio con endodermo de la región media, en una

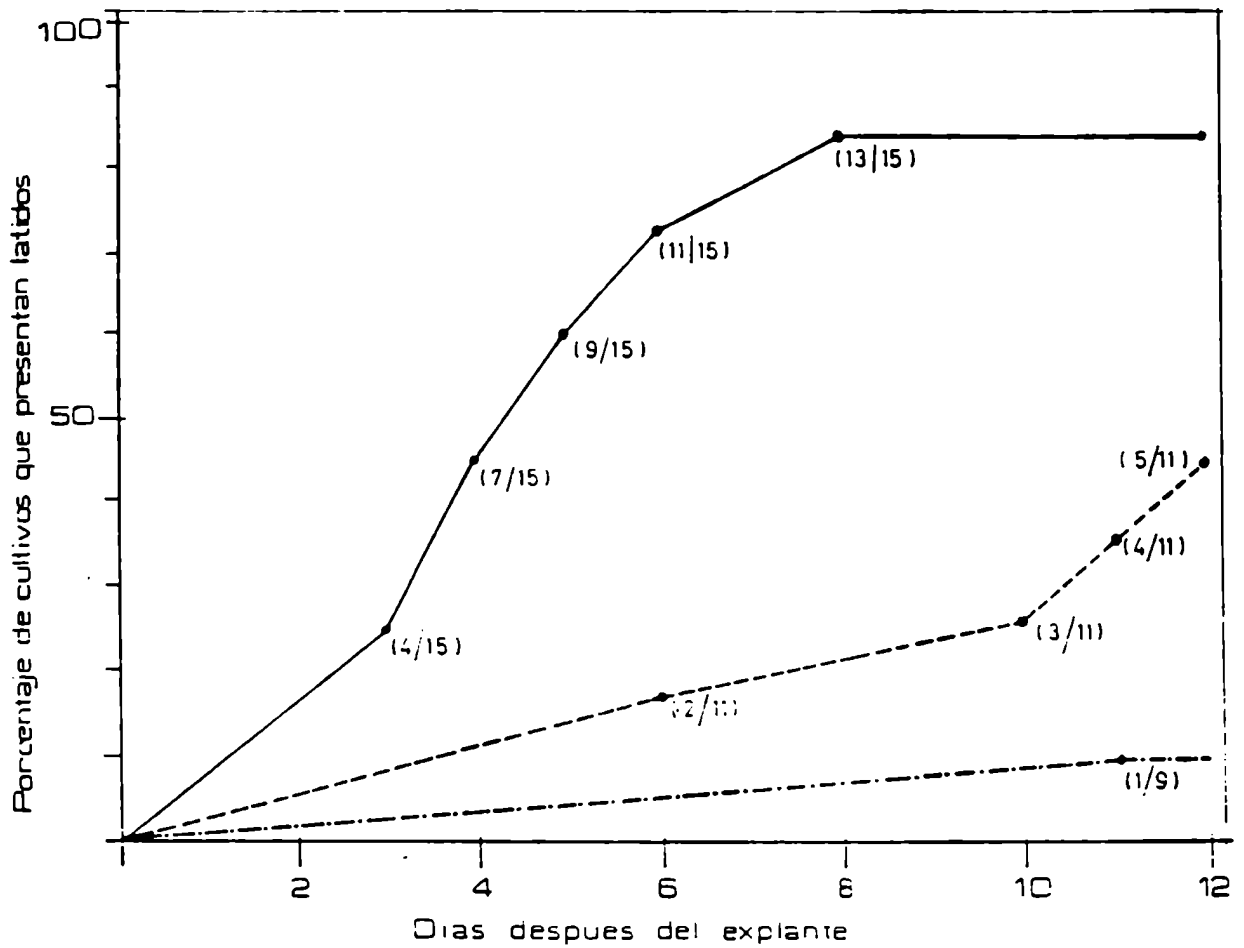


Fig 24 · Cultivos de mesodermo presuntivo cardíaco de néurulas en presencia de endodermo anterior (—), de la región media (---) y de la región posterior (-.-) de embriones del mismo estadio. Entre paréntesis : número de cultivos que presentan latidos/ número de cultivos realizados de cada tipo .-

muy escasa cantidad de casos los latidos aparecen alrededor del 6º día del ensayo; en otros se revelan más tardíamente, es decir, entre el 10º y 12º día (fig. 24).

3.2.7. - Acción inductora de endodermo de distintos estadios embrionarios.

Algunos resultados obtenidos por Jacobson (1961) explantando todo el endodermo de embriones de Taricha torosa (Urodela) en distintos estadios de desarrollo, demostrarían que hasta el estadio de botón caudal avanzado sería necesaria una estrecha asociación entre esta hoja y el esbozo cardíaco para que se desarrolle un corazón normal.

Sin embargo, estos datos no aclaran si el endodermo presenta la misma capacidad inductora durante todos los estadios embrionarios, o bien si se limita a los estadios neurales, es decir cuando se verifica la determinación del área cardíaca. Con el objeto de aclarar el interrogante, hemos tratado de ensayar la capacidad del endodermo para inducir la formación del corazón de Bufo arenarum en estadios distintos de desarrollo.

Técnicamente, se explantó el mesodermo presuntivo cardíaco de embriones en estadio 14 (surco neural) y se lo cultivó en contacto, respectivamente, con endodermo anterior de embriones en estadio 14 (surco neural) y sucesivos hasta el estadio 20 (circulación branquial) (fig. 2).

Los resultados obtenidos, resumidos en la tabla IV, demuestran que:

a) - el endodermo anterior (faríngeo) de embriones en estadio de surco neural (estadio 14) induce un elevado porcentaje de diferenciación cardíaca (el 80% de los cultivos).

b) - el endodermo anterior de embriones en estadio de rotación, o brote caudal, determina un muy escaso porcentaje de cultivos con latidos.

c) - el endodermo anterior de embriones en estadios de latido cardíaco o de circulación branquial muestra una muy débil o ninguna acción para la diferenciación del territorio car-

Endodermo explan- tado de estadio:	Número de cultivos reali- zados	Número de cul- tivos que presen- tan latidos	%
14 Surco Neural	5	4	80
15 Rotación	10	6	60
16 Tubo Neural	--	--	--
17 Botón Caudal	8	6	75
18 Respuesta Mus- cular	6	1	16
19 Latido Cardíaco	6	1	16
20 Circulación Branquial	5	0	0

TABLA IV. Resultados obtenidos al cultivar mesodermo pre-
suntivo cardíaco de embriones en estadio de sur-
co neural (estadio 14) en contacto con endoder-
mo anterior de embriones en distintos estadios
de desarrollo.

díaco.

3.2.8. - Medios condicionados.

Esta serie de ensayos tuvo por objeto reconocer si la acción inductora del endodermo sobre el mesodermo presuntivo cardíaco se verifica a expensas del íntimo contacto entre inductor (endodermo anterior) y territorio competente (mesodermo presuntivo cardíaco) o bien, si el inductor libera alguna sustancia o sustancias que difusas en el medio actúan a nivel del territorio competente.

La metodología empleada, descrita en el punto 2.2.8., está basada en la utilizada por Niu y Twitty (1953) para el estudio de la acción inductora del cordomesodermo sobre el ectodermo para la diferenciación del territorio neural.

Según los resultados que hemos obtenido, el mesodermo presuntivo cardíaco proveniente de embriones en estadio de tubo neural (estadio 15) cultivado en "presencia", pero no en "contacto", de endodermo de la región anterior de embriones en el mismo estadio, se diferencia y presenta latidos cardíacos en un 100% de los casos, lo que permite emitir la hipótesis de que el endodermo anterior ejercería su acción inductora a través de sustancias que difunden en el medio.

En otra serie de ensayos, y con el objeto de corroborar y aportar datos más fehacientes para la interpretación de estos últimos resultados obtenidos, se mantuvo en desarrollo durante 4 días endodermo de la región anterior de embriones en estadio de tubo neural; luego se retiró el tejido endodérmico y se puso en cultivo, en la misma solución salina, mesodermo presuntivo cardíaco de embriones que también habían logrado el mismo estadio de tubo neural. A partir del cuarto día del cultivo de mesodermo cardíaco, un 90% de los explantes presentaron latidos rítmicos. Se confirmaría por lo tanto la hipótesis de que el endodermo liberaría algún factor químico capaz de actuar como inductor para la diferenciación del mesodermo pre-

suntivo cardíaco.

Hay que aclarar que el experimento reviste ciertas dificultades técnicas dado que se precisa coordinar la presencia de embriones en estadio de tubo neural que proporcionarán el mesodermo cardíaco, con el momento en que, luego de 4 días, se retira de los cultivos el endodermo.

3.2.9. - Cultivos de explantes en "sandwich".

Los éxplantes en "sandwich", cierran con relativa facilidad sus bordes y forman casi siempre una estructura subesférica, más o menos voluminosa, cuyos movimientos giratorios se deben a la acción de cilias que se distribuyen como mechones en áreas celulares ectodérmicas.

Grupo 1. Incluye "sandwich" que corresponden al cultivo de mesodermo presuntivo cardíaco, junto con endodermo del área anterior (endodermo faringeo). En la mayoría de los casos, entre el tercer y cuarto día se manifiestan latidos cardíacos aunque con una frecuencia menor que la observada en embriones controles.

El análisis histológico demuestra células endodérmicas más o menos organizadas en tubos que, según suele ocurrir en muchos casos, presentan un típico aspecto epitelial (fig. 25). También se evidencian células mesodérmicas que consideramos las responsables de las contracciones.

Cabe señalar al respecto que los latidos cardíacos que se verifican en estas condiciones experimentales no parecen depender de estructuras cardíacas organizadas; sólo hemos encontrado células mesenquimáticas distribuidas al azar, que a veces, limitan cavidades más o menos amplias (fig. 26, 27).

Un caso interesante lo presentaron algunos cultivos en los que, por un crecimiento desproporcionado del ectodermo, se formó una acumulación celular que, a modo de barrera, se interpuso entre el endodermo y el mesodermo presuntivo cardíaco; no se presentaron latidos y el análisis histológico puso



Fig. 25. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". El endodermo se ha organizado en un tubo y sus células presentan apariencia epitelial (EN). El mesodermo se ha diferenciado en mesénquima (ME) que limita algunas cavidades. (flechas).

25

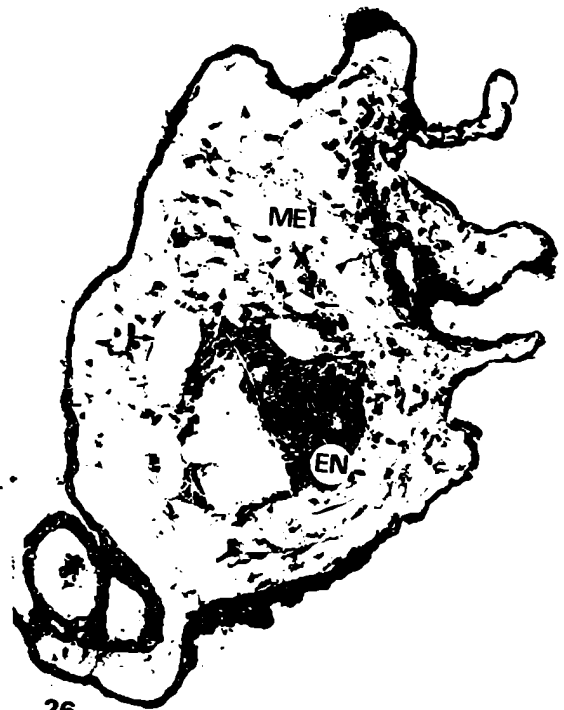


Fig. 26. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". Se aprecia el endodermo (EN) y las células mesenquimáticas (ME) rodeando cavidades de volumen distinto. (flechas).

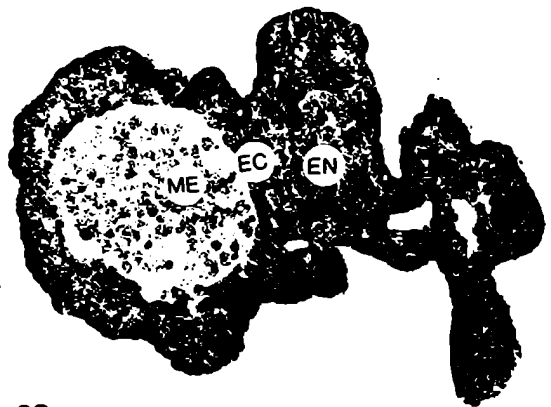
26



Fig. 27. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". Idem anterior. EN: endodermo. ME: mesodermo. Flechas: cavidades.

27

Fig. 28. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". El mesodermo (ME) ha quedado aislado del endodermo (EN) por una barrera de ectodermo (EC) y no presenta diferenciación.



28

en evidencia que las células mesodérmicas no habían sufrido diferenciación (fig. 28).

Consideramos de interés destacar que en el "sandwich" constituido por ectodermo banal y por mesodermo presuntivo cardíaco, no se verificaron latidos y que no ha sido posible reconocer histológicamente, diferenciación en las células mesodérmicas (fig. 29). Solo en un caso se verificó la formación de una cavidad amplia, limitada por una capa monocelular mesodérmica, análoga al peridardio; sin embargo las células mesodérmicas en el interior no presentaron diferenciación (fig. 30).

Grupo 2 y 3. Comprenden explantes en "sandwich" formados por la unión de mesodermo presuntivo cardíaco con endodermo de áreas medias o posteriores, respectivamente, del embrión. El análisis histológico demuestra presencia de células mesodérmicas que no se organizan en estructuras cardíacas y no se diferencian en células mesenquimáticas (fig. 31, 32). En ningún caso se manifestaron latidos cardíacos.

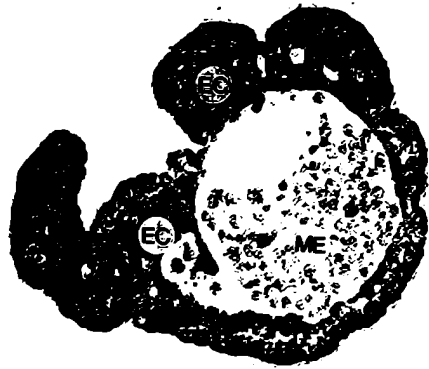
3.2.10. - Regeneración del esbozo cardíaco.

Basándonos en la constatación de que en Bufo arenarum el esbozo del corazón se diferencia morfofisiológicamente en el estadio de "botón caudal" (ver sección 3.1), hemos considerado oportuno realizar una serie de explantes y trasplantes de este esbozo, tanto aisladamente como así también junto con el endodermo faringeo, con el objeto de reconocer eventuales procesos de regeneración y/o de inducción. Los estadios operados abarcan los comprendidos entre "botón caudal" y "latido cardíaco".

A) Explantes.

a) Explante del esbozo cardíaco.

El explante que interesa solamente el esbozo cardíaco del estadio de "botón caudal" no parece causar daño al endodermo faringeo que, como lo demuestra la figura se man-



29

Fig. 29. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". Ectodermo banal (EC) y mesodermo (ME) no diferenciado.



Fig. 30. Grupo 1. Cultivo en "sandwich". Ectodermo (EC) y mesodermo (ME).

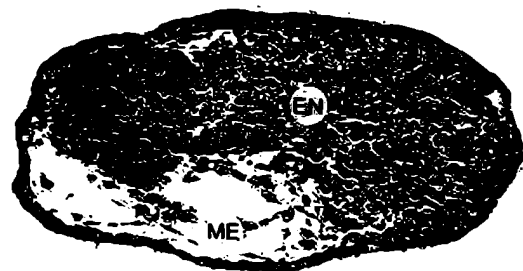
30



Fig. 31. Grupo 2. Cultivo en "sandwich". Endodermo (EN) y mesodermo (ME).

31

Fig. 32. Grupo 3. Cultivo en "sandwich". Endodermo (EN) y mesodermo (ME).



32

tiene intacto. En lo sucesivo y más precisamente a partir del cuarto día del explante, el 83 % de los embriones manifestaron latidos rítmicos (fig. 33, 34, 35).

La observación histológica corrobora la presencia de un corazón, variable en forma y volumen, que en la mayoría de los casos se encuentra representado por un tubo cardíaco replegado (fig. 36). Sus paredes son muy delgadas y a veces monoestratificadas. Además se aprecian algunos tabiques de fibras musculares que se orientan desde la periferia hacia el centro del tubo cardíaco. En el interior de estos imperfectos corazones, la presencia de elementos figurados de la sangre, permite emitir la hipótesis que el corazón regenerado participa en los procesos de circulación. Cabe destacarse que los glóbulos rojos, con núcleo voluminoso, no parecen diferir de los que se encuentran en los controles.

La posibilidad de regeneración del esbozo cardíaco en embriones en estadio de botón caudal, se pierde paulatinamente con el sucesivo desarrollo. En efecto, si a embriones en estadio de "respuesta muscular" se les explanta el esbozo cardíaco, sólo se regenera un tubo histológicamente poco diferenciado, dentro de una cavidad pericárdica bastante amplia, hidrópica. Si bien se manifiestan latidos rítmicos, cesan en poco tiempo y la larva no sobrevive (fig. 37).

Si el explante del esbozo cardíaco se realiza, en cambio, en embriones en estadio más avanzado como es el de "latido cardíaco", no se verifica regeneración. Los estadios larvales que en este último caso se desarrollan, presentan cuadros de hidropesía, malformaciones en las branquias, no muestran latidos y sobreviven poco tiempo.

El corte histológico en estos casos, demuestra, a nivel del área cardíaca, un grupo de células que no logra organizarse en tubo.

b) Explante de esbozo cardíaco junto con endodermo.



33

Fig. 33. Embrión de B. arenarum (corte sagital) dos horas después del explante del área cardíaca. El endodermo faringeo no resulta dañado (ph). x 80.



Fig. 34. Embrión control de B. arenarum (corte sagital) en estadio de botón caudal. Se aprecia el área cardíaca (flecha). x 100.



35

Fig. 35. Embrión de B. arenarum (corte sagital) dos horas después del explante del área cardíaca y del endodermo ubicado inmediatamente por encima. x 70.



36

Fig. 36. Corte transversal de un embrión de Bufo arenarum al que, en estadio de botón caudal, se le explantó solamente el área cardíaca (ver texto). Se aprecia la presencia de un corazón regenerado. x 125.



Fig. 37. Corte transversal de un embrión de B. arenarum al que, en estadio de respuesta muscular, se le explantó el área cardíaca (ver texto). Se desarrolla un pequeño tubo cardíaco (flecha). Comparese con fig. 39 x 125.

Cuando el explante interesa tanto al esbozo del corazón como así también al endodermo de la región anterior, se visualiza en su lugar ya a las 2 hs después de la operación, un grupo de células constituido por células endodérmicas y, respectivamente, mesodérmicas dispuestas un tanto caóticamente. No obstante, determina, por lo menos a nivel macroscópico, alteraciones varias, siendo las más frecuentes una marcada hidropesía, un anómalo desarrollo de las branquias y la falta de latidos cardíacos.

El análisis histológico demuestra la presencia de un pequeño grupo de células de origen mesodérmico suspendidas dentro de la cavidad pericárdica (fig. 38).

Cuando el explante de este tipo se realiza en embriones en estadio de "respuesta muscular" o "latido cardíaco", no se registra regeneración del corazón.

B) Trasplantes.

Si bien en los embriones tomados al azar, el corte histológico demuestra la eficiencia de la operación, el explante de sólo el esbozo cardíaco de embriones en estadio de botón caudal sigue proporcionando un interrogante: es decir si el área explantada corresponde o no al esbozo en estudio.

Con el objeto de contestar al interrogante y garantizar la seguridad de la metodología, hemos realizado el "trasplante" del esbozo, en el área ventral de otro embrión del mismo estadio del donante.

Los resultados corroboran que el área corresponde al esbozo cardíaco; en todos los casos se aprecia, entre el 4º y 6º día de realizado el trasplante, la presencia en el área ventral de la larva huésped, de una característica formación cuyos latidos se alternan con los del corazón normal (fig. 40).

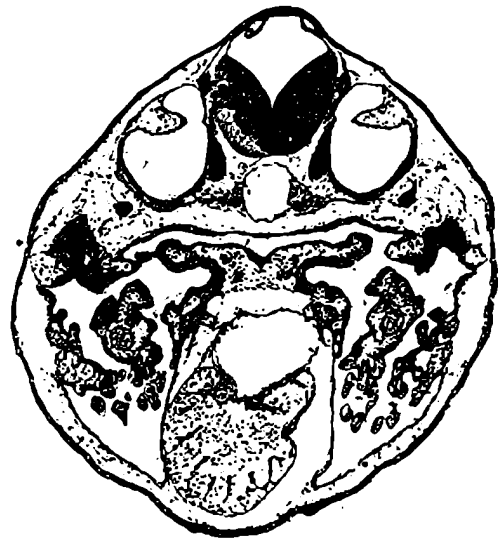
El análisis histológico demuestra que el área trasplantada se diferencia en un corazón más o menos irregular, muchas veces de reducido tamaño, casi siempre ubicado en



Fig. 38. Corte transversal de un embrión de Bufo arenarum al que, en el estadio de botón caudal, se le explantó el área cardíaca y el endodermo adyacente. Notar la presencia de un grupo de células mesodérmicas en la cavidad pericárdica. x 125.

38

Fig. 39. Corte transversal de un embrión control de B. arenarum. El corazón está totalmente desarrollado. x 125.



39

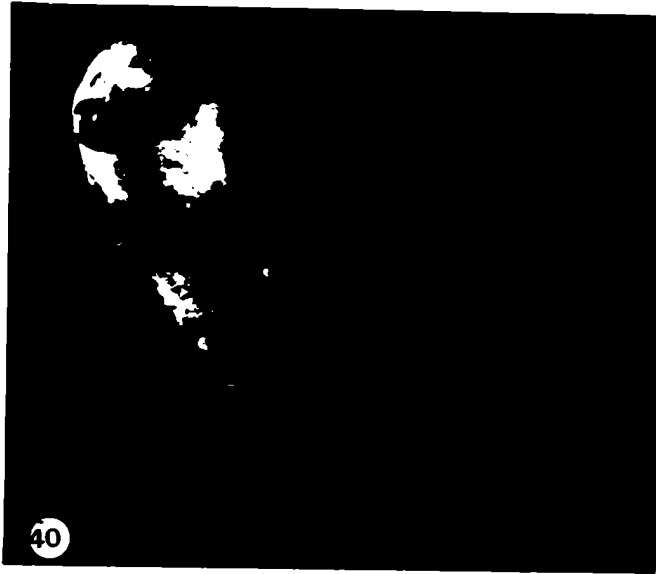


Fig. 40. Vista de una larva de B. arenarum a la que se le trasplantó el esbozo cardíaco (ver texto). Se aprecia la característica formación ventral formada por el traplante en la que se hicieron evidentes las rítmicas contrac-ciones (flecha). x 25.

Fig. 41. Corte transversal de una larva de B. arenarum a la que se trasplantó un esbozo cardíaco (ver texto). Notese un tubo cardíaco y la presencia de elementos formes en su interior (flecha). x 125.



la cara interna de la somatopleura y que contacta también con la lámina esplacnopléurica que rodea al intestino (fig. 41).

Muchos de los trasplantes logran formar un tubo cuya luz se encuentra rodeada por delgadas paredes de fibras musculares. Su forma irregular demuestra que sufrió uno o más replegamientos, si bien anómalos. No se observan tabiques y los elementos sanguíneos en su interior, confirmarían la participación de ese corazón suplementario en los procesos de circulación.

En todos los casos, al promediar los estadios larvales, el corazón suplementario se reabsorbe paulatinamente.

CUARTA PARTE

DISCUSION

4.1. Análisis de los resultados

Para simplificar la exposición de los resultados, consideramos oportuno analizar en forma separada, antes de presentar una conclusión, los datos reunidos a lo largo del estudio descriptivo y a la vez logrados durante las varias etapas de los ensayos experimentales. Eso permitirá tener, como base, parámetros adecuados en lo que se refiere al desarrollo y a la diferenciación del corazón, en condiciones normales, de Bufo arenarum y permitirá además un enfoque comparativo indispensable para el análisis de los problemas relacionados con la inducción embrionaria, es decir con la "Entwicklungsmechanick" según el concepto de Spemann (1932).

4.1.1. Conceptos inherentes a la inducción

El mecanismo de inducción embrionaria, eje fundamental de la Biología del desarrollo, con el que se vinculan nuestros ensayos, representa uno de los mayores problemas todavía no resueltos por la moderna Embriología; se desconoce como actúan el o los factores de "inducción" y el rol que revisten las áreas "inducidas".

En síntesis, ha podido reconocerse que el ectodermo diferencia estructuras neurales cuando se encuentra sometido a la acción inductora del cordomesodermo, salvo algunos casos límites, como los ensayos en los que se obtienen neuroblastos manteniendo ectoblasto en soluciones hipotónicas o de un pH determinado (Barth, 1941; Holtfreter, 1944, 1947; Barth y Barth, 1959; Siegel et al, 1985; Tiedemann, 1986).

Los resultados proyectan numerosos interrogantes y por lo tanto la necesidad de interpretar, bajo otro ángulo científico, los clásicos resultados de Spemann (1932) que han sido paulatinamente redimensionados, aceptándose por los ensayos realizados especialmente por Toivonen et al (1975), Toivonen y Wartiovaara (1976), Toivonen (1979), etc. que no sería necesario el contacto entre cordomesodermo y ectoblasto para que se verifique

el proceso de inducción. En efecto, si es que entre los dos tejidos se ubica, experimentalmente, un filtro cuyos poros de $0,8 \mu$ permiten que los factores inductores solubles difundan en el medio y alcancen el ectoblasto, éste diferenciará estructuras neurales. Tiedemann (1969) refiriéndose al problema con cierta cautela expresa que: "l'explication des mécanismes du transfert des facteurs inducteurs de la solution environnante vers les cellules, ainsi que d'une cellule á une autre, nécessite de nouvelles expériences".

En años relativamente recientes, utilizando una metodología de fraccionamiento subcelular, ha podido ser aislado de gástrulas de Anfibios una fracción microsomal citoplasmática que posee elevada capacidad para inducir estructuras arquencefálicas (Janeczck et al, 1984, a, b); además, una fracción nuclear, aparentemente relacionada con ribonucleoproteínas, tendría también capacidad para inducir la diferenciación de neuroblastos (Bretzel y Tiedemann, 1986).

El análisis bioquímico de la matriz extracelular de gástrulas de Anfibios, ha puesto de manifiesto la presencia tanto de distintos mucopolisacáridos como así también de glicoproteínas y de ácidos nucleicos (Kosher y Searls, 1973; Johnson, 1977 a, b, c; Sanchez, et al, 1983; Sanchez et al, 1984; Riou et al, 1986), que estarían involucrados no solo en procesos morfogénéticos sino también en los mecanismos de inducción neural (Brachet, 1960).

Otra cuestión vinculada con el problema de los procesos inductores es la capacidad de respuesta de las células "blanco" es decir, de las células que constituyen el territorio capaz de recibir y responder al estímulo del factor inductor. Para que eso ocurra, las células "blanco" deben presentar sus membranas intactas y en modo particular, las glicoproteínas de membranas deberán poseer sus grupos carbohidratos libres. Ha sido señalado que si las glicoproteínas se bloquean, experimentalmente, con lectinas específicas, las células son incapaces de responder a los estímulos inductores (Duprart et al, 1982; Gualandris et al, 1983, 1985).

Resultados obtenidos por varios autores al utilizar inductores neurales inespecíficos, han permitido consolidar la hipótesis de que el mecanismo de inducción, por lo menos el neu-

ral, deberá considerarse como una "activación" del territorio competente, más que como una acción "instructiva" del inductor (Løvtrup y Perris, 1983).

La hipótesis no descarta la posibilidad que la inducción represente el resultado de un mecanismo de intercambio iónico (Stern, 1984). Barth y Barth (1959, 1969) obtienen diferenciación neural de células ectoblásticas cultivadas en un medio de distinta fuerza iónica; además, estudios recientes realizados con distintos ionóforos (sustancias que permite el libre paso de iones desde o hacia el interior de la célula) han demostrado la importancia del intercambio iónico en la diferenciación neural (Løvtrup y Perris, 1983; Siegel et al, 1985).

4.1.2. Conceptos inherentes a la regeneración

Según Barfurth (1915), la regeneración, en un organismo, representa un proceso de neoformación de partes traumatizadas o perdidas por factores experimentales o bien accidentales. Se considera que posee una estricta correlación con la característica propiedad, atributo fundamental de los seres vivientes, de poder mantener íntegra la propia forma. La capacidad de regeneración fisiológica (autotonía) o bien experimental se manifiesta, en mayor o menor grado, en los distintos organismos y si bien lo que se regenera puede presentarse, a veces, defectuoso, hipertrófico y hasta diferente, no se invalida, por eso el concepto de que la regeneración se orienta a la sustitución de partes perdidas.

La extensión de los procesos de regeneración y las condiciones para que se verifiquen dependen en muchos casos de factores puramente físicos, pero no puede desconocerse que obedecen también a otros factores secundarios de no menor importancia.

El poder de regeneración es muy distinto entre los diversos tejidos y órganos: como ley general y amplia puede considerarse que la facultad de regenerar una parte perdida resulta tanto más importante, cuanto mayor es la "labilidad", es decir la facilidad de renovarse de los elementos que constituyen el tejido. Con el envejecimiento del ejemplar e independientemente de su ubi-

cación en la Escala Zoológica, las posibilidades de regeneración decrecen, como también disminuyen hasta presentarse como simple cicatrización, a medida que se verifican en organismos cada vez más diferenciados.

Todo proceso regenerativo se relaciona con problemas inherentes a la especificidad de los tejidos y con los más dinámicos de la embriogénesis.

4.2. Interpretación del análisis descriptivo.

Si bien el desarrollo cardíaco de Bufo arenarum es, en muchos aspectos, similar al descrito en otras especies anfibias, es posible establecer mediante adecuadas observaciones algunas diferencias.

El análisis comparativo de los procesos que se verifican durante la génesis cardíaca en Ambystoma mexicanum (Urodelo) (Copenhaver, 1926, 1955; Willens, 1955; Lemanski, 1973) y respectivamente en Bufo arenarum (Anuro) ponen de manifiesto que en esta última especie, al finalizar el estadio de placa neural, las láminas laterales mesodérmicas se han fusionado en la línea media ventral, mientras que en Ambystoma, en este mismo estadio, se encuentran todavía ubicadas en el área dorsal, a la derecha y a la izquierda del eje sagital del embrión. La diferente ubicación del mesodermo presuntivo cardíaco, daría como resultado una diferencia en los tiempos en que se verifica la inducción endodérmica.

Según Willens (1955) en el estadio de botón caudal de Ambystoma mexicanum, las células mesodérmicas que darán origen al endocardio del corazón, derivarían de los bordes libres de las láminas laterales del mesodermo, mientras que según nuestras observaciones en Bufo arenarum este proceso se debería a una migración, hacia la región dorsal, de las células de la esplacnopleura.

También en la formación del miocardio y pericardio, respectivamente, se han podido señalar diferencias entre Ambystoma mexicanum y Bufo arenarum. En efecto, en el primero tanto la lámina premiocárdica (región de la esplacnopleura que dará lugar al miocardio) como la prepericárdica (región de la somatopleura que

dará origen al pericardio) de un lado se fusionan, en el estadio de botón caudal, con las respectivas del lado opuesto, realizando un movimiento de aproximación hacia la región ventral, por debajo del grupo celular que dará origen al endocardio. Este último, por los movimientos morfogénéticos que se verifican de manera consecutiva, quedará circundado lateral y ventralmente por el miocardio y el pericardio (Lemanski, 1973).

Las observaciones efectuadas durante el desarrollo del corazón de Bufo arenarum en condiciones normales, demuestran que las láminas mesodérmicas de un lado que darán origen al miocardio y al pericardio, se fusionan con las respectivas del lado opuesto más tempranamente que en Urodela, es decir al finalizar el estadio de placa neural; eso ocurre en un plano ubicado en una región inferior al futuro endocardio. En lo sucesivo, debido a que las dos láminas migran hacia el área dorsal, envolverán con sus movimientos el endocardio simulando una copa y sus bordes dorsales hasta llegan a unirse constituyendo un efímero mesocardio (fig. 8).

Cabe destacar además que en Bufo arenarum, cuando se verifican los plegamientos del tubo cardíaco, la capa monocelular miocárdica manifiesta signos de activa mitosis y un cambio en la fisonomía de sus células que adquieren forma subsférica mientras que disminuye su volumen citoplasmático.

Al igual que en Ambystoma mexicanum (Lemanski, 1973) las trabéculas miocárdicas en Bufo arenarum se forman antes que el endocardio se ponga en íntimo contacto con el miocardio. Es decir, no se observa, como ocurre en Aves, que el endocardio contacte precozmente con el miocardio y que en éste se inicie la formación de trabéculas ventriculares (Manasek, 1970).

Los primeros estadios del desarrollo del corazón de Bufo arenarum se caracterizan por la presencia de numerosas plaquetas vitelinas que muestran afinidad para el azul de bromofenolmercurio semejante a lo descrito por Lemanski (1973) en Ambystoma mexicanum. La intensa coloración de las plaquetas vitelinas tratadas con esta técnica o con la reacción de PAS, refleja la composición química del vitelo señalada para otros Anfibios (Colombo,

1983) es decir, carbohidratos y proteínas.

En la especie por nosotros estudiada, a medida que el desarrollo avanza, se verifica una disminución tanto en el número como en el volumen de las plaquetas vitelinas; contemporáneamente se manifiesta un significativo incremento de la tinción de proteínas y carbohidratos en la matriz citoplasmática. Al comenzar los latidos ocurre una más rápida y notable disminución numérica de las plaquetas vitelinas, lo que indicaría que parte del vitelo ha sido usado como directa fuente de energía para los procesos de síntesis.

El material amorfo ubicado entre el endo y el miocardio durante el desarrollo normal del corazón de Bufo arenarum, puede ser homologado a la gelatina cardíaca descrita en Aves. Sin embargo, las propiedades de coloración muestran diferencias entre Anfibios y Aves. En estas últimas, el material amorfo ubicado entre endo y miocardio adquiere un color rosado en presencia de eosina y muestra reacción positiva con el ácido peryódico según el método de Schiff (Ortiz, 1958); en la especie Anfibia por nosotros estudiada, ese material no se colorea con eosina y no reacciona positivamente con PAS.

Según Hurle et al (1980) e Icardo (1983), en el embrión de Aves los mucopolisacáridos de la gelatina cardíaca se colorean con Alcian blue. Análoga coloración y distribución del material alcian blue positivo hemos podido comprobar en el corazón en desarrollo de Bufo arenarum. Su intensa coloración con el alcian blue a pH 2.5 y su sensibilidad al tratamiento con hialuronidasa, indicarían que la mayor parte del material que se tiñe es ácido hialurónico y condroitín sulfato (Troyer, 1980). La comprobación que después del tratamiento con hialuronidasa permanecen sitios de coloración, sugiere que pueden estar presentes otros mucopolisacáridos como por ejemplo dermatán sulfato o keratán sulfato. Estos resultados tienen bastante analogía con los obtenidos en embriones de rata (Markwald y Smith, 1972) y en Aves (Manasek et al, 1973; Orkin y Toole, 1978; Hurle et al, 1980).

Nuestros datos sostienen el concepto que en Bufo a-

arenarum la distribución de mucopolisacáridos en la gelatina cardíaca no sería homogénea a lo largo del tubo cardíaco; bastará considerar que mucosustancias alcian blue positivas se ubican principalmente a nivel de unión de las cámaras cardíacas. Resulta significativo que una análoga ubicación de la gelatina cardíaca ha sido descripta en Aves y que ha sido emitida la hipótesis (Barry, 1948; Patten et al, 1948) que pueda funcionar como válvula durante el desarrollo del corazón, es decir cuando todavía no están diferenciadas las estructuras anatómicas adecuadas. La viscosidad de la gelatina cardíaca impediría la deformación causada por el paso de la corriente sanguínea, y a la vez su presencia facilitaría el corrimiento de la sangre hacia adelante. La presencia de ácido hialurónico en la gelatina cardíaca con sus propiedades de elasticidad, viscosidad y alta presión osmótica (Toole et al, 1984) satisfecería los requerimientos físicos del corazón en desarrollo.

Postulamos la hipótesis que la gelatina cardíaca en la especie Anfibia Bufo arenarum, cumpla un rol similar al descripto en Aves dada su particular ubicación en los sitios en los que se forman las válvulas cardíacas.

Los datos descriptivos que hemos reunido permiten señalar que en Bufo arenarum, en estadio 21-22, se verifica una migración de células endocárdicas hacia el canal atrioventricular, precedida por la presencia de un material amorfo que reacciona positivamente al alcian blue pH 2.5. Si bien el cuadro es análogo al de Aves, nuestros ensayos no corroboran la hipótesis que en Bufo arenarum la presencia de ácido hialurónico y condroitín sulfato represente una condición indispensable para la diferenciación de las válvulas auriculoventriculares (Markwald et al, 1978; Markwald y Funderburg, 1983; Markwald et al, 1984). Se torna necesario un más profundo análisis que incluya el cultivo de áreas específicas del corazón en desarrollo, para reconocer los motivos del resultado contrastante entre Aves y Anfibios.

4.3. Interpretación de los ensayos experimentales.

4.3.1. Explantes - Transplantes - Cultivos.

Los resultados inherentes a los ensayos experimentales en Bufo arenarum indicarían la imprescindible necesidad de la presencia del endodermo faríngeo para que se diferencie el corazón a expensa de un área de tejido mesodérmico, específicamente designada en el plan estructural de la organogénesis. Según se demostró, si bien en esta especie el explante de todo el endodermo realizado en estadios neurales, anula la diferenciación del corazón, análogamente a lo que ocurre en Urodelos (Balinsky, 1939; Nieuwkoop, 1947; Jacobson, 1960), el dato proyecta el interrogante de si "todo" el endodermo tendría la misma capacidad inductora o si ésta se encontraría limitada en función de áreas presuntivas o de estadios embrionario.

Al realizar la serie de ensayos de trasplantes de áreas endodérmicas en la región cardíaca, cuyos detalles técnicos y descriptivos han sido mencionados (ver 2.2.2 y 3.2.2), hemos podido observar que el endodermo anterior (faríngeo) posee mayor poder de inducción que el endodermo de áreas posteriores. Según lo demuestra la tabla II, el mesodermo presuntivo cardíaco mantenido en contacto con endodermo faríngeo diferencia estructuras cardíacas en casi el 100% de los casos: en cambio, el mesodermo presuntivo cardíaco en presencia de endodermo de la región media, diferencia corazón sólo en un 28% de los casos; áreas endodérmicas más distales trasplantadas en la región cardíaca, sólo inducen diferenciación cardíaca en casos esporádicos.

El conjunto de estos resultados experimentales afirman el concepto que en Bufo arenarum la actividad inductora del endodermo, máxima a nivel del área faríngea, disminuye paulatinamente hasta cesar en las regiones posteriores. Se corroborarían en parte, los datos obtenidos por Fullilove (1970) en el Urodelo Taricha torosa.

Consideramos oportuno destacar que si bien nuestros

ensayos parecen poseer un amplio margen de seguridad, los resultados tanto de los explantes de áreas mesodérmicas cardíacas presuntivas, como así también de los trasplantes de áreas endodérmicas, representan el corolario de técnicas muy delicadas y los datos que se obtienen no siempre son de fácil interpretación. Por lo tanto, en varias ocasiones, para un oportuno control, hemos usado un sistema de cultivo in vitro que permitió una mayor diversidad de ensayos experimentales y también facilitó la interpretación de las varias manifestaciones morfológicas.

Esta metodología proporcionó además la posibilidad de corroborar los resultados obtenidos usando las técnicas de los explantes o trasplantes. Los resultados sintetizados en la tabla III y graficados en la fig. 23 demuestran que la diferenciación del mesodermo presuntivo cardíaco, sólo se verifica en presencia de endodermo y que es el endodermo de la región anterior, es decir la faríngea, el más capacitado para inducir la diferenciación.

Como consecuencia se proyecta el interrogante de si el área endodérmica faríngea mantiene, a lo largo de las varias etapas del desarrollo, su capacidad inductora o bien si la disminuye o pierde con los eventos morfológicos y bioquímicos que se verifican a medida que se realiza la organogénesis. Pudo demostrarse que en Bufo arenarum el endodermo anterior, desde el inicio de los estadios neurales hasta el de botón caudal, es capaz de inducir el mesodermo presuntivo cardíaco explantado de embriones en estadio 14 (surco neural). Esta capacidad, según se consiguió, se pierde a medida que el desarrollo prosigue: el endodermo de la región faríngea de embriones en estadio 18 (respuesta muscular) disminuye notablemente su posibilidad de inducir mesodermo presuntivo cardíaco, mientras que el endodermo de embriones en estadios 19 y 20 (latido cardíaco - circulación branquial) presenta sólo en muy esporádicos casos alguna acción inductora que se refleja en una escasa diferenciación del mesodermo (tabla IV) de la región cardíaca.

Hemos tratado de explicar el conjunto de los resultados anteriormente expuestos, considerando que en Anfibios, lue-

go del estadio respuesta muscular, el endodermo, masivamente entendido, se diferencia en faringe, estómago, duodeno y otros órganos (Tahara y Nakamura, 1961; Balinsky, 1978). Es muy probable por lo tanto, que a medida que la hoja endodérmica sufre los procesos de diferenciación, disminuya o inhiba su posibilidad de inducir el territorio mesodérmico competente, para la formación del corazón.

Los resultados obtenidos con la metodología del explante en "sandwich", son concordantes con los obtenidos in vitro. Es decir, confirman que es el endodermo del área faríngea es el más capacitado para inducir la diferenciación del corazón. Sin embargo el análisis histológico ha demostrado que en ningún caso se verificó la formación de una verdadera estructura cardíaca y que serían las células de aspecto mesenquimático las responsables de los latidos rítmicos. Es muy probable que la falta de estructuras cardíacas se deba a la escasa cantidad de material mesodérmico incluido en el "sandwich", ya que resultados análogos se obtienen cuando se cultivan en "sandwich" otros territorios embrionarios (Rollhäuser y Horst, 1975).

Los resultados que hemos obtenido utilizando la metodología de los "medios condicionados", demostrarían que el endodermo anterior liberaría en el medio salino de cultivo, un "factor" de inducción que actuaría sobre el mesodermo presuntivo cardíaco. Según se sabe los medios condicionados han sido utilizados, en modo particular, por Niu y Twitty (1953) y por Matsuda y Kajishima (1980) con el objeto de demostrar que la inducción primaria se verifica "también" a través de factores que "difunden" en el medio. Para que el ectodermo competente reaccione manteniéndolo en un cultivo "condicionado" por la presencia del cordomesodermo, éste deberá permanecer en la solución de cultivo por lo menos 7 días. En nuestro ensayo experimental hemos obtenido resultados positivos usando medios condicionados con endodermo anterior, durante 4 días. Por otra parte, ha sido señalado que el territorio competente que se pone en cultivo debe ser de volumen pequeño, en efecto piezas voluminosas de ectodermo competente, no parecen diferenciarse por la presencia del "factor" difusible (Niu y Twitty,

1953). En función de esta indicación hemos tratado que el volumen del mesodermo competente puesto en cultivo fuera menor que el endodermo inductor.

En la literatura científica se enfatiza que en Aves, la diferenciación del mesodermo precardiaco se verifica a raíz de dos procesos complementarios: a) la síntesis de proteínas contráctiles en las células y b) la síntesis de colágeno en la matriz extracelular; la interrupción de una de las dos síntesis representa causa suficiente para que se inhiba la diferenciación cardíaca (Wiens y Spooner, 1983; Wiens et al, 1984).

En cuanto a los Anfibios ha podido ser demostrada la presencia de varios tipos de proteínas contráctiles en el corazón en desarrollo de Ambystoma mexicanum; además en una variedad mutante de esta especie (ver introducción) pudo evidenciarse una significativa disminución en la síntesis de actina y miosina (Lemanski, 1978), de la tropomiosina (Moore y Lemanski, 1982) y una anómala distribución de la troponina-T (Fuldner et al, 1984). No obstante, hasta el presente, no se han realizado estudios que aclaren una eventual relación entre la síntesis de proteínas contráctiles y la actividad inductora del endodermo para la diferenciación del corazón.

Jacobson y Duncan (1968) a raíz de un estudio inherente a la diferenciación cardíaca en un Anfibio Urodelo, Taricha torosa, concluyen que ésta se encontraría sometida a tres factores diferentes. Un primero, representado por una sustancia específica, actuaría como inductor cardíaco y estaría localizado en el endodermo anterior; un segundo factor, se ubicaría principalmente en la epidermis y en menor concentración en las crestas neurales, placa neural, endodermo y según lo expresan textualmente los mismos autores, "quizás en todos los tejidos embrionarios". El tercer factor, localizado en los pliegues neurales a nivel cefálico y quizás, en las áreas neurales adyacentes, representaría un factor inhibidor de la diferenciación cardíaca.

Este último dato reviste interés biológico, sin embargo queda limitado en el ámbito experimental puesto que no re-

fleja ninguna condición fisiológica. La distancia entre el área de diferenciación cardíaca y la de los pliegues neurales de la región cefálica resulta muy significativa como para poder admitir su eventual acción durante los procesos de morfogénesis cardíaca en condiciones normales.

Nuestros ensayos experimentales no han podido demostrar que en Bufo arenarum se encuentren los factores señalados por Jacobson y Duncan (1968). Al realizar algunas pruebas tratando de usar como factor inhibidor la placa neural, al trasplantarla en el área de diferenciación del corazón de embriones de Bufo arenarum, pareció haber interferido la diferenciación del corazón, pero no podemos descartar la posibilidad de que, por lo menos en nuestro caso, represente el resultado de una acción mecánica y no debido a la acción de eventuales factores de inhibición (resultados que no hemos consignado en extenso, por considerarlos escasos).

4.3.2. Regeneración

El explante del esbozo cardíaco realizado en estadio de botón caudal, demuestra que en Bufo arenarum el área cardíaca puede sufrir más o menos amplios procesos de regeneración.

En embriones de Ambystoma mexicanum, luego del explante mesodermo cardíaco efectuado durante estadios neurales o de botón caudal, se verifica la regeneración del corazón, que en cambio no se obtiene cuando el explante abarca áreas más extensas que la del esbozo cardíaco (Copenhaver, 1926).

Estos resultados suelen explicarse en función del concepto de "campo morfogénético" introducido por Weiss (1939) y entendido como un territorio embrionario que sin presentar inicialmente determinadas características macro o microscópicas, se diferencia en un órgano específico. Como se sabe, la remoción de partes del "campo", se traduce en un rápido proceso de "regulación", por lo que el destino final de ese campo no resulta alterado (Cummings, 1985).

Es de suponer en base a los conceptos expuestos,

que en Bufo arenarum existiría un "campo morfogenético"; esta situación morfológica permitiría que el endodermo adyacente al explante del esbozo del corazón, diferencie estructuras cardíacas. La capacidad de regulación, dentro del campo cardíaco, se pierde rápidamente a lo largo del desarrollo. En efecto, en embriones en estadio de respuesta muscular o poco más avanzados, el territorio cardíaco no se regenera.

Nuestros ensayos han comprobado además, que si el explante interesa sólo el área del mesodermo cardíaco, dejando intacto el endodermo faríngeo, se verifica la regeneración del tubo cardíaco, mientras que eso no ocurre cuando el mesodermo cardíaco se explanta junto con endodermo faríngeo.

Para explicar estos resultados podría emitirse la hipótesis de una acción inductora del endodermo sobre el mesodermo que circundaba el esbozo cardíaco antes del explante. Esta hipótesis, aparentemente posible, no parece reflejar la realidad en cuanto, según se ha demostrado, en estadio de botón caudal la capacidad inductora del endodermo es muy escasa o nula (ver 3.2.7). Sería por lo tanto más propio, quizás, considerar que la destrucción de áreas endodérmicas faríngeas dificulte o impida el corrimiento de los territorios mesodérmicos adyacentes al área cardíaca para sustituir el esbozo explantado. Cabe señalar al respecto que estudios llevados a cabo utilizando embriones y no sólo de Anfibio, destacan la importancia tanto de la matriz extracelular como también de los territorios adyacentes al grupo celular que deberá sufrir una migración para alcanzar la ubicación que le corresponde antes de su diferenciación. El concepto se encuadra en los parámetros morfológicos propuestos por las observaciones que analizan los procesos de migración de células aisladas experimentalmente y que suelen compararse con lo que ocurre durante la migración de células altamente especializadas como las germinales (Heasman et al. 1981; Heasman, Wylie y Holwill, 1985), las de las crestas neurales (Lofberg et al., 1980; Rovasio et al. 1983) y los involucrados en los movimientos epibólicos durante la gastrulación (Nakatsuji, 1984; Nakatsuji y Johnson, 1984; Johnson, 1986).

QUINTA PARTE

CONCLUSION

Conclusiones.

El conjunto de los datos reunidos a lo largo de las observaciones descriptivas y de los distintos ensayos experimentales orientados al estudio de la diferenciación del área presuntiva cardíaca de Bufo arenarum, permite sintetizar las características que se evidencian durante el desenredarse de este armónico, pero complejo, mecanismo biológico. Los eventos tanto morfológicos como bioquímicos logran, a través de una larga cadena de inducciones sucesivas y/o recíprocas, la diferenciación específica de un determinado grupo de células mesodérmicas que, susceptibles a la información inductora, constituirá el órgano cardíaco.

Ha resultado evidente que los procesos mediante los cuales el territorio presuntivo del corazón se encuentra sometido al mecanismo de la inducción, obedecen a afinidades celulares selectivas y que no sería indispensable el contacto directo entre tejido inductor, o sea endodermo de la región faríngea y mesodermo presuntivo cardíaco. No obstante, es menester señalar que es muy probable que estos procesos no representen "solamente" simples procesos de difusión de factor de inducción; consideramos que un rol más o menos preponderante y efectivo, según el caso y quizás el "momento" de la embriogénesis, lo tendrían la afinidad celular selectiva y la pinocitosis.

El problema es muy complejo: se admite al respecto que los "inductores" pueden causar nuevas cadenas de reacciones o bien actuar permitiendo que se evidencie un "represor". En la actualidad se considera que la inducción embrionaria representaría un proceso de "derepresión" y algunos de nuestros ensayos parecerían corroborar esta hipótesis.

Si bien la diferenciación del corazón de Bufo arenarum sigue por lo menos bajo cierto aspecto, el plan básico descrito para Anfibios Urodelos, muestra peculiaridades morfológicas que suscitan un adecuado interés biológico, a saber:

1) Las láminas mesodérmicas laterales alcanzan la línea media ventral del embrión en estadios más tempranos que en Urodolos, lo que se traduce en un repliegue de la somato y esplacnopleura que envuelven a las células del endocardio; existe además un patrón diferente de migración de las células mesodérmicas que darán origen al endocardio.

2) El tubo cardíaco, al constituirse, se repliega en forma de "S" y los movimientos que presenta coinciden, en línea general, con lo descrito al respecto para especies Urodelas.

3) El análisis histoquímico pone de manifiesto, en el corazón en desarrollo, la presencia de numerosas plaquetas vitelinas de composición química heterogénea. A partir del momento en que se visualizan los latidos cardíacos, tanto el número como el volumen de las plaquetas disminuye rápidamente lo que corrobora y afirma una vez más el concepto de que el vitelo es usado, en los estadios embrionarios, no sólo como directa fuente de energía, sino también para los procesos de síntesis.

4) Ha sido reconocido un material amorfo localizado entre miocardio y endocardio análogo a la "gelatina cardíaca" descrita en Ave y señalado fugazmente en Rana (Jaffee, 1962) que presenta propiedades químicas peculiares, o mejor dicho opuestas a las hasta ahora señaladas en cuanto no es ni eosinófilo ni PAS positivo sin embargo, no puede desconocerse que reacciona con el Alcian blue a pH 2.5, lo que permite suponer presencia de glicosaminoglicanos. La reacción, que no se manifiesta homogénea a lo largo del tubo cardíaco, sino que se limita a las regiones próximas al canal aurículoventricular, favorece la hipótesis que este grupo de mucopolisacáridos tenga una activa participación en la conducción del flujo sanguíneo y en la diferenciación de las válvulas cardíacas.

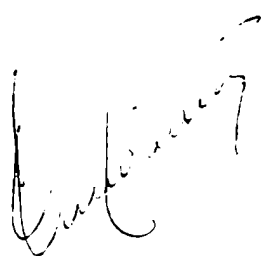
5) La diferenciación del mesodermo presuntivo cardíaco de Bufo arenarum parece verificarse a expensas de una acción inductora del endodermo y más precisamente del endodermo faríngeo; el endodermo ubicado en regiones posteriores, no presenta o bien presenta muy escasa capacidad de inducción.

6) El endodermo faríngeo de embriones en estadio de botón caudal o de estadios más avanzados, pierde la capacidad de inducir la diferenciación cardíaca.

7) El territorio cardíaco se encuentra "determinado" en el estadio de botón caudal.

8) La técnica de los "medios condicionados" demostró que el endodermo de la región anterior, es decir el "faríngeo", es capaz de liberar un "factor" (o factores) que difunde en el medio de cultivo y que actúa sobre el mesodermo presuntivo cardíaco sin necesidad de que se verifique un íntimo contacto entre "inductor" y "territorio competente" para que se verifique la diferenciación del corazón.

9) En concordancia con lo descripto, aunque parcialmente para otras especies Anfibias, también en Bufo arenarum ha podido establecerse la presencia de un "campo cardíaco" que permite procesos de activa regeneración.



DR. A. PISANO
DIRECTOR LABORATORIO
INVESTIGACIONES EMBRIOLOGICAS
(CONICET)



SEXTA PARTE

APENDICE

A. Soluciones Fisiológicas.

- 1. Solución Holtfreter madre.

ClNa	3500 mg
ClK	50 mg
Cl ₂ Ca	100 mg
H ₂ O bidestilada	1000 ml

Se lleva a 80º C dos veces y se agregan, en frío, 200 mg de CO₃HNa previamente esterilizado en estufa a seco.

- 2. Solución Holtfreter standard.

Se diluye la solución Holtfreter madre 1: 9.

- 3. Solución de Niu y Twitty.

Sol.a - ClNa	3400 mg
ClK	50 mg
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	80 mg
SO ₄ Mg	100 mg
H ₂ O bidestilada	500 ml

Sol.b - Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	110 mg
KH ₂ PO ₄	20 mg
H ₂ O bidestilada	250 ml

Sol.c - CO ₃ HNa	200 mg
H ₂ O bidestilada	250 ml

Se lleva a ebullición cada solución por separado. Se mezclan, frías, inmediatamente antes del uso.

- 4. Solución Barth X

Sol.a - ClNa	5150 mg
ClK	75 mg
Cl ₂ Ca	60 mg
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	62 mg

$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg
H_2O bidestilada	500 ml
Sol.b - $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	30 mg
H_2O bidestilada	38 mg
	250 ml
Sol.c - CO_3HNa	
H_2O bidestilada	200 mg
	250 ml

Se lleva a ebullición cada solución por separado. Se mezclan, frías, inmediatamente antes del uso.

B. Fijadores.

1. Ancel y Vintemberger.

H_2O destilada	90 ml
Formol	10 ml
Ac. Acético	0,5 ml
ClNa	0,5 gr

Se fija durante 48 hs y luego se pasa a formol al 4% durante 24-48 hs antes de la inclusión.

2. Bouin.

Ac. Pícrico (sol. saturada)	75 ml
Formol	25 ml
Ac. Acético	2 ml

Se fija de 2 a 12 hs dependiendo del volumen de la pieza. Luego se pasa a alcohol 70% por 24 hs como mínimo. Se recomienda no mantener las piezas en alcohol por mucho tiempo.

C. Coloraciones.

1. Hematoxilina alcoholica de Ehrlich.

Hematoxilina	2 gr
Alcohol 95%	100 ml

Ac. Acético	10 ml
glicerina	100 ml
H ₂ O dest.	100 ml

Se agrega alumbre de Na ó K en exceso (aprox. 8-10 gr). Se agita varias veces en botella destapada y se deja hasta que tome un color rojo oscuro, luego se filtra. Se debe colocar a la luz para que oxide. Tarda aproximadamente 15 a 20 días para lograr su completa maduración.

2. Eosina.

A la solución de eosina acuosa al 0,5%, se agregan por cada 100 ml, unas gotas de ác. acético glacial. Luego se filtra.

3. Tricrómica de Mallory.

Solución de Mallory.

Azul de anilina	0,4 gr
Naranja G	2,5 gr
Ac. Oxálico	2 gr
H ₂ O destilada	100 ml

Luego de la deshidratación los cortes se pasan a:

- a) Fucsina ácida al 1% 1 minuto
- b) Ac. Fosfomolibdico 1% 20 segundos
- c) Sol. de Mallory 10 minutos
- d) lavado rápido en H₂O destilada
- e) Deshidratar, virar en alcohol 80%, clarificar en xilol y montar.

4. Reacción de PAS.

Luego de la deshidratación los cortes se pasan por:

- a) sol. acuosa de ácido peryódico al 1%, 10 minutos.
- b) Lavado en H₂O 5 minutos.
- c) Reactivo de Schiff, 10 minutos.
- d) Lavado en tres cambios en sol. al 0,5% de metabisulfito de Na.
- e) Lavado en H₂O
- f) Deshidratar, clarificar en Xilol y montar.

Reactivo de Schiff.

Hervir 100 ml de H₂O destilada y retirar de la fuente de calor. Inmediatamente disolver 1 gr de fucsina básica (o pararosalina). Dejar enfriar hasta 60° C y filtrar. Agregar 2 gr de metabisulfito de Na y 20 ml de 1 N ClH. Cerrar el recipiente y guardar por 18-24 hs. Transcurrido ese tiempo agregar 300 mg de carbón activado, agitar y filtrar. Se guarda entre 0° y 5° C. Recipiente absolutamente limpios inclusive los tapones.

5. Azul de bromofenol-mercurio para proteínas.

Preparación de la solución de azul de bromofenol-mercurio:

Disolver 0,4 gr de Cl₂Hg en 40 ml de una solución acuosa de ácido acético al 2% y agregar 20 mg de azul de bromofenol.

- a) Desparafinar los cortes y llevarlos a H₂O.
- b) Colorear en la solución de bromofenol-mercurio por 15 minutos.
- c) lavar en tres cambios de ác. acético al 0,5% por 5 minutos en cada uno.
- d) pasar a alcohol tert-butílico por 1 minuto.
- e) poner en 2 cambios de alcohol tert-butílico por un total de 3 hs o toda la noche.
- f) Clarificar en xilol y montar.

6. Alcian Blue (pH 2.5) - Rojo Neutro.

- a) Desparafinar los cortes y llevarlos a agua.
- b) Colorear en Alcian Blue en 3% de Ac. Acético por 1 a 2 hs.
- c) Lavar en Agua destilada.
- d) Colorear con rojo neutro al 1% por 1 minuto.
- e) Secar el exceso de agua con papel de filtro y dejar secar completamente al aire (22° a 37°C).
- f) Clarificar en Xilol y Montar.

D. Método de inclusión de piezas pequeñas (usado para incluir los cultivos en "sandwich").

- a) Las piezas fijadas se colocan en agar tibio (1%); se seca el exceso de líquido con papel de filtro.
- b) Se realizan algunos orificios en el agar alrededor de la pieza y se vierte agar caliente hasta cubrir.
- c) Una vez solidificado el agar, se corta alrededor de la pieza y el taco se pasa por eosina u otro colorante por unos minutos.
- d) Se siguen los pasos clásicos de deshidratación e inclusión en parafina, teniendo la precaución de aumentar los tiempos a fin de obtener una buena penetración a través del agar.

SEPTIMA PARTE

BIBLIOGRAFIA

1. ANCEL, P. y P. VINTEMBERGER. 1948. Recherches sur le determinisme de la symetrie bilaterale dans l'oeuf des amphibiens. Bull. Biol. Fr. Belg. Suppl. 31: 1-182.
2. ANDREW, A. y V. GABIE. 1969. Hanging drop culture of Xenopus laevis neural crest. Acta Embryol. Exper. 2,3: 123-136.
3. ASASHIMA, M. 1975. Inducing effects of the presuntive endoderm of successive stages in Triturus alpestris. Wilhelm Roux' Archiv. 177: 301-308.
4. BACON, R.L. 1945. Self-differentiation and induction in the heart of Amblystoma. J. Exp. Zool. 98: 87-125.
5. BALINSKY, B.I. 1939. Experiments on total extirpation of the whole entoderm in Triton embryos. C.R.Acad. Sci. URSS 23: 196-198.
6. BALINSKY, B.I. 1978. Introducción a la Embriología (Trad. J. Janés y J. Ayala). Ed. Omega. Barcelona.
7. BARFURTH, D. 1916. Regeneration and Involution. Erg. An. Entw 1: 25-55.
8. BARRY, A. 1948. The functional significance of the cardiac jelly in the tubular heart of the chick embryo. Anat. Rec. 102: 289.
9. BARTH, L.G. 1941. Neural differentiation without organizer. J. Exp. Zool. 87: 371-384.
10. BARTH, L.G. y L.J. BARTH. 1959. Differentiation of the Rana pipiens ectoderm in gastrula in conditioned medium. J. Embryol. Exp. Morph. 7: 210-222.
11. BARTH, L.G. y L.J. BARTH. 1969. The role of sodium chloride in the process of induction by lithium chloride in cells of Rana pipiens gastrula. J. Embryol. Exper. Morph. 19: 387-396.
12. BERNANKE, D.H. y R.W. ORKIN. 1984. Hyaluronate binding and degradation by cultured embryonic chick cardiac cushion and myocardial cells. Dev. Biol. 106: 360-367.
13. BONHAG, P.F. 1955. Histochemical studies of the ovarian nurse tissues and oocytes of the milkweed bug Oncopeltus fasciatus (Dallas). I. Cytology, nucleic acids and carbohydrates. J. Morphol. 96: 381-439.
14. BONNER, P.H. y T. ADAMS. 1982. Neural induction of chick myoblast differentiation in culture. Dev. Biol. 90: 175-184.

15. BRACHET, A. 1898. Recherches sur le developement du coeur, des premiers vaisseaux et de sang chez les amphibiens urodèles. Arch. Anat. micr. 2: 251-304.
16. BRACHET, A. 1903. Recherches sur l'origine de l'appareil vasculaire sanguin chez les amphibiens. Arch. Biol. 19: 1-243.
17. BRACHET, A. 1921. Traité d'Embryologie des vertébrés. Masson Ed. Paris.
18. BRACHET, J. 1960. The Biochemistry of Development. Pergamon Press. New York.
19. BRETZEL, G y H. TIEDEMANN. 1986. Neural-inducing activity of nuclei and nuclear fractions from Xenopus laevis embryos. Roux' Arch. Dev. Biol. 195: 123-127.
20. CLEINE, J.H. y J.M. SLACK. 1985. Normal fates and states of specification of different regions in the axolotl. J. Embryol. Exp. Morph. 86: 247-269.
21. COLOMBO, R. 1983. Actin in Xenopus yolk platelets: a peculiar and debated presence. J. Cell Sci. 63: 263-270.
22. COPENHAVER, W.M. 1926. Experiments on the development of the heart of Amblystoma punctatum. J. Exp. Zool. 43: 321-371.
23. COPENHAVER, W.M. 1955. Heart, blood vessels, blood and endodermal derivatives. In "Analysis of Development" B.WILLIER, P.WEISS and V.HAMBURGER eds. Saunders. Co. Philadelphia. pp: 440-461.
24. CUMMINGS, F.W. 1985. A patten-surface interactive model of morphogenesis. J. Theor. Biol. 116: 243-273.
25. DAVIS, C.L. 1924. The cardiac jelly of the chick embryo. Anat. Rec. 27: 201.
26. DE HAAN, R.L. 1968. Emergence of form and function in embryonic heart. Dev. Biol. (Suppl.) 2: 208-250.
27. DEL CONTE, E y J.L. SIRLIN. 1952. Patten series of the first embryony stages in Bufo arenarum. Anat. Rec. 112: 125-136.
28. DUPRAT, A.M.; L. GUALANDRIS y P. ROUGE. 1982. Neural induction and the structure of the target cell surface. J. Embryol. Exper. Morph. 70: 171-187.
29. EKMANN, G. 1921. Experimentelle Beiträge zur Herzentwicklung der Amphibien. Roux' Arch. F. Entw. mech. Org: 106: 320-352.

30. FULDNER, R.; S. LIM; M. GREASER y L.F. LEMANSKI. 1984. Accumulation and localization of Troponin-T in developing hearts of Ambystoma mexicanum. J. Embryol. Exper. Morph. 84: 1-17.
31. FULLILOVE, S. 1970. Heart induction: distribution of active factors in newt endoderm. J. Exp. Zool. 175: 323-326.
32. GARCIA MARTINEZ, V. y J.M. HURLE. 1986. Cell shape and cytoskeletal organization of the endothelial cells of the semi-lunar heart valves in the developing chick. Anat. Embryol. 174: 83-89.
33. GESSNER, J.H.; A.E. LORINCZ y H. BOSTROM. 1965. Acid mucopolysaccharide content of the cardiac jelly of the chick embryo. J. Exp. Zool. 160: 291-298.
34. GRUNZ, H. 1983. Change in the differentiation pattern of Xenopus laevis ectoderm by variation of the incubation time and concentration of vegetalizing factor. Roux's Arch. Dev. Biol. 192: 130-137.
35. GRUNZ, H.; J. BORN; H. TIEDEMANN y H. TIEDEMANN. 1986. The activation of a neuralizing factor in the neural plate is correlated with its homoiogenetic-inducing activity. Roux's Arch. Dev. Biol. 195: 464-466.
36. GUALANDRIS, L.; P. ROUGE y A.M. DUPRAT. 1983. Membrane changes in neural target cells studied with fluorescent lectin probes. J. Embryol. Exper. Morph. 77: 183-200.
37. GUALANDRIS, L.; P. ROUGE y A.M. DUPRAT. 1985. Target cell surface glycoconjugates and neural induction in an amphibian. J. Embryol. Exper. Morph. 86: 17-37.
38. HEASMAN, J.; R. HYNES; A. SWAN; V. THOMAS y C.C. WYLIE. 1981. Primordial germ cells of Xenopus embryos: the role of fibronectin in their adhesion during migration. Cell 27: 437-447.
39. HEASMAN, J.; C.C. WYLIE y S. HOLWILL. 1985. The importance of basement membranes in the migration of primordial germ cells in Xenopus laevis. Dev. Biol. 112: 18-29.
40. HENDRIX, M.J. y D.E. MORSE. 1977. Atrial septation. I. SEM study in the chick. Dev. Biol. 57: 345-363.
41. HILL, C.S. y L.F. LEMANSKI. 1979. Morphological studies on cardiac lethal mutant salamander hearts in organ cultures. J. Exp. Zool. 209: 1-19.

42. HIRUMA, T. y R. HIRAKOW. 1985. An ultrastructural topographical study on myofibrillogenesis in the heart of the chick embryo during pulsation onset period. *Anat. Embryol.* 172: 325-329.
43. HOLTGRETER, J. 1933. Einfluss von Wirtsalter und Verschieden organbezirken auf die Differenzierung von Angelagertem Gastrulacktoderm. *W. Roux's Arch. Entw. Mech. Org.* 127: 619-775.
44. HOLTGRETER, J. 1944. Neural diferentiation of ectoderm through exposure to saline solution. *J. Exp. Zool* 95: 307-343.
45. HOLTGRETER, J. 1947. Neural induction in explants wich have passed through a sublethal cytolysis. *J. Exp. Zool.* 106: 197-222.
46. HOUSSAY, F. 1893. Developpment et morphologie du parablaste et de l'appareil circulatoire. *Arch. Zool. Exp. et Gen.* 3: 1-94.
47. HUMPHREY, R.R. 1968. Genetically determined heart function in embryos of the mexican axolotls (Ambystoma mexicanum). *Anat. Rec.* 162: 475.
48. HUMPHREY, R.R. 1972. Genetic and experimental studies on a mutant gene (c) determining absence of heart action in embryos of the mexican axolotls (Ambystoma mexicanum). *Dev. Biol.* 27: 365-375.
49. HURLE, J.M.; J.M. ICARDO y J.L. OJEDA. 1980. Compositional and structural heterogenicity of the chick embryo tubular heart: a TEM, SEM and histochemical study. *J. Embryol. Exper. Morph.* 56. 211-223.
50. HURLE, J.M. y J.L. OJEDA. 1977. Cardiac jelly arrangement during the formation of the tubular heart of the chick embryo. *Acta Anat.* 98: 444-455.
51. ICARDO, J.M. 1983. Structure and function of the cardiac jelly. *Morf. Norm. y Pat. Sec. A, Hist.* 7: 43-58.
52. ICARDO, J.M. y J.L. OJEDA. 1984. Effects of colchicine on the formation and looping of the tubular heart of the embryonic chick. *Acta Anat.* 119: 1-9.
53. JACOBSON, A.G. 1960. Influences of ectoderm and endoderm on heart differentiation in the newt. *Dev. Biol.* 2: 138-154.
54. JACOBSON, A.G. 1961. Heart determination in the newt. *J. Exp. Zool.* 146: 138-148.

55. JACOBSON, A.G. y M. DUNCAN. 1968. Heart induction in salamanders. *J. Exp. Zool.* 167: 79-103.
56. JACOBSON, M. 1984. Cell lineage analysis of neural induction: origin of cells forming the induced nervous system. *Dev. Biol.* 102: 122-129.
57. JAFFEE, O.C. 1962. Hemodynamics and cardiogenesis I. The effects of altered vascular patterns on cardiac development. *J. Morphol.* 110: 217-226.
58. JANECEK, J.; M. JOHN; H. TIEDEMANN y H. TIEDEMANN. 1984. Inducing activity of subcellular fractions from amphibian embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193: 1-13.
59. JOHNSON, J.B. 1903. The origin of the heart endothelium in amphibian. *Stud. Zool. Lab. West Virginia Univ.* 7: 28-34.
60. JOHNSON, K.E. 1977a. Extracellular matrix synthesis in blastula and gastrula stages of normal and hybrid frog embryos. I. Toluidine blue and lanthanum staining. *J. Cell Sci.* 25: 313-322.
61. JOHNSON, K.E. 1977b. Extracellular matrix synthesis in blastula and gastrula stages. II. Autoradiographic observations on the sites of synthesis and mode of transport of galactose- and glucosamine- labelled materials. *J. Cell Sci.* 25: 323-334.
62. JOHNSON, K.E. 1977c. Extracellular matrix synthesis in blastula and gastrula stages of normal and hybrid frog embryos. III. Characterization of galactose- and glucosamine- labelled materials. *J. Cell Sci.* 25: 335-356.
63. JOHNSON, K.E. 1986. Transplantation studies to investigate mesoderm-ectoderm adhesive cell interactions during gastrulation. *J. Cell Sci.* 82: 99-117.
64. KELLER, R.E. 1975. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of Xenopus laevis. I. Prospective areas and morphogenetic movements of the superficial layer. *Dev. Biol.* 42: 222-241.
65. KELLER, R.E. 1976. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of Xenopus laevis. II. Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer. *Dev. Biol.* 51: 118-137.
66. KOSHER, R.A. y R. SEARLS. 1973. Sulfated mucopolysaccharides synthesis during the development of Rana pipiens. *Dev. Biol.* 32: 50-68.

67. KULIKOWSKI, R.R. y F.J. MANASEK. 1977. Cardiac mutant salamanders: evidence for heart induction. *J. Exp. Zool.* 201: 485-490.
68. LEMANSKI, L.F. 1973. Heart development in the mexican salamander, Ambystoma mexicanum. I. Gross anatomy, histology and histochemistry. *J. Morphol.* 139: 301-328.
69. LEMANSKI, L.F. 1973b. Heart development in the mexican salamander, Ambystoma mexicanum. II. Ultrastructure. *Am. J. Anat.* 136: 487-526.
70. LEMANSKI, L.F. 1973c. Morphology of developing heart in cardiac lethal mutant mexican axolotls, Ambystoma mexicanum. *Dev. Biol.* 33: 312-333.
71. LEMANSKI, L.F. 1978. Myogenesis and inductive processes during heart development in mexican axolotls (Ambystoma mexicanum). *Birth Defects: Original Articles Series.* XIV (7): 179-203.
72. LEMANSKI, L.F.; M.S. MOOSEKER; L.D. PEACHEY y M.R. IYENGAR. 1976. Studies of muscle proteins in embryonic myocardial cells of cardiac lethal mutant mexican axolotls (Ambystoma mexicanum) by use of heavy meromyosin binding and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Cell Biol.* 68: 375-388.
73. LEMANSKI, L.F. y R.A. FULDNER. 1977. Immunofluorescent studies for myosin, tropomyosin and actinin in developing hearts of normal and cardiac lethal mutant salamanders (Ambystoma mexicanum). *J. Cell Biol.* 75: 327c.
74. LEMANSKI, L.F.; B.S. MARX y C.S. HILL. 1977. Evidence for abnormal heart induction in cardiac mutant salamanders (Ambystoma mexicanum). *Science* 196: 894-896.
75. LILLIE, R.D. 1951. Simplification of the manufacture of Schiff reagent for use in histochemical procedures. *Stain Technol.* 26: 163-165.
76. LOFBERG, J.; K. AHLFORS y C. FALLSTROM. 1980. Neural crest cell migration in relation to extracellular matrix organization in the embryonic axolotl trunk. *Dev. Biol.* 75: 148-167.
77. LØVTRUP, S. 1983. Epigenetic mechanisms in the early amphibian embryo: cell differentiation and morphogenetic elements. *Biol. Rev.* 58: 91-130.
78. LØVTRUP, S. y R. PERRIS. 1983. Instructive induction or permissive activation? Differentiation of ectodermal cells isolated from the axolotl blastula. *Cell Differ.* 12: 171-176.

79. MANASEK, F.J. 1968. Embryonic development of the heart. I. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo. *J. Morphol.* 125: 329-365.
80. MANASEK, F.J. 1969. Embryonic development of the heart. II. Formation of the epicardium. *J. Embryol. Exp. Morph.* 22: 233-248.
81. MANASEK, F.J. 1970. Histogenesis of the embryonic myocardium. *Am. J. Cardiol.* 25: 149-168.
82. MANASEK, F.J.; M. REID; W. VINSON; J. SEYER y R.C. JOHNSON. 1973. Glycosaminoglycan synthesis by the early embryonic chick heart. *Dev. Biol.* 35: 332-348.
83. MARKERT, C.L. y H. URSPRUNG. 1973. *Genética del Desarrollo*. (Trad. M. Ortiz Vasquez). U.T.E.H.A. Méjico.
84. MARKWALD, R.R. y W.N. ADAMS SMITH. 1972. Distribution of mucosubstances in the developing rat heart. *J. Histochem. Cytochem.* 20: 896-907.
85. MARKWALD, R.R.; T.P. FITZHARRIS; H. BANK y D.H. BERNANKE. 1978. Structural analysis on the matrical organization of glycosaminoglycans in developing endocardial cushions. *Dev. Biol.* 62: 292-304.
86. MARKWALD, R.R. y F.M. FUNDERBURG. 1983. Use of 6-diazo-5-oxo-1-norleucine to study interaction between myocardial glycoconjugate secretion and endothelial activation in the early embryonic chick heart. *Dev. Biol.* 99: 395-407.
87. MARKWALD, R.R.; R. RUNYAN; G. KITTEN; F.M. FUNDERBURG; D.H. BERNANKE y P. BRAUER. 1984. Use of collagen gel cultures to study heart development: proteoglycan and glycoprotein interactions during the formation of endocardial cushion tissue. In "The role of extracellular matrix in development". R.L. TRELSTAD Ed. Alan R. Liss Inc. pp. 323-350.
88. MARSHALL, A.M. 1890. The development of the blood vessels of the frog. *Stud. Biol. Lab. Owens Collage.* 2: 185-268.
89. MASUI, Y. 1966. Ph-dependence of the inducing activity of lithium ion. *J. Embryol. Exp. Morph.* 15: 371-386.
90. MATSUDA, M. y T. KAJISHIMA. 1980. Effect of conditioned media on the differentiation of amphibian embryonic melanophores. *Acta Embryol. Morphol. Exper. (n.s.)* 1 (3): 165-174.
91. MOLLIER, S. 1906. Die erste Anlage des Herzens bei den Wirbeltieren. *Hertwig's Handb. Vergl. und Exper. Entwickel Wirbeltiere.* 1: 1020-1051.

92. HOOKE, P.B. y L.F. LEMANSKI. 1982. Quantification of tropomyosin by radioimmunoassay in developing hearts of cardiac mutant axolotls, Ambystoma mexicanum. J. Muscle Res. and Cell Motil. 3: 161-167.
93. NAKAMURA, A. y F.J. MANASEK. 1981. An experimental study of the relation of cardiac jelly to the shape of the early chick embryonic heart. J. Embryol. Exper. Morph. 65: 235-256.
94. NAKATZUJI, N. 1975. Studies on the gastrulation of amphibian embryos: cell movement during gastrulation in Xenopus laevis embryos. Wilhelm Roux's Archiv. 178: 1-14.
95. NAKATSUJI, N. 1984. Cell locomotion and contact guidance in amphibian gastrulation. Amer. Zool. 24: 615-627.
96. NAKATSUJI, N. y K. JOHNSON. 1984. Ectodermal fragments from normal frog gastrulae condition substrata to support normal and hybrid mesodermal cell migration "in vitro" J. Cell Sci. 68: 49-67.
97. NEWGREEN, D.F.; M. SCHEEL y V. KASTNER. 1986. Morphogenesis of sclerotome and neural crest in abian embryos. In vivo and in vitro studies on the role of notochordal extracellular material. Cell Tis. Res. 244: 299-313.
98. NIEUWKOOP, P.D. 1947. Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells and on the development of the lateral plates and germ ridges in Urodeles. Arch. Néerl. Zool. 8: 1-205.
99. NIU, M.C. y V.C. TWITTY. 1953. The differentiation of gastrula ectoderm in medium conditioned by axial mesoderm. Proc. Nat. Acad. Sci. 39: 985-989.
100. ORKIN, R.W. y B.P. TOOLE. 1978. Hyaluronidase activity and hyaluronate content of the developing chick embryo heart. Dev. Biol. 66: 308-320.
101. ORTIZ, E.C. 1958. Estudio histoquímico de la gelatina cardíaca en el embrión de pollo. Arch. Inst. Cardiol. Mex. 28: 244-265.
102. ORTS-LLORCA, I.; J. PUERTA FONOLLA y J. SOBRADO. 1982. The formation, septation and fate of the truncus arteriosus in man. J. Anat. 134: 41-56.
103. PASTEELS, J. 1945. Recherches sur l' action du LiCl sur les oeufs des amphibiens. Arch. Biol. 56: 105-183.
104. PATTEN, B.M.; T.C. KRAMER y A. BARRY. 1948. Valvular action in the embryonic chick heart by localized apposition of endocardial masses. Anat. Rec. 102: 299-321.

105. PEARSE, A.G.E. 1980. Histochemistry. Theoretical and applied. Fourth Ed. Churchill Livingstone. London.
106. PISANÓ, A. 1956. Método para mantener fisiológicamente activa la hipófisis de anfibio "in vitro". Arch. de Farm. y Bioq. Tucumán 7: 387-391.
107. RIOU, J.F.; T. DARRIBERE y J.C. BOUCAUT. 1986. Cell surface glycoproteins changes during gastrulation in Pleurodeles walthii. J. Cell Sci. 82: 23-40.
108. ROLL HAUSER-TER HORST, J. 1975. Trunk Neural Crest of Triturus in Sandwich explants. Wilhelm Roux's Archiv. 177: 153-158.
109. ROVASIO, R.A.; A. DELOUVEE; K. YAMADA; K. TIMPL y J.P. THIERY. 1983. Neural crest cell migration: requirements for exogenous fibronectin and high cell density. J. Cell Biol. 96: 462-473.
110. RUGH, R. 1952. Experimental Embryology. Burgess Publishing Co. Minneapolis.
111. RUMYANTSEV, P.P. 1977. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. Inter. Rev. Cytol. 51: 187-273.
112. SAMPSON, L.V. 1904. A contribution to the embryology of Hylodes martinicensis. Am. J. Anat. 3: 473-504.
113. SANCHEZ, S.S.; M.O. CABADA y F.D. BARBIERI. 1983. Newly synthesized extracellular ribonucleic acids in the amphibian gastrula. Cell Differ. 13: 149-157.
114. SANCHEZ, S.S.; P. SALINAS y F.D. BARBIERI. 1984. Distribution of fibronectin in the gastrulating Bufo arenarum embryo. Micr. Electr. Biol. Cel. 8: 81-86.
115. SIEGEL, G.; H. GRUNZ; U. GRUNDMANN; H. TIEDEMANN y H. TIEDEMANN. 1985. Embryonic induction and cation concentrations in amphibian embryos. Cell Differ. 17: 209-219.
116. SISSMAN, N.J. 1970. Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: comparative chronology. Am. J. Cardiol. 25: 141-148.
117. SMITH, J.C. y C.M. MALACINSKI. 1983. The origin of the mesoderm in an anuran, Xenopus laevis and a urodele, Ambystoma mexicanum. Dev. Biol. 98: 250-254.

118. SMITH, R.C. y J. KNOWLAND. 1984. Protein synthesis in dorsal and ventral regions of Xenopus laevis embryos in relation to dorsal and ventral differentiation. Dev. Biol. 103: 355-368.
119. STALSBERG, H. y R.L. DE HANN. 1969. The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. Dev. Biol. 19: 128-159.
120. STERN, C. 1984. A simple model for early morphogenesis. J. Theor. Biol. 107: 229-242.
121. STÖHR, P. 1924. Experimentelle studien on embryonalen Amphibienherzen. I. Uber transplantation embryonaler Amphibienherzen. Arch. F. Mikr. Anat. u Entw. Mech. 102: 426-451.
122. STÖRH, P. 1929. Zur Embryonalen Herz transplantation. Arch. Entwicklungsmech. 116: 300-326.
123. SUZUKI, A.; Y. MIFUNE y T. KANEDA. 1984. Germ layer interactions in patten formation of Amphibian mesoderm during primary embryonic induction. Develop. Growth and Differ. 36: 81-94.
124. TAHARA, Y. y O. NAKAMURA. 1961. Topography of the presumptive rudiments in the endoderm of the Anuran neurula. J. Embryol. exp. Morph. 9: 138-158.
125. THOMPSON, R.P. y T.P. FITZHARRIS, 1979. Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: tissue reorganization during septation. Am. J. Anat. 156: 251-264.
126. TIEDEMANN, H. 1986. The molecular mechanism of neural induction: neural differentiation of Triturus ectoderm exposed to Hepes buffer. Roux'Arch Dev. Biol. 195: 399-402.
127. TOIVONEN, S. 1979. Transmission problem in Primary-induction. Differentiation 15: 177-181.
128. TOIVONEN, S.; D. TARIN; L. SAXEN; P.J. TARIN y J. WARTIOVAARA. 1975. Transfilter studies on neural induction in newt. Differentiation 4: 1-6.
129. TOIVONEN, S. y J. WARTIOVAARA. 1976. Mechanism of cell interaction during primary induction studied in transfilter experiments. Differentiation 5: 61-72.
130. VOGT, W. 1929. Gestaltungsanalyse an Amphibienkeirn mit örtlicher Vitolffärbung. II. Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. Roux'Arch. f. Entw. mech. d.Org. 120: 384. 706.

131. WEISS, P. 1939. Principles of development. Holt, Reinhardt and Wiston EDS. New York.
132. WIENS, D. and B.S. SPOONER, 1983. Actin isotype biosunthetic transitions in early cardiac organogenesis. Eur. J. Cell. Biol 30: 60-66.
133. WIENS, D.; M. SULLINS and B. SPOONER. 1984. Precardiac mesoderm differentiation in vitro. Actin-isotype synthetic transitions, myofibrilogenesis, initiation of heart beat, and the possible involvement of collagen. Differentiation 28: 62-72.
134. WILLENS, S. 1955. The migration of heart mesoderm and associated areas in Ambystoma punctatum. J. Exp. Zool., 129: 579-605.

ADDENDUM

RESULTADOS PUBLICADOS Y PRESENTACIONES A CONGRESOS
DE TEMAS INHERENTES A LA TESIS

A. PUBLICACIONES

PAZ, D.A. and A. PISANÓ. 1985. Inductory Action of the Endoderm During Cardiac Area Differentiation. *Com. Biol.* 3(4): 423-430.

PAZ, D.A. and A. PISANÓ. 1987. Histogenesis of embryonic heart in Bufo arenarum. A light, SEM and Histochemical study. Enviado a publicación.

PAZ, D.A. y A. PISANÓ. 1987. Diferenciación de territorios cardíacos mantenidos en explante. (En traducción).

B. PRESENTACIONES A CONGRESOS.

PAZ, D.A. y A. PISANÓ. Explantes y trasplantes de esbozo cardíaco en embriones de Bufo arenarum. II Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Rosario. 1983.

PAZ, D.A. y A. PISANÓ. Acción inductora del endodermo durante la diferenciación cardíaca en Bufo arenarum. VII Jornadas Argentinas de Zoología. Mar del Plata. 1984.

PAZ, D.A. y A. PISANÓ. Diferenciación de territorios cardíacos mantenidos en explante. III Jornadas Científicas Soc. de Biología de Córdoba. 1986.

PAZ, D.A. y A. PISANÓ. Diferenciación del área cardíaca en Bufo arenarum. IV Jornadas Científicas Soc. de Biología de Córdoba. 1987.

