

85



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA UNIDAD  
CARDIOPULMONAR DE Ambystoma mexicanum  
(Amphibia: urodela)

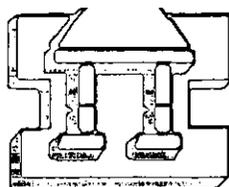
TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

MUNGUÍA ROSAS MIGUEL ÁNGEL



IZTACALA

MÉXICO, D.F.

297405

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

AGOSTO, 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevo acabo en el Departamento de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" bajo la dirección de la Doctora en Ciencias, Concepción Sánchez Gómez y fue apoyado por el Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto:27922-N.



LA CIENCIA ENTERA NO ES SINO UN REFINAMIENTO DE LO QUE  
PENSAMOS TODOS LOS DIAS.....

*ALBERT EINSTEIN*

*El ambystoma cual salamandra gigante  
Prolifera en charcas y estanques  
Como otras desea, cosa fija,  
Tener un montón de renacuajos como hijas.*

*Estos ajolotes tienen branquias  
Para respirar bajo las aguas  
Pero mientras se transforma  
En nueva salamandra  
En su estanque viven perdidas y errantes.*

*Cambian solo bajo impulsos,  
Cuando en el charco son muchos,  
Pues entonces han de usar  
pulmones para respirar  
y salir fuera a la orilla  
Pero sí sienten del lago la atracción  
Lleno de alimento y buena aireación  
Mantienen de joven perpetua situación  
Y dan más renacuajos con su  
Reproducción.*



\*Poema escrito por el zoólogo británico Walter Garstang dedicado a los ambystomas, en el que deja ver sus concepciones sobre el ciclo de vida, la relación de la neotenia con presiones ambientales y el cambio en cuanto a respiración que se da con la metamorfosis en estos organismos.

## *DEDICATORIAS .....*

*A mis padres, quienes fueron mis primeros maestros, gracias por sus clases de dedicación, humildad; por enseñarme a luchar por un ideal, a realizar con amor mi trabajo, por dejarme ser yo mismo y por apoyar con tanto sacrificio mi obsesión por ser Biólogo.....Aquí les traigo la primera recompensa a sus esfuerzos.....gracias.*

*A mi Universidad la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. Como digiera Santiago Genovés....Bendita Universidad.....*

*A ti mi compañera de viaje.....Brenda T. H.....Gracias por tu apoyo.*

*En memoria de la Dra. María Victoria de la Cruz, quien fue la que me aceptó como becario en su laboratorio e inicio la dirección de mi trabajo de tesis, falleciendo a un mes de haber iniciado el estudio, sobreviven una gran cantidad de publicaciones en el campo del desarrollo cardiaco, testimonio de una gran investigadora.*

## *AGRADECIMIENTOS.....*

Le quiero dar mi más grande agradecimiento y reconocimiento a la Dra. Concepción Sánchez Gómez, por no dejarme huérfano de tutor de tesis cuando falleció la Dra. De la Cruz, por ser una persona que sabe enseñar pero también sabe aprender, por saber contagiar su pasión por la ciencia, por las lecciones de redacción, anatomía, embriología y gastronomía. También quiero agradecerle por dejarme conducir el trabajo hacia mis intereses académicos personales y seguirme asesorando, aunque me saliera de la línea de investigación del departamento.

Al personal del Departamento de Biología del Desarrollo y teratogenesis Experimental del Hospital Infantil de México "Federico Gómez":

Dr. Manuel Arteaga y la Dra. Isabel García por su apoyo desinteresado en la presentación del trabajo en foros, en el manejo de imágenes, por prestarme su equipo y por lo que se me olvidó.

M. en C. Laura Villavicencio, por los concejos, tu equipo y por todo el apoyo brindado.

A los técnicos Lidia Blancas, Lucía Lima, Oswaldo Aguirre, Inés Jurado, y la Q.F.B. Marcela Salazar por el apoyo brindado en la parte histológica.

Al señor fotógrafo, Mario Jáuregui por su arte en la fotografía, un millón de gracias.

A la secretaria del departamento María Félix por llevar toda la carga administrativa durante mi estancia en el departamento.

A mis compañeros estudiantes por hacerme ameno el día: Liliana, Alex, Carmela.

Quiero agradecer también a los investigadores extranjeros:

Dr. Luis O. Cimarosti, por la cátedra de histología, por las correcciones y observaciones al trabajo.

Dr. Hobart Smith de la Universidad de Colorado mil gracias por su libro, las referencias y los artículos.

Susan Duhon y Sandra Boarland de la colonia de ajolotes de Indiana por los ejemplares del Axolotl News Letter y los artículos que no hubiera encontrado en México.

A mis profesores adictos a la Biología, por contagiarme su pasión y sus vicios: Ismael Ledesma Mateos, Aurelio Ramírez Bautista, Diodoro Granados, Jorge Gersenowies y Claudia Diez de Bonilla (una Bióloga *honoris causa*).

A las personas que me asesoraron en el manejo de los organismos: Biol. Jorge Ensastegui del parque ecológico de Xochimilco, Biol. Amaya G. y Biol. Enrique G. del laboratorio de hepertología de la FES Iztacala.

A mis amigos de la Fes Iztacala, que compartieron conmigo el gusto (y los que ni tanto) de estudiar Biología: Maru, Mayra, Mónica, Irving, Manolo, Nelly, pollo, Gaby (la del herbario), Gaby Dávila, Karla, Mariana, Horacio, Julio, Víctor (chaparro), Jorge (Cerebro), Marisol, Josué, Lupe, Angustias (sin tu comida no hubiera terminado mis estudios) y los que por cuestiones de espacio no los pude incluir.

A mis compañeros del C.C.H. Azcapotzalco: Ana T. (ya ves como sí pude), Ismael, Aidé, Rosa, Karina, Zainos, Eleazar, M. Alcántara, Los metal maniacos ...por que el metal nos da poder!!!!....y todo el Under ground de aquellos tiempos tan oscuros.....

A mis compañeros de la secundaria que aun recuerdo: Emilio, Oscar Ramón, El loco, Pinacho, Eric.

*Sinceramente Miguel A. Murguía Rosas.....*

---

ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA UNIDAD  
CORDIOPULMONAR DE *Ambystoma mexicanum*  
(Amphibia:Urodela).

---



# INDICE

	PAG.
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
ANTECEDENTES.....	8
ACERCA DEL ORGANISMO EN ESTUDIO .....	11
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17
RESULTADOS .....	23
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	46
LITERATURA CITADA.....	48
FIGURAS (RESULTADOS).....	52
APÉNDICE "1" TÉCNICA EMPLEADA PARA CIRUGÍA EN EL CORAZON DE AJOLOTE.....	83
APÉNDICE "2" TÉCNICA DE MILTON Y CHARLES MODIFICADA PARA INYECCIÓN CARDIVASCULAR EN EL CORAZON DE AJOLOTE.....	87
APÉNDICE "3" CORAZON DE APODO.....	91
APÉNDICE "4" CORAZON DE ANURO.....	92
APENDECE "5" CORAZON DE PEZ PULMONADO.....	93
ESQUEMA "1" REPRESENTACIÓN DEL CORAZON DE AJOLOTE.....	95
ESQUEMA "2" DIAGRAMA GENERAL DE CIRCULACIÓN EN EL AJOLOTE.....	96
ESQUEMA "3" DISPOSICIÓN DE ARCOS AORTICOS, CORAZON Y PULMON DEL AJOLOTE.....	97

## Resumen

---

*Ambystoma mexicanum* actualmente es considerado uno de los anfibios más importante como sujeto de experimentación, sin embargo, no se tiene una descripción detallada de su corazón, solo existen trabajos en los que se aborda el tema conjuntamente con otros *taxa* de forma muy somera o en el campo de fisiología donde la anatomía queda en segundo plano. En la literatura reciente predominan estudios sobre la Biología del desarrollo, regeneración y biología molecular, en éstos estudios la parte anatómica se ha cubierto tomando la referencia de organismos taxonómicamente cercanos, pero se ha olvidado que la anatomía cardíaca refleja más el modo respiratorio predominante y el estilo de vida que una relación taxonómica muy estrecha. Con la finalidad de describir las características morfológicas realizar la descripción del corazón de este organismo, compararlo con otros grupos de anfibios y discutir la relación que existente entre la anatomía del corazón y del pulmón y la neoténia, se realizaron estudios de anatomía macroscópica, microdisecciones, histología, microscopía electrónica de barrido, grabaciones en vídeo y se llevó acabo la inyección vía ventricular de una masa gelatinosa tomando como base la técnica de Milton y Charles (1971). Se encontró que el corazón del ajolote exhibe el patrón básico que se observa en los anuros y la mayoría de los anfibios: tiene un seno venoso y un bulbus cordis no integrados al corazón, dos atrios y un ventrículo, el polo arterial está constituido por un tronco arterial y cuatro pares de arcos aórticos con ducto carotideo y ducto arterioso persistentes. Las principales diferencias con los anuros (grupo más representativo de la clase) es una comunicación en el septum interatrial, la ausencia de cuerdas tendinosas en la válvula atrio ventricular, la falta de un arreglo en grupos de las trabéculas del ventrículo y una muesca entre la válvula espiral del bulbus cordis y el septum principal del tronco arterial, esta ultima característica conjuntamente con la comunicación interatrial se ha asociado a la predominancia de las respiraciones no pulmonares. En el ajolote debe darse un fenómeno semejante, ya que la neoténia involucra la retención de las branquias y un estilo de vida acuático, sin embargo, no existe una atrofia tan severa en estas estructura como la sucede en otros urodelos neoténicos como *Necturus sp.* Al estudiar los pulmones se encontró que tiene una organización compleja: están altamente vascularizados y compartimentalizados y son de gran volumen, a pesar que se ha reportado que la metamorfosis es un evento importante para la maduración pulmonar y el estilo de vida del organismo. Supongo que los pulmones son funcionales pese a las características larvales, ya que las aguas que habita son hipóxicas y la demanda de oxígeno no puede satisfacerse del todo con las respiraciones no pulmonares y tiene que salir a la superficie y respirar aire con oxígeno. La atrofia de las estructuras auxiliares en la separación sanguínea se debe a que existe sangre oxigenada tanto en el atrio izquierdo (proveniente de pulmones) como en el atrio derecho (proveniente de respiraciones no pulmonares y sangre sistémica) por lo que no se requiere mantener una separación sanguínea. Cuando existe una buena oxigenación del agua, las respiraciones no pulmonares pueden satisfacer la demanda total de oxígeno de los distintos órganos incluyendo el pulmón, ya que el arco pulmocutáneo pasa por las branquias antes de llegar a los pulmones.

## INTRODUCCION

---

Clásicamente el corazón de los anuros ha sido considerado el más representativos (en la mayoría de sus características) del corazón ancestral de los tetrápodos, además de ser el grupo cuyo patrón de circulación sanguínea se considera como el patrón general de la clase *amphibia* (Holmes, 1976). Debido a estos hechos se realizará a manera de introducción, la descripción de la anatomía cardiaca de este orden que se ha tomado como un modelo general para toda la clase.

El corazón de los anuros se encuentra en el tórax y dentro de la cavidad pericárdica, de tal manera que las cámaras cardiacas y accesorias se observan prácticamente de frente. Los atrios están en posición cefálica con respecto al ventrículo y el bulbus cordis en posición ventral derecha con respecto a los atrios. El ventrículo tiene la forma de un cono invertido cuyo ápice apunta en dirección caudal; el tamaño del ventrículo es mayor con respecto a los atrios (De la Cruz, et al. 1999) (Fig. 1). El seno venoso drena al atrio derecho, mientras que al izquierdo llega el seno de las venas pulmonares. Ambos atrios están separados por un septum interatrial completo; en muchos casos el atrio derecho es más grande que el izquierdo y puede ocupar un espacio considerable a la izquierda del bulbus cordis (Lawson, 1979 a). Los atrios se abren al ventrículo por medio del orificio atrioventricular compuesto por dos valvas, una dorsal y otra ventral que se insertan a la pared ventricular y son tensadas por cuerdas tendinosas y lo dividen en dos tractos de entrada, uno derecho y otro izquierdo (Van Mierop, et al. 1985).

El ventrículo es único (no septado) de paredes esponjosas, con trabéculas organizadas en grupos; el ventrículo se continúa con el bulbus cordis a través del orificio bulboventricular localizado en la porción derecha de la cavidad ventricular, en este orificio está presente la válvula semilunar proximal que consta de tres velos valvulares tensados a la pared del bulbus cordis mediante cuerdas tendinosas (Van Mierop y Kutsche, 1984).

El bulbus cordis está bien desarrollado, presenta un septo delgado en forma espiral (válvula espiral) que lo divide en dos canales, uno sistemocarotideo y otro pulmocutáneo; dicha válvula corre en dirección de izquierda dorsal a derecha ventral y se inserta por su borde dorsal a la pared del bulbus cordis, mientras que su borde ventral es libre, lo que permite que durante la diástole bulbar haya un flujo entre ambos canales, por lo que la separación de los torrentes sanguíneos no es completa. En la porción distal del bulbus cordis, existe un par de válvulas bicúspides, una en el canal pulmocutáneo y otra en el sistemocarotideo, esta última es la más desarrollada (Lawson, 1979 a).

El bulbus cordis se continúa con la aorta ventral o tronco arterial, segmento muy corto que se bifurca casi inmediatamente en una rama derecha y otra izquierda, ambas de igual talla. La válvula espiral del bulbus cordis en su porción distal se fusiona con el septum principal del tronco arterial, el cual se prolonga en el interior de ambas ramas lo que permite la continuidad de los canales, el pulmocutáneo dorsal y el sistemocarotideo ventral. La anatomía general interna del corazón de anuro se ilustra en la figura 2. Existe otro septum en el interior del tronco arterial denominado septum médium, el cual surge a partir del septum principal formando un ángulo recto y se extiende en un plano sagital dividiendo el compartimiento sistemocarotideo del tronco arterial en un canal derecho de tamaño regular y un canal izquierdo más pequeño (Fig. 3), el canal derecho se continúa en el cuarto arco derecho formando los dos canales carotideos, mientras que el lado

---

izquierdo da origen a la arteria subclavia y se continua con la aorta dorsal, que irriga la extremidad superior derecha y el resto del cuerpo excepto el tracto digestivo (Van Mierop y Kutsche, 1984).

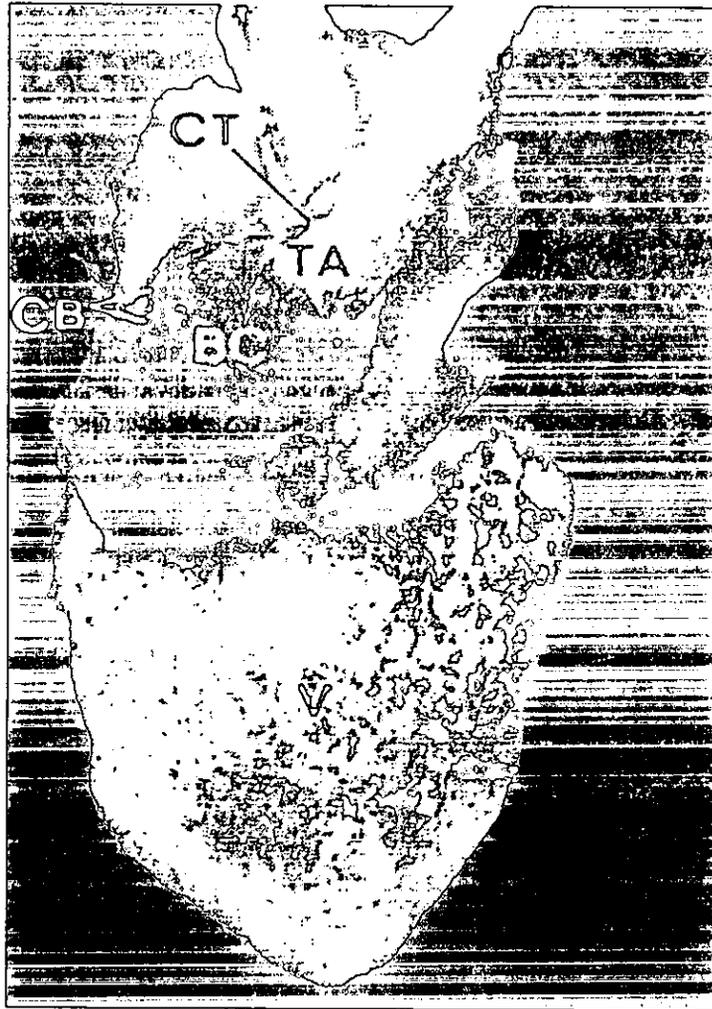


Figura. 1. Fotografía de vista ventral de corazón de *Rana pipiens*. V = ventrículo, BC = bulbus cordis, TA = tronco arterial, CB = vasos coronarios, CT = tronco coronario. (tomado de De la Cruz, et al. 1999).

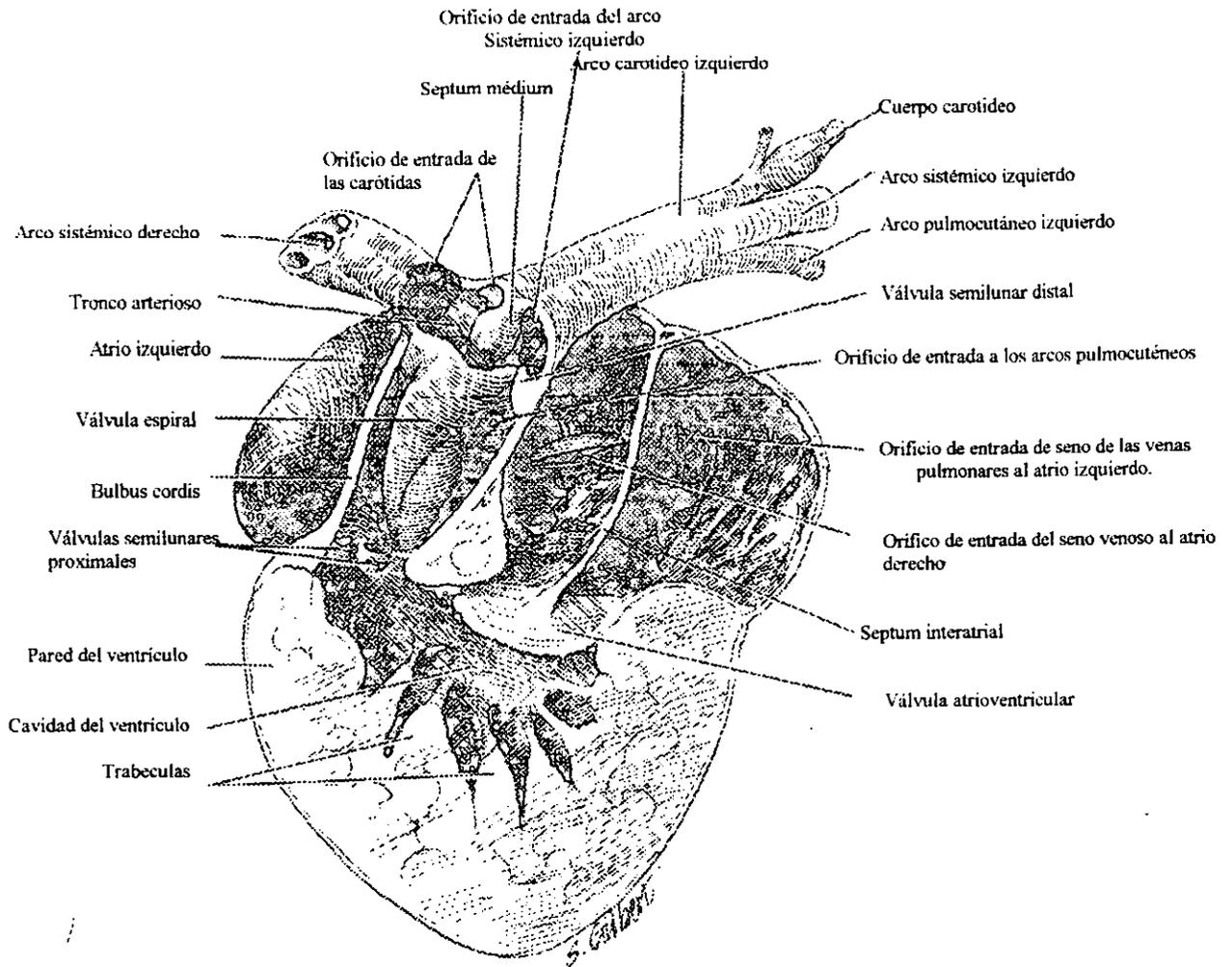


Figura. 2. Esquema de anatomía interna de corazón de anuro. (tomado de Lawson, 1979 a)

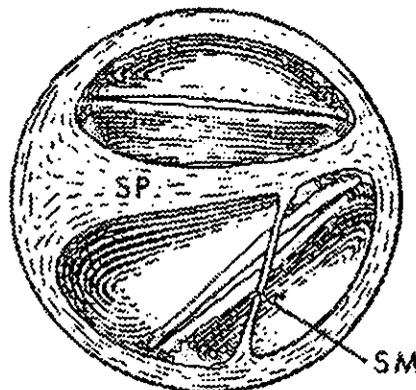


Figura. 3. Esquema de la región basal del tronco arterial. SP=septum principal, SM=septum médium. (tomado de Van Mierop y Kutsche, 1984).

En los anuros solo prevalecen 3 de los 6 pares de arcos aórticos que aparecen en el cordado ancestral y en el embrión de los vertebrados (III, IV, VI). El par III se extiende cefálicamente y forma las carotidas, una externa (ventral) y otra interna (dorsal). El par IV es un arco sistémico, éste en estadios larvarios está unido al arco III por el ducto carotideo. El par VI es pulmocutáneo y en los adultos suplementa de sangre a los pulmones constituyendo las arterias pulmonares. En los estadios larvales este par de arcos presenta un conducto que los comunican con la aorta dorsal, llamado "ducto arterioso", tanto el ducto carotideo como el ducto arterioso se pierden con la metamorfosis (Fig. 4) (Torrey, 1978). La presencia en el corazón de los anuros de dos atrios (derecho e izquierdo), una cavidad ventricular compartimentalizada (con dos tractos de entrada y una región apical trabeculada), un bulbus cordis con una válvula espiral, una válvula en su región proximal (bulboventricular) y dos en su región distal (bulbotruncales), así como la disposición del septum principal del tronco, son características anatómicas indicativas de que este grupo es el primer *taxa* dentro de los tetrápodos en el que se establece la separación entre la sangre arterial y venosa (Johansen y Burggren, 1980).

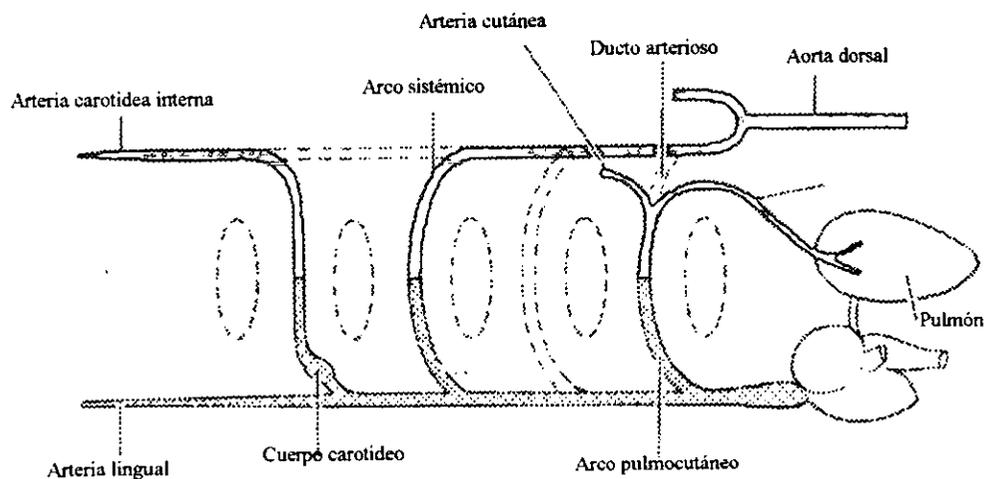


Figura. 4. Esquema de los arcos aórticos de anuro. En líneas punteadas se muestran las estructuras que se pierden con la metamorfosis (tomado de Lawson, 1979 a).

El hecho de que los anuros sean en cuanto a la anatomía cardíaca el grupo más representativos de los anfibios actuales y se consideren como el modelo básico del corazón ancestral de los tetrápodos, no implica que todos los anfibios sigan un mismo patrón, pues los anfibios actuales son extremadamente diversificados y han desarrollado muchas adaptaciones secundarias (Johansen y Hanson 1968). Algunas se consideran desviaciones y / o regresiones de la línea evolutiva principal del corazón de los anfibios, que está claramente representada en los anuros, hablar de un patrón general de anatomía cardíaca en la clase *Amphibia* es claramente inapropiado (Burggren, 1988). Generalmente se piensa que los organismos de un mismo *taxa* tienen características anatómicas similares, sin embargo en los anfibios, actualmente existe una tendencia a considerar que la anatomía cardíaca refleja más el estilo de vida y el modo respiratorio predominante que una relación taxonómica muy estrecha ( Burggren,1988; Lawson, 1966,1979 a).

## ANTECEDENTES

---

*Ambystoma mexicanum* es uno de los anfibios más utilizados como sujetos de experimentación (Smith, 1971, 1989), en la investigación en general y en diferentes aspectos del desarrollo cardíaco. Sin embargo, no existe una descripción morfológica detallada del corazón en esta especie en particular, solo se conocen algunos trabajos donde se aborda el tema en diversos taxas, conjuntamente con otros órganos y sistemas (anatomía comparada) como los de Cuvier (1865), Fritsh (1869), Weichert (1951) y Eaton, et al. (1960). También existen trabajos en el campo de la fisiología en los que la anatomía cardíaca queda en un segundo plano como el de Terhail (1942). Estos trabajos nos dan solo una escasa e incompleta información y además es de llamar la atención su antigüedad. Smith (1971) señala además que los trabajos realizados en el siglo antepasado (Cuvier, 1865 y Fritsh, 1869) fueron hechos en material *postmortem* mal preservado. Estos textos hoy en día son muy difíciles de conseguir debido a su antigüedad y a las características de las publicaciones.

Antecedentes importantes para nuestro estudio, son trabajos más modernos realizados en otras especies de anfibios, por ejemplo, Lawson (1966) realiza la descripción del corazón de *Hypogeophis rostratus*, Van Mierop y Kutsche (1984) y Van Mierop et al (1985) la de *Bufo marinus*, el trabajo de Sharma (1957) en *Rana pipens* que es retomado por De la Cruz et al (1999) centrándose en los vasos coronarios, mientras que Johansen y Hanson (1968) incluye en su trabajo una breve descripción de *Amphiuma tridactylum* y trabajos originales sobre corazón y pulmón incluidos en libros como el de *Necturus* realizado por Lawson (1979 a,b).

Por ultimo tenemos los antecedentes donde se relaciona la forma respiratoria con la arquitectura cardiaca, que nos permiten reforzar nuestro planteamiento y elaborar una hipótesis. Por ejemplo; Goodrich (1930), menciona que en algunas salamandras acuáticas y / o neoténicas la válvula espiral puede estar reducida o ausente y además Johansen y Hanson (1968) apunta que su anatomía y la administración de sus sistemas respiratorios es más parecida a la de los peces pulmonados que a la de otros anfibios. Boas (1882) y Lawson (1966, 1979 a) señalan que en algunos apodos, los cuales usan la piel como el principal órgano de intercambio gaseoso, la válvula espiral del bulbus cordis y el septum interatrial están muy reducidos. Un caso extremo lo cita Bruner (1900) en salamandras que carecen de pulmones (*pletodontidae*), en ellas el bulbus cordis es poco desarrollado, el septum interatrial puede no desarrollarse y el arco pulmocutáneo degenera en una arteria cutánea simplemente y finalmente el descrito en salamandras acuáticas (Johansen y Hanson, 1968), cuya circulación nos recuerda más a los peces pulmonados (*Dipnoi*) que a los urodelos o anuros. Por otro lado está Figge (1930) citado en Weichert (1951) quien después de sus trabajos sobre metamorfosis en *Necturus* plantea que como consecuencia de la fijación de la neotenia, se pueden dar cambios importantes en el patrón de arcos aórticos, específicamente en el arco pulmocutáneo debido a la predominancia de la respiración branquial y la hemodinamia. Un experimento citado en Weichert (1951) trata de comprobar esta hipótesis ligando el arco pulmocutáneo en salamandras no neoténicas (*Ambystoma tigrinum*) y ver si esto repercute en la metamorfosis, el resultado fue que a diferencia de los controles los organismos ligados no sufren metamorfosis después de la inyección intramuscular de la hormona tiroidea T4 intramuscular. También tenemos el trabajo de Garber (1930), él extirpa el pulmón de *A. mexicanum* e induce la metamorfosis y observa que a pesar de la pérdida de las branquias por la metamorfosis y la ausencia de los pulmones, el organismo se mantiene

vivo por un par de meses, en base a esto él plantea que la respiración cutánea debe ser muy importante en la oxigenación sanguínea.

## ACERCA DEL ORGANISMO EN ESTUDIO

---

Según Smith (1971) *Ambystoma mexicanum* taxonomicamente esta agrupado dentro de las siguientes taxas :

Phylum: *chordata*.

Subphylum: *vertebrata*.

Superclase: *tetrapoda*.

Clase: *amphibia*.

Subclase: *lisamphibia*.

Orden: *urodela*.

Familia: *ambystomidae*.

Género: *ambystoma*.

La familia *ambystomidae* es un grupo de salamandras distribuidos únicamente en el reino neartico. Es un organismo endémico de los lagos de Xochimilco que se distingue por ser neoténico obligado inducible (Norris, 1985), categoría dada por ser un organismo que de forma natural no sufre metamorfosis, pero se le puede inducir de formas artificial por la inyección de la hormona tiroidea T4. La neotenia en el ajolote es debida a que la hipófisis no produce la cantidad suficiente de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), necesaria para estimular la producción de la tiroxina en la glándula tiroides. Este mecanismo no es exactamente el mismo que opera en otros organismos neoténicos, pero se ha determinado que en todos está involucrado el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides-tejidos y órganos blanco; lo que varía es el punto específico en donde se da la modificación (Khun y Jacob, 1989).

Morfológicamente, *A. mexicanum* como la mayoría de las larvas de ambystomatidos, tiene una cabeza deprimida, presenta una cola postanal musculosa con una aleta caudal que ocupa aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de la longitud hocico cloaca, que en organismos sexualmente maduros es de 16 a 24 cm. Posee tres ramas principales de branquias externas, que pueden llegar a ser muy plumosas, dependiendo de su actividad respiratoria, cuenta con una serie de pliegues a los costados que funcionan como una extensión en la superficie respiratoria. El cuerpo es cilíndrico, la coloración va del verde oscuro a negro (larva y adulto), existen variedades albinas pero éstas fueron obtenidas en el laboratorio, poseen cuatro dedos en extremidades anteriores y cinco en posteriores, sin membranas interdigitales; en organismos metamorfoseados se presentan párpados (Armstrong y Malacinsky, 1989) (Fig. 5).

*A. mexicanum* presenta una reproducción estacional, la puesta se da entre octubre y febrero, su tamaño promedio es de 660 huevos. El desarrollo embrionario dura 2.5 semanas a 18°C, al momento de la eclosión, las larvas miden 1cm aproximadamente; alcanzan su madurez sexual entre los 10 y 18 meses de vida, su periodo reproductivo dura de 5 o 6 años y su vida total en cautiverio es hasta de 10 años (Armstrong y Duhon, 1989).

La denominación ajolote es dada en México a cualquier larva de salamandra, es una traducción al español de la palabra náhuatl axolotl que quiere decir perro de agua; los primeros exploradores españoles lo describían como un pez de cuatro patas, pero más tarde en París, Cuvier establecería su identidad, trabajos que se publicarían en 1865, él lo denominó como: "una larva de una salamandra desconocida", al mismo tiempo iniciaría su carrera como objeto de investigación debido a la facilidad de reproducirlo en

cautiverio. Su fama se extendió a todo el mundo hasta convertirse en la actualidad en el animal mexicano más conocido y junto con *Xenopus laevis* los anfibios más utilizados en investigación (Smith, 1989).

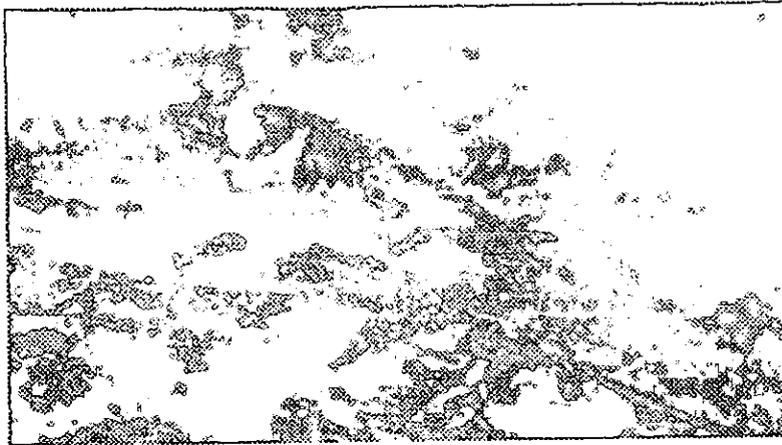
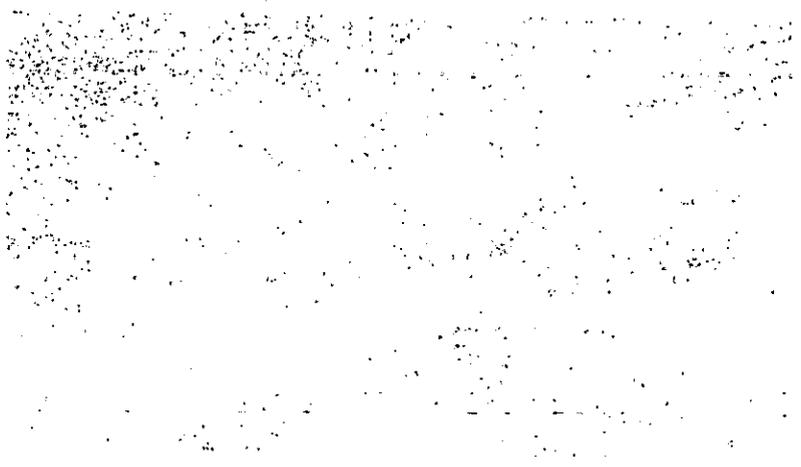


Figura. 5. Apariencia externa del ajolote: *Ambystoma mexicanum*

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..



... ..

## JUSTIFICACION

---

En el presente trabajo, se realiza una descripción detallada de la morfología cardíaca y pulmonar específica del ajolote, que no existe en la literatura; principal justificación de nuestra investigación. Este trabajo cobra mayor importancia si tomamos en cuenta que el ajolote actualmente es un modelo biológico de experimentación muy utilizado y que el conocer la anatomía cardíaca es algo fundamental para entender otros procesos a niveles más finos, tales como la cardiogénesis y la fisiología cardiovascular. Por otro lado, al conocer de forma integral la morfofisiología del corazón de los anfibios, resultan un buen modelo en la investigación de los patrones hemodinámicos de los estadios tempranos del desarrollo de los vertebrados superiores, incluido el humano (Burggren, 1988 y Sedmera et al, 2000). Además, nuestros hallazgos sobre la anatomía cardíaca y pulmonar de *A. mexicanum* serán una herramienta útil al realizar estudios comparativos para explicar la evolución del grupo de los anfibios y de los tetrápodos (Holmes, 1976).

## HIPOTESIS

---

La metamorfosis en anfibios es un proceso que involucra eventos tales como la absorción de las branquias, la maduración pulmonar (adelgazamiento de los epitelios respiratorios, actividad secretora, aumento de tamaño y vascularización) (Coleman y Hessler, 1996), la pérdida del ducto arterioso y ducto carotideo en el polo arterial, así como la terminación del desarrollo de estructuras auxiliares en la separación sanguínea, ya que con la metamorfosis estos organismos pasan de tener una respiración predominantemente branquial a una predominantemente pulmonar. *A. mexicanum*, es un organismo neoténico, es decir no sufre metamorfosis, por lo tanto retiene las branquias y no sufre las modificaciones a nivel cardíaco y pulmonar que traen consigo la metamorfosis, por lo que esperamos que las estructuras cardiovasculares asociadas a la separación sanguínea y el pulmón sean poco desarrollados o estén en proceso de atrofia debido a los requerimientos hemodinámicos y respiratorios propios de un organismo con una respiración no pulmonar predominante.

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Describir las características morfológicas del corazón y el pulmón de *Ambystoma mexicanum* y discutir las relaciones que existen entre ellos y de que manera la morfofisiología de un órgano puede influenciar la del otro.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Hacer una descripción anatómica e histológica del corazón y pulmón del organismo en estudio.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos con los conocimientos que existen al respecto en otros anfibios, principalmente con los anuros, por ser más representativos de la clase *Amphibia*, así como con los apodos y otros urodelos.
- ❖ Discutir si la neotenia y sus implicaciones a nivel respiratorio intervienen en la definición de la arquitectura cardíaca.

## MATERIALES Y METODOS

---

---

Se adquirieron 18 organismos vivos y 2 cadáveres (fijados por congelación a una temperatura de  $-2^{\circ}\text{C}$ .), sexualmente maduros, así como 6 larvas de *Ambystoma mexicanum*, de la colonia de ajolotes de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (U.N.A.M.) la especie se corroboró de acuerdo a las claves de Smith y Taylor (1942). En el corazón, se realizaron estudios de anatomía macroscópica, microdisecciones, histología, microscopia electrónica de barrido y grabaciones en vídeo. Para el pulmón se realizaron estudios de anatomía macroscópica, histología y microscopia electrónica de barrido.

Además para dar seguimiento a los principales vasos de entrada y de salida del corazón, se llevó a cabo una inyección cardiovascular de una mezcla de gelatina-octanol-fenol por la técnica de Milton y Charles (1971), "masa de Milton y Charles".

### I. Estudios del Corazón

#### A) Anatomía macroscópica

Para poder realizar el estudio de anatomía macroscópica del corazón de *A. mexicanum* se hizo una incisión en la línea media ventral a nivel de la cintura escapular y cuello, se disecó la membrana pericárdica para dejar expuesto el corazón y polo arterial, toda la cirugía se llevó a cabo sobre una cama de parafina en una charola de disección, en medio de operación para urodelos (apéndice 1). En los organismos vivos, el

procedimiento se realizó previa anestesia con benzocaína al 0.6% (Variable, 1985) (apéndice 1), para que permanecieran con vida y realizar una vídeo grabación para tener un registro dinámico de la actividad del corazón (sección I – E). Posteriormente se fijó el corazón por perfusión, inyectando una solución salina ayudados con una sonda y una jeringa hipodérmica. Debido a que el corazón es un órgano hueco, lleno de sangre y para evitar el colapso de las cavidades, primero se introdujo el ringer para anfibios (apéndice 1) para lavar el órgano y después el fijador (formalina 3.4%). Tanto los corazones obtenidos de material *in vivo* como los de material *postmortem* fueron sometidos a una sesión fotográfica bajo un microscopio estereoscópico.

#### B) Micro disecciones

Las características internas de las diferentes estructuras que constituyen el corazón y cámaras asociadas, se investigaron realizando disecciones longitudinales de la región atrial, el ventrículo, el bulbus cordis y el tronco arterial; también se hicieron disecciones a nivel de los pisos valvulares atrioventricular y bulboventricular. Con el propósito de hacer evidentes los diferentes septos, trabeculas y sistemas valvulares de las distintas cámaras cardiacas, seno venoso, bulbus cordis y polo arterial, dichas estructuras se tiñeron usando pequeños filamentos de vidrio, cubiertos con una mezcla de azul de metileno (1%) y agar (2%) en proporción 1:1. Para analizar la conexión interna que se establece entre las diferentes cámaras cardiacas y el destino de los conductos y vasos principales, se utilizaron pequeños trozos de cabellos, a manera de sondas, que se deslizaron dentro de los orificios senoatrial, atrioventricular, bulbotruncuales, venas pulmonares y arcos aórticos. En todos estos casos los especímenes se estudiaron y se fotografiaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

### C) Histología

Se utilizaron cinco organismos adultos, a los que previamente se les realizó una cirugía y se les fijó como ya se mencionó anteriormente. Las piezas anatómicas se deshidrataron en un tren de alcoholes: 30%, 50%, 60%, 70%, 90%, 96% y 100%, dándoles cambios de 30 minutos a las primeras cinco concentraciones y 2 de una hora en las concentraciones restantes, se aclararon con xilol y se incluyeron en parafina, imprimiéndoles presión con la ayuda de una bomba de vacío para sacar el aire del interior del órgano si fuese necesario. Se realizaron cortes sagitales y transversales de 5 micras de grosor en un micrótopo (Leitz 1512), que se tiñeron con la técnica tricrómica de Masson (modificada de Goldner, tomada de Aguilar et al). La descripción y obtención de material fotográfico, se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico y un óptico. También se empleó el software Vidcap para digitalizar las imágenes.

### D) Microscopia electrónica de barrido

Parte del material obtenido de las microdisecciones se procesó para analizarse con el microscopio electrónico de barrido (Jeol SME 5300). Se estudiaron muestras del piso válvula atrioventricular, ventrículo, bulbus cordis y tronco arterial. Para preparar estos especímenes, una vez hecha la disección se sujetaron con pequeños alambres de cobre en un trozo de corcho, para evitar que se cerraran durante la desecación. Se deshidrataron en un tren de alcoholes: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 % un baño de 15 minutos cada uno, en el alcohol absoluto se dieron dos cambios de 20 minutos cada uno. Inmediatamente después se desecaron por punto crítico usando CO<sub>2</sub> líquido, en un

aparato Samdri 780A, se colocaron en un portamuestras de cobre y se recubrieron con una delgada capa de oro de un grosor de 35nm, usando un aparato Dentun Vaccun Desk-1.

#### E) Video grabaciones

Para realizar un análisis dinámico de la actividad del corazón, se llevó a cabo la grabación en video de organismos adultos y larvas de reciente eclosión, después de exponer el corazón, mediante el procedimiento quirúrgico ya descrito. La filmación de este material "in vivo" se llevó a cabo usando una videocámara Olympus U-PNTVC y una video grabadora VHS Sony-HiFi.

## II. Estudio de los pulmones

### A) Anatomía macroscópica.

A los organismos utilizados en estudios anteriores se les realizó una disección en la región dorsal a nivel del tronco, removiendo la columna vertebral, lo que permitió observar la morfología externa del pulmón, el grado de desarrollo y su disposición *in situ*, estas piezas también se sometieron a sesión fotográfica con la ayuda de un microscopio estereoscópico y un microscopio multifot Nikon, así como en una cámara digital Nikon.

## B) Histología

Para estudiar la organización histológica del pulmón, se extrajeron pulmones de los mismo organismos de la sección II – A, se tomaron muestras de aproximadamente 1.5 cm cortando a partir de la región del hilio, se deshidrataron en un tren de alcoholes (30%,50%,70%,90%,96%,) con cambios de 15 minutos cada uno y dos de una hora en alcohol absoluto. Se aclararon con xilol y incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 5 micras de grosor, sagitales y transversales en un micrótomo (Leitz-1512). Se tiñeron con las técnicas tricrómica de Masson, hematoxilina y eosina (HE), azul de alciano, PASS y luxol azul rápido, contrastados con hematoxilina (tomadas de Aguilar et al). Al igual que en el corazón, las imágenes se digitalizaron directamente del microscopio con el software Vidcap.

## C) Microscopia electrónica de barrido

Se realizaron cortes del pulmón, gruesos con una navaja de bisturí de forma longitudinal justo por la mitad, que se prepararon de forma similar a los corazones para el microscopio electrónico de barrido. También se hicieron cortes de 15 micrómetros de las piezas incluidas en parafina para estudios histológicos, éstos últimos, se desparafinaron en xilol, se lavaron en alcohol absoluto y se desecaron al aire. Posteriormente se recubrieron con una delgada capa de oro (35nm) en un aparato Dentun Vaccun Desk-1 para después observarlos en el microscopio electrónico de barrido (Jeol SEM 5300).

### III .- Inyección de la masa de Milton y Charles

Para poder seguir el destino de los arcos aórticos, las arterias y venas pulmonares, se realizó la inyección de una masa de gelatina y octanol-fenol, tomando como base la solución marcada como "*red boroasperse solution*" de Milton y Charles (1971). A continuación se describe la técnica adecuada a nuestros requerimientos. Cuatro organismos vivos, se anestesiaron y sometieron a cirugía de la forma ya descrita. La masa de gelatina pigmentada (apéndice 2), se les inyectó por vía ventricular, usando una sonda y haciendo presión con una jeringa hipodérmica. La masa se dejó fluir hasta que el corazón dejaba de latir y recorriera todo el circuito. Después los especímenes se fijaron con formol tamponado al 3.4%, para acelerar la solidificación de la gelatina y evitar que abandonara los vasos sanguíneos. Finalmente se siguió el curso de los vasos principales mediante microcirugía (apéndice 2).

La descripción del corazón y el pulmón, siempre se realizó usando el material fotográfico obtenido, para sustentar en todo momento la reseña de los resultados, a partir de éstas se realizaron esquemas y diagramas como interpretación.

El equipo utilizado en las distintas facetas del estudio fue el siguiente: microscopio estereoscópico Olympus 57-STUZ, óptico olympus BH2-RFCA, cámara Olympus C-3SAD-4 y cámara digital nikon. En el caso de las fotografías en blanco y negro usamos la película Kodak plus-x-pan.

## RESULTADOS

---

### I. Estudios del Corazón

#### A) Anatomía macroscópica

De acuerdo con las observaciones realizadas tanto en material *postmortem* como *in vivo*, el corazón de *A. mexicanum* se ubica en el del tórax dentro de la cavidad pericárdica, cuya pared es gruesa y de color pardo moteado. La disposición natural de las cámaras cardíacas en el corazón *in situ* en vista ventral es de tal forma que se observa la superficie izquierda del seno venoso y de la región atrial, el ventrículo, la región distal del bulbus cordis y el tronco arterial (Fig. 6). Siguiendo la dirección del flujo sanguíneo se encuentran: el seno venoso, los atrios, el ventrículo, el bulbus cordis y el tronco arterial del que emergen cuatro pares de arcos aórticos (Fig. 7). Respecto a las características anatómicas externas y disposición espacial (en vista ventral) de las cámaras cardíacas, encontramos que el seno venoso es una estructura de forma sacular de gran volumen (Figs. 6,7), sus paredes son muy delgadas y translucidas (Fig. 6), está en posición dorsal con respecto a los atrios y el ventrículo, sobresaliendo en la porción caudal a la izquierda del ventrículo. La región atrial es cefálica con respecto al ventrículo; es la de mayor volumen (Figs. 6,7), sus paredes son delgadas y translucidas al igual que las del seno venoso; en su interior se observan abundantes músculos pectíneos (Fig. 6), el atrio derecho es más dorsal que el izquierdo (Figs. 6, 7). El ventrículo tiene la forma de un

cono invertido de aspecto esponjoso y moteado, su base corresponde a los surcos atrioventricular y bulboventricular. El ápice apunta en dirección caudal (Fig. 6) desplazándose a la derecha durante la diástole atrial (Fig. 7). El bulbus cordis es una estructura tubular de forma espiral su base es caudal y ventral y su porción más distal cefálica y dorsal, su unión con el ventrículo es el surco bulboventricular que se encuentra en la región basal derecha más o menos al mismo nivel del surco atrioventricular. A continuación está el tronco arterial que se encuentra en posición dorsal e izquierda con respecto al bulbus cordis que se encuentra sobre una muesca formada en la región medio ventral de los atrios. Es una estructura cilíndrica deprimida muy corta, mide aproximadamente  $\frac{1}{2}$  de la longitud del bulbus cordis, se dirige en dirección ventrodorsal y de izquierda a derecha, bifurcándose en dos ramas principales, que corren paralelas y muy cercanas (Figs. 6,7). De cada una de ellas emergen cuatro pares de arcos aórticos (Fig. 7). También se observa un vaso coronario en la porción más cefálica del tronco arterial, que se ramifica profusamente e irrigan las paredes del tronco arterioso y bulbus cordis pero no el ventrículo.

#### B) Microdisecciones.

Las microdisecciones de las cámaras cardíacas permitieron observar los diferentes septos, conductos y válvulas presentes en su interior. Existe un septum interatrial incompleto, con un orificio en su región medio-basal, que comunica ambos atrios (Fig.8) y cuya disposición es oblicua con respecto al eje dorso ventral del organismo (Fig. 9). Dicho septum se inserta en las paredes atriales y al surco atrioventricular, dividiendo su orificio en dos, uno derecho y otro izquierdo (Fig.10). El atrio izquierdo es de menor tamaño que el derecho, sin embargo ambos orificios atrioventriculares tienen un tamaño semejante. En el atrio derecho drena el seno venoso por medio del orificio senoatrial y al izquierdo el

de las venas pulmonares que está constituido por la convergencia de dos venas pulmonares (Fig. 11). En el interior del orificio atrioventricular existe una válvula constituida por dos valvas de aspecto mamelar, gruesas y pigmentadas, que se inserta en las paredes ventriculares y se proyectan hacia su cavidad (Fig. 12). Con esta metodología (microdisecciones) no se observo la presencia de cuerdas tendinosas y / o músculos papilares en este sistema valvular específicamente. Existe una cavidad ventricular única, de luz estrecha con paredes muy esponjosas y rica en trabeculas que se disponen en laminas delgadas que no se organizan en grupos (Fig. 12). El bulbus cordis emerge del ventriculo a través del orificio bulboventricular que contiene en su interior un complejo valvular constituido por tres velos, cada uno de ellos tiene una forma similar a un nido de golondrina, estos tres velos valvulares están anclados a la pared del bulbus cordis en su región más proximal, uno se encuentra en la porción medio dorsal y los otros dos en los extremos derecho e izquierdo respectivamente (Fig. 12). La estructura más sobresaliente del bulbus cordis es la válvula espiral (Fig. 13), que se inserta por su borde dorsal a la pared bulbar, su borde ventral es libre; mediante este estudio de microdisecciones no se pudo distinguir la presencia de músculos papilares o cuerdas tendinosas ni en los sistemas valvulares semilunares ni en la válvula espiral. En el extremo distal del bulbus cordis se encuentran dos válvulas que se ubican en la base de los dos canales en los que se divide el tronco arterial (Figs.13,14). Este último tiene un septum principal que lo divide en dos canales, uno derecho y otro izquierdo (Fig.14) que se ramifican en cuatro pares de arcos aórticos.

### C) Histología

El seno venoso es una estructura sumamente delgada, constituida por endocardio y miocárdio (Fig. 15 a); son evidentes algunos músculos pectíneos (Fig.15b). La pared

atrial también es de miocardio bordeada por endocardio y epicardio, pero su grosor es variable, va desde una célula miocárdica hasta cuatro y posee abundantes músculos pectíneos (Fig.16a). El septum interatrial tiene la misma constitución histológica, es muy delgado en la región central y más grueso en su inserción a la pared atrial (Fig. 16B). Las valvas de la válvula atrioventricular están formadas por endocardio que bordea la línea de cierre de ambas valvas y una capa muscular delgada, inmersa en la pared ventricular muy trabeculada. Entre ambas capas celulares, existe una gran cantidad de matriz extracelular con células mesenquimales en su interior (Fig.17). Mediante esta técnica tampoco se detectó ninguna estructura que las tense ya sea cuerdas tendinosas y / o músculos papilares en este sistema valvular (válvula atrioventricular). El ventrículo tiene un aspecto esponjoso, posee varios espacios intersticiales debido al gran desarrollo trabecular que es muy irregular, las trabeculas se toman más gruesas en la zona de la cavidad ventricular y las células miocárdicas que las forman se tiñen de un color rojo intenso. A pesar de la gran cantidad de trabeculas, las paredes son muy delgadas, compuestas por una capa de células miocárdicas un poco más claras que las de las trabeculas y cubiertas por endocardio hacia la luz de la cavidad y un fino epicardio hacia la superficie externa (Fig. 18). En la unión bulboventricular, la región proximal del bulbus cordis se encuentra inmersa dentro del ventrículo (Fig. 19), en este sitio, las trabeculas son mas gruesas que la región del tracto de entrada (compare Figs.17 y 19). Las paredes libres del bulbus cordis están constituidas por las tres capas celulares típicas de este órgano; el endocardio es muy delgado, el miocardio es un tejido compacto no trabeculado, formado por dos estratos bien definidos, el interno es horizontal y el externo oblicuo (Fig. 20); el epicardio es más grueso que en las demás cámaras. La válvula espiral del bulbus cordis, está formado de endocardio y una matriz extracelular que se tiñe de azul con la técnica de Masson, lo que indica que está constituida por mesenquima (Fig. 21a,b). Las válvulas semilunares constan también de tejido mesenquimal y endocardio y se encuentran

tensadas a la pared bulbar por fibras muy delgadas, que son proyecciones del endocardio, es decir los sistemas valvulares semilunares tanto proximal como distal si presentan cuerdas tendinosas y se hacen evidentes mediante esta metodología (Fig.22a,b). En la región del tronco arterial existe un endotelio y músculo liso que se tiñe de rojo por la técnica de Masson, está inmerso en tejido conectivo. El septum principal se distingue por tener un núcleo cartilaginoso, rodeado de una matriz mas laxa y células mesenquimatosas (Fig 23a,b); las divisiones que individualizan los cuatro pares de arcos aórticos emergen de forma independiente (Fig.23c).

El endocardio se distingue del miocardio, porque el primero forma un epitelio constituido de células que tienen la forma de huso, con escaso citoplasma, claro y un núcleo oscuro muy prominente; mientras que las células de miocardio presentan mayor cantidad de citoplasma que se tiñe de color rojo y en cuyo interior se observan las estriaciones de miofibrillas; están unidas por discos intercalares, su núcleo es claro, prominente y central. El epicardio es un epitelio de células planas más pequeñas que las del endocardio, su núcleo es prominente y oscuro. El espacio entre el miocardio y el epicardio, esta ocupado por matriz extracelular y escasas células de forma estrellada y de núcleo denso. En las diferentes regiones del corazón, varía en tamaño, es muy grande en las uniones atrioventricular y bulboventricular, pero en la región apical del ventrículo es casi virtual ya que el epicardio se adosa al miocardio.

#### D) Microscopia electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido permitió determinar que el sitio de inserción del septum interatrial al surco atrioventricular, se encuentra en una región adyacente a la inserción de cada valva, de la válvula atrio ventricular (Fig. 24). Otro aspecto interesante

observado por este medio fueron las cuerdas tendinosas de los sistemas valvulares semilunares, tanto proximales como distales. Cada velo tiene tres cuerdas tendinosas, una en la parte central y dos en cada extremo (Fig. 25a). Respecto a las válvulas semilunares distales, pudimos confirmar que ambas son bicúspides (Fig. 25b) y se obtuvo una mejor imagen de la válvula espiral (Fig. 26). Respecto al ventrículo encontramos que las trabeculas tienen un arreglo laminar pero no forman trabeculas gruesa (Fig. 27) y tampoco observamos cuerdas tendinosas por esta técnica.

#### E) Grabaciones en Vídeo.

Los vídeos muestran que el orden de contracción de las cámaras cardiacas y accesorias es el mismo que el del flujo sanguíneo (para detalle de la circulación ver esquema 2). Primero se contrae el seno venoso, luego la región atrial (cuya fase sistólica es la más dramática en comparación con las demás cámaras), después se contrae el ventrículo y finalmente el bulbus cordis. El tronco arterial no se contrae, sus movimientos son producto de los cambios de presión en su interior. Durante la diástole la sangre es intensamente cianótica, sin embargo en la sístole tienen un color rosa claro. Al principio de la sístole la pared ventricular se observa embebida por la sangre dándole un aspecto rozado, pero al final de este proceso, el ventrículo adquiere un aspecto blanquecino, debido a la salida de la sangre de los espacios que existen entre las trabeculas. Otro fenómeno importante que se aprecia bajo esta metodología, es que la salida de la corriente sanguínea en el polo arterial derecho (tronco arterial y arcos aórticos), se anticipa unas décimas de segundo con respecto al flujo izquierdo (Fig. 28). No fue posible ver las estructuras internas, debido al desarrollo muscular de las paredes de las cámaras cardiacas, accesorias y el tronco arterial. Es importante señalar la presencia de un vaso coronario que se hace evidente a partir del sitio donde se bifurca el tronco arterial, justo

antes de la emergencia de los arcos aórticos, corre entre las dos ramas principales, ramificándose e invadiendo las paredes del tronco arterial y bulbus cordis. También se observó que el flujo sanguíneo que viene de las venas pulmonares es muy abundante.

## II. -Estudio de los pulmones

### A) Anatomía macroscópica

Los pulmones son estructuras saculares no lobuladas, deprimidos, alargados y situados dorsalmente. Cada uno presenta un bronquio que emerge de la región ventral de una traquea muy corta, van desde la región de la tercera rama branquial hasta la región media del cuerpo, ocupan aproximadamente un tercio de la longitud total del cuerpo, se encontró que existen diferencias en cuanto al tamaño, pero sin un patrón que determine cual es el más pequeño (Fig. 29). Su coloración es pardusca, sus paredes son translúcidas, de manera que es posible observar su vascularización interna. Existe un vaso que bordea toda su contorno, de él emergen múltiples vasos de diferente calibre que se ramifican profusamente. Cabe mencionar que los pulmones de algunos especímenes, al momento de sacrificarlos contenían aire en su interior (Fig. 30).

### B) Histología

El pulmón del ajolote internamente es una esponja desde la región inmediatamente caudal al hilio hasta el ápice. Sobresale un canal principal que corre longitudinalmente, el cual posee células ciliadas, secretoras y un epitelio pseudoestratificado, presenta músculo liso y tejido conectivo en sus paredes (Fig. 31). Hay otros conductos de menor calibre, que tienen un epitelio cilíndrico ciliado y secretor,

su pared también es de músculo liso y no existe cartilago en ninguna de estas estructuras. Las secreciones son positivas a las tinciones: azul de alciano, luxol y PAS (Fig. 32). Dicha positividad se encontró en un 15% de la población celular de estas zonas. La porción respiratoria está muy extendida por todo el pulmón, vemos unidades respiratorias o alvéolos que no están arreglados en sacos alveolares, son estructuras de epitelio plano simple con gran número de capilares en toda su extensión donde no existen células secretoras ni células ciliadas (Fig. 33). Existen vasos bien desarrollados que corren por toda la periferia el pulmón (Fig. 34) las arterias se ramifican hasta llegar a los capilares. Las estructuras conductoras de aire, extra pulmonares son poco desarrolladas y carecen de cartilago en su paredes, su principal sostén es el músculo liso y colágena densa.

### C) Microscopia electrónica

En el estudio realizado mediante el microscopio electrónico de barrido, se lograron obtener imágenes que nos dan un mejor detalle sobre la disposición de los cilios en células epiteliales del bronquio y bronquiolos (Fig. 34), en los alvéolos no encontramos cilios. También se lograron observar células secretoras en proceso de exocitosis (Fig.35), que forman parte del epitelio de los bronquios y bronquíolos.

### III.- Inyección de la masa de Milton y Charles.

Los cuatro pares de arcos aórticos pasan por las branquias antes de llegar a su destino específico (Fig. 36). El tercer par, después de su paso por las branquias, llega a la

aorta dorsal y se proyecta a la región del rostro constituyendo las carotidas, el cuarto y quinto par, después de pasar por las branquias, desembocan a la aorta dorsal por lo que son arcos sistémicos, el sexto par se halla unido en la región dorsal al quinto par por el ducto carotideo (Esquema 3). El sexto par es mas dorsal y está reducido en cuanto a tamaño; después de pasar por las branquias, alimenta al pulmón y la piel, es decir origina a la arteria pulmocutánea (Fig.37).

Los pulmones se hallaron con una gran cantidad de la masa, observándose regiones obscuras y claras como consecuencia de la compartimentalización interna (Fig. 29). De cada pulmón sale un vaso de diámetro regular y llega al atrio izquierdo como una vena pulmonar (Fig. 37). La piel retuvo gran cantidad del pigmento, dándose una mayor acumulación en los pliegues intercostales.

## DISCUSION

---

El corazón de *A. mexicanum*, al igual que en todos los tetrápodos, ocupa la región ventrocefálica del tórax, está contenido dentro una cavidad pericárdica, que a su vez forma parte de la cavidad celómica; el polo venoso es caudal y el arterial cefálico. La disposición en vista ventral de las cámaras cardíacas y anexas en los individuos de la clase anfibia varía ampliamente, en los anuros es frontal, es decir se observa la cara ventral del ventrículo, el bulbus cordis y el tronco arterial; los atrios son dorsales al bulbus cordis y el seno venoso está en posición dorsal a los atrios y el ventrículo (Fig. 1) (apéndice 4) (De la Cruz et al, 1999). Nuestros resultados muestran que en *A. mexicanum* la disposición es sagital izquierda, por lo que sólo es evidente la superficie izquierda del seno venoso, atrio izquierdo y ventrículo (Figs. 6, 7). Este mismo patrón ha sido observado en otros ambystomatidos como *A. punctatum* y *A. tigrinum* (Copenhaver 1939). En cuanto al tamaño de las cámaras cardíacas y accesorias, encontramos que en el ajolote las de mayor volumen son el seno venoso y los atrios (Fig. 7), mientras que en anuros se ha descrito que el ventrículo es la estructura más prominente (Van Mierop et al, 1985). En los apodos, específicamente *Hypogeophis rostratus* el patrón es muy similar al de anuros pero con la diferencia de que el ventrículo es más reducido y el bulbus cordis más desarrollado (Lawson, 1966) (apéndice 3).

Respecto a las características de las cámaras cardíacas y accesorias, encontramos que al igual que en todos los anfibios, el seno venoso persiste como una estructura independiente (Figs. 6,7), no se integra al atrio derecho, sus paredes son miocárdicas sumamente delgadas, con escasos músculos pectíneos (Fig. 15), estas características histológicas explican, la capacidad contráctil que apreciamos en el video. En nuestro modelo el seno venoso se abre al atrio derecho a nivel del surco atrio ventricular, caso similar se ha descrito durante el desarrollo embrionario de las aves y los mamíferos (Steding et al, 1990), pero en los anuros se ha descrito en la parte media de su pared dorsal (Lawson, 1979 a).

Encontramos que el atrio derecho es mayor en tamaño que el izquierdo; se sabe que esto sucede con frecuencia en los anfibios (Lawson, 1979 a). Suponemos que esto se debe a que el atrio derecho maneja una mayor presión porque recibe sangre proveniente de todo el organismo excepto los pulmones. También se encontró que el septum interatrial es incompleto, es decir presenta una comunicación en su región basal media. Diversos autores han descrito que esta característica también es muy común en los anfibios, específicamente en aquellos cuyo pulmón tiene una actividad respiratoria reducida y las respiraciones accesorias (cutánea, bucofaringea y cloacal) son muy importantes (Johansen y Hanson, 1968; Lawson, 1966, 1979 a,b; Withers, 1992 ). Estos autores señalan que cuando la respiración no pulmonar es la dominante, la sangre que arriba al atrio derecho, puede tener un contenido de oxígeno igual o incluso mayor que la del atrio izquierdo que proviene de los pulmones, dependiendo obviamente de que tan funcionales son. Bajo estas circunstancias, no es indispensable la separación de los torrentes circulatorios derecho (sistémico) e izquierdo (pulmonar) a nivel cardíaco, ya que puede llegar sangre parcialmente oxigenada a ambos lados del corazón. Es importante señalar que esta propuesta también está apoyada por los hallazgos de Bruner (1900) en

pletodontidos, que son salamandras que presentan atrofia pulmonar severa y tabique interatrial muy reducido. En este caso, el autor plantea que si existiera un septum interatrial completo, impediría el flujo de sangre parcialmente oxigenada en el atrio izquierdo, la parte izquierda del ventrículo, la región del bulbus cordis que se continua con ésta y el sexto par de arcos aórticos. También debemos recordar que los anuros al sufrir la metamorfosis, pierden las branquias y la respiración pulmonar se vuelve dominante, en este caso, el tabique interatrial es completo. Por otro lado, Garber, 1930; Czopek, 1957 y Coleman & Hessler, 1996, han demostrado la importancia de la respiración cutánea en el ajolote en condición neoténica. Ellos estudiaron la vascularización cutánea antes y después de la metamorfosis inducida y encontraron que es menos abundante después de la metamorfosis, una vez que se establece la respiración pulmonar predominante. Se aceptan las explicaciones de todos estos autores, pues además de encontrar un tabique interatrial incompleto, hallamos evidencias que sugieren la existencia de una respiración cutánea importante, pues al inyectar gelatina coloreada a través del ventrículo, encontramos que la sangre llega a la piel con una distribución selectiva, siendo sumamente abundante en los pliegues intercostales.

Es importante señalar que durante la morfogénesis cardíaca de los anfibios sucede algo similar a lo descrito en anfibios de respiración pulmonar no predominante. En etapas tempranas del desarrollo, la sangre oxigenada proveniente del saco vitelino o la placenta, llega al corazón a través del seno venoso, pues los pulmones están en proceso de desarrollo y aún no son funcionales. En estas etapas, el tabique interatrial mantiene una comunicación, primero es el ostium primum, posteriormente el ostium secundum que se forma por procesos apoptóticos en el septum primum, esta comunicación permite el paso de sangre oxigenada a la parte izquierda del corazón embrionario (Anselmi G. y De la Cruz M. V. 1998). Una vez desarrollado el pulmón, aumenta la presión y la

concentración de oxígeno en la sangre del lado izquierdo del corazón, se cierra la comunicación y se separan definitivamente los dos torrentes circulatorios. Esto sucede después de la eclosión en las aves y después del nacimiento en los mamíferos.

La información que existe sobre la estructura cardíaca de los anfibios con respiración pulmonar no predominante y los conocimientos sobre la morfogénesis cardíaca en los anfibios nos permite suponer que la presencia de alguna comunicación interatrial en los anfibios neoténicos, que llegan a la madurez con un aspecto larval como es el caso del ajolote, o los que poseen pulmones atróficos se debe a que persiste una condición de la etapa embrionaria y no a la aparición posterior de la comunicación interatrial una vez que se había desarrollado completamente, es decir no hay una regresión de dicha estructura. Esta misma propuesta es aplicable a la posición en que se encuentra el orificio senoatrial en el ajolote, pues al principio del desarrollo, el seno venoso tiene una posición caudal con respecto a los atrios y como es obvio la unión senoatrial tiene esa misma ubicación; con el desarrollo, las cámaras cardíacas aumentan de tamaño y cambian de posición en el espacio, hasta que finalmente el seno venoso se ubica en la porción media de la pared dorsal del atrio derecho.

El hecho que en el ajolote los orificios atrioventriculares derecho e izquierdo sean muy semejantes en tamaño, a pesar de las diferencias el tamaño de los atrios, nos hace suponer que la presencia de una comunicación interatrial cercana a los orificios atrioventriculares determina que las presiones sanguíneas se igualen y no existan condiciones hemodinámicas que influyan en un tamaño diferencial de ambos orificios. A diferencia de los anuros, en el ajolote no pudimos constatar la presencia de cuerdas tendinosas y / o músculos papilares por las metodologías empleadas, que son muy evidentes en anuros (Fig. 17), el aparato tensor de estas valvas es distinto en el ajolote

que en los anuros, aunque los estudios por microdisecciones no nos permitieron establecer la presencia de cuerdas tendinosas en el sistemas valvular atrioventricular los estudios histológicos y de microscopia electrónica dan la confianza de decir que no existen tales estructuras en esta válvula , solo pudimos ver pequeñas trabeculas que las insertan a la pared ventricular. Respecto a la forma de las valvas, en el ajolote encontramos que son estructuras gruesas que recuerdan a los cojines del canal atrioventricular del embrión de pollo y en los anuros son más delgadas y no están inmersas en el ventrículo. Suponemos que el desarrollo de cuerdas tendinosas y músculo papilares va relacionado con el cambio de forma de las valvas atrioventriculares, de las paredes ventriculares, el incremento de la presión que se maneja y la necesidad de evitar el reflujo. Tal vez la presión que maneja el tracto de entrada ventricular del ajolote es menor que en el corazón de un anuro o bien que la constitución anatómica de estas valvas las haga eficientes en su función.

Encontramos que el ventrículo en *A. mexicanum*, al igual que otros urodelos y anuros, posee una pared miocárdica muy delgada, altamente trabeculada, sin embargo en el ajolote existe un arreglo laminar (Figs.12,17,27) pero no se agrupan para formar grandes trabeculas como sucede en los anuros que poseen de siete a ocho grupos (Van Mierop et al, 1985). En el ajolote el ventrículo es muy esponjoso, entre las trabeculas se forman diminutos canales o espacios intersticiales, por estos espacios se embebe la sangre oxigenada, es por eso que en estos organismos así como en otros urodelos y los anuros, no existen vasos coronarios en el ventrículo, solo los encontramos en estructuras como el tronco arterial y bulbus cordis. En los anuros existen dos troncos coronarios que se originan en el arco carotideo (III) (De la Cruz et al 1999), pero en el ajolote no determinamos su origen, solo pudimos observar un tronco coronario a partir del sitio donde se ramifica el tronco arterial. Con base a la descripción de la irrigación coronaria de

la literatura en anuros y nuestras observaciones en el ajolote, vemos que es mas profusa en anuros. Respecto a los apodos se ha señalado que los vasos coronarios irrigan gran parte de las caras dorsal y ventral del tronco arterial, bulbus cordis y ventrículo, su patrón es muy distinto al de los anuros y urodelos. En el apodo *Hypogeophis rostratus*, las coronarias irrigan el ventrículo, primordialmente su región ventral, además del bulbus cordis y la parte mas caudal del tronco arterial (apéndice 3), también estos vasos forman una red en la cara dorsal del corazón y se abren en ambos lados del seno venoso (Lawson, 1966). Esta diferencia está relacionada con las características del miocardio ventricular de *H. rostratus* que es mas compacto y de un número mayor de capas celulares comparándolo con *A. mexicanum*, los urodelos y anuros. Por esta razón la imbibición de sangre oxigenada no es tan eficiente en *H. rostratus*. Se ha señalado en la literatura que la estructura de la pared miocárdica y el desarrollo trabecular del ventrículo es la principal causa de la separación de los torrentes sanguíneos (sistémico y arterial), que se establece en los atrios y se continúa en el ventrículo (Simon, 1958; Johansen y Hanson, 1968, Jahansen y Burggren 1980; Withers, 1992). En los apodos debido a la escasa trabeculación y lo compacto de las paredes ventriculares, la separación se da más bien por una trabecula central que tiene su origen en la pared ventral, muy cerca del ápice, dicha trabecula crece en dirección cefálica (Marcus, 1935; Shiling, 1935; Ramaswami, 1944; Lawson, 1966.), sin embargo Lawson (1966), refiere que en este caso, la separación sanguínea es menos efectiva que la observada en otros ordenes de anfibios (urodela y anura).

El bulbus cordis es la estructura más variable en cuanto a complejidad y tamaño en el corazón de los anfibios y sus características internas están muy relacionadas con el tipo de respiración predominante (Johansen y Hanson, 1968, Jahansen y Burggren 1980; Burggren, 1988; Withers, 1992), sin embargo, en general hay un patrón básico. Es una

estructura tubular, que tienen dos límites, uno con el ventrículo y otro con el tronco arterial, en cada uno existe un sistema valvular (sigmoideas proximales y distales) y una válvula espiral que corre longitudinalmente en su interior; está constituido de músculo cardiaco bordeado por endocardio y epicardio. Las variaciones exhibidas en los distintos grupos de anfibios, son principalmente de tamaño y grado de desarrollo en sus sistemas valvulares. En el ajolote encontramos una discontinuidad de la válvula espiral del bulbus cordis con el septum principal del tronco arterial (Figs.14, 26 ), característica que conjuntamente con la presencia de la comunicación interatrial (Fig. 8 ) es una consecuencia de la participación de respiraciones no pulmonares, aspecto en el que está inmiscuida la neoténia. En el caso de otros organismos neotécicos como *Necturus*, presenta una válvula espiral mas reducida que el ajolote, por ser un organismo neoténico abligado (Weichert, 1951). En algunos apodos en los que se ha determinado que la respiración cutánea es muy importante, también la válvula espiral es simplificada (Boas 1882) y en los anuros donde la respiración pulmonar es predominante, la válvula espiral está bien desarrollada y forma un continuo con el septum principal del tronco arterial. El ejemplo más demostrativo de la relación anatomía del bulbus cordis y forma respiratoria predominante es el descrito por Bruner (1900) en salamandras que carecen de pulmones (pletodontidos), en estos organismos se ha perdido casi por completo la válvula espiral y el bulbus cordis es el más simplificado dentro de los anfibios.

Otro aspecto importante de mencionar es que a diferencia del sistema valvular atrioventricular, las valvas semilunares si presentan cuerdas tendinosas las cuales fue posible observarla mediante los estudios histológicos y de microscopia electrónica. Estas estructuras insertan dichas valvas a la pared del bulbus cordis, pero no contienen una matriz de colágena, solo son proyecciones endocardicas (Fig. 22). En estudios realizados en anfibios solo se muestran en esquemas pero no se ha descrito su constitución

histológica, por lo que no es posible determinar si esta característica es compartida por todos los anfibios. En el ajolote existe la misma disposición de las válvulas semilunares como los anuros, tres proximales y dos válvulas bicúspides distales.

Pensamos que la presencia en el corazón del ajolote de una comunicación interatrial y una discontinuidad entre la válvula espiral del bulbus cordis y el septum principal del tronco arterial, pueden ser las únicas repercusiones de la participación de respiraciones accesorias y branquial en la que la neotenia está involucrada directamente.

En cuanto al polo arterial (tronco y arcos aórticos) *A. mexicanum* al igual que otros urodelos y los anuros tiene el tronco arterial dividido por el septum principal en dos canales, uno derecho pulmocutáneo y uno izquierdo sistemocarotideo. Sin embargo este plan general no es exhibido en los apodos, por ejemplo Ramaswami (1944) menciona que en *H. rostratus* existe en el tronco arterial un septum espiral, él describe que el tronco arterial es un tubo simple en su región basal y en la región mas cefálica da origen a dos grandes canales.

*A. mexicanum* sigue el patrón de arcos aórticos propuesto por Lawson (1979) para las larvas de urodelos: cuatro arcos (III,IV,V,VI), el tercero se prolonga cefálicamente dando origen a las carotidas, el cuarto y quinto son sistémicos y el sexto da origen a la arteria pulmocutánea. Entre el par III y el IV existe un segmento que los une que es el ducto carotideo y entre el V y VI el ducto arterioso (Esquema #3). La porción ventral del arco pulmocutáneo no se encuentra en otros organismos como *Necturus*, pero conserva la porción dorsal que es alimentada por el arco V mediante el ducto arterioso, característica que Figge (1930) (citado en Weichert, 1951) ha relacionado con la fijación definitiva de la neotenia en este organismo. El autor considera que en los organismos

como *Necturus* la metamorfosis es imposible, porque dicho proceso biológico tiene como consecuencia entre otras cosas, la pérdida del ducto arterioso (que en *Necturus*, está implicado en la irrigación sanguínea de la piel y el pulmón) y debido a que carecen de la porción ventral del arco pulmocutáneo, si sufrieran la metamorfosis, perderían las branquias y el ducto arterioso y con esto los pulmones y la piel quedarían desprovistos del aporte sanguíneo. Es decir el organismo metamorfoseado debería de prescindir de todos estos sistemas respiratorios y entonces mantenerse solamente con otras respiraciones accesorias como la bucofaringea, que en los pletodontidos que son los anfibios donde este tipo respiratorio se considera el más eficiente, solo aportan un 13% de la oxigenación sanguínea total, por lo que si a *Necturus* se le indujera la metamorfosis, este sistema respiratorio por sí solo sería insuficiente y el organismo moriría. Otro experimento que apoya la relación de la pérdida del segmento ventral del arco VI en el establecimiento definitivo de la neotenia también citado por Weichert (1951), consistió en simular la condición de *Necturus* en *Ambystoma tigrinum*, que es una especie no neoténica, ligando el segmento ventral del arco VI, en estas circunstancias no se presentó la metamorfosis, a pesar de que se trató de inducirla experimentalmente, mediante hormonas tiroideas.

Basándonos en estos hechos, suponemos que en el ajolote uno de los factores involucrados en que responda a la inducción hormonal para sufrir la metamorfosis, es la presencia de la porción ventral del sexto par de arcos aórticos.

Otro dato interesante visto en nuestros resultados es que el sexto par de arcos aórticos pasa por las branquias antes de llegar al pulmón (Fig. 36); esta característica anatómica, significa que en el ajolote aparentemente el pulmón recibe sangre oxigenada de las branquias, dependiendo que tan bien oxigenada este el agua del medio donde habitan. El paso del sexto par de arcos aórticos por las branquias, antes de llegar al

pulmón y a la piel, no se ha observado en especies muy emparentadas con el ajolote como *Ambystoma tigrinum*, en el que el arco VI es el único de los arcos aórticos que no tiene ninguna relación con las branquias, sino que éste solamente alimenta la piel y el pulmón. Los anuros solo poseen tres pares de arcos aórticos durante la etapa adulta el III, IV y VI. El quinto se pierde durante la metamorfosis al igual que los ductos carotideo y arterioso. En el caso de los apodos solo existe un arco sistémico-pulmonar y dos carotidas comunes.

Respecto al pulmón, en *A. mexicanum* al igual que en todos los anfibios, no presenta lobulaciones, encontramos que frecuentemente los pulmones derecho e izquierdo son diferentes en cuanto al tamaño (Fig. 29), se descarta que éste sea un suceso patológico, pues esta situación se presentó en todos los organismos sacrificados y no se ha descrito una patología de este tipo. Tampoco observamos una constante respecto a cual de los pulmones era el de mayor o menor tamaño, para pensar que fuera una característica de la especie como sucede en las cecalias las cuales tienen el pulmón izquierdo solo de forma vestigial. En éstos la presencia de un pulmón izquierdo reducido está asociada con la forma del cuerpo de un cilindro delgado y alargado (Lawson, 1979 b). El resto de los anfibios poseen pulmones pareados y de talla similar.

Los pulmones del ajolote son de buen tamaño y ocupan aproximadamente 1/3 de la longitud total del cuerpo, tienen una organización interna compleja, esto lo pudimos apreciar desde el exterior, cuando inyectamos la gelatina pigmentada, ya que apreciamos un mosaico de colores pardos (Fig. 29), que no es otra cosa que la masa penetrando a compartimentos de distinto calibre, es decir existe una compartimentalización jerarquizada en su interior. Este órgano cuenta con estructuras extra pulmonares muy simplificadas, esto tal vez debido a que no existe cartilago como estructura de sostén lo que limita su

tamaño, pues de ser muy grandes podría producirse su colapso, el principal sostén está dado por tejido conectivo denso. El pulmón presenta en la mayor parte de su longitud estructuras respiratorias, los compartimentos rodeados en su luz totalmente por capilares no pueden ser otra cosa que alvéolos (Fig. 33), que no están organizados en sacos alveolares, con las técnicas empleadas no pudimos distinguir el grosor de la barrera alveolo endotelial. Encontramos que la organización del pulmón del ajolote es más compleja aun que en el caso de los anuros y es muy contrastable con otros organismos neoténicos como *Necturus* en donde las paredes de los pulmones son prácticamente lisas (Lawson, 1979 b). Nuestros resultados difieren de los estudios realizados en esta misma especie por Czopek (1957) que muestran solo mediante un esquema el pulmón del ajolote como una estructura sacular con escasas invaginaciones. El trabajo carece de material fotográfico, quizá sus resultados se deban a que la especie del organismo con el que trabajó no fue identificada adecuadamente y no se trate de la misma especie o bien sea un híbrido, caso común en ambystomatidos (Smith 1989) o posiblemente el hecho, que el organismo permanezca bajo condiciones de laboratorio y oxigenación constante haya repercutido en la degeneración de sus pulmones, ya que éste es un órgano usado para la respiración aérea y si existe una buena oxigenación en el agua, la respiración se realiza principalmente por las branquias lo que pudiera provocar una atrofia de los pulmones debido a falta de actividad. Nuestros organismos provienen de la facultad de estudios superiores Iztacala donde se les mantiene en agua reposada libre de aeración artificial, por lo que deben ejercitar mayormente la actividad respiratoria de los pulmones; al respecto Garber (1930), plantea que los ajolotes tienen la capacidad de adecuar y eficientizar sus modos respiratorios de forma diferencial, de acuerdo a sus requerimientos fisiológico y al medio donde habitan, es por eso que pueden encontrarse distintos resultados en cuanto a la morfología pulmonar, dependiendo del medio y las condiciones donde se mantenga a los organismos.

Otro aspecto importante a discutir es la posible presencia de sustancias tenso activas (surfactantes) secretadas por el epitelio del bronquio y el bronquiolo, las tinciones realizadas en los cortes de pulmón, nos indican la presencia de lipoproteínas (luxol positivas) y glucoproteínas (Pass positivas) (Fig. 32). No se encontró reacción positiva a estas tinciones en las paredes alveolares, tal vez porque no existen las sustancias, el tipo de tinción no es específica para sus propiedades o el tipo de fijación y / o deshidratación las haya lavado. Existe la posibilidad de que en el ajolote, al igual que en los vertebrados superiores, solo las lipoproteínas sean surfactantes, y las glucoproteínas tengan otra función, o bien que ambas tengan función surfactante ya que este aspecto debe abordarse mediante otra metodología. Cuando un organismo pasa de una respiración branquial a una pulmonar, como los peces pulmonados o el mismo ajolote, el surfactante puede ser importante para evitar el colapso de las estructuras respiratorias cuando el agua interna se desplaza por aire al respirar por pulmones. El caso es similar al que ocurre en los recién nacidos, en ellos, antes del nacimiento, los pulmones se encuentran llenos de líquido amniótico, el cual es sustituido por aire en el momento del nacimiento, si no existieran las sustancias surfactantes, podrían colapsarse las estructuras respiratorias (Avery et al 1973).

Pareciera que existe una discordancia con los resultados obtenidos en corazón con los de pulmón, ya que hemos justificado la reducción de estructuras auxiliares en la separación sanguínea con la predominancia de respiraciones no pulmonares que es la tendencia general en la literatura, nuestra siguiente pregunta sería, ¿Por qué no existe un buen desarrollo de las estructuras involucradas en la separación sanguínea, que a su vez está relacionada con la predominancia de las respiraciones accesorias, si existe un pulmón bien desarrollado?. Es difícil pensar que en el ajolote los pulmones no sean

funcionales, aunque un estudio morfológico no es una prueba tajante de que lo sean. Una posible explicación sería, que aún no ha pasado un tiempo evolutivo suficiente para que se presenten cambios muy drásticos a nivel pulmonar, atrofia o desarrollo incompleto. Una segunda explicación y la más congruente es que el pulmón no ha sufrido cambios muy drásticos debido a que el ajolote, bajo ciertas circunstancias respira por pulmones, pues su hábitat son los lagos de Xochimilco que son cuerpos de agua lenticos con concentraciones muy bajas de oxígeno, debido a la gran cantidad de materia orgánica que existe en ellos, cuya combustión consume grandes cantidades de oxígeno y esta concentración varía durante las diferentes estaciones del año (Duhon, 1996). La respiración branquial y cutánea se presenta durante su estancia en el agua y predomina cuando hay una buena oxigenación del agua, durante este lapso el mismo pulmón es oxigenado por las branquias como otro órgano más ya que el arco pulmocutáneo pasa por ellas antes de llegar al pulmón y a la piel.

La administración de la respiración pulmonar y no pulmonar del ajolote la podemos ilustrar con los peces pulmonados. *Protopterus aethiopicus* y *Lepidosiren paradoxa* (Lenfant y Joahansen, 1968) son incapaces de vivir solamente con el oxígeno del agua, respirado solo por las branquias y piel, ellos necesitan tomar el oxígeno del aire a través de los pulmones, esta respiración es tan importante que incluso durante la estivación, cuando los cuerpos de agua se secan, pueden pasar un par de meses al año fuera del agua. (Johansen y Hanson, 1968). Por el contrario, la respiración de *Neoceratodus* es predominantemente branquial y la pulmonar es mínima, ya que los cuerpos de agua que habita son ricos en oxígeno y sus pulmones son poco organizados (Johansen y Hanson, 1968). En el ajolote existe un mecanismo similar al encontrado en *Protopterus* y *Lepidosiren*, ya que éstos también habitan en aguas poco oxigenadas y con una oscilación muy fuerte en cuanto a contenido de oxígeno, con la diferencia que

estos *Dipnos*, tienen un pulmón más desarrollado, y no tienen branquias externas ni su piel constituye un órgano respiratorio tan importante como en el ajolote, estas características les permiten vivir tiempos prolongados en la superficie a estos peces (en el apéndice 5 se muestra un corazón de pez pulmonado).

Las deducciones de carácter fisiológico derivadas en este trabajo puramente morfológico, son una integración morfofuncional, pues aunque la morfología la mayoría de las veces sugiere función, se necesita de estudios experimentales complementarios que las confirmen.

Debido al carácter puramente morfológico de este estudio, han quedado poco explicados ciertos aspectos y abiertos para abordarse desde otra perspectiva y metodología, tal es el caso de los mecanismos de separación sanguínea, el grado de funcionalidad del pulmón y los resultados obtenidos con los estudio de vídeo.

## CONCLUSIONES

---

- El corazón de *A. mexicanum*, presenta el plan fundamental de un anfibio representativo de la clase (anuro): un corazón tricavitario, con seno venoso persistente, un bulbus cordis como cámara accesoria, el cual consta de 2 sistemas valvulares semilunares (proximal y distal) y una válvula espiral. En cuanto al polo arteria, éste muestra dos canales principales, la organización de los arcos aórticos es la de una larva de urodelos, pero con la peculiaridad de que el arco VI pasa por las branquias antes de llegar a la piel y pulmones. Los pulmones están bien desarrollados, son altamente compartimentalizados y vascularizados y presentan gran cantidad de estructuras respiratorias en toda su extensión.
- Las diferencias principales con los anuros (grupo vivo mas representativo de la clase) son: la comunicación interatrial, la falta de cuerdas tendinosas en el sistema valvular atrioventricular, la falta de un arreglo en grupos de las trabeculas , la muesca entre la válvula espiral y el septum principal del tronco arterial y que en el ajolote existen 4 pares de arcos aórticos con ducto arterioso y ducto carotideo persistente. El ajolote en comparación con otros organismos neoténicos como *Necturus* y otros que carecen de pulmones (pletodontidos) presenta una atrofia o falta de desarrollo mínimo de las estructuras auxiliares en la separación sanguínea.

- Tomando en cuenta los argumentos citados y los resultados obtenidos, podemos plantear que la importancia de las respiraciones no pulmonares en conjunto con la pulmonar son las más posibles causantes de la comunicación interatrial y la discontinuidad de la válvula espiral y el septum principal ya que esto involucra que en ambos lados del corazón exista sangre oxigenada. La neotenia tiene un papel importante en esto ya que involucra la retención de las branquias y un estilo de vida acuático; también es la responsable del arreglo de arcos aórticos de este organismo.
  
- El pulmón puede funcionar cuando la concentración de oxígeno baja dramáticamente en el agua con repetidas excursiones a la superficie o simplemente complementando a las respiraciones no pulmonares que operan principalmente bajo el agua.

## LITERATURA CITADA

1. Aguilar M.;Coutiño B. Y P. Salinas (1996) Manual General de Técnicas Histológicas y Citológicas. Facultad de Ciencias U.N.A.M. 130p.
2. Anselmi G. y De la Cruz M.V. (1998) Embriological Development of the atria. Septation and Viseroatrial Situs en Living Morphogenesis of the Heart. Markwald and De la Cruz Editors. U.S.A. pp 169-186.
3. Armstrong J. B y Duhon T. (1989) Induced Spawing, Artificial Insemination and Other Genetic Manipulations en Developmental biology of Axolotl, Oxford university press, Armstron and Malascynsky editors.228-235 U.S.A.
4. Armstrong J. B. y Malacinsky M. G. (1989) Developmental Biology of Axolotl, Oxford university press, U.S.A. 311 p.
5. Avery, M. E.; Nai-San; Wang y Taeusch H. W. Jr. (1973) The Lung of the Newborn Infant. Sci. Am., 228 : 75 - 86
6. Boas J. E. V. (1882) Uber den Conus Arteriosus and die Arterienbogen der Amphibien. Morph.Jahrb. 7 : 488-572.
7. Bruner, H. L. (1900) On the Heart of Lungless Salamanders. J. Morphol. 16: 323-336.
8. Burggren W. (1988) Cardiac Desings in Lower Vertebrate: what can Phylogeny reveal about Ontogeny. Experientia. 44 : 919-929.
9. Coleman C.M. y Hessler A.C. (1996) Thyroxine induced Metamorphosis in a Neotenic Axolotl (*Ambystoma mexicanum*): Gills, Lungs, and Capillaries. Axolotl news letter (26): 4-9.
10. Copenhaver W.M. (1939) Some Observations on the Growth and Function of heteroplasic heart grafts. J. Exp. Zool. 82 (2): 239-271

11. Cuvier G. L. (1865) Lecons d' Anatomie Comparee. 2<sup>a</sup>ed. paris fortin & Mason. 8 vols.
12. Czopek J. (1957) The Vascularization of Respiratory Surfaces in *Ambystoma mexicanum* (Cope) in ontogeny. Zoologica poloniae 8 : 131-149
13. De la Cruz, M. V. Y Markwald, R. (1998) Living Morphogenesis of the Heart. R. Markwald and De la Cruz Editors U.S.A. 233 p.
14. De la Cruz M. V.; Moreno-Rodríguez R. y P. Angelini (1999) Phylogeny of the Coronary Arteries en Coronary Artery Anomalies: a Comprehensive Approach, edited by P. Angelini. Lippincot & Wilkins, Philadelphia U.S.A. pp 1-9
15. Duhon T. S. (1996) The Axolotl and its Native Habitat- Yesterday and Today. Axolotl. Newsletter. 26: 14-17
16. Eaton T.H. (1960) Comparative Anatomy of the Chordates. New York U.S.A. Mc Graw. Hill. 921 p.
17. Fritsh G.(1869) Vergleichenden Anatomee Der Amphibien Herze. Arch. Anat. Physiol. LeipZing 1869: 645-758.
18. Garber S.T. (1930) Metamorphosis of the Axolotl Following Lung Extirpation. Anat. Rec. 45: 261-268
19. Goodrich E. S. (1930) Studies on the Structure and Development of Vertebrates. Macmillan, london, 837 p.
20. Holmes E. B. (1976) A Reconsideration of the Phylogeny of tetrapod heart. J. Morphol. 147: 209-228
21. Johansen K. (1963) Cardiovascular Dynamics in the Amphibian. *Amphiuma tridactylum*, Cuvier. Acta Physiol. Scand. Suppl. 217: 82 p.
22. Johansen K y Hanson D. (1968) Functional Anatomy of Heart of Lung Fishes and Amphibian. Amer. Zool. 8 : 191-210.
23. Johansen H. y Burggren W. (1980) Cardiovascular Function in the Lower Vertebrates and Heart like Organs, Vol.1 N.Y. Academic press, pp. 61-117
24. Khun E. R. y Jacob M. F. (1989) Metamorphosis en Developmenta Biology of Axolotl. Armstrong and Malacinski editors. New York Oxford University Press. pp 187-197
25. Lawson, R. (1966) The Anatomy of Heart of *Hypogeophis rostratus* (Amphibia: Apoda) and it's Possible Mode of Action. J. Zool. 149: 320-336.

26. Lawson R. (1979 a) The Comparative Anatomy of Circulatory System en Hyman's Comparative Vertebrate Anatomy. 3 a. Ed. Marvalee H. Wake. Chicago U.S.A. 448-554
27. Lawson R. (1979 b) The Comparative Anatomy of the Celom and the Digestive and Respiratory System en Hyman's Comparative Vertebrate Anatomy. 3 a. Ed. Marvalee H. Wake. Chicago U.S.A. 448-554
28. Lenfant C. y Johansen K. (1968) Respiratory Adaptation of Selected Amphibians. Resp. Physiol .2 : 247-260.
29. Marcus H. (1935) Zur Stammens Ges Chichte Der herzens. Morph. Jahrb. 76: 96-103.
30. Milton R.H. y Charles B. C. (1971) A Gelatin Mass for Vascular Injection. Jale J. Biol. Med. 43 :257-270
31. Norris D. O. (1985) Vertebrate Endocrinology. 2<sup>nd</sup> ed. Lea & Febiger. Filadelfia
32. Ramaswami L. S. (1944) An Account of the Heart and Associated Vesseles in Some Genera of Apoda. Proc. Zool. Soc. Lond. 114 :117-138.
33. Rugs, R. (1962) Experimental embryology. Burgess publishing company. 3<sup>a</sup> ed. U.S.A. 499 p.
34. Shilling, C. (1935) Das Herz von *hypogeophis* und seine Entwickloug. Morph. Jahrb. 76: 57-91.
35. Sedmera D.P.; Exieder T.; Vuillemin M., Thompson R.P. Y Anderson R.H. (2000) Developmental Patterns of Myocardio. Anat. Rec. 258 : 319 - 337.
36. Sharma S. (1957) The Anatomy and Mode of Action of the Heart of Frog *Rana pipiens*. J. Morph 109: 323-349
37. Simons J. R. (1958) The Distribution of Blood from the Heart in some Amphibia. Proc. Zool. Soc. Lond. 132: 54-65
38. Smith H. y Taylor E.H. (1942) An Annotated Checklist and Key to the Amphibian of Mexico. Smithsonian Institution. United Stated National Museum Bulletin. (194) : 118 p.
39. Smith H.(1971) Synopsis of Hepertofauna of México.Vol.1 Analysis of literature of Axolotl. Erick Undberg Augata.W.V. 245 p.
40. Smith H. (1989) Discovery of the Axolotl and its early History in Biological Research. en Developmental Biology of Axolotl. Amstrong y Malacinski editors. Oxford University Press. USA. pp: 3-11

41. Steding G.; Jinwen X.; Seidl W.; Maner J.; Y Xia H.; (1990) Developmental Aspects of the Sinus Valvas and the Sinus Venosus Septum of the Right Atrium in Human Embryos. *Anat. Embryol.* 181: 469-475
42. Terhail A.J.J. (1942) On the Arterial Arch of *Salamandra muculosa* and *Ambystoma*. *J. Exp. Zool.* 53 :23-45.
43. Torrey W. T. (1978) *Morfogenesis de los Vertebrados*. Limusa 3° ed. Mex. D.F. 576 p.
44. Vanable J. W. (1985) Benzocaine an Exelent Amphibian Anestecic. *Axolotl Newsletter.* 14 :19-21.
45. Vanmierop L.H.S. y Kutsche L.M. (1984) Comparative Anatomy and Embriology of the Ventricles and Arterial Pole of the Vertebrate Heart en *Comparative Anatomy and Patology*, Markwald and Takao eds. U.S.A. 234 P.
46. Van Mierop L.H.S., Lodewyk L. y Kutsche L. M. (1985) Some Aspects of Comparative Anatomy of the Heart. *Cardio Vascular Shunt Alfred Benzon Symposium 21*. Editors: Johansen and Burggren, Munkgaard, Copenhagen. pp 38-56
47. Weichert, C.K. (1951) *Anatomy of the Chordates*. New York U.S.A. Mc Graw. Hill 921 p.
48. Withers, C.P. (1992) *Comparative Animal Physiology*. Sauunders Colleague publishing 4°ed. Sydney Australia. pp 563-730

---

# **FIGURAS (RESULTADOS)**

---

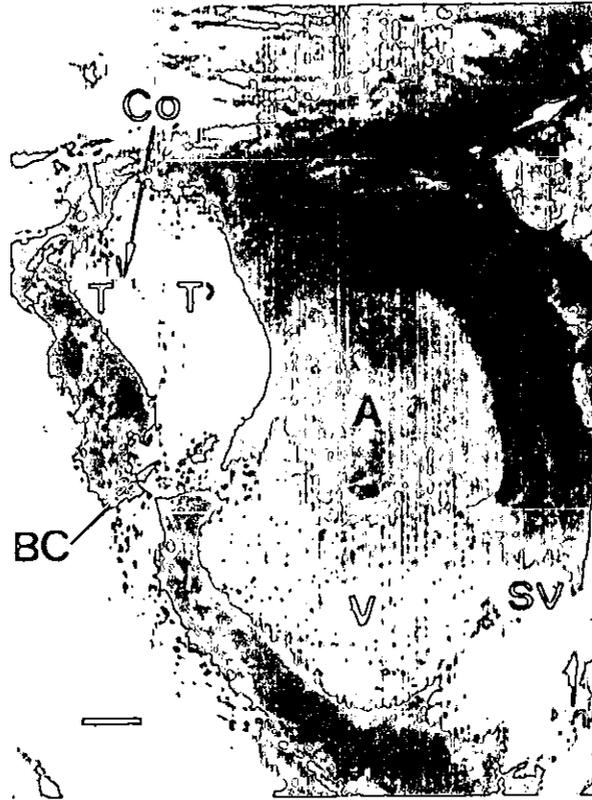


Figura.6. Fotografía de corazón de ajolote fijado por perfusión en vista ventral. SV= seno venoso, V= ventrículo, A= atrio, BC= bulbus cordis, T, T= rama derecha e izquierda del tronco arterial, Co = vaso coronario. La flecha señala el probable origen del vaso coronario. La barra representa 1mm.



Figura. 7. Fotografía de vista ventral de corazón de cadáver conservado por congelación olote y fijado en formol. SV = seno venoso, A = atrio, V = ventrículo, BC = bulbus cordis, T= tronco arterial, Co = vasos coronarios. III, IV, V, VI = arcos aórticos.



Figura. 8. Disección de la región ventral del atrio izquierdo. La flecha señala la comunicación en el septum interatrial (SIA). Se colocó un cabello en el orificio atrio ventricular derecho que se puede apreciar por transparencia. El septum está teñido con azul de metileno. La barra representa 1mm.



Figura. 9. Fotografía de corazón en vista ventral con disección en el atrio izquierdo (AI), el septum interatrial (SIA) esta teñido con azul de metileno. Se colocaron un cabello en cada tracto de entrada, los cuales están separados por el SIA. La comunicación interatrial es evidencia por una flecha. V = ventrículo, BC = bulbus cordis T= tronco arterial. La barra representa 1 mm.

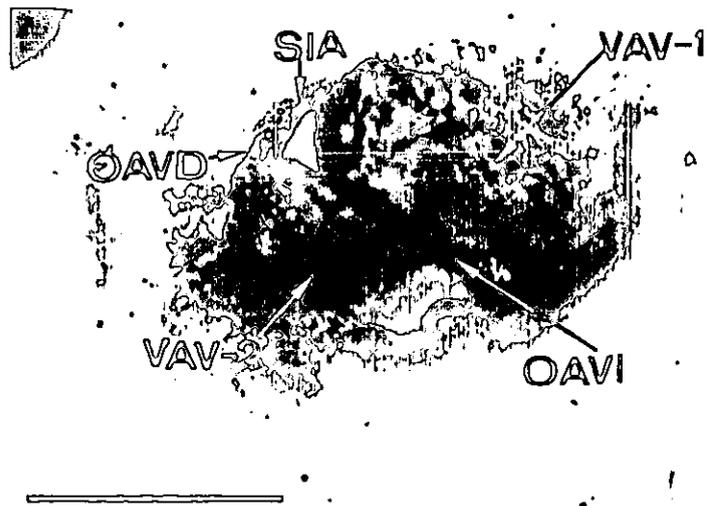


Fig. 10. Fotografía disección longitudinal a nivel del piso valvular atrioventricular, visto cefálicamente. El sepum interatrial (SI-A) se encuentra teñido con azul de metileno. VAV-1,2 = valvas atrio ventriculares. OAVD = orificio atrio ventricular derecho. OAVI = orificio atrio ventricular izquierdo. La barra representa 1mm.

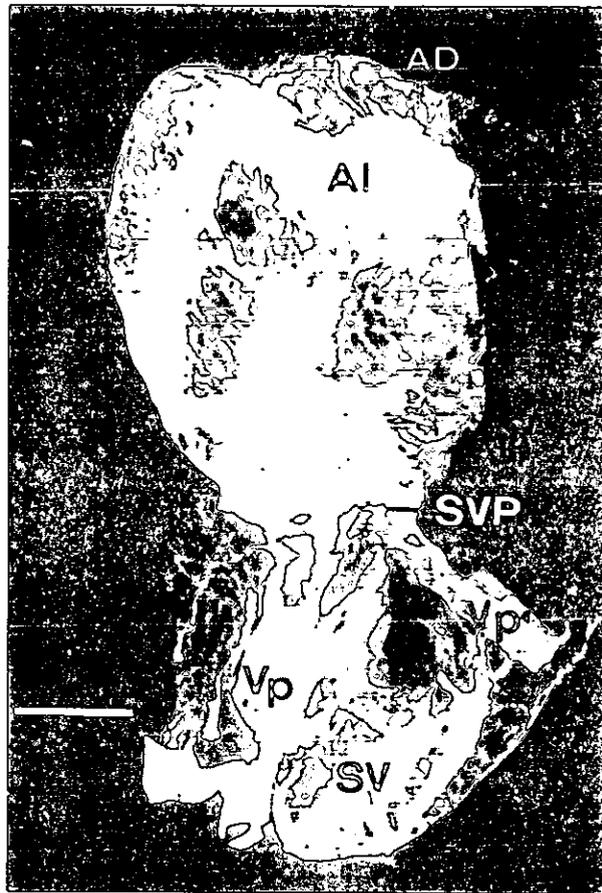


Figura. 11. Fotografía de región atrial vista dorsalmente. SV= seno venoso. AD= atrio derecho, AI= atrio izquierdo VP, VP'= venas pulmonares, SVP = seno de las venas pulmonares. La barra representa 1mm.



Figura .12. Fotografía de disección longitudinal de la cara izquierda del ventrículo (V). En su cavidad observamos las trabeculas (cabezas de flechas) teñidas con azul de metileno. VA-V1,2 = valvas de la válvula atrioventricular. 1,2,3 = valvas dela válvula semilunar proximal teñidas con azul de metileno. La barra representa 1mm.

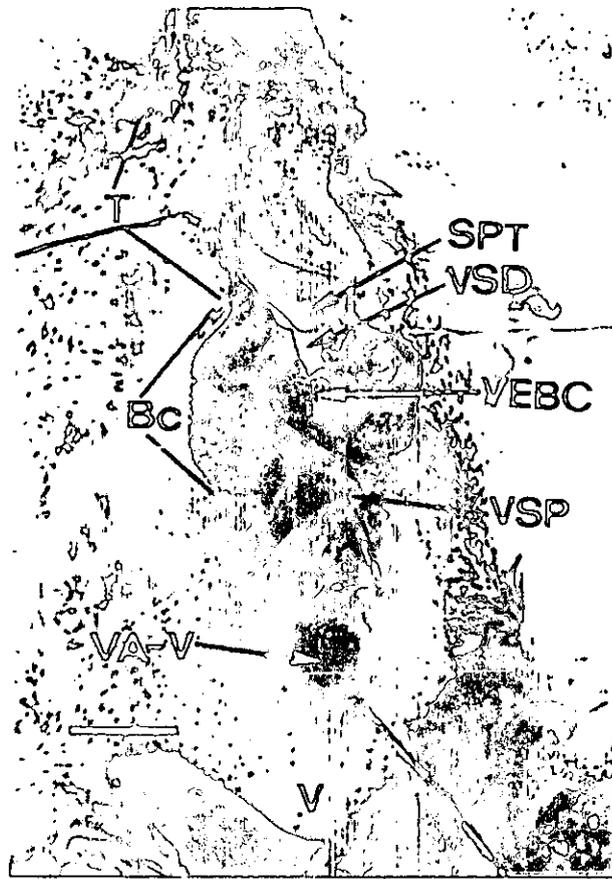


Figura. 13. Fotografía de vista ventral de disección longitudinal de ventrículo (V), bulbus cordis (Bc) y tronco arterial (T), con tinción de azul de metileno. VA-V = válvula atrioventricular. VSP = válvula semilunar proximal. VEBC = válvula espiral del bulbus cordis. VSD= válvulas semilunares distales. SPT = septum principal del tronco arterial. La barra representa 1mm.



Figura. 14. Fotografía de disección longitudinal de tronco arterial (T) y bulbus cordis (BC). Vista ventral. SBV = surco bulbo ventricular C1, C2 = canales derecho e izquierdo del tronco, en los que se inserto un cabello con la finalidad de hacerlos evidentes. La barra representa 1mm.

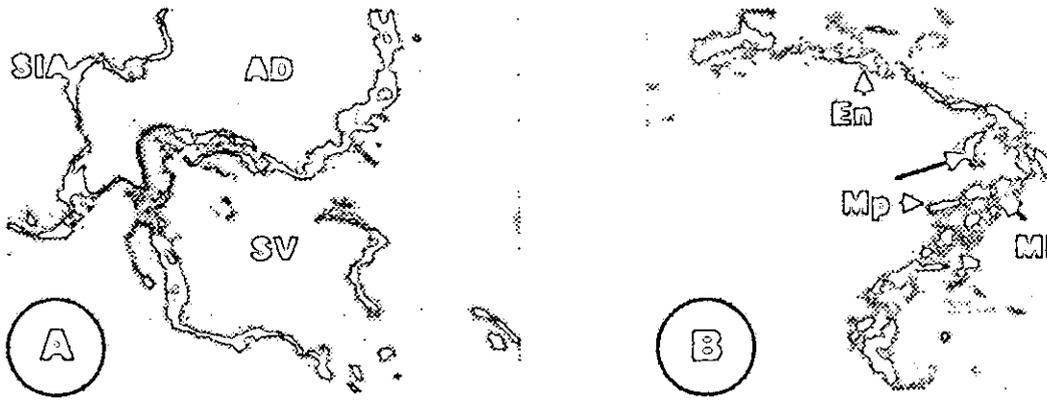


Figura. 15. Fotografía digital de corte sagital de seno venoso teñido por la técnica tricromica de Masson. En "A" tenemos al seno venoso (SV) como se relaciona con el atrio derecho (AD), 208X. "B" es un acercamiento (835X) de la pared del seno venoso del mismo corte. SIA = septum interatrial, En = endocardio, Mp = músculos papilares, Mi = miocardio.

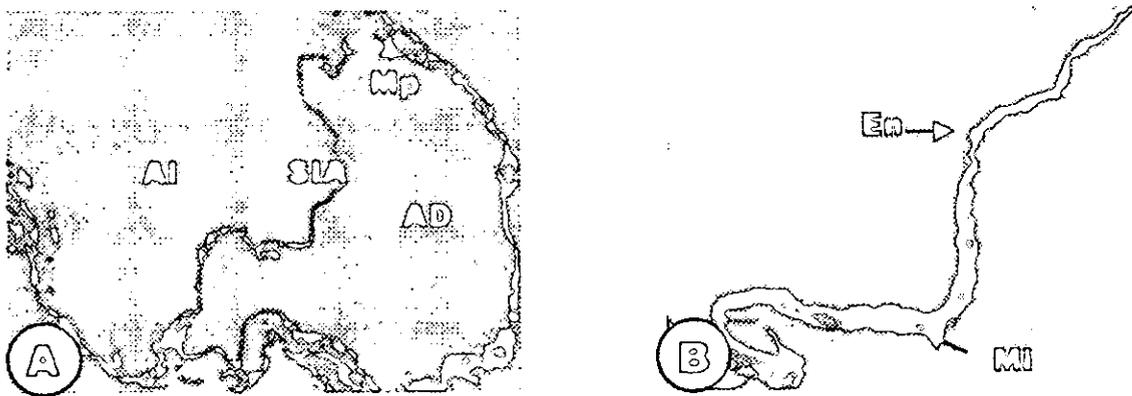


Figura. 16. Fotografía digital de corte sagital de la región atrial (A) teñido mediante la técnica de Masson, 83.5 X. "B" es un acercamiento del septum interatrial, 835X. AI = atrio izquierdo, SIA= septum interatrial, MP = músculos papilares, AD = atrio derecho, En = endocardio, Mi =miocardio.



**Fig. 17. Fotografía digital de corte sagital del tracto de entrada ventricular, teñida con la técnica tricromica de Masson. A = atrios, VAV-1,2 = valvas de la válvula estrioventricular. 83.5 X.**

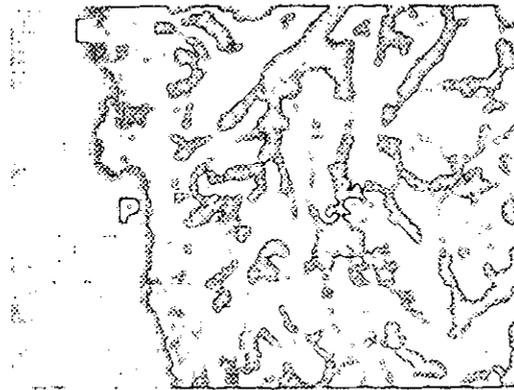


Figura. 18. Fotografía digital de corte sagital de ventrículo teñido con la técnica de Masson, 417.5X. P = pared ventricular, E = epicardio, CS = células sanguíneas.

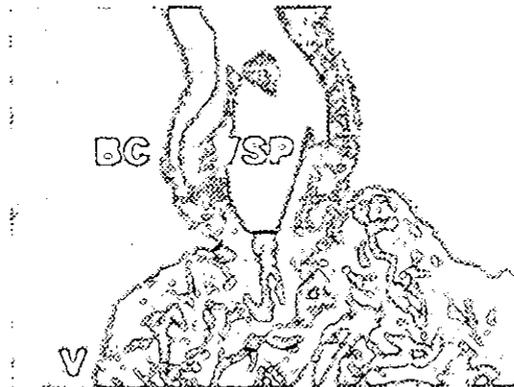


Figura. 19. Fotografía digital de corte sagital de la región bulbo ventricular teñida con la técnica de Masson, donde se puede apreciar la unión bulboventricular (dentro un círculo). V= ventrículo, BC= bulbus cordis, VSP= válvula semilunar proximal.

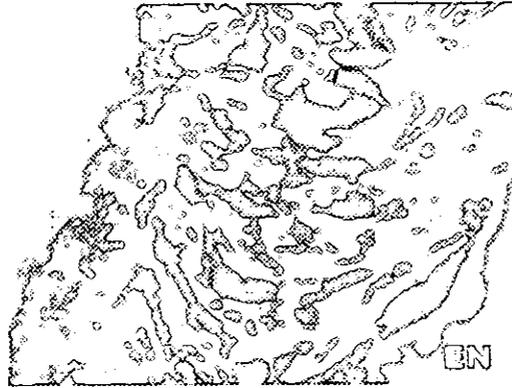


Figura 20. Fotografía Digital de corte sagital de la pared del bulbus cordis teñida con la técnica de Masson. EN= endocardio, EP= epicardio, M= miocardio, 1.- Estarto oblicuo, 2.- Estrato horizontal.

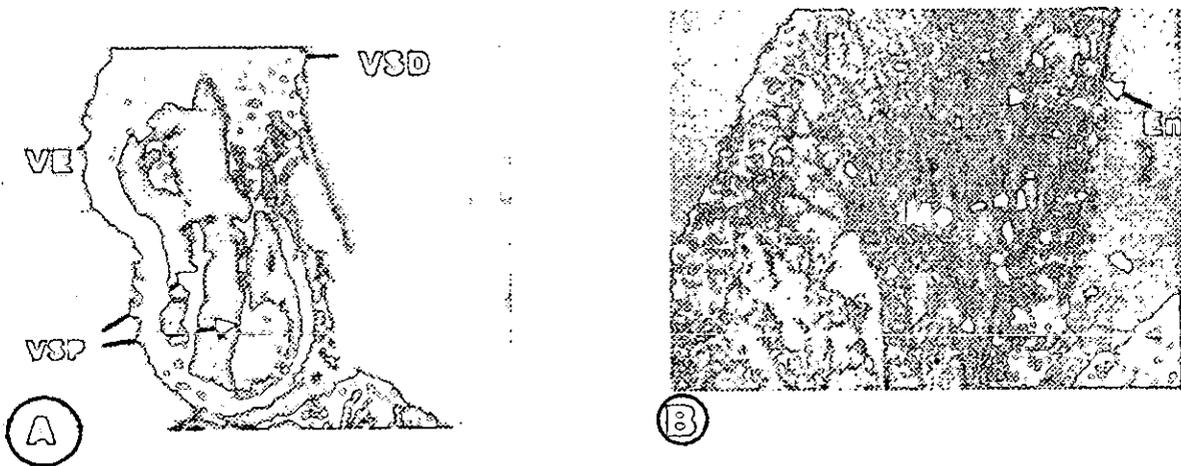
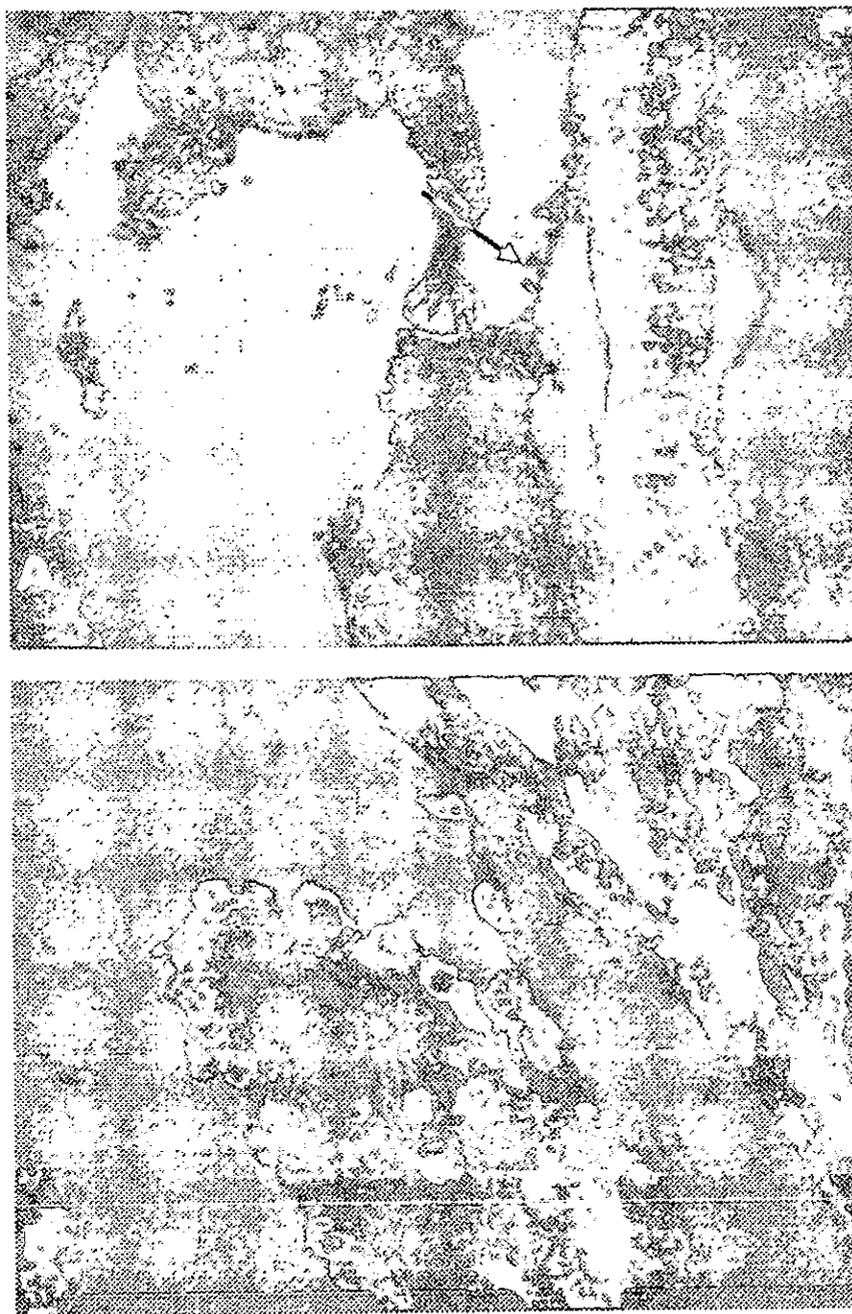
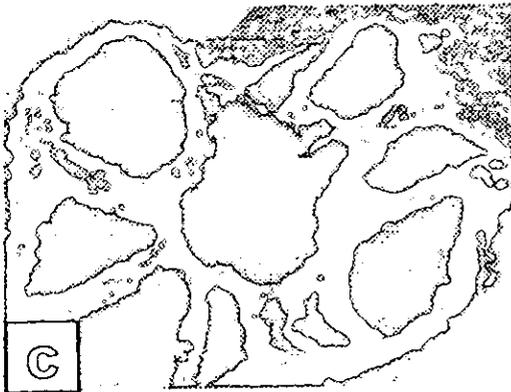
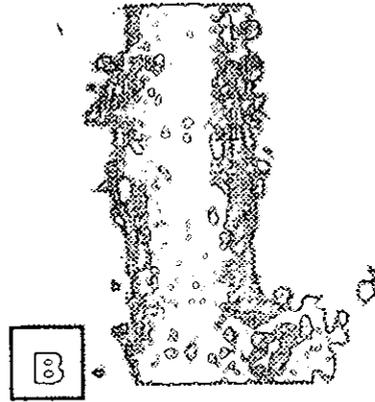


Figura. 21. Fotografía digital de corte sagital del bulbus cordis teñidos por la técnica de Masson(A), 83.5X. "B" es un acercamiento de la válvula espiral 417X. VSP= válvulas semilunares proximales, VE= válvula espiral, VSD= válvula semilunar distal, Me= mesenquima, En= endocardio.



**Figura. 22.** Fotografía digital de corte sagital teñido por la técnica de Masson de las válvulas semilunares distales 417.5X (A) y proximales 40X (B). La flecha señala una cuerda tendinosa, 835X



**Figura. 23. Fotografía digital de cortes de tronco arterial teñidos con la técnica de Masson. A y B, son cortes sagitales a 83.5X y 208.75X respectivamente y C es un corte transversal a 208.75X.**

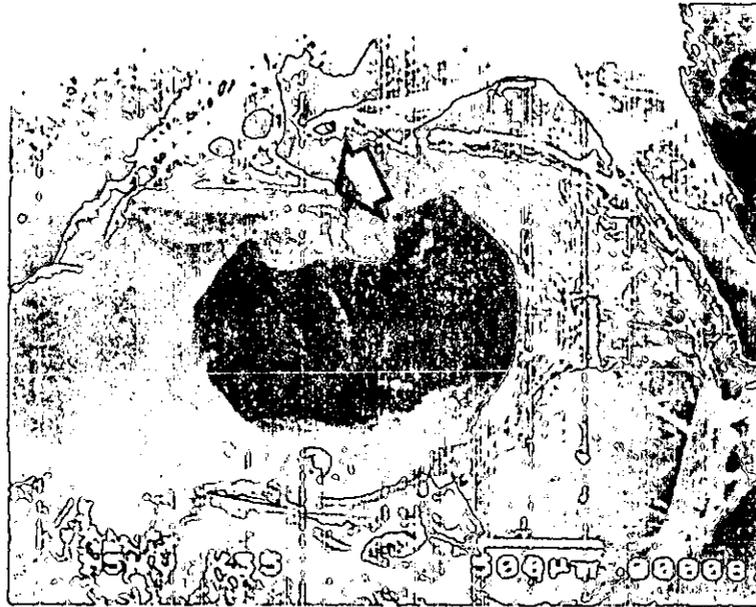


Figura.24. Microfotografía electrónica de barrido de el piso valvular atrio ventricular visto cefalicamente. Las flechas señalan los puntos de inserción del septum interatrial. La barra representa 500 micrómetros.

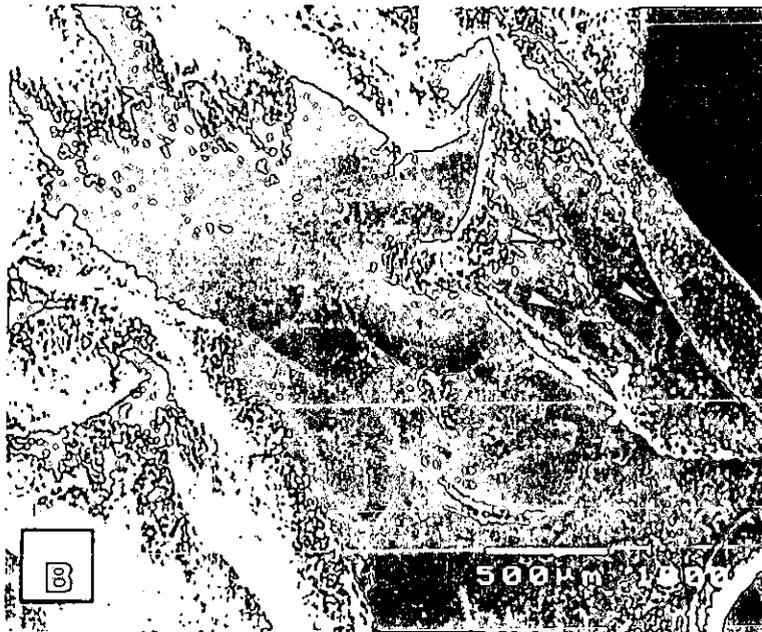
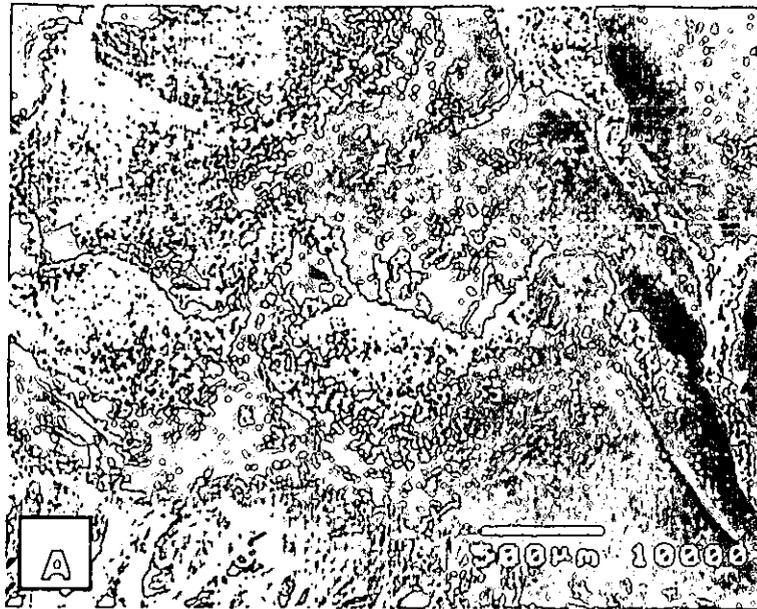


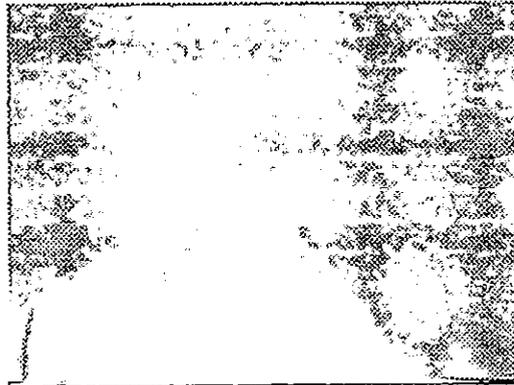
Figura. 25. Microfotografía electrónica de barrido de las valvas de la válvula semilunar proximal (A) y de las válvulas semilunares distales. Las flechas indican la presencia de cuerdas tendinosas. La barra representa 500 micrómetros.



Figura.26.- Microfotografía electrónica de barrido de la válvula espiral del bulbus cordis.15X.



Fig.27. Macrofotografía electrónica de barrido del arreglo trabecular en la cavidad ventricular. 50X.



**Fig. 28. Fotografía tomada de videofilmación in vivo del corazón en vista ventral. C1= canal derecho, C2=canal izquierdo. 15X.**

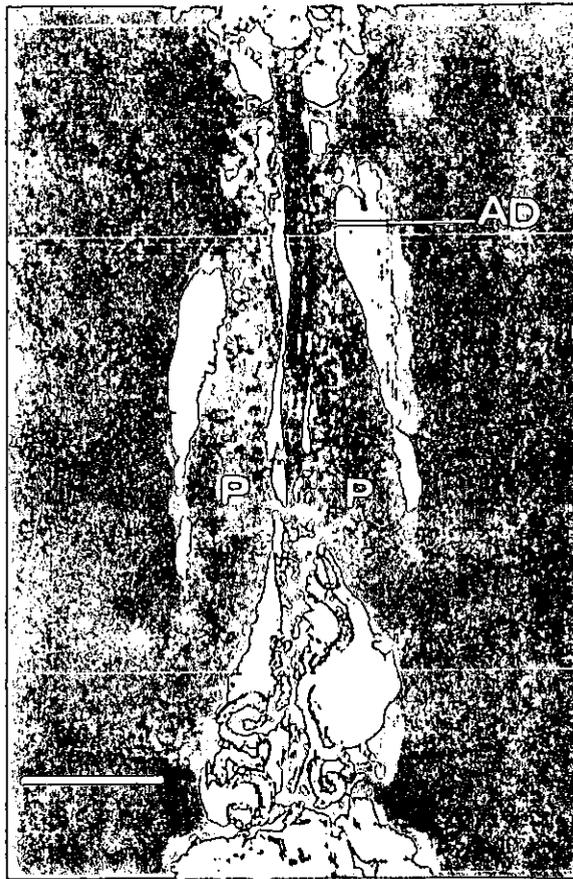
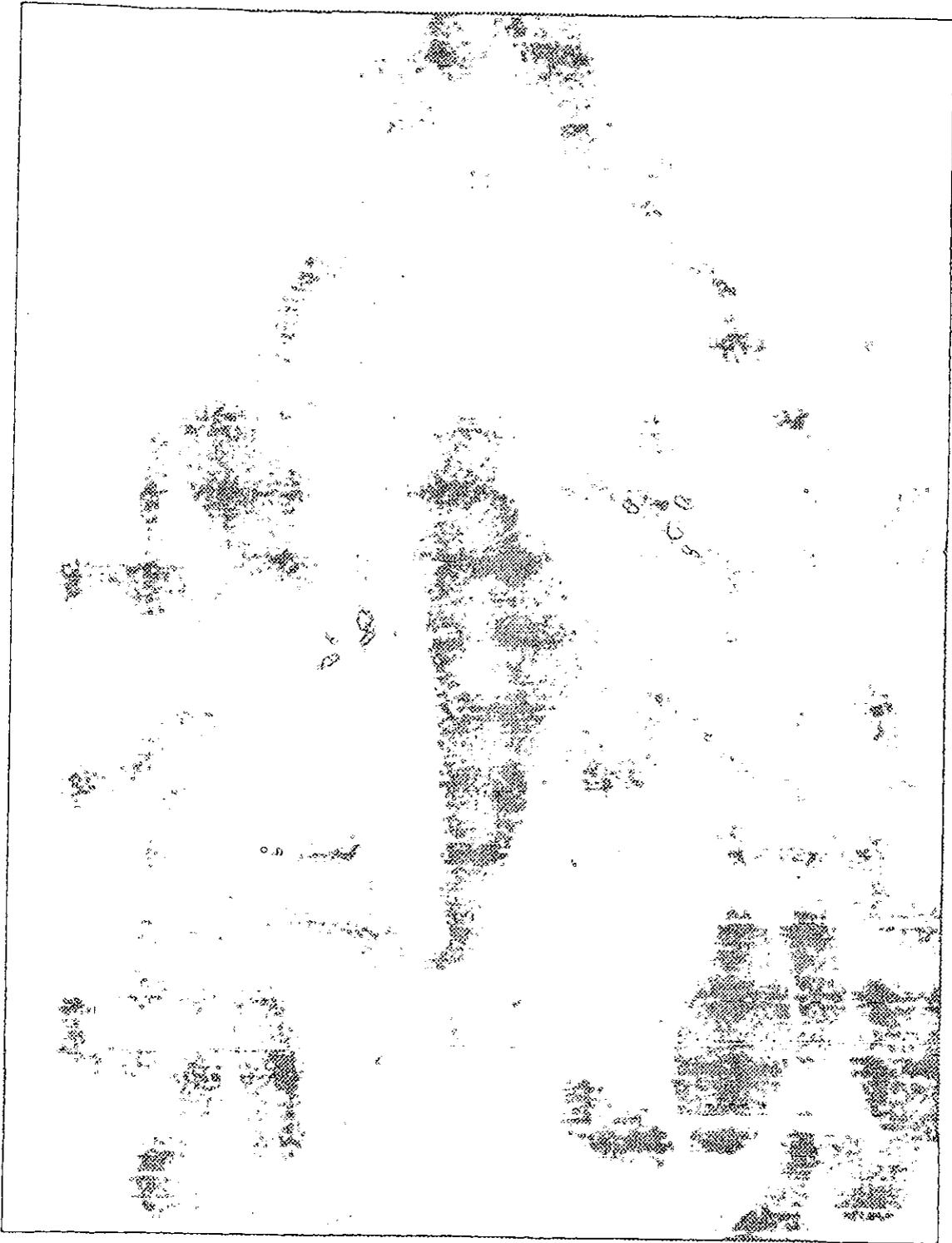


Figura. 29. Fotografía de vista dorsal de pulmones. P = pulmón, AD= aorta dorsal. la barra representa 1cm.

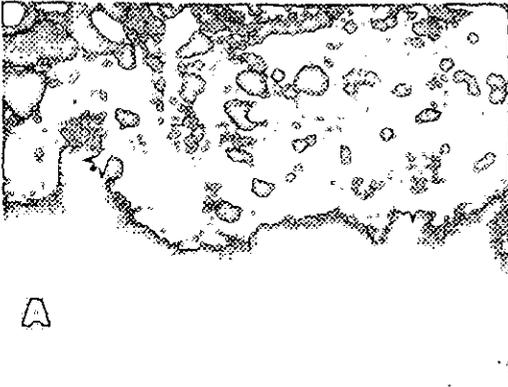


**Figura 30, disección ventral de ajolote de reciente muerte, la barra representa 1 cm.**

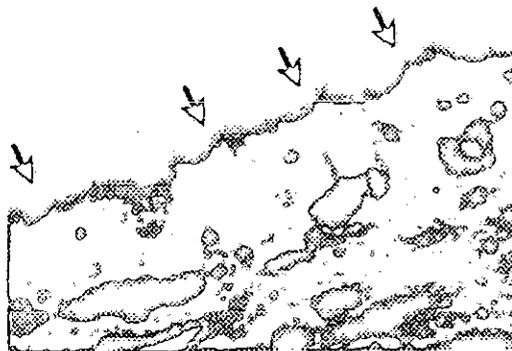
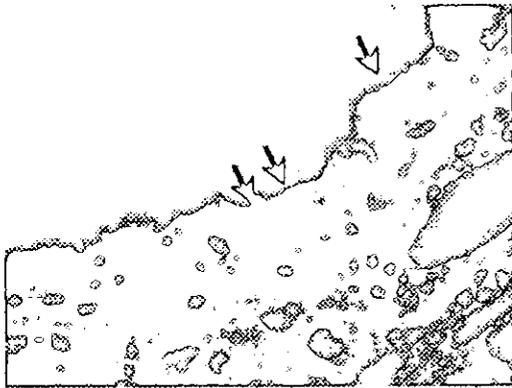


**Figura.31.- Fotografía digital de corte sagital de Bronquio de pulmón teñido con la técnica de hematoxilina y eosina. 208.75X**

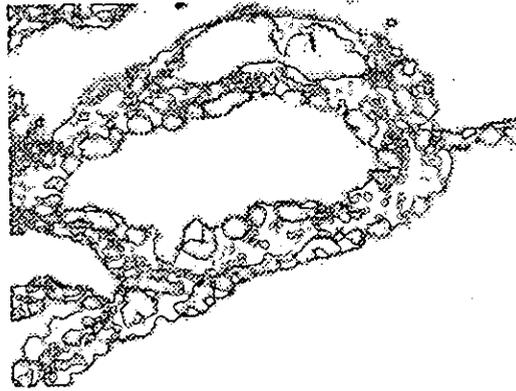
o



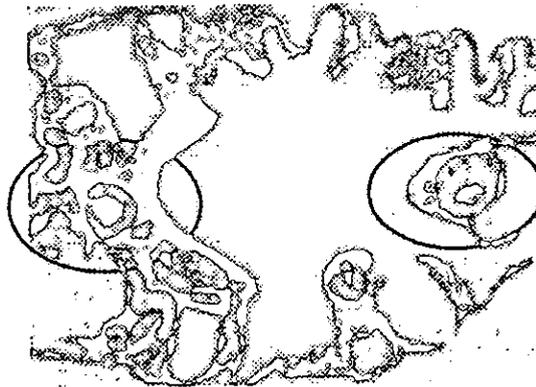
A



**Figura. 32. Fotografía digital de Cortes sagitales de tinciones positivas .A= azul de alciano, B = Luxol fast blue, C. Pass. Las flechas indican las células con reacción positiva. 835 X.**



**Figura 33. Fotografía digital de corte sagital de alveolo de pulmón de ajolote teñido con la técnica de hematoxilina eosina. 400X**



**Fig.34. Fotografía digital de corte transversal de pulmón en su nivel medio, teñido con la técnica de Luxol Fast Blue, en un círculo están encerrados dos grandes vasos.**

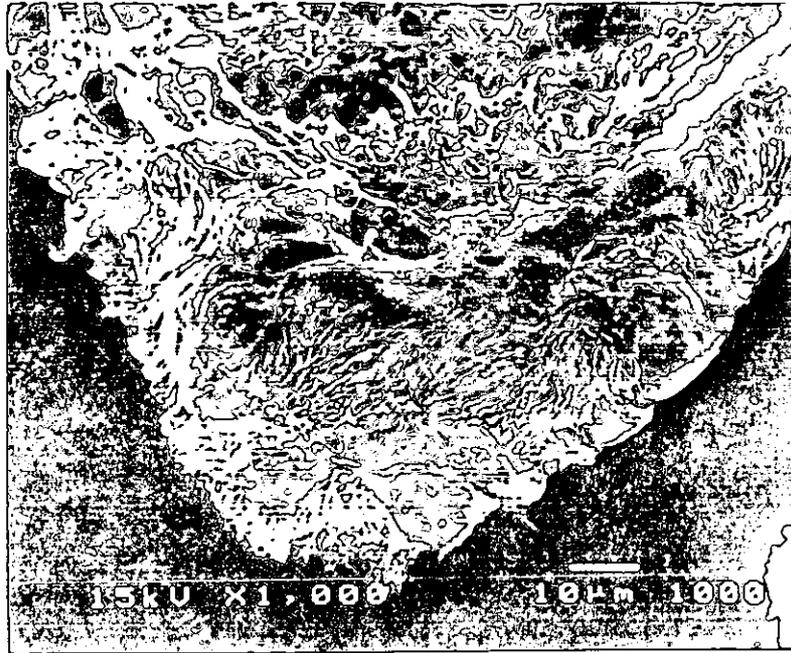


Figura. 35. Microfotografía electrónica de barrido, de cilios de células de epitelio bronquiolar. La barra representa 10 micrómetros.

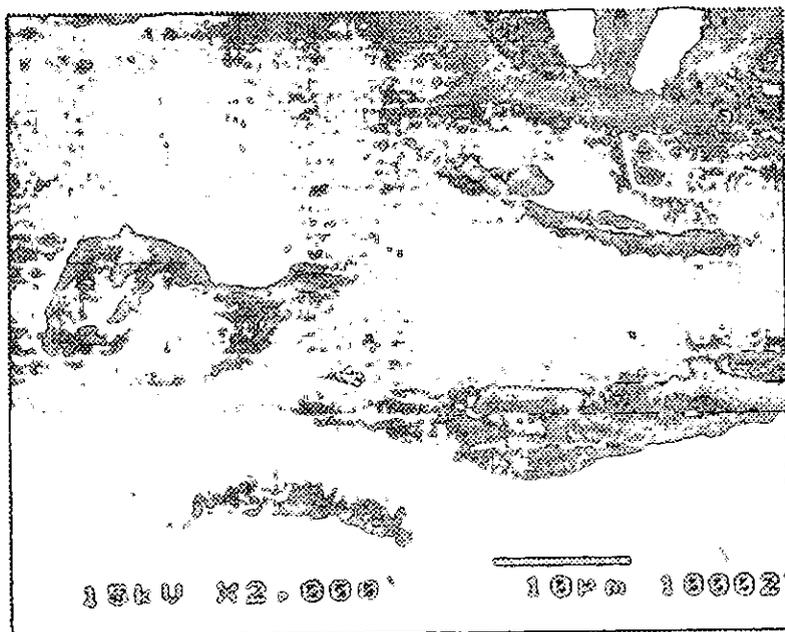


Figura. 36. Microfotografía electrónica de barrido que muestra exocitosis de células del epitelio bronquiolar (flechas) de pulmón. La barra representa 10 micrometros.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



Figura.37. Fotografía de corazón de ajolote inyectado con la masa de Milton y Charles. Vista ventral. III, IV, V, VI son los arcos aórticos correspondientes. La barra representa 1 cm.

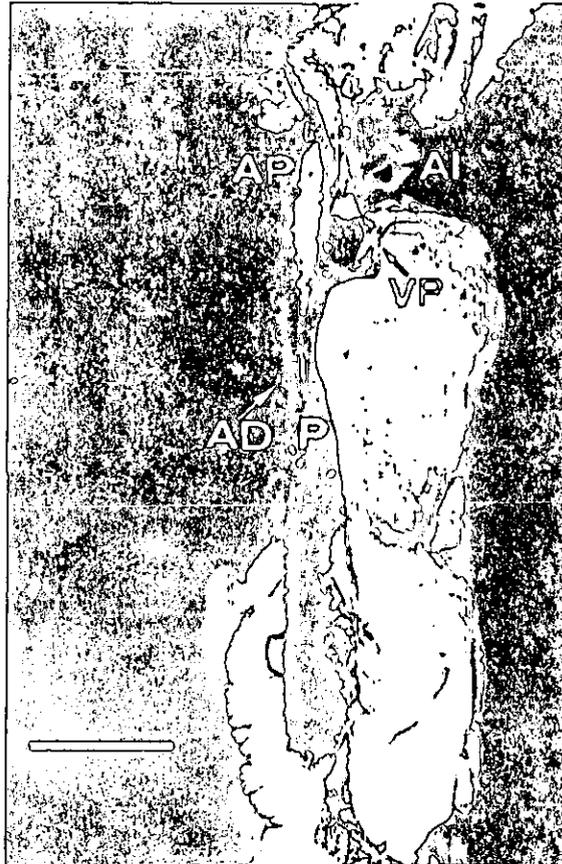


Figura 38. Fotografía de vista lateral de pulmón (P) y corazón de ajolote. AD = Aorta dorsal, VP= venas pulmonares, AP = arteria pulmonar, AI = atrio izquierdo.

---

---

## APENDICES

---

---

## APENDICE -1-

# TECNICA EMPLEADA PARA CIRUGIA EN EL CORAZÓN DE AJOLOTE

### EQUIPO:

- Tijeras de disección curvas.
- Tijeras para iris (Vannas).
- Charola de disección (con cama de parafina en el fondo).
- Bisturí número 11.
- Microscopio de disección.
- Pinzas de relojero #15 (2).
- Alfileres.
- Pipetas Pasteur
- Cable de cobre "magneto"

### REACTIVOS:

- Medio de operación para urodelos
- Solución salina (Holfreter)
- Benzocaína en polvo
- Alcohol etílico 96%
- Agua destilada

- Agua (H<sub>2</sub>O) libre de cloro
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)
- Bicarbonato de sodio (NHCHO<sub>3</sub>)

### **SOLUCIONES:**

Solución stock para urodelos (Rugs, 1962):

Agua corriente libre de cloro.....	1 litro
NaCl.....	7 gr.
KCl.....	0.1 gr
CaCl <sub>2</sub> .....	0.2 gr

Medio de operación para urodelos (Rugs, 1962) :

Solución stock para urodelos.....	2 partes
Agua corriente libre de cloro.....	1 parte

Solución Holfreter (Rugs, 1962):

NaCl.....	0.35gr
KCl.....	0.005gr
CaCl <sub>2</sub> .....	0.01gr

NaHCO<sub>3</sub>.....0.02 gr  
Agua destilada.....100 ml

(+) Anestésico :

- 1.-Diluir 6.0 gramos de benzocaína en una cantidad mínima de etanol al 96% (5 mililitros aproximadamente).
- 2.-Llevarla a un volumen final de 100 ml.
- 3.-Agitar fuertemente, de ser posible usar agitador y mosca.

(+) El anestésico tiende a precipitar poco tiempo después de prepararse, por lo tanto es muy importante preparar sólo la cantidad necesaria y usarla en un lapso no mayor a 3 horas.

#### **PROCEDIMIENTO:**

- ❖ Tomar el espécimen, colocarlo en la charola de disección con cama de parafina llena de medio de operación para urodelos y anestesiarlo. A pesar de que la concentración indicada en la literatura es de 0.6% para un ajolote adulto, nosotros recomendamos mejor usar la solución concentrada que ya especificamos como preparar y agregar a gotas hasta que el ajolote esté bien anestesiado; esto porque la resistencia de los organismos al anestésico es variable dependiendo de la temperatura ambiente y su talla corporal.
- ❖ Una vez anestesiado el organismo, fijarlo con alfileres a la charola por las extremidades anteriores y posteriores así como de la aleta caudal.
- ❖ Realizar una incisión con el bisturí, en la región media ventral, justo en la región que está flanqueada por las branquias hasta la región media abdominal, retirar la piel,

músculo y escápulas con tijeras hasta encontrar el pericardio, que tiene una apariencia brillante y es de color gris a verde oscuro y moteado, este saco pericardico hay que jalarlo con las pinzas de relojero antes de cortar, con cuidado ya que dentro esta el corazón, recomendamos hacer los cortes con las tijeras para iris; retirar completamente el pericardio detenerlo en los extremos con alambres y alfileres junto con los otros tejidos. La disección se puede prolongar más cefálicamente para descubrir los arcos aórticos, así el corazón se puede filmar, inyectar con la masa de Milton y Charles o cualquier otra manipulación que requiera realizarse *in vivo* a corazón abierto.

- ❖ Fijar el corazón por perfusión ya que al ser un órgano que cuenta con cámaras huecas y que además están llenas de sangre, puede ocasionar muchos problemas a la hora de realizar cortes histológicos, micro disecciones o microscopia electrónica. Recomendamos inyectar vía seno venoso o ventrículo, primeramente la solución salina Holfreter o ringer para anfibios y luego el fijador por la misma vía. Después de forma externa a todo el organismo para fijarlo.

Nota: en caso de que exista la necesidad de que el organismo sobreviva, toda la cirugía debe realizarse en condiciones de asepsia, suturar y tratar el espécimen con antibióticos como la estreptomocina o la penicilina y mantenerlo en medio de crecimiento que se prepara usando dos partes de la solución stock para urodelos y cuatro de agua corriente libre de cloro, el organismo se mantiene en esta solución hasta que cicatrice la herida.

## APENDICE -2-

### TECNICA DE MILTON Y CHARLES MODIFICADA PARA INYECCIÓN CARDIO VASCULAR DE EL CORAZÓN DE AJOLOTE.

La técnica utilizada para el sistema vascular del ajolote fue una adecuación de la solución "Monastral red + borospere" referida por Milton y Charles (1971). La técnica equipo y reactivos utilizados en el estudio fueron los siguientes:

#### EQUIPO:

- Catéter o sonda para niño.
- Jeringa hipodérmica de uso clínico de 10ml.
- Vasos de precipitado (50 y 25ml).
- Agitadores.
- Balanza analítica.
- Pipeta graduada.
- Probeta graduada (10, 50, 100 ,ml).
- Equipo para cirugía del apéndice "I".

#### REACTIVOS:

- Agua destilada (H<sub>2</sub>O)
- Ioduro de potasio (KI)
- Fosfato bibásico de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

- Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).
- Octanol ( $\text{CH}_3\text{COHH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ).
- Fenol (liquido) ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ).
- Gelatina (para microbiología).
- Tinta china negra (Staford).
- Formalina 15% (formaldehído diluido en PBS 1X)

### SOLUCIONES:

Soluciones de fosfato bibásico y monobásico de sodio 1mM.

Se prepara tomando en cuenta los siguientes consideraciones: el peso molecular del fosfato bibásico y monobásico es de 142.0 gr/mol y 137.99 gr/mol, es decir agregar 142 gr. De fosfato bibásico y 137 de fosfato monobásico por cada litro de agua respectivamente. El pH final debe ser de 7.1-7.4.

Solución de octanol : fenol:

$\text{CH}_3\text{OH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ .....40ml

$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ .....60ml

Formol 15% diluido en PBS 1x (formalina)

## PROCEDIMIENTO:

- ❖ Agregar los reactivos en las siguientes proporciones en el siguiente orden y agitar con una varilla de vidrio hasta su dilución total antes de agregar el siguiente.

Agua destilada.....	36 ml.
Gelatina.....	13 gr.
Ioduro de potasio.....	13 gr.
Fosfato monobásico de sodio (1 mM).....	13 ml.
Fosfato bibásico de sodio (1 mM).....	3 ml.
Mezcla de octanol-fenol (40:60).....	0.3ml.
Tinta china .....	11 ml.

\*El volumen total de esta masa tiene que ser de 55 ml aproximadamente, su coloración tiene que ser amarilla cristalina debe ser translúcida y viscosa, esto para obtener mejores resultados.

- ❖ Al momento de usar agregar a la masa formalina al 15% en proporción 9 :1 (masa : formalina), esta gelatiniza rápidamente (aprox. 5 minutos después de agregar el formol) por lo que el proceso tiene que realizarse lo más rápido posible. Si se requiere que la masa llegue a vasos muy pequeños e invada gran parte de los órganos así como un tiempo de gelatinización mayor y una mayor fluidez se recomienda una dilución 1:1 de la masa con PBS (1X), antes de agregar la formalina.

## **PROCEDIMIENTO:**

- ❖ Anestesiar y realizar cirugía como se especifica en el apéndice "1"
- ❖ Lavar internamente el corazón inyectando ringar para anfibios con la ayuda de la jeringa hipodérmica y la sonda por vía ventricular (ver apéndice "1"), hasta eliminar toda la sangre del interior del corazón.
- ❖ Cargar rápidamente la jeringa hipodérmica con la masa ya con formalina, conectarla a una sonda e inyectar en la zona del ventrículo, regulando la presión con el émbolo (la vía no es exclusivamente ventricular ésta puede variar dependiendo la zona de interés, la inyección puede ser por el seno venoso, atrio, ventrículo o bulbus cordis).

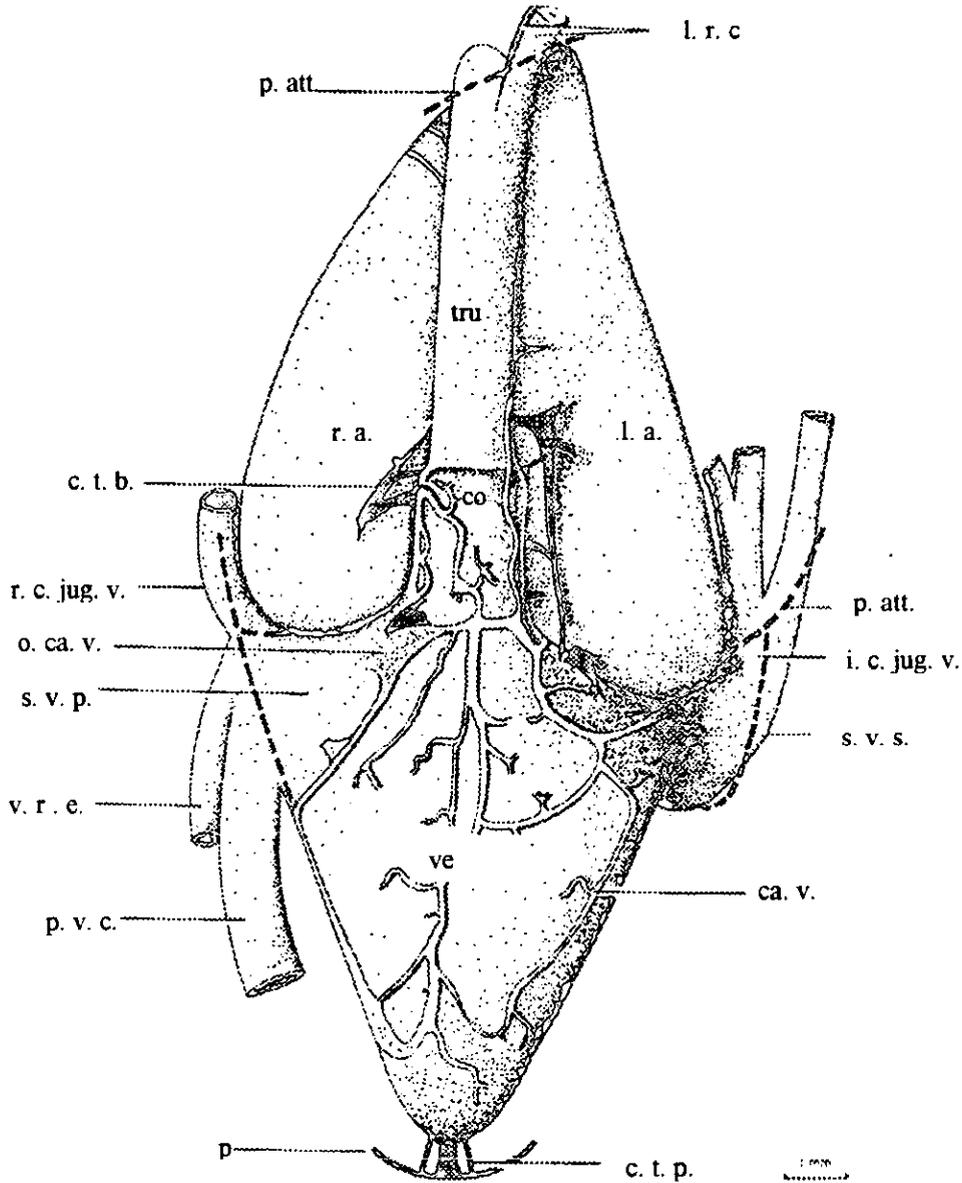
Después de inyectar la masa, las contracciones cardiacas la impulsaran por el sistema vascular, la variación de la concentración de la formalina, el octanol - fenol, y la dilución de la masa, nos da un amplia gama de tiempos de gelatinización y tamaño de vasos que puede invadir la masa así como la consistencia final.

- ❖ Finalmente lavar el cadáver con agua corriente después de la gelatinización de la masa y fijarlo con formalina 3.5%, por dos horas mínimo. Al iniciar el seguimiento de los vasos, el cadáver se mantienen en agua para evitar la desecación. La disección se puede llevar acabo con equipo para cirugía, el equipo a usar dependerá de el tamaño de los vasos a seguir.

**Nota:** la mezcla sin pigmento y sin formalina, puede almacenarse por un par de meses a temperatura ambiente sin disminuir su eficacia.

### APÉNDICE-3-

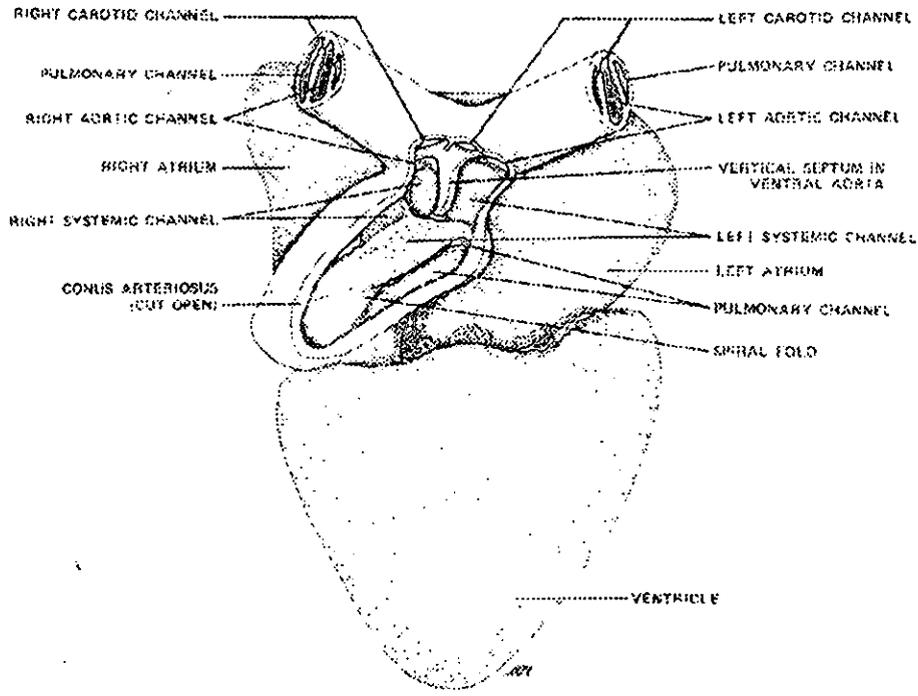
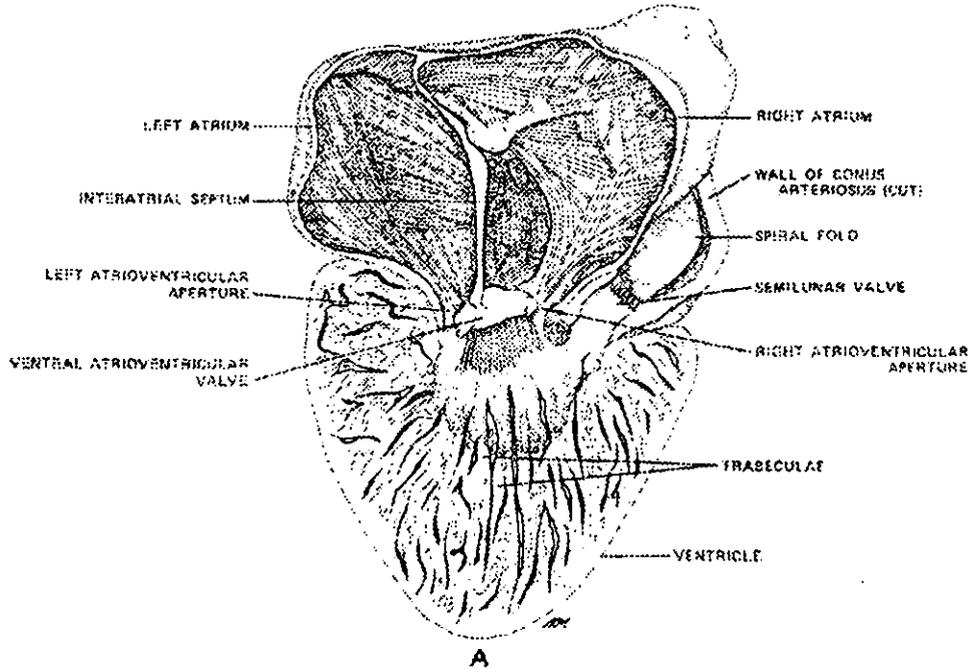
#### CORAZON DEL APODO *Hypogeophys rostratus* (de Lawson 1966).



ca.v.= venas coronarias, con.= bulbus cordis, c.t.b.= tejido conectivo que conecta el atrio y el tronco arterial, c.t.p.= uniones posteriores de tejido conectivo, l.a.= atrio izquierdo, r.a.=atrio derecho, l.c.jug.v.= vena yugular común izquierda, r.c.jug. v.= vena yugular común izquierda, l.r.c.=arterias carotídeas comunes, derecha e izquierda, o.ca.v.= apertura de las venas coronarias en el seno venoso, p= pericardio, p.att= puntos de adherencia entre el corazón y el pericardio, p.v.c.= vena cava posterior, s.v.p.= seno venoso principal, s.v.s.= seno venoso sinistra, tru = tronco. ve= ventrículo, v.re.=,vena renal.

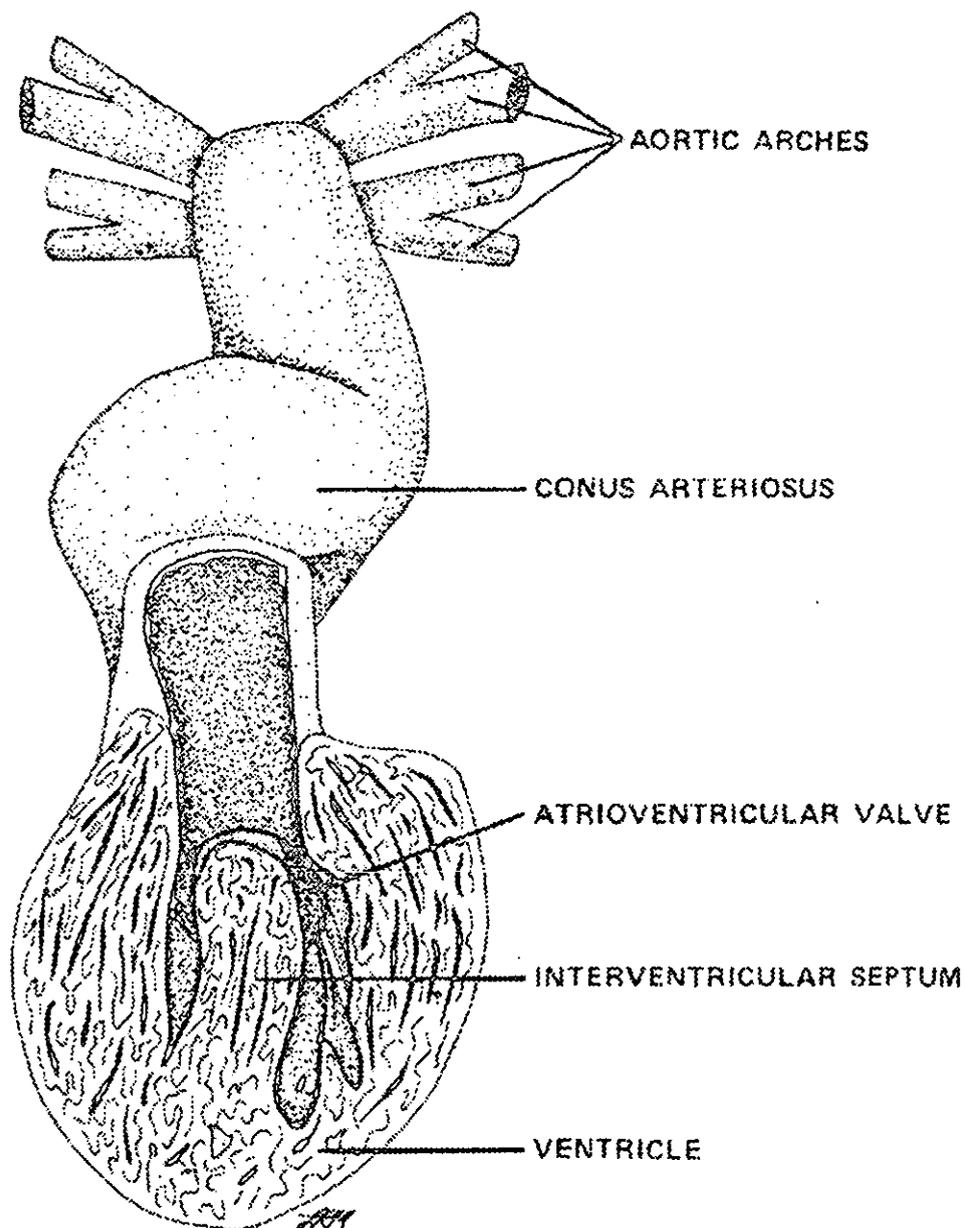
## APÉNDICE-4-

### CORAZÓN DE ANURO "*Rana catesbiana*" (Holmes, 1976)



APENDICE-5-

CORAZÓN DE PEZ PULMONADO (*Protopterus*) ( de Holmes 1976)



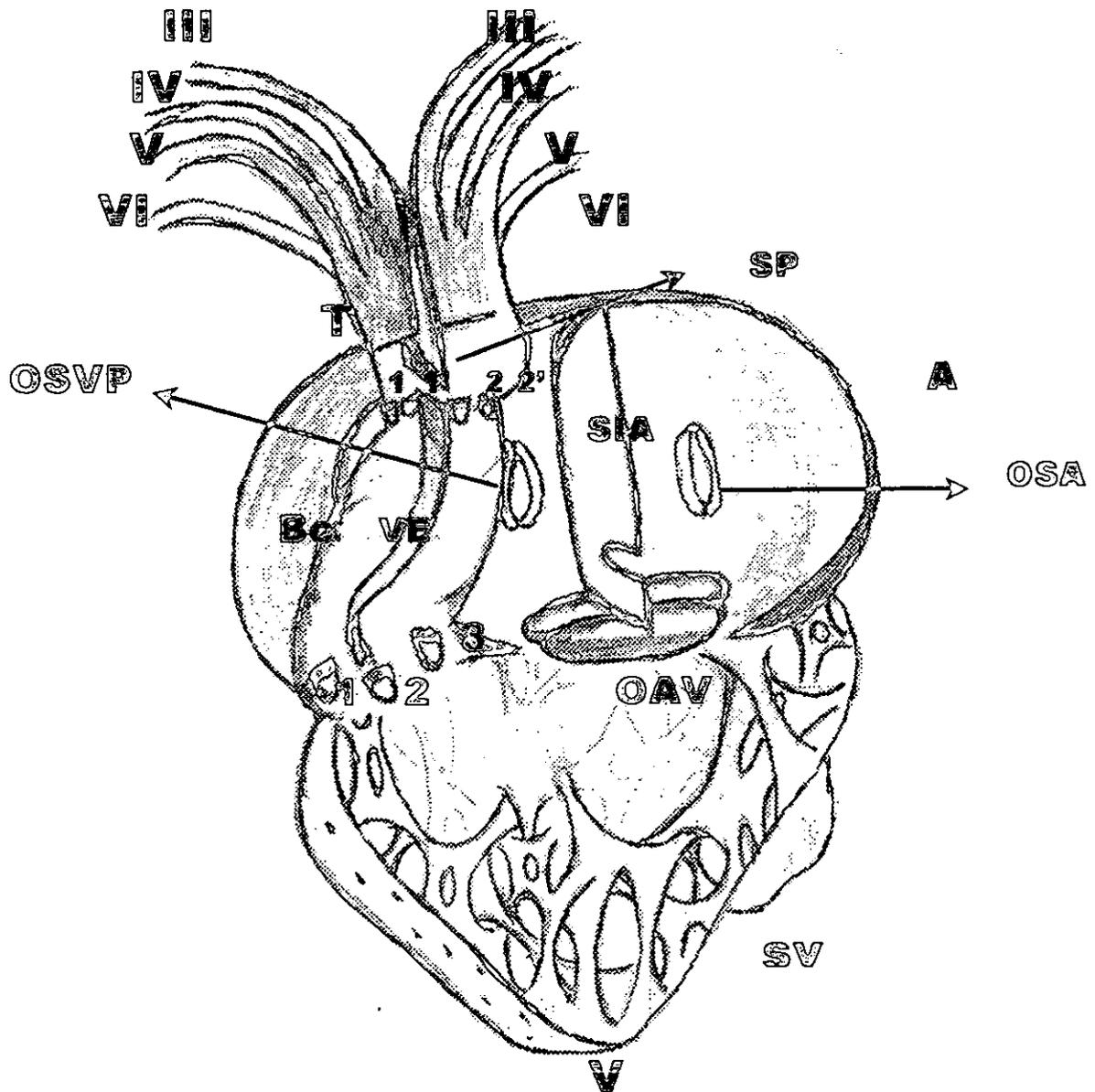
---

# ESQUEMAS

---

## ESQUEMA -1-

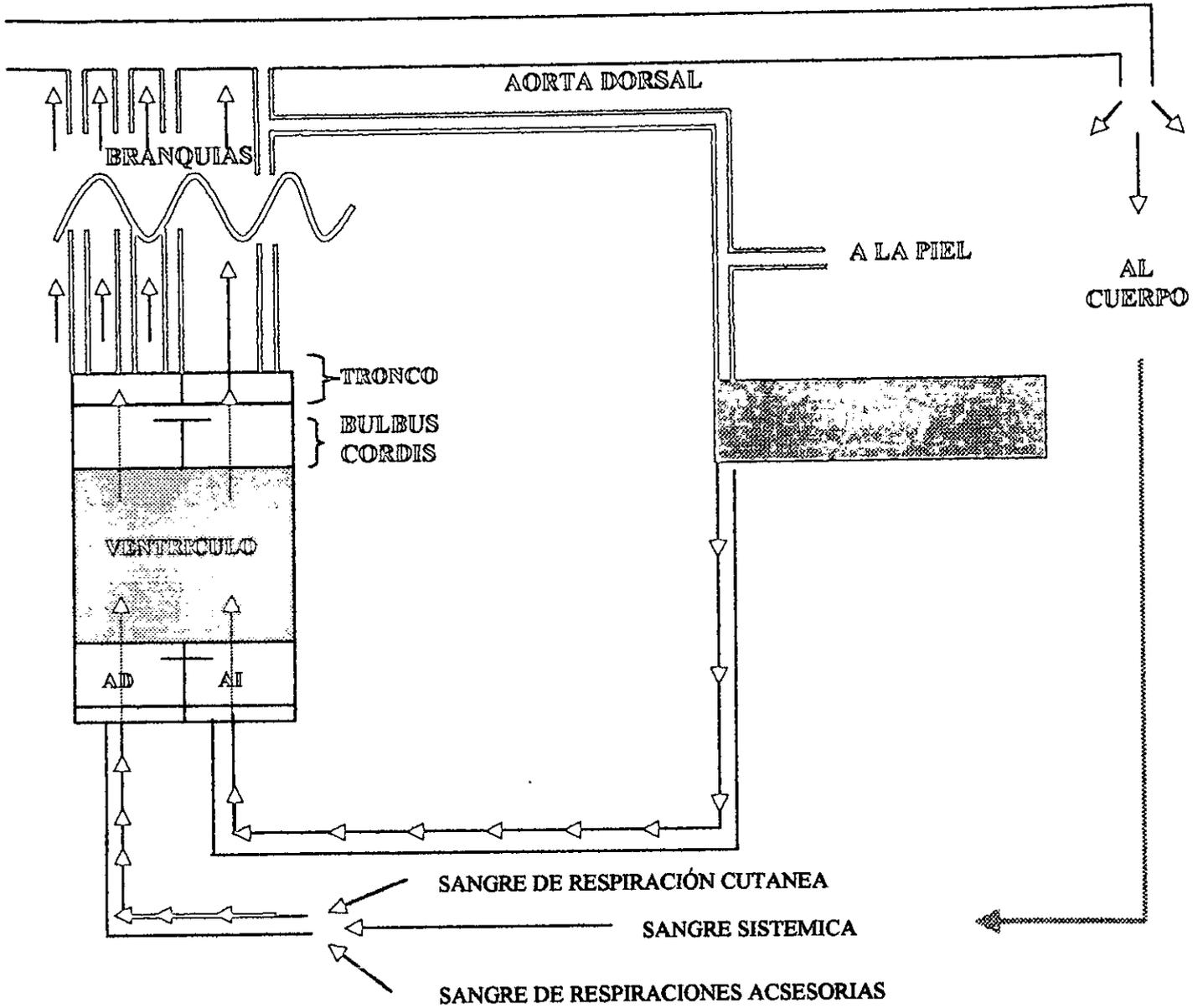
### REPRESENTACIÓN DEL CORAZÓN DE AJOLOTE



A=atrio, V= ventriculo, BC= bulbus cordis, T= tronco arterial, SP= septum principal SIA= septum interatrial, OSA= orificio senoatrial, OSVP= entrada del seno de las venas pulmonares, OAV= orificio atrio ventricular, SV= seno venoso, 1,2,3 = valvas de válvula semilunar proximal, VE = válvula espiral, 1, 1',2,2'= valvas de válvulas semilunares distales, I,II, III,IV= arcos aórticos correspondientes.

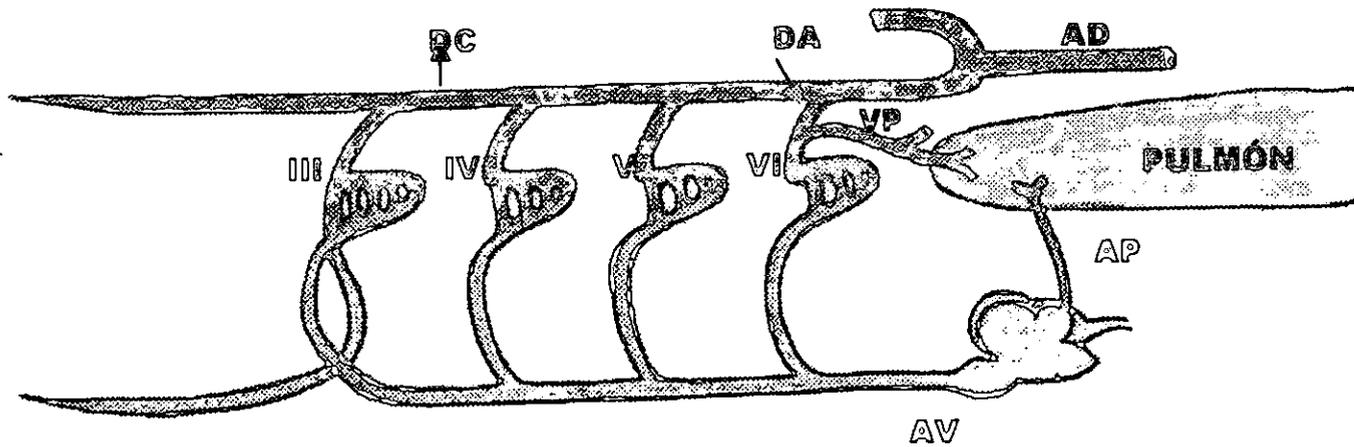
ESQUEMA -2-

DIAGRAMA GENERAL DE CIRCULACIÓN EN EL AJOLOTE



### ESQUEMA -3-

## DISPOSICIÓN DE ARCOS AORTICOS, CORAZÓN Y PULMÓN DEL AJOLOTE



DC= Ducto corotideo. DA = Ducto arterioso, AD =Aorta dorsal, VP = Venas pulmonares, AP = Arteria pulmonar, VP = Vena pulmonar, AV = Aorta ventral. III, IV, V, VI son los arcos aórticos respectivos.

ESTA TESIS NO SALIR  
DE LA BIBLIOTECA