



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

ASPECTOS REPRODUCTIVOS DEL MACHO DE *AMBYSTOMA
MEXICANUM* PARA LA OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS
ESPERMATÓFOROS Y ESPERMATOZOIDES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTAN:

OLGUÍN REYES MIGUEL RAFAEL
TORRES GLORIA JULIÁN

ASESOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

CO-ASESORES:

M EN C. ALICIA ALCÁNTAR RODRÍGUEZ
M EN C. URIEL ÁNGEL SÁNCHEZ RIVERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO (FES CUAUTITLÁN)

2023

Agradecimientos Miguel

Agradezco a mi familia por su apoyo y comprensión a lo largo de mi formación académica y su confianza respecto al camino que he tomado sin su apoyo no sería posible la realización de este proyecto.

A los amigos que realice durante estos años en la universidad y que de una u otra forma me han brindado su apoyo. En especial Miguel Linares agradezco su ayuda directa en este trabajo.

Agradezco totalmente a mis asesores el Doctor José Alfredo Medrano, la maestra Alicia Alcántar Rodríguez y el maestro Uriel Ángel Sánchez Rivera, nos permitieron continuar con este trabajo y al brindar sus conocimientos y apoyo continuo esto fue posible. De igual forma agradezco a la Doctora María del Carmen Espejel del Moral por su apoyo brindado tanto en las clases como en el laboratorio.

Gracias a Julián por su compromiso con el trabajo y su ayuda constante siempre siendo un gran amigo en quien se puede confiar.

Agradecimientos Julián.

He comprendido que la mejor maestra que puedo tener es la vida por sí misma. Desde que comencé mis estudios universitarios hasta el día de hoy, han ocurrido tantos sucesos, que me han hecho cambiar completamente mi perspectiva. Y parte muy importante de esos aprendizajes ha sido saber que las personas que me aman y aprecian son pilares fundamentales en mi existencia. Es por eso que en estas líneas quiero agradecerles ya que sin su apoyo esto no sería posible.

Quiero agradecer a mis padres por la herencia más valiosa que pudiera recibir, fruto del inmenso apoyo y confianza que en mí se depositó para que los esfuerzos y sacrificios hechos por mí, no fueran en vano. Por inculcar en mí el amor y valores que hoy son mis cimientos.

A ti mami, por ser una segunda madre y cuidar de mí siempre con amor y entrega.

Vane y Luciano, gracias infinitas por ser mis motores y estar siempre a mi lado dándome su maravilloso amor y apoyo, caminando cada paso de la vida junto a mí. Por hacer de mí una mejor persona en todos los aspectos, por ser los eternos amores de mi vida.

A todos los integrantes de mi familia por siempre ser uno de mis grandes apoyos, por todos los momentos compartidos y por su amor.

Un agradecimiento especial a mis asesores, al doctor José Alfredo Medrano Hernández, la maestra Alicia Alcántar Rodríguez y el maestro Uriel Ángel Sánchez Rivera. Que siempre han estado al pie del cañón y creer en este trabajo, por aportar su invaluable conocimiento, ser grandes guías y hacer esto posible infinitas gracias.

Agradecer a mi gran amigo y compañero de tesis Miguel, a quien le estaré agradecido toda la vida por estar en los buenos y no tan buenos momentos, pero siempre demostrar lo que significa ser un verdadero amigo.

También un agradecimiento al maestro Fernando García y María Espejel por siempre tener la mejor disposición de apoyarnos.

Por último, agradecer a todos los que formaron parte de este proceso y ayudaron a que este trabajo sea posible.

Índice	
Resumen.....	I
Introducción	1
Taxonomía de anfibios	2
Generalidades del género <i>Ambystoma</i>	7
Descripción de la especie de estudio según la IUCN.....	11
Ciclo de vida	12
El eje reproductor en los machos	16
Aparato reproductor masculino.....	18
Espermatogénesis.....	19
Espermatozoides.....	21
Fertilización	22
Antecedentes	24
Justificación	26
Objetivos	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
Material y métodos.....	27
Mantenimiento de la especie para su reproducción.....	27
Obtención del espermátforo y espermatozoides.....	29
Evaluación de los espermatozoides	30
Estructura testicular	31
Resultados	32
I. Evaluación de los espermátforos y los espermatozoides.....	32
II. Histología testicular.....	38
Discusión	44
-Obtención de espermatozoides	44
-Disolución del espermátforo	45
-Morfología de los espermatozoides.....	46
-Estructura testicular.....	46

Conclusión	48
Bibliografía	49
Anexo 1. Técnica de necropsia en ajolote macho de Xochimilco.....	56

Índice cuadros y figuras

Figura 1. Etapa desarrollo en anuros	2
Figura 2. Familias que conforman el orden de anuros	4
Figura 3. Familias que conforman el orden de apoda	4
Figura 4. Ejemplar de <i>Dermophis mexicanus</i>	5
Figura 5. Familias que conforman el orden caudata.....	6
Figura 6. Ejemplar de <i>Isthmura belii</i>	7
Cuadro 1. Cuadro de <i>Ambystoma</i> en México.....	8
Figura 7. Estructuras anatómicas de un ajolote leucístico.....	11
Figura 8. Etapas de vida de ajolotes	13
Figura 9. Embrión de ajolote	13
Figura 10. Desarrollo embrionario	14
Figura 11. Larva de ajolote.....	14
Figura 12. Extremidades ajolote juvenil.....	14
Figura 13. Ajolote joven	15
Cuadro 2. Parametros fisicoquimicos del agua en el mantenimiento de ajolotes	16
Figura 14. Eje hipotálamo- hipofisiario- gonadal.....	17
Figura 15. Sistema urogenital macho de ajolote.....	18
Figura 16. Lóbulos testiculares de <i>Taricha granulosa</i>	19
Figura 17. Variación en la estructura espermática	22
Figura 18. Resumen de los patrones de vida de los anfibios.....	23
Cuadro 3. Duración de los estadios celulares de espermatogenesis	24
Figura 19. Estructura del espermátforo de <i>Ambystoma texanum</i>	25
Figura 20. Organismos en cautiverio.....	28
Figura 21. Pareja en cautiverio	29

Figura 22. Material de trabajo en laboratorio	30
Figura 23. Espermátóforo macho E15640	32
Figura 24. Espermátóforo.....	33
Figura 25. Espermátóforo macho E15638.....	34
Figura 26. Espermatozoides en disolución.....	35
Figura 27. Espermatozoides microscopio 10X	35
Figura 28. Espermatozoides tinción Eosina-Nigrosina	36
Figura 29. Espermatozoides tinción Eosina-Nigrosina	37
Figura 30. Espermatozoides tinción Eosina-Nigrosina	37
Figura 31. Estructura testicular tinción H-E	38
Figura 32. Estructura testicular tinción H-E	39
Figura 33. Estructura testicular tinción H-E	40
Figura 34. Estructura testicular tinción PAS	41
Figura 35. Estructura testicular tinción PAS	42
Figura 36. Estructura testicular tinción Tricromica de Masson.....	43

Índice anexo

Figura 1 y 2. Revisión externa.....	57
Figura 3 y 4. Revisión de la cabeza y branquias externas.....	58
Figura 5 y 6. Se revisan los miembros anteriores.....	59
Figura 7. Se observa las glándulas cloacales	59
Figura 8 y 9. Incisión primaria	60
Figura 10 y 11. Al abrir la cavidad celómica	61
Figura 12. Exposición los testículos	62
Figura 13. Se retiraron los órganos reproductivos.....	63
Figura 14. Se observa el cuerpo de ajolote joven sin vísceras.....	64

Resumen

La biología reproductiva de una especie es la combinación de características fisiológicas, anatómicas y conductuales que participan de manera coordinada bajo ciertas condiciones ambientales. Los anfibios comprenden cerca de 8579 especies descritas y se dividen en tres órdenes, dentro de los cuales se han reportado 798 especies de urodelos que a su vez incluyen el género *Ambystoma*. En la reproducción de los ajolotes el macho libera sus espermatozoides rodeados de una capa de moco, estructura conocida como espermatóforo. La hembra recoge este espermatóforo dando lugar a una fertilización interna para la posterior liberación de los huevos. El género *Ambystoma* está constituido por 32 especies descritas. En México se encuentran 17 especies distribuidas desde el noroeste hasta el centro del país. Dentro de estas, 16 son endémicas del país y 15 especies están listadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 bajo alguna categoría de riesgo. Al ser una especie atractiva para la investigación debido a sus características biológicas, conocer sobre los aspectos reproductivos de la especie es esencial para su mantenimiento y conservación. La tasa de extinción de especies se ha acelerado en los últimos años debido al crecimiento exponencial de la población humana y al uso intensivo de los recursos naturales. La importancia de la revisión de los aspectos reproductivos en esta especie radica en la expansión de conocimiento para la elaboración de futuros trabajos en la reproducción asistida. El conocer más sobre los procesos de espermatogénesis y la anatomía del ajolote ayudará en el manejo reproductivo, así como para establecer las bases de futuros proyectos en la evaluación reproductiva. Para ello, nos planteamos describir aspectos reproductivos de los ajolotes macho para la obtención de espermatóforos desde el mantenimiento de los individuos hasta el momento en el que se formaron las parejas para llevar a cabo el cortejo y puesta de espermatóforos. Se incluye además la revisión, transporte y la posterior separación de espermatozoides mediante el uso de medios como la solución Ringer simplificado de anfibio + solución de hidróxido de sodio al 20% y el uso de la tinción con eosina-nigrosina para la evaluación espermática. En la estructura testicular se identificaron los diferentes estadios celulares de la espermatogénesis.

Introducción

La palabra anfibio proviene del griego “*anfi*” y “*bios*” que significa ambas vidas, refiriendo al rasgo generalizado de sus historias de vida. Los anfibios modernos son un grupo de vertebrados monofiléticos; es decir, comparten un ancestro común (Lissamphibia) que data de hace unos 290 millones de años (Amphibiaweb, 2022). Los anfibios modernos presentan características como piel lisa y vascularizada, presentan glándulas mucoides con las que mantienen la piel hidratada y pueden secretar toxinas. Son animales anamniotas que pueden tener diferentes formas de desarrollo. En las especies de desarrollo indirecto, los renacuajos son notablemente distintos a los adultos (estructural, fisiológica y conductualmente), las larvas transcurren a su estado adulto mediante la metamorfosis (Fig.1). En el caso del desarrollo directo los individuos nacen con aspecto similar al del adulto). Ambas formas de desarrollo difieren estructuralmente pues las larvas presentan branquias en el primer caso. En el desarrollo directo, los individuos que se asemejan a los adultos llevan a cabo la respiración por medio de la piel, pulmones y membranas mucosas de la boca y la faringe. La deposición de huevos se da en el medio líquido (Duellman y Trueb, 1994; Vitt y Caldwell, 2013).

Los anfibios son animales ectotermos, carecen de uñas verdaderas, pueden presentar estructuras epidérmicas córneas en la punta de los dedos de las extremidades posteriores; el corazón presenta tres cámaras, el cráneo es aplanado y con menos huesos que otros grupos además solo presentan diez pares craneales. Se encuentran ampliamente distribuidos exceptuando regiones antárticas y Groenlandia (IUCN, 2022). Los anfibios comprenden cerca de 8579 especies descritas y se dividen en tres ordenes:

- Gymnophiona - Apoda - cecilias
- Caudata - Urodela - salamandras y tritones
- Salientia - Anura - sapos y ranas

Actualmente, se han reportado, 7566 especies de anuros que corresponden al 88% de los anfibios, 798 especies de urodelos que corresponden al 9% de los anfibios, y 215

especies de cecalias que corresponden al 3% de anfibios (Amphibiaweb, 2023). Particularmente México es un país privilegiado, ya que es considerado el cuarto país en diversidad de anfibios después de Brasil, Colombia e Indonesia. El territorio Nacional ocupa tan solo el 1.4% de la superficie de la Tierra. A pesar de ello, alberga entre el 10-12% de todas las especies del planeta y es el hábitat de cerca de 377 especies, de las cuales el 64% son endémicas (Sarukhán *et al.*, 2009).

Taxonomía de anfibios

a) Anura

El orden Anura es el más abundante y diverso de los anfibios vivos, se encuentra constituido por 54 familias, 457 géneros y 7566 especies (Fig.2). Su distribución abarca hábitats acuáticos y terrestres. Su incapacidad para adaptarse al agua salada los ha restringido en gran medida a estuarios y hábitats marinos. En su mayoría están ubicados en climas tropicales húmedos (Amphibiaweb, 2023).



Figura 1. Etapas del desarrollo en anuros. Modificada de Encyclopedia Britanica, Inc., (2006).

Pueden presentar cuerpos robustos, extremidades anteriores cortas y posteriores bastante desarrolladas, glándulas ampliamente distribuidas en la piel; otros pueden ser delgados y de piel lisa (Canseco y Gutiérrez, 2010). Poseen cabezas anchas, cavidad oral amplia, cuencas oculares grandes y carecen de cola (Parra *et al.*, 2014). La mayoría de las ranas y sapos presentan fertilización externa; durante el amplexo o abrazo nupcial los machos toman a las hembras por el dorso para la aproximación de cloacas para asegurar la fertilización (Parra *et al.*, 2014).

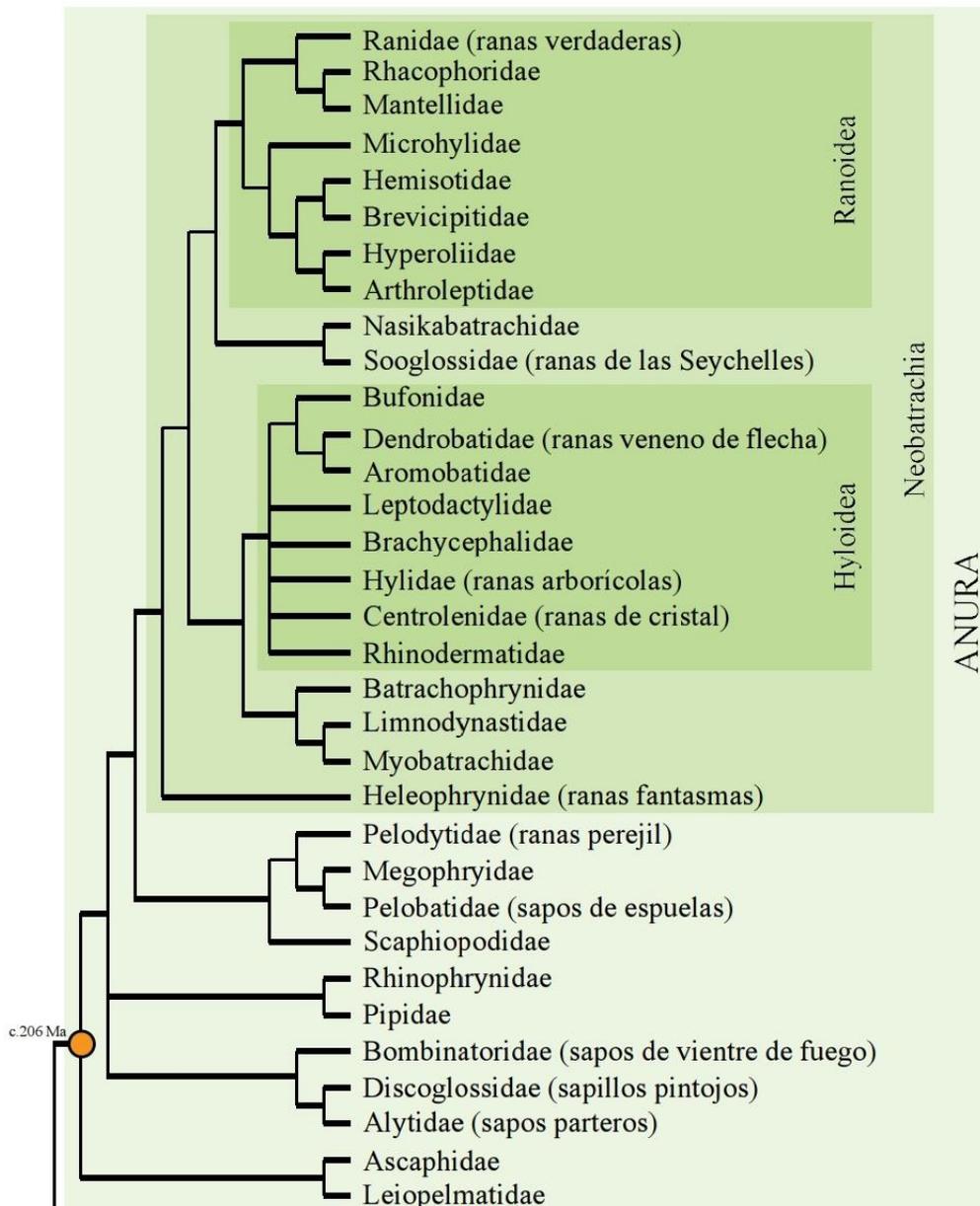


Figura 2. Familias que conforman el orden de los anuros (obtenida de San Mauro, 2012).

b) Gymnophiona

El orden Gymnophiona está constituido por 10 familias, 33 géneros y 215 especies (Fig.3). Se encuentran en los trópicos, exceptuando Madagascar y Oceanía (Amphibiaweb, 2023).

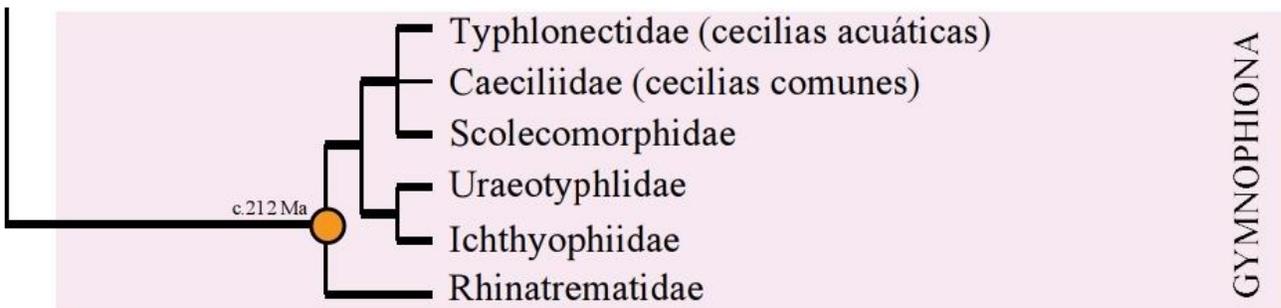


Figura 3. Familias que conforman el orden Apoda (obtenida de San Mauro *et al.*, 2012).

Las cecilias tienen aspecto similar a las lombrices de tierra: presentan un cuerpo alargado, delgado y anillado con ausencia de extremidades, la cabeza es fuertemente osificada y de forma roma lo que permite la excavación para crear sus madrigueras. Su longitud hocico - cloaca oscila en un intervalo desde 7 cm hasta 1.6 m (Fig.4) (Halliday y Adler, 2007). Tienen una piel lisa y húmeda con glándulas que lubrican, así como tóxicas y antimicrobianas; presentan pliegues en forma de anillo, lo que le da una apariencia segmentada (San Mauro *et al.*, 2014).

El hocico contiene un tentáculo sensorial retráctil a cada lado de la cabeza entre la nariz y el ojo. El tentáculo sirve como órgano olfativo y ayuda en la localización e identificación de presas. Sus ojos vestigiales pueden distinguir la presencia o ausencia de la luz. La mandíbula superior sobresale de la inferior lo cual permite la captura de presas en espacios estrechos (Vitt y Caldwell, 2013).

Todas las cecilias tienen fertilización interna; el órgano copulador masculino, el falodeo es una estructura situada en la cloaca. Durante el apareamiento, el macho introduce el falodeo en la cloaca de la hembra (Vitt y Caldwell, 2013). Las especies ovíparas

depositan sus huevos en nidos subterráneos cerca del agua y pueden modificar la composición de la piel para servir de alimento a los juveniles. Este comportamiento se denomina dermatofagia. En las especies vivíparas los embriones llegan a raspar la pared del oviducto materno para servir de alimento (San Mauro *et al.*, 2014).



Figura 4. Ejemplar de Cecilia mexicana *Dermophis mexicanus* (obtenida de Luis Canseco Márquez / Banco de imágenes / CONABIO 2022).

C) Urodela

Dentro del orden Caudata o Urodela al cual pertenecen las salamandras encontramos 10 familias, 68 géneros y 798 especies (Fig.5). Se distribuyen en la región Holártica, pero en mayor proporción en países neotropicales (Amphibiaweb, 2023).

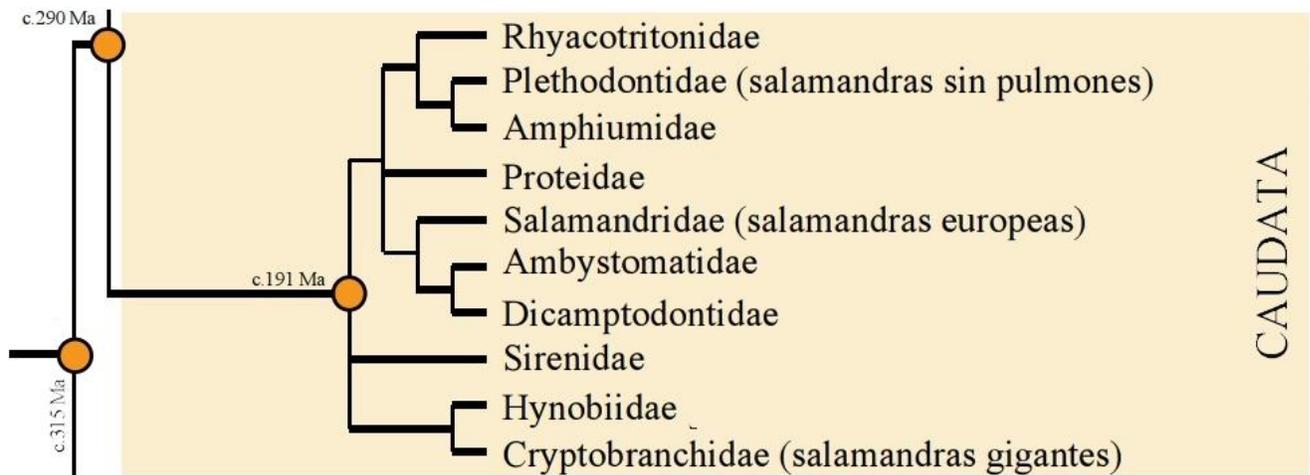


Figura 5. Familias que forman el orden Caudata (obtenida de San Mauro *et al.*, 2014).

Presentan diferentes características morfológicas como cuerpos robustos y largos que alcanzan una longitud hocico-cloaca de hasta 34 cm, con una cola aplanada lateralmente. Asimismo, algunas especies del género *Siren* alcanzan una longitud hocico-cloaca de hasta 90 cm, pero carecen de extremidades posteriores. La respiración es pulmonar o mediante branquias externas. En cambio, los organismos completamente terrestres exhiben un cuerpo de talla pequeña a mediana (Fig.6) (2 a 15 cm) y el intercambio de gases ocurre en la piel y pulmones, con excepción de la familia Plethodontidae en la que la respiración se lleva a cabo completamente mediante la piel (Parra *et al.*, 2014). Los linajes derivados de salamandras tienen fertilización interna con excepción de Sirenidae y Cryptobranchidae, aunque no presentan un órgano copulador (Vitt y Caldwell, 2013). El 20-25% de las especies conocidas presentan una historia de vida bifásica: tienen adultos terrestres que regresan al agua para aparearse y depositar sus huevos, de los que eclosionan larvas acuáticas con branquias. La secuencia de osificación del cráneo, incluida la aparición tardía de las axilas, una remodelación del paladar durante la metamorfosis, la ausencia de un oído medio, el origen del músculo aductor de la mandíbula, la presencia de hendiduras branquiales y branquias externas en larvas acuáticas permiten diferenciarlos de otros taxones (Vitt y Caldwell, 2013).



Figura 6. Ejemplar de Tlaconete pinto (*Isthmura bellii*) (cortesía de Uriel A. Sánchez Rivera).

Generalidades del género *Ambystoma*

El género *Ambystoma* está constituido por 32 especies descritas, las cuales se distribuyen en Norteamérica desde el suroeste de Alaska y sur de Canadá, hasta el altiplano mexicano (Pough *et al.*, 2001). En México se encuentran 17 especies distribuidas en el noroeste y centro del país. De estas, 16 son endémicas, lo que representa más del 85% del total de especies que habitan en México (cuadro 1) (Parra *et al.*, 2014). Los individuos de este género habitan en lagos y arroyos, donde las características propias de estos cuerpos de agua les han permitido adecuarse exclusivamente a estos sitios. De las 16 especies endémicas, 15 se encuentran listadas dentro de la NOM-059- SEMARNAT - 2010 en alguna categoría de riesgo.

Cuadro 1. Especies de *Ambystoma* en México (NOM-059- SEMARNAT-2010. IUCN, 2022)

Especie	Distribución	Estatus – Categoría de riesgo de la especie (NOM-059-SEMARNAT-2010)	Información adicional
<i>A. altamirani</i>	Sierra de las cruces (Estado de México)	Amenazada (A)	En 2004 fue reportado que la población disminuyó al menos 50%, pérdida de su hábitat y depredación de especies como trucha arcoíris
<i>A. amblycephalum</i>	Morelia (Tacicuaro) Michoacán	Protección especial (Pr)	La población de la especie se ve severamente fragmentada debido a la desecación de los cuerpos de agua
<i>A. andersoni</i>	Michoacán (laguna de Zacapu)	Protección especial (Pr)	La población es difícil de encontrar y posiblemente está en declive
<i>A. bombypellum</i>	A 14 km de San Martín, CDMX	Protección especial (Pr)	Datos insuficientes
<i>A. dumerilii</i>	Laguna de Pátzcuaro, Michoacán	Protección especial (Pr)	Entre 1987 y 2000 los pescadores reportaron la captura de esta especie en kilogramos por año, del 2004 en adelante se reportó la dificultad para atraparlos
<i>A. flaviperatum</i>	Norte de Santa Cruz, Jalisco	Protección especial (Pr)	En 2009 esta especie era bastante común en sierra Quila con aproximadamente 200 individuos en 500 metros, los patrones de lluvia han cambiado y causado que los arroyos se sequen

<i>A. granulosum</i>	Toluca, Estado de México	Protección especial (Pr)	La especie ha tenido un declive de hasta 50% de su población en los últimos 25 años con los programas del gobierno de introducción de carpa
<i>A. leorae</i>	Arroyos de la Sierra Nevada (Iztaccíhuatl, Popocatepetl y Monte Tláloc) en el Centro de México	Amenazada (A)	Está especie era relativamente común de encontrar hasta que se dio la destrucción de su hábitat
<i>A. lermaense</i>	Lago Lerma, Toluca. Estado de México	Protección especial (Pr)	La especie ha sido registrada en 3 lagunas de las ciénagas de Lerma en áreas protegidas
<i>A. mexicanum</i>	Xochimilco	Peligro de extinción (P)	La población ha experimentado una reducción dramática debido a la transformación de su hábitat y la población silvestre es bastante pequeña en Xochimilco
<i>A. ordinarium</i>	Puerto Hondo, Michoacán	Protección especial (Pr)	Listado en peligro debido a la fragmentación que ha sufrido la extensión del territorio de 4,448 km ²
<i>A. rivulare</i>	Eje Neovolcánico Estado de México, Michoacán y Guerrero	Amenazada (A)	Se estima que la población ha disminuido 50% basado en la desaparición de especímenes en ríos y arroyos debido al declive del hábitat y la invasión de pescadores

<i>A. rosaceum</i>	Mojárachi, Chihuahua	Protección especial (Pr)	Debido a su distribución tan extensa tiene una población amplia. Es una especie que se encuentra comúnmente en su área
<i>A. silvense</i>	Navios, Durango	No hay datos suficientes para su evaluación	Datos insuficientes
<i>A. taylori</i>	Alchichica, Puebla	Protección especial (Pr)	Listado en peligro crítico debido a la extensión de su hábitat con solo 2.4 km ² todos los individuos están en una sola zona
<i>A. velasci</i>	Michoacán, Estado de México, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Coahuila, y Querétaro	Protección especial (Pr)	Datos insuficientes

Descripción de la especie de estudio según la IUCN

Ambystoma mexicanum

Clase: Amphibia

Orden: Caudata

Suborden: Salamandroidea

Familia: Ambystomatidae

Género: *Ambystoma*

Especie: *Ambystoma mexicanum*

Es una especie endémica que habita solo en los lagos de Xochimilco, en la Ciudad de México. A diferencia de la mayoría de urodelos, los ajolotes son paedomorfos obligados; realizan metamorfosis si son inducidos artificialmente por la adicción de la hormona tiroidea o algún agente estresor en su ambiente (Page y Voss, 2009). Mantienen sus branquias externas a lo largo de su desarrollo hasta ser un adulto (Fig.7).

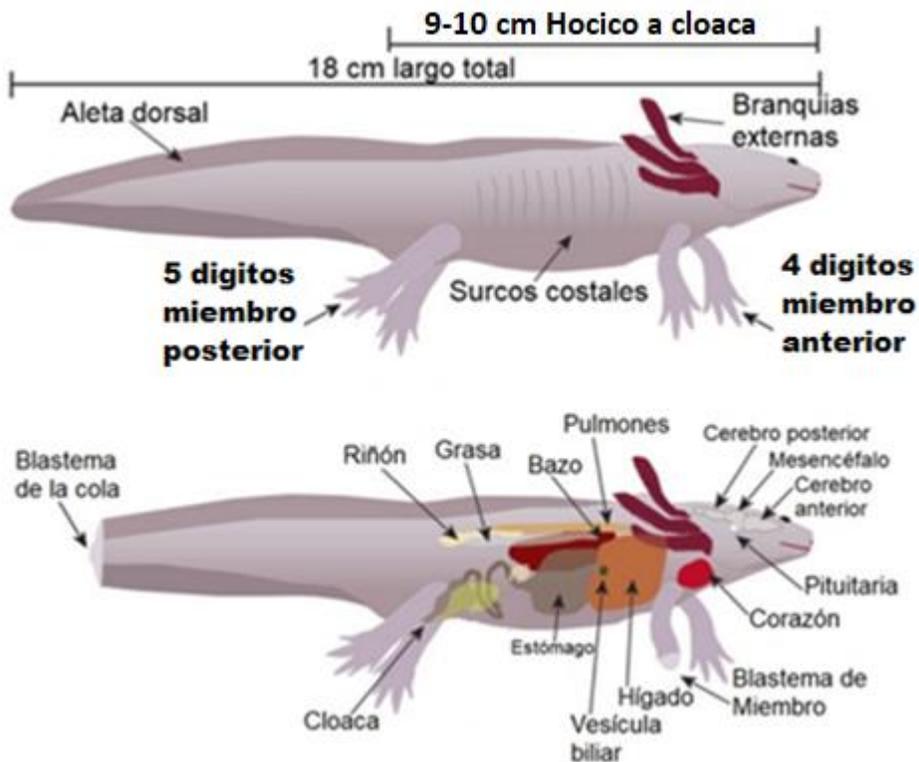


Figura 7. Estructuras anatómicas de un ajolote leucístico (tomado y modificado de Farkas y Monaghan, 2015).

El dimorfismo sexual es moderado pero visible; los machos son delgados, alargados y exhiben un abultamiento en la cloaca a diferencia de las hembras que son más compactas y robustas. Emplean su olfato en la búsqueda de alimento, que permite al animal discriminar entre olores (Getchell. 1977; Mackay-Sim y Shaman. 1984). Su vista es reducida y su rango de visión para la detección de movimientos es limitado (Grabowski y Pak, 1975; Waloga y Pak, 1978). Poseen el sistema de línea lateral el cual es utilizado para detectar las corrientes eléctricas (vía órganos ampulares localizados en la cabeza) y por el movimiento del agua (vía mecanorreceptores presentes a lo largo de todo el cuerpo del animal) (Smith,1996). El ajolote tipo silvestre es de color gris, café o verde-olivo moteado y esta coloración surge de una combinación de tres diferentes células pigmentarias, melanóforos (negros) son los cromatóforos dominantes en animales adultos, mientras que los xantóforos (amarillos) son más abundantes en el desarrollo temprano (Frost *et al.*, 1984). Los leucóforos (blancos) son el resultado de una mutación recesiva de un gen desconocido y se distinguen fácilmente de los albinos por la pigmentación de sus ojos. Los animales albinos tienen una completa deficiencia de melanina y una apariencia amarillenta debido a la gran cantidad de xantóforos (Gresens, 2004).

Ciclo de vida

De las 17 especies de *Ambystoma* en México, 5 de éstas pueden llegar a presentar la maduración sexual y reproducirse manteniendo un fenotipo larval sin llevar a cabo la metamorfosis, proceso también conocido como neotenia, estas especies son:

- *A. mexicanum*
- *A. andersoni*
- *A. dumerilii*
- *A. taylori*
- *A. tigrinum*

El ciclo empieza con el embrión que se desarrolla dentro de un huevo translúcido formado por tres capas. Una vez eclosionado, la cría solo posee cabeza, cuerpo y branquias. Posteriormente se desarrollan los miembros tanto anteriores como posteriores (Figs.8 a 13) (Servín, 2011).



Figura 8. Etapas de vida del ajolote (Imagen obtenida de García Rojas. 2016).



Figura 9. Embriones en etapa de gastrulación, longitud aproximada de 2 mm (Fuente propia).



Figura 10. Desarrollo en etapa de larva longitud aproximada de 11 mm previo a eclosión (Fuente propia).



Figura 11. Se presentan larvas de ajolote antes de la eclosión; se destaca que el individuo no presenta extremidades (Fuente propia).



Figura 12. Las extremidades delanteras se desarrollan primero, unas semanas más tarde, las extremidades traseras comienzan a aparecer (Fuente propia).



Figura 13. Ajolote joven de aproximadamente 5 cm de longitud total, los adultos llegan a medir de 25 a 30 cm. Alcanzan estas tallas después de los 18 meses y hasta los 2 años (Fuente propia).

Condiciones de mantenimiento en cautiverio

Las instalaciones básicas para un ajolote bajo cuidado y protección de los humanos deben de cubrir sus necesidades como: temperatura, espacio, agua de buena calidad, iluminación, sustrato y refugios. Aunque no hay un espacio mínimo para alojar la especie se estima que por lo menos debe ser de 10 litros de agua por cada individuo. La calidad del agua es un aspecto importante para mantener la salud adecuada de los ejemplares (Cuadro.2) (Duhon, 1992).

Los parámetros fisicoquímicos (pH, amoníaco, nitritos, metales pesados, desinfectantes, pesticidas, cloro) son características a considerar para evitar riesgos en el mantenimiento de la especie (Cuadro 2) (González y Servín, 2014).

Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos para el mantenimiento de ajolotes (tomado y modificado de Servín, 2011).

Parámetro	Valor ideal
pH	6.5-8
Cloro	0 mg/l
Dureza general (GH)	6-16 dh
Nitritos (NO ₂ -)	> 3 mg/l
Amonio	0%
O ₂ disuelto	>80% de saturación
Temperatura	15 - 18°C

El eje reproductor en los machos

Los anfibios poseen un eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal similar al de otros vertebrados (Licht y Porter, 1987). Esta relación hace posible que el sistema nervioso central identifique las señales del ambiente como: época del año, alimento disponible, fotoperiodo, presencia de animales del sexo opuesto. Estas señales inician una coordinación que se da mediante la interacción de hormonas, que se encuentran distribuidas vía sanguínea ocasionando respuestas fisiológicas (Fig.14) (Lombardi, 1998).

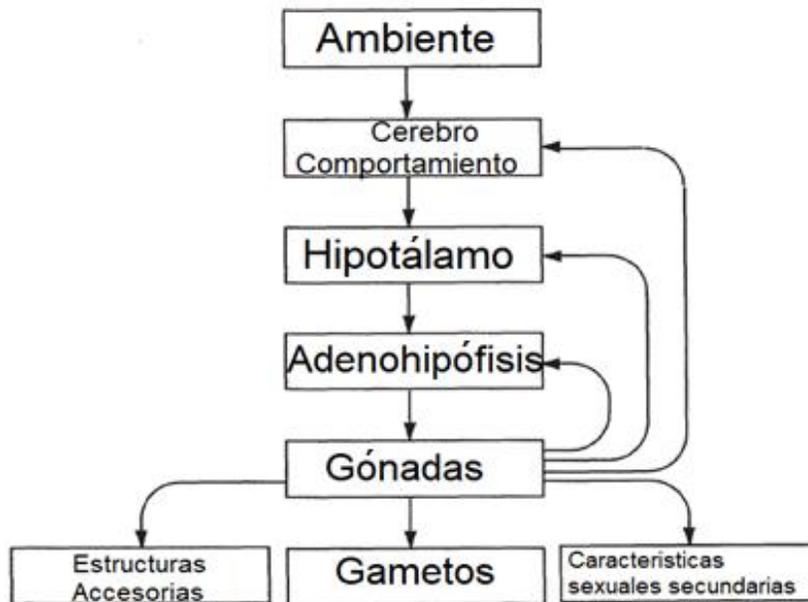


Figura 14. Diagrama general de la interacción en la regulación del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal (imagen obtenida de Lombardi, 1998).

El hipotálamo sintetiza y secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que estimula la producción de gonadotropinas hipofisarias (White *et al.*, 1974). Algunos anfibios presentan dos formas de Gonadotropina (GTH) homólogas a la hormona luteinizante (LH) y a la hormona folículo estimulante (FSH) de mamíferos (Licht y McCreery, 1985). En los machos, la FSH está involucrada en la proliferación de espermatogonias, a través de las células de Sertoli que promueven la actividad mitótica, la meiosis y la espermiogénesis, mientras que la LH estimula a las células intersticiales o Leydig para la producción de testosterona (Van Tienhoven, 1968, Lombardi, 1998). En los ambistomátidos, los periodos húmedos o secos afectan los patrones conductuales y reproductivos por lo que la actividad reproductiva es estacional (Dorantes *et al.*, 2012). En condiciones óptimas, a partir del primer año de vida del individuo se pueden dar los casos de reproducción, sin embargo, es común el retardo hasta el segundo año de vida (Dorantes *et al.*, 2012).

Aparato reproductor masculino

Los testículos son órganos pareados alargados y en algunas especies segmentados con múltiples lóbulos, relacionados con la edad de los individuos (Valdivieso y Tamsitt, 1965). El riñón de las salamandras está dividido en una región genital o craneal que está destinada al transporte de los espermatozoides y una región pélvica o caudal la cual está destinada a la filtración y formación de la orina (Siegel *et al.*, 2010). Los espermatozoides son liberados de los quistes al lumen y siguen su recorrido en los conductos eferentes, que conectan con los canales laterales del riñón los cuales están localizados entre los testículos y la porción craneal del riñón. Los espermatozoides llegan a la región genital del riñón y de ahí al conducto primario urinario que desemboca en una ámpula donde el contenido es liberado por la cloaca (Fig.15) (Aranzábal, 2003).

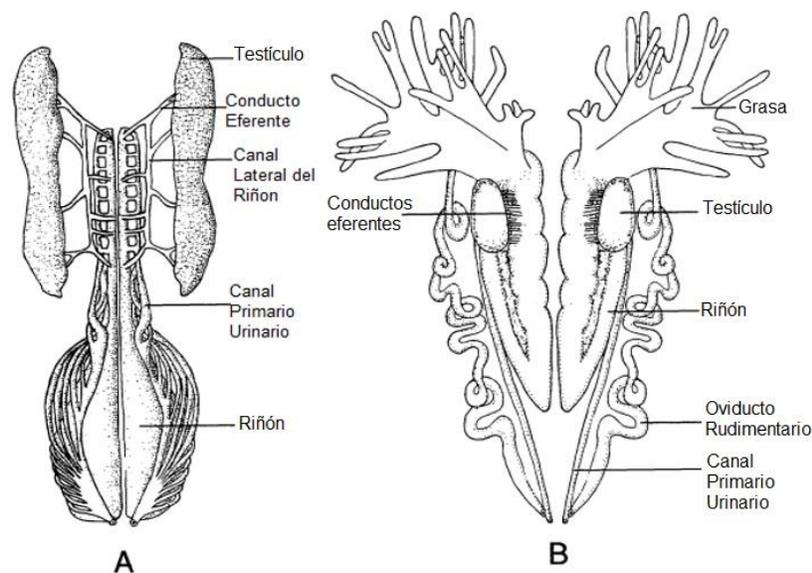


Figura 15. Comparación del Sistema urogenital del macho en anfibios. A) salamandras y B) Ranas (Imagen tomada y modificada Lombardi, 1998).

Los testículos en los urodelos pueden estar integrados por uno o varios lóbulos, cada uno es funcional y morfológicamente representan una unidad testicular. Los lóbulos están unidos por cordones interlobulares estrechos cubiertos por un solo epitelio peritoneal y tejido conectivo vascularizado subyacente donde se encuentran una gran

cantidad de espermatogonias. Entre las trabéculas de tejido conectivo y cerca de los capilares se encuentran las células de Leydig (Fig.16) (Vitt y Caldwell, 2013).

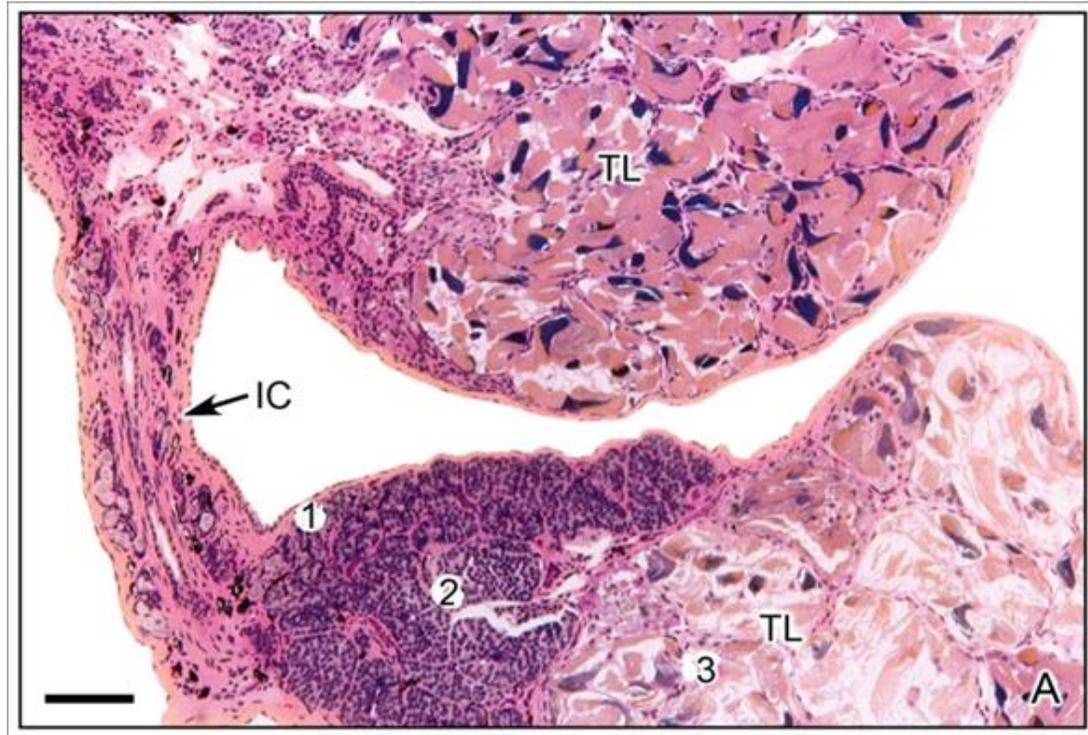


Figura 16. Lóbulos testiculares de salamandra granulosa (*Taricha granulosa*). Los lóbulos testiculares (TL) están unidos por un cordón interlobar (IC). La región cefálica del lóbulo contiene espermatogonias (1) y espermatocitos (2) y la región caudal contiene espermatozoides (3). Tinción Hematoxilina-eosina, Bar = 200 μ m (Imagen tomada de Uribe y Mejía, 2014).

Espermatogénesis

Es el proceso en el cual se da la formación de espermatozoides. En *Ambystoma* la espermatogénesis se lleva a cabo en quistes formados dentro de los testículos. La espermatogonia se desarrolla dentro de una cápsula formada de células de Sertoli. Las células sustentaculares o de Sertoli se despegan de la lámina basal y continúan revistiendo las células en desarrollo formando los quistes (Grier, 1984). Las células de Leydig se mantienen bajo un proceso de maduración junto a las olas de desarrollo de los espermatozoides (Humphrey, 1922).

En la mayoría de urodelos, la espermatogénesis se da de una manera cíclica estrechamente relacionada con la temporada del año (Moore, 1975; Lofts, 1984; Uribe *et al.*, 1991).

La espermatogénesis incluye tres fases:

1. Espermatocitogénesis o fase proliferativa: Las fases iniciales de la espermatogénesis se encuentran en la región más craneal. La espermatogonia primaria A está situada individualmente o formando pequeños grupos. Esta se divide múltiples veces por mitosis, para aumentar la población hasta que da lugar a una espermatogonia secundaria (Uribe *et al.*, 1991).

2. Fase de meiosis: en estas divisiones se reduce a la mitad el número de cromosomas. La espermatogonia secundaria inicia el proceso de meiosis y al entrar en profase 1 es considerado espermatocito primario el cual al terminar la primera división meiótica se obtienen 2 espermatocitos secundarios, los cuales entran a la segunda división meiótica (Meiosis II) y da origen a cuatro espermatidas (células haploides).

3. Espermioagénesis o fase de maduración: en esta fase se da la maduración de las espermatidas donde progresivamente se vuelven células alargadas. Se forma la vesícula acrosomal, el núcleo se alarga y se condensa la cromatina; se elimina una cantidad de citoplasma y los espermatozoides maduros se almacenan en los quistes en forma de remolino con las cabezas orientadas a un mismo lado (Uribe *et al.*, 1991).

La espermatogonia primaria A pasa por diferentes divisiones mitóticas para dar lugar a una población de gran cantidad que seguirá con la maduración. El número de ciclos de división es de 3 a 14 en los vertebrados. En salamandras del género *Ambystoma* y *Triturus* se dan 7 divisiones (Lombardi, 1998). Las espermatogonias primarias son de forma esférica con el citoplasma granular y con un núcleo irregular, pueden ser observadas entre el tejido conectivo de otros quistes no sólo en la región cefálica. Las espermatogonias secundarias son muy parecidas a las primarias forman grupos en los cuales se forman nuevos quistes junto con las células de Sertoli (Uribe y Mejía, 2014).

Los espermatoцитos primarios son células esféricas con un diámetro de 35-45 μm que contienen cromosomas duplicados de densidad variada a lo largo de la profase I de la meiosis. Los espermatoцитos en el estadio de paquiteno son los más comunes debido a la duración de la fase (Cobb y Handel, 1998). El espermatoцитo secundario presenta una forma circular con un diámetro de 18-20 μm contiene cromosomas haploides duplicados, son menos frecuentes de ver y en su mayoría son visibles en un quiste junto a espermatoцитos primarios (Uribe y Mejía, 2014).

Las espermátidas tempranas son de forma esférica con un diámetro de 14-17 μm estas se transforman en espermatozoides a través de la espermiogénesis se hacen células alargadas. Los espermatozoides están formados por una cabeza larga, un cuello y un flagelo. Las células intersticiales o de Leydig en salamandras se encuentran bajo un proceso continuo de maduración en el testículo. El cambio en la morfología de las células del intersticio se relaciona con la espermatogénesis. Las células de Leydig miden 35 - 55 μm de diámetro (Lazard, 1976; Lazard, 1979). El contenido de lípidos en estas células las convierte en sitios de síntesis androgénica (Norris *et al.*, 1985).

Espermatozoides

La morfología de los espermatozoides en anfibios consiste en una cabeza alargada con una vesícula acrosomal y el núcleo los cuales toman una forma alargada, un centriolo que se acomoda junto al núcleo, una pieza media que contiene las mitocondrias y la cola (Uribe *et al.*, 1994; Pudney, 1995, Aguiar *et al.*, 2003). Poseen una modificación en la membrana plasmática con forma de aleta conocida como membrana ondulante que recubre la pieza media y el flagelo. Esta modificación ayuda en el movimiento (Fig.17) (Furieri, 1975).

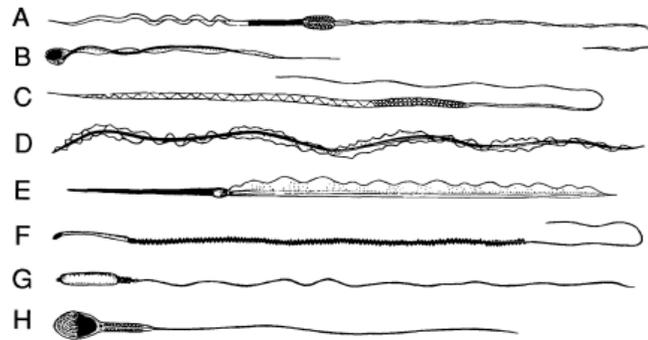


Figura 17. Variación en la estructura espermática de vertebrados: A, B, C, peces; D, E, anfibios; F, G, aves; H, mono (Tomada de Lombardi, 1998).

La relación filogenética entre anfibios ha sido estudiada por las características morfológicas de los espermatozoides (Lee y Kwon, 1996). El orden de urodelos mantiene tres sinapomorfías (características únicas): una barba acrosomal, la cresta nuclear y la membrana ondulante (Wortham *et al.*, 1982).

Fertilización

En urodelos el macho deposita los espermátóforos en el medio acuático y mediante un complejo comportamiento atrae a la hembra para que recoja el espermátóforo con la cloaca. La hembra almacena este material en su espermateca la cual mantiene viables a los espermatozoides (Fig.18) (Wakimoto, 1979).

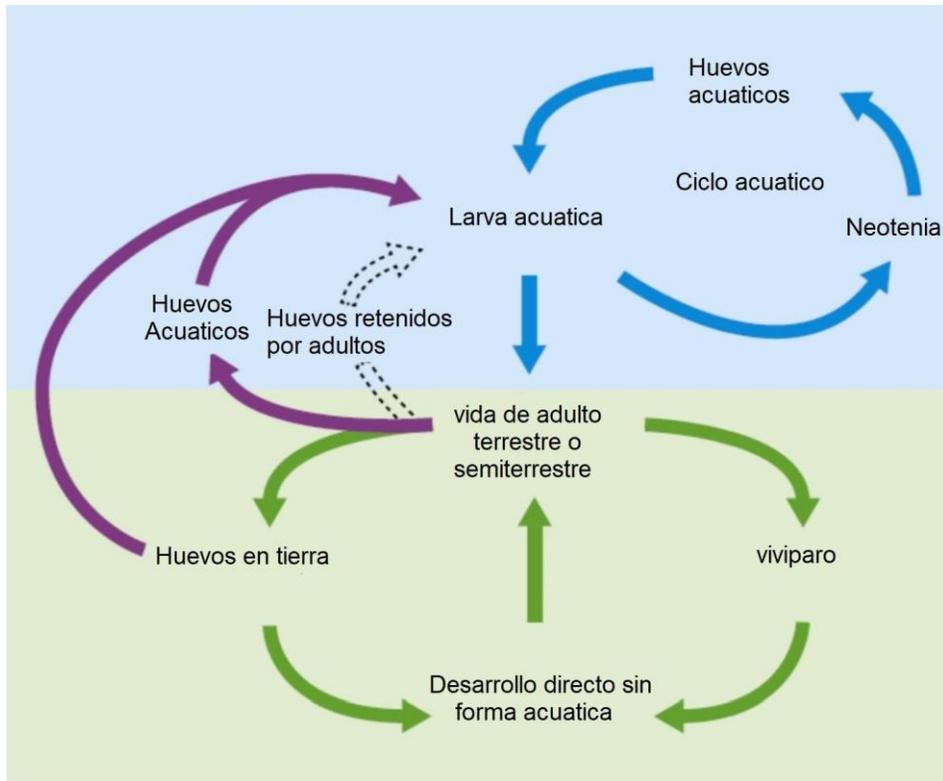


Figura 18. Resumen de los patrones de vida de los anfibios. Tres patrones básicos son reconocidos en los anfibios: (1) ciclo totalmente acuático con maduración sexual en forma de larva; (2) ciclo totalmente terrestre; (3) patrón acuático - terrestre con sus estadios larvarios. Con estos patrones se dan variaciones como las especies vivíparas contra las especies que depositan huevos (Imagen tomada y modificada de Norris y Carr, 1997).

Antecedentes

En la mayoría de los anfibios de climas templados, los ciclos reproductivos están estrechamente relacionados con la estación del año (Lofts, 1974). En *Triturus hongkongensis*, durante la primavera se renueva la cantidad de espermatogonias, los espermatozoides maduros del invierno pasado se empaquetan en un espermatóforo. En el verano los espermatozoides maduros predominan y en los meses de otoño e invierno los espermatozoides han sido liberados (Miltner y Armstrong, 1983). Estos autores realizaron una comparación aproximada del tiempo de los estadios celulares involucrados en la espermatogénesis entre algunos anfibios (cuadro 3).

Cuadro 3. Duración de los estadios celulares (en días) de espermatogénesis en diferentes anfibios

Species	Z ¹	P	D	M	2°SC	SPT	SPM	SPP
<i>T. vulgaris</i>	6	14	18	20	21	22	—	—
<i>X. laevis</i>	5	10	22	23	23	24	37	—
<i>P. cinereus</i>	8	13	24	26	26	27	—	—
<i>A. mexicanum</i> ²	5	10	32	33	39	50	62	121

Z: cigoteno; P: paquiteno; D: diploteno; M: primera metafase; 2°SC: espermatocito secundario; SPT: espermátida; SPM: espermatozoide; SPP: espermatóforo (tomado de Miltner y Armstrong, 1983).

Russell *et al.* (1981) realizaron la descripción del espermatóforo y sus estructuras en *Ambystoma texanum*. La estructura del espermatóforo es similar a la de un hongo (Fig.19) (Salthe, 1967).

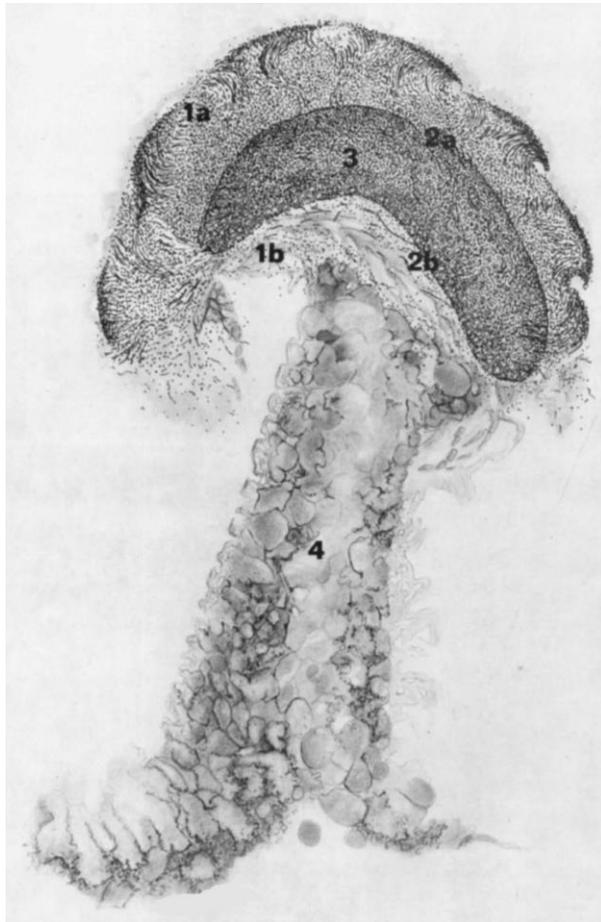


Figura 19. Estructura del espermatóforo de *Ambystoma texanum*. Hay cuatro estructuras importantes, los espermatozoides se encuentran un capuchón, en el cual (1a y 2a) las cabezas a la periferia, (1b y 2b) las colas hacia la periferia distal; (3) la presencia de gotas citoplasmáticas y (4) un tallo que se conecta al capuchón en el cual se encuentran espermatozoides solo en el sitio de unión entre ambas estructuras (tomada de Russell *et al.*, 1981).

De acuerdo con Noble y Weber (1929) y Nobel y Brady (1933), la capa blanquecina del espermatóforo de las salamandras consiste en una mezcla de espermatozoides con secreciones de las glándulas pélvicas. La presencia de espermatozoides en la periferia del capuchón y en la parte donde se une al tallo únicamente sugiere que estos dos componentes se producen de forma separada y son unidas posteriormente.

Justificación

El ajolote se ha convertido en una especie atractiva para la investigación en áreas como la fisiología, embriología, medicina regenerativa y genética (Humphrey, 1975), debido a ciertas características de la especie como: el tamaño y número de los huevos, desarrollo externo, la aceptación de injertos de tejidos en adultos y embriones (Voss *et al.*, 2009).

La tasa de extinción de especies se ha acelerado en los últimos años debido al crecimiento exponencial de la población humana y al uso intensivo de recursos naturales. La reproducción en cautividad ha evitado la extinción a un número considerable de especies (Hedrick y Kalinowski, 2000). Algunas de estas especies han sido introducidas posteriormente a su hábitat natural, aunque hasta la fecha el éxito de los programas de reintroducción ha sido muy bajo (Balmford *et al.*, 2000).

Un objetivo fundamental en la preservación de especies es el de contar solo con algunos de los individuos de la especie, con el fin de mejorar el conocimiento de su reproducción y desarrollar técnicas de reproducción asistida que faciliten el intercambio genético entre las poblaciones mantenidas en cautividad y las poblaciones silvestres. La aplicación de biotecnologías reproductivas permite preservar al máximo la diversidad genética y evitar los efectos de la consanguinidad en todas las poblaciones (Gomendio y Roldan, 2004; Roldán y Garde 2004). En México, más del 85% de las especies de anfibios, se encuentran en alguna categoría de conservación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2022). La importancia de la revisión de los aspectos reproductivos en la especie radica en la expansión de conocimiento para la elaboración de futuros trabajos en la reproducción asistida.

Objetivos

Objetivo general

- Describir algunos aspectos reproductivos del macho de ajolote de Xochimilco para la obtención y evaluación de espermátóforos y espermatozoides.

Objetivos particulares

- Describir la obtención, transporte y manejo de los espermátóforos para su evaluación morfológica.
- Describir la estructura testicular y algunas etapas de la espermatogénesis.
- Evaluar la morfología y viabilidad de los espermatozoides mediante el uso de la tinción Eosina-Nigrosina.

Material y métodos

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal (L2) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán.

Mantenimiento de la especie para su reproducción

Para el mantenimiento de los ajolotes se alojaron separados hembras de machos en peceras de 40 litros con un filtro de esponja. Diariamente se revisaron y se les alimentó con gusanos de tubifex. Previo a la selección de parejas se mantuvieron durante 1 mes con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, y se controló la temperatura a 14°C (Fig. 20). Se colocaron parejas en cada pecera y se observó su comportamiento evitando agresiones. Al constatar la compatibilidad de las parejas se colocaron adornos dentro de las peceras como rafia o planta *Elodea* y algunas piedras para estimular la deposición del espermátóforo (Fig. 21).

Su reproducción se llevó a cabo posterior al cortejo, en el cual el macho es estimulado mediante el olfato siendo atraído por las feromonas de la hembra. El macho efectuó recorridos circulares durante un tiempo. Al llamar la atención de la hembra, suelta uno o varios espermátóforos los cuales son recogidos por la hembra desde la cloaca.

En estado libre, la reproducción de esta especie tiene lugar entre noviembre y febrero, aún en abril es posible encontrar algunos reproductores. En cautiverio se tomaron en

cuenta las necesidades y factores de vida libre para poder llevar a cabo su reproducción y se ajustaron estos parámetros.

Se formaron tres parejas de las cuales se obtuvieron los espermatozoides.



Figura 20. Organismos en cautiverio (Fuente propia).

Dentro de los factores más importantes a tomar en cuenta para garantizar la reproducción se incluyen:

- fotoperiodo 12 horas luz y 12 horas oscuridad
- temperatura del agua entre 12 a 18°C
- relación hembra: macho, 2: 1
- sustratos que consisten en rafia o plantas, material necesario para la hembra en caso de recoger el espermatozoides.

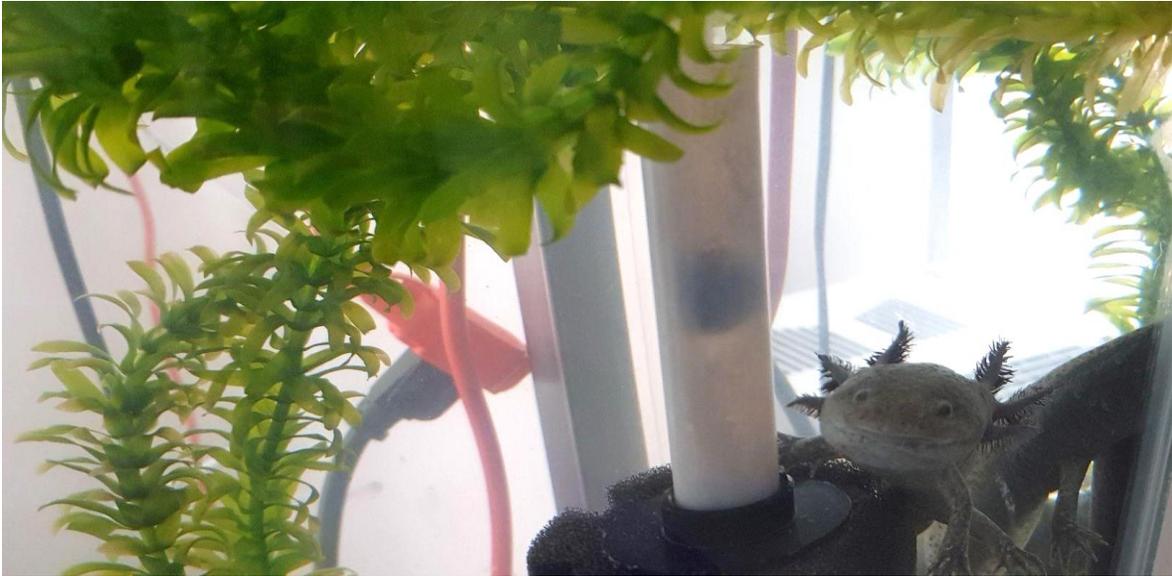


Figura 21. Pareja en cautiverio, para la obtención de muestra (Fuente propia).

Se monitoreó a cada pareja sin interferir en el cortejo y permitir que el macho libere los espermátóforos. Se debe tener en cuenta que los machos pueden depositar más de un solo espermátóforo y presentar más de un solo cortejo.

Obtención del espermátóforo y espermatozoides

Para el transporte de los espermátóforos se utilizó un termo en el cual se depositaron espermátóforos y agua de la misma pecera donde estaba la pareja, el termo fue depositado en una hielera con refrigerantes donde la temperatura del agua fue monitoreada en todo momento para mantenerla a 8°C. Al llegar al laboratorio, se tuvo un área de trabajo lista para el manejo de las muestras (Fig. 22), pasando a la revisión externa del espermátóforo.



Figura 22. Material dispuesto para la evaluación del espermatóforo y los espermatozoides. Fotografía tomada en el laboratorio de Reproducción Animal L2, UIM FESC, (Fuente propia).

Evaluación de los espermatozoides

Para la separación y disolución de la capa mucosa del espermatóforo, se utilizó la solución Ringer Simplificado de Anfibio (SAR) y el uso de Tris-HCl o solución de hidróxido de sodio al 20% (Rivera *et al.*, 2021).

Posterior a la revisión se retiró parte del espermatóforo con métodos físicos mediante el uso de un porta objetos o bisturí para separar el cono, estructura que contiene casi en su totalidad espermatozoides, lo restante se depositó en una caja de Petri donde se realizaron lavados con SAR (Solución Ringer Anfibio Modificado) a 8°C. Al separar únicamente el cono se realizaron más lavados con SAR y con Tris-HCl o con NaOH con el propósito de retirar contaminantes de la capa de moco y disolver lo más posible el moco, ya que este es un impedimento en la evaluación pues mantiene fuertemente unidos a los espermatozoides. El contenido resultante se pasó a un agitador (vórtex) por 2 minutos para homogeneizar lo más posible los espermatozoides. Posteriormente se tomaron muestras para hacer frotis con la tinción de Eosina nigrosina con la finalidad de revisar la estructura y viabilidad de los espermatozoides tras la técnica de separación de espermatozoides con espermatóforo.

Estructura testicular

Para la obtención de muestras de testículo se realizó la necropsia de dos ajolotes machos donados (Ver anexo 1). Se enviaron las muestras al laboratorio para la preparación de laminillas histológicas con diferentes tinciones: Hematoxilina/Eosina (HE), tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) y tinción tricrómica de Mason. De esta forma se revisaron al microscopio, se identificaron las células y estado de maduración. Se tomaron fotos para la descripción de las etapas observadas.

Resultados

I. Evaluación de los espermatóforos y los espermatozoides

Dos de las tres parejas presentaron conductas de cortejo y se obtuvieron espermatóforos de esos machos. Estos fueron depositados en un lapso de 24 horas posterior a la formación de las parejas. El lugar donde se encontraron los espermatóforos fue en el fondo de la pecera. Todos los espermatóforos presentaron un aspecto íntegro (Fig.23).

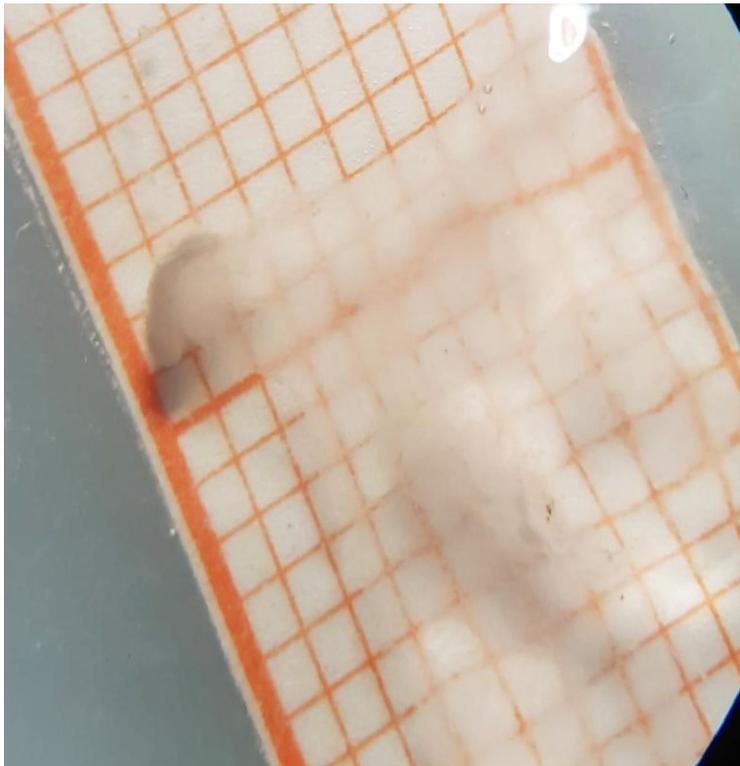


Figura 23. Revisión externa del espermatóforo del macho E15640 (Pareja #1).

Del macho E15640 se obtuvieron tres espermatóforos con las siguientes características:

- Tamaño: capuchón 10 mm; tallo 50 mm de largo
- Forma: las tres muestras tenían la misma forma de cono
- Estructura interna: se identifican 3 regiones principales (Fig.24)
- Movimiento de los espermatozoides: Ausente.

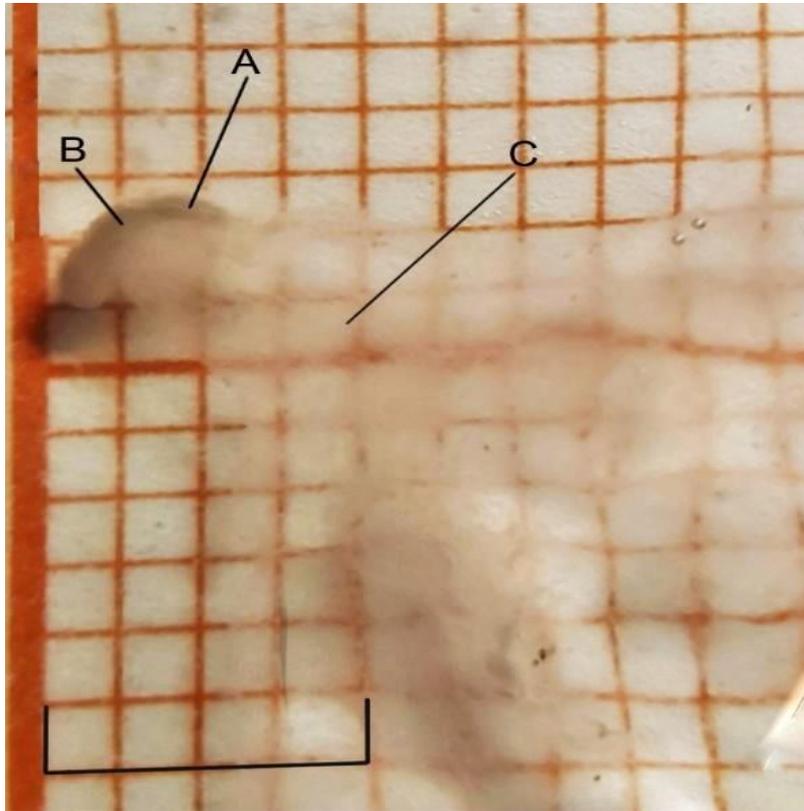


Figura 24. Espermatóforo: se reconocen 3 regiones principales (A) periferia donde están organizados los espermatozoides, (B) la zona central está organizada gotas citoplasmáticas, y (C) es la capa mucosa que protege y envuelve a los espermatozoides.

Para los espermatóforos del macho E15640 se utilizó el medio SAR y para disolver el moco del espermatóforo Tris-HCl. Los espermatozoides no se llegaron a separar adecuadamente (Fig. 27).

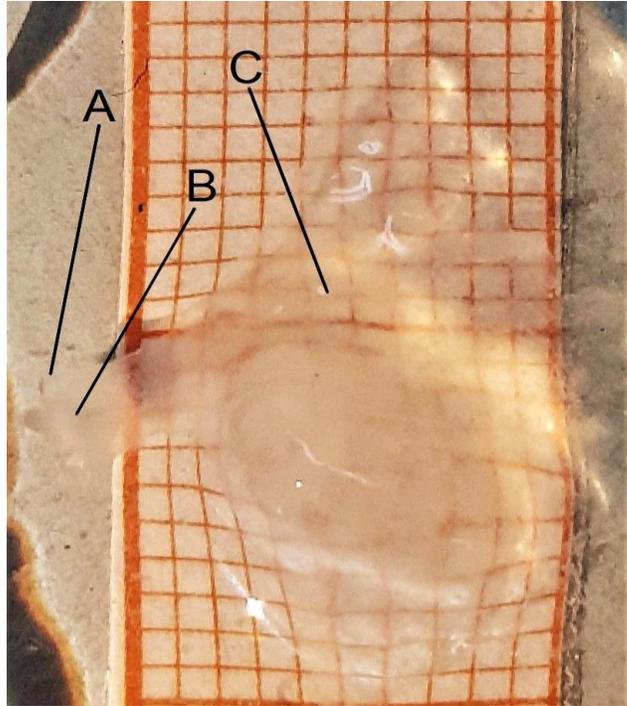


Figura 25. Espermatóforo de macho E15638 se reconocen las 3 regiones principales (A) periferia donde están organizados los espermatozoides, (B) la zona central está organizada gotas citoplasmáticas, y (C) corresponde a la capa mucosa que protege y envuelve a los espermatozoides (Pareja #2).

Del macho E15638 se obtuvieron dos espermatóforos con las siguientes características:

- tamaño: capuchón 10 mm, tallo 70 mm
- forma: las 2 muestras presentan una forma de cono
- Estructura interna: se identifican 3 regiones principales (Fig. 25)
- Movimiento de los espermatozoides: Ausente.

Para los espermatóforos del macho E15638 se utilizó el medio SAR y para disolver el moco del espermatóforo NaOH (20%) (Fig. 26). Se observó que los espermatozoides se llegaron a separar, pero ocurrió lisis celular. Se llegaron a observar cabezas y flagelos separados (Figs. 27 y 28).

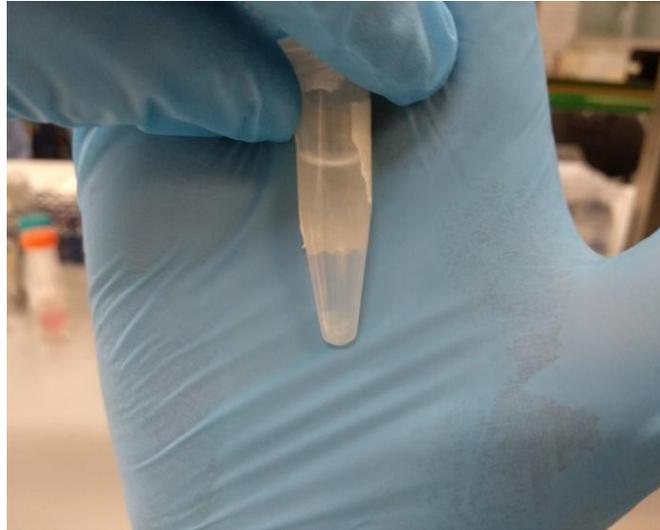


Figura 26. Se observa un tubo de 5 ml con espermatozoides del macho E15638 diluidos.

- Volumen: 6 μ l promedio únicamente del botón con espermatozoides
- Color: blanco lechoso
- Consistencia: gelatinosa

Las muestras obtenidas al final de este proceso se pasaron a un portaobjetos para su revisión al microscopio.

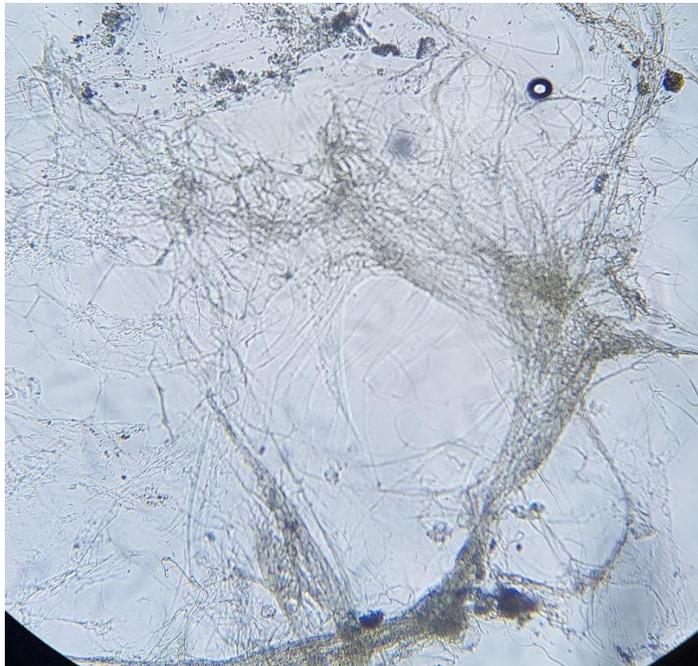


Figura 27. Objetivo 10X. Se observan espermatozoides del macho E15640 fuertemente unidos entre si debido a la presencia de moco del espermatóforo.

Viabilidad y morfología

Para estas pruebas se utilizó la tinción supravital de Eosina-Nigrosina con la que se observan espermatozoides viables los cuales no se tiñeron y mantuvieron su membrana intacta, mientras que los espermatozoides no viables se tiñeron debido a un daño en la membrana (Figs. 28 a 30).

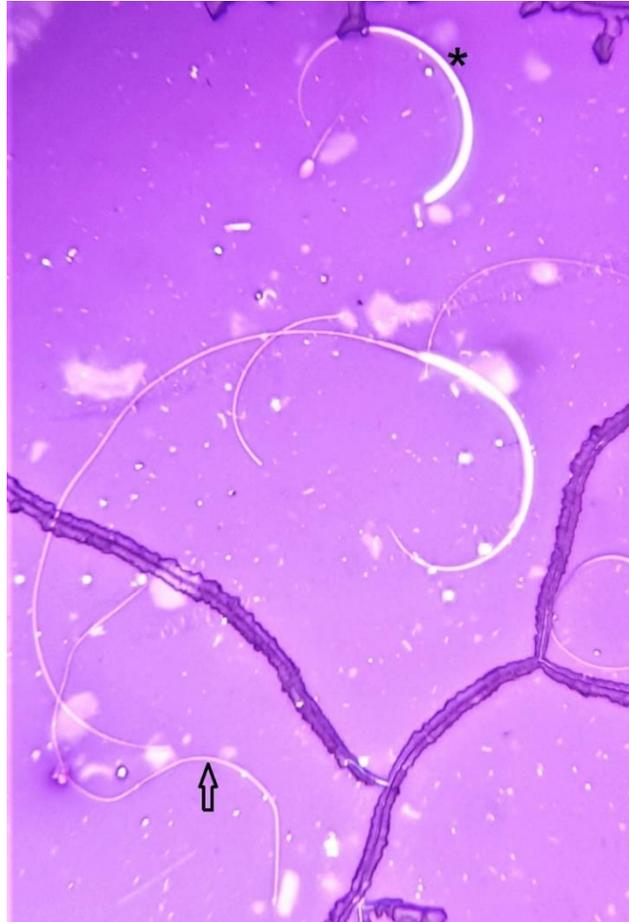


Figura 28. Eosina-nigrosina tomada con objetivo de 40X. Espermatozoides del macho E15638 Se identifica un espermatozoide con la membrana intacta (centro de la imagen) y se observa una cabeza espermática (*) desprendida y el posible flagelo de esta cabeza (flecha)

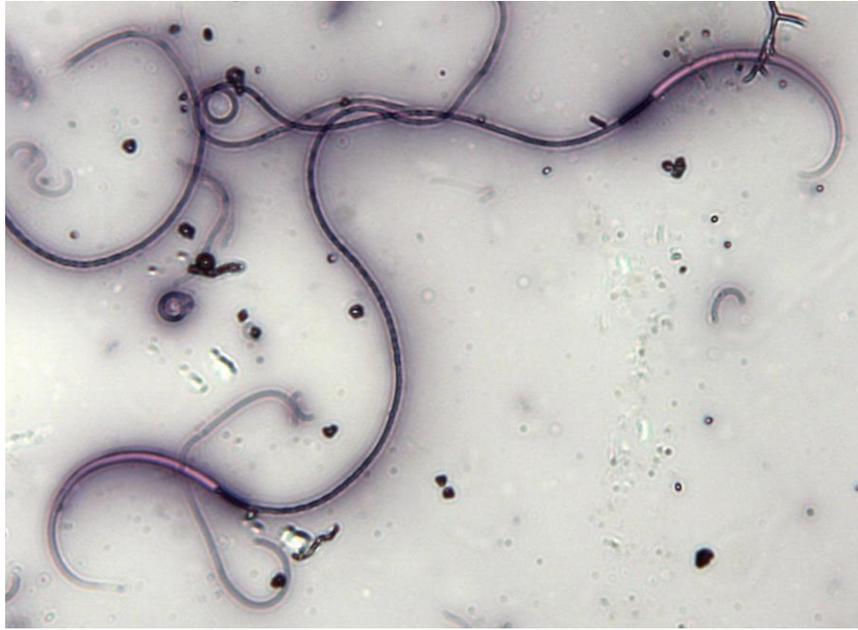


Figura 29. Eosina-nigrosina objetivo 40X. Espermatozoides del macho E15638 con la membrana celular dañada



Figura 30. Eosina-nigrosina objetivo 40X. Espermatozoide del macho E15638 con membrana celular dañada, se puede observar en la zona del flagelo la membrana ondulante (*).

II. Histología testicular

En esta sección se muestra una serie de cortes histológicos de testículo que ilustran los diferentes tipos celulares germinales que participan en la espermatogénesis (Figs. 31 a 36).

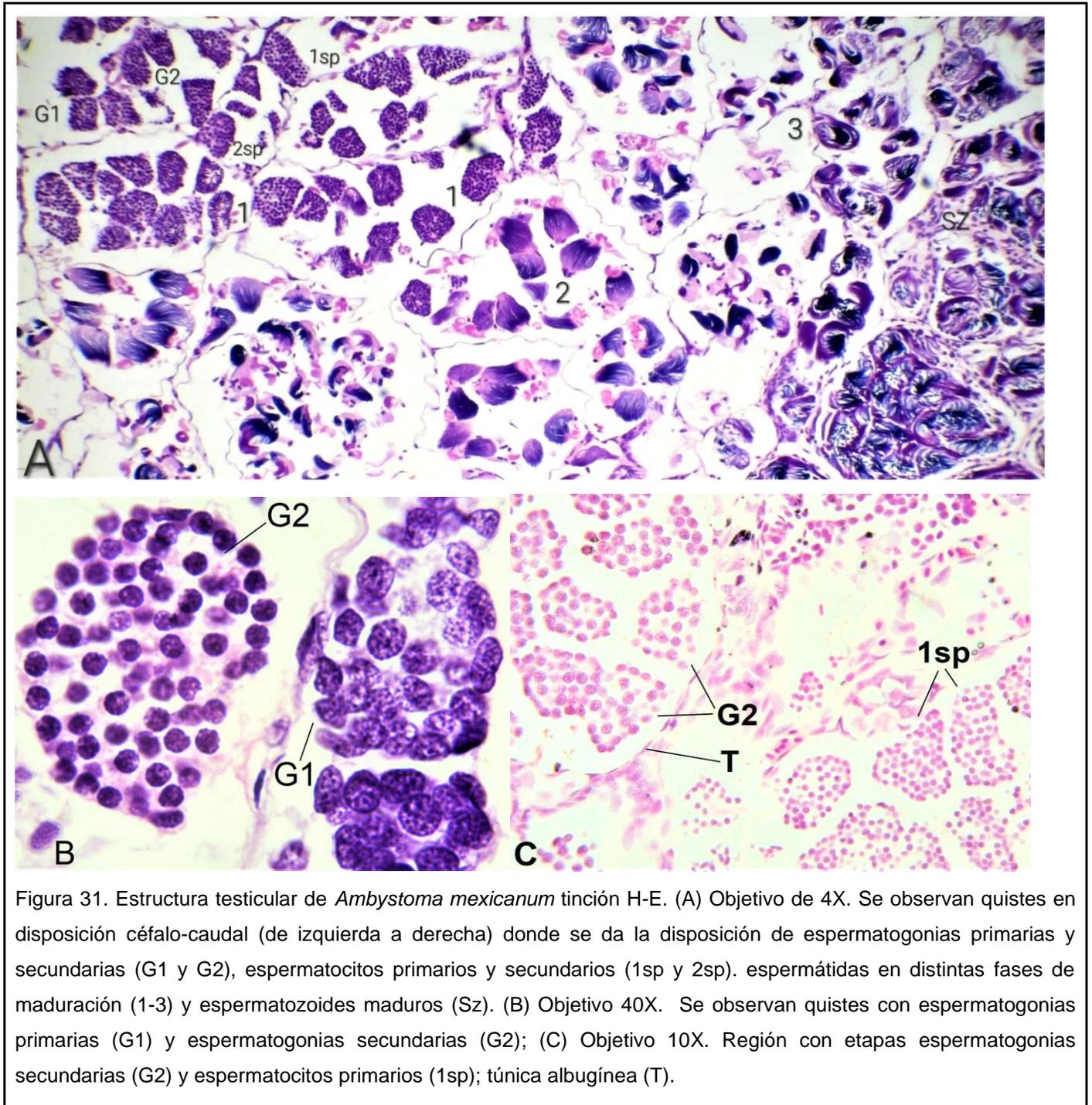


Figura 31. Estructura testicular de *Ambystoma mexicanum* tinción H-E. (A) Objetivo de 4X. Se observan quistes en disposición céfalo-caudal (de izquierda a derecha) donde se da la disposición de espermatogonias primarias y secundarias (G1 y G2), espermatocitos primarios y secundarios (1sp y 2sp). espermátidas en distintas fases de maduración (1-3) y espermatozoides maduros (Sz). (B) Objetivo 40X. Se observan quistes con espermatogonias primarias (G1) y espermatogonias secundarias (G2); (C) Objetivo 10X. Región con etapas espermatogonias secundarias (G2) y espermatocitos primarios (1sp); túnica albugínea (T).

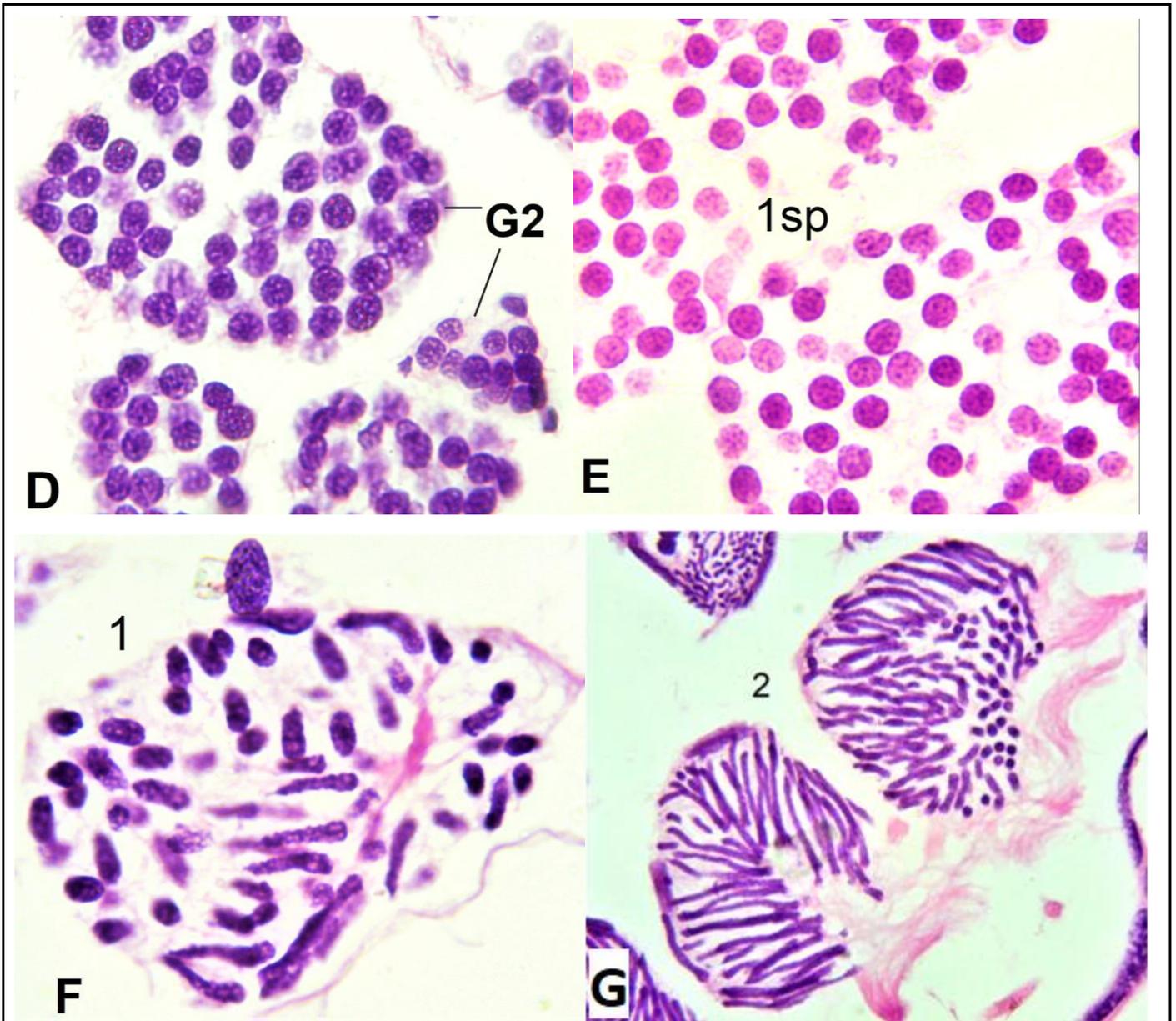


Figura 32. Estructura testicular de *Ambystoma mexicanum*. Tinción H-E. (D) Objetivo 20X. Quistes con (G2) espermatogonias secundarias en mitosis. (E) Objetivo 40X. Quistes con (1sp) espermatocitos primarios. (F) Objetivo 40X. espermátidas en estadio de (1) maduración inicial. (G) Objetivo 40X. Espermátidas en fase de Maduración (2) en una etapa intermedia se muestran las colas en desarrollo y las cabezas se disponen al mismo lugar.

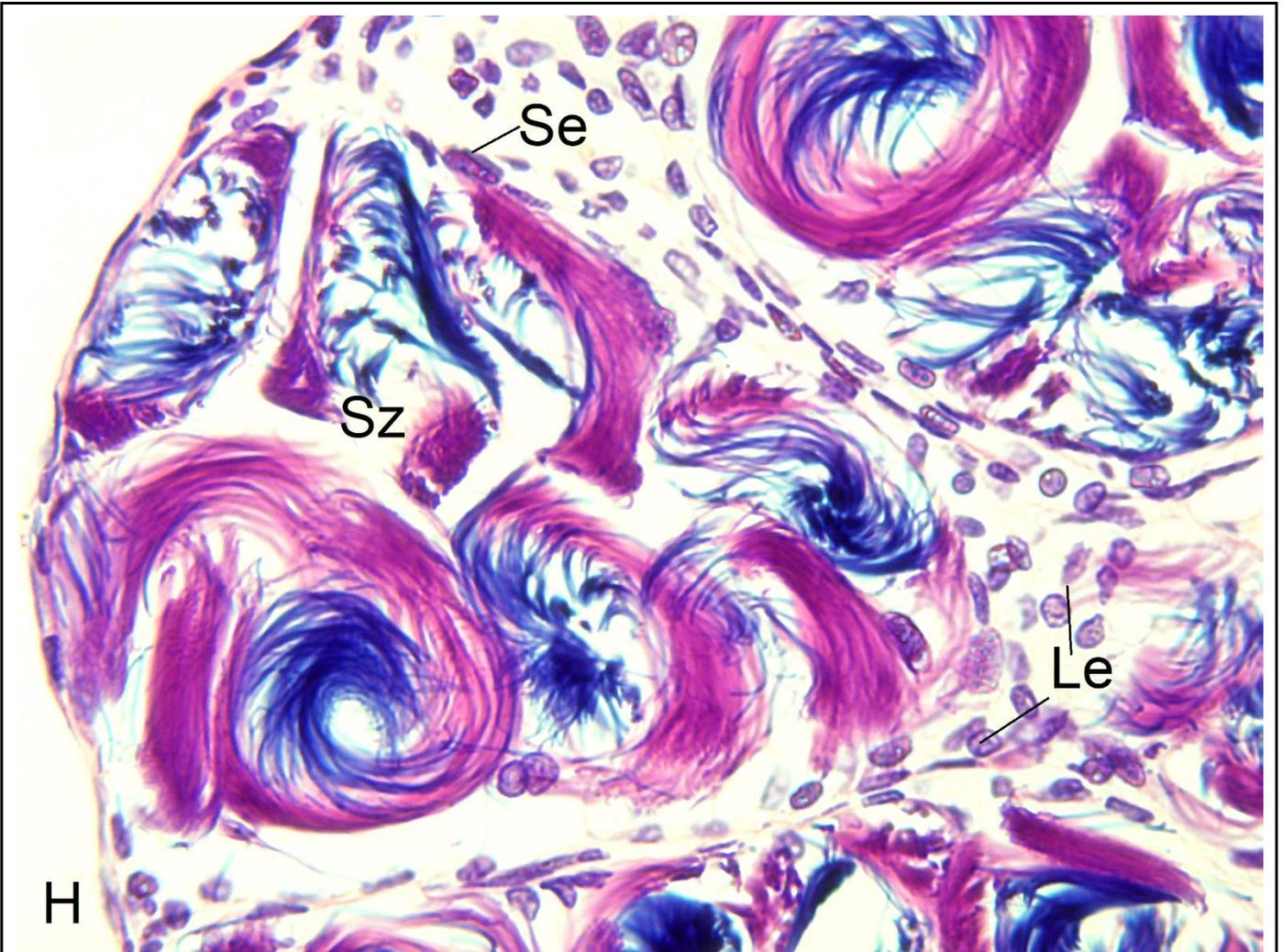


Figura 33. Estructura testicular de *Ambystoma mexicanum*. Objetivo 20X. Tinción H-E. Se muestran quistes con espermatozoides maduros (Sz) en una posición de remolino rodeados por tejido intersticial, las cabezas mantienen una disposición hacia el mismo lado. Se observan células de Leydig (Le) y células de Sertoli (Se),

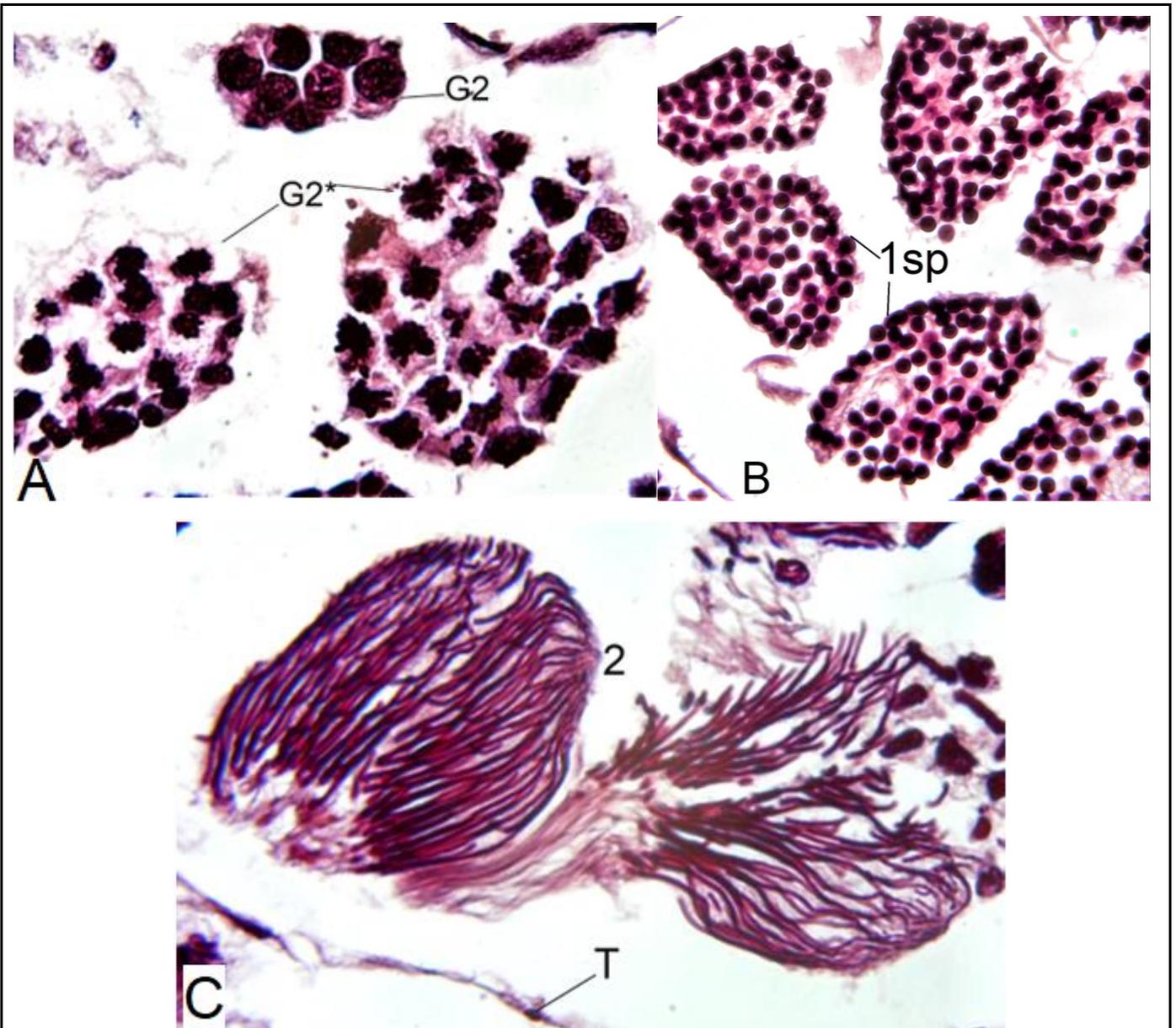


Figura 34. Estructura testicular de *Ambystoma mexicanum* Tinción PAS. (A) Objetivo 20X. Quistes que presentan espermatogonias secundarias (G2*) en metafase. (B) Objetivo 20X. Quistes con espermatocitos primarios (1sp). (C) Objetivo 40X. Espermátidas en etapa media (2) de alargación con formación de cola, túnica albugínea (T).

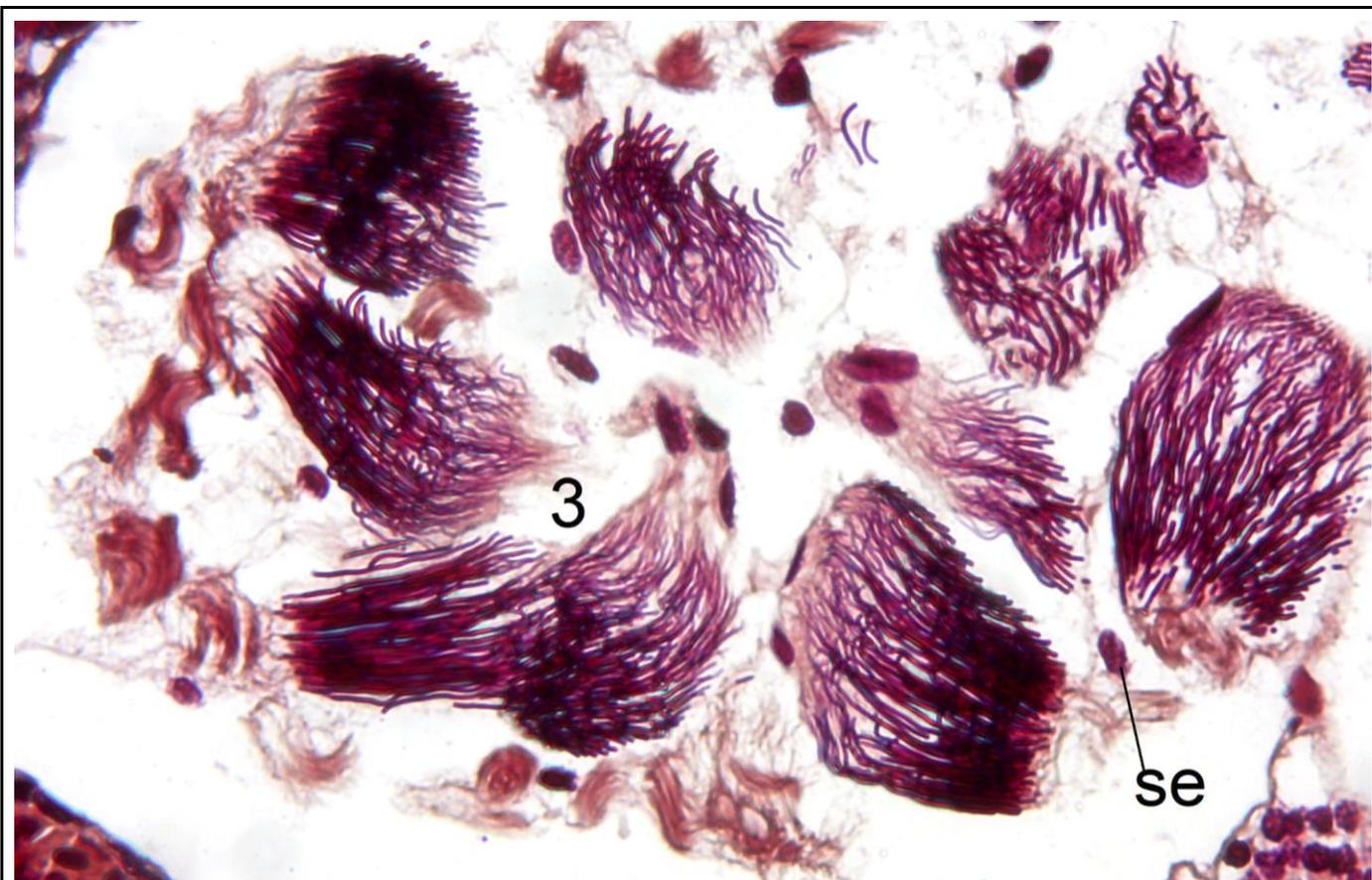


Figura 35. Estructura testicular de *Ambystoma mexicanum* Tinción PAS Objetivo 20X. Espermatidas (3) en fase avanzada de maduración, se nota la cabeza alargada de los espermatozoides con la misma dirección y la formación de flagelo. Se observan los núcleos de las células de Sertoli (se).

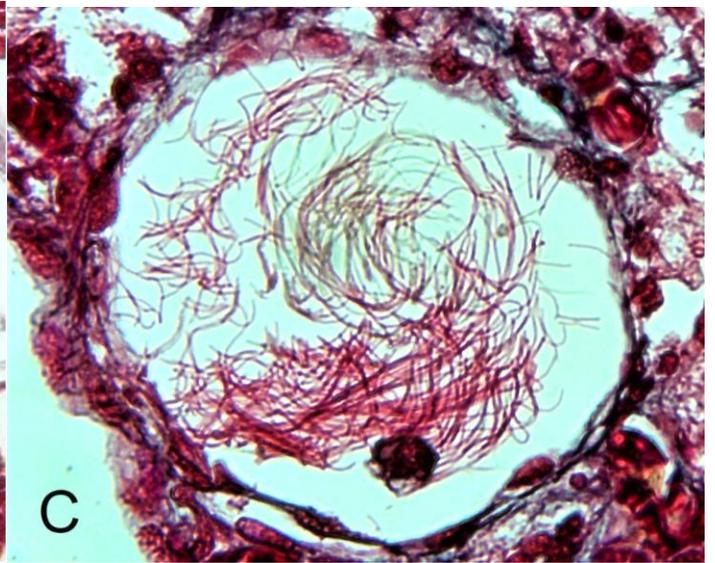
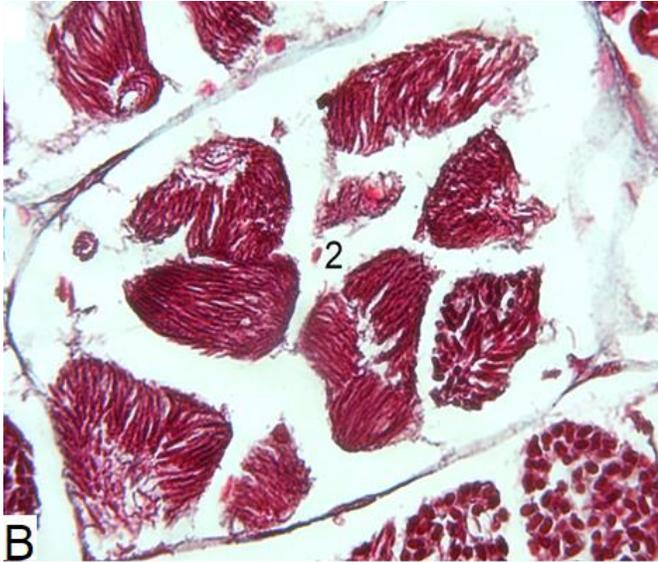
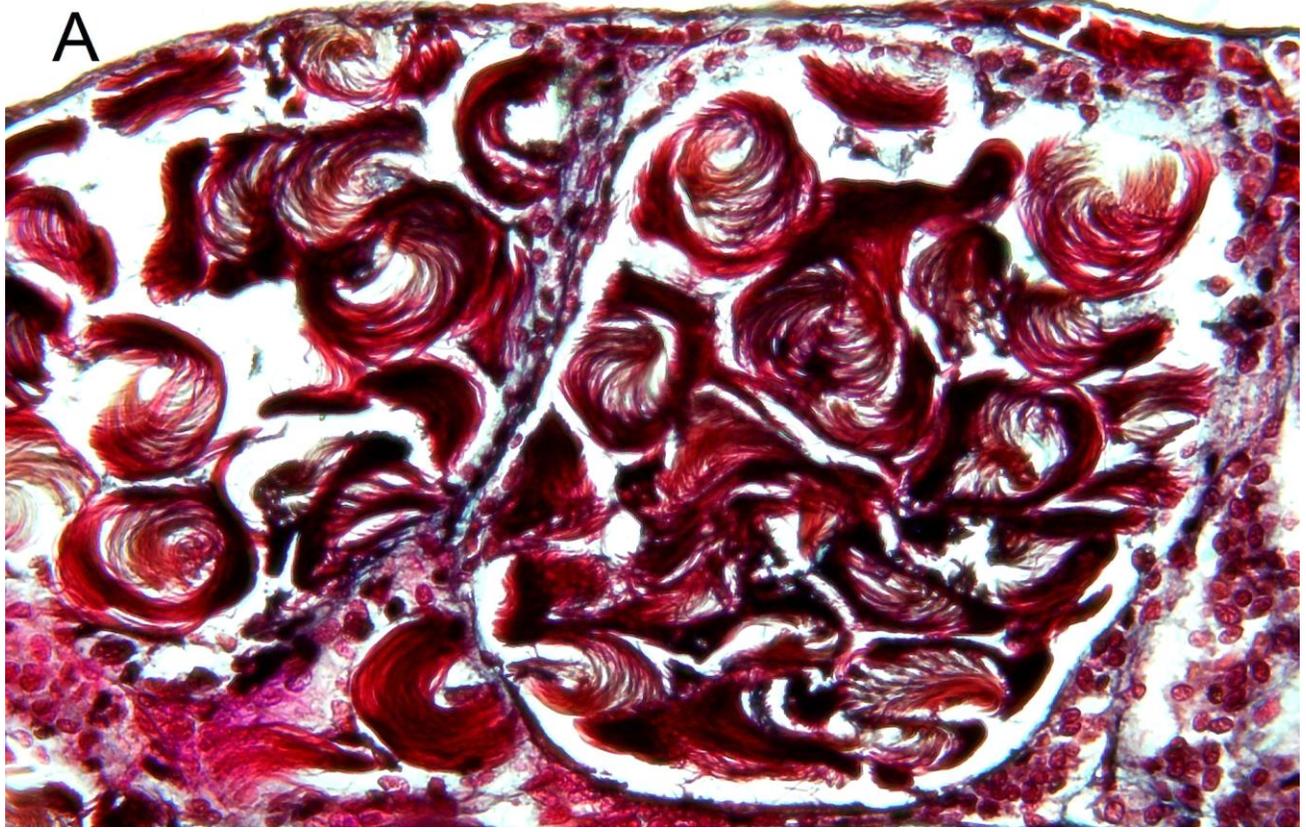


Figura 36. Estructura testicular de *Ambystoma mexicanum*. Tinción Tricrómica de Masson. (A) Objetivo 20X. Quistes con espermatozoides maduros en disposición de remolino. (B) Objetivo 20X. Espermatidas en maduración intermedia (2) con proceso de alargación. (C) Objetivo 20X. Quiste con espermatozoides maduros sueltos posiblemente el quiste este roto o listo para la liberación de espermatozoides.

Discusión

Los anfibios enfrentan un declive mundial en sus poblaciones (IUCN, 2022), por lo cual es necesario aumentar el conocimiento acerca de su reproducción para establecer programas de conservación más eficientes. Estos programas pueden desarrollarse si se tiene la información necesaria de la anatomía reproductiva, la época de cortejo y el apareamiento. Además, son necesarias para la obtención y evaluación de espermatozoides y para su criopreservación.

-Obtención de espermatozoides

El manejo de la especie bajo condiciones de laboratorio puede realizarse de formas distintas. El desarrollo de métodos no invasivos son una prioridad para la colección y almacenamiento de los gametos (Gascon, 2007; Browne y Figiel, 2011). Arnold (1976) obtuvo 81 espermátóforos por cada cortejo presentado en *A. maculatum*. De la misma manera, McWilliams (1992) reportó la colección de hasta 128 espermátóforos en *A. texanum*. Este tipo de manejo permite asegurar la variación genética mediante el uso de diferentes machos.

Para la selección de las hembras y los machos destinados a la reproducción es importante considerar características de los ejemplares como la edad (de al menos 1 año de vida), longitud hocico a cloaca (entre 20 a 23 cm) el estado físico (animales sin lesiones ni mutilaciones, branquias externas amplias, ausencia de enfermedades visibles en la piel y el trato entre la pareja) y la ausencia de conductas agresivas (González y Montes, 2014). Todas estas características nos permitieron hacer un manejo eficiente de las parejas para permitir las conductas reproductivas. Además, el acondicionamiento de la pecera mediante el uso de plantas, rafia o piedras favoreció la oviposición en las hembras y la liberación de espermátóforo en machos (Gonzales y Montes, 2014). Por otro lado, fue importante el manejo ambiental: un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, y mantener la temperatura entre 12 a 18°C. Esto permitió la adaptación de la especie para presentar actividad reproductiva. Este método dista de los métodos invasivos donde se ha reportado la recolección de espermatozoides en anfibios mediante la maceración de testículos (Beesley *et al.*,

1998), así como el uso de hormonas para la reproducción en *A. mexicanum* (Mansour *et al.*, 2011), *A. granulatum* y *A. lermaense* (Aguilar *et al.*, 2009). Esta estimulación hormonal permite la colección de espermatozoides a partir de secreciones obtenidas por masaje abdominal o mediante la canulación de la cloaca. Asimismo, estimula la producción y la liberación de los espermatozoides (Figiel, 2013).

-Disolución del espermatozoide

El material que recubre a los espermatozoides fue difícil de desintegrar. Esto impidió realizar adecuadamente la evaluación espermática ya que las células se quedan fuertemente adheridas. Rivera *et al.*, (2021) reportaron el uso del Ringer Simplificado de Anfibio (SAR) más hidróxido de sodio (NaOH) al 20% en el procesamiento de espermatozoides de *A. mexicanum*. Los espermatozoides obtenidos fueron suficientes para realizar la evaluación espermática utilizando la tinción de Eosina- Nigrosina y la posterior criopreservación.

Los espermatozoides de los urodelos son inactivos, debido a que en los testículos están en un medio isotónico (~280 mosmol/kg). La espermateca mantiene una osmolaridad alta por lo cual los espermatozoides siguen inactivados hasta que tienen contacto con la cubierta del ovocito (Sasaki *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2003). Otros factores esenciales para la activación de espermatozoides son la composición iónica, el pH y la temperatura (Della *et al.*, 2017). Esto se debe tener en cuenta para la elección de diluyentes utilizando como base una solución salina fisiológica (Shishova *et al.*, 2011).

En la maceración de testículos de ajolote para obtener los espermatozoides se ha utilizado solución SAR, para formar una suspensión que contiene componentes iónicos y orgánicos derivados de los testículos (Browne *et al.*, 1998). Esta mezcla puede ser almacenada por horas o días a temperaturas cercanas a la congelación (Browne y Figiel, 2011). Para la evaluación de la viabilidad espermática se usan métodos como el porcentaje de motilidad (Hollinger y Corton 1980), la integridad de la membrana plasmática (Beesley *et al.*, 1998; Browne *et al.*, 1998), la integridad morfológica, la

evaluación de la función mitocondrial, la reacción acrosomal y la integridad del ADN de los espermatozoides (Mocé y Graham 2008).

Mansour *et al.* (2011) reportaron colección de gametos de ajolote tras la aplicación de gonadotropina coriónica humana (eCG) para la fertilización *in vitro*. La obtención de espermatozoides fue a través de un masaje abdominal sin la eutanasia. A la mezcla de espermatozoides y huevos utilizaron una solución salina fertilizante (FS) de pH 8.5 y osmolaridad de 65 mosmol/kg, permitiendo la fertilización de los huevos y la obtención de las larvas.

En las pruebas realizadas en este trabajo se utilizó una solución de Tris-HCl con la cual no se pudo desintegrar la capa mucosa del espermátforo y los espermatozoides no fueron aptos para una evaluación. Al usar la solución SAR + NaOH al 20% logramos separar los espermatozoides, aunque pequeños grupos con espermatozoides adheridos y lisis celular. Lamentablemente, no se pudo disponer de una mayor cantidad de espermátforos para hacer más pruebas o probar otros métodos para desintegrar la capa mucosa. Además, los espermatozoides no presentaron movimiento.

-Morfología de los espermatozoides

La morfología espermática ha evolucionado en respuesta a los múltiples métodos de reproducción (Duellman y Trueb, 1994). La variación en la morfología espermática sugiere que el espermatozoide tiene la cabeza más larga en relación a los espermatozoides de mamíferos para contener mayor material nuclear (Wortham *et al.*, 1977). En nuestro trabajo llegamos a observar espermatozoides mediante la tinción de Eosina-Nigrosina, sin embargo, no fue posible un conteo adecuado de la proporción de espermatozoides vivos y muertos.

-Estructura testicular

Los testículos, por ser un órgano largo pareado, están unidos a la parte dorsal de la cavidad celómica; están alineados paralelamente al mesonefros y los conductos de Wolff y a los conductos rudimentarios de Müller (Adams, 1940; Propper, 2011). Los

testículos de *Ambystoma* están formados por 1 o más lóbulos dependiendo de la maduración del animal (Baker y Taylor, 1964; Lofts 1987). Estas lobulaciones son observables en las muestras obtenidas y se describen varias especies que presentan esta adaptación morfológica como lo son: *Desmognathus fuscus*, *Diemyctylus viridescens*, *Salamandra atra* entre otras (Franchi *et al.*, 1982; Lofts, 1987; Humphrey, 1922; Uribe y Mejía, 2014).

Miltner y Armstrong (1983) realizaron la identificación de estadios celulares durante la espermatogénesis se compararon individuos en la misma época del año y encontraron que no eran los mismos estadios celulares. En salamandras, la espermatogénesis se presenta en oleadas donde en la región craneal del testículo se registran fases tempranas de desarrollo mientras que en la región caudal se encuentran las fases finales (Norris y Lopez, 2011). Esto corresponde a lo observado en los cortes histológicos de este trabajo respecto a la disposición en oleada céfalo-caudal. La distribución de quistes céfalo-caudal puede ser observada en cortes longitudinales ya que en los cortes transversales se observan quistes en estadios similares (Pudney *et al.*, 1983; Trauth, 1983; Flament *et al.*, 2009; Uribe y Mejía, 2014). En *A. tigrinum*, se identificó que la espermatogénesis se inicia en el mes de abril con la organización de nuevos lóbulos con la proliferación de espermatogonias, la espermiogénesis se inicia en julio y los espermatozoides ya están formados para el mes de agosto (Norris *et al.*, 1985). En algunos quistes se observan espermatozoides anormales en tamaño y forma los cuales eventualmente serán fagocitados por las células de Sertoli (Schindelmeiser *et al.*, 1983).

Para este trabajo el mes de colección de los testículos fue septiembre por lo que las etapas observadas corresponden desde espermatogonias hasta espermatozoides maduros. El mantenimiento de las condiciones ambientales propias de las épocas de reproducción como la temperatura y el cambio en las horas luz desencadenó el comportamiento de cortejo al juntar a la hembra con el macho. El conocimiento sobre la espermatogénesis en estas especies nos permite distinguir mejor los patrones de reproducción de la especie para su uso y aprovechamiento en condiciones de

laboratorio. En *A. mexicanum* bajo condiciones controladas de cautiverio se ha descrito un patrón de reproducción en todo el año para obtener puestas (Armstrong *et al.*, 1989A). Mantener a los ajolotes en el laboratorio nos permitió obtener espermátóforos para su evaluación aun en meses que en vida libre sería difícil de conseguir.

Conclusión

- Bajo condiciones de cautiverio se pudieron obtener espermátóforos mediante un manejo no invasivo.
- Se realizó la descripción externa del espermátóforo.
- El uso de la solución SAR + NaHO al 20% demostró ser la solución que logró la desintegración del espermátóforo, aunque con la ruptura de las células.
- La espermatogénesis observada es similar a lo observado en otros urodelos.

Perspectivas.

Ésta ha sido la primera aproximación en el manejo y evaluación de espermátóforos y espermatozoides, así como la histología testicular de ajolotes. Los resultados son alentadores para continuar con esta línea de investigación utilizando otras sustancias para disolver el espermátóforo, promover la activación del movimiento, realizar la evaluación de espermatozoides que contribuirá al desarrollo de tecnologías reproductivas para la conservación de esta especie.

Bibliografía

- Adams AE. 1940. Sexual conditions in *Triturus viridescens*. III. The reproductive cycle of the adult aquatic form of both sexes. *American Journal of Anatomy*, 66: 235-275.
- Aguiar– Jr O, Garda A A, Lima AP, Colli GR, Bão SN, y Recco-Pimentel SM. 2003. Biflagellate spermatozoon of the poison-dart frogs *epipedobates femoralis* y *colostethus* sp. (Anura, *Dendrobatidae*). *Journal of Morphology*, 255: 114-121.
- AmphibiaWeb. 2023. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 13 Feb 2023
- Aranzábal MU. 2003. The testes, spermatogenesis and male reproductive ducts. *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. New Hampshire: Science Publishers, Inc, 183-202.
- Arnold SJ. 1976. Sexual behavior, sexual interference and sexual defense in the salamanders *Ambystoma maculatum*, *Ambystoma tigrinum* y *Plethodon jordani*. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 42: 247-300.
- Baker CL y Taylor WW. 1964. The urogenital system of the male *Ambystoma*. *Journal Tennessee academy science*, 39: 1-9.
- Balmford A, Gaston KJ y James A. 2000. Integrating costs of conservation into international priority setting. *Conservation Biology*, 14: 597-605.
- Beesley SG, Costanzo JP, y Lee Jr RE. 1998. Cryopreservation of spermatozoa from freeze-tolerant and-intolerant anurans. *Cryobiology*, 37: 155-162.
- Browne RK, Clulow JMM y Clark A. 1998. Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm. *Cryobiology* 37:339-345.
- Browne R y Figiel Jr CR. 2011. Amphibian Conservation and Cryopreservation of Sperm, Cells and Tissues. *Cryopreservation un aquatic species*, 345-365.
- Canseco-Márquez L y Gutiérrez-Mayén. 2010. *Anfibios y reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Conabio, Fundación para la Reserva de la Biosfera Cuicatlán, A. C, y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 302 p.
- Cobb J y Handel MA. 1998. Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. In *seminars in cell & developmental biology*, 9: 445-450.
- Della TG, Trudeau VL, Gratwicke B, Evans M, Augustine L, Chia H, Bronikowski EJ, Murphy, JB y Comizzoli P. 2017. Effects of hormonal stimulation on the concentration

- and quality of excreted spermatozoa in the critically endangered *Panamanian golden frog* (*Atelopus zeteki*). *Theriogenology*, 91: 27–35.
- Dorantes A.C, Martínez y Guzmán. 2012. *Endocrinología clínica. El Manual Moderno*. Mexico, D.F, 96-98.
 - Duellman WE y Trueb L. 1994. *Biology of amphibians*. The Johns Hopkins University. Baltimore, USA, 670.
 - Duhon, S. T. 1992. Spawning Axolotls at UI: a ten-year history. 21, Indiana, USA: Axolotl newsletter, Vol. Summer. 29-36.
 - Farkas JE y Monaghan JR. 2015. Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. In *Salamanders in Regeneration Research*, Humana Press, New York, 27-46.
 - Figiel CR. 2013. Cryopreservation of sperm from the axolotl *Ambystoma mexicanum*: implications for conservation. *Herpetological Conservation and Biology*, 8: 748.
 - Flament S, Dumond H, Chardard D y Chesnel A. 2009. Lifelong testicular differentiation in *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Caudata). *Reproductive biology and endocrinology*, 7: 1-12.
 - Franchi E, Camatini M, y Decurtis I. 1982. Morphological evidence of a permeability barrier in urodele testis. *Journal of ultrastructure research*, 80: 253-263.
 - Frost SK, Epp LG y Robinson SJ. 1984. The pigmentary system of developing axolotls: I. A biochemical and structural analysis of chromatophores in wild-type axolotls. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 81: 105-120.
 - Furieri P. 1975. The peculiar morphology of the spermatozoon of *Bombina variegata* (L.). *Monitore Zoologico italiano-Italian Journal of Zoology*, 9: 185-201.
 - García A. 2016. Etapas del crecimiento del axolote. Disponible en: <http://www.blog.illustraciencia.info/2016/03/etapas-de-crecimiento-del-axolote-ana.html>
 - Gascon C. 2007. *Amphibian conservation action plan: proceedings IUCN/SSC Amphibian Conservation*.
 - Getchell TV. 1977. Analysis of intracellular recordings from salamander olfactory epithelium. *Brain Research*, 123: 275-286.
 - Gomendio M y Roldan ER. 2004. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *International Journal of Developmental Biology*, 52: 439-447.

- González MH y Montes OK. 2014. Manual de Procedimientos para el Manejo y Mantenimiento de la Colonia de Axolotes del Laboratorio de Restauración Ecológica, México: Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México. 34.
- González MH y Servín ZE. 2014. Manual básico para el cuidado en cautiverio del axolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). Laboratorio de Restauración ecológica, Instituto de Biología UNAM. 4-37.
- Grabowski SR y Pak WL. 1975. Intracellular recordings of rod responses during dark-adaptation. *The Journal of Physiology*, 247: 363-391.
- Gresens J. 2004. An introduction to the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Laboratorio animal*, 33: 41-47.
- Grier HJ. 1984. Testis structure and formation of spermatophores in the atherinomorph teleost *Horaichthys setnai*. *Copeia*, 833-839.
- Halliday T y Adler K. 2007. La gran enciclopedia de los anfibios y reptiles. Libsa, Madrid, 240.
- Hedrick PW y Kalinowski ST. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual review of ecology and systematics*, 139-162.
- Hollinger TG y Corton GL. 1980. Artificial fertilization of gametes from the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Gamete Research*, 3: 45-57.
- Humphrey RR. 1922. The multiple testis in urodeles. *The Biological Bulletin*, 43: 45-67.
- Humphrey RR. 1975. The axolotl, *Ambystoma mexicanum*. In *handbook of genetics* Springer, Boston, 3-17.
- IUCN. 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-1. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on 20 July 2022.
- Lazard L. 1976. Spermatogenesis and 3 β -HSDH activity in the testis of the axolotl. *Nature*, 264: 796-797.
- Lazard L. 1979. Steroidogenesis in axolotl testis. Histochemistry of two major enzymes related to cell type, spermatogenesis, and substrate. *General and Comparative Endocrinology*, 39: 381-387.
- Lee YH y Kwon AS. 1996. Ultrastructure of spermatozoa in urodela and primitive anura (Amphibia) with phylogenetic considerations, *The Korean society of systematic zoology*. 12.

- Licht P y McCreery BR. 1985. Regulation of secretion and physiological actions of gonadotropins in amphibians. *Current Trends in Comparative Endocrinology*, 1: 191.
- Licht P y Porter DA. 1987. Role of gonadotropin-releasing hormone in regulation of gonadotropin secretion from amphibian and reptilian pituitaries. In *hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles*, Springer, Boston, 61-85.
- Lofts B. 1974. Reproduction In Lofts B., editor. (Ed.), *Physiology of the amphibia*, New York y London, Academic Press. 2: 105–218.
- Lofts B. 1984. Amphibians. *Marshall's physiology of reproduction*, 1: 127-205.
- Lofts B. 1987. Testicular function. In *hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles*, Springer, Boston, 283-325.
- Lombardi J. 1998. *Comparative vertebrate reproduction*, Springer, Boston, 109-153.
- Mackay-Sim A y Shaman P. 1984. Topographic coding of odorant quality is maintained at different concentrations in the salamander olfactory epithelium. *Brain research*, 297: 207-216.
- Mansour N, Lahnsteiner, y Patzner RA. 2011. Collection of gametes from live axolotl, *Ambystoma mexicanum*, and standardization of *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 75: 354-361.
- McWilliams SR. 1992. Courtship behavior of the small-mouthed salamander (*Ambystoma texanum*): the effects of conspecific males on male mating tactics. *Behaviour*, 121: 1-19.
- Miltner MJ y Armstrong JB. 1983. Spermatogenesis in the Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Journal of Experimental Zoology*, 227: 255-263.
- Mocé E y Graham JK. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal reproduction science*, 105: 104-118.
- Moore FL. 1975. Spermatogenesis in larval *Ambystoma tigrinum*: Positive and negative interactions of FSH and testosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 26: 525-533.
- Nobel GK y Brady MK. 1933. Observations on the Life History of the Marbled Salamander, *Ambystoma opacum*. Gravenhurst, *Zoologica*, 11: 89-132.
- Noble GK y Weber JA. 1929. The spermatophores of *Desmognathus* and other plethodontid salamanders. *American Museum novitates*, 351.
- Norris DO y Carr JA. 1997. *Comparative aspects of vertebrate reproduction*. *Vertebrate endocrinology*, 3rd ed. San Diego: Academic Press, 410-495.

- Norris DO y López K. 2011. Hormones and Reproduction of Vertebrates. Amphibians. Elsevier Inc. San Diego-USA. 2.
- Norris DO, Norman MF, Pancak MK y Duvall D. 1985. Seasonal variations in spermatogenesis, testicular weights, vasa deferentia, and androgen levels in neotenic male tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. General and comparative endocrinology, 60: 51-57.
- Page RB y Voss SR. 2009. Induction of metamorphosis in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). Cold Spring Harbor Protocols, 8.
- Parra-Olea G, Flores-Villela O y Mendoza-Almeralla C. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. Revista mexicana de biodiversidad, 85: 460-466.
- Pough FH, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitzky AH y Wells KD. 2001. Reproduction and life history. Herpetology. New Jersey: Princet Hall, 228-259.
- Propper CR. 2011. Testicular structure and control of sperm development in amphibians. In hormones and reproduction of vertebrates. Academic Press. 39-53.
- Pudney J, Canick JA, Mak P y Callard GV. 1983. The differentiation of Leydig cells, steroidogenesis, and the spermatogenetic wave in the testis of *Necturus maculosus*. General and Comparative Endocrinology, 50: 43-66.
- Pudney J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. Microscopy research and technique, 32: 459-497.
- Rivera-Pacheco J, Herrera-Barragán J, León-Galván M, Ocampo-Cervantes J, Pérez-Rivero J y Gual-Sill F. 2021. Criopreservación espermática de *Ambystoma mexicanum* (Shaw y Nodder, 1798). Abanico veterinario, 11.
- Roldán ER y Garde JJ. 2004. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. Los Retos Medioambientales del siglo XXI. La conservación de la Biodiversidad en España, Fundacion BBVA, Bilbao. 283-307.
- Russell LD, Brandon RA, Zalisko EJ, y Martan J. 1981. Spermatophores of the salamander *Ambystoma texanum*. Tissue and Cell, 13: 609-621.
- Salthe SN. 1967. Courtship patterns and the phylogeny of the urodeles. Copeia, 100-117.
- San Mauro D y Zardoya R. 2014. Las cecilias, los anfibios desconocidos. Revista Museo nacional de Ciencias Naturales. Natural Mente. Madrid, 3: 24-29.
- San Mauro D. 2012. Anfibios. El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos, 40: 400-407.

- Sarukhán J, Koleff P, Carabias J, Soberón J, Dirzo R, Llorente Bousquets J, Halffter G, González R, March I, Mohar A, Anta S, de la Maza J. 2009. Capital Natural de México: Conocimiento actual, evaluación y perspectivas de Sustentabilidad. Síntesis. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 100 p.
- Sasaki T, Kamimura S, Takai H, Watanabe A y Otinake K. 2002. The activity for the induction of the sperm acrosome reaction localises in the outer layers and exists in the high-molecular-weight components of the egg-jelly of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zygote*, 10: 1-9.
- Schindelmeiser J, Greven H y Bergmann M. 1983. The immature part of the testis in *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia, Urodela). *Archivum histologicum japonicum*, 46: 159-172.
- SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 30 de diciembre de 2010.
- Servín E. 2011. Manual para el mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al axolotl de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el zoológico de Chapultepec. Tesis de licenciatura, Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 205 pp.
- Shishova NR, Uteshev VK, Kaurova SA, Browne RK y Gakhova EN. 2011. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology*, 75: 220-232.
- Siegel DS, Sever DM y Aldridge RD. 2010. The pelvic kidney of male *Ambystoma maculatum* (Amphibia, Urodela, Ambystomatidae) with special reference to the sexual collecting ducts. *Journal of Morphology*, 271: 1422-1439.
- Smith SC. 1996. Pattern formation in the urodele mechanoreceptive lateral line: what features can be exploited for the study of development and evolution? *The International Journal of Developmental Biology*, 40: 727-733.
- Trauth SE. 1983. Reproductive biology and spermathecal anatomy of the dwarf salamander (*Eurycea quadridigitata*) in Alabama. *Herpetologica*, 9-15.
- Uribe MCA y Mejía-Roa V. 2014. Testicular structure and germ cells morphology in salamanders. *Spermatogenesis*, 4.

- Uribe MCA, Rios GG y Brandon RA. 1994. Spermatogenesis in the urodele *Ambystoma dumerilii*. *Journal of Morphology*, 222: 287-299.
- Uribe MCA., Gómez, R. G., y López Arriaga, C. 1991. Cambios morfológicos del testículo de *Ambystoma dumerilii* durante un ciclo anual. *Bol Soc Herpetol Mex*, 3, 13-8.
- Valdivieso D y Tamsitt JR. 1965. Reproduction in a neotropical salamander, *Bolitoglossa adspersa* (Peters). *Herpetologica*, 21: 228-236.
- Van Tienhoven A. 1968. Reproductive physiology of vertebrates. Reproductive physiology of vertebrates. Michigan.
- Vitt LJ y Caldwell JP. 2013. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. Academic press.
- Voss SR, Epperlein HH y Tanaka EM. 2009. *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. Cold Spring Harbor Protocols.
- Wakimoto BT. 1979. DNA synthesis after polyspermic fertilization in the axolotl. *Journal of embryology and experimental morphology*, 52: 39–48.
- Waloga G y Pak WL. 1978. Ionic mechanism for the generation of horizontal cell potentials in isolated axolotl retina. *The Journal of general physiology*, 71: 69-92.
- Watanabe T, Itoh T, Watanabe A y Onitake K. 2003. Characteristics of sperm motility induced on the egg-jelly in the internal fertilization of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zoological science*, 20: 345-352.
- White WF, Hedlund MT, Weber GF, Rippel R, Johnson ES y Wilber JF. 1974. The pineal gland: a supplemental source of hypothalamic-releasing hormones. *Endocrinology*, 94: 1422-1426.
- Wortham Jr JE, Brandon RA y Martan J. 1977. Comparative morphology of some plethodontid salamander spermatozoa. *Copeia*, 666-680.
- Wortham JWE, Murphy JA, Martan J. y Brandon RA. 1982. Scanning electron microscopy of some salamander spermatozoa. *Copeia*, 1982: 52-60.

Anexo 1. Técnica de necropsia en ajolote macho de Xochimilco

Identificación del animal

Fecha: septiembre

Especie: *Ambystoma mexicanum*

Sexo: Macho

Tamaño. Longitud hocico-cloaca: 8 cm y hocico-cola: 15 cm

Fecha de muerte: septiembre-2020 Edad: 3 años

Estado de descomposición a la realización de necropsia: Cadáver intermedio
(muerto entre 24 a 48 horas)

Identificación del animal: E15638

Procedencia: Ajolotario de la FES Iztacala (UNAM)

Causa de muerte:

espontánea () Eutanasia

Exámenes Requeridos

citología () Biopsia

Revisión externa

Se colocó al organismo en decúbito dorsal y ventral antes de la disección. Se revisó desde la cabeza hasta la punta de la cola notando la pigmentación normal del organismo. A la revisión externa fue de gran importancia detectar la presencia de ectoparásitos, hongos, amputación de miembros o branquias y el tamaño de éstas, lesiones por burbujas, se realizó la revisión de los miembros y sus dedos, la integridad de la piel, y la identificación del sexo mediante la observación de caracteres sexuales de la especie (Figuras 1 y 2).



Figura 1 y 2. Revisión externa. Decúbito dorsal: color verde moteado café, sin presencia de ectoparásitos, branquias externas numerosas sin la presencia de hongos. Revisión caudal: color verde moteado café, sin presencia de ectoparásitos, pigmentación más oscura en la región de la cloaca, se anota la medida del ajolote cabeza- cola y cabeza-cloaca (Imagen tomada por Miguel Ángel Linares, 2022).

En la revisión de la cabeza se inspeccionaron los ojos y su estado, la cavidad oral que no tuviera algún objeto extraño atorado. La revisión de las extremidades anteriores y posteriores, es de importancia la integridad y coloración. Se finalizó la inspección externa al identificar mediante las características secundarias el sexo del ajolote (Figs 3 a 7).



Figura 3 y 4. Revisión de la cabeza y branquias externas. (sin presencia de hongo ni lesiones, branquias disminuidas ni pérdida en la continuidad de la piel) (Imagen tomada por Miguel Ángel Linares, 2022).

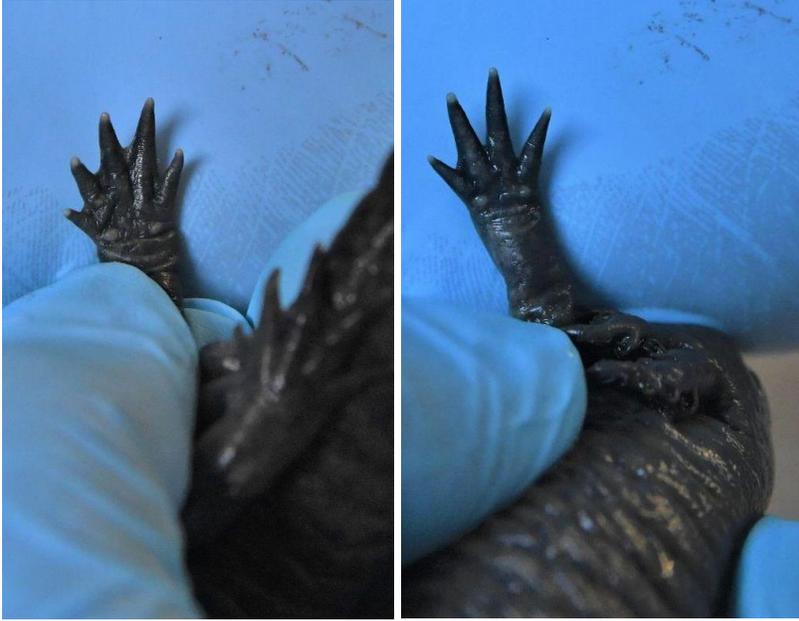
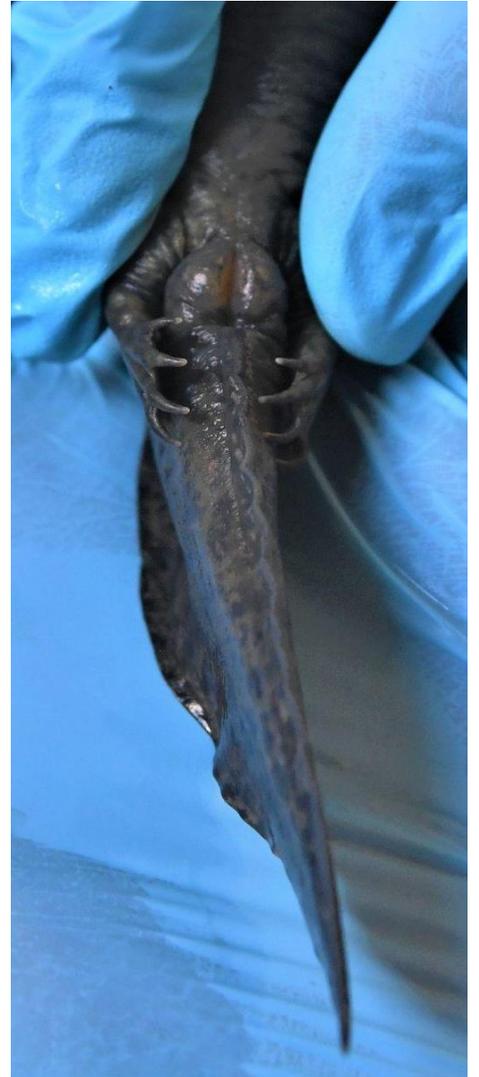


Figura 5 y 6. Se revisaron los miembros anteriores con cuatro dedos y posteriores con cinco dedos.

Figura 7 se observaron las glándulas cloacales prominentes por lo que se identificó que es macho (Imagen tomada por Miguel Ángel Linares, 2022).



Incisión primaria

A la incisión primaria se levantó la piel con la navaja del bisturí para retirar la piel del tejido subcutáneo y músculos, la piel de los anfibios es bastante delgada por lo que se debe tener cuidado de no entrar a la cavidad celómica directamente. Se dio la apertura mediante la línea media de forma que quedo levantada en forma de libro. El paso a través de la barrera celómica se puede dar de forma horizontal por la línea media desde la base de la cabeza hasta la región de la cloaca evitando el daño a los órganos internos, en este proceso se revisó la integridad de los diferentes estratos del tejido (Figuras 8 y 9).



Figura 8 y 9. Incisión primaria en la que se retiró la piel de los músculos. Se expuso la cavidad celómica donde se observaron los órganos (Imagen tomada por Miguel Ángel Linares, 2022).

De esta forma se identificaron los órganos en su posición original, la revisión de los órganos implica su tamaño, integridad, coloración la presencia de adherencias (Figuras 10 y 11).



Figura 10 y 11. Al abrir la cavidad celómica se identificaron los órganos (Imagen tomada por Miguel Ángel Linares, 2022; Olgún y Torres, 2019).

Enseguida, se identificaron los órganos internos:

- Corazón: tricavitario, 2 atrios y 1 ventrículo
- Pulmones: estas especies neoténicas conservan pulmones y branquias, sacos simples
- Tubo digestivo corto
- Hígado: bilobulado, alargado y bordes marcados
- Riñones: relación bastante cercana a los testículos
- Testículos pareados
- Glándulas cloacales

Incisión secundaria

Al retirar los órganos se realizó una doble ligadura en la zona del esófago y una doble ligadura en el final del recto para posteriormente cortar y poder retirar el aparato digestivo, corazón y pulmones completamente y proceder a la colecta de órganos, su fijación adecuada siendo 1 parte de muestra y 10 de formol (Figura 12 y 13).

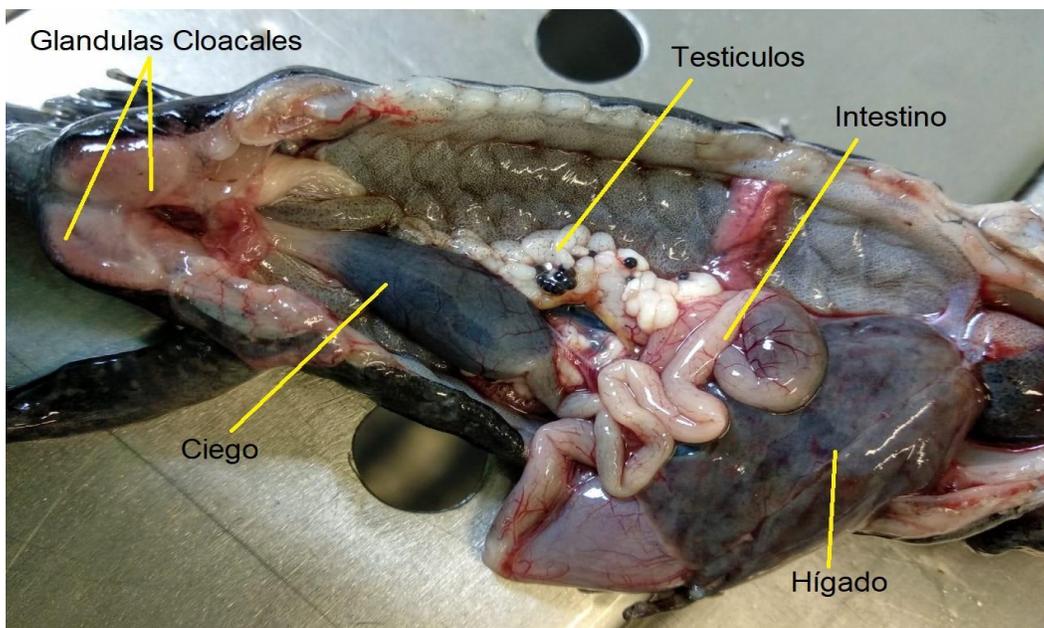


Figura 12. Exposición los testículos con múltiples lobulaciones las cuales están ligadas a la edad del ajolote siendo los más maduros los que tienen más lobulaciones (Imagen tomada por Olguín y Torres, 2019).



Figura 13. Se retiraron los órganos reproductivos para su disección individual, recolecta y envío al laboratorio (Imagen tomada por Olgún y Torres, 2019).

Al retirar aparato digestivo y respiratorio, se observaron los testículos juntos al riñón en la parte dorsal de la cavidad celómica.

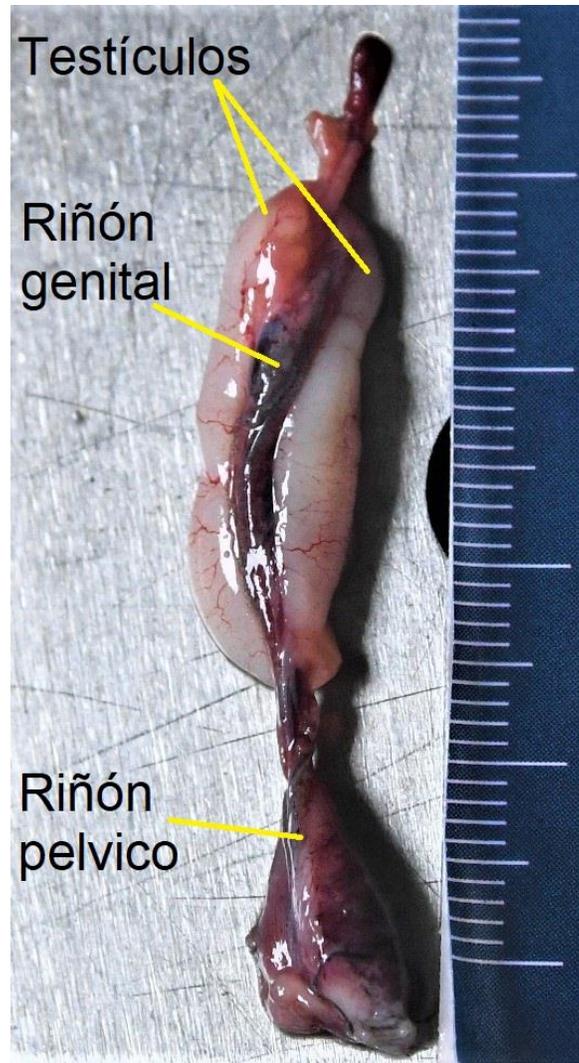
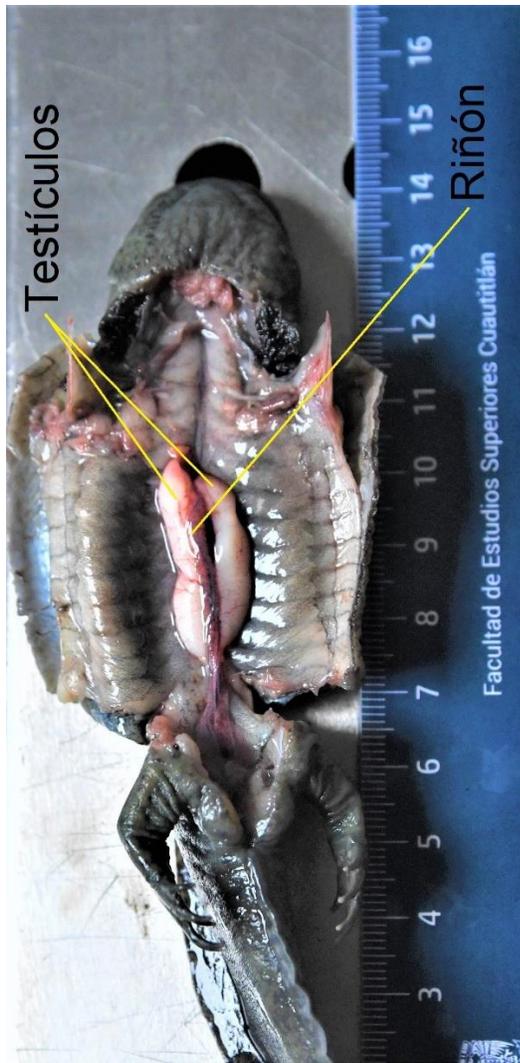


Figura 14. Se observó el cuerpo de ajolote joven sin vísceras, donde se identificaron los testículos lisos color blanco perlado y su conexión estrecha con el riñón. Figura 15. Se distinguieron los testículos de ajolote joven y su conexión con el riñón y sus 2 zonas; genital y pélvico (Imagen tomada por Miguel Ángel Linares, 2022).