



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE ANFIBIOS URODELOS”

T E S I S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

JUAN CARLOS TAMARIZ ARAGON

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. CARMEN ÁLVAREZ RODRÍGUEZ



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

Introducción	4
Antecedentes	6
Justificación	9
Objetivos	10
Objetivo general	
Objetivos particulares	
Metodología	10
Resultados	11
Diferenciación gonadal	11
Diferenciación sexual genotípica	11
Diferenciación sexual gonadal	11
Por temperatura	12
Por hormonas	12
Esteroides	12
Estrógenos	13
Estradiol	13
Determinación de las células germinales primordiales	13
Por determinantes citoplasmáticos	13
Por interacciones celulares	14
Determinación y migración de CGPs	15
Anuros	15
Urodelos	16
Morfología de la gónada	17
Espermatogénesis	18

Fecundación	20
Anuros	20
Urodelos	21
Función de la gelatina del huevo	21
Urodelos	22
Movilidad espermática	22
Reacción acrosomal	23
Función de la membrana vitelina	24
Primera unión del espermatozoide	24
Partenogénesis en urodelos	25
Discusión	26
Conclusiones	34
Bibliografía	35

INTRODUCCIÓN

El avance de la ciencia requiere de organismos modelo que le ayuden a comprobar sus hipótesis, siendo los anfibios seleccionados por algunas características de su desarrollo. La mayoría de los anfibios son de fecundación externa; su huevo es transparente y grande; su desarrollo embrionario y generacional es corto; además se pueden cultivar en instalaciones sencillas como peceras.

En general los anfibios son suaves y húmedos, a excepción de las cecilias, que tienen pequeñas escamas en los pliegues exteriores del cuerpo, no obstante, al contrario que los reptiles, los anfibios carecen de escamas y tienen que permanecer en las inmediaciones del agua para sobrevivir. Hay tres ordenes existentes de anfibios; Gimnofiones o Apodos (cecilias), anuros (ranas y sapos) y urodelos (salamandras, tritones y sirenas) (Duellman, 1986, Sever, 2002). Los eventos reproductivos han sido más estudiados en los anuros, el conocimiento sobre estos eventos se toma como referencia para el desarrollo de la reproducción de los urodelos.

La capacidad de los urodelos para regenerar algunas partes de su cuerpo, es hoy en día de gran interés para la investigación en biología del desarrollo en especial para las ciencias biomédicas, por lo cual se están implementando nuevas técnicas para poder tenerlos en cautiverio bajo condiciones controladas. Además, en algunos anfibios urodelos se presenta el fenómeno de neotenia, donde un estado larval (ajolote) puede madurar sexualmente.

Por otra parte, la reproducción, mantenimiento y manejo de los ajolotes en cautiverio, es relativamente sencillo, por lo cual resultaría adecuada la utilización de estos organismos en las investigaciones sobre biología del desarrollo y su aplicación en la docencia. Los urodelos además tienen la capacidad para producir en una sola puesta de 300 a 600 huevos y en algunos casos se llegan a reportar hasta 1000 huevos por puesta (Duellman, 1986)

La realización de investigaciones que vayan enfocadas a conocer más de la biología de la reproducción de los urodelos como la diferenciación gonadal, la determinación de las células germinales y la fecundación, no sólo repercutirá positivamente en el campo de las ciencias biológicas, sino será de gran utilidad para quienes los urodelos representan una fuente de ingresos económicos, así como también en el campo de la ecología debido a que su hábitat está desapareciendo encontrándose en peligro de extinción.

Aunque los estudios sobre la biología reproductiva de los urodelos es aún muy escasa, es de gran importancia reunir esta información, analizarla y compararla con la de otros organismos modelo, principalmente si se toma en cuenta, que no se tiene información que analice estos tópicos para saber que tanto se ha avanzado en el conocimiento de los eventos reproductivos de estos anfibios.

ANTECEDENTES

En los vertebrados existen diferentes formas para determinar el sexo. En los mamíferos y en las aves, la determinación sexual es estrictamente genética. En los mamíferos la hembra es homogamética, con dos cromosomas sexuales iguales (XX), mientras que en el macho es heterogamético, presentando dos cromosomas sexuales diferentes (XY). En las aves la situación está invertida, el macho tiene dos cromosomas iguales (ZZ), mientras que en la hembra el par de cromosomas es diferente (ZW) (Gilbert, 2005).

En los mamíferos cuando el embrión es XY, los cordones sexuales primarios que se forman del epitelio celómico de la cresta genital proliferan hasta penetrar hasta el mesénquima del primordio gonadal y posteriormente las células germinales, que migraron a la gónada, penetran a éstos. La parte distal de estos cordones se fusionarán unos con otros y formarán una red de cordones internos, la *rete testis*, conforme la gónada prosigue su desarrollo se forman otras estructuras propias del testículo. En las gónadas indiferenciadas XX, los cordones sexuales primarios degeneran. El epitelio germinal pronto produce un nuevo juego de cordones sexuales que permanecen cerca de la corteza de la gónada, estos cordones se fragmentan y se forman grupos de células epiteliales que rodean a las células germinales para formar el folículo (Gilbert, 2005).

Por otra parte, varios genes han sido encontrados cuya función es necesaria para la diferenciación gonadal normal, principalmente en roedores. Sry, es responsable de la inducción del testículo en conjunto con Sox9 (Meyers-Wallen, 2005).

En los anfibios se han establecido dos modelos de diferenciación sexual, en algunos concuerda con el modelo de mamíferos y otros con el de aves. En *Xenopus laevis* como en *Rana pipiens* y *Bufo vulgaris* se ha reportado que el macho es homocigoto presentándose los cromosomas ZZ mientras que la hembra es heterocigota siendo los cromosomas ZW (Van Tienhoven, 1983, Osawa *et al.*, 2005).

La línea celular que da origen a los gametos son las llamadas células germinales primordiales (CGPs), cuyo origen es determinado de diferente forma en los animales en sus primeras etapas del desarrollo. Ha sido claramente establecido que en organismos como los ranas, nemátodos, moscas y pollos las CGPs son especificadas por determinantes citoplasmáticos (proteínas específicas y ARNm,

a ambos se les llama plasma germinal) en el ovocito, en anfibios urodelos, se dice que es por fenómeno de inducción la formación de CGPs (Johnson *et al.*, 2003).

Durante la fecundación se fusionan el espermatozoide y el ovocito/óvulo para crear un nuevo individuo con un genoma que es derivado de ambos padres. Por lo tanto, la fecundación implica por una parte, la combinación genes (sexualidad) derivados a partir de ambos progenitores y posteriormente, la creación de un nuevo organismo es decir, la reproducción (Gilbert, 2005).

En los anfibios, muchos anuros presentan fecundación externa mientras que en la mayoría de los urodelos su fecundación es interna. Las hembras de urodelos toman con los labios cloacales el espermátforo “eyaculado” por los machos en el agua. Los espermatozoides empaquetados en el espermátforo son liberados dentro de la cloaca y son almacenados en la espermateca. Después de un corto o largo periodo de almacén fecundan a los óvulos en la cloaca, que posteriormente serán liberados en el medio acuático (Gilbert, 2005).

Los factores que regulan la movilidad del espermatozoide son únicos en cada especie.

En el arenque, *Clupea pallasii*, se han aislado dos factores del huevo, uno de los cuales es un péptido que activa al espermatozoide, mientras que el otro es una glucoproteína que inicia la movilidad de los mismos (Watanabe *et al.*, 2003).

Por otra parte, en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, un péptido que activa los espermatozoides, *speract*, es liberado de la gelatina del huevo (Watanabe *et al.*, 2003). Así también, un péptido con función quimiotáctica *resact* se ha aislado de la gelatina del huevo del erizo de mar *Arbacia punctulata* (Suzuki and Garbers, 1984, Ward *et al.*, 1985).

La gelatina del huevo (GEL H) de anfibios, se compone de estructuras fibrosas que forman varias subcapas, que son secretadas en la parte posterior del oviducto, *pars convulata*. Se sabe que los carbohidratos son diferentes entre las subcapas de la GEL H, sugiriendo que cada capa juega una función distinta en la fecundación y en el desarrollo (Carroll *et al.*, 1992, Watanabe y Onitake, 2002.).

La proteína ZPC es homóloga a la proteína ZP3 de ratón (así como en peces y mamíferos) por ser el sitio de unión del espermatozoide e inducir la reacción acrosomal en la zona pelúcida. La proteína ZPC se cree que contribuye a la unión del espermatozoide en *Xenopus laevis*, como en muchas

especies. La reacción acrosómica en anuros es inducida cerca o en la membrana vitelina en *Bufo* y *Xenopus*; sugiriendo que la sustancia inductora de la reacción acrosomal es agregada a la membrana vitelina antes de ser rodeada por la GEL H (Watanabe y Onitake, 2002).

JUSTIFICACIÓN

Varias especies de urodelos han sido utilizadas como modelos en el estudio de la biología del desarrollo, desde los experimentos de trasplante que realizaron Spemann y Mangold en 1924, con el que obtuvieron el premio Nobel con su hipótesis del organizador primario. Los anfibios urodelos se han venido usando en diversas áreas de la biología del desarrollo. Sin embargo *Xenopus laevis* es el modelo por excelencia en diversas áreas de la Biología del desarrollo.

El avance de la ciencias biológicas requiere de organismos modelo que ayuden a comprobar sus hipótesis, constituyendo los anfibios urodelos, uno de los modelos alternativos, debido a sus características de desarrollo; un tiempo corto entre generaciones y su facilidad de cultivo.

Además, en los urodelos en una sola puesta se pueden obtener hasta 1000 embriones, por lo cual son ideales para la realización de prácticas de laboratorio de biología de la reproducción, así como también en otras áreas de las ciencias biológicas.

Debido a que las investigaciones sobre aspectos reproductivos en organismos superiores son difíciles de estudiar, dichos tópicos han sido enfocados principalmente en organismos de fecundación externa como los anfibios anuros (ranas y sapos), descuidando a organismos como los anfibios urodelos que pueden aportar conocimientos que ayuden a entender lo que sucede en otros vertebrados que también son de fecundación interna.

Debido a que no se cuenta con información bibliográfica que analice qué tanto se ha avanzado en el estudio de las características reproductivas de urodelos, sería muy útil que la investigación se enfocara sobre aspectos como diferenciación gonadal, formación de linaje germinal y fecundación, ya que en México hay pocos estudios sobre estos tópicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer con base en una revisión bibliográfica los aspectos reproductivos hasta hoy estudiados de anfibios urodelos.

Objetivos particulares

Revisar cómo es la diferenciación gonadal y la formación de linaje germinal en los anfibios urodelos.

Describir los principales eventos de la fecundación en los anfibios urodelos.

Comparar la diferenciación gonadal, formación del linaje germinal y fecundación de los anfibios urodelos con la de otros vertebrados modelos de estudio para dichos procesos.

METODOLOGÍA.

Para cumplir con los objetivos planteados, se hizo una recopilación de libros, tesis, fuentes electrónicas formales de información, revistas científicas nacionales e internacionales relacionadas con las bases biológicas del conocimiento del linaje germinal, diferenciación gonadal y fecundación en anfibios urodelos.

Los artículos o información recopilada se leyó y analizó para obtener la información necesaria con respecto al tema, se elaboraron cuadros, esquemas y/o diagramas comparativos entre anfibios urodelos y algunas especies modelo de estudio para dichos procesos.

RESULTADOS

Diferenciación gonadal

Los animales han adoptado múltiples estrategias para determinar el sexo. En general, hay dos mecanismos en vertebrados: determinación sexual genotípica (sistema XX/XY o ZZ/ZW) y determinación sexual dependiente de temperatura. Aunque la determinación sexual esta bajo control genético, la diferenciación sexual de las gónadas puede ser modificada por efecto de la temperatura u hormonas esteroides (Chardard *et al.*, 1995).

En los mamíferos se han encontrado varios genes necesarios para la diferenciación gonadal normal. En el ratón, el gen *Sry* es responsable de transformar el tejido somático de la gónada indiferenciada en testículo. Sin embargo, la presencia del gen *Sry* no es suficiente para el desarrollo de los testículos, se requiere de la presencia del gen *Sox9* que ayuda también a la degeneración de los conductos de Müller (Gilbert, 2005, Meyers-Wallen, 2005).

La expresión del gen *Lhx9* en mamíferos, es requerido para la formación de la gónada bipotencial (Mazaud *et al.*, 2002) en conjunto con el gen *WT1*. Ambos genes activan la expresión del gen *Sf1* que es esencial para la formación de la gónada bipotencial y parece participar en la masculinización de las células de Leyding y Sertoli (Wilhelm y Englert, 2002, Park *et al.*, 2005).

En aves, el gen *Dmrt1* en el cromosoma Z de pollos es expresado en la gónada indiferenciada antes de la determinación sexual (Osawa *et al.*, 2005). *Dmrt1* es esencial para la diferenciación de testículos y podría estar implicado en la diferenciación gonadal de *Xenopus laevis* (Osawa *et al.*, 2005).

En los anfibios el mecanismo de diferenciación sexual general, concuerda en algunos con el modelo de mamíferos y en otros con el de aves. En algunos anuros como *Xenopus laevis*, y *Rana pipiens* así como también en urodelos como *Ambystoma* se ha reportado que el macho es homocigoto (ZZ), mientras que la hembra es heterocigota (ZW) (Van Tienhoven, 1983, Osawa *et al.*, 2005).

En muchas especies de reptiles, incluyendo lagartos, cocodrilos y tortugas la determinación sexual es dependiente de la temperatura (Chardard *et al.*, 1995).

Generalmente, al criar larvas de algunos anfibios a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ$) se obtiene una relación de 1 macho: 1 hembra; sin embargo, al subir o bajar la temperatura esta relación cambia (Chardard *et al.*, 1995). El cambio de sexo funcional por medio de la temperatura en urodelos se puede ver en dos especies de *Pleurodeles*, *P. waltl* y *P. poireti*. Al mantener las larvas a una temperatura de 32° el resultado es de 100% machos funcionales (Flament *et al.*, 2003). El tratamiento con temperatura en urodelos, debe ocurrir en el llamado “periodo termo sensitivo” que va del estadio 42 al estadio 54 en *Pleurodeles waltl*. El tratamiento con estradiol en machos (ZZ) hace que se diferencien en hembras funcionales, contrarrestando los efectos de masculinización de la alta temperatura (ver figura 1) (Flament *et al.*, 2003).

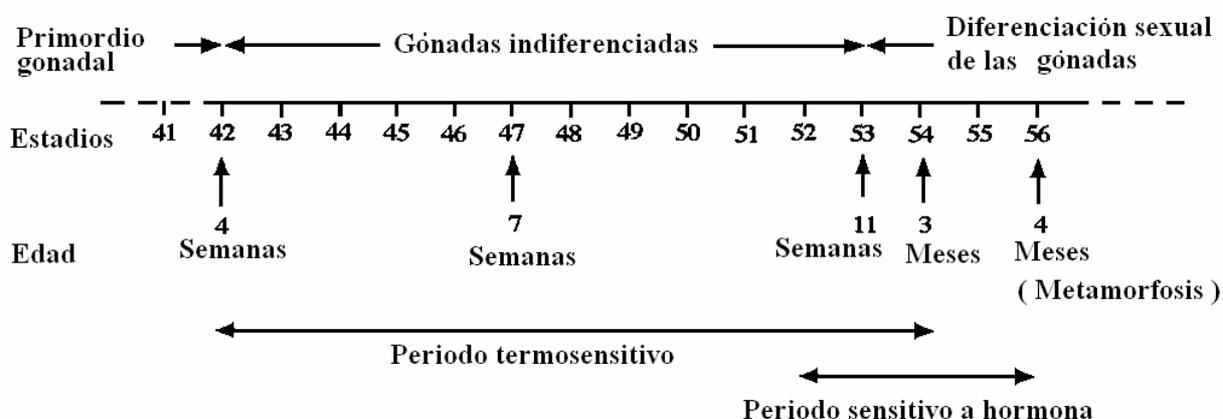


Figura 1. Desarrollo de *Pleurodeles waltl*: Principales eventos del desarrollo gonadal. La evolución de las gónadas se presenta en tres eventos: Primordio gonadal, gónadas indiferenciadas y diferenciación gonadal correspondiendo a testículos u ovarios. El cambio del sexo ocurre con tratamiento de calor en larvas hembras (ZW) del estadio 42 al estadio 54 al cual se le llama periodo termo sensitivo o también, el cambio del sexo ocurre tratando a larvas machos (ZZ) con estrógenos durante el periodo sensible a hormona (del estadio 52 al estadio 56) (Modificado de Flament *et al.*, 2003).

Los esteroides también juegan un papel clave en las funciones reproductivas en las especies de vertebrados y una diferenciación sexual en vertebrados no mamíferos. Los estrógenos son sintetizados por una enzima compleja denominada aromatasa (Kuntz *et al.*, 2004).

En estudios con larvas de anfibios anuros la hormona estradiol a altas dosis induce 100 % machos, mientras que a bajas dosis induce 100% hembras. Mientras que en salamandras como en *Ambystoma punctatum*, los datos encontrados muestran que el tratamiento con estrógenos a machos en estado larval induce desarrollo de hembras (Hayes, 1998., Chardard *et al.*, 2003).

En la hembra de la salamandra *P. waltl* se ha detectado una actividad aromatasa en sus gónadas, aumentado conforme avanza su desarrollo larval, mientras que cuando se bloquea dicha actividad el resultado es el desarrollo de testículos. Sugiriendo que los estrógenos podrían estar implicados en la diferenciación sexual gonadal de hembras en esta especie (Hayes, 1998., Flament *et al.*, 2003, Chardard *et al.*, 2003).

Determinación de las células germinales primordiales.

La línea celular que da origen a los gametos es la de las llamadas células germinales primordiales (CGPs), cuyo origen es determinado de diferente forma en los animales en sus primeras etapas del desarrollo. Los procesos por los cuales los gametos continúan su desarrollo hasta su maduración en el caso de tratarse de los óvulos es la ovogénesis en las hembras, mientras que en los machos es la espermatogénesis para formar espermatozoides.

La línea germinal es establecida en los embriones de los animales con la formación de CGPs, que darán origen a los gametos. Existen dos modos de determinar las CGPs en los embriones de animales (Johnson *et al.*, 2003), una por determinantes citoplasmáticos y otra por interacciones celulares.

En organismos como los nemátodos, moscas, ranas y pollos las CGPs son especificadas por determinantes citoplasmáticos que son denominados en su conjunto como plasma germinal en el ovocito. El plasma germinal, contiene un gran número de mitocondrias, ribosomas y estructuras llamadas gránulos germinales, posteriormente, el plasma germinal será empaquetado por células específicas durante la segmentación (Johnson *et al.*, 2003, Gilbert, 2005). El plasma germinal de anfibios anuros (ranas y sapos) se encuentra alrededor del polo vegetal del ovocito, durante la segmentación es llevado hacia el polo animal del citoplasma, (figura 2). Las CGPs se concentran en la región posterior del intestino larval así como en la cavidad abdominal en formación, migrando a lo largo del lado dorsal del intestino y luego a lo largo de la pared abdominal entrando a la cresta genital (Johnson *et al.*, 2001, Gilbert, 2005).

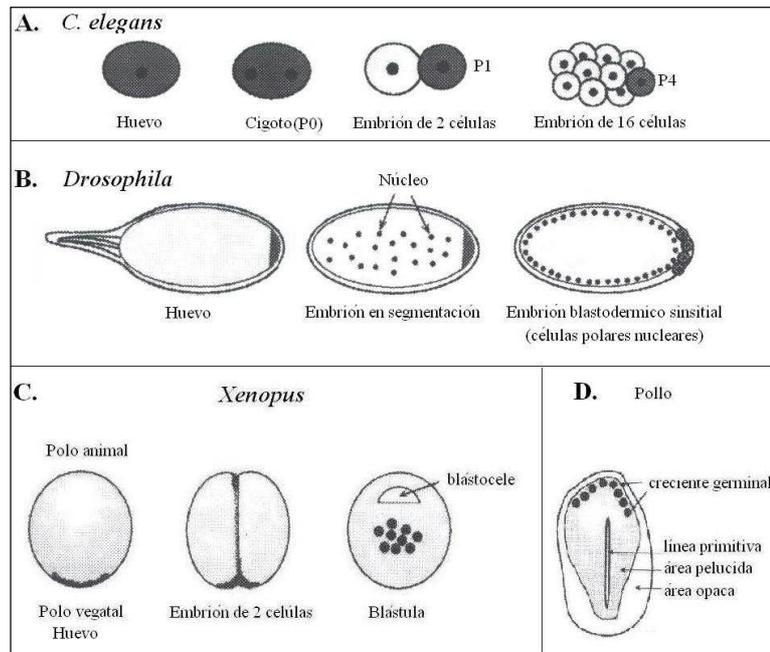


Figura 2. Origen de las CGPs en diferentes organismos. En **A**, los gránulos P en *C. elegans* se distribuyen a lo largo del huevo maduro. Se separan del linaje celular somático a través de una serie de divisiones desiguales que producen blátomeras P1 en el embrión de 2 células y el linaje germinal constituye la blátomera P4. En **B**, el plasma polar de *Drosophila* es localizado en el extremo posterior del huevo maduro. El núcleo llega al extremo posterior del embrión, formando células polares que incluyen plasma polar. En **C**, el plasma germinal de *Xenopus* se localiza en el polo vegetal del ovocito maduro. Este se divide en proporciones iguales entre la primera y la cuarta blátomera. En el estadio de blástula, el plasma germinal es encontrada en aproximadamente 20 células que están posicionadas en el piso del blastocele. Y en **D**, las CGPs primeramente se localizan en el estadio de blastodisco. Estas son principalmente encontradas en la región llamada creciente germinal, que está localizada anterior al embrión propiamente (Modificado de Matova y Cooley, 2001).

En los casos tales como las salamandras y mamíferos, las células germinales son determinadas por interacciones entre las células vecinas, no se ha localizado un plasma germinal en los ovocitos de salamandras. Las CGPs de embriones de anfibios urodelos tienen un origen de la placa lateral del mesodermo que involuciona a través del labio ventral del blastoporo (Johnson *et al.*, 2003). La interacción de las células del endodermo dorsal y células del hemisferio animal crean las condiciones necesarias para formar células germinales en las áreas que involucionan a través del labio dorsal (Ikenishi y Nieuwkoop, 1978). En otros estudios se ha encontrado que en varias especies de urodelos las CGPs derivan de las células ubicadas en la zona marginal ventral (ZMV) de embriones en estadio de gástrula; estas células más tarde migran sobre el labio ventral del blastoporo en asociación con el mesodermo presuntivo lateral posterior (Johnson *et al.*, 2001). Así en las salamandras, las CGPs son formadas por inducción en la región del mesodermo, posteriormente siguen un camino hacia las gónadas, mientras que en el ratón el ectodermo extraembrionario induce a las células epiblasticas vecinales para convertirse en precursores de las CGPs y en el mesodermo extraembrionario (Bendel-Stenzel *et al.*, 1998), ver figura 3.

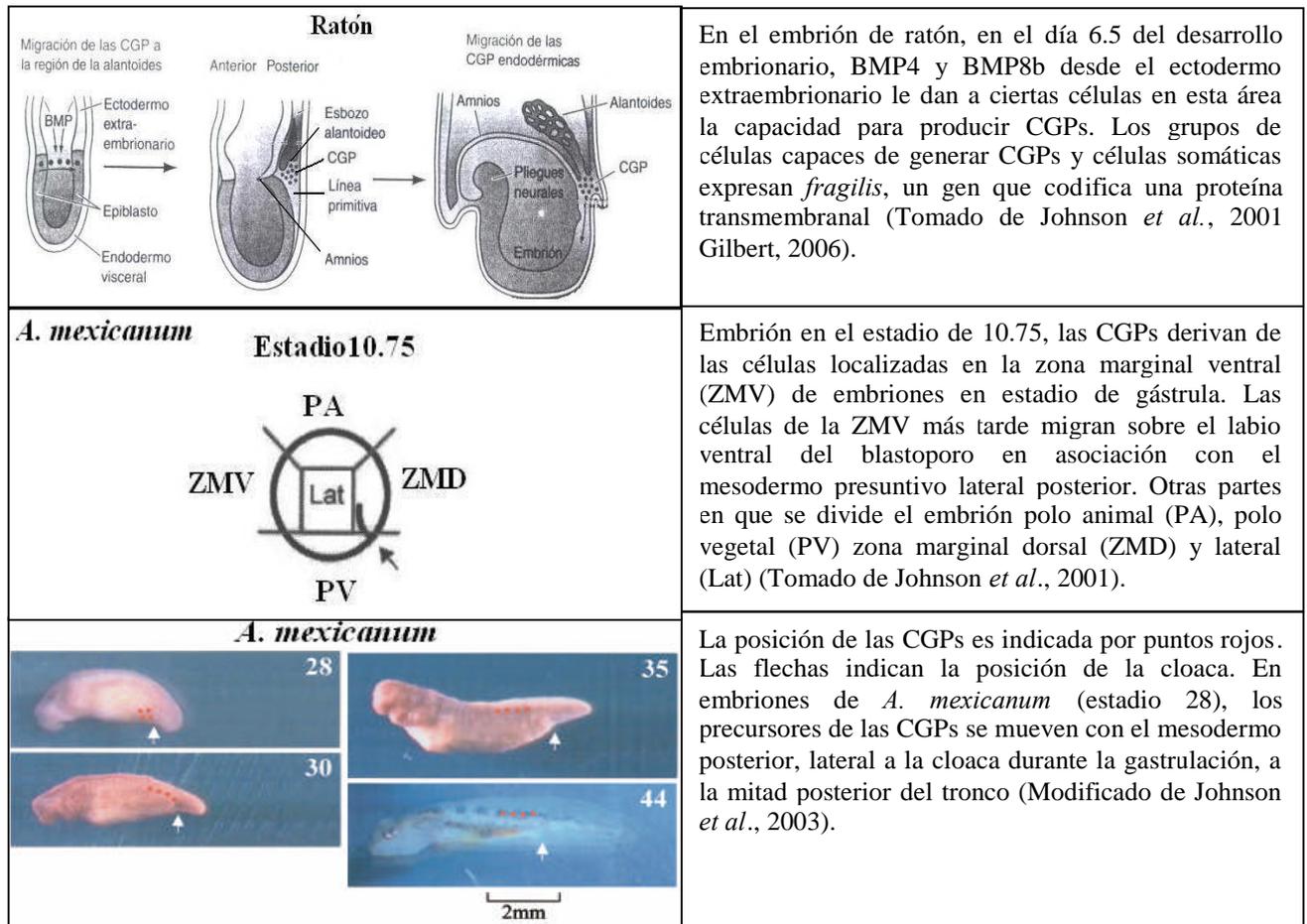


Figura 3. Se muestra el origen y migración de las CGPs de mamíferos y de anfibios urodelos.

Determinación y migración de CGPs en los anfibios.

En los anfibios anuros se identifica morfológicamente el plasma germinal por la presencia de grandes poblaciones de mitocondrias (se especula que estos organelos portan los determinantes de la línea germinal) unidas a la membrana celular con una apariencia de gránulos fibrosos electro-densos llamados gránulos germinales, son conocidos también como gránulos P en el nematodo *C. elegans*, gránulos polares en *Drosophila* y gránulos germinales en *Xenopus*, ver figura 2 (Matova y Cooley, 2001).

En el anfibio urodelo *Ambystoma mexicanum*, grandes gránulos germinales han sido observados después de la fecundación en la zona marginal dorsal del embrión, en donde se propone que las interacciones inducen la determinación de las CGPs. Con estas observaciones se sugiere que podría

haber una contribución materna por la presencia de grandes poblaciones de mitocondrias, para inducir los eventos requeridos en la formación de las CGPs en esta especie (Matova y Cooley, 2001).

Por otra parte, estructuras correspondientes a gránulos germinales similares de anfibios anuros o sus derivados se reconocen en las CGPs de *A. mexicanum* en el estadio 40 y aumentan hasta el estadio 46 (Tamori *et al.*, 2004). Sin embargo, el plasma germinal como tal no ha sido encontrado en ovocitos o huevos de anfibios urodelos.

En el ratón se ha identificado y caracterizado un factor de transcripción llamado *Oct-4* u *Oct-3*, este factor es expresado exclusivamente en células tallo y células germinales. Se ha sugerido que este factor podría estar manteniendo la potencia de las células tallo y de las células germinales (Pesce *et al.*, 1998, Bachvarova *et al.*, 2004).

En los vertebrados el linaje de las células germinales es especificado por información posicional en la gastrulación del embrión, la identificación de los factores de transcripción homólogos para *Oct-4* en mamíferos y en especies de anfibios urodelos, sugiere que estos factores pudrían estar implicados en la separación de células somáticas de las células germinales (Pesce *et al.*, 1998, Matova and Cooley, 2001).

Las CGPs suben a una posición anterior durante el desarrollo de *Xenopus* pero no en el desarrollo del *Ambystoma*. En *Xenopus* las CGPs son encontradas en la mitad posterior del endodermo al final de la gastrulación y en la mitad del tronco en estadios de renacuajos. Como el tronco se acorta, las CGPs entran a la gónada a nivel de las vértebras 3-8, ver figura 3 (Johnson *et al.*, 2003).

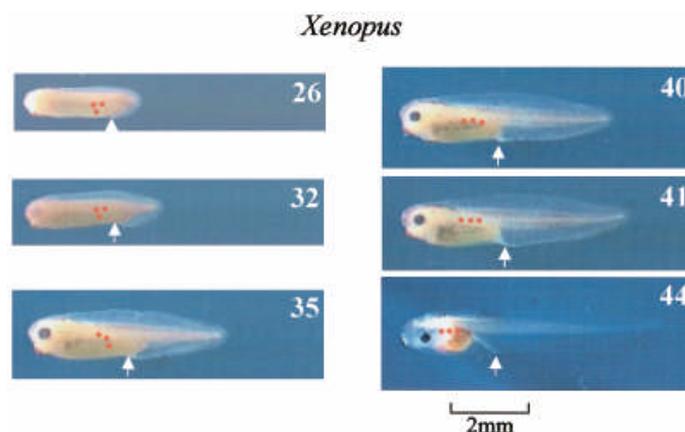


Figura 4. Migración de las CGPs en *Xenopus*. La posición de las CGPs se indica con puntos rojos y la posición de la cloaca se indica con la flecha (Tomado de Johnson *et al.*, 2003.).

El gen DAZ (Supresor en la Azoospermia) codifica una proteína unida a RNA localizada en el cromosoma Y de humanos masculinos (Tamori *et al.*, 2004). Homólogos de este gen han sido identificados en otros organismos modelo. En *Xenopus*, el RNA del gen *Xdazl* está localizado en el plasma germinal en los ovocitos y en embriones, sugiriendo que la proteína resultante es requerida para el desarrollo temprano de las células germinales durante la migración a la gónada. En el anfibio urodelo, *Cynops pyrrhogaster* sin embargo, el gen *Cydazl* y la proteína (Cydazl) se detectaron en las células germinales que habían llegado a la cresta genital en desarrollo, indicando que la proteína Cydazl parece tener un papel en la diferenciación de las células germinales durante la embriogénesis tardía (Tamori *et al.*, 2004).

En los urodelos no se conoce con claridad la ruta de migración de las CGPs. Sin embargo, a diferencia de otros vertebrados una vez que se han establecido las CGPs, éstas células continúan su desarrollo en la gónada diferenciada.

En anfibios las gónadas varían de forma en relación con la del cuerpo. En los urodelos los testículos son alargados e irregulares, mientras que en los anuros son redondeados, cada testículo (lóbulo) muestra diferentes estadios de maduración de los espermatozoides, en un corte histológico se pueden apreciar la distribución de grupos (quistes) de espermatozoides en un mismo estadio de maduración (figura 5) (Paniagua y Nistal, 1983). Similar a los testículos, los ovarios tienen la función de la maduración de células germinales, por el proceso de la ovogénesis, en donde la ovogonia se transforma en ovocito que es liberando al oviducto (Dutta y Munshi, 2001).

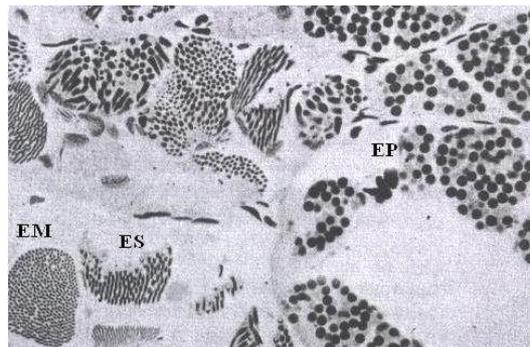


Figura 5. Se muestran grupos de espermatozoides en diferentes grados de maduración (quistes) de los testículos del urodelo *Ambystoma*, espermatocitos primarios (EP), espermatocitos secundarios (ES) y espermatozoides maduros (EM) (Modificado de Armstrong, 1989).

Por otra parte, tenemos que la interacción de las células germinales y de Sertoli es difícil de estudiar en mamíferos, debido a la organización celular compleja de sus túbulos seminíferos; ya que una sola

célula de Sertoli esta en contacto con varias células germinales en diferentes estadios de maduración (Sáez, *et al.*, 2001).

Los testículos de anfibios urodelos, proporcionan un sistema para el estudio del proceso de la maduración de las células germinales; gracias a la organización de sus quistes, en donde las células germinales se pueden encontrar en un determinado estadio de maduración o en gradiente de maduración (Del Río-Tsonis, 1996., Pierantoni, *et al.*, 2002).

La estructura de los testículos (pareados) de urodelos es única debido a que los quistes están organizados en lóbulos (Del Río-Tsonis, 1996., Jameson, 1988., Armstrong- Malaciski, 1989), los cuales son equivalentes a los tubos seminíferos en mamíferos, estos lóbulos proporcionan separación física entre el intersticio de las células germinales que lo comparten (Gómez, 1989), como se muestra en la fig. 6.

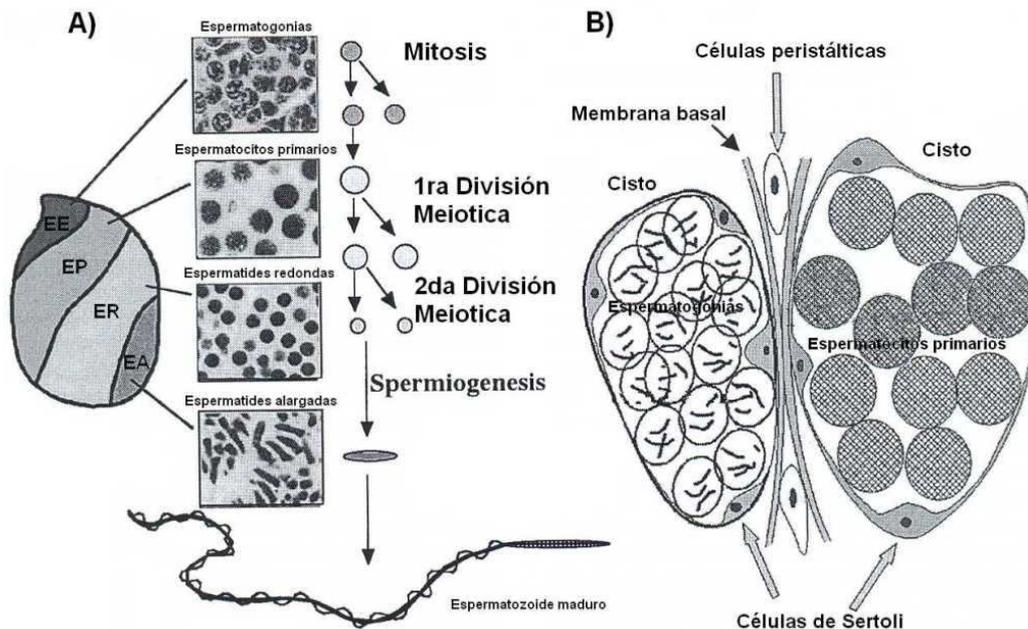


Figura. 6. Espermatogénesis y estructura testicular de un urodelo típico **A)** los testículos de los urodelos consiste de varias zonas cada una consiste de un estadio igual de la espermatogénesis; estadio espermatogonias (EE), estadio espermatocitos primarios (EP), estadio espermátides redondas (ER) y estadio espermátides alargadas (EA). El radio del volumen entre varios estadios depende de las estaciones. La parte madura se encuentra ausente. Después de varios ciclos mitóticos, las espermatogonias se diferencian en espermatocitos primarios que pasan por divisiones meióticas, dando como resultado espermátides redondas pasando al proceso de la espermiogénesis y eventualmente diferenciándose en espermatozoides maduros. **B)** Las pequeñas unidades de los testículos es un quiste que se constituye de una célula germinal clonada derivada de una espermatogonia y de algunas células somáticas, células de Sertoli. Algunos quistes están empaquetados en un lóbulo que esta rodeado por una membrana basal. Afuera de los lóbulos se encuentran algunas células de Leydig llamadas células peristálticas (Modificado de Shin-ichi, 2004).

La espermatogénesis es un proceso continuo de diferenciación por el cual, las espermatogonias pasan por una serie de divisiones mitóticas antes de entrar a su ciclo meiótico. Los espermatocitos primarios se convierten en espermatocitos secundarios después de la primera división meiótica y más tarde se convierten en espermátides después del segundo evento meiótico. En todos estos eventos de diferenciación celular de espermatogonias a espermátides, las células germinales permanecen unidas por medio de puentes citoplasmáticos por los cuales pueden intercambiar iones y moléculas, gracias a esto es que se da una sincronía de diferenciación (Gilbert, 2005). Finalmente las espermátides entran al proceso de espermiogénesis para la diferenciación a espermatozoides maduros. Todos estos eventos están estrechamente regulados por factores hormonales y paracrinos liberados durante las interacciones de las células somáticas y las células germinales (Del Río-Tsonis, 1996).

Posteriormente en los urodelos los espermatozoides maduran y son empaquetados en estructuras llamadas espermatóforos (paquetes de espermatozoides), que son expulsados al medio acuático durante el apareamiento donde la hembra los recoge con sus labios cloacales para depositar los espermatozoides en la spermateca (Wake y Dickie, 1998, Sever, 2002).

Tanto el testículo como el ovario, van a tener dos funciones principales: producción de gametos y síntesis de esteroides. Mientras que en la espermatogénesis se forman esencialmente gametos con un núcleo móvil, en la ovogénesis se forman gametos que contienen todo el material necesario para iniciar y mantener el metabolismo y el desarrollo de un nuevo organismo.

Los ovarios de la mayoría de los urodelos son estructuras alargadas y simétricas que están conformados en términos generales de su superficie externa hacia su interior por, una corteza y una médula. En la corteza se encuentra el epitelio germinal que contiene ovogonias y la mayoría de los folículos, los cuales contienen a los ovocitos. En la médula se encuentran los vasos sanguíneos, nervios y algunos folículos muy desarrollados además de los cuerpos lúteos. (Dutta y Munshi, 2001).

La ovogénesis en la especie humana comienza cuando las células germinales se multiplican y producen las ovogonias. Estas células entran en una fase de crecimiento y se originan los ovocitos de primer orden. En ellos se lleva a cabo la meiosis y comienza la fase de maduración. La primera división meiótica da lugar a una célula grande, el ovocito de segundo orden y una célula menor, el corpúsculo polar. El ovocito se divide y da lugar al segundo corpúsculo polar. Esta célula, es la que se transforma en el ovocito secundario listo para ser fecundado. Los corpúsculos polares no son funcionales, y se pueden volver a dividir. El ovocito, durante la ovogénesis, se rodea de células en el

ovario y se forman los llamados folículos (Gilbert, 2006, Pierantoni *et al.*, 2002). En el caso de los anfibios, las células que recubren al ovocito son las que van a formar las capas de la gelatina del huevo, la cual presenta diferentes funciones en la fecundación del ovocito y en el desarrollo (Wake y Dickie, 1998).

Fecundación

La fecundación es un evento por el cual se produce descendencia. Los anuros presentan fecundación externa mientras que en la mayoría de los urodelos es interna, en estos últimos no se presentan órganos copulatorios sino labios cloacales que la hembra utiliza para recoger el espermátóforo que es depositado en el fondo del estanque por el macho.

Los ovocitos de anfibio están rodeados por una membrana vitelina y varias capas de gelatina. Dichas cubiertas son esenciales para la interacción de los gametos (ovocito y espermatozoide).

El encuentro de los gametos se ha estudiado principalmente en el erizo de mar y ha servido de modelo para extrapolar los conocimientos obtenidos a otras especies de fecundación externa. Los detalles de la fecundación son diferentes en cada especie, pero en general se presentan 4 eventos de acuerdo a Gilbert (2005).

1. Contacto y reconocimiento entre el espermatozoide y el ovocito/óvulo. Asegurando que ambos sean de la misma especie.
2. Regulación de la entrada del espermatozoide al gameto femenino. Con esto se evita que más de uno entre al óvulo.
3. Fusión del material genético de ambos gametos (espermatozoide y óvulo).
4. Activación del metabolismo del óvulo fecundado para iniciar el desarrollo de un nuevo organismo.

El sistema de fecundación en los anfibios, ha sido estudiado más en anuros que presentan fecundación externa (Adams *et al.*, 2005). Sin embargo, los eventos que suceden en la fecundación externa son diferentes a la fecundación interna. En la fecundación externa de anuros como en *Xenopus* y *Bufo* la osmolalidad aumenta alrededor de los espermatozoides que se expulsaron en el agua, induciendo la movilidad de éstos, posteriormente son atraídos al huevo por acción

quimiotáctica por parte de la gelatina del huevo hasta llegar a la membrana vitelina donde es inducida la reacción acrosómica y así lograr fecundar al huevo (Watanabe y Onitake, 2002).

Las hembras de urodelos toman el espermátforo expulsado por los machos en el agua. Los espermatozoides son liberados dentro de la cloaca y se almacenan en la espermateca. Después de un corto o largo periodo de almacenamiento fecundan a los ovocitos en la cloaca. Antes que se complete la fecundación de los huevos son expulsados al agua. En algunas especies, los espermatozoides almacenados en la espermateca entran al oviducto y fecundan los huevos. Los huevos fecundados comienzan a desarrollarse en el oviducto y la embriogénesis es completada allí. En estas especies vivíparas, algunos carbohidratos son secretados en la porción más posterior del oviducto para abastecer al embrión. Sugiriendo que algunas secreciones del oviducto son modificadas de modo específico en la fecundación. Sin embargo, se cree que el mecanismo básico para la fecundación es común entre los anfibios (Adams *et al.*, 2005).

La gelatina del huevo (GEL H) de anfibios urodelos es esencial para que se lleve con éxito la fecundación y el desarrollo, además tiene una función antibiótica hasta que la embriogénesis se haya completado. La GEL H de anfibios que es secretada en la parte posterior del oviducto, *pars convulata*, se compone de estructuras fibrosas que forman varias subcapas (Wake y Dickie, 1998).

Se sabe que los carbohidratos son diferentes entre las subcapas de la GEL H, sugiriendo que cada capa juega una función distinta en la fecundación y en el desarrollo (Carroll *et al.*, 1992, Itoh *et al.*, 2002.).

En el urodelo, *Cynops pyrrhogaster*, la GEL H es morfológicamente dividida en 6 capas, de las más internas J0 a la J4, a la región más externa pegajosa (st). Además las capas J4 y la st se componen de dos subcapas distintas. La interacción del ovocito y espermatozoide ocurre en la GEL H en el proceso de la fecundación (Watanabe y Onitake, 2002).

Los espermatozoides de los urodelos se encuentran inmóviles almacenados en la espermateca de la hembra. Cuando son colocados directamente sobre la superficie de la GEL H, comienzan a moverse después de tres minutos previo a la fecundación (Watanabe *et al.*, 2003).

Con respecto a la subcapa J2 se detectó baja actividad en la movilidad espermática, sugiriendo que el factor que induce esta movilidad es distinta entre las capas st y J2. Mientras que espermatozoides de *C. pyrrhogaster* comenzaron a moverse por efecto del aumento del pH (Watanabe *et al.*, 2003).

La iniciación de la movilidad de los espermatozoides se localiza en la capa st de la GEL H de *C. pyrrhogaster*, esta sustancia es denominada SIME (sustancia que induce la movilidad del espermatozoide) (Watanabe y Onitake, 2002).

Se ha encontrado que la SIME es una proteína estable al calor del medio ambiente de aproximadamente 50 kDa de peso molecular. Una forma inactiva de más de 500 kDa también se ha encontrado en la GEL H (Watanabe y Onitake, 2002).

Los cationes como K^+ , Na^+ y Ca^{2+} de la GEL H están también implicados en la activación de la iniciación de la movilidad espermática de *C. pyrrhogaster*. El potasio puede inducir la movilidad del espermatozoide de *Cynops* si son tratados a altas concentraciones. Por lo que se ha sugerido que los canales de K^+ de la membrana del espermatozoide están implicados en la iniciación de la movilidad espermática (Ukita *et al.*, 1999).

En erizos de mar, *Strongylocentrotus purpuratus*, un péptido, *speract*, es liberado de la GEL H el cual activa la movilidad del espermatozoide y causa la salida de K^+ a través de los canales de K^+ dependientes de GMPc en el espermatozoide (Watanabe *et al.*, 2003).

Por otra parte los iones calcio solos no pueden inducir la movilidad espermática. Los iones calcio en la GEL H podrían mediar la activación de la movilidad espermática de *C. pyrrhogaster* como en el ratón (Ukita *et al.*, 1999).

La GEL H de los anfibios mantiene una concentración constante de calcio, el cual es necesario para iniciar la reacción acrosomal del espermatozoide. El calcio es necesario para iniciar la movilidad espermática hasta que se lleva a cabo la fecundación interna de *C. pyrrhogaster*. En el erizo de mar se sugiere que la entrada del calcio es por medio de la salida de Na^+/H^+ debido a la intervención de *speract* (Suzuki and Garbers, 1984). Esta activación de la salida de Na^+/H^+ permite la alcalinización del interior celular, causando la elevación del AMPc y finalmente ocurre la entrada del Ca^{+2} en el espermatozoide por medio de los canales de Ca^{2+} . Un mecanismo similar podría causar la iniciación de la movilidad espermática en *C. pyrrhogaster* (Watanabe *et al.*, 2003).

En los anfibios urodelos la reacción acrosomal del espermatozoide es inducida en la región más externa (st) de la GEL H de *C. pyrrhogaster*, en la fracción de la glycoproteína de más de 500 kDa (Watanabe y Onitake, 2002).

La GEL H de *C. pyrrhogaster* guía al espermatozoide a la membrana vitelina; cuando se agrega solución de GEL H a espermatozoides estos comienzan a moverse hacia la solución de GEL H. Se han fertilizado con éxito huevos desprovistos de GEL H de *C. pyrrhogaster*. Sugiriendo que esto sucede en los urodelos. En contraste, muchos espermatozoides son atrapados cuando pasan a través de la GEL H. Por lo tanto la GEL H presenta dos papeles la atracción de los espermatozoides y la exclusión de ellos (Itoh *et al.*, 2002).

Durante la fecundación en general en el huevo, la membrana vitelina que lo cubre es modificada por la liberación del contenido de sus gránulos corticales actuando como un bloqueador de la polispermia. En urodelos, los huevos son fisiológicamente poliespérmicos, algunos espermatozoides entran a los huevos durante la fecundación. Estos hallazgos indican que la membrana vitelina presenta características diferentes entre los anuros y urodelos (Itoh *et al.*, 2002).

La membrana vitelina de *C. pyrrhogaster* presenta seis componentes y tres capas que pueden ser detectadas por técnicas inmunológicas. La unión de los espermatozoides a la membrana vitelina es mediada por el sulfato de heparina localizado en la superficie del proceso acrosomal (Watanabe y Onitake, 2002).

Una sustancia de 84 kDa ha sido purificada de la membrana vitelina con columna de afinidad a heparina, mientras que una molécula del mismo tamaño ha sido detectada en la porción más externa de la membrana vitelina de huevos maduros, con anticuerpos anti-vitronectina. Podrían estar la heparina y la vitronectina implicadas en la unión del espermatozoide al huevo de *C. pyrrhogaster* (Watanabe y Onitake, 2002).

Las moléculas de proteínas de ZPC de 84 kDa y de 70 kDa han sido detectadas en la porción más interna de la membrana vitelina de *C. pyrrhogaster*. La proteína ZPC es homóloga a la proteína ZP3 de ratón la cual es responsable de la primera unión del espermatozoide e induce la reacción acrosomal en la zona pelúcida (Watanabe y Onitake, 2002).

La ZPC se cree que contribuye a la unión del espermatozoide en *Xenopus laevis*, como en muchas especies. La ZPC no contribuye a la primera unión del espermatozoide a la membrana vitelina de *C. pyrrhogaster*, debido a que ésta se localiza en la porción más interna de la membrana (Vo y Hedrick, 2000).

En la fecundación interna, los cambios no ocurren en el volumen y en el equipamiento del la GEL H durante la fecundación. Por lo tanto al parecer los espermatozoides tienen suficiente tiempo para atravesar la GEL H respondiendo a los estímulos del huevo, el número de espermatozoides sobre los huevos se piensa que es limitado debido a la capacidad de almacén de la espermateca por un largo periodo, así como también se cree que la habilidad para contribuir a la fecundación disminuye en algunos espermatozoides (Sever, 2002).

La reacción acrosomal en anuros es inducida cerca o en la membrana vitelina en *Bufo* y *Xenopus*; sugiriendo que la sustancia inductora de la reacción acrosomal es agregada a la membrana vitelina antes de ser rodeada por la GEL H. En contraste, en los urodelos, *Pleurodeles waltl* y *C. pyrrhogaster*, la reacción acrosomal es observada en la GEL H, semejante a lo que sucede en algunos mamíferos, como en el ratón donde la zona pelúcida inicia la reacción acrosomal. En la figura 7 se muestra la función de la GEL H y de la membrana vitelina en el urodelo *C. pyrrhogaster* y del anuro *X. laevis* (Watanabe y Onitake, 2002).

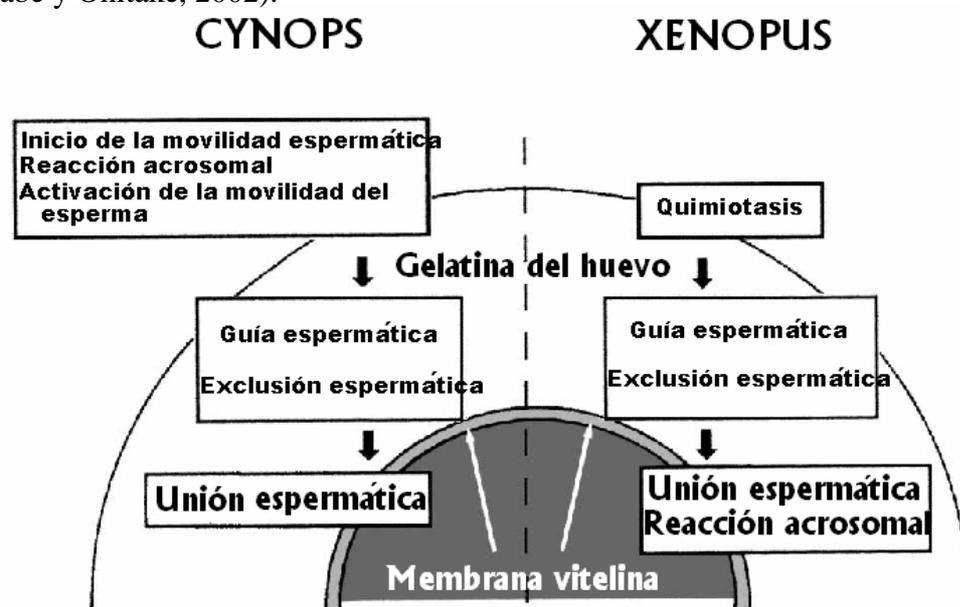


Fig. 7. Se muestran los sitios que inducen las interacciones del ovocito y espermatozoide en las cubiertas del ovocito del tritón *C. pyrrhogaster* y la rana, *X. laevis*. Los recuadros superiores y medios muestran las funciones de la GEL H en la zona en donde se encuentran. Aunque la dirección y la exclusión espermática son proporcionadas por la GEL H en ambas especies, en el caso de *Cynops* es más eficiente la fecundación. Debido a que la fecundación en *Xenopus* es externa, la exclusión es por hidratación con el paso del tiempo de la GEL H. Los recuadros de abajo muestran los eventos que induce la membrana vitelina (modificado de Watanabe y Onitake, 2002).

También es necesario mencionar que se ha reportado la partenogénesis en al menos dos especies de urodelos (*A. platinum* y *A. tremblai*), las cuales son triploides, necesitan de machos diploides cuyos espermatozoides son necesarios para iniciar el desarrollo de los huevos partenogénicos, aunque el material genético de los machos no es incorporado (Hayes, 1998).

Por otra parte, en el urodelo *Notophthalmus (Triturus) viridensis* tanto la hembra como el macho son triploides. El estudio de esta especie como de *Ambystoma*, en los efectos de la triploidia podría estar relacionada por los sistemas diferentes que determinan el sexo, en *Ambystoma* son ZZ/ZW mientras que en *Notophthalmus* son XX/XY (Hayes, 1998). El estudio de estos animales podría contribuir al entendimiento de las relaciones entre los mecanismos de la determinación sexual y diferenciación sexual gonadal.

DISCUSIÓN

Diferenciación gonadal

En los mamíferos, la determinación sexual es estrictamente genética; sin embargo, esto puede ser modificado en algunas especies de anfibios por la temperatura y acción de las hormonas esteroides (Chardard *et al.*, 1995). En el cuadro 1 se muestran algunos genes y su función.

Cuadro 1. Genes y su relación con la diferenciación gonadal en algunos vertebrados.

Gen	Función del gen	Animal
Sry	Induce el testículo en Conjunto con Sox9 (Meyers-Wallen, 2005)	Roedores
Sox9	Participa en la diferenciación del testículo en conjunto con Sry (Meyers-Wallen, 2005).	Roedores
Lhx9	Su expresión es esencial para la formación de la gónada bipotencial en conjunto con WT1 (Mazaud <i>et al.</i> , 2002).	Roedores
WT1	Induce la formación de la gónada bipotencial en conjunto con Lhx9 (Mazaud <i>et al.</i> , 2002).	Roedores
Dmrt1 (en el cromosoma Z)	Se expresa en la gónada indiferenciada antes de la determinación sexual (Osawa <i>et al.</i> , 2005).	Pollo
Dmrt1 (en el cromosoma Z)	Podría estar implicado en la diferenciación gónadal (Osawa <i>et al.</i> , 2005).	<i>Xenopus Lavéis</i>
¿?		Urodelos

En el caso de anfibios urodelos no se ha detectado gen alguno que pueda estar relacionado con la diferenciación gonadal como es el caso de otros organismos. En los urodelos se han encontrado cromosomas sexuales como XX/XY o ZZ/ZW (Chardard *et al.*, 1995). Ver el cuadro 2.

Cuadro 2. Muestra el tipo determinación sexual en algunos vertebrados.

Tipo de determinación sexual	Organismo
XX/XY	Mamíferos (Gilbert, 2005).
ZZ/ZW	Pollo (Van Tienhoven).
ZZ/ZW	Anuros, <i>X. laevis</i> y <i>R. pipiens</i> (Osawa, 2005).
ZZ/ZW	Urodelo, <i>Ambystoma</i> (Van Tienhoven).
ZZ/ZW	Urodelo, <i>P. waltl</i> (Flament <i>et al.</i> , 2003).
XX/XY	Urodelo, <i>Notophthalmus (Triturus) viridensis</i> (Hayes, 1998).
¿?	Urodelo, <i>Cynops pyrrhogaster</i>

La diferenciación gonadal que en mamíferos y aves es establecida por la presencia de cromosomas sexuales puede ser alterada por otros factores. En el urodelo *Pleurodeles* la temperatura y el uso de hormonas modifican el sexo gonadal. Se ha observado que la variación de temperatura durante el periodo termosensible, que va del estadio 42 al 54; afecta el desarrollo de la gónada. Para el desarrollo del 100% de machos se requiere una temperatura de 32° C, así como también el uso de la hormona estradiol puede modificar el sexo gonadal en etapa larval del estadio 52 al 56, contrarrestando los efectos de la temperatura (Flament *et al.*, 2003), ver figura 1.

La determinación del sexo relacionada a factores ambientales como la temperatura se presenta en algunos reptiles como las tortugas y los cocodrilos. Sin embargo, en los urodelos la determinación del sexo es genética, mientras que la diferenciación gonadal puede ser en algunos casos determinada por efecto de la temperatura. Los estrógenos pueden contrarrestar los efectos de la temperatura e inducir la diferenciación del ovario, sin importar que los embriones se estén incubando a temperaturas en las que se producen machos. De igual manera si se contrarresta la actividad de la enzima aromatasa se desarrollan organismos machos, aunque la temperatura a la que se mantengan los huevos sea para el desarrollo de hembras (Kuntz *et al.*, 2004).

Determinación de las células germinales primordiales

Las CGPs son la línea celular que da origen a los gametos en los animales. En el caso de nematodos, moscas, anfibios anuros y pollos las CGPs son determinadas por medio del plasma germinal que se

encuentra en el citoplasma del ovocito, mientras que por otra parte se tiene a los anfibios urodelos y mamíferos en donde las CGPs son determinadas por interacción de las células vecinas. En los urodelos las CGPs derivan de las células localizadas en la ZMV de embriones en estado de gástrula; poco después estas células migran con el mesodermo lateral posterior sobre el labio ventral del blastoporo, a diferencia de los mamíferos en donde CGPs son inducidas en las células del epiblasto por el ectodermo extraembrionario (Ikenishi y Nieuwkoop, 1978, Johnson *et al.*, 2003), ver cuadro 3 y figura 3.

Cuadro 3. Especificación de las CGPs en diferentes animales.

Animales	Plasma germinal	Interacción celular
Nemátodos	Distribuida en todo el citoplasma del huevo maduro (Matova y Cooley, 2001).	
Moscas	Desplazado hacia el polo posterior del huevo maduro (Matova y Cooley, 2001).	
Anfibios anuros	Desplazado hacia el polo vegetal del huevo maduro (Matova y Cooley, 2001).	
Pollos	Son detectadas en el estadio de blastodisco (Matova y Cooley, 2001, Takashi 1993).	
Anfibios urodelos		En el estadio 28, se localizan en el mesodermo posterior, lateral a la cloaca (Johnson <i>et al.</i> , 2001).
Mamíferos		Son encontradas en el área del epiblasto proximal a la línea primitiva (Matova y Cooley, 2001).

Sin embargo, tales estudios han sido realizados a nivel histológico o citológico por lo cual, para investigar los mecanismos de especificación de CGPs o células germinales verdaderas en anfibios urodelos se utilizan marcadores moleculares ya utilizados en otros organismos, como se muestra en el cuadro 4; el gen *DAZL* (*DAZ-LIKE*) es utilizado como una herramienta molecular.

Cuadro 4. El gen *DAZ* humano v sus homólogos en otros organismos

Organismos	Gen	Localización	Función del gen
Humanos	<i>DAZ</i>	En el cromosoma Y.	Codifica una proteína unida a ARN del cromosoma Y. No se usa como marcador de CGPs, interviene en la meiosis en la espermatogénesis (Johnson <i>et al.</i> , 2003).
<i>Xenopus</i> , Anfibio anuro	<i>Xdazl</i>	Gen autosómico (?) y su ARN se expresa en el plasma del ovocito y en el embrión.	La proteína resultante podría ser requerida para el desarrollo temprano de las células germinales durante la migración a la gónada (Bachvarona <i>et al.</i> , 2004).
<i>Cynops</i> , Anfibio urodelo	<i>Cydazl</i>	Se expresa en CGPs dentro de la cresta genital en desarrollo (estadio 59)	La proteína <i>Cydazl</i> parecer tener un papel en la diferenciación de las células germinales durante la embriogénesis tardía (Tamori <i>et al.</i> , 2004).

El avance del estudio del gen *Cydazl* ayudará a establecer la diferenciación de las células germinales durante la embriogénesis en el anfibio urodelo *Cynops*, así como también servirá de comparación con genes homólogos de otros anfibios (urodelos y anuros) y no anfibios. En el caso de *Xenopus*, que está más relacionado con *Cynops*, ya que en los mismos genes, *Xdazl* y *Cydazl* respectivamente, tienen que ver con la diferenciación de CGPs presentándose en diferentes tiempos. En general, en cada una de las especies que presentan el gen *DAZL*, el *ARN DAZL* muestra expresión específica de las células germinales y la proteína *DAZL*, se cree que presenta un papel clave en la meiosis y en el avance normal de la gametogénesis en algunos sistemas, aunque las funciones actuales permanecen sin descifrarse (Tamori *et al.*, 2004). Por otra parte, la transcripción de factores también ayuda a descifrar lo que sucede con las células germinales, como es el caso del factor de transcripción *Oct-4*, que podría estar implicado en la separación de células somáticas y de las células germinales en mamíferos y se sugiere que también en especies de anfibios urodelos (Pesce *et al.*, 1998), ver cuadro 5.

Cuadro 5. Localización y función del factor de transcripción de *Oct-4* en el ratón y sus homólogos en otros organismos.

Animal	Factor de transcripción	Localización	Función del factor de transcripción
Ratón	<i>Oct-4</i>	Es expresado en células de tallo y células germinales.	Este factor podría estar manteniendo la potencia de las células tallo y células germinales, así como también podría jugar un papel más allá de la maduración de las CGPs en gametos (Pesce <i>et al.</i> , 1998).
Humanos, vacas y monotremas (marsupiales)	<i>murine Oct-4</i>	Es expresado en células de tallo y células germinales	Este factor podría estar manteniendo la potencia de las células tallo y células germinales, así como también podría jugar un papel más allá de la maduración de las CGPs en gametos (Pesce <i>et al.</i> , 1998).
<i>Ambystoma</i> , Anfibio urodelo	<i>AxOct-4</i>	Se expresa en células tallo antes de la gastrulación y es confinado en las CGPs durante la gastrulación.	Se especula que puede ser necesario para la formación de las CGPs (Pesce <i>et al.</i> , 1998).

Por otra parte, la interacción de las células germinales y de Sertoli es difícil de estudiar en mamíferos, debido a la organización compleja de sus túbulos seminíferos; para lo cual los testículos de anfibios urodelos proporcionan un sistema adecuado en el estudio de la maduración de las células germinales, gracias a la organización de sus quistes, en donde las células germinales se pueden encontrar en un estadio de maduración o formando un gradiente de maduración (Shin-ichi, 2004), ver figura 6.

Fecundación

Los urodelos presentan fecundación interna, la hembra toma el espermátforo que es depositado por el macho en el fondo de la charca. La hembra puede almacenar los espermatozoides algunos días y hasta más de un año en la espermateca. Posteriormente los ovocitos son fecundados en la cloaca y liberados al agua.

La GEL H se compone de varias capas (dividida en 6 capas, de las más internas J0 a la J4, a la región más externa pegajosa (st).), cada una presenta función diferente en la fecundación del ovocito; sin embargo, los componentes presentes en la GEL H de *Cynops pyrrhogaster* no son determinantes para la fecundación del ovocito, ya que los ovocitos desprovistos de la GEL H son fecundados eficientemente (Itoh *et al.*, 2002).

No obstante, hay sustancias importantes e interesantes que se han encontrado en la GEL H de *C. pyrrhogaster* específicamente en la capa st, la SIME, una proteína de 50 kDa que induce la movilidad espermática (Watanabe y Onitake, 2002). Conforme se vaya avanzando más en el estudio de la fecundación de urodelos se sabrá más sobre las funciones que podrían tener las sustancias de la GEL H.

También hay cationes (K^+ , Na^+ y Ca^{2+}) provenientes de la GEL H que están implicados en la movilidad del espermatozoide y en la iniciación de la reacción acrosomal; sugiriéndose que la entrada de Ca^{2+} en el espermatozoide por medio de canales de Ca^{2+} podría ser de igual manera a como se da la iniciación de la movilidad espermática en el erizo de mar (Watanabe *et al.*, 2003).

Aparte de estas sustancias, hay otras que se ha encontrado, la proteína ZPC detectada en la porción más interna de la membrana vitelina de *Cynops pyrrhogaster*, que es homóloga a la proteína ZPC en la membrana vitelina de *Xenopus* y la proteína ZP3 en la zona pelúcida de ratón. La función de ZP3 de ratón y la ZPC de *Xenopus* contribuye a la primera unión del espermatozoide, mientras que en el caso de *Cynops* no contribuye a la primera unión debida a que esta localizada en la porción más interna de la membrana vitelina. Sin embargo, la membrana vitelina de *Cynops* es una matriz organizada en varias capas, que juega un importante papel en la fecundación, ver cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación de los eventos de la fecundación de algunos animales.

Tipo de fecundación	Quimiotaxis	Sitio de unión ovulo-espermatozoide.	Sitio de reacción acrosomal	Organismo
Externa	Se presenta por el péptido <i>resact</i> , que es difundido de la GEL H (Ward <i>et al.</i> , 1985).	Por la proteína bindina localizada en el proceso acrosomal (Gilbert, 2005).	En la GEL H (Watanabe y Onitake, 2002).	Erizo de mar
Interna	En la capa st de la GEL H (Watanabe, 2003).	En la superficie del proceso acrosomal del espermatozoide, por el sulfato de heparina. En la membrana vitelina, por la heparina y vitronectina (Watanabe y Onitake, 2002).	En la capa st de la GEL H, por una proteína de 500 kDa de peso molecular (Watanabe y Onitake, 2002).	Anfibios urodelos
Externa	Se presenta en la GEL H (Watanabe y Onitake, 2002).	En la porción más interna de membrana vitelina, por la proteína ZPC (Watanabe y Onitake, 2002).	En membrana vitelina (Watanabe y Onitake, 2002).	Anfibios anuros (<i>Xenopus laevis</i>)
Interna	¿?	En la zona pelúcida por la proteína ZP3 y ZP2 (Gilbert, 2005).	En la zona pelúcida por la proteína ZP3 que se une a la proteína de galactosiltransferasa-I del espermatozoide (Gilbert, 2005).	Mamíferos (ratón)

Los resultados encontrados en esta revisión, muestran una clara evidencia de la escasa información de los tópicos abordados sobre los anfibios urodelos. En relación a la diferenciación gonadal existe poca información que ayude a encontrar qué factores genéticos están implicados en este proceso. Sin embargo, se sabe que la temperatura y/o la concentración de hormonas, pueden modificar la diferenciación gonadal.

Por otra parte, en la determinación de las células germinales primordiales en anfibios urodelos, no se conoce con exactitud que genes están implicados en la determinación de estas células, tampoco se conoce con claridad su ruta de migración hacia las gónadas. La utilización de marcadores genéticos ayudará en gran medida a descifrar la determinación de estas células.

En relación con la fecundación, al igual que los tópicos anteriores el avance del conocimiento en los urodelos es poco en comparación al existente en el erizo de mar y los anuros. Tomando en cuenta que

en nuestro país presenta urodelos endémicos como el *Ambystoma mexicanum* que ya se están criando en instalaciones de algunas instituciones como en la FES Iztacala, lo cual permitirá tener una fuente de organismos para realizar investigaciones sobre cualquier aspecto de la biología de dicha especie.

CONCLUSIONES

Con esta revisión se encontró que los urodelos son poco utilizados en la investigación de aspectos reproductivos; sin embargo, son extensamente empleados en estudios de regeneración.

Se identificó que la diferenciación sexual de las gónadas en los urodelos en general está bajo control genético como en las aves y los mamíferos; sin embargo, en algunas especies como *Pleurodeles waltl* la diferenciación sexual de las gónadas puede ser modificada por efecto de la temperatura y las hormonas esteroides como en los reptiles.

La diferenciación del linaje germinal en los anfibios urodelos se cree que es por interacción de las células semejante a los mamíferos. En *Cynops*, el gen *Cydazl* diferencia las CGPs. mientras que, en *Ambystoma* el factor de transcripción, *AxOct-4*, es necesario para la determinación de las CGPs, su homólogo el *Oct-4* se expresa en las CGPs de otros animales.

Se describieron algunos eventos de la fecundación de los anfibios urodelos, en donde la gelatina del huevo de *Cynops*, es necesaria pero no determinante en la fecundación del ovocito. La capa de gelatina es quimioatrayente y en ella se realiza la reacción acrosomal de manera parecida al erizo de mar, ya que el espermatozoide también presenta un proceso acrosomal. Sin embargo, la proteína ZPC de la membrana vitelina en *Cynops* no interviene en la primera unión con el espermatozoide, mientras que si lo hace en *Xenopus*, como la ZP3 de la zona pelúcida de mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

Adams Erika M., Jones Adams G. and Arnold Stevan J. 2005. Multiple paternity in natural population of a salamander with long-term sperm storage. *Molecular Ecology*. 14: 1803-1810.

Ari Van Tienhoven. 1983. *Reproductive physiology of Vertebrates*, 2da ed. Cornell University press. 19-37, 104-108, 141-143.

Armstrong J. B. And Malaciski G. M., 1989. *Developmental Biology of the Axolotl*. New York. Oxford. 37-41.

Bachvarova R. F., Masi T., Drum M., Parker N., Mason K., Patient R. and Johnson A. 2004. Gene expression in the Axolotl germ line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axoct-4* and *Axkit*. *Developmental Dynamics*. 231: 871-880.

Bendel-Stenzel M., Anderson R., Heasman J. and Wyley C. 1998. The origin and migration of primordial germ cell in the mouse. *Cell & Developmental Biology*. 9:393-400.

Carroll E. J. Jr., Palmer R. and Rubial R. 1992. Structure and macromolecular composition of the jelly coats of the urodele *Ambystoma mexicanum*. *Develop Growth & Differ*. 34: 501-508.

Chardard D., Desvages G., Pieau C., and Dourmon C. 1995. Aromatase activity in gonads of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *General and comparative endocrinology*. 99: 100-107.

Chardard D., Kuntz S., Chesnel A. and Flament S. 2003. Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. *Journal of experimental zoology*. 296A: 46-55.

Del Río-Tsonis K., Covarrubias L., Kent J., Hastie N. D. and Tsonis P. A. 1996 Regulation of the Wilms' Tumor Gene During Spermatogenesis. *Developmental Dynamics* 207: 372-381.

Dournon C., Membre H. and Bautz A. 2001. Sex reversal of germ cell gametogenesis in chimeras of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian): genetic and immunogenetic demonstration using tolerance or rejection of skin grafts. *Develop Growth Differ.* 43: 97-106.

Duellman W. E.; Trueb L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. USA. 127-131.

Dutta Hiran M. and Munshi J.S. Datta. 2001. *Vertebrate functional morphology*. Science publisher. USA. 267-293.

E. W. Jameson, Jr. 1988. *Vertebrates Reproduction*. Wiley (Canada). USA. 72-75.

Flament S., Kuntz S., Chesnel A., Grillier-Vuissoz I., Tankozic C., Penrad-Mobayed M., Aunque G., Shirali P., Schroeder H. and Chardard d. 2003. Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles Waltl* (urodele amphibian). *Aquatic Toxicology*. 64: 143-53.

Gilbert S. 2005. *Developmental Biology*. Sinauer Associates. USA. 547-559.

Gómez Ríos J. G. 1989. Estudio histológico del aparato reproductor del achote (*Ambystoma dumerilli*, Duges). Urodelo del lago de Pazcuaro. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias UNAM. México. 62 p.

Hayes T. 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *The Journal of Experimental Zoology*. 281: 373-399.

Ikenishi K. y Nieuwkoop. 1978. Location and ultra structure of primordial germ cell (PGCs) in *Ambystoma mexicanum*. *Develop. Growth and differ.* 20; 1-9.

Itoh T., Kamimura S., Watanabe A. and Onitake K. 2002. Egg-jelly structure promotes efficiency of internal fertilization in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Journal of Experimental Zoology*. 229: 314-322.

Johnson Andrew D., Drum M., R. F., Masi T., White M. E. and Crother B. I. 2003. Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution. *Evolution & Development*. 5:414-431.

- Johnson A. D., Bachvarova R. F., Drum M. and Masi T. 2001. Expression of Axolotl DAZL RNA, a marker of germ plasm: Widespread maternal RNA and onset of expression in germ cells approaching the gonad *Developmental Biology*. 234: 402-415.
- Kuntz S., Chardard D., Chesnel A., Ducatez M., Callier M. and Flament S. 2004. Expression of aromatase and steroidogenic factor 1 in the lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology*. 145: 3111-3114.
- Matova N. and Cooley L., 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Developmental Biology*. 231: 291-320.
- Mazaud S., Oréal E., Guigon C. J., Carré-Eusébe D. and Magre S. 2002. Lhx9 expression during gonadal morphogenesis as related to the state cell differentiation. *Gene Expression patterns*. 2: 373-7.
- Meyers-Wallen V. N. 2005. Sf1 and mis expression: Molecular milestones in the canine sex determination pathway. *Mol Repro Dev*. 70: 383-9.
- Osawa N., Oshima Y. and Nakamura M. 2005. Molecular cloning of Dmrt1 and its expression in the gonad of xenopus. *Zoological Science* 22: 681-687.
- Paniagua R. y Nistal M. 1983. Introducción a la histología animal comparada. Ed. Labor Universitaria. España. 309-310.
- Park S.Y., Meeks J. J., Raverot G., Pfaff L. E., Weiss J., Hammer G. D. and Jameson J. L. 2005. Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development and disease*. 132: 2415-23.
- Pesce M., Groos M. K. and Schöler H. R. 1998. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *BioEssays*. 20: 722-732.
- Pierantoni R., Cobellis G., Meccariello R., Palmiero C., Fienga G., Minucci S. and Fasano S. 2002. The amphibian testis as model to study germ cell progresión during spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 132: 131-139.

- Sáez F. J., Madrid J. F., Alonso E. and Hernandez F. 2001. Glycan composition of follicle (Sertoli) cells of the amphibian *Pleurodeles waltl*. A lectin Histochemical study. *J. Anat.* 198: 673-681.
- Sever D. M. 2002. Female sperm storage in amphibians. *Journal of Experimental Zoology.* 292: 165-179.
- Shin-ichi Abé. 2004. Hormonal control of meiosis initiation in the testis from Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zoological science.* 21: 691-704.
- Suzuki N. and Garbers D. L. 1984. Stimulation of sperm respiration by speract and resact at alkaline extracellular pH. *Biology of Reproduction.* 30: 1167-1174.
- Takashi K. 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Development Growth & Differentiation.* 35:237-243.
- Tamori Y., Iwai T., Mita K. and Wakahara M. 2004. Spatio-temporal expression of a DAZ-like gene in the Japanese newt *Cynops pyrrhogaster* that has no germ plasm. *Dev. Genes Evol.* 214: 615-627.
- Van Tienhoven A. 1983. Reproductive physiology of Vertebrates, 2da ed. Cornell University press. 19-37, 104-108, 141-143.
- Vo L. H. and Hedrick J. I. 2000. Independent and hetero-oligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoprotein ZPC in *Xenopus laevis*. *Biol Reprod.* 62: 766-774.
- Ukita M., Itoh T., Watanabe T., Watanabe A. and Onitake K. 1999. Substances for the initiation of sperm motility in egg-jelly of the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zool Sci.* 16: 793-802.
- Ward G., Brokaw C., Garbers D. and Vacquier V. 1985. Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J. Cell Biol.* 101: 2324-2329.
- Watanabe A. y Onitake K. 2002. The Urodele Egg-Coat as the apparatus Adapted for the Internal Fertilization. *Zoological Science.* 19: 1341-1347.

Watanabe T., Itoh T., Watanabe A. and 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.

Wake M. H. and Dickie R. 1998. Oviduct structure and function and reproductive modes in amphibians. *The Journal of Experimental Zoology*. 282: 477-506.

Wilhelm D. y Englert C. 2002. The Wilms tumor suppressor Wt1 regulates early gonad developmental by activation of sf1. *Genes & Developmental*. 16: 1839-51.