

## Archivos de Cardiología de México

Volumen **75**  
Volume

Suplemento **3**  
Supplement

Julio-Septiembre **2005**  
July-September

*Artículo:*

### Regeneración miocárdica en *Ambystoma mexicanum* después de lesión quirúrgica

Derechos reservados, Copyright © 2005  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)

## Regeneración miocárdica en *Ambystoma mexicanum* después de lesión quirúrgica

Alvaro Vargas-González,\* Esteban Prado-Zayago,\*\* Martha León-Olea,\*\*\* Verónica Guarner-Lans,\* Agustina Cano-Martínez\*

### Resumen

Se realizó resección ventricular en el corazón de *Ambystoma mexicanum*, se evaluó si la restitución del tejido resulta de hipertrofia o de hiperplasia. Por medio de una tinción tricrómica se encontró que 5 días después del daño en el espacio de la resección se encontró un coágulo rodeado de fibras de colágena ( $83 \pm 6\%$ ), músculo ( $10 \pm 3\%$ ) y zonas sin tejido ( $7 \pm 2\%$ ). Una proporción de  $50 \pm 4$  y  $90 \pm 2\%$  correspondió a tejido muscular 10 y 30 días después de la lesión. La tinción con bis-Benzimida indicó que en la zona lesionada hay proliferación celular. En tanto que la inmunohistoquímica doble para actina sarcomérica  $\alpha$  y antígeno nuclear de proliferación celular mostró que el tejido que restituyó el espacio se produjo por proliferación de cardiomiocitos con un valor máximo de 68%, 5 días después de la lesión. Nuestros resultados indican que el miocardio de *A. mexicanum* recupera su estructura mediante la hiperplasia de cardiomiocitos y sugieren que su capacidad regenerativa es mayor que la informada para mamíferos adultos (1%), y para otros vertebrados no mamíferos (32%). Esto hace de *A. mexicanum* un modelo idóneo para estudiar los mecanismos reguladores de la regeneración miocárdica *per se*, en vertebrados adultos *in vivo*.

### Summary

#### MYOCARDIAL REGENERATION IN *AMBYSTOMA MEXICANUM* AFTER SURGICAL INJURY.

Ventricular resection of the heart of *Ambystoma mexicanum* was performed and the type of tissue that restored the lesion and if it is by hypertrophy or hyperplasia of myocardium, were evaluated. Masson's trichrome stain indicated that 5 days after resection, the gap was occupied with a blood clot surrounded by collagen fibres ( $83 \pm 6\%$ ) and muscle ( $10 \pm 3\%$ ) and the rest of area ( $7 \pm 2\%$ ) free of tissue. A proportion of  $50 \pm 4$  and  $90 \pm 2\%$  was muscular tissue, 10 and 30 days after injury. The evaluation with bis-Benzimide indicated cell proliferation in the injured area. The double immunohistochemistry for  $\alpha$ -sarcomeric actin and proliferating cell nuclear antigen indicated that the tissue that occupied the injury-produced gap was originated by cardiomyocyte proliferation, which presented a maximum of 68%, 5 day after injury. Our results indicate that the myocardium of *A. mexicanum* recovers its structure through cardiomyocyte hyperplasia and suggest that the myocardial regenerative capacity is higher than the reported for adult mammals (1%) and other non-mammalian vertebrates (32%). This characteristic makes *A. mexicanum* a suitable model to study the mechanisms that regulate *per se*, the myocardial regeneration in adult vertebrates *in vivo*. (Arch Cardiol Mex 2005; 75: S3, 21-29)

**Palabras clave:** Resección ventricular. Cardiomiocitos. Proliferación celular.

**Key words:** Ventricular resection. Cardiomyocytes. Cell proliferation.

\* Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

\*\* Criadero Tachipa Umbral, Maya 'Ik Centro.

\*\*\* Laboratorio de Histología, División de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría.

Correspondencia: Dra. Agustina Cano Martínez. Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". (INCICH, Juan Badiano No. 1 Col. Sección XVI, Tlalpan 14080. México D.F.). Teléfono: 01 (555) 5 73 29 11, Ext. 1278. Fax: 01 (555) 5 73 09 26. Correo electrónico: canagu@cardiologia.org.mx

## Introducción

La capacidad regenerativa difiere entre los vertebrados dependiendo del estado de desarrollo y de su lugar en la escala filogenética, de modo que suele ser mayor en las etapas más tempranas de desarrollo y en los animales más antiguos.<sup>1</sup> En los anfibios urodelos la regeneración ocurre incluso en etapas tardías de la ontogenia, y en una variedad amplia de estructuras anatómicas que incluyen las branquias,<sup>2</sup> las extremidades y la cola,<sup>3,4</sup> las mandíbulas,<sup>5</sup> la córnea, el cristalino y la retina,<sup>6,7</sup> después de su resección parcial o total.

Por mucho tiempo se pensó que el músculo cardíaco de los mamíferos adultos era un tejido con cardiomiocitos diferenciados terminalmente<sup>8-10</sup> que no podían reingresar a la etapa de síntesis de ADN y mitosis del ciclo celular. Tal postura se ha puesto en duda debido a que hay evidencias que indican la existencia de cardiomiocitos proliferantes en el corazón de mamíferos adultos después de daño miocárdico.<sup>10-13</sup> Sin embargo se ha reportado el equivalente a sólo 0.0002% de miocitos cardíacos en mitosis y 0.0011% de núcleos de miocito cardíaco en división, en el corazón de humano inmediatamente después de infarto y en insuficiencia cardíaca crónica respectivamente.<sup>10</sup> Mientras que solamente 1% de las células cercanas a la zona lesionada presenta marca para antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) después del ligamiento de la arteria coronaria en ratas adultas.<sup>12,13</sup> El miocardio de los anfibios adultos responde a la lesión experimental con datos que sugieren el reingreso de las células a la etapa de síntesis de ADN y mitosis.<sup>14,15</sup> Sin embargo, entre los tipos celulares que suelen formarse después de lesión del miocardio se encuentran el músculo cardíaco y el tejido conectivo que se observa como una cicatriz fibrótica<sup>15</sup> y no hay evidencias claras del tipo y proporción de las células en proliferación. Por lo anterior en el presente trabajo se evaluó la recuperación estructural del miocardio ventricular de *A. mexicanum* después de lesión quirúrgica. Se evaluó el tipo de tejido con el que se ocupa el espacio resultante, así como si este tejido se produjo por hipertrofia o por hiperplasia.

## Material y métodos

### Material biológico

Se usaron 20 organismos adultos de *A. mexicanum* de 8 a 12 meses de edad, obtenidos por reproducción en cautiverio en el Criadero "Tachipa Umbral" (Permiso SEMARNAP: INE-CITES-DGVS-

CR-IN-0249-D.F./97). Los animales se transportaron al laboratorio donde se mantuvieron con luz y temperatura ambiente. Se alimentaron con peces vivos (charales, *Chirostoma regani* y *Chirostoma jordani jordani*), *ad libitum*. El manejo y cuidado de los animales se hizo según los principios del Comité de Bioética del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

### Resección ventricular y obtención del corazón

Los organismos se anestesiaron con una inmersión en solución de triclaína en agua 1:1,000 (w:v) (ICN Biomedicals). Se colocaron sobre una base fría a 4° C con el propósito de reducir su metabolismo y se realizó una toracotomía en condiciones de asepsia. Catorce organismos se sometieron a toracotomía y resección de 10 ± 2% del ventrículo, que alcanzó la cavidad ventricular, con una tijera para microcirugía. La herida se limpió y la cavidad torácica se cerró con hilo quirúrgico 3-0 después de la formación de un coágulo. Una vez recuperados de la anestesia, los animales se regresaron a las peceras, con las condiciones descritas previamente. La tasa de sobrevivencia fue de 85.7% después de la resección. En los organismos control (n = 6) se efectuó toracotomía sin resección ventricular. Los organismos se sacrificaron por decapitación en los días 5, 10 y 30 después de la cirugía, y se extrajo el corazón de 4 organismos lesionados y 2 controles en cada tiempo. Los animales recibieron una inyección i.p. de colchicina (300 mg/kg) (Sigma Chemical), con el propósito de detener las células en división.<sup>16,17</sup>

### Procesamiento del tejido

Los corazones aislados se lavaron con solución salina, y se fijaron con formol al 10% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), durante 8 horas, y se equilibraron en sacarosa al 30% a 4° C. Se hicieron cortes por congelación en crióstato, transversales y seriados, de 10 µm de grosor, que se montaron en portaobjetos gelatinizados.

### Tinción tricrómica de Masson

En un lote de cortes histológicos se revisó la estructura de la pared del ventrículo cardíaco con la técnica tricrómica de Masson (kit comercial, Accustain Trichrome Stain, Sigma Diagnostics), la cual tiñe el músculo de color rojo y el tejido fibroso de color azul, para identificar el tipo de tejido que restituyó la lesión. Los cortes se incu-

baron en solución de Bouin a 60° C durante 60 minutos, se tiñeron con hematoxilina de Weigert, seguida de una tinción con Escarlata de Biebrich y fucsina ácida durante 5 minutos, y un tratamiento con ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico durante 10 minutos. Se tiñeron con azul de anilina durante 10 minutos, y se enjuagaron con ácido acético al 1% durante 2 minutos. Finalmente se deshidrataron con etanol al 95% y absoluto, y se aclaró con xilol. Se buscó tejido muscular cardíaco y fibras de colágena a través de microscopía de luz. Se revisaron 4 campos a 120X de 6 cortes por laminilla, en 5 laminillas por cada ventrículo. Se calculó el promedio porcentual de músculo y fibras de colágena en la zona de lesión, a través de la medición del área ocupada por estos tipos de tejido en las microfotografías correspondientes impresas, y la proporción de cada uno respecto al área total correspondiente al espacio resultante de la resección.

#### **Tinción fluorescente con bis-Benzimida**

La ocurrencia de proliferación celular en general, se evaluó con una técnica fluorescente usando bis-Benzimida, un cromógeno que se une de manera específica a los pares de adenina-timina del ADN e incrementa la fluorescencia nativa del ácido nucleico.<sup>18</sup> Una serie de cortes se fijó con glutaraldehído al 2.5% en PBS. El tejido se lavó e incubó en una solución de 125 µg/mL de bis-Benzimida (Sigma, Chemical) durante 60 minutos en temperatura ambiente. Los cortes se lavaron con PBS, y se observaron con microscopía de fluorescencia. Los núcleos ovales o circulares con cromatina arreglada en forma heterogénea se consideraron como núcleos en división.<sup>16,17</sup>

#### **Inmunohistoquímica doble para actina sarcomérica $\alpha$ y PCNA**

En otro lote de cortes se evaluó la presencia de miocitos cardíacos en proceso de proliferación. Se utilizó una técnica inmunohistoquímica doble para actina sarcomérica  $\alpha$  y PCNA, usando un kit para inmunotinción doble (kit comercial, Dako EnVision Doblestain System). El tejido se rehidrató con PBS, y se expuso a peróxido de hidrógeno 0.03% para bloquear la actividad de peroxidasa endógena. Los cortes se trataron con suero normal de cabra para evitar la unión inespecífica. Se incubaron con un anticuerpo primario, monoclonal, anti-actina sarcomérica  $\alpha$  ( $\alpha$ -Sr-1, Dako A/S) de ratón, diluido 1:200 en amortiguador Tris-HCl pH 7.0 y BSA 1%, du-

rante 30 minutos en temperatura ambiente. En seguida se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, hecho en cabra, acoplado a un polímero unido a peroxidasa de rábano. Los cortes se expusieron a una mezcla de sustrato para peroxidasa y el cromógeno diaminobenzidina. El tejido teñido para actina sarcomérica  $\alpha$  se procesó para la detección de PCNA. Se bloqueó la fosfatasa alcalina endógena. Se aplicó un anticuerpo primario, monoclonal, anti-PCNA (PC10, Dako A/S) de ratón, diluido 1:100 en amortiguador Tris-HCl pH 7.0 y BSA 1%, durante 30 minutos en temperatura ambiente. Los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, hecho en cabra, marcado con un polímero acoplado a fosfatasa alcalina, y se expusieron a una mezcla de sustrato para fosfatasa alcalina y el cromógeno rojo rápido. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma, Diagnostics). Lo cual hace que los núcleos PCNA positivos se observen de color azul oscuro a negro, debido a la combinación del rojo (rojo rápido) con el que se marca PCNA y el color azul-violáceo de la hematoxilina, mientras que los PCNA negativos presentaron un color azul-violáceo. La contratinción con hematoxilina es necesaria para efectuar la cuantificación de los núcleos PCNA positivos respecto al total de núcleos localizados en las fibras musculares en la zona regenerante (protocolo DAKO). Se prepararon controles negativos y positivos para actina sarcomérica  $\alpha$  usando miocardio de rata, y controles negativos y positivos para el PCNA usando cortes de tejido hepático de sapo en regeneración. Se calculó la proporción de núcleos de cardiomiocitos PCNA positivos respecto a los PCNA negativos localizados en las fibras miocárdicas de la zona regenerante en 15 campos a 400X de al menos 3 cortes de 5 laminillas, por cada ventrículo.

#### **Análisis de datos**

Se comparó el valor promedio porcentual de músculo y fibras de colágena revelados por la técnica tricrómica, así como el promedio porcentual de núcleos positivos para PCNA en cardiomiocitos, en comparación con el control con la prueba t de Student. Los valores de  $P \leq 0.05$  se consideraron significativos.

#### **Resultados**

##### **Características histológicas del miocardio ventricular de *A. mexicanum* sin daño**

La pared ventricular cardíaca de *A. mexicanum* control está formada por un miocardio compuesto

por fibras musculares cuyas células mostraron un núcleo central teñido de negro y un citoplasma teñido de rojo con la técnica tricrómica de Masson. El miocardio carece de vasos sanguíneos evidentes, y se encuentra delimitado por un epicardio que tiene fibras de colágena, mismas que se tiñen de azul con esta técnica (Fig. 1-A).

### Ocupación de la zona lesionada con tejido nuevo

Con la técnica tricrómica, en el día 5 después de la lesión, se encontró que la zona dañada estaba ocupada, parcialmente, por un coágulo rodeado por  $83 \pm 6\%$  de fibras de colágena y  $10 \pm 2\%$  de fibras musculares desorganizadas, con el espacio restante libre de tejido (Fig. 1-B). En el día 10 después de la lesión, en la zona de daño se encontró un  $50 \pm 4\%$  de músculo cardíaco y sólo residuos de coágulo (Fig. 1-C). En el día 30 después de lesión, el coágulo se reabsorbió y se encontró un  $90 \pm 2\%$  de tejido muscular cardíaco que ocupó la zona dañada previamente. La organización de las fibras musculares cardíacas y la estructura general de la pared ventricular fueron similares a las encontradas en el tejido control (Fig. 1-D), es decir con las fibras miocárdicas en forma de trabéculas (color rojo) y delimitadas hacia el exterior del ventrículo por el epicardio (color azul). Los valores provienen de al menos 15 campos en donde se localizó la lesión en cada condición experimental, y la región equivalente de cada control.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos con la tinción con bis-Benzimida. Se muestran sólo dos imágenes, correspondientes al control y 30 días después de lesión, por considerarse representativas de estos resultados. En el tejido control teñido con bis-Benzimida, los núcleos se observaron alargados y con su cromatina distribuida en forma homogénea (Fig. 2-A). Treinta días después de la lesión (Fig. 2-B) en la parte más externa del tejido regenerante, en las fibras miocárdicas se encontraron núcleos más largos y anchos, en pares, con más o menos el doble de diámetro respecto a los núcleos del tejido control, con forma oval o circular, y con la marca de bis-Benzimida en forma granular, lo que sugiere la dilución de la bis-Benzimida vía cariocinesis.<sup>16,17,28</sup> Se contaron al menos 500 núcleos en cada condición.

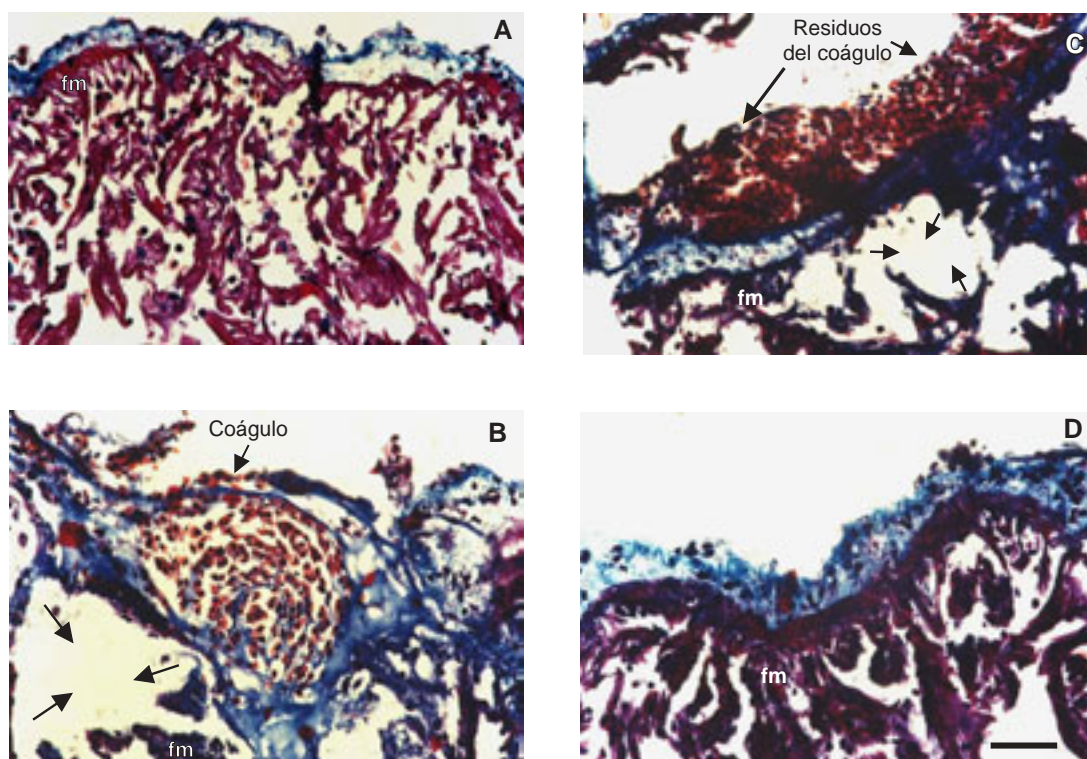
### Proliferación de miocitos cardíacos

En el tejido control se observaron miocitos cardíacos identificables, con la inmunohistoquími-

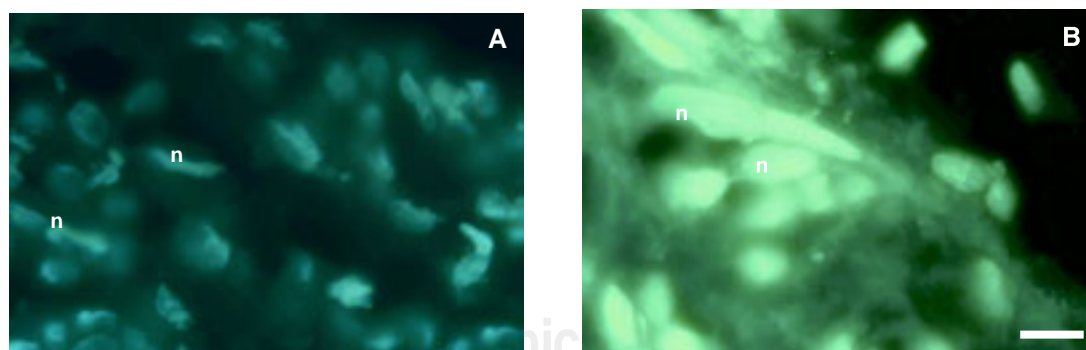
ca para actina sarcomérica  $\alpha$  y PCNA, por sus estriaciones teñidas de color marrón, con núcleos PCNA positivos en la zona más cercana al epicardio y núcleos PCNA negativos (azul-violetáceos) en las fibras miocárdicas (Fig. 3-A). Cinco días después del daño, en la zona cercana a la lesión, las fibras musculares cardíacas presentaron la marca para actina sarcomérica  $\alpha$  pero no se observó la organización de las estriaciones. Se observaron fibras musculares multinucleadas y de cada 100 núcleos con marca para PCNA, distinguibles por una coloración negra, 68 correspondieron a núcleos localizados en fibras miocárdicas ( $68 \pm 5\%$ ) (Fig. 3-B). Diez días después de la lesión, las fibras aún se observaron sin estriaciones, multinucleadas y con núcleos arreglados en pares con un promedio de 35 núcleos de cada 100 ( $35 \pm 4\%$ ) con marca para PCNA (Fig. 3-C). En el día 30 después de daño se encontraron indicios de reorganización de las estriaciones en la zona alejada del borde de la lesión. Sin embargo en la zona más externa de la zona regenerante aún se localizó un promedio de 10 núcleos por cada 100 ( $10 \pm 2\%$ ) con marca para PCNA en fibras con ausencia de estriaciones (Fig. 3-D). Los datos provienen del conteo de por lo menos 500 núcleos en cada condición.

### Discusión

La pared ventricular cardíaca de *A. mexicanum* adulto presenta características estructurales que la asemejan al tejido cardíaco de vertebrados como los peces cartilaginosos y peces óseos,<sup>19</sup> los reptiles como la tortuga *Testudo horsfieldi*,<sup>20</sup> y los anfibios<sup>21</sup> incluyendo la rana<sup>22</sup> en etapa adulta, ya que tiene una estructura que incluye un miocardio laxo, esponjoso, trabecular y delimitado por epicardio. Así mismo, tales características en el miocardio de *A. mexicanum* lo asemejan al músculo cardíaco de aves y mamíferos en estado embrionario,<sup>23</sup> cuando las células precardiáticas aún pueden proliferar. Lo que sugiere que el miocardio de esta especie podría estar compuesto por miocitos con capacidad para proliferar pese al estado adulto de los organismos. La estructura del ventrículo del corazón embrionario de los vertebrados incluye cordones de miocardio que constituyen las trabéculas ventriculares.<sup>23,24</sup> Las trabéculas en las aves y los mamíferos, se pierden por compactación del ventrículo en la etapa final del desarrollo embrionario,<sup>23,24</sup> de manera que el miocardio queda formado por una capa interna esponjosa y una capa externa compacta.<sup>21,25</sup>

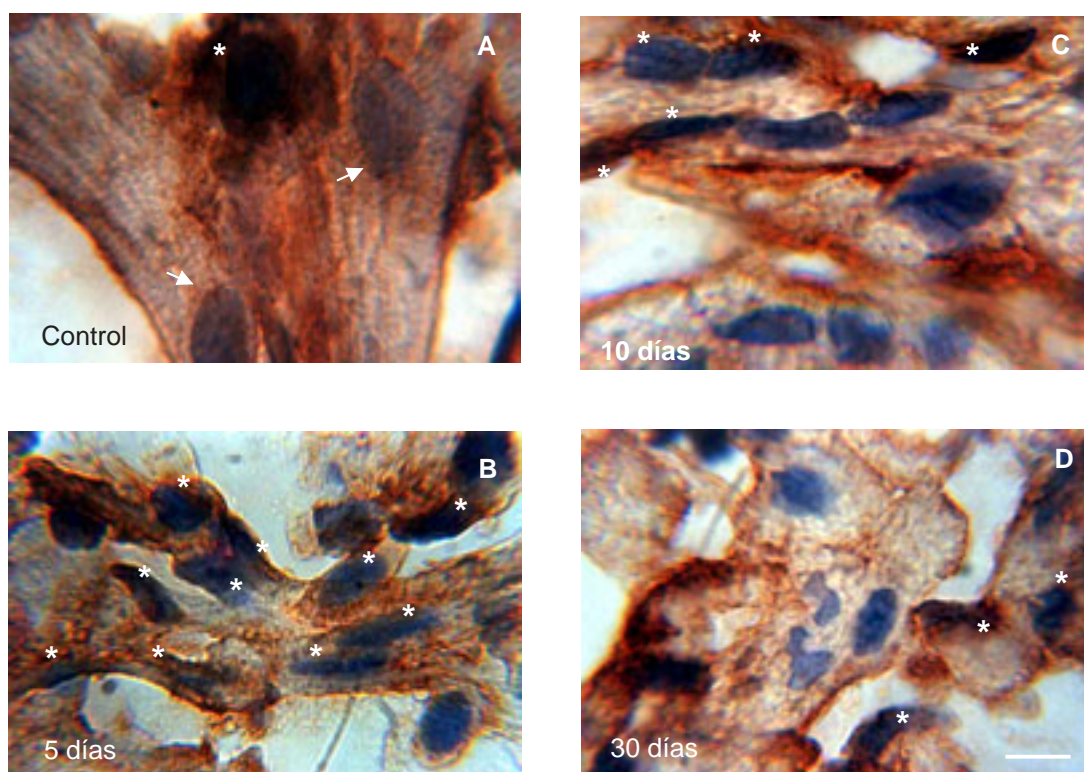


**Fig. 1.** Microfotografías en las que se muestran las características histológicas de la pared ventricular de *Ambystoma mexicanum* con la técnica tricrómica de Masson. En el panel A, en el tejido control las fibras musculares (fm) (rojo) están limitadas, hacia el exterior, por el epicardio compuesto por fibras de colágena (azul). En el panel B se observa que el espacio resultante del daño en el día 5 después de la cirugía está ocupado por un coágulo ( $83 \pm 6\%$ ), músculo ( $10 \pm 3\%$ ) y zonas sin tejido ( $7 \pm 2\%$ ) (flechas). En C se muestran los resultados 10 días después de lesión quirúrgica, se encontró alrededor de un  $50 \pm 5\%$  de músculo cardíaco, residuos de coágulo en la zona lesionada y aún parte del espacio sin ocupar por tejido (flechas). El panel D corresponde a los resultados 30 días después de la resección. Se encontró un  $90 \pm 2\%$  de músculo cardíaco, y la organización de las fibras musculares y la continuidad de la pared cardíaca fueron semejantes a las observadas en el tejido control. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 2.** Microfotografías que muestran imágenes representativas del miocardio ventricular de *Ambystoma mexicanum* teñido con una técnica fluorescente con bis-Benzimida. En el tejido control los núcleos (n) aparecen ovoides y con su cromatina distribuida en forma homogénea (A). Treinta días después de resección los núcleos en la zona cercana al daño fueron más largos y anchos, con más o menos el doble de diámetro respecto a los núcleos en el tejido control, con forma oval o circular, y una distribución heterogénea de su cromatina y se encontraron arreglados, aparentemente, como pares en la misma célula miocárdica (B). Barra = 40  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 3.** Microfotografías en las que se compara el miocardio ventricular de *Ambystoma mexicanum* con una inmunohistoquímica doble para actina sarcomérica  $\alpha$  (marrón) y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (negro). En el tejido control se observan las estriaciones y núcleos de los miocitos cardíacos de color azul-violetáceo, sin marca para PCNA (flechas) (A). En el día 5 después del daño, en la zona cercana a la lesión, se encontraron fibras musculares cardíacas sin estriaciones, multinucleadas y con  $68 \pm 5\%$  de núcleos marcados para PCNA (\*) asociados a éstas (B). En el día 10 después del daño se encontró  $35 \pm 4\%$  de núcleos marcados para PCNA (\*) en pares asociados a fibras musculares cardíacas (C). En el día 30 después de la resección se encontró una reorganización de las estriaciones, y los núcleos de miocitos cardíacos se observaron como en el tejido control en la región menos cercana al borde de la zona regenerante, mientras que en la zona inmediata al borde aún se localizó un promedio de  $18 \pm 3\%$  núcleos PCNA positivos en fibras sin las estriaciones definidas (D). Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

En *A. mexicanum* la compactación del miocardio no ocurre y las trabéculas persisten en la edad adulta, como ocurre en otros anfibios,<sup>25</sup> por lo que es semejante al miocardio embrionario de aves y mamíferos.

Por otra parte, el miocardio ventricular de *A. mexicanum* carece de vasos sanguíneos evidentes, como se ha informado para otros urodelos.<sup>26</sup> Podría ser que las características esponjosa y trabecular del miocardio permitan que la sangre luminal, circulante a través del corazón, entre a los espacios trabeculares, bañe a cada célula del miocardio aun en ausencia de vasos, y que el oxígeno difunda desde la sangre al miocardio.<sup>19</sup>

#### **Reparación de la lesión resultante de la resección ventricular**

En este estudio presentamos evidencias de que después de eliminar una fracción de  $10 \pm 2\%$  de la

pared ventricular del corazón de *A. mexicanum*, el espacio se restituye gradualmente por tejido miocárdico que resulta de un proceso de hiperplasia. A diferencia de estudios previos realizados en anfibios, en los cuales no se precisa el fenotipo celular que prolifera y en los que se informa la formación de una cicatriz fibrosa.<sup>15</sup> Nuestros resultados concuerdan con otro estudio realizado con la misma estrategia de lesión, y en la misma especie usada por nosotros;<sup>27</sup> sin embargo, el autor informó un valor máximo de proliferación de 12.8% en el día 21 después de la lesión, que es menor que el que encontramos nosotros ( $68 \pm 5\%$ ) al día 5. Tal discordancia podría explicarse por la diferencia en el tiempo de análisis después de la lesión. Nosotros informamos la mayor proporción de cardiomiocitos en proliferación a los 5 días después de la lesión, en tanto que en el otro trabajo lo hacen a los 21 días después del daño. En nuestros resultados a

los 10 y 30 días después de la lesión, la proporción de núcleos con marca para PCNA disminuye conforme transcurre el tiempo después de la lesión, lo cual concuerda con los resultados informados a los 21 días. Otra posibilidad es que las diferencias se relacionen con el hecho de que tal estudio se hizo con animales más viejos (4 años) ya que se ha propuesto que la capacidad regenerativa decrece con la edad<sup>1</sup> y nuestros resultados provienen de organismos de 1 año de edad. Por otro lado, nuestros resultados son concordantes con lo informado para pez cebra, en el sentido de que después de resección ventricular se presenta una recuperación gradual mediante la proliferación de cardiomiocitos, misma que aumenta progresivamente hasta un máximo al día 14 y después decrece hacia el día 30 a un 20% y hacia el día 60 aún permanece en 7%.<sup>28</sup>

La presencia de fibras cardíacas multinucleadas, que es una característica poco frecuente en el tejido cardíaco sin daño, tanto en *A. mexicanum* como en *N. Viridescens*,<sup>29</sup> así como la desorganización de las estriaciones de los miocitos cardíacos encontradas en el día 5 después de la resección, se observa también en los miocitos proliferantes *in vitro*.<sup>30,31</sup> Este cambio morfológico se considera como componente de la desdiferenciación que hace posible la proliferación de miocitos cardíacos.<sup>30,31</sup> Mientras que los signos de reorganización de las estriaciones en la zona más interna de la zona regenerante, junto con el hecho de que en el borde los núcleos se observaron más grandes y con la cromatina condensada como lo indica la tinción con bis-Benzimida, observados en el día 30 después del daño, sugiere una secuencia de desdiferenciación, proliferación y rediferenciación celular de la zona del epicardio hacia el miocardio. Se considera que este tipo de secuencia forma parte del mecanismo general de regeneración tisular en los anfibios urodelos adultos.<sup>32</sup>

El hecho de que *A. mexicanum* es una especie cuyos organismos crecen y alcanzan la madurez sexual pero conservan las características juveniles,<sup>33</sup> conlleva la retención de células indiferenciadas parcialmente en sus tejidos.<sup>34</sup> Esto podría incluir la retención de células precardiáticas que proliferan y se diferencian hasta formar cardiomiocitos nuevos *in situ* cuando las condiciones lo requieren.

Los resultados del presente trabajo se apoyan en evidencias recientes de nuestro laboratorio en las que después del daño quirúrgico se afecta la frecuencia y fuerza de contracción del corazón de *A. mexicanum* (datos no mostrados). Parámetros que se recuperan gradualmente hasta llegar a sus

valores basales entre el día 30 y 90 después de lesión quirúrgica.<sup>35</sup>

En este trabajo se presentan evidencias de que el miocardio ventricular de *A. mexicanum* recupera su estructura después del daño a través de la hiperplasia de miocitos cardíacos. Con un valor máximo de  $68 \pm 5\%$  5 días después de la lesión, en comparación con el valor máximo informado para otros vertebrados no mamíferos como *N. viridescens*<sup>15</sup> (10%) y para pez cebra<sup>28</sup> (32%), 20 y 14 días después del daño, respectivamente. Lo que indica que el corazón de *A. mexicanum* tiene una capacidad regenerativa mayor, lo que hace de esta especie un modelo idóneo para estudiar el proceso de regeneración del miocardio en los vertebrados adultos *in vivo*.

## Conclusiones

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que en el corazón del anfibio urodelo, *A. mexicanum*:

1. El espacio que queda después de la resección ventricular es ocupado de manera gradual por tejido muscular principalmente, sin presentarse fibrosis de reemplazo.
2. Tal tejido proviene de un proceso de hiperplasia de cardiomiocitos, no de hipertrofia.
3. La regeneración general incluye la restitución del tejido eliminado, así como su forma, sin rebasar los límites físicos del contorno del ventrículo, por lo que se trata de una regeneración de tipo epimórfica (Carlson, 2003).
4. Representa un modelo potencial para estudiar los mecanismos que regulan la regeneración miocárdica en vertebrados adultos *in vivo*, incluyendo la participación de factores de crecimiento, la regulación génica de la desdiferenciación, proliferación, rediferenciación, transdiferenciación y fusión celular potencialmente relacionadas con el proceso regenerativo. Lo cual permitiría tener los fundamentos básicos para a futuro abordar aspectos terapéuticos pertinentes.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por el apoyo otorgado a través del proyecto 00-303 a ACM, y a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado en su versión de Tesis Doctoral, proyecto 202331, a AVG.



## Referencias

1. THOUVENY Y, TASSAVA RA: *Regeneration through phylogenesis*. En Ferretti P, Géraudie J. "Cellular and molecular basis of regeneration. From invertebrates to humans". New York, John Wiley & Sons, 1998; 9-43.
2. BALINSKY BI: *Introducción a la embriología*. Barcelona, Omega, 1978; 559-587.
3. SCADDING SR: *Phylogenetic distribution of limb regeneration capacity in adult amphibia*. J Exp Zool 1977; 202: 57-68.
4. HOUDRY J: *Evolution of the amphibian regenerative capacity throughout metamorphosis*. En Inoue S, Shirai T, Egar M, Aiyama S, Géraudie J, Nobunaga T, Sato NL: *Proceedings of 6<sup>th</sup> Singer Symposium*. Okada, Maebashi, 1988; 13-22.
5. GHOSH S, THOROGOOD P, FERRETI P: *Regenerative capability of upper and lower jaws in the newt*. Int J Dev Biol 1994; 38: 479-490.
6. REYER RW: *Regeneration of lens in the amphibian eye*. Quart Rev Biol 1954; 29: 1-46.
7. MITASHOV VI: *Mechanism of retina regeneration in urodeles*. Int J Dev Biol 1996; 40: 833-844.
8. RUMYANTSEV PP: *Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration*. Int Rev Cytol 1977; 51: 187-273.
9. KAJSTURA J, ZHANG X, REISS K, SZOKE E, LI P, LAGRASTA C, ET AL: *Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic ventricular remodelling in coronary artery narrowing-induced cardiomyopathy in rats*. Circ Res 1994; 74: 383-400.
10. QUAINI F, CIGOLA E, LAGRASTA C, SACCANI G, QUAINI E, ROSSI C, ET AL: *End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes*. Circ Res 1994; 75: 1050-1063.
11. SASAKI R, MORISHITA T, ICHIKAWA S, YAMAGATA S: *Autoradiographic studies and mitosis of heart muscle cells in experimental cardiac hypertrophy*. Tohoku J Exp Med 1970; 102: 159-167.
12. REISS K, KAJSTURA J, CAPASSO JM, MARINO TA, ANVERSA P: *Impairment of myocyte contractility following coronary artery narrowing is associated with activation of the myocyte IGF1 autocrine system, enhanced expression of late growth related genes, DNA synthesis, and myocyte nuclear mitotic division in rats*. Exp Cell Res 1993; 207: 348-360.
13. REISS K, MEGGS LG, LI P, OLIVETTI G, CAPASSO JM, ANVERSA P: *Upregulation of IGF1, IGF1-receptor, and late growth related genes in ventricular myocytes acutely after infarction in rats*. J Cell Physiol 1994; 158: 160-168.
14. BECKER RO, CHAPIN S, SHERRY R: *Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians*. Nature 1974; 248: 145-147.
15. OBERPRILLER JO, OBERPRILLER JC: *Response of the adult newt ventricle to injury*. J Exp Zool 1974; 187: 249-260.
16. CAMERON IL: *Cell proliferation and renewal in the mammalian body*. En Cameron IL, Thrasher JD. "Cellular and molecular renewal in the mammalian body". New York, Academic Press, 1971; 45-85.
17. STEVENS HCE: *Use of colchicine for the measurement of mitotic rate in the intestinal epithelium*. Am J Anat 1961; 108: 231-244.
18. ARAKI T, YAMAMOTO A, YAMADA M: *Accurate determination of DNA content in single nuclei stained with Hoechst 33258 fluorochrome at high salt concentration*. Histochemistry 1987; 87: 331-338.
19. LILLYWHITE HB, ZIPPEL KC, FARRELL AP: *Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates*. Comp Biochem Physiol A Mol Int Physiol 1999; 124: 369-382.
20. OSTADAL B, RYCHTEROVÁ V, POUPA O: *Isoproterenol-induced acute experimental cardiac necrosis in the turtle (Testudo horsfieldi)*. Am Heart J 1968; 76: 645-649.
21. ROMENSKII O: *Blood supply of the compact and spongy myocardium of fish, amphibia and reptiles*. Arkhiv Anatomii Gistologii i Embriologii 1978; 75: 91-95.
22. VICTOR S, NAYAK VM, RAJASINGH R: *Evolution of the ventricles*. Texas Heart Inst J 1999; 23: 168-175.
23. SEDMERA D, PEXIEDER T, VUILLEMIN M, THOMPSON RP, ANDERSON RH: *Developmental patterning of the myocardium*. Anat Rec 2000; 258: 319-337.
24. BEN-SHACHAR G, ARCILLA RA, LUCAS RV, MANASEK FJ: *Ventricular trabeculations in the chick embryo heart and their contribution to ventricular and muscular septal development*. Circ Res 1985; 57: 759-766.
25. POUPA O, LINDSTRÖM L: *Comparative and scaling aspects of heart and body weights with reference to blood supply of cardiac fibers*. Comp Biochem Physiol A 1983; 76: 413-421.
26. HIRAKOW R: *The fine structure of the Necturus (amphibia) heart*. Am J Anat 1971; 132: 401-422.
27. FLINK IL: *Cell cycle reentry of ventricular and atrial cardiomyocytes and cells within the epicardium following amputation of the ventricular apex in the axolotl, Ambystoma mexicanum: confocal microscopic immunofluorescent image analysis of bromodeoxyuridine-labeled nuclei*. Anat Embryol (Berl) 2002; 205: 235-244.
28. POSS K, WILSON L, KEATING M: *Heart regeneration in zebrafish*. Science 2002; 298: 2188-2190.
29. OBERPRILLER J, OBERPRILLER J, AREFYEVA A, MITASHOV VI, CARLSON B: *Nuclear characteristics of cardiac myocytes following the proliferative response to mincing of the myocardium in the*

- adult newt, *Notophthalmus viridescens*. Cell Tissue Res 1988; 253: 619-624.
30. NAG A, HEALY C, CHENG M: *DNA synthesis and mitosis in adult amphibian cardiac muscle cells in vitro*. Science 1979; 205: 1281-1282.
31. TATE J, OBERPRILLER J: *Primary cell culture and morphological characterization of ventricular myocytes from the adult newt Notophthalmus viridescens*. Anat Rec 1989; 224: 29-42.
32. BROCKES J, KUMAR A: *Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration*. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 566-574.
33. KÜHN E, JACOBS G: *Metamorphosis*. En Armstrong JB, Malacinski GM. "Developmental biology of the axolotl". New York, Oxford University, 1989; 187-197.
34. HARRIS W: *Neurobiology*. En Armstrong JB, Malacinski GM. "Developmental biology of the axolotl". New York, Oxford University Press, 1989; 157-168.
35. CANO A, VARGAS A, GUARNER V, PRADO E: *Functional restoration of the heart after pharmacological and surgical damage in amphibians*. Can J Cardiol 2003; 19(Suppl A): 78A.

