



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GONADAL EN EL
AMBYSTOMA MEXICANUM (ANFIBIA: URODELA)**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Eva Mendoza Cruz

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Luis Zambrano González
Instituto de Biología, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. MARZO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GONADAL EN EL
AMBYSTOMA MEXICANUM (ANFIBIA: URODELA)**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Eva Mendoza Cruz

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Luis Zambrano González
Instituto de Biología, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/001/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente.

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité de Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **10 de octubre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del estudiante **MENDOZA CRUZ EVA** con número de cuenta **89380943** con la tesis titulada: **"DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GONADAL EN EL AMBYSTOMA MEXICANUM (ANFIBIA:URODELA)"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ:**

Presidente:	DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
Vocal:	DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE
Vocal:	DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Vocal:	DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ
Secretario:	DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de enero de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica** (PAPIIT), con número de proyecto IN211920.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por la beca otorgada para estudios de posgrado a nivel doctorado con número de registro 103095.

A mi tutora principal:

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz, Facultad de Ciencias, UNAM.

A mi comité tutor:

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Luis Zambrano González, Instituto de Biología, UNAM.

Agradecimientos personales

A mi alma mater la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por permitirme ser parte de su comunidad desde el bachillerato hasta mis estudios de Doctorado.

A la **Facultad de Ciencias** por permitirme cumplir mi meta de ser Bióloga y seguir descubriendo el maravilloso y diverso mundo de la Biología.

A mi tutora principal la **Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz**, por permitirme trabajar en este proyecto bajo su dirección, por orientarme durante el transcurso del doctorado y por su apoyo incondicional a lo largo de mi trayectoria académica y profesional.

A la **Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza** por permitirme realizar las técnicas de inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, RT-PCR y Wester blot en su laboratorio, así como su apoyo y valiosos comentarios para enriquecer la presente investigación.

Al **Dr. Luis Zambrano González** por la donación de las puestas de *Ambystoma mexicanum* empleadas en la presente investigación, así como por su apoyo, disposición y valiosos comentarios durante la presente investigación.

A mi **Comité de Candidatura**

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Dra. Patricia Riva Manzano

Dr. Horacio Merchant Larios

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Dr. Héctor Maximino Rodríguez Magadan

A mi **Comité para la obtención de Grado**

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Dra. María Cristina Revilla Monsalve

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Dr. Edmundo Bonilla González

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

A la técnica académica **M. en C. María Estela Pérez Cruz** por su apoyo en el cuidado y mantenimiento de los ejemplares de *Ambystoma mexicanum* en el acuario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Al técnico académico **M. en C. Ignacio Andrés Morales Salas** por su apoyo en el cuidado, mantenimiento y reproducción de los ejemplares de *Ambystoma mexicanum* en el acuario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Al **M. en C. Horacio Mena González** por su apoyo en la obtención y mantenimiento de la puesta de huevos del ajolote *Ambystoma mexicanum* en el Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología, UNAM.

Al **Técnico Pedro Medina** por su apoyo en el procesamiento y obtención de cortes finos para microscopía electrónica.

Al **M. en C. Alejandro Marmolejo** por su apoyo en el manejo del ultramicrotomo y asesoría para obtener cortes semifinos.

A **mis amig@s y coleg@s** Dra. Claudia Olivera, Biol. Gladys Molina, Pasante de Biología Jesica Sánchez, Dra. Tania Porras, Dra. Adriana Martínez, Dra. Alma Lilia Álvarez, Biol. Rosario Pintor especialista en microscopía electrónica, M. en C. Juan Carlos Campuzano, por su amistad y apoyo incondicional.

A mis padres por ser mis guías y mi apoyo.
Sé que estarían orgullosos de mí, los amo y extraño.

A Sac-nicté y Caleb por ser mi inspiración y motivación cada día.
Los amo.

A mis herman@s, por ser mis compañeros de aventuras y mi apoyo siempre.
Los quiero.

A mis sobrín@s, por alegrar cada momento de mi vida.

A tí, por estar y ser parte de este logro.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
CAPÍTULO I: Development and gonadal sex differentiation in the neotenic urodele: <i>Ambystoma</i>	
<i>mexicanum</i>.....	31
CAPÍTULO II: Dimorphic protein expression for Sox9 and Foxl2 genes in the testicles and ovaries of the	
urodele amphibian: <i>Ambystoma mexicanum</i>.....	45
CAPÍTULO III: Expresión de los genes <i>Sox 9</i> y <i>Vasa</i> durante la diferenciación gonadal en larvas del anfibio	
urodele: <i>Ambystoma mexicanum</i>	60
DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES.....	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

RESUMEN

En vertebrados, los procesos de determinación y diferenciación sexual gonadal varían en sus procesos morfogénéticos y en la expresión de genes involucrados en estos procesos, la cual puede estar conservada o no entre los diferentes grupos. Dado que *Ambystoma mexicanum* es un anfibio urodelo neoténico, es importante conocer si durante el proceso de diferenciación gonadal, los genes que intervienen en él, siguen un patrón ya conocido. Especialmente porque es un organismo que no presenta metamorfosis y que en general los cambios morfológicos más evidentes en diferentes órganos y sistemas incluyendo el reproductor se dan durante este proceso en los organismos que sí presentan metamorfosis. En este contexto, estudios histológicos, morfológicos y expresión génica, que correlacionen las etapas del desarrollo embrionario y larval con la diferenciación gonadal en el *A. mexicanum* son importantes y necesarios. Por lo que en la presente tesis se caracterizó la morfología de la gónada en diferenciación, así como la expresión de algunos genes que intervienen durante este proceso en el anfibio urodelo *Ambystoma mexicanum*. Siendo los objetivos de esta investigación: Determinar las etapas del desarrollo embrionario y larval, en las que se establece la gónada indiferenciada, la diferenciación a un ovario o a un testículo, así como los eventos morfológicos que se llevan a cabo durante dichos procesos. Describir el patrón de expresión de los genes *Vasa*, *Sox9* y *Foxl2*, corroborando a nivel semicuantitativo la expresión de éstos. Describir el patrón de expresión de los genes *Sox 9* y *Vasa* durante la diferenciación gonadal en larvas del anfibio urodelo: *Ambystoma mexicanum*.

Integrando la información obtenida podemos concluir, que la morfogénesis gonadal de *Ambystoma mexicanum* es independiente de la edad larval y coincide con lo observado

en otros urodelos. La condición de neotenia no influye sobre el proceso de la diferenciación gonadal, ya que el desarrollo de la gónada ocurre en estadios de desarrollo similares a los de especies de urodelos que sufren metamorfosis, por lo que se sugiere involucra un proceso de heterocronia. En relación a la expresión génica de *Sox9*, *Foxl2* y *Vasa*, podemos indicar que en *A. mexicanum* la expresión de estos genes es dimórfica, siendo similar a lo descrito para otras especies de vertebrados, lo que sugiere que los mecanismos moleculares en *A. mexicanum* no son modificados por el proceso de neotenia que presenta este anfibio urodelo.

ABSTRACT

In vertebrates, the processes of gonadal sex determination and differentiation vary in their morphogenetic processes and in the expression of genes involved in these processes that may or may not be conserved between the different groups. Since *Ambystoma mexicanum* is a neotenic urodele amphibian, it is important to know if during the gonadal differentiation processes and the expression of genes involved in this process follows a known pattern. Especially because it is an organism that does not present metamorphosis and that, in general, the most evident morphological changes in different organs and systems, including the reproductive one, occur during this process in organism that do present metamorphosis. In this context, histological, morphological and gene expression studies that correlate the stages of embryonic and larval development with gonadal differentiation in *A. mexicanum* are important and necessary. Therefore, in this thesis, the gonad in differentiation was characterized, as well as the expression of some genes that intervene during this process in the urodel amphibian *Ambystoma mexicanum*. Being the objectives of this research: determine the stages of embryonic and larval development, in which the undifferentiated gonad is established, the differentiation to an ovary or a testicle, as well as the morphological events that take place during said processes. Describe the expression pattern of *Vasa* genes, *Sox9* and *Foxl2*, corroborating at a semi-quantitative level the expression of these and describing the expression pattern of *Sox9* and *Vasa* during gonadal differentiation in larvae of the amphibian urodele: *Ambystoma mexicanum*.

Integrating the information obtained in the aforementioned chapters, we can conclude that the gonadal morphogenesis of *Ambystoma mexicanum* is independent of larval age and coincides with that observed in other urodeles. The neoteny condition does

not influence the process of gonadal differentiation, since the development of the gonad occurs instages of development similar to those of urodele species that undergo metamorphosis, so it is suggested that it involves process of heterochrony. In relation to the gene expression of *Sox9*, *Foxl2* and *Vasa*, we can indicate that in *A. mexicanum* the expression of these genes is dimorphic, being similar to that described for other vertebrate species, which suggest that the molecular mechanism in *A. mexicanum* are not modified by neoteny process that this urodel amphibian presents.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El proceso de determinación sexual (DS) es esencial en la biología reproductiva de los organismos (Zhen y Wan, 2014). Hayes (1998), define al mecanismo de determinación sexual como el proceso que compromete a la gónada bipotencial para que ésta se desarrolle como un ovario o un testículo.

En vertebrados existen dos sistemas de determinación sexual: genética y ambiental (Hayes, 1998; Sarre et al. 2011; Flament et al. 2011). La determinación sexual genética (DSG) está dada por la presencia de cromosomas sexuales (XX/XY, ZZ/ZW), donde el sexo se establece por la constitución cromosómica heteromórfica (XY/ZW) como ocurre en los mamíferos, reptiles, aves y peces (Guerrero y Moreno, 2010), en el caso de los anfibios anuros aproximadamente el 4% presentan cromosomas sexuales citológicamente identificados como en *Rana clamitans*, *R. pipiens*, *Hyla japonica*, *Bombina orientalis* (Flament et al., 2011; Roco et al, 2021), en los anfibios urodelos *Pleurodeles waltl*, *Triturus alpestri*, *T. vulgaris*, *T. cristatus* y *T. carnifex* también se han identificado cromosomas sexuales (Hayes, 1998; Flament et al. 2011; Hillis y Green 1990; Wallace et al. 1999; Eggert, 2004).

La determinación sexual ambiental (DSA) es un mecanismo que depende de factores ambientales para que se determine el sexo gonadal de un individuo durante su desarrollo (Shoemaker et al. 2009; Trukina et al. 2013). En peces los principales factores ambientales son la temperatura y el pH, así como los factores sociales (la densidad poblacional, la proporción de machos y hembras en la población) (Baroiller et al. 1999; Guerrero y Moreno, 2010). En reptiles se ha reportado ampliamente que la temperatura es

el principal factor ambiental determinante del sexo (Gutiérrez et al. 1984; Bull, 1985; Pieau et al. 2001; Martínez y Moreno, 2019). En anfibios se ha observado que la determinación sexual también puede realizarse por factores ambientales como la temperatura (Hayes, 1998; Wallace et al. 1999; Sarre et al. 2011; Flament et al. 2011; Roco et al. 2021). Sin embargo, también es evidente que las hormonas esteroides, los estrógenos y los andrógenos, pueden inducir fácilmente una reversión sexual y modificar la determinación sexual genética (Flament, 2016; Dournon et al. 1990).

Se ha propuesto que los anfibios urodelos son un buen modelo para estudiar algunos procesos relacionados con los mecanismos de determinación y diferenciación sexual gonadal, no obstante no hay estudios recientes que aborden ambos temas, dando pie a que se investigue cómo se llevan a cabo estos procesos (Hayes, 1998; Smith y Voss, 2009). Además, los urodelos son organismos que se pueden mantener en condiciones de laboratorio, son de fácil manipulación, las hembras presentan huevos desarrollándose en los oviductos (Roco et al. 2021), así mismo producen muchos huevos por puesta y las larvas absorben con facilidad hormonas o sustancias químicas que se adicionan al agua (Hayes, 1998). Estas características hacen que los urodelos sean considerados un buen grupo para la investigación (Roco et al. 2021).

Basándonos en esta información y tomando en cuenta que *Ambystoma mexicanum* es un urodelo endémico de México y que se encuentra en la lista de especies amenazadas, es de suma importancia protegerlo y conservarlo. Por lo que el conocimiento obtenido en este estudio sobre los eventos involucrados desde el inicio de su diferenciación gonadal hasta que ésta se diferencia, así como su actividad reproductora y la cascada génica intrínseca en estos eventos, nos ayudarán a entender eventos biológicos que permitan en un momento dado preservar la especie.

En la actualidad son pocos los estudios relacionados con los procesos de diferenciación y reproducción de este urodelo, por lo que esta investigación aportará información relevante.

ANTECEDENTES

DETERMINACIÓN SEXUAL EN URODELOS

Determinación sexual genética (DSG)

En urodelos como *Pleurodeles waltl*, *Ambystoma mexicanum*, *A. tigrinum*, *A. dumerilli*, *A. opacum*, *A. laterale*, *Hynobius retardatus*, *Chiropterotriton dimidiatus* y *Aneides ferreus*, la determinación sexual es genética, mostrando un sistema cromosómico ZZ/ZW igual que las aves (Dournon et al. 1984; Hillis y Green, 1990; Wallace et al. 1999; Wallace y Wallace, 2000). Por otra parte en los urodelos *Dendrotriton bromeliacea*, *D. cuchumatanes*, *D. rabbi*, *D. xoloccalcae*, *Hydromantes ambrosii*, *H. flavus*, *H. imperialis*, *H. italicus*, *H. sp*, *Nototriton picadoi*, *N. veraepacis*, *Oedipina pamipes*, *Thorius dubitus*, *T. pennatulus*, *T. sp*, *Necturus alabamensis*, *N. beyeri*, *N. lewesi*, *N. maculosus* *N. punctatus*, *Triturus alpestris*, *T. cristatus*, *T. c. carnifex*, *T. helveticus*, *T. italicus*, *T. marmoratus* y *T. vulgaris* se ha descrito un sistema cromosómico XY/XX (Hillis y Green, 1990) al igual que en los mamíferos (Cuadro 1). En este sistema el cromosoma Y promueve la diferenciación hacia machos, siendo este el sexo heterogamético. En contraste, en el sistema ZW se ha indicado que el cromosoma W promueve la diferenciación sexual hacia hembras, siendo este el sexo heterogamético (Hillis y Green, 1990; Lacroix et al. 1990).

Determinación sexual ambiental (DSA)

En algunas especies de urodelos se ha descrito la determinación sexual ambiental (DSA) como el mecanismo de determinación sexual, siendo la temperatura el principal factor involucrado (Cuadro 1). De esta manera, se ha sugerido que la temperatura influye durante la determinación sexual en una etapa crítica del desarrollo embrionario temprano conocido como periodo termosensible (Sarre et al. 2011; Angelopoulou et al. 2012; Ruiz-García et al. 2021).

Cuadro 1. Determinación Sexual en Vertebrados.

GRUPO	DETERMINACION SEXUAL	SISTEMA CROMOSOMICO	ESPECIES	REFERENCIA
MAMÍFEROS	GENÉTICA	XX/XY	<i>Bos primigenius taurus</i> , <i>B. taurus</i> , <i>B. indicus</i> , <i>Ellobius sp.</i> , <i>Tokudaia sp.</i> , <i>Mus musculus</i> .	Sarre et al. 2011; Elsik et al. 2009; Trukina et al. 2013.
AVES	GENÉTICA	ZZ/ZW	<i>Delichon urbica</i> ; <i>Amazilia boucardi</i> , <i>Ara militaris</i> , <i>Cairina moschata</i> , <i>Gallus gallus</i> .	Trukina et al. 2013, Sánchez et al. 2015.
REPTILES	GENÉTICA	ZZ/ZW XX/XY	<i>Bothrops asper</i> , <i>B. nigroviridis</i> , <i>B. schlegeli</i> , <i>B. nummifer</i> , <i>Crotalus durissus durissus</i> , <i>Xenodon rabdocephalus</i> , <i>Imantodes cenchoa</i> , <i>Leimadophis epinephalus</i> , <i>Erythrolamprus bizonus</i> , <i>Drymobius margantiferus</i> , <i>Bassiana duperreyi</i> , <i>Pogona vitticeps</i> , <i>Sceloporus poinsetti</i> .	Gutiérrez et al. 1979; Gutiérrez et al. 1984; Warner et al. 2011.
	AMBIENTAL (°T)		<i>Gekko bokouensis</i> , <i>Pelodiscus sinensis</i> , <i>Amphibolurus norrisi</i> , <i>A. muricatus</i> , <i>Niveoscincus ocellatus</i> , <i>Caimán yacaré</i> ; <i>Alligator mississippiensis</i> , <i>A. sinensis</i> ; <i>Cocodylus siamensis</i> , <i>C. johnstoni</i> ; <i>C. porosus</i> , <i>C. palustris</i> , <i>Emys orbicularis</i> , <i>Testudo graeca</i> , <i>Chelydra serpentina</i> , <i>Lepidochelys olivacea</i>	Sarre et al. 2011; Arenas et al. 2001; Gutiérrez et al. 1979; Lang et al. 1989; Deeming et al. 1989; Webb et al. 1987; Pieau, 1971, 1972; Yntema, 1976; McCoy et al., 1983; Merchant-Larios et al., 1989.
ANFIBIOS	GENÉTICA	XX/XY ZZ/ZW	<i>Xenopus laevis</i> , <i>Rana rugosa</i> , <i>Triturus cristatus</i> , <i>Pleurodeles waltl</i> , <i>Ambystoma mexicanum</i> , <i>A. tigrinum</i> , <i>A. dumerilli</i> .	Hillis y Green, 1990; Wallace y Wallace, 2000; Dournon y Houillon, 1984.
	AMBIENTAL (°T)		<i>Rana temporaria</i> , <i>R. sylvatica</i> , <i>Hyperolius viridiflavus</i> , <i>Bufo boreas</i> , <i>B. vulgaris</i> y <i>Ptychocheilus adspersus</i> , <i>P. poiretti</i> , <i>Hynobius retardatus</i> , <i>Triturus cristatus carnifex</i> ; <i>Leippelma hamiltoni</i> ; <i>L. hochsterteri</i> .	Hayes, 1998; Dournon y Houillon, 1984; Chardard et al. 1995; Wallace et al. 1999; Sarre et al. 2011; Trukina et al. 2013.
PECES	GENÉTICA/ AMBIENTAL	XX/XY ZZ/ZW	<i>Dicentrarchus labrax</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Gramma loreto</i> , <i>Xiphophorus maculatus</i> , <i>Oryzias latipes</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> , <i>O. aureus</i> y <i>Gambusia</i> .	Devlin y Nagaham, 2002; Guerrero y Mendoza, 2010.

DIFERENCIACION SEXUAL EN URODELOS

La diferenciación sexual hace referencia al proceso de desarrollo gonadal una vez determinado el sexo genético del embrión; en un momento específico del desarrollo embrionario, se expresarán los genes involucrados en la diferenciación sexual gonadal (Hayes, 1998; Salame y Villalpando 1998). Durante la diferenciación sexual, la gónada bipotencial indiferenciada, ya comprometida se desarrollará hacia un ovario o hacia un testículo (Hayes, 1998).

Las gónadas indiferenciadas se originan de un empaquetamiento de células localizadas en la región ventro-medial de la mitad media anterior del mesonefros. Inicialmente se observan como estructuras sólidas, que presentan en la periferia una corteza conformada por un epitelio celómico y células germinales primordiales (CGPs) de origen extragonadal. En la parte central de la gónada indiferenciada, encontramos la región de la médula constituida por células somáticas (Wallace et al. 1999; Kuntz et al. 2003; Dumond et al. 2008). Si la gónada indiferenciada se compromete hacia un ovario, la región de la corteza prolifera y se engrosa, mientras que la médula entra en un proceso de regresión, dando origen a la cavidad ovárica. Las células germinales localizadas en la corteza dan origen a las ovogonias y posteriormente a los ovocitos. Por el contrario, si la gónada indiferenciada es comprometida hacia testículo, las células germinales migran hacia la región medular dando origen a las espermatogonias y espermatoцитos; mientras que las células de la corteza darán origen a la túnica albugínea (Hayes, 1998; Flament et al. 2011, Fig. 1).

Se han propuesto dos hipótesis para explicar el proceso de diferenciación gonadal en anfibios. Witschi (1957), postula que la diferenciación sexual gonadal es el resultado de

interacciones antagónicas entre las dos regiones que conforman la gónada indiferenciada, la corteza y la médula. De esta manera, la diferenciación morfológica de la gónada sigue un patrón simétrico, en donde la acción dominante de uno u otro de los componentes somáticos (medular o cortical), sobre las células germinales bipotenciales determina el camino morfológico a seguir (testicular u ovárico) (El Jamil et al. 2008). Contrario a este modelo, Falconi et al. (2004), sugieren que la diferenciación gonadal sigue un patrón asimétrico, es decir, que las células somáticas y germinales juegan un papel diferente en hembras y machos. De esta manera, en la gónada femenina las células germinales estimulan a las células somáticas a diferenciarse en un ovario. Mientras que, en la gónada masculina, las células somáticas se diferencian en una estructura testicular que provoca que las células germinales se diferencien en espermatogonias (El Jamil et al. 2008).

Estudios realizados en anuros, sobre todo en la familia Ranidae, indican que la corteza se deriva del epitelio celómico, mientras que la médula es originada a partir del blastema mesonéfrico sin aportación del epitelio celómico como en *Rana sylvatica* y *R. arora e Hyla regilla* (Hayes, 1998). Otras investigaciones indican que en *R. esculenta* y *R. dalmatina*, el blastema interrenal como el blastema mesonéfrico origina tanto a las células de la corteza como a las de la médula, lo que sugiere que en etapas tempranas del desarrollo gonadal la corteza y la médula tienen un mismo origen (Hayes, 1998). En el caso de *Xenopus laevis*, *Rana pipiens* y *Rhacophorus arboreus*, se ha indicado que el epitelio celómico no solo forma a la corteza sino también a la región medular, dando así un origen común a estas dos regiones (Flament et al. 2011; Merchant, 1978; Merchant, y Villalpando, 1981). Por su parte Vannini (1941) sugiere que la región medular se origina del blastema interrenal en *Rana agilis*, *Bufo bufo*, *B. viridis*, *Bombina pachypus* y en dos salamandras, *Triton* sp. Como se observa en los trabajos anteriores, los autores tienen diferentes puntos

de vista. Por lo que son necesarios más estudios en anfibios, particularmente en urodelos para aclarar el origen de las regiones que conforman la gónada indiferenciada.

Origen de las células germinales

Durante el desarrollo embrionario, son evidentes dos linajes celulares: las células somáticas y las células germinales. Las células somáticas son aquellas células que conforman a los tejidos y órganos, originadas durante el desarrollo embrionario y están estrechamente relacionadas con las células germinales. Las células germinales son el único linaje celular que lleva a cabo divisiones meióticas con la finalidad de reducir el número cromosómico, llevar a cabo la recombinación genética y conservar la variabilidad en las especies. Tienen un origen extraembrionario y son las precursoras de los espermatozoides y ovocitos en machos y hembras respectivamente (Bachvarova et al. 2009a).

El origen y especificación de la línea germinal es controversial y se ha catalogado como un mecanismo especie-específico. En urodelos se ha propuesto un modelo conservado de especificación llamado epigénesis, este modelo menciona que células pluripotenciales son inducidas por señales extracelulares para diferenciarse en CGPs, como sucede en mamíferos (Nieuwkoop y Sutasurya, 1979; Nieuwkoop y Sutasurya, 1981; Wakahara, 1996; Johnson et al. 2003b; Hayashi et al. 2007; Dumond et al. 2008; Johnson et al. 2011; Maufroid y Capuron, 1985; Johnson et al. 2001). Algunos autores proponen que las CGPs se originan del mesodermo a partir de células somáticas en etapas avanzadas del desarrollo embrionario (Capuron, 1972; Wakahara, 1996; Dumond et al. 2008). En adición, indican que, a diferencia de otros vertebrados, las células germinales no migran ni se mueven independientemente, sino que estas son posicionadas por cambios

morfogenéticos durante el desarrollo embrionario (Capuron, 1972; Humphrey, 1929; Nieuwkoop, 1947; Smith, 1964; Capuron, 1968). La especificación del linaje germinal en la mayoría de los vertebrados se lleva a cabo temprano en la embriogénesis, cuando el destino de la célula se ha establecido. El proceso de epigénesis en urodelos fue descrito por primera vez en la salamandra *Triturus pyrrhogaster* (Wakahara, 1996). En estos estudios se observó que la inducción de las CGPs del ectodermo primitivo en ajolotes se daba en respuesta a señales que inducen al mesodermo ventral, siendo consistente con el origen de las CGPs en urodelos (Johnson et al. 2001; Ogielska y Bartmanska, 2009), pero esta señalización aun no es del todo clara (Wakahara, 1996).

En las gónadas de urodelos de los géneros *Ambystoma*, *Pleurodeles*, *Hynobius* y *Cynops*, se ha propuesto que las CGPs son el producto de interacciones inductivas durante el desarrollo embrionario. En *Cynops pyrrhogaster* se ha propuesto que el origen de las CGPs se da en el polo animal o del ectodermo, debido a la presencia de gránulos de pigmento en el citoplasma de dichas células. En larvas en etapa de gástrula de *P. waltl*, se sugiere que las células germinales fueron inducidas por células endodérmicas del ectodermo dorsal dentro del endodermo presuntivo, e inducen la diferenciación de la notocorda, somitas y túbulos pronéfricos y el endodermo ventral promueve la diferenciación del mesénquima y de las CGPs (Maufroid y Capuron, 1977b; Dournon y Houillon, 1985, ver Dournon et al. 1989; Dumond et al. 2008). En *P. waltl* durante la etapa 35 las CGPs se localizan en la región posterior del cuerpo de la larva cercanas al conducto de Wolff y de la futura cloaca (ver Dournon et al. 1989) y la migración hacia las crestas urogenitales toma lugar entre los estadios 35 y 41 de desarrollo embrionario (Komiya et al. 1994).

Especificación de las células germinales

La información disponible sobre la especificación de las células germinales primordiales en urodelos es parcial, debido que existen pocos estudios que involucran marcadores específicos para estas células. Uno de estos marcadores, es el gen *Vasa*, el cual se expresa en las células de la línea germinal muy temprano en el desarrollo embrionario. La expresión de la proteína de este gen se detecta en el citoplasma de las células germinales y es un gen conservado en los cinco grupos de vertebrados y algunos invertebrados (Bachvarova et al. 2009a; Komiya et al. 1994; Olsen et al. 1997; Castrillon et al. 2000; Bachvarova et al. 2009b). En el urodelo *P. waltl* se ha observado la expresión del gen *Vasa* en larvas del estadio 33 cercano a la eclosión, lo que puede indicar que su expresión es tardía durante el desarrollo en esta especie (Al-assad et al. 2012). En *A. mexicanum* se ha observado la expresión de *Vasa* durante la segmentación y gastrulación (Bachvarova et al. 2004), esta expresión decrece en el estadio 12 y en estadio 40 hay poca expresión de este gen. Conforme avanza el desarrollo en el estadio 45, la expresión de *Vasa* se localiza en la región dorsal del cuerpo donde se han localizado a las células germinales (Bachvarova et al. 2004). Estudios filogenéticos indican que el gen *PwVasa* está estrechamente relacionado con el gen *Vasa* de *A. mexicanum*. Pruebas de RT-PCR demuestran que los transcritos de *Vasa* se expresan sólo en el complejo gónada-mesonefros en larvas de ambos sexos y en ovarios y testículos de individuos adultos (Dumond et al. 2008).

En *A. mexicanum* el gen *Axdazl*, un homólogo del gen *Dazl* (otro marcador molecular de las células germinales) (Johnson et al. 2001; Bachvarova et al. 2004), se ha descrito como un factor característico de las células germinales que se expresa temprano en el desarrollo gonadal (Tamori et al. 2004). Se ha descrito que el RNA de *Axdazl*, se expresa durante la embriogénesis en la zona marginal, pero se extiende a lo largo de los hemisferios

animal y vegetal a los 10.75 días postfertilización (dpf) y su expresión es específica para células germinales al inicio de la etapa (Johnson et al. 2001). En *Cynops pyrrhogaster* el transcrito *Cydazl* y la proteína, se detectan en células germinales que han llegado a la cresta genital y que han sido rodeadas por células somáticas, así como en células germinales que proliferan en la gónada durante los estadios de gónada indiferenciada y al inicio de la diferenciación (Flament et al. 2009). Estas observaciones apoyan la conclusión de Johnson et al. (2003b) de que los anfibios urodelos no presentan plasma germinal y que el gen *Dazl*, relacionado con la expresión específica de las células germinales, es inducido por señalización en el embrión (Picheral, 1968).

Otro marcador de la línea germinal que es requerido para la supervivencia y proliferación de las CGPs, es el gen *Oct-4*. En *A. mexicanum* no se detectó expresión de *Axoct-4* en CGPs de embriones o larvas de estadios tempranos, su expresión se localizó en el mesodermo presuntivo de la blástula y gástrula. El RNAm de *Axoct-4* materno es detectado en embriones en estadio de segmentación aumentando su expresión conforme avanza el desarrollo embrionario (Bachvarova et al. 2004).

Estos estudios apoyan lo propuesto para urodelos en cuanto al modo de especificación de las células germinales primordiales que es por inducción, a través de señales célula a célula.

Gónada indiferenciada

Hasta el momento, los estudios sobre la morfogénesis gonadal en urodelos como *P. waltl* concuerdan en que la gónada indiferenciada se forma a partir de un empaquetamiento de células localizadas en la mitad anterior del mesonefros, iniciándose así la formación de

la cresta urogenital. Las células germinales de origen extragonadal migran para colonizar la cresta urogenital, la cual se localiza en la región posterior del mesonefros, cercana al conducto de Wolff y de la futura cloaca. En *P. waltl* la migración de las CGPs toma lugar entre los estadios 35 y 41 del desarrollo y el establecimiento de la gónada indiferenciada se observa entre los estadios 42 al 53. En estos estadios, la gónada indiferenciada se observa suspendida en la cavidad celómica junto con algunas células somáticas de la cresta urogenital. La periferia de la gónada indiferenciada es la corteza que se deriva del epitelio celómico y contiene células germinales en la parte central, la médula es derivada del blastema del mesonefros y contiene solo células somáticas (Flament et al. 2011; Kuntz et al. 2003; Dumond et al. 2008). En estadio 50 la gónada indiferenciada, se separa del cuerpo graso y los primeros eventos morfológicos de diferenciación sexual se observan en el estadio 53 (Dumond et al. 2008).

Diferenciación ovárica

La primera manifestación de diferenciación morfológica de la gónada fue caracterizada por un ovario, donde se forma una cavidad central debido a la regresión o eliminación de las células transitorias que componen la región medular y el desarrollo de la corteza por proliferación de las células que la conforman (Dumond et al. 2008).

En *P. waltl*, la diferenciación del ovario inicia con una modificación en la localización de las CGPs, así como con el incremento en el número de células somáticas de la gónada. En larvas ZW de estadio 54, las ovogonias se ubican en la corteza en donde proliferan junto con las células somáticas y forman una estructura compacta. Durante esta etapa, se empiezan a formar pequeñas cavidades en la región medular, las cuales se alargan

y se fusionan. De esta manera, la médula se observa como un compartimento delgado y está constituida por una capa sencilla de epitelio que forma el saco del ovario en la región central. La gónada incrementa de tamaño, el desarrollo de la región cortical continua, en donde las células germinales continúan dividiéndose por mitosis y hay un incremento en el volumen de la cavidad ovárica. Al final de la metamorfosis de los organismos, los ovarios contienen solo nidos de células germinales en la región cortical y ovocitos rodeados de células foliculares hacia el centro de la gónada (Dumond et al. 2008; El Jamil et al. 2008). En este estadio 54, las ovogonias se empiezan a asociar con las células somáticas para dar inicio con el proceso de foliculogénesis. Estas ovogonias entran en la primera división meiótica y se detienen en la profase I. El ovario se diferencia como un ovisaco y la médula sufre una regresión dando origen a la cavidad ovárica (Dumond et al. 2008).

Diferenciación testicular

La mayoría de los caudados son atípicos en relación con la diferenciación testicular. En Salamandridae, los machos poseen testículos multilobulados que se siguen diferenciando durante la vida adulta (Flament et al. 2009).

A diferencia de las hembras genéticas, en larvas ZZ las células germinales colonizan la región de la medula donde se asocian con las células somáticas de Sertoli formando unidades llamadas cistos constituidos por lóbulos; mientras que la zona cortical es reducida o degenera (Dumond et al. 2008).

Como se mencionó en el urodelo *P. waltl*, durante la etapa de gónada indiferenciada la región cortical está adyacente al epitelio celómico donde se localizan las CGPs que se originan de una región extragonadal. En la parte central de la gónada indiferenciada se encuentra la médula que se deriva del blastema mesonéfrico. Al inicio de la diferenciación

testicular, los primeros eventos morfogenéticos se restringen a la parte posterior de la gónada, en estadio 53. En este estadio, las células germinales migran de la región de la corteza hacia la médula en donde junto con las células de Sertoli se agrupan en unidades llamados cistos, los cuales a su vez están contenidos en lóbulos. Posteriormente, la corteza desprovista de células germinales forma la túnica albugínea, que envuelve al testículo (Tamori et al. 2004). Algunos eventos suceden después de la metamorfosis especialmente en machos, la meiosis ocurre en animales jóvenes y, en adultos se forma un testículo con varios lóbulos (Dumond et al. 2011, ver Flament et al. 2009).

Genes involucrados en la diferenciación gonadal

En anfibios la caracterización de los genes involucrados en la diferenciación gonadal se basa principalmente en estudios realizados en mamíferos (Cuadros 2 y 3), en donde genes ortólogos (*dmrt1*, *sox9*, *foxl2*, *amh*, *dax1*, *wnt4*, *sfl*, etc.), que se sabe forman parte de la vía de diferenciación gonadal en mamíferos, se han tomado en cuenta para ver su expresión y ser analizados durante el desarrollo gonadal de urodelos (Piprek et al. 2013; Mawaribuchi et al. 2017).

En algunas especies de anfibios pueden ser identificadas secuencias de genes de la familia *Sox* (factores de transcripción), aunque aún no se sabe el papel que tenga el gen *Sox9* durante la diferenciación sexual de este grupo, debido a que ha sido poco estudiado. En larvas de *P. waltl* de ambos sexos, la expresión del RNAm del factor de transcripción *Sox9*, involucrado en la determinación y diferenciación testicular en mamíferos, fue detectada tanto en la gónada como en el mesonefros durante el estadio 42 correspondiente a la etapa de gónada indiferenciada y mantiene su expresión durante todo el periodo termosensible (del estadio 42 al 54). El RNAm de *Sox9* es producido tanto en el testículo

como en el ovario durante el estadio 54, siendo expresado mayormente en el testículo en estadios tardíos de su desarrollo al final de la metamorfosis (estadio 56). El patrón de expresión de *Pwsox9* (ortólogo de *Sox9* clonado para *P. waltl*) se observó en los complejos gónada/mesonefros, en ambos sexos. En el testículo su expresión se observó tanto en el núcleo de las células somáticas como de las células germinales. En el ovario el patrón de expresión de *Pwsox9* se localizó solo en el citoplasma de ambos tipos celulares (Joss et al. 2006) (Cuadro 2).

La hormona antimulleriana (Amh) o sustancia inhibidora del conducto de Müller (Mis) es miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes β (TGF- β) (Al-Assad et al. 2013). Esta hormona es secretada durante los primeros eventos de la determinación sexual masculina por las células de Sertoli. Su expresión provoca una degeneración de los conductos de Müller, por lo que se impide el desarrollo de los genitales internos característicos de las hembras. La expresión de *Mis* se ha reportado en reptiles, aves, peces y mamíferos; siendo expresada sólo en machos. *Mis* nunca ha sido descrita en anfibios y su existencia en Caudados no es contundente, ya que en machos adultos los conductos de Müller se mantienen. En larvas de *P. waltl* se han observado altos niveles de expresión del RNAm de *Mis* en el complejo gónada-mesonefros tanto en hembras como en machos, así como en las etapas de la diferenciación gonadal (Nakamura et al. 2012). Después de la metamorfosis un decremento de *Mis* en el testículo es observado al igual que en hembras. En organismos adultos el RNAm de *Mis* es detectado en las gónadas de ambos sexos, además se ha observado un incremento durante la diferenciación testicular y su expresión fue localizada en las células de Sertoli (Nakamura et al. 2012; Raymond et al. 1999; Márquez y López, 2004) (Cuadro 2).

La expresión de la proteína del gen *sfl* (factor esteroideogénico 1, receptor nuclear), se expresa inicialmente en el primordio gonadal/adrenal, se continúa expresando en la gónada bipotencial de ambos sexos, presenta una expresión dimórfica durante el desarrollo gonadal (Zarkower, 2001); sin embargo, la expresión es mayor en el ovario (Eggert, 2004).

El gen *Dmrt1* es un factor de transcripción, que codifica proteínas con dedos de zinc unidas a DNA, es un gen conservado en vertebrados e invertebrados (Zanaria et al. 1994; Robertson et al. 1999). Es expresado en testículo de ranas, lo que sugiere que participa en la diferenciación testicular, coincidiendo con algunos otros vertebrados. En la salamandra *Hynobius retardatus*, la expresión del gen *Dmrt1* se localiza en la gónada y complejo mesonéfrico de larvas masculinas durante la diferenciación sexual; cuando las larvas son sometidas a una temperatura de 28°C una supresión en la expresión de *Dmrt1* es inducida, por lo que se producen hembras. En *P. waltl* la expresión de *Dmrt1* no es descrita durante la diferenciación sexual, sino hasta después de la metamorfosis (Flament et al. 2011) (Cuadro 2).

En el caso del gen *Dax1* que codifica a un miembro atípico de la familia de receptores nucleares a hormonas (Nakamura et al. 2012), es expresado en células somáticas durante la diferenciación testicular, reprime la transcripción de *Sfl*, inhibe la expresión de *Sox9*, por lo que es considerado como el gen anti-testículo (Márquez y López, 2004; Merchant y Díaz, 2011; Wilhelm et al. 2007). En anfibios se presenta una expresión sexualmente dimórfica; es decir, se expresa mayormente en testículo que en ovario (Cuadro 3). En el caso de *Sox 3* es expresado exclusivamente en el ovario (Eggert, 2004).

Cuadro 2. Genes involucrados en la diferenciación testicular de anfibios.

Genes de diferenciación testicular		Función de la proteína	Anfibios
<i>SRY</i>	Factor de transcripción	Gen determinante testicular, encargado de iniciar el proceso de diferenciación sexual, induce la expresión de otros genes que participan durante la diferenciación del testículo. Se expresa en el núcleo de células de Sertoli. Su expresión induce la proliferación de células somáticas. Reprime la expresión de la aromatasa P450, inhibiendo la conversión de testosterona a estradiol ayudando al desarrollo fenotípico masculino [Márquez, A y López, A., 2004; Merchant, H. y Díaz, V. 2011; Villareal, S. y Aguilar, X. 2014; Zhen, Y. y Wan, X. 2014]	<i>DM-W</i> En anfibios, es miembro de la familia de genes con dominio-DM. Es un gen determinante del sexo femenino, expresado en la gónada primordial y localizado en las células somáticas que rodean a las células germinales de gónadas ZW [Zhen y Wan, 2014]
<i>Sox 9</i>	Factor de transcripción	Su expresión se observa en gónadas indiferenciadas, es un gen necesario y suficiente para la diferenciación testicular. Se considera un gen crítico para el desarrollo y diferenciación de las células pre-Sertoli y Sertoli. La expresión de <i>Sox9</i> es específica para las células de Sertoli, se expresa en su núcleo y se mantiene durante y después de su diferenciación [Márquez y López, 2004; Villareal y Aguilar, 2014; De Falco y Capel, 2009]	En anfibios <i>Sox9α</i> se expresa sólo en cerebro y testículo. En estado larvario de <i>R. rugosa</i> , dos isoformas <i>Sox9 α</i> y <i>Sox9 β</i> , fueron encontradas no solo en testículo sino también en ovario, lo que indica que la expresión específica para testículo, su expresión fue solo en los núcleos de las células de Sertoli y en el ovario se expresó en células germinales, localizándose en el citoplasma de ovocitos previtelogénicos y en el núcleo de ovocitos vitelogénicos. En <i>Xenopus laevis</i> <i>Sox9</i> es expresado en testículos y complejo mesonéfrico [Flament, et al. 2011]
<i>Dmrt1</i>	Factor de transcripción	Regulador crítico del desarrollo gonadal. Su expresión es mayor en testículo [Wilhelm et al. 2007]	En <i>R. rugosa</i> , es localizado en testículos, se expresa solo en células intersticiales y células de Sertoli. En adultos esta proteína solo se expresa en células germinales [Aoyama et al. 2003]
<i>Amh (Mis)</i>	Hormona	Inicia la diferenciación fisiológica de las células pre-Sertoli y Sertoli. Secretada por las células de Sertoli. Inhibe el desarrollo de los conductos de Müller. El gen de <i>Amh</i> es un gen blanco para <i>Sox9</i> , durante el desarrollo gonadal embrionario [Merchant y Díaz, 2011; Zhen y Wan, 2014; De Falco y Capel, 2009]	

Cuadro 3. Genes involucrados en la diferenciación ovárica de anfibios.

Genes de la diferenciación ovárica		Función de la proteína	Anfibios
<i>DM-W</i>		Es un gen determinante del sexo femenino, se expresa en la gónada primordial y localizado en células somáticas que rodean a las germinales en gónadas ZW (Yoshimoto e Ito, 2011; Sarre et al. 2011; Trukhina et al. 2013; Zhen y Wan, 2014).	Es miembro de la familia de genes con dominio-DM. Se expresa en la gónada primordial y se localiza en células somáticas que rodean a las germinales en gónadas femeninas (Yoshimoto e Ito, 2011; Sarre et al. 2011; Trukhina et al. 2013; Zhen y Wan, 2014).
<i>Wnt4</i>	Molécula de señalización	Se expresa en la gónada femenina, se requiere en la formación de los conductos de Müller, en la diferenciación de células intersticiales para su diferenciación en células de la teca. Requerida para la formación y el mantenimiento de las células germinales del ovario. Se expresa en el mesenquima del mesonefros y el epitelio celómico de las crestas genitales. Reprime las vías de señalización de machos (Humprey et al. 2004, Nakamura et al. 2012; Merchant y Díaz, 2011; Villareal y Aguilar, 2014; Zhen y Wan, 2014).	En <i>R. rugosa</i> fue aislado de testículos y puede ser expresado durante la diferenciación gonadal, cuando aún no hay cambios morfológicos entre testículo y ovario (Nakamura, 2009).
<i>β-catenina</i>	Factor de transcripción	Proteína que reprime la vía de diferenciación testicular de <i>Sox9</i> . A través de su vía de señalización ayuda a la activación de <i>Rspo1</i> (Capel, 2006; Nef y Vassalli, 2001).	
<i>Rspo1</i>	Factor de crecimiento	Actúa mediante la activación de las vías de señalización de WNT y betacatenina, inhibiendo a SOX9. Considerado como el gen determinante del ovario (Márquez y López, 2004; Villareal y Aguilar, 2014).	
<i>Foxl2</i>	Factor de transcripción	Requerido para el mantenimiento de las células de la granulosa. Es activador del gen CYP19 que codifica a la aromatasa, responsable de la biotransformación de andrógenos a estrógenos (Villareal y Aguilar, 2014; Nef y Vassalli, 2001).	En el anuro <i>Rana rugosa</i> , es expresado en cerebro, testículo y ovario, expresándose mayormente en ovario. En <i>X. laevis</i> , se aisló el DNAc de <i>Foxl2</i> , pero no se analizó su patrón de expresión (Oshima et al. 2008).
<i>Dax1</i>	Receptor nuclear	Durante la diferenciación testicular, es expresado en células somáticas. Reprime la transcripción de <i>Sf1</i> . Inhibe la expresión de <i>Sox9</i> , no es requerido para la formación de testículo, por lo que es considerado como el gen anti-testículo. Expresado en el desarrollo de la glándula adrenal, hipotálamo y pituitaria (Márquez y López, 2004; Merchant y Díaz, 2011; Wilhelm et al. 2007).	En <i>R. rugosa</i> se expresa en mayor cantidad en I testículo que en ovario. Después de la metamorfosis. <i>Dax1</i> es expresado solo en gónadas masculinas (Sugita et al. 2001).

Hormonas involucradas en la diferenciación gonadal

En el urodelo *P. waltl*, la presencia de la enzima p450aromatasa (p450arom), que es un complejo enzimático responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos en el testículo, se ha relacionado al igual que en mamíferos, con un papel durante la espermatogénesis (Chardard et al. 1995; Kuntz et al. 2003b; Gallien, 1951). La actividad gonadal de la aromatasa en *P. waltl* presenta diferencias significativas entre la diferenciación de ovario o testículo. Esto es, durante el estadio 52, justo antes de la diferenciación morfológica de la gónada la p450arom incrementa su actividad en larvas femeninas ZW (Kuntz et al. 2003b). Se ha observado que, a altas concentraciones de estrógenos, la actividad del gen Cyp19 que codifica para la p450arom, puede ser inhibida produciendo hembras en los urodelos *Ambystoma punctatum*, *A. tigrinum*, *A. maculatus* y *P. waltl* (Hayes, 1998).

El papel del estradiol durante el desarrollo gonadal en urodelos ha sido estudiado en varias especies incluida *P. waltl*. En esta especie el estradiol tiene un efecto inhibitor que afecta el desarrollo de los conductos de Müller (Chardard et al. 2003) durante su periodo termosensible (estadios 42- 54), provocando una reversión sexual completa en larvas ZZ (Ko et al. 2008). En esta misma especie, se ha observado que el receptor a estrógenos α (ER α), se expresa principalmente en gónadas, cuerpo graso adyacente a la gónada y oviducto; aunque también se expresa en hígado y muy poco en espermiductos e intestino (Tiffocche et al. 1993). Su expresión se correlaciona con el desarrollo del ovario y oviducto durante la diferenciación de hembras (Kuntz et al. 2003b; Arenas et al. 2001). En el caso del testículo, el papel de los ER α se ha relacionado con el papel de los estrógenos en la espermatogénesis como se ha reportado en la salamandra *Triturus marmoratus* (Elsik et al. 2009).

En *P. waltl* la hormona antimulleriana (amh), se expresó en niveles más altos en testículos en desarrollo, antes y durante la diferenciación gonadal al ser comparados con los ovarios (Al-Asaad et al. 2013).

En anfibios los andrógenos tienen un efecto inhibitor que depende no solo de la estructura de estos, sino también de la dosis empleada en los tratamientos. En *P. waltl* se ha reportado que la testosterona causa un efecto inhibitor sobre el desarrollo gonadal en larvas de ambos sexos, provocando que las gónadas no tengan un arreglo estructural normal y además contengan pocas células germinales (Ko et al. 2008).

Generalidades reproductoras en urodelos

Los urodelos pertenecen a la clase Amphibia (Zippel, 2007) y son comúnmente llamados tritones y salamandras. Se caracterizan por sufrir metamorfosis, en la mayoría de los casos, aunque con algunas excepciones (Larson, 1991). El ciclo de vida de estos anfibios generalmente está dividido en tres fases: la primera es la de huevo, y se da en el momento de la puesta; la segunda se produce tras la eclosión y se le conoce como de larva y por último la de metamorfosis, en donde las larvas experimentan importantes cambios fisiológicos y morfológicos (Armstrong y Malacinski, 1989; Bride et al. 2004). En la etapa larvaria la respiración es branquial (viven en el agua), en la adulta su respiración es pulmonar (vida semi-terrestre) (Servín, 2011). Algunas familias de urodelos disponen de pulmones poco desarrollados, por lo que conservan las branquias externas durante toda la vida como es el caso de *Ambystoma mexicanum*, *A. dumerilli*, *A. andersoni*, *A. taylori* y *A. tigrinum* (Servín, 2011). También algunas especies presentan una condición llamada neotenia, que es la capacidad de reproducirse y alcanzar la madurez sexual y reproducirse sin que lleven a cabo la metamorfosis, conservando de esta manera características larvarias

de la etapa acuática durante la madurez. La mayoría de los urodelos presentan fecundación interna; es decir, el macho deposita estructuras que contienen espermatozoides empaquetados conocidas como espermatóforos, para que posteriormente la hembra los recoja con la cloaca llevándolos a su tracto reproductor en donde se lleva a cabo la fecundación (Iwata et al. 2000).

Generalidades del ajolote *Ambystoma mexicanum*

Ambystoma mexicanum, es un anfibio que pertenece a la Clase Amphibia, al Orden Urodela, a la Familia Ambystomatidae, al Genero *Ambystoma* y a la especie *A. mexicanum*, nombre común “ajolote” (Servín, 2011). Es una salamandra neoténica o paedomórfica, es decir alcanza su madurez sexual, conservando características morfológicas del estadio larvario (Eisthen y Krause 2012). Es una especie endémica de México, nativa de los lagos de Xochimilco y Chalco en la Ciudad de México (Zambrano et al. 2004; Eisthen y Krause 2012). Alteraciones en su hábitat para fines agrícolas, introducción de especies no nativas, deterioro y contaminación de su espacio, han degradado gravemente su entorno, debido a esto se encuentran "en peligro crítico" en la Lista Roja de la UICN (Contreras et al. 2009).

Este ajolote habita en aguas lénticas (esto es, con poca o nula corriente de agua), a una temperatura que va de los 10 a los 18 °C y con poca iluminación. Utiliza refugios como plantas acuáticas y diferentes tipos de sustratos, al sentirse amenazado tiende a enterrarse en el fondo del sitio en donde se encuentren. La calidad del agua es un factor muy importante, los parámetros fisicoquímicos que deben considerarse para evaluar la calidad de ésta, son el pH, nitritos, nitratos, amonio, oxígeno disuelto, concentración de cloro, dureza del agua (concentración de sales magnesio y calcio) y temperatura. Si estos

parámetros no son los adecuados, los ajolotes serán susceptibles a contagiarse de bacterias u hongos o enfermarse (Mena y Servin, 2014). Los organismos en estadio larvario se alimentan con larvas de *Artemia franciscana*, mosquito *Culex stigmatosomosa* y *Tubifex tubifex*.

Las salamandras del género *Ambystoma* han sido importantes modelos para los estudios de biología del desarrollo, ecología y evolución (Voss y Smith, 2005; Smith y Voss, 2009). Se han realizado estudios sobre la distribución y conservación de la especie (Contreras et al, 2009; Recuero et al, 2010), sobre su regeneración (Song et al. 2010), así como del mecanismo de neotenia (Thompson et al. 2014), siendo pocos los estudios realizados sobre su determinación y diferenciación sexual.

En vertebrados, a pesar de que la estructura y función de los órganos reproductores en adultos es similar, los procesos de determinación y diferenciación sexual gonadal varían en cuanto a sus procesos morfogénéticos, así como por la expresión de diferentes genes dependiendo de la constitución cromosómica y la función de éstos, la cual puede estar conservada o no entre los diferentes grupos. Dado que *Ambystoma mexicanum* es una especie neoténica consideramos importante conocer si durante el proceso de diferenciación gonadal y la expresión de los genes que intervienen en este proceso sigue un patrón ya conocido, especialmente porque es un organismo que no presenta metamorfosis y que en general los cambios morfológicos más evidentes en diferentes órganos y sistemas incluyendo el reproductor, se dan durante la metamorfosis en los organismos que si la presentan. Dentro de este contexto, estudios histológicos y morfológicos que correlacionen las etapas del desarrollo embrionario y larval con la diferenciación gonadal en el *A.*

mexicanum son importantes y necesarios, puesto que aportaran información relevante y de gran importancia sobre estos temas.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Ambystoma mexicanum es considerado un buen modelo para el estudio en diferentes áreas de la investigación, principalmente en ecología, evolución, distribución y conservación de la especie, así como en la medicina para el estudio de la biología del desarrollo y la regeneración. Sin embargo está considerado como un organismo en peligro de extinción, debido a que su hábitat esta amenazado por el daño ecológico en su ambiente original y es prioritario protegerlo y conservarlo, por lo que conocer aspectos de su actividad reproductora y cómo se lleva a cabo su proceso de diferenciación gonadal, son prioritarios y de gran importancia.

Por lo que la justificación de este trabajo de investigación es que tomando en cuenta que se trata de un organismo que presenta neotenia y que a lo largo de su vida va a conservar el aspecto de larva, es importante definir en qué momento del desarrollo se lleva a cabo el establecimiento de la gónada indiferenciada y su diferenciación estructural en un ovario o en un testículo, así como conocer si el patrón de expresión de algunos genes relacionados con la diferenciación gonadal que han sido descritos en otros vertebrados se conservan en este organismo, indicando si el proceso de neotenia influye sobre estos aspectos o no.

HIPOTESIS

Los mecanismos de determinación y diferenciación sexual gonadal, tanto a nivel morfológico como molecular en *Ambystoma mexicanum* serán similares a los descritos en otras especies de urodelos. Por lo tanto, la condición de neotenia no influye sobre estos procesos.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta investigación es caracterizar la morfología de la gónada en diferenciación, así como la expresión de algunos genes que intervienen durante este proceso, en el anfibio urodelo *Ambystoma mexicanum*.

Los objetivos particulares son:

1. Identificar las etapas del desarrollo embrionario y larval, en las que se establece la gónada indiferenciada así como en las que se lleva a cabo su diferenciación en un ovario o en un testículo, correlacionando estos eventos con los cambios morfológicos que se llevan a cabo durante dichos procesos.
2. Describir el patrón de expresión de los genes *Vasa*, *Sox9* y *Foxl2*, corroborando a nivel semicuantitativo la expresión de éstos, durante la edad adulta.
3. Describir el patrón de expresión de los genes *Sox 9* y *Vasa* durante la diferenciación gonadal en larvas del anfibio urodelo: *Ambystoma mexicanum*

El trabajo de investigación se organizó en 3 capítulos, correspondiendo a cada uno los objetivos planteados. Se procedió a realizar la metodología específica para cada uno y finalmente el resultado se vio reflejado en dos artículos publicados y uno en proceso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para cumplir el objetivo 1, la metodología general fue la siguiente. Se obtuvieron 4 puestas de *A. mexicanum* donadas por el Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología, durante los meses de diciembre y enero. De las cuales se colectaron embriones y larvas en diferentes estadios de desarrollo que se categorizaron de acuerdo con las tablas de desarrollo previamente descritas por Bordzilovskaya et al. 1989 y Nye et al. 2003. Se contabilizaron los días de desarrollo partiendo del momento de la fertilización (días post fertilización: dpf), y se correlacionaron con los estadios de desarrollo (E). De acuerdo con análisis previos sobre el desarrollo gonadal en urodelos (Ikenishi y Nieuwkoop, 1978; Dumond et al. 2008), se estableció colectar y analizar organismos desde el E41 al E57 y larvas de 120 días (n=10 por estadio). Se procesaron para microscopía electrónica de transmisión con el fin de observar y describir la ultraestructura de la gónada ya sea en formación, indiferenciada, así como la gónada diferenciada en ovario y testículo. Describiendo así, los principales eventos de la morfogénesis gonadal y su correlación con los estadios embrionarios y larvarios en *A. mexicanum*.

Los métodos empleados para cumplir el objetivo 2 fueron los siguientes. Se obtuvieron cinco ovarios y cinco testículos de organismos de 18 meses para estudiar en ellos la expresión de algunos genes importantes y requeridos durante la diferenciación gonadal de *A. mexicanum*. Se obtuvieron fragmentos de ambos órganos que se fijaron para inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, histología, microscopía electrónica, detección de actividad de la $\Delta 5$ -3 β HSD, Western blot y densitometría. Se analizando de esta manera la expresión de la proteína de los genes Sox9, Foxl2 y Vasa, así como la actividad de la

enzima $\Delta 5$ -3 β HSD en ovarios y testículos de *A. mexicanum*, correlacionándola con la morfología.

Se decidió emplear estos genes debido a que se ha registrado que son determinantes en la diferenciación gonadal y han sido empleados en otros vertebrados (mamíferos principalmente). Sox9 es uno de los principales genes autosómicos involucrados en la diferenciación testicular y es conservado entre vertebrados (Kent et al. 1996), se expresa en las células de Sertoli, y se ha empleado como marcador en la diferenciación del testículo en diferentes especies de vertebrados (Morais da Silva et al. 1996; Cameron y Sinclair, 1997). Foxl2 es un gen dimórfico que se expresa en gónadas femeninas, y sigue un patrón conservado entre los diferentes grupos de vertebrados (Cocquet et al. 2002). Se expresa en células de la granulosa y su función durante la diferenciación ovárica es también conservada, al regular la expresión del gen Cyp19, el cual codifica para la enzima aromatasa, que a su vez cataliza la transformación de andrógenos a estrógenos (Liu et al. 2007).

Vasa es un gen indispensable durante el desarrollo de la línea germinal. Se expresa en las células germinales y es empleado como un marcador de la línea germinal en invertebrados y vertebrados (Molyneaux y Wylie, 2004).

RESULTADOS

Basandonos en las tablas de desarrollo descritas por Bordzilovskaya et al. 1989 y Nye et al. 2003, se categorizaron embriones y larvas en diferentes estadios de desarrollo. Y de acuerdo con estudios previos sobre el desarrollo gonadal en urodelos (Ikenishi y Nieuwkoop, 1978; Dumond et al. 2008), se estableció coleccionar y analizar organismos desde

el E41 al E57 (n=10 por estadio), de estos estadios se escogieron solo los estadios en donde observamos cambios importantes y evidentes durante el desarrollo de la gónada (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estadios de desarrollo con cambios importantes en el desarrollo de la gónada (características externas).

Estadio 41 12 días post fertilización (dpf)	En este ocurre la eclosión y la boca es claramente delineada.
Estadio 42 13 dpf	Las branquias son alargadas y la boca está completamente delineada.
Estadio 43 14 dpf	La boca finalmente se abre.
Estadio 44 15 dpf	Aparece una protuberancia o yema en la región anterior del cuerpo por debajo de las branquias que dará origen a la extremidad anterior.
Estadio 45 16 dpf	La yema es más notoria y grande que en el estadio anterior, es de forma triangular o cónica y transparente.
Estadio 46 17 dpf	La yema se observa con una pequeña bifurcación en la parte anterior, es más larga que en el estadio anterior y luce transparente.
Estadio 47 22 dpf	La extremidad anterior es más larga y la bifurcación es más evidente.
Estadio 53 42 dpf	La extremidad anterior presenta el tercer dedo totalmente formado y es evidente el inicio de la formación del cuarto dedo, así como el inicio de la formación de la extremidad posterior.
Estadio 54 46 dpf	El desarrollo de la extremidad anterior es completo y se observan 4 dedos bien desarrollados. En la extremidad posterior se observa el inicio de la bifurcación de la yema o protuberancia.
Estadio 55 52 dpf	Los dedos de la extremidad anterior son más alargados y la extremidad posterior ya se observa con 3 dedos bien desarrollados.
Estadio 56 56 dpf	Los dedos de la extremidad anterior se observan más alargados y gruesos que en la etapa anterior, su desarrollo llegó a su término. La extremidad posterior muestra 4 dedos en desarrollo.
Estadio 57 60 dpf	La extremidad posterior se observa con 5 dedos bien desarrollados, la extremidad está completamente formada.

CAPITULO I

Development and gonadal sex differennation in the neotenic urodele:

Ambystoma mexicanum

Development and gonadal sex differentiation in the neotenic urodele: *Ambystoma mexicanum*

Eva Mendoza-Cruz¹ · Norma Moreno-Mendoza² · Luis Zambrano³ · Maricela Villagrán-SantaCruz¹

Received: 27 February 2017 / Revised: 16 May 2017 / Accepted: 29 May 2017 / Published online: 15 June 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract *Ambystoma mexicanum* is an endemic neotenic urodele amphibian from Mexico; although it belongs to the Salamandridae family, it is characterized by retaining larval structures and hence has been widely used as an experimental model. In the present study, we describe the main events of gonadal morphogenesis in *A. mexicanum* and correlate these with stages in embryonic and larval development. In this way, it was established that during stage 41 (St41), the gonadal primordium is formed, consisting of primordial germ cells (PGC) and somatic cells. During St45, the undifferentiated gonad is formed from a larger number of PGC interacting with somatic cells. During St53, the germ and somatic cells arrange into the cortical and medullary region. As development proceeds between St55 and 57, morphological differentiation of the gonadal sex takes place, primarily manifested in ovarian differentiation. Our observations and the way these correlate with other urodeles suggest that gonadal morphogenesis in *A. mexicanum* does not depend on larval age. Besides, onset of gonadal sexual differentiation takes place from St53 onward, evidenced by ovarian structural changes, thus neotenic condition does not influence gonadal

differentiation events. Finally, it has been established that gonadal development is controlled by chronological regulation that differs from that of somatic development which in the case of *A. mexicanum* suggests that gonadal development is completely independent of metamorphosis, thus implying a process of heterochrony.

Keywords *Ambystoma mexicanum* · Gonadal differentiation · Urodela amphibians · Germ cells · Neoteny

Introduction

Amphibians have been used as a model for studying different aspects of vertebrate development. Under laboratory conditions, these organisms are suitable for experiments due to their easy manipulation, the large number of eggs laid in one batch and because larvae are aquatic and easily absorb chemical substances and hormones that are added to the medium, facilitating their study (Hayes 1998; Jamil et al. 2008).

With regard to processes of gonadal sexual determination and differentiation, anurans from the amphibian group have been most studied. Contrastingly, only few species of urodela have been studied and these include *Pleurodeles waltl*, *P. poireti*, *Cynops cristatus*, *C. pyrrhogaster*, *Salamandra salamandra*, *Ambystoma tigrinum* and *A. mexicanum*. Studies on these species include the way hormones influence sexual differentiation (Chardard et al. 1995), temperature-related sex reversal (Chardard et al. 2004; Flament et al. 2011), the effect of androgens and P450 aromatase on sexual differentiation (Kuntz et al. 2003). *P. waltl* is the most studied urodela in terms of the biology of sexual differentiation (Dumond et al. 2008) including

✉ Maricela Villagrán-SantaCruz
mvsc@ciencias.unam.mx

¹ Laboratorio de Biología Tisular y Reproductora, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 04510 México City, México

² Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 04510 México City, México

³ Laboratorio de Restauración Ecológica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 04510 México City, México

expression of genes that regulate these processes (Dumond et al. 2011).

Generally, the mechanism for gonadal sexual differentiation follows a similar pattern among anura and urodela. Both groups are gonochoristic (Dumond et al. 2008); i.e. that they develop a single functional sex throughout their lifetime. During gonad morphogenesis, processes of migration, colonization and cell differentiation take place that will lead to the establishment of an undifferentiated gonad consisting of cells of from both the somatic and germ line. In this regard, it has been observed that the formation of the undifferentiated gonad in amphibians is related to the packing of epithelial cells located in the ventral region of the mesonephros, which during very early stages of development are known as genital ridges. Later, these genital ridges are colonized by primordial germ cells (PGCs) of extra-gonadal origin, while somatic cells continue to proliferate (Hayes 1998; Kuntz et al. 2003; Dumond et al. 2008; Flament et al. 2011). Therefore, the undifferentiated gonad is established by the migration and proliferation of PGCs and the proliferation of somatic cells that together form two regions, one external corresponding to the cortical region and one internal that forms the medullary region (Wallace et al. 1999; Kuntz et al. 2003). In this way, the undifferentiated gonad acquires the morphological characteristics which differentiate either into an ovary or a testis; meaning that this is a bipotential organ, whose differentiation will depend on physiological and molecular factors.

Once the undifferentiated gonad is established, morphological differentiation initiates. In the case of ovarian differentiation, this is characterized by the development of the cortex due both to the proliferation of somatic cells and gonocytes or primary oogonia. Some of the primary oogonia form groups of secondary oogonia. These groups are separated from other groups and primary oogonia by a layer of somatic prefollicular cells. When this layer of somatic prefollicular cells proliferate and separate surrounding the individual secondary oogonia which enter meiosis, the first diplotene oocytes appear forming the oocyte follicles (Ogielska and Kotusz 2004). The ovary acquires an ovisac structure because the medullary region undergoes regression resulting in formation of the ovarian cavities (Flament et al. 2009). In contrast, during testicular differentiation, a germinal compartment forms in the medullary region made from lobules that contain the GC and the Sertoli cells of somatic origin. Within the lobules, germline cells are found at different stages of development, grouped within cysts and associated with Sertoli cells. Surrounding the lobules is the cortex region, which is devoid of germ line cells. This gives rise to the tunica albuginea formed mainly from loose connective tissue surrounding the testicle (Kuntz et al. 2003; Flament et al. 2009).

Salamanders from the *Ambystoma* genus have provided important models for biological studies focusing on development, ecology and evolution (Voss and Smith 2005; Smith and Voss 2009; Eisthen and Krause 2012). The axolotl, *Ambystoma mexicanum* is an amphibian from the Urodela order, pertaining to the Ambystomatidae family (Servín 2011). It is a Mexican endemic species that inhabits the lakes of Xochimilco and Chalco in Mexico City (Zambrano et al. 2004). Currently, it is in critical danger of extinction as the censuses from 1998, 2004, 2006 and 2009 have shown a drastic decrease (Wright and Whitaker 2001; CITES 2009; Contreras et al. 2009; CONABIO 2011). *A. mexicanum* is a neotenic salamander; meaning that it reaches sexual maturity even though it retains morphological characteristics from its larval stage (Eisthen and Krause 2012).

The axolotl has become an excellent model for medical and biological research. Studies have considered the distribution and conservation of the species (Contreras et al. 2009; Recuero et al. 2010), its regeneration (Song et al. 2010) and the mechanism of neoteny (Thompson et al. 2014). Concerning mechanisms of sexual determination and differentiation, studies on the genetic basis of sexual determination (Smith and Voss 2009), ultrastructure, localization (Ikenishi and Nieuwkoop 1978) and germ line specification (Johnson et al. 2003; Chatfield et al. 2014) have been undertaken, as well as the expression of some genes specific to germ cells, such as *Axdazl*, *Axvh*, *Axoct-4* and *AxKit* (Bachvarova et al. 2004).

Although *A. mexicanum* has been bred and maintained under laboratory conditions for several years, surprisingly, its reproductive patterns including its physiology during this process have not been documented in detail (Eisthen and Krause 2012). Likewise, a correlation between sexual differentiation and the different stages of embryonic development has not been established in *A. mexicanum*. The objective of this research was thus to investigate the main morphological events leading to gonadal sexual differentiation and their correlation with stages of embryonic and larval somatic development; in order to assess whether the neoteny has any influence at the time of the gonadal morphogenesis in urodeles, independently of the somatic development of the organism as proposed in anurans (Ogielska and Kotusz 2004).

Materials and methods

Animals

Four batches of *A. mexicanum* eggs were donated by the Laboratory for Ecological Restoration at the Institute of Biology, UNAM, FAUT-0112. The batches were

transferred to the Aquarium at the Faculty of Sciences, UNAM, where they were maintained under proper development conditions, with a photoperiod of 12 h light:12 h dark, at a temperature of 16 ± 2 °C and individuals at the larval stage were fed larvae from *Artemia franciscana*, *Culex stigmatosoma* mosquitoes and *Tubifex tubifex*.

Embryos and larvae were collected from these egg batches at different stages of development, and categorized according to the tables previously drawn up by Bordzilovskaya et al. 1989 and Nye et al. 2003. Days of development were counted from the moment of fertilization (days post-fertilization: dpf), and correlated with stages of development (St). According to previous analyses of gonadal development among urodela (Ikenishi and Nieuwkoop 1978; Dumond et al. 2008), the decision was taken to collect and analyze organisms between St41 and St57 and 120-day larvae ($n = 10$ per stage). For purposes of killing, we complied with all procedures described in the Guide to use of Laboratory Animals from the Ethics Committee of the Biomedical Research Institute (UNAM). Organisms were placed in a solution of 2% NaHCO_3 at 4 °C, in order to anesthetize them, proceeding immediately to their killing by decapitation (Guerrero and Moreno 2012). A cross-sectional cut was taken to obtain the mid-caudal region of the embryos between St41 and St54; whereas for St55 to St57, the gonads were isolated by micro-dissection. Each caudal region was placed in phosphate buffer (PBS) together with the isolated gonads, to be subsequently fixed applying the appropriate process.

Transmission electron microscopy analysis

Each mid-caudal region obtained from embryos at St41, larvae between St42 and St54 and gonads isolated from larvae between St55 and St57, were processed by light microscopy and transmission electron microscopy (TEM). For this, tissues were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky 1965) for 24 h at 4 °C and then incubated in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) and stored at 4 °C for 24 h. Subsequently, the tissues were post-fixed with 1% osmium tetroxide (OsO_4) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 1 h, dehydrated in a graduated series of ethanol solutions (70–100%, JT Baker), placed in acetonitrile (JT Baker) and infiltrated with solutions of Epon/acetonitrile (EMS/JT Baker) at 1:1 and the at 2:1. Finally, the tissues were incubated in pure Epon for 24 h and polymerized in plastic blocks at 60 °C for 24 h. Semi-thin sections (1 μm), obtained using an ultramicrotome (NOVA, Leica/LKB, Wetzlar, Germany) were stained with toluidine blue (0.1% in water) and observed under light microscope (E200, Nikon, Melville, NY, USA). For electron microscopic analysis, ultrathin sections (25- to 100-nm-thick sections covering a total thickness of 0.5 nm) were mounted on

copper grids and contrasted using 2.5% uranyl acetate and 0.3% lead citrate for observation under transmission electron microscopy (JEM-1010, JEOL, Tokyo, Japan).

Morphometrics

For each development stage of *A. mexicanum* St41, St45, St50, St53, St55 and St57, the length and width of both gonads ($n = 6$) were measured, as well as the width and length of germ cells detected. Measurements were made using a micrometric eyepiece with 40 \times magnification in a CX-31 model Olympus microscope. The data obtained indicated average and standard deviation, using the Statistical program, version 10.

Results

Ambystoma mexicanum larvae at St57 (Fig. 1a) the gonads are paired, whitish and elongated structures, located in the posterior mid-dorsal region of the body and closely related to the mesonephros (Fig. 1b). The mesonephros is distinguished by a yellowish opaque color, located to one side of the gonad (Fig. 1b). In semi-thin cross sections from the mid-caudal region of the larvae, gonads appear to be attached to the ventral surface of the mesonephros and to adjacent the intestinal mesentery. There is evidently a close relationship between the gonads and other structures such as the Wolffian duct, dorsal aorta and intestinal mesentery located within the coelomic cavity (Fig. 1d).

Once we had anatomically and structurally located the gonads, we performed a sequential analysis for gonadal development initiating at St41 that corresponded to embryos of 11 dpf and larvae between St42 (13 dpf) and St57 (90 dpf), as well as 120 dpf.

The undifferentiated gonad

In the case of *A. mexicanum* embryos at St41 (11 dpf), the gonad appears to be morphologically undifferentiated. In transverse sections of embryos taken from the mid-posterior caudal region, gonadal primordia or urogenital ridges are observed within the coelomic cavity, on both sides of the mesentery that contains the intestine, close to the Wolffian duct and in close proximity to the mesonephros. The gonadal primordium is a compact oval-shaped structure with an average diameter of $22.6 \pm 3.6 \times 11 \pm 1.8$ μm , where some relatively large cells ($9.2 \pm 2.3 \times 5.3 \pm 1.0$ μm in diameter) with oval shape, prominent nucleus, lipid droplets and electron-dense bodies can be observed in its cytoplasm; morphological characteristics which suggest they consist of primordial germ cells (PGCs) (Fig. 2a). Ultra-structural analysis confirms the presence of PGCs that appear as large

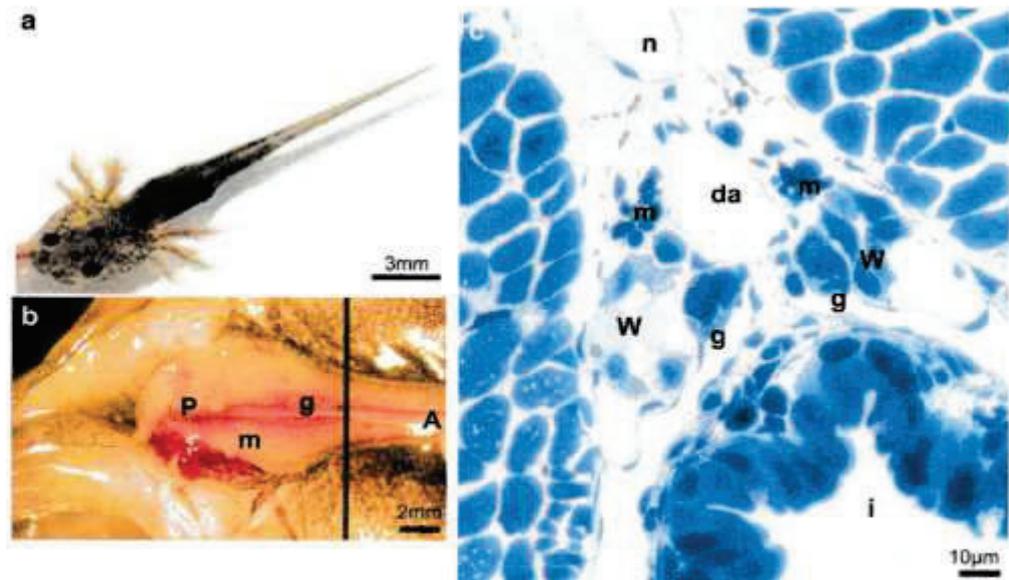


Fig. 1 Larva and location of the gonad in *A. mexicanum*. **a** *A. mexicanum* larvae during St50. **b** Larva caudal region at St57, where the gonad (g)-mesonephros (m) complex is attached to the body wall of the dorsal region. P posterior, A anterior region. **c** Transverse section at level marked in B of an embryo at St46 where the gonads

(g) are located in the coelomic cavity on both sides of the mesentery holding the intestine (i), closely related to the mesonephros (m), the Wolffian duct (W) and the dorsal aorta (da); the notochord (n) is also visible

cells with prominent nuclei and finely granular chromatin; in its cytoplasm lipid droplets, electron-dense bodies and abundant mitochondria are visible (Fig. 2b).

As development progressed, apparently there were no significant changes in morphogenesis of the gonadal primordium. At St45 (15 dpf), the average size of the gonad was $24.2 \pm 6.9 \times 12 \pm 1 \mu\text{m}$; whereas that of germ cells (primary oogonia) was $9.6 \pm 2.91 \times 5.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$. The primary oogonia are more clearly defined, presenting a more rounded shape and they have a prominent and oval nucleus with an evident nucleolus, and in the cytoplasm, an increase in yolk droplets and electron-dense bodies can be observed (Fig. 2c). At this stage, there is a close relationship between GCs and somatic cells; the latter can be identified by their irregular morphology and their location both in the periphery of the gonad as well as among the GCs (Fig. 2c, d).

At St50 (28 dpf), larvae still manifest the morphology of an undifferentiated gonad; however, this is larger than at previous stages and has an average diameter of $38.5 \pm 8.5 \times 17.8 \pm 1.8 \mu\text{m}$. Anatomically, gonads are suspended in the coelomic cavity attached to the dorsal wall of larvae by a mesentery. Gonads have now acquired an elongated and irregular morphology and consist of a greater number of somatic cells in close contact with a greater number of primary oogonia (Fig. 3a). Surrounding

the gonad, somatic cells can be observed to form a cubic epithelium (Fig. 3a). Primary oogonia have an average diameter of $10.0 \pm 0.9 \times 6.0 \pm 1.5 \mu\text{m}$ and apparently consist of a large nucleus and evident nucleolus, and have a smaller number of electron-dense bodies and lipid droplets in their cytoplasm (Fig. 3a). Ultra-structurally, primary oogonia manifest a prominent nucleus with homogeneously distributed chromatin, a well-defined nucleolus, mitochondria, and a few electron-dense bodies in their cytoplasm (Fig. 3b, c). No significant morphological changes were observed in the development of the gonad during St51 and St52 (data not shown).

Gonadal sex differentiation

During St53 (42 dpf), the gonad continues to increase in size ($54.2 \pm 10.2 \times 20.8 \pm 4.4 \mu\text{m}$ in diameter), and has taken on a saccular and pedunculated shape. There is an evident increase in the number of somatic cells in the hilar region that bind it to the body wall. The limiting epithelium is composed of irregular somatic cells and there are a greater number of GCs, which are located contiguous to one another in the cortical region of the gonad. In some individuals, the structure of the medullary region of the gonad appears compact, but notably certain spaces or

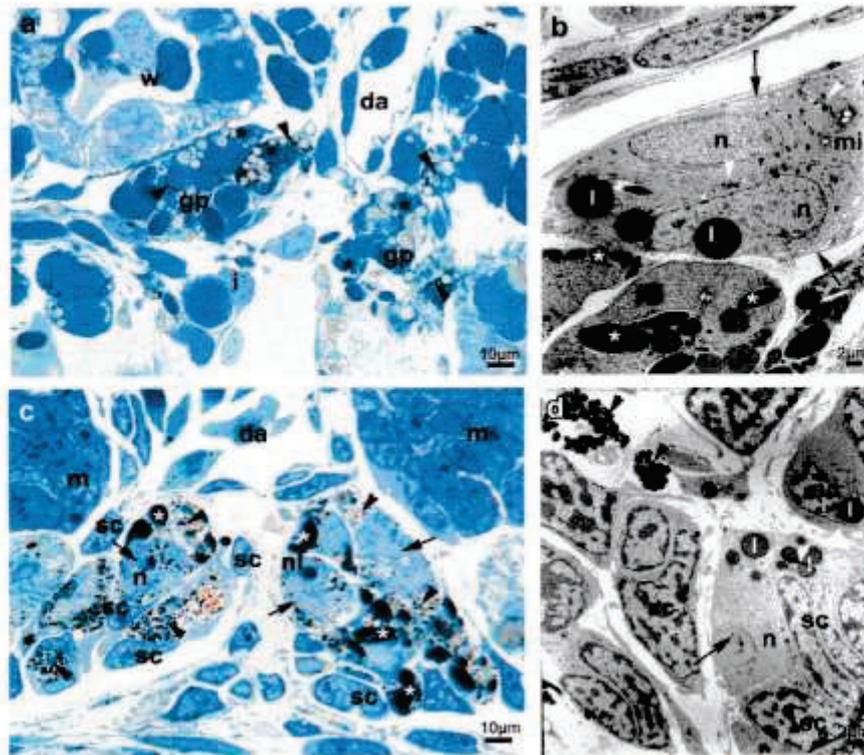


Fig. 2 Undifferentiated gonad of *A. mexicanum*. **a** Transverse section of the mid-caudal region of an embryo during St41 (11 dpf) where gonadal primordium (gp) is visible and strictly related to the Wolffian duct (W), the intestinal mesentery (i) and the dorsal aorta (da). Large germ cells with yolk droplets (asterisk) and electro-dense bodies (arrowhead) immersed in their cytoplasm are visible. **b** Electron micrograph of the gonadal primordium, where the prominent nucleus (n) of each germ cell (arrow), lipid drops (l), yolk drops (asterisk), mitochondria (mi) and electro-dense bodies (arrowhead) in their cytoplasm are visible. **c** Undifferentiated gonads of a larva during

St45 (15 dpf) located adjacent to the mesonephros (m) and the dorsal aorta (da). Note the evident nucleus (n) and nucleolus (nl) of the germ cells (arrows), yolk drops (asterisk) and electro-dense bodies (arrowhead) in their cytoplasm, as well as the close relationship with somatic cells that have irregular morphology (sc). **d** Electron micrograph of a germ cell (arrow) with a prominent round nucleus (n), lipid drops (l) in their cytoplasm and their close relationship to somatic cells (sc). Note the presence of electro-dense bodies (arrowhead) of a germ cell located at the upper end

cavities begin to appear between both somatic cells and in the middle of the medullary region, making them appear loose (Fig. 3d). GCs are more rounded and have an average diameter of $10.8 \pm 2.1 \times 7.2 \pm 1.1 \mu\text{m}$, the electro-dense bodies in their cytoplasm have decreased considerably and yolk droplets are no longer visible. Interaction between somatic cells and GCs is closer (Fig. 3e, f). These morphological changes suggest the onset of ovarian rather than testicular differentiation.

Ovary differentiation

Clear morphological regionalization is apparent during ovarian differentiation, defined by the presence of a cortical region and a medullary region (Fig. 4a). These structural changes are clearest during St55 (52 dpf), when the

forming ovary has an average size of $88.7 \pm 17.2 \times 45.7 \pm 23.3 \mu\text{m}$ in terms of diameter and is delimited by an epithelium of cubic somatic cells. In cross sections of the anterior region of the gonad, there is evidently a structure adjacent to the hilar region, known as the progonaad that will subsequently give rise to fatty bodies (Fig. 4a). In the medullary region of the gonad, somatic cells still appear to be irregular, limiting the central cavity, although there are still some spaces between the cells. In the cortical region, a greater number of closely packed primary and secondary oogonia form two or three layers of cells. The mean diameter of the all oogonia at this stage was $12.7 \pm 3.5 \times 12.3 \pm 2.4 \mu\text{m}$; and apparently some of these are dividing (Fig. 4a). Ultra-structural analysis shows that primary oogonia have clear cytoplasm with abundant mitochondria, electro-dense bodies and a prominent

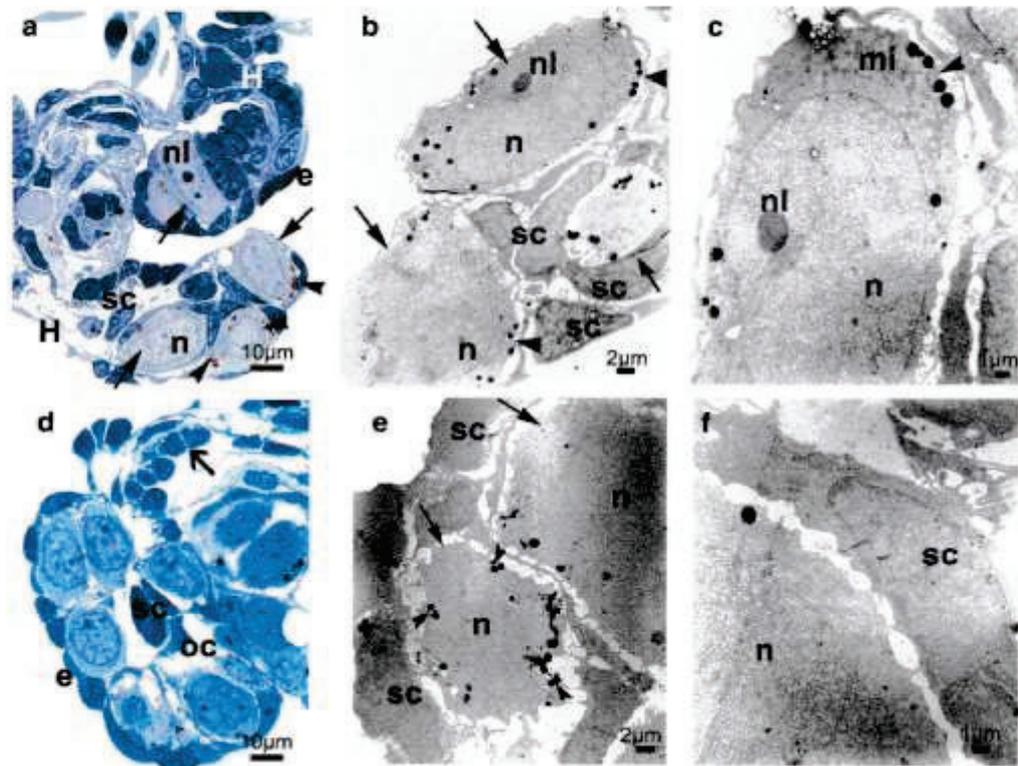


Fig. 3 Undifferentiated gonad of *A. mexicanum*. **a** Undifferentiated gonad of *A. mexicanum* larvae at St50 (28 dpf). The gonads were observed suspended by the hilar region (H). They consist of germ cells (arrow) notable for their prominent nucleus (n), nucleolus (nl) and electro-dense bodies (arrowhead) in their cytoplasm. Somatic cells (sc) are located among the germ cells, as well as peripheral epithelial cells (e). **b** Electron micrograph showing germ cells (arrow) with evident nucleus (n), nucleolus (nl) and electron-dense bodies (arrowhead) in their cytoplasm. Somatic cells (sc) are also visible between them. **c** At higher resolution, the nucleus (n) and nucleolus (nl), as well as mitochondria (mi) and electron-dense bodies

(arrowhead) in its cytoplasm are visible in germ cells. **d** Beginning of gonadal differentiation at St53 (42 dpf). Gonad suspended from the hilar region (thick arrow) where two regions are visible: a cortical region where germ cells are located, and a medullary region with many somatic cells (sc), as in the periphery of the gonad forming the epithelium (e). Note the onset of ovarian cavity (oc) formation in the medullary region. **e** Electron micrograph of the gonad, where two germ cells are visible, with a round nucleus (n) and electro-dense bodies (arrowhead) and closely related to somatic cells (sc). **f** Detail of a germ cell, with its prominent nucleus (n) and a closely related somatic cell (sc)

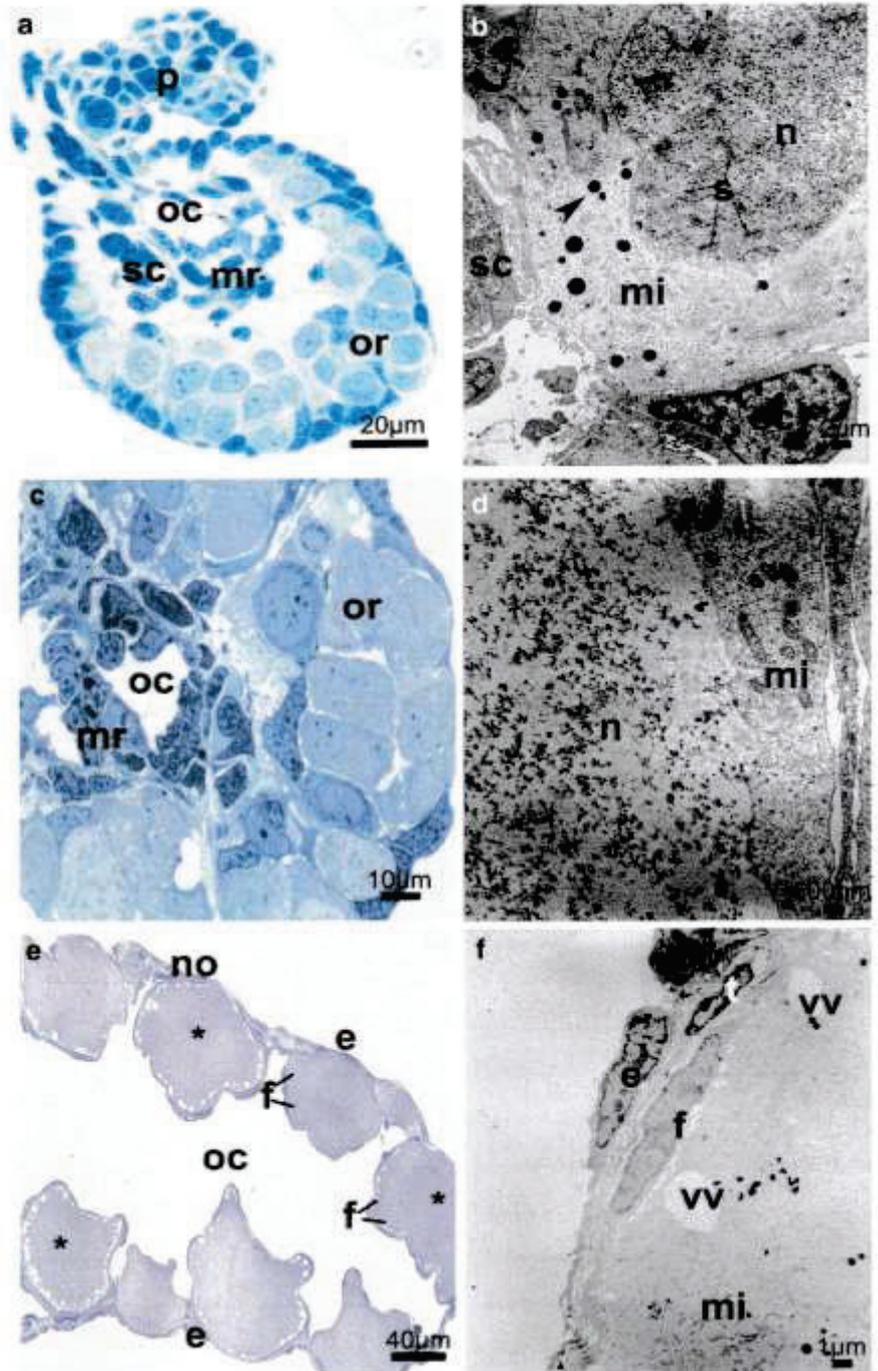
spherical nucleus. Secondary oogonia, were observed with structures similar to synaptonemal complexes, characteristic of cells in meiotic division (Fig. 4b).

During St57 (90 dpf), the developing ovary had a larger diameter ($96 \pm 6.6 \times 61.3 \pm 11.3 \mu\text{m}$), as a result of the increase in GCs (oogonias) and somatic numbers. The ovary at this age, which is located adjacent to the progonad appears as a compartmentalized structure, where we find a cortical region formed by two or three layers of GCs with an average diameter of $14.8 \pm 2.3 \times 10.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$; and a medullary region, which has been reduced considerably and where few cells apparently form a simple epithelial layer, delimiting the central cavity of the ovary (Fig. 4c). The ultrastructure reveals the prominent nuclei of primary

oogonia with homogeneously distributed chromatin, mitochondria in their cytoplasm and prefollicular cells that are closely related to primary oogonia (Fig. 4d).

After 3 months of larval development (120 dpf), ovaries are anatomically located in the abdominal cavity and suspended dorsally from the body wall by the mesovary. They lie symmetrically on either side of the midline of the body, parallel to the kidneys. Morphologically, the ovary appears to be a sacular structure with a large central cavity (Fig. 4e); the limit to the ovary is defined by epithelial cells that are cubic or flattened in shape and in some places on this delimiting epithelium, groups of oogonias are observed to structure the germinal epithelium or niches (Fig. 4e). At the periphery of the ovary, meaning in the cortical region,

Fig. 4 Ovarian differentiation in *A. mexicanum*. **a** Location of the gonad of a larva during St55 (52 dpf), cortical region (cr) with peripheral germ cells and medullary region (mr) consisting of somatic cells (sc) in retreat leading to formation of the ovarian cavity (oc). Note the progonad (p) closely related to the back region of the gonad. **b** Electronic micrography of a germ cell with indications of meiosis, evidenced by the presence of synaptonemal complexes (s). Mitochondria are also apparent (mi) and electron-dense bodies (arrowhead) in its cytoplasm, and the relationship with somatic cells is evident (sc). **c** Gonad of a larva at St57 (90 dpf), where germ cells in the cortical region (cr) are visible and regression of the medullary region (mr) forming a central ovarian cavity (oc). **d** At greater resolution the nucleus (n) of a germ cell is visible, and in its cytoplasm mitochondria (mi) can be seen. **e** 3-month-old larva ovary (120 dpf), surrounded by an epithelium (e), with an evident ovarian cavity (oc). Attached to the epithelium are ovarian follicles structured by the oocyte (asterisk) (f). Note a niche of oogonias (no) in the wall of the ovary. **f** Electron micrograph of the wall of an oocyte with peripheral vitelline vesicles (vv) and mitochondria (mi) in their cytoplasm and surrounded by follicular cells (f), of the theca (t) and ovarian epithelium (e)



follicles attached to the ovarian epithelium can be observed. These are formed during the diplotene oocyte, presenting a prominent nucleus with several peripheral nucleoli. The

cytoplasm is homogeneous with peripheral vitelline vesicles surrounded by a layer of flattened follicular cells and a thin theca also formed from flattened cells (Fig. 4f).

Testis differentiation

During St55 (52 dpf), a notable increase in the size of the differentiating gonad occurs, in the testicular direction ($78.5 \pm 14.1 \times 63.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$ in diameter). The two regions that structure the gonad manifest changes; the cortical region is now restricted to a layer of flattened epithelial cells that surround the gonad and these continue with the mesentery to suspend this from the wall of the body. In the medullary region, a large amount of primary spermatogonia are observed to form groups in close relation to somatic cells, organized in such a way that they structure groups delimited by other internal somatic cells, thus forming the testicular cords (Fig. 5a). Primary spermatogonia are apparently larger in size than somatic cells, with an average diameter of $11.3 \pm 0.8 \times 8.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$. These primary spermatogonia consist of a large nucleus with an eccentric nucleolus and it is evident that some primary spermatogonia groups are undergoing cell division (Fig. 5a). Ultra-structurally, it is notable that in the primary spermatogonia nucleus, chromatin is finely granular and this nucleus is surrounded by a large amount of peripheral mitochondria. In the primary spermatogonia cytoplasm, the presence of some dense granules is still apparent (Fig. 5b). At this stage of testicular differentiation, two types of somatic cells are evident, some of irregular shape intimately attached to the primary spermatogonia, which are pre-Sertoli cells, and others more peripheral that are possibly part of the stromal tissue and therefore future peritubular or myoid cells (Fig. 5b). At this stage, as well as during ovarian morphogenesis the progonad appears, which will later form fatty bodies (Fig. 5a).

At St57 (90 dpf), the testes are apparently larger ($80 \pm 7.2 \times 44.3 \pm 4.0 \mu\text{m}$). In the medullary region, testicular cords are becoming organized; this is where the majority of primary spermatogonia are located, identifiable by their size (with an average diameter of $14.0 \pm 0.8 \times 9.3 \pm 1.8 \mu\text{m}$). These are electron-light in appearance with a prominent nucleus, with one or two nucleoli. The germ line (spermatogonias) is closely related to somatic cells (future Sertoli cells) and structures the testicular cords (Fig. 5c, d). Among the testicular cords, somatic cells present different morphologies, some are fusiform and located at the periphery of the cords, structuring future myoid or peritubular cells, and others are irregular in shape, appearing as part of the interstitial tissue and finally there are others with lipids included in their cytoplasm that are located near blood vessels; possibly future Leydig cells (Fig. 5c, d). In the GCs, the presence of a granular chromatin in the nuclei and a large amount of mitochondria in the cytoplasm close to the periphery of the nucleus is ultra-structurally evident (Fig. 5d).

At 3 months of development (120 dpf), testicular differentiation is apparent. The testes appear as same described in before stage. The testes are parallel to the axis of the body, and closely related to the mesonephros. They are surrounded by fibrous connective tissue that forms the tunica albuginea with an interior consisting of testicular lobes. Each testicular lobe consists of several cysts with primary spermatogonias and each cyst consists of one or more Sertoli cells which make up the cyst wall (Fig. 5e). Externally, surrounding each lobe, it is possible to observe the myoid or peritubular cells. Between the testicular lobules, the interstitial tissue is loose and is formed out of connective tissue, where the Leydig cells are located close to blood vessels (Fig. 5e). Ultra-structurally, the primary spermatogonias can be identified by the presence of a large round nucleus with finely granular and homogeneous chromatin (Fig. 5f). In the interstitial region, cells with accumulations of lipid droplets are apparent, suggesting the differentiation of Leydig cells (Fig. 5f).

Notably, the size of the gonad as well as the size of the GCs increases as larval development progresses, with a tendency to be bigger at the beginning of gonadal differentiation, especially in the female gonad (Table 1).

Discussion

The Mexican axolotl (*A. mexicanum*) is a pedomorphic salamander; meaning that it becomes sexually mature while preserving morphological characteristics from the larval stage. Some morphological and molecular aspects related to germline specification and germ cell migration have been described for some stages of embryonic and larval development (Ikenishi and Nieuwkoop 1978; Dournon et al. 1989; Johnson et al. 2001; Bachvarova et al. 2004); but morphological events involved in the processes of gonadal sexual determination and differentiation have been little explored. Similarly, neither has the correlation between these morphogenetic events and the establishment of the germ line been reported. As this is a neotenic organism, it is of great interest to identify and correlate processes of gonadal differentiation with stages in embryonic development, as well as considering that observed among other non-neotenic urodeles, such as *P. waltl*. Anatomically in *A. mexicanum*, as in anurans and *P. waltl*, the gonads develop as paired organs that are located in the posterior mid-dorsal region of the body of the organism, closely related to the mesonephros and suspended in the coelomic cavity (Ogielska 2009; Flament et al. 2011).

Gonad sexual development in amphibians is a process that has principally been described among anurans (Ogielska 2009; Pipek et al. 2010; Flament et al. 2011), whereas little is known about urodeles (Dournon et al.

Fig. 5 Testicular gonadal differentiation in *A. mexicanum*. **a** Larval gonad at St55 (52 dpf), where testicular cords (*box*) are visible in the medullary region, structured by germ cells and surrounded by somatic cells (*sc*). Notice the epithelial cells (*e*) that surround the gonad and the progonad (*p*) at upper right. **b** Electron micrograph of a germ cell with a large nucleus (*n*) with homogeneously distributed chromatin, mitochondria (*mi*) and electro-dense bodies (*arrowhead*) in their cytoplasm. Note the close relationship between two somatic cells, one of them practically attached; pre-Sertoli future Sertoli cell (*S*) and the other more peripheral; future peritubular cell (*P*). **c** Larval gonad during St57 (90 dpf), where testicular cords comprising primary spermatogonia (*Sp*) are visible in close relation to pre-Sertoli (*S*) cells, peritubular cells (*P*) and in the interstitium near to the blood vessels (*bv*) are future Leydig cells (*L*). **d** Electron micrograph of a primary spermatogonia (*Sp*) with a large nucleus (*n*) and mitochondria (*mi*) in its cytoplasm, note the close relationship with somatic cells: future pre-Sertoli (*S*), peritubular (*P*), and Leydig (*L*). **e** Testes of a 3-month-old larva (120 dpf) with cysts of primary spermatogonia (*Sp*) inside, consisting of one or more sertoli (*S*) cells. Peritubular cells (*P*) are visible around the lobules and in the interstice there is a Leydig cell (*L*) near to a blood vessel (*bv*). **f** Electron micrograph showing the detail of a primary spermatogonia (*Sp*) cyst, closely related to sertoli (*S*) cells; in the interstitial tissue, a leydig (*L*) cell with lipid droplets in its cytoplasm is visible

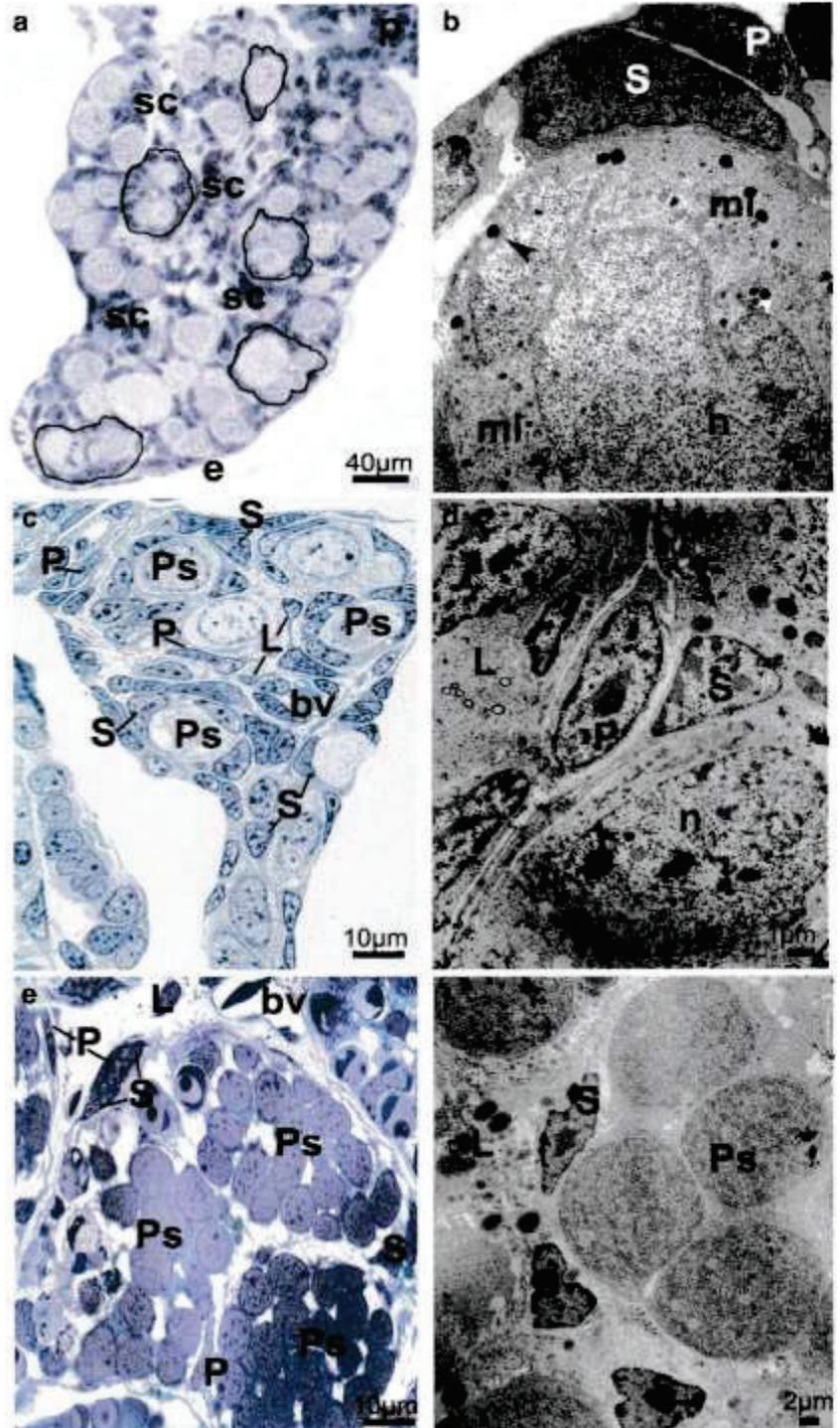


Table 1 Average diameters (length and width) of the gonad and the germ cells (GC) and area of germ cells of *A. mexicanum* at different stages of development

Development stage	Gonad length (μm)	Gonad width (μm)	GC length (μm)	GC width (μm)	GC area (μm^2)
41	22.6 \pm 3.6	11 \pm 1.8	9.2 \pm 2.3	5.3 \pm 1.0	488 \pm 153.6
45	24.2 \pm 6.9	12.0 \pm 1.0	9.6 \pm 2.9	5.6 \pm 1.3	620 \pm 97.2
50	38.5 \pm 8.5	17.8 \pm 1.8	10.0 \pm 0.9	6.0 \pm 1.5	576 \pm 101
53	54.2 \pm 10.2	20.8 \pm 4.4	10.8 \pm 2.1	7.2 \pm 1.1	706 \pm 96
55 O	88.7 \pm 17.2	45.7 \pm 23.3	12.7 \pm 3.5	12.3 \pm 2.4	709 \pm 110
57 O	96.0 \pm 6.6	61.3 \pm 11.3	14.8 \pm 2.3	10.8 \pm 0.9	1053 \pm 180
57 T	80.0 \pm 7.25	44.3 \pm 4.0	14.0 \pm 0.8	9.3 \pm 1.8	638 \pm 74

1990). In this study, the main morphological events leading to the establishment of the undifferentiated gonad and its morphological differentiation in *A. mexicanum* were similar to those described for anurans and the *P. waltl* urodela (Dourmon et al. 1990). The formation of a genital ridge is apparent during St41, when a group of somatic cells are found suspended below the mesonephros and adjacent to the Wolffian duct. This stage coincides with the location of PGCs close to the Wolffian duct, concurring with previous studies (Ikenishi and Nieuwkoop 1978; Dourmon et al. 1990; Bachvarova et al. 2004; Dumond et al. 2008; Flament et al. 2011). Based on our observations, the genital ridge seems to retain, at least morphologically, the potential to differentiate into a testis or an ovary, depending on the chromosomal complement of the organism (ZZ-ZW). Between St42 and 44, no obvious morphological changes were observed, only an increase in the size of the gonad probably due to the invasion of PGCs, apparently similar to that reported among *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*, as the gonad during the larval stage contains few somatic cells (Falconi et al. 2004; Ogielska 2009). Likewise, it has been reported that during these stages, PGCs may be in a period of mitotic rest, as apparently in *P. waltl* there is a period between St35 and St41, characterized by zero mitotic index (Po), during which no proliferation occurs (Dourmon et al. 1989, 1990).

In *A. mexicanum* from St45 until St52, it is already possible to observe the developing gonadal primordium as a more compact structure where the germ line becomes clearly distinguished from the somatic line. In this respect, in our observations, as in other studies, it is evident that the number of germ cells appears to increase as does their size (Ikenishi and Nieuwkoop 1978; Dourmon et al. 1990; Dumond et al. 2008). Therefore, we suggest that during these stages of larval development in *A. mexicanum* urodela, independent of the chromosomal sex of the organism, the undifferentiated gonad consists mainly of germ cells and somatic cells. Thus, the morphological events leading

to the development and establishment of the undifferentiated gonad in *A. mexicanum* occur between St41 and St53, similar to that reported for the *P. waltl* salamander (Dourmon et al. 1990; Dumond et al. 2008; Flament et al. 2011). As in most vertebrates and owing to its morphological characteristics, the undifferentiated gonad in *A. mexicanum* can be considered as a bipotential structure, meaning that morphologically it has the capacity to differentiate into an ovary or testis.

During St45, it has been reported that the *P. waltl* salamander has a structure formed out of somatic cells which is attached to the gonad, known as the peduncle or hilar region. In the case of *A. mexicanum*, this structure appears during St50, coinciding more with that described for other amphibians (Jamil et al. 2008).

Structural changes in the undifferentiated gonad during St53 of *A. mexicanum*, such as the rearrangement of germ cells in the cortical region, an increase in their proliferation and the beginning of the formation of a cavity in the internal zone by regression of the medullary region, suggest that at the end of this stage, sexual differentiation of the gonad initiates. Similar to that reported in *P. waltl* and contrary to that found in other vertebrates, in *A. mexicanum*, it seems that the first morphological manifestation of gonadal sexual differentiation occurs in the female gonads, as in the male gonad no morphological changes were detected with respect to the structure of the undifferentiated gonad; only an evident increase in size, coinciding with previous observations (Dourmon et al. 1990). Testicular morphogenesis is evident during St55, when germ cells located in the medullary region of the gonad interact with somatic cells, whereas the cortical region is restricted to a layer of flattened epithelial cells that surround the gonad. All these cellular processes of gonadal differentiation coincide with patterns reported for anuran amphibians and urodeles (Dourmon et al. 1990; Kuntz et al. 2003; Dumond et al. 2008; Flament et al. 2011; Al-Assad et al. 2013; Haczkiwicz and Ogielska 2013).

The electro-dense bodies that are contained in germ cells that make up the *A. mexicanum* gonad decrease as gonadal development progresses during St53. Ikenishi and Nieuwkoop (1978) observed the presence of mitochondrial arrangements in the cytoplasm of germ cells of *A. mexicanum* during St40, which they called “nuage”, also known as electro-dense material or “cloud” in other amphibians. In other urodeles such as *Triturus pyrrogaster*, *Hynobius* and *P. waltl*, these groups of mitochondria have also been observed in germ cells (Ogielska 2009), indicating that these structures appear with characteristic of the germline, as they have also been found to be closely related to mitochondria, which are part of the nuclear material and contain ribonucleoproteins (Guerrero and Moreno 2012; Voronina et al. 2011). In mammals, “dense nuclei” are equivalent to “nuage” material and it has been proposed that these are organelles specializing in the reception of signals from the extracellular environment that may modify the behavior and differentiation status of PGCs (Merchant and Álvarez 1981; Voronina et al. 2011). Therefore, the decrease in electro-dense material in germ cells at the moment when morphological differentiation initiates in the gonad in *A. mexicanum* (St53), may indicate a role in maintaining the bipotential germline state.

The structural arrangement of the developing ovaries and testes was similar to that described for other species of anuran amphibians such as *X. laevis* (Merchant and Villalpando 1981), *X. tropicalis*, *R. pipiens*, *Bombina orientalis* among others (Hayes 1998), as well as for the *P. waltl* urodela (Dournon et al. 1990; Hayes 1998; Kuntz et al. 2003; Dumond et al. 2008). In *A. mexicanum*, during St55, a structure appears for the first time in the anterior region and adjacent to the gonad known as an anterior progonad, which will give rise to fatty bodies, as observed in other urodeles (Ogielska 2009).

Morphogenetic changes undergone by undifferentiated gonads of both sexes in order to differentiate themselves, as well as the time involved, seem to be independent of the neotenic condition of *A. mexicanum*. As in the *P. waltl* salamander, the beginning of the organization of the cortical and medullary regions for the formation of a testis or ovary begins during St53, when both species are at the larval stage (Dournon et al. 1990; Kuntz et al. 2003; Dumond et al. 2008). In other amphibians, the differentiation process occurs only during the larval lifespan and in some cases occurs near to metamorphosis (Dournon et al. 1990; Hayes 1998). During processes of gonadal differentiation, some of these occur before, and others after metamorphosis, as is the case on entering germ line meiosis. In the ovary of *P. waltl*, oogonias enter meiosis during metamorphosis, that is approximately during St56 (Dournon et al. 1990; Dumond et al. 2008), whereas in the testicle, PGCs do this during the juvenile stage (Dumond

et al. 2008; Flament et al. 2011; Al-Assad et al. 2013). In the case of *A. mexicanum*, although they do not undergo complete metamorphosis, something similar to that described for *P. waltl* occurs. In *A. mexicanum*, ovary germ cells initiate meiosis during St55, evidenced by the presence of synaptonemal complexes.

At 3 months of age, the gonad has completed its morphological differentiation, becoming an ovary or a testicle. The ovary of *A. mexicanum* is a saccular structure, coinciding with that observed in *Necturus maculosus* (Kessel and Panje 1968), *P. waltl* (Dumond et al. 2008; Wallacides et al. 2009; Flament et al. 2011) and *A. dumerilli* (Uribe 2009, 2011). In comparison with the testicle, the presented structure is compact, similar to that observed in other urodeles such as *P. waltl* (Dumond et al. 2008; Flament et al. 2011) and *A. dumerilli* (Uribe et al. 1994).

In conclusion, our observations suggest that the time period for embryonic development in *A. mexicanum* is similar to that observed in *P. waltl*. However, larval development in *A. mexicanum* is faster than the development of *P. waltl*; this may be due to the neotenic condition of *A. mexicanum*; implying that when they are not undergoing metamorphosis, they can follow a pattern of constitutive growth independent of the temperature at which larvae develop. The different events of gonadal development observed in *A. mexicanum* coincide with those described for *P. waltl* in terms of stages; however, fewer days are required for *A. mexicanum* to advance from one stage to another. This change in development speed coincides with the stage at which the thermo-sensitive period proposed for *P. waltl* begins, suggesting that in *A. mexicanum* urodela, temperature does not influence somatic development. However, in both urodela species, the onset of gonadal development occurs from St35 (11–12 dpf) and the establishment of the undifferentiated gonad is observed from St50, independent of the days post-fertilization. This suggests that gonadal morphogenesis is independent of days of larval development. Likewise, the onset of gonadal sexual differentiation in *A. mexicanum* takes place from St53, evidenced by ovarian structural changes. Likewise in *P. waltl*, it is known that gonadal sexual differentiation takes place in stages prior to metamorphosis (St53–St56); stages that coincide with differentiation in *A. mexicanum*, meaning that the neotenic condition does not influence events related to gonadal morphogenesis.

According to Wakahara (1996) gonadal development is controlled by a chronological regulation that differs from somatic development; this suggests that gonadal development is completely independent of metamorphosis, implying a process of heterochrony.

Acknowledgements The authors thank Horacio Mena for providing biological material in the form of egg laying; Estela Pérez and Ignacio

Morales for the support provided in the care and maintenance of the laid eggs. We would also like to thank Pedro Medina and Adriana Castro for electron microscopy assistance. This work was supported by the DGAPA, UNAM. Project PAPIIT-IN223214 and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through a doctorate scholarship awarded to EMC 103095.

References

- Al-Assad I, Chardard D, Clemente N, Picard J, Dumond H, Chesnel A, Flament S (2013) Müllerian inhibiting substance in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology* 154:3931–3936
- Bachvarova R, Masi T, Drum M, Parker N, Mason K, Patient R, Johnson A (2004) Gene expression in the axolotl germ line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axoci-4*, and *Axkit*. *Dev Dyn* 231:871–880
- Bordzilovskaya NP, Dettlaf TA, Duhan ST, Malacinski GM (1989) Developmental-stage series of axolotl embryos. In: Armstrong JB, Malacinski GM (eds) *Developmental biology of the Axolotl*. Oxford University, New York, pp 201–219
- Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dourmon C (1995) Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibian) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen Comp Endocrinol* 99:100–107
- Chardard D, Penrad-Mobayed M, Chesnel A, Pieau C, Dourmon C (2004) Thermal sex reversals in amphibians. In: Valenzuela N, Lance V (eds) *Temperature dependent sex determination*. Smithsonian Institution, Washington, DC, pp 59–67
- Chatfield J, O'Reilly M, Bachvarova R, Ferjentsik Z, Redwood C, Walmsley M, Patient R, Loose M, Johnson D (2014) Stochastic specification of primordial germ cells from mesoderm precursors in axolotl embryos. *Development* 141:2429–2440
- CITES (2009) Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Apéndice I, II y III. <http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>
- CONABIO (2011) Fichas de especies prioritarias. Ajolote Mexicano (*Ambystoma mexicanum*) Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F. Compilado por Roberto Arreola
- Contreras V, Martínez ME, Valiente E, Zambrano L (2009) Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biol Conserv* 142:2881–2885
- Dourmon C, Demassieux C, Durand D, Lesimple M (1989) Primordial germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl*: genetic control before gonadal differentiation. *Int J Dev Biol* 33:477–485
- Dourmon C, Durand D, Demassieux C, Lesimple M (1990) Differential germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl*: controls by sexual genotype and by thermal epigenetic factor before differentiation of sexual phenotype of gonads. *Int J Dev Biol* 34:365–375
- Dumond H, Kuntz S, Chesnel A, Ko C, Wallacides A, Chardard D, Flament S (2008) Sexual development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Sex Dev* 2:104–114
- Dumond H, Al-Assad I, Chesnel A, Chardard D, Boizet B, Flament S, Kuntz S (2011) Patrones de expresión SOX9 temporales y espaciales en el curso del desarrollo de las gónadas del caudado anfibio *Pleurodeles waltl*. *J Exp Zool B Mol Evol Dev* 316B:199–211
- Eisthen HL, Krause BC (2012) Ambiguities in the relationship between gonadal steroids and reproduction in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Gen Comp Endocrinol* 176:472–480
- Falconi R, Dalpiaz D, Zaccanti F (2004) Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura). 1. Sex differentiation. *J Exp Zool* 301A:378–388
- Flament S, Dumond H, Chardard D, Chesnel A (2009) Lifelong testicular differentiation in *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Caudata). *Reprod Biol Endocrinol* 7:1–12
- Flament S, Chardard D, Chesnel A, Dumond H (2011) Sex determination and sexual differentiation. In: Norris D, Lopez K (eds) *Amphibians*. Academic Press Elsevier, New York, pp 1–19
- Guerrero S, Moreno N (2012) Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encostictus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J Fish Biol* 80:572–594
- Haczkievicz K, Ogielska M (2013) Gonadal sex differentiation in frogs: how testes become shorter than ovaries. *Zool Sci* 30(2):125–134
- Hayes TB (1998) Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool* 281:373–399
- Ikenishi K, Nieuwkoop P (1978) Location and ultrastructure of primordial germ cells (pgcs) in *Ambystoma mexicanum*. *Dev Growth Differ* 20:1–9
- Jamil A, Magre S, Mazabraud A, Penrad M (2008) Early aspects of gonadal sex differentiation in *Xenopus tropicalis* with reference to an antero-posterior gradient. *J Exp Zool* 309A:127–137
- Johnson AD, Bachvarova RF, Drum M, Masi T (2001) Expression of axolotl *DAZL* RNA, a marker of germ plasm: wide spread maternal RNA an onset of expression in germ cells approaching the gonad. *Dev Biol* 234:402–415
- Johnson AD, Drum M, Bachvarova RF, Masi T, White ME, Crother BI (2003) Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution. *Evol Dev* 5:414–431
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137–8A
- Kessel R, Panje W (1968) Organization and activity in the pre- and postovulatory follicle of *Necturus maculosus*. *J Cell Biol* 39:1–34
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Flament S (2003) Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenet Genome Res* 101:283–288
- Merchant LH, Alvarez BA (1981) The role of dense core granules of mammalian primordial germ cells: an in vivo and in vitro study. *Excerpta Médica* 559:119–121
- Merchant LH, Villalpando I (1981) Ultrastructural events during early gonadal development in *Rana pipiens* y *Xenopus laevis*. *Anat Rec* 199:349–360
- Nye HL, Cameron JA, Chernoff EA, Stocum DL (2003) Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. *Dev Dyn* 226:555–560
- Ogielska M (2009) Undifferentiated amphibian gonad. In: Ogielska M (ed) *Reproduction of amphibians*. Science Publishers, Enfield, pp 1–33
- Ogielska M, Kotusz A (2004) Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anura amphibians. *J Morphol* 259:41–54
- Piprek RP, Pectio A, Szymura JM (2010) Differentiation and development of gonads in the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* L., 1758 (Amphibia: Anura: Bombinatoridae). *Zool Sci* 27:1–9
- Recuero E, Cruzado-Cortés J, Parra G, Zamudio K (2010) Urban aquatic habitats and conservation of highly endangered species: the case of *Ambystoma mexicanum* (Caudata, Ambystomatidae). *Ann Zool Fenn* 47:223–238

- Servín ZE (2011) Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el Zoológico de Chapultepec. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM
- Smith JJ, Voss RS (2009) Amphibian sex determination: segregation and linkage analysis using members of the tiger salamander species complex (*Ambystoma mexicanum* and *A. t. tigrinum*). *Heredity* 102:542–548
- Song F, Li B, Stocum D (2010) Amphibians as research models for regenerative medicine. *Organogenesis* 6:141–150
- Thompson S, Muzinic L, Muzinic C, Niemiller ML, Voss SR (2014) Probability of regenerating a normal limb after bite injury in the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Regeneration* 1:27–32
- Uribe MC (2009) Spermatogenesis and male reproductive system. Urodela. In: Ogielska M (ed) *Reproduction of amphibians*. Science Publishers, Enfield, pp 100–124
- Uribe MC (2011) Hormones and the female reproductive system of amphibians. In: Norris D, Lopez K (eds) *amphibians*. Elsevier, Amsterdam, pp 55–81
- Uribe MC, Gomez G, Brandon RA (1994) Spermatogenesis in the urodele *Ambystoma dumerilii*. *J Morphol* 222:287–299
- Voronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P, Nagamori I (2011) RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 22:1–27
- Voss S, Smith J (2005) Evolution of salamander life cycles: a major effect QTL contributes to discreet and continuous variation for metamorphic timing. *Genetics* 170:275–281
- Wakahara M (1996) Heterochrony and neotenic salamanders: possible clues for understanding the animal development and evolution. *Zool Sci* 13:765–776
- Wallace H, Badawy G, Wallace B (1999) Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell Mol Life Sci* 55:901–909
- Wallacides A, Chesnel A, Chardard D, Flament S, Dumond H (2009) Evidence for a conserved role of retinoic acid in urodele amphibian meiosis onset. *Dev Dyn* 238:1389–1398
- Wright K, Whitaker B (2001) *Amphibian medicine and captive husbandry*. Krieger, Florida
- Zambrano L, Reynoso VH, Herrera G (2004) Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Instituto de Biología, UNAM. Base de datos SNIB-Conabio Proyecto AS004

CAPÍTULO II

Dimorphic protein expresión for *Sox9* and *Foxl2* genes in the testicles and ovaries of the urodele amphibian: *Ambystoma mexicanum*



Dimorphic protein expression for *Sox9* and *Foxl2* genes in the testicles and ovaries of the urodele amphibian: *Ambystoma mexicanum*

Eva Mendoza-Cruz¹ | Norma Moreno-Mendoza² | Luis Zambrano-González³ |
Tania Janeth Porras-Gómez¹ | Maricela Villagrán-SantaCruz¹

¹Laboratorio de Biología Tisular y Reproductora, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

²Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

³Laboratorio de Restauración Ecológica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Correspondence

Maricela Villagrán-SantaCruz, Laboratorio de Biología Tisular y Reproductora, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C. P. 04510 Ciudad de México, México.
Email: mvsc@ciencias.unam.mx

Abstract

Ambystoma mexicanum is an endemic salamander from Mexico. Due to its neotenic characteristics, it is considered an important model for regeneration and development studies. However, there is little research concerning the pattern of gene expression related to testicular and ovarian function. In this study, we analyse expression of the protein of the *Sox9*, *Foxl2* and *Vasa* genes, and Δ^5 -3 β HSD enzyme activity in ovaries and testicles of *A. mexicanum*. Correlating morphology with the expression of *Sox9* and *Foxl2*, we find that these genes manifest sexually dimorphic expression. *Sox9* is expressed at higher levels in the testicle, whereas *Foxl2* is specific to the ovary. *Vasa* was detected in spermatogonia in the anterior region of the testis, and in the ovary, it was located in previtellogenic oocytes. Δ^5 -3 β HSD was located in Leydig cells of the testicles and theca cells of the ovaries. In summary, the dimorphic expression of *Sox9* and *Foxl2*, and that of *Vasa* in the germ line are similar to that described for other vertebrates, suggesting that the molecular mechanisms related to ovarian and testicular function in *A. mexicanum* follow a similar expression pattern that is not altered by neotenic characteristics.

KEYWORDS

Ambystoma mexicanum, *Foxl2*, *Sox9*, *Vasa*, Δ^5 -3 β HSD

1 | INTRODUCTION

The *Ambystoma mexicanum* axolotl is a salamander endemic to Mexico that presents pedomorphic characteristics. This condition of retaining larval characteristics up until sexual maturity has made this axolotl a model organism for biological research, with importance for regeneration and embryonic development studies in general (Eisthen & Krause, 2012). However, despite the neotenic condition that this organism presents, little is known about its reproductive characteristics, particularly about the expression pattern of genes related to testicular and ovarian function and their relationship to the neotenic condition, characteristic of *A. mexicanum*.

In this regard, classic studies that deal with sexually reversed organisms have suggested that *A. mexicanum* females are heterozygous in terms of sex, as they have Z and W heteromorphic sex chromosomes, and the Z chromosome usually represents a male-determining chromosome. Thus, these genetic experiments have established a ZW-type sexual determination mechanism for *A. mexicanum* (Humphrey, 1945, 1957; Smith, & Voss, 2009). Based on the proposal that attests to this type of sexual determination mechanism, recently it has tried to identify specific regions in the W chromosome associated with sex, where an ATRX gene that is a paralogue of ATRW and an orthologous gene called MAP2K3 have been linked to sex, and proposed as markers for the

identification of the sex of axolotls (Keinath, Timoshevskaya, Timoshevskiy, Voss, & Smith, 2018).

Despite the fact that a sex gene or sex-determining genes in *A. mexicanum* have not yet been identified with exactitude, somatic genes conserved in vertebrates have also been related to the processes of sexual determination and differentiation, as well as to gonadal morphogenesis. In this way, a large number of genes related to gonadal sexual determination and differentiation, as well as genes involved in testicular and ovarian function, have been described in other vertebrates, mainly in mammals. Genes that play a more relevant role in maintaining the functionality of the adult testis and/or the ovary of vertebrates include the transcription factor *Sox9* (SRY-box 9). This gene is highly conserved throughout the evolution of vertebrates, including amphibians (Nagai, 2001). It is a member of the family of SOX transcription factors, occupies a domain within a group that manifest high mobility (HMG) to DNA and two transactivation domains (Harley, Clarkson, & Argentaro, 2003). Among mice, it has been described as being expressed when embryonic development initiates in the nuclei of Sertoli cells, as it is necessary for their differentiation, as well as for the formation and maintenance of seminiferous tubules in testicular morphogenesis (Quin and Bishop, 2005). In amphibians, *Sox9* has been studied extensively among several anuran species such as *Rana rugosa* (Takase, Nōguchi, & Nakamura, 2000), *Xenopus laevis* (Osawa, Oshima, & Nakamura, 2005) and *Xenopus tropicalis* (El Jamil, Kanhoush, Magre, Boizet-Bonhoure, & Penrad-Mobayed, 2008), where it is apparent that during embryonic and larval development, this gene is expressed in both male and female gonads. However, following metamorphosis, when a testicle and an ovary have already been differentiated, its expression is detected only in the testicles (Flament, Chardard, Chesnel, & Dumond, 2011). In urodele amphibians, the expression of *Sox9* has been studied in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*, where it was observed that this gene is expressed in both sexes during larval development and only in the testis at the end of metamorphosis (Dumond et al., 2011). Subsequently, in adult stages it is once again detected in both sexes, so it has been suggested that *Sox9* may play a role during late gonadal differentiation. As it is expressed in the ovary, there is a suggestion that it plays a role in the functionality of the adult ovary of this newt (Dumond et al., 2011).

Another of the relevant genes in ovarian and testicular differentiation of vertebrates is the transcription factor *Foxl2* (forkhead box L2). *Foxl2* is one of the genes expressed in early development with a sexually dimorphic pattern, acting as a marker of ovarian differentiation in mammals and able to play a role in the differentiation of ovarian somatic cells and in the development or maintenance of folliculogenesis (Bertho et al., 2016; Cocquet et al., 2018). In Anuran amphibians such as *R. rugosa* and *X. laevis*, apparently *Foxl2*

transcripts are expressed in undifferentiated gonads of both sexes before the onset of sexual differentiation, its greatest expression being in females. To identify the cell type expressed by *Foxl2* in the *R. rugosa* ovary, protein expression, detected in somatic cells that surround the oocytes in ovaries just after metamorphosis, was analysed (Flament et al., 2011; Oshima, Uno, Matsuda, Kobayashi, & Nakamura, 2008). In the urodele amphibian *Andrias davidianus*, the expression of *adFoxl2* was greater in the ovary than in other tissues. During the development of the gonads, transcription of *adFoxl2* mRNA was significantly greater in the ovary than in the testicles and increased gradually with respect to age; thus, it appears that this gene plays a role in the development of the oocytes. *Foxl2* transcripts were detected in granulosa cells in the ovary and in spermatocytes of the *A. davidianus* salamander (Hu, Meng, Tian, Zhang, & Xiao, 2016).

In virtually all vertebrates, the testicles and ovaries have the same developmental origin: the primordial gonads. Prior to sex determination, the primordial gonads, also known as bipotential gonads, are made up of multipotent somatic progenitor cells that are able to adopt one or other sex-specific cellular outcome. During sex determination, the support cell lineage differs to become either Sertoli cells in the testicles (Sekido, Bar, Narváez, Penny, & Lovell-Badge, 2004) or pre-granular cells in the ovaries (Chassot et al., 2012). After undergoing cell differentiation, the outcome concerning sexual definition spreads to other somatic lineages, including steroidogenic cells (Leydig cells in the testicles and theca cells in the ovaries) that then promote the acquisition of primary and secondary sexual characteristics, by means of hormonal regulation. During the production of steroid hormones, there are two biosynthesis pathways, known as $\Delta 4$ and $\Delta 5$, which use cholesterol as a precursor. This is unfolded by a series of enzymes, until it transforms into pregnenolone, an intermediate hormone that is common in all types of steroid hormones, produced by both the ovaries and the testicles, as well as by other types of steroidogenic organs (Gore-Langton and Armstrong, 1988). Pregnenolone is in turn converted to progesterone by the $\Delta 5$ - 3β hydroxysteroid dehydrogenase enzyme complex ($\Delta 5\beta$ -HSD). Activity on the part of the $\Delta 5\beta$ -HSD enzyme complex is essential for carrying out steroid hormone production, which is why it is considered an early physiological marker of steroidogenic cells, in turn influenced by age, sex, cyclic phenomena, diet and stress (Goldman, Baker & Stanek, 1972). Pioneer studies on the histoenzymatic activity of $\Delta 5\beta$ -HSD were described by Levy, Deane, and Rubin (1959), in order to determine the location and abundance of enzymes and other compounds related to steroid metabolism. Indication of enzymatic activity relates to the transfer of hydroxysteroid hydrogens to the tetrazolium salt, via a pyridine nucleotide (NAD⁺); in this way, the salt is reduced

and as in its reduced form it is insoluble and coloured (formazan salt), when deposited at the reaction site it can be localized. In this way, this enzymatic reaction has been used to locate steroidogenic activity related to both testicular Leydig cells and ovarian theca cells (Warttenberg, 1958; Christensen, 1975; Martínez-Juárez et al., 2018).

Due to the importance of the *Sox9* transcription factor in the development and maintenance of Sertoli cells in adult testis, and of *Foxl2* in the regulation of the development and maintenance of the ovary, the objective of our work was to characterize protein expression pattern of the *Sox9* and *Foxl2* genes in the ovaries and testicles of 18-month-old *A. mexicanum*, using as a germ line marker to the RNA helicase *Vasa* and as the steroidogenic cell line the activity of the Δ^5 -3 β HSD enzyme. Finally, we correlated our results with the ultrastructure of these tissues.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

Ovaries from five female and testicles from five male *A. mexicanum* were obtained. 18-month-old adult organisms were donated by the Laboratory of Ecological Restoration of the Institute of Biology, UNAM, FAUT-0112. Subsequently, these were transferred to the Biomedical Research Institute, where they were sacrificed following procedures described in the Laboratory Animal Use Guide of the Ethical Committee in the Biomedical Research Institute (UNAM). Animals were placed in a solution of 2% NaHCO₃ at 4°C, in order to anaesthetize them, and then immediately sacrificed by decapitation. The ovaries and testes were then surgically removed and cut into several pieces. A fragment was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for immunofluorescence and immunohistochemistry. Finally, other fragments were frozen for total protein extraction and Western blot analysis.

2.2 | Histological preparation

The ovaries and testes were fixed in Bouin solution for 24 hr at 4°C. The tissue was dehydrated in ethanol solutions ranging from 30% to 100%, and then, tissue clearance was performed on xylol (JT Baker, Edo. Mex., México), and subsequently infiltrated and embedded in paraffin liquid, permitting the formation of solid blocks. Sections of 7 μ m were obtained using an 820 Spencer Microtome (American Optical Corporation, New York, USA) and stained with haematoxylin and eosin (Electron Microscopy Sciences (EMS); Hatfield, PA, USA—Amresco, Solon, OH, USA), employing standard techniques. Samples were prepared

using permanent mounting medium (Entellan, J.T. Baker, Xalostoc, Edo. of México, México).

2.3 | Light microscopy

Fragments from ovaries and testicles were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965) for 24 hr at 4°C and then transferred into sodium cacodylate buffer (0.1 M pH 7.4) and stored for 24 hr at 4°C. Subsequently, tissues were post-fixed in osmium tetroxide (OsO₄; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 hr and dehydrated in 70%–100% ethanol solutions (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. of México, México). They were then placed in acetonitrile (J.T. Baker) twice for 20 min each and incubated in dilutions of Embed 812 resin (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) acetonitrile (J.T. Baker) 1:1 for 1 hr and 2:1 for another hour. Finally, samples were incubated in pure Embed 812 resin for 24 hr and polymerized in plastic blocks at 60°C for 24 hr. For each sample, semi-thin sections of 1 μ m thickness and 60 nm thickness were obtained using a Leica ultramicrotome (Wetzlar, Germany). The semi-thin sections were stained with toluidine blue, mounted with Cytoseal mounting medium (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) and observed under a light microscope (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

2.4 | Immunofluorescence

Immediately after dissection, ovary and testis fragments were fixed in PFA (4% in 1X PBS, pH 7.1) for 30 min, washed with 1X PBS for 5 min and placed in 30% sucrose in PBS (Sigma-Aldrich) at 4°C, overnight. Samples were soaked in optimum mounting medium for frozen sectioning (OCT; Tissue-Tek, Sakura, CA, USA) and frozen in hexane (JT Baker) at -70°C. Subsequently, we obtained 20- μ m sections in a cryostat (Leica CM 1850). Immunofluorescence technique was performed as previously described by Moreno-Mendoza, Harley, and Merchant-Larios (1999). Briefly, sections were treated with Triton X-100 (1% in 1X PBS) for 10 min, washed with 1X PBS and blocked for 2 hr with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich). Sections were incubated separately with polyclonal antibodies against VASA (1:250; Abcam, ab13840) and SOX9 (1:250; Millipore, AB5535) and diluted in 1% albumin overnight at 4°C. They were then washed four times with 1X PBS for 5 min and incubated with the secondary antibody cyanine 3 (Cy3) (1:200; Life Technology, A10520) diluted in albumin/1X PBS for 1 hr at room temperature. Finally, sections were mounted in medium for permanent fluorescence (Dako™) and stored at 4°C for analysis under a Zeiss confocal microscope (LSM 5 Pascal; Carl Zeiss, Jena, Germany),

equipped with argon–krypton and helium–neon, employing filters for Cy3 and Nomarski interference contrast technique.

2.5 | Immunohistochemistry

Ovaries and testes were embedded in paraffin following the aforementioned light microscopy protocol. Sections were placed in a vacuum for 24 hr, at 4°C. Sections were dewaxed using standard techniques. Subsequently, they were placed in 0.01 M hot pH 6 sodium citrate and allowed to cool to room temperature. The samples were washed with 1X PBS for 10 min. Endogenous peroxidase was inactivated with 3% hydrogen peroxide (J.T. Baker) in methanol for 30 min. Sections were then washed with 1X PBS for 5 min, and 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) was added for 10 min. Sections were then washed with 1X PBS, blocked with 1% albumin for 2 hr and incubated overnight with FOXL2 primary antibody (sc-68348; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) at a 1:50 dilution. The following day, sections were washed four times in 1X PBS for 5 min each. The Vector AB kit was used, and sections were incubated with the anti-rabbit secondary antibody at a 1:100 dilution in 1% albumin (Sigma-Aldrich) for 1 hr at room temperature. Sections were washed four times in 1X PBS for 5 min each and then placed in the AB reagent prepared following the Vector AB kit instructions (Vectastain ABC Kit, Burlingame, CA). Sections were washed again, four times in 1X PBS for 5 min each and finally developed with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) for 4 min. Slides were allowed to dry at room temperature and mounted using Cytoseal mounting medium.

2.6 | Detection of $\Delta 5$ -3 β HSD activity

Fourteen-micron-thick sections were extracted from the tissues included in Tissue-Tek, and incubated at 37°C in histoenzymatic detection medium of $\Delta 5$ -3 β HSD, composed of 20 mg of β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD; N1636-250; Sigma-Aldrich), 20 mg of Nitro Blue Tetrazolium (N5514-10; Sigma-Aldrich) and 2 mg of dehydroisoandrosterone (D-4000; Sigma-Aldrich) for 1 hr. Sections were washed with distilled water and mounted in a permanent aqueous medium (Dako™) for observation under a light field microscope (Levy et al., 1959).

2.7 | Western Blot analysis

Snap-frozen testicle and ovary were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulphate), in the presence of a protease inhibitor mixture

and centrifuged at 16,000 g for 20 min at 4°C. Supernatants were collected and stored at –80°C until use. Total protein content in supernatants was assayed using the Pierce Bicinchoninic Acid Protein assay (Thermo Scientific, IL, USA). Fifty micrograms of protein from testicle and ovary homogenates, diluted in loading buffer (Laemmli 2 x containing 1% β -mercaptoethanol), was separated by electrophoresis on 12% SDS-PAGE home-made gels at 150 V for 60 min and transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), using semi-dry blot system (Bio-Rad) at 25 V for 50 min. Membranes were blocked in PBS/2% non-fat dry milk, overnight at 4°C and incubated overnight at 4°C with primary antibodies SOX9 (AB5535, Millipore, Burlington, MA), FOXL2 (sc68348, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), VASA (Abcam, abb13840) and β -actin (A2066, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). After washing with PBS/0.2% Tween, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies anti-rabbit IgG (Invitrogen, CA, USA) at RT for 1.5 hr. Chemiluminescence revealed immunoreactivity bands, employing a Super Signal Wets Dura Extended Duration Substrate Kit (Thermo Scientific, IL, USA) according to the manufacturer's protocol. The optical density (intensity/mm²) for each band was quantified by densitometry using ImageJ software.

2.8 | Densitometric analysis

The optical density of each sample was normalized with respect to corresponding actin values. Expression values for each protein are represented as arbitrary relative expression communities, obtained from the ratio of protein interest/actin for each sample. Relative expression values are represented as the mean derived from independent experiments \pm standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey multiple comparison test with a 95% confidence interval was performed, using the Statgraphics Centurion XV statistical program.

3 | RESULTS

3.1 | Morphology of *Ambystoma mexicanum* ovary

Ovarian fragments from 18-month-old *A. mexicanum* were processed to provide a structural description; oocytes were classified according to their stage of development based on Uribe (2010) and Erler, Sweeney, and Monaghan (2017). Ovaries were observed as paired, voluminous structures that are located in the posterior mid-body region to either side of the midline, parallel to the kidneys. The wall of the ovary

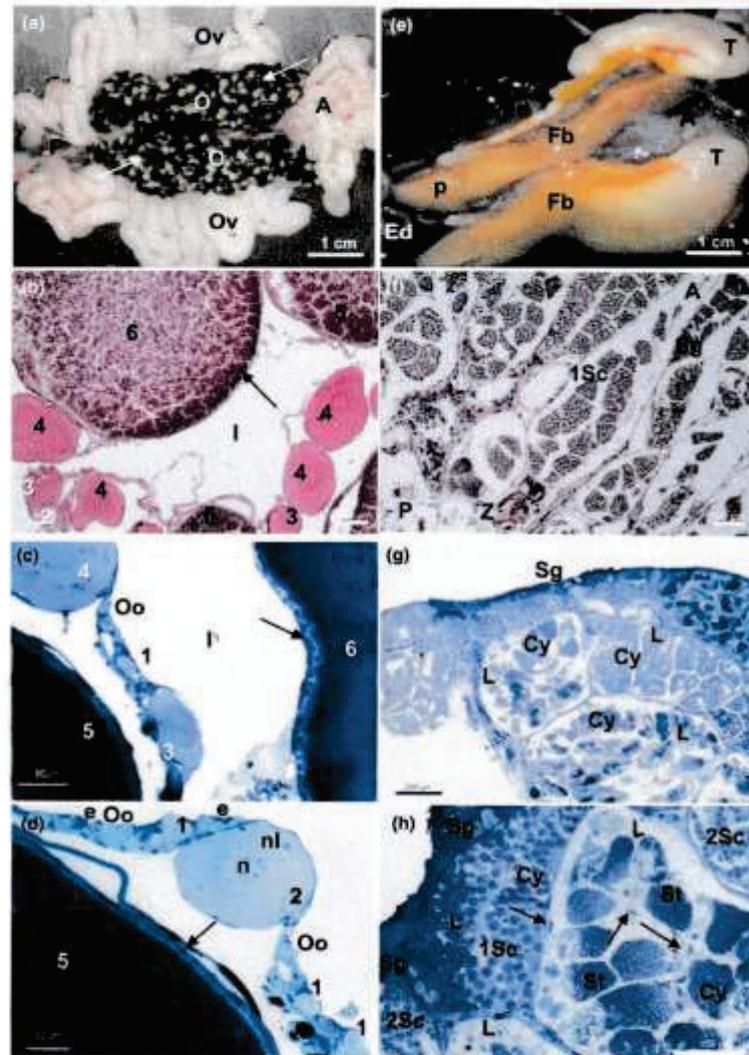


FIGURE 1 Morphology of ovaries and testicles of 18-month-old *Ambystoma mexicanum*. (a) Anatomy of the female reproductive system from an anterior (A) and posterior (P) perspective. Ovaries (Ov), oviducts (Ov), oocytes (arrow). (b) Histological section of an ovarian fragment where oocytes undergoing stages II, III, IV, V and VI are visible in the lumen (l). Pigmentation is evident at the animal pole in stage V and stage VI oocytes. (c) Semi-thin ovary section, where oocytes are visible at stages III and IV and among them an oogonia nest (Oo) and an oocyte at stage I. At the ends, there are two oocytes at stages V and VI surrounded by follicular cells (arrow), and at the centre the lumen (l). (d) Semi-thin ovarian section showing epithelial cells on the ovarian wall (e), oogonia nests (Oo) and oocytes at stages I and II with prominent nucleus (n) and several nucleoli (nl), as well as an oocyte at stage V with follicular and theca cells (arrow). (e) Anatomy of the male reproductive system. Testis (T), efferent ducts (Ed), fatty bodies (Fb), anterior region (A), posterior region (P). (f) Histological section of the testicle, showing different stages of spermatogenesis from the anterior region (A) to the posterior (P). (g) Section of the testicle showing the testicular lobes (Lb) containing cysts (Cy), and showing spermatogonia (Sg) nests at the periphery. (h) Amplification of the anterior region of the testicle, showing cysts (Cy) within the lobes (Lb), note the nuclei of Sertoli cells (arrow) surrounding the cysts. At the limit are isolated or grouped spermatogonia (Sg)

is transparent, making it possible to observe the larger vitellogenic oocytes, which manifest clear regionalization, where the animal pole is darker due to pigmentation and the plant pole, with greater concentration of yolk (Figure 1a), is

lighter. Morphologically, the ovary appears to have a saccular structure; the outer limit of the ovary is made of cubic or flattened epithelial cells and at some points on this delimiting epithelium, groups of oogonia and stage I oocytes can be

observed forming nests (Figure 1c,d). At the periphery of the ovary, attached to the epithelium are the follicles at different stages of development, which hang from the wall, and grow and develop into the ovarian cavity (Figure 1b). The follicles in primary growth at stage I are located in the nests, formed from oocytes that have a spherical nucleus with a nucleolus, and outside a number of flattened follicular cells surround the oocyte (Figure 1b,c,d). In stage II follicles, the nucleus of the oocyte is central and spherical, containing one or more nucleoli and is already completely surrounded by follicular cells. At stage III, the nucleus of the oocyte is large, spherical and has several peripheral nucleoli, and its cytoplasm is homogeneous with peripheral vitelline vesicles, which are surrounded by a layer of flattened follicular cells (Figure 1b,c,d). From stage IV onwards, secondary growth begins, where the presence of yolk is evident at the periphery of the oocyte cytoplasm. During stages V and VI, the size of the oocytes increases markedly by the accumulation of yolk platelets, and at stage V, the animal pole is clearly distinguished by deposition of pigment in the cortical cytoplasm (Figure 1b). At stage VI, the yolk platelets are larger and more abundant and are mostly located at the plant pole. At the periphery of stage V and stage VI oocytes, the follicular wall consisting of thin follicular cells is notable (Figure 1c,d).

3.2 | Morphology of the *Ambystoma mexicanum* testicle

Anatomically, *A. mexicanum* testicles were observed as paired organs located parallel to the axis of the body, attached to the dorsal wall of the body by the mesorchium and located prior to or cranial to the kidneys (Figure 1e). These are elongated structures composed of several lobes and are surrounded by fibrous connective tissue that forms the tunica albuginea. Histologically, the testicles consist of testicular lobes, including interstitial connective tissue (Figure 1f,g,h). This morphological conformation indicates that the spermatogenesis process occurs longitudinally from the anterior or cephalic dorsal region towards the caudal or posterior region of the testis; this is a process of gradual and regionalized germ cell maturation, which is also cystic. Each testicular lobe is made up of several cysts and each of these cysts is structured by the relationship between one or several spermatogonia and one or several Sertoli cells, to form the wall of the cyst (Figure 1h). Depending on the testicular region, the lobes present cysts with development that is synchronous with the germ line cells, which mature progressively in a caudal cephalic direction with respect to the testis. In this way, in each testicular region we can observe lobes with cysts that manifest different types of spermatogenic cells, ranging from spermatogonia located at the periphery of the anterior or cephalic region, to cysts of

primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa towards the posterior or caudal region (Figure 1f,g,h). Testicular lobes are surrounded by loose interstitial tissue, where Leydig cells are located.

3.3 | Expression of SOX9, FOXL2 and VASA proteins in *Ambystoma mexicanum* testis

Combining Nomarski's microscopy and immunofluorescence techniques, it was apparent that *SOX9* protein expression is located in the nucleus of Sertoli cells. Evidently, within each testicular lobe, spermatogenic cells differentiated to the same degree can be identified, grouped into cysts in the same lobe. Likewise, each cyst is associated with several Sertoli cells (Figure 2a,b,c). Regarding the expression pattern of the *Foxl2* protein, no expression signal was detected in situ in the *A. mexicanum* testis (Figure 3a). As for the expression of the *Vasa* RNA helicase, this was located in the cytoplasm of germ or spermatogonia cells within cysts that form lobes located in the peripheral dorsal and more cephalic region of the testis (Figure 4a,b,c). It was apparent that as sperm cells progress in their differentiation, the cytoplasmic expression of the *VASA* protein declines, which was evident in spermatogonia that are initiating meiosis, that is primary spermatocytes (Figure 4c).

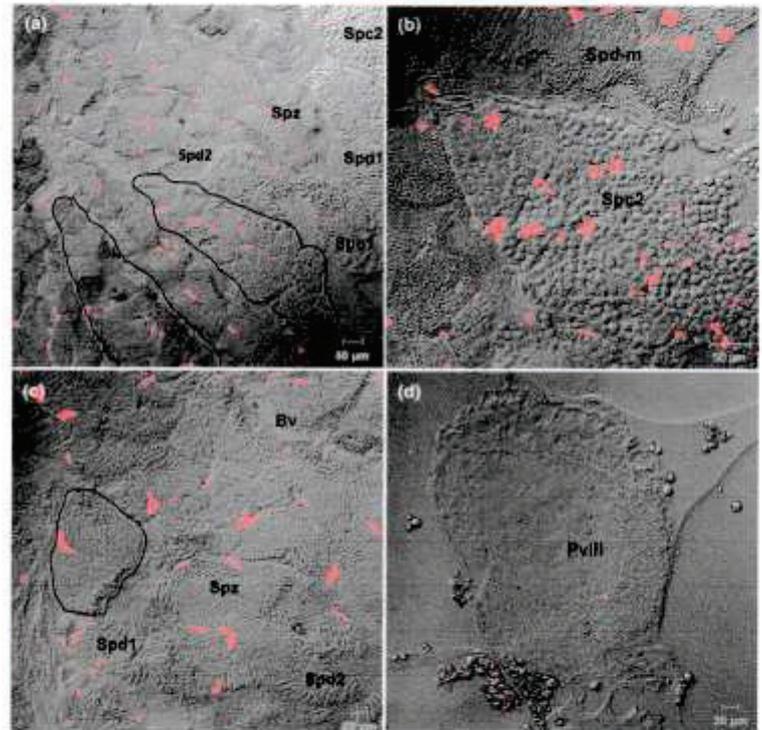
3.4 | Expression of SOX9, FOXL2 and VASA proteins in *Ambystoma mexicanum* ovary

In 18-month-old *A. mexicanum* ovaries, it was not possible to detect the expression of the *Sox9* protein by immunofluorescence (Figure 2d). This may be due to the fact that the ovary is a large and elongated structure, and this technique obtains 20- μ m sections, so *SOX9* is probably indicated by oogonia nests, as expression of this gene would be required for oogenesis. Contrary to what was found with the *Sox9* transcription factor, *Foxl2* protein expression was observed in the cytoplasm of follicular cells that surround oocytes at different stages of follicular development, being most evident in vitellogenic oocytes, where many yolk platelets have already accumulated (Figure 3). With respect to the expression pattern of the *Vasa* protein, as in most vertebrates, this was observed in the cytoplasm of previtellogenic oocytes or during primary stage III growth (Figure 4d).

3.5 | Detection of Δ^5 -3 β HSD enzymatic activity in *Ambystoma mexicanum* testes and ovaries

Δ^5 -3 β HSD activity was detected by the accumulation of granular formazan deposits, resulting from the transfer of hydroxysteroid hydrogen to the tetrazolium salt, by means of a

FIGURE 2 Expression of the transcription factor *Sox9* in testis and ovary of *Ambystoma mexicanum*. (a) Expression of the *Sox9* protein in the nuclei of Sertoli cells (red) located between the cysts that make up the testicular lobes (black contour), (b) Amplification of (a) where the nuclei of Sertoli cells (red) are visible, adjacent to cysts containing secondary spermatocytes (Spc2) surrounded by lobes with elongated spermatids (Spd2). (c) Detail of another region of the testicle where lobes with sperm cells are visible at different stages of development grouped in cysts and associated with Sertoli cells, the latter evidenced by the positive expression of *SOX9*. (d) In the ovary, no *SOX9* signal was detected as shown in a stage III previtellogenic oocyte (PvIII)



pyridine nucleotide (NAD⁺). In this way, the salt is reduced, and because its reduced form is insoluble and coloured (formazan salt), this is deposited at the reaction site. Because of this, we identified Δ^5 -3 β HSD activity in *A. mexicanum* testicles, similar to that detected in mouse testicles, used as a positive control for this technique (Figure 5f). Formazan deposits accumulated in cells located in the interstitial compartment that surrounds the testicular lobes (Figure 5a), where Leydig cells are usually found in the testicles of vertebrates. Analysing the accumulation of formazan granule deposits in greater detail, these deposits were detected in cells with steroidogenic characteristics, demonstrated by lipid accumulation (Figure 5b,c). In the ovaries of *A. mexicanum*, deposits of formazan, which are a sign of steroidogenic activity, were detected in some cells located in the theca region of the follicles (Figure 5d). A weak signal was also observed at the periphery of the vitellogenic oocyte cytoplasm (Figure 5e).

3.6 | Quantification of SOX9, FOXL2 and VASA proteins in testes and ovaries of *Ambystoma mexicanum*

Protein quantification was performed by Western blot transfer analysis (Figure 6a). We perceived that similar to the

results obtained for the location of the protein for the transcription factor *Sox9*, this factor was expressed in both sexes; however, the expression of this protein was significantly higher in the testicles than in the ovaries. In the case of the *Foxl2* protein, as shown by the immunohistochemical tests, this was not detected in the testicles; however, in the ovaries, protein expression of this gene was clearly evident. We also discerned that the Vasa protein is expressed both in the ovary and in the testis; however, higher levels were detected in the testis (Figure 6c). The β -actin loading control was used as a positive control, with no apparent differences between ovary and testis (Figure 6b).

4 | DISCUSSION

The external morphology and histological structure of the *A. mexicanum* ovary from 18-month-old specimens used in present investigation confirms that these are sexually mature organisms or reproductive adults. In the ovary, oogonia located in nests were observed at different sites in the ovarian wall with oocytes at different stages of development, that is from primary growth (previtellogenesis) during stages I, II and III to secondary growth (vitellogenesis) during stages IV, V and VI. Likewise, in the male gonads there is typical

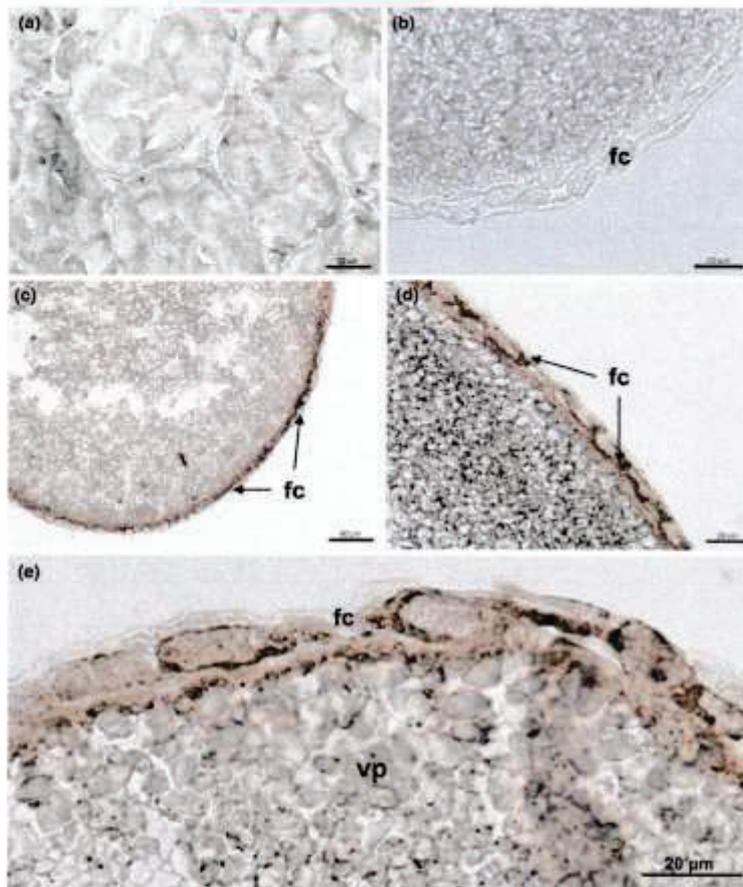


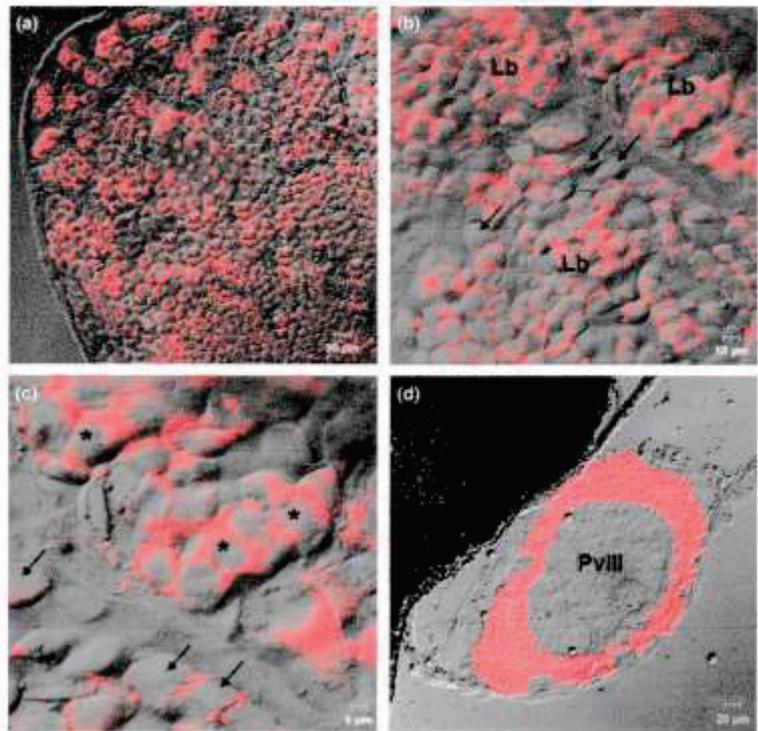
FIGURE 3 Immunohistochemical localization of the *Foxl2* protein in testis (a) and ovary (b–e) of *Ambystoma mexicanum*. (a) In the testicles, no *FOXL2* protein signal was detected in any cell type. (b) Ovarian section used as a specificity control, where the primary antibody was omitted. (c) Ovarian section, where a stage VI vitellogenic oocyte (VgVI) surrounded by follicular cells (fc) is visible. (d) Amplification of (c) where follicular cells (fc) expressing *FOXL2* are visible. (e) Greater amplification of oocyte formed out of yolk platelets (vp), where the positive expression of *FOXL2* in the surrounding follicular cells (fc) is evident

active cystic spermatogenesis with a type of caudal cephalic maturation, coinciding with the characteristics that have been mentioned for other urodeles (Erlar et al., 2017; Propper, 2011; Uribe, 2009, 2011; Uribe and Mejía-Roa, 2014). It thus appears that adult organisms of *A. mexicanum* show a typical urodele reproductive pattern, despite continuing to maintain larval characteristics.

In the present study, we analyse *Sox9* gene expression involved in testicular function and *Foxl2* gene involved in the ovarian function of vertebrates, as well as the expression of highly conserved *Vasa* helicase in the development and maintenance of the germ line. Although the morphological changes that occur in the developing testicles and ovaries are well-defined in some amphibian species, especially anurans, the genetic regulation of gonadal morphogenesis in urodele amphibians is poorly understood. However, it is probable that genes involved in testicular and ovarian morphogenesis and their maintenance are expressed in a spatiotemporal manner coinciding with the morphological changes that occur during gonadal differentiation. In the *A. mexicanum*

testicle, the *Sox9* protein was detected in somatic cells, which correspond to Sertoli cells and coincides with their location within the testicular lobes. Therefore, considering what has been observed in other amphibians and vertebrates in general, the *Sox9* gene in *A. mexicanum* may play a role in the development of testicular structures and, therefore, in the differentiation and maintenance of the testis. The expression of *Sox9* in the urodele amphibian *A. mexicanum* suggests an evolutionarily conserved role in the development of vertebrate testicles. The functional importance of *Sox9* in the differentiation of the male phenotype (testicular differentiation) has been widely reported among vertebrates (Kent, Wheatley, Andrews, Sinclair, & Koopman, 1996; Morais da Silva et al., 1996; Moreno-Mendoza et al., 1999; Spotila, Spotila, & Hall, 1998). In particular, among Anuran amphibians, the expression of *Sox9* has been studied in some species of adult amphibians such as *R. rugosa* and *X. laevis*, where the expression of *Sox9* is dimorphic, and only detected in the testis (Flament et al., 2011; Osawa et al., 2005; Takase et al., 2000). However, in other Anuran such as *X. tropicalis* and

FIGURE 4 Expression of RNA helicase VASA in the testis and ovary of *Ambystoma mexicanum*. (a) Transverse and anterior section of testis, where VASA protein expression in the cytoplasm of sperm cells is shown in red. (b) Amplification of (a) where three lobes are visible (Lb) containing VASA-positive cells, in which their cytoplasm is completely red and cells marking this appear to decrease (Arrows). (c) Greater magnification shows a lobe with three cysts containing spermatogonia, evidenced by the expression of VASA that completely surrounds the nucleus (*) of these cells. Adjacent to this lobe, another lobe is found with cells where VASA expression is decreasing, indicating that these are primary spermatocytes (arrows). (d) In the ovary of *Ambystoma mexicanum*, VASA was detected in the previtellogenic oocytes and a stage III oocyte (PvIII) is shown



Bufo marinus, in addition to the detection of *Sox9* protein expression in the testicle, it was also observed in the ovary, in the cytoplasm of previtellogenic oocytes (Abramyan, Feng, & Koopman, 2009; El Jamil et al., 2008). Similarly, in the urodele amphibian *P. waltl*, *Sox9* expression was detected as much in ovaries as in testicles (Dumond et al., 2011), findings that corroborate with those of this study. Recently, the Penrad-Mobayed group investigated the nuclear localization of the *SOX9* protein in adult oocytes of the Anuran amphibian species *X. laevis*, *X. tropicalis* and the urodele *P. waltl*. They observed that there is indeed a nuclear localization of the *Sox9* protein in nuclear extracts from adult oocytes of these amphibians and they suggest a role in post-transcriptional processes and possibly a different biological role on the part of this protein, in the later stages of oogenesis (El Jamil et al., 2008; Penrad-Mobayed et al., 2018). Evidently, the expression of the *SOX9* protein in adult ovaries, specifically in oocytes, is not restricted to species of Anuran amphibians or urodeles, but also occurs in fish such as *Oryzias latipes* (Yokoi et al., 2002), *Danio rerio* (Rodríguez-Mari et al., 2005), *Chapalichthys encaustus* (Guerrero-Estévez et al., 2012) and even reptiles such as *Crocodylus moreletii* (Martínez-Juárez, López-Luna, Porras-Gomez, & Moreno-Mendoza, 2018), so this may in fact be a general characteristic of anamniotes and amniotes (Dumond et al., 2011; Penrad-Mobayed et al., 2018).

Among genes that maintain the morphology and function of the ovary, we analyse the *Foxl2* transcription factor, which has been described as being responsible for the transformation of androgens to oestrogens and granulosa cell differentiation (Nef & Vassalli, 2009; Villareal & Aguilar, 2014) and for maintaining the morphology of the adult ovary in several vertebrate species (Uhlenhaut et al., 2009). In the *A. mexicanum* ovary, we found that *Foxl2* protein expression is located in the cytoplasm of follicular cells, surrounding oocytes undergoing secondary growth during stages V and VI (vitellogenic), during which the large accumulation of yolk platelets is already evident, conforming with the idea that the expression pattern for the *Foxl2* gene is highly conserved throughout evolution (Bertho et al., 2016). In the testicle, *Foxl2* protein expression was barely detectable by Western blot or by immunohistochemistry, which suggests a dimorphic role for this gene during ovarian and testicular differentiation in *A. mexicanum*. It has been proposed that *Foxl2* expression is essential for the differentiation of granulosa or follicular cells and for the maintenance of the ovary, by negatively regulating the expression of *Sox9*. In the absence of *Foxl2*, there is no differentiation of granulosa cells and, therefore no folliculogenesis, as primary follicles die by apoptosis in the absence of functional granulosa cells. As mentioned, in our observations of *A. mexicanum*, *Foxl2* presents a sexually dimorphic expression pattern, so it can be considered an indicator of female

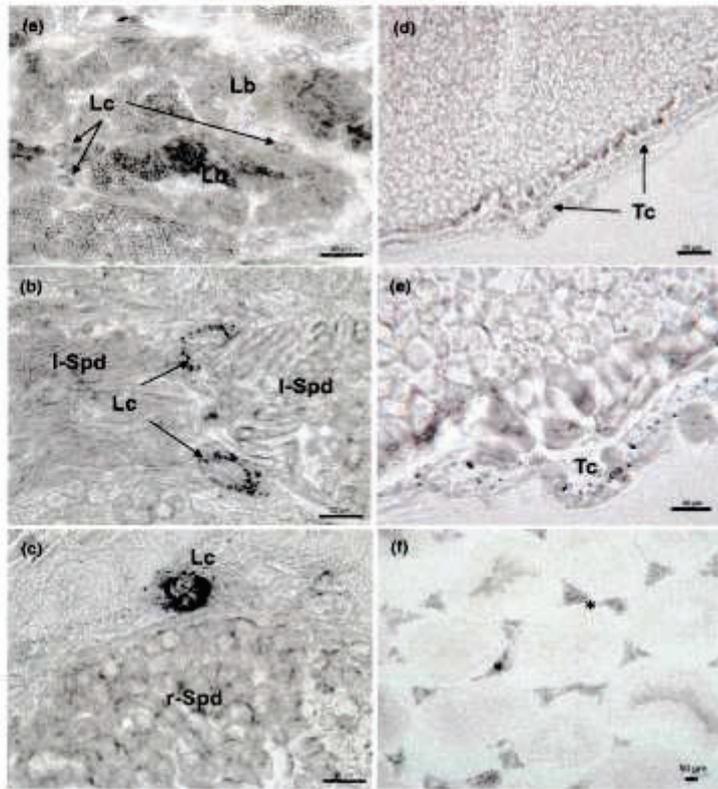


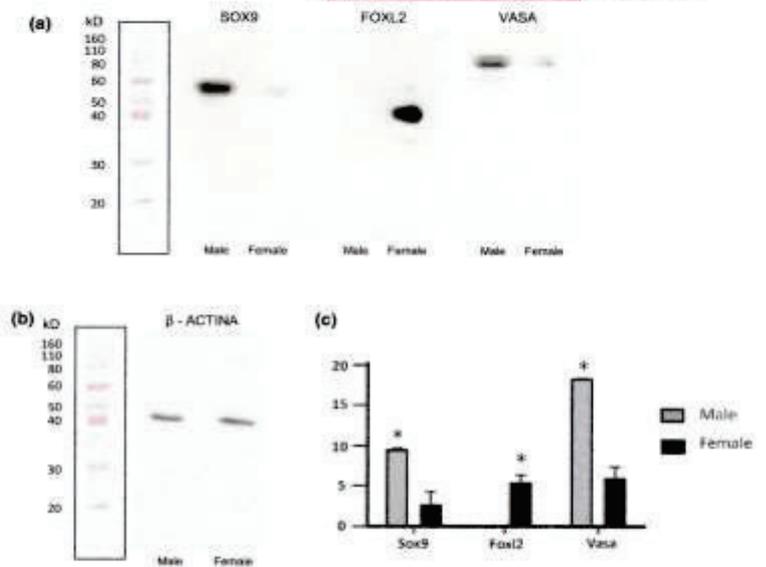
FIGURE 5 Detection of the Δ^5 -3 β HSD enzyme in testis (a, b and c) and ovary (d and e) of *Ambystoma mexicanum*. (a) Expression of Δ^5 -3 β HSD in Leydig (Lc) cells located in the interstitium surrounding the testicular lobes (Lb). (b) Detail of Δ^5 -3 β HSD expression in the cytoplasm of Leydig cells (Lc) located in the interstitium and adjacent to the membrane of two testicular lobes (Lb) containing elongated spermatids (Spd2). (c) Detection of a Leydig cell with formazan deposits located adjacent to a testicular lobe (Lb) made up of round spermatids (Spd1). (d) Detection of Δ^5 -3 β HSD activity in theca cells (Tc) of a follicle containing a vitellogenic oocyte. (e) Detection of increased Δ^5 -3 β HSD enzyme expression in theca cells (Tc). (f) Δ^5 -3 β HSD activity in Leydig cells (*) in mouse testis used as a positive control

functional heterogamy (Schmidt et al., 2004; Shoemaker-Daly et al., 2010; Cocquet et al., 2018). *Foxl2* has not been widely studied in amphibians, but as in mammals and other vertebrates, it is also linked to the feminization and maintenance of the gonad (Bertho et al., 2016). In some Anuran species such as *R. rugosa*, *X. laevis* and *Lithobates sylvaticus*, *Foxl2* is expressed in the gonads of both sexes, although subsequently clear dimorphic expression is observed, where expression levels in the ovaries are more evident (Flament et al., 2011 and Bertho et al., 2016; Piprek, Damulewicz, Kloc, & Kubiak, 2018). In the giant salamander *Andrias davidianus*, which has a close phylogenetic relationship with *P. walt*, the expression of *adFoxl2* was characterized by observing that transcript levels gradually increase in the ovary during the first 5 years of life, being detected at significantly higher levels in the ovary than in the testicle. In situ expression is detected in ovarian granulosa cells and weakly in spermatocytes in the testis (Hu et al., 2016). Based on our observations for *A. mexicanum*, we can assume that at some time *Sox9* and *Foxl2* may coexpress during gonadal morphogenesis, in order to carry out some function possibly related to the mechanisms of gonadal sexual determination and differentiation.

Subsequently, the dimorphic expression of these genes would influence the establishment of ovarian and testicular functionality in sexually mature organisms. In this way, *Foxl2* gene function remains in the granulosa cells, while continuing to regulate and maintain ovarian functionality.

Vasa is a gene that has been used as a germ cell marker in vertebrate and invertebrate species (Molyneaux & Wylie, 2004). The *Vasa* gene codes for an RNA-dependent helicase that belongs to the DEAD box protein family, is germ line-specific and is necessary not only for germ cell specification during embryogenesis, but also for gametogenesis (Soatome, Isomura, Seki, Nakamura, & Nakamura, 2010). In this investigation, *Vasa* was located in germ line cells of ovaries and testicles of *A. mexicanum*, specifically in oocytes and spermatogonia, coinciding with that observed in a number of Anuran species (Erler et al., 2017; Komiya, Itoh, Ikenishi, & Furusawa, 1994; Marracci et al., 2007). In the *A. mexicanum* ovary, *Vasa* was expressed in the cytoplasm of oocytes undergoing primary growth (previtellogenic) stage III, which is similar to the pattern of expression observed in previtellogenic oocytes of *Rana ridibunda*, *Rana esculenta* and *Rana lessonae* (Marracci et al., 2007), as well as in the adult testis

FIGURE 6 Expression of protein from genes *Sox9*, *Foxl2* and *Vasa* in the testis and ovary of *Ambystoma mexicanum*. (a) Immunoblot for SOX9 (56kDa), FOXL2 (38kDa) and VASA (76kDa). (b) Smooth muscle β -actin (42kDa). (c) The relative expression levels obtained from the densitometric analysis of the bands obtained for each protein are visible; these were normalized with respect to actin protein. Significant differences between sexes $^*(p < .05)$



of *X. laevis* and *R. rugosa* (Soatome et al., 2010). *Vasa* protein expression levels were higher in the testis, which may be due to the fact that in the ovary, VASA is detected only in cell groups similar to those detected in nests and to the fact that as the follicular stage progresses and follicles become previtellogenic, VASA expression decreases considerably. Contrarily, in the case of the testicles, VASA was expressed in all the spermatogonia that make up the testicular lobes, probably representing the majority of cells that express this RNA helicase.

The transformation of Δ^5 - 3β HSD is essential for the biosynthesis of all kinds of active steroids such as progesterone, glucocorticoids, androgens and oestrogens. These steroid hormones play a crucial role in the differentiation, development, growth and physiology of most human tissues (Morel et al., 1997). The detection of Δ^5 - 3β HSD enzymatic activity in the *A. mexicanum* testis was evident in Leydig cells, owing to the accumulation of formazan deposits in the lipid droplets contained in the cytoplasm of these steroidogenic cells. In the ovaries, Δ^5 - 3β HSD was observed in cells located in the theca region surrounding the follicles. These positive cells mostly correspond to oocytes undergoing previtellogenesis III, suggesting that steroidogenic cells are active in 18-month-old *A. mexicanum* females. In this regard, in some amphibians such as *Rana catesbeiana*, masculinization has been seen to occur, when Δ^5 - 3β HSD activity decreases (Hsu, Hsu, & Liang, 1979; Hsu, Yu, Ku, Chang, & Liu, 1991). Studies of larvae and adults of *X. laevis* revealed Δ^5 - 3β HSD enzyme activity in the interrenal, kidney and gonad tissue. Steroidogenic activity is weak but positive during early and advanced stages, similar to that observed in *R. catesbeiana*

larvae. Similarly, after ovarian and testicular sexual differentiation, little hormonal activity is apparent, and no differences concerning this activity between sexes (Kang, Marin, & Kelley, 1995). In *P. walli*, this enzyme has been detected by histochemistry in testis and ovary (Collenot & Collenot, 1977). In other vertebrates such as the *Mabuya carinata* lizard, during their annual spermatogenic cycle, there is a well-defined seasonal lipid cycle and steroidogenic activity in the testicle. In spermatogenically active testicles, the lipids are scattered and Δ^5 - 3β HSD activity is evident in Leydig cells (Shivanandappa & Devaraj-Sarkar, 1979). In the interstitium of *A. mexicanum* testicles, we find what we anticipated considering other reptiles and vertebrates, Δ^5 - 3β HSD activity in Leydig cells (which produce steroid hormones), which corroborates the fact that 18-month-old male *A. mexicanum* are already sexually mature and that steroidogenic Leydig cells are located in the interstitial region of the testicles as in all vertebrates.

In conclusion, the 18-month-old *A. mexicanum* females and males are sexually mature. Also at this age, we found novel results that corroborate the dimorphic expression of the *Sox9* and *Foxl2* genes in males and females, respectively, providing evidence that some ovarian and testicular differentiation events are conserved among vertebrates. Similarly, the expression of the *Vasa* gene in the oocytes and spermatogonia of this urodele also maintains a conserved role. Likewise, in this study, for the first time, the steroidogenic thecal and Leydig cells were identified by their physiological activity, indicating hormonal activity in these organisms. In summary, our results suggest that the molecular mechanisms related to ovarian and testicular function in *A. mexicanum*

follow a similar pattern of expression to that described in most vertebrates that are not altered by their neotenic condition. Therefore, these results are expected to promote future research on the reproductive biology of *A. mexicanum* and among urodele amphibians in general.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Posgrado en Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by UNAM-PAPIIT-IN211920 to MVZ. Horacio Mena for providing biological material in the form of egg laying. E.M.C. received a doctoral scholarship from CONACYT (no. 103095/354763). This paper is a requisite for E.M.C. to obtain a Ph.D. degree in the Posgrado en Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México. Thanks to Programa de Becas Posdoctorales en la UNAM for the scholarship granted to T.J.P-G (DGAPA-UNAM).

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no conflicts of interest associated with the contents of this manuscript.

ORCID

Maricela Villagrán-SantaCruz  <https://orcid.org/0000-0002-3538-8709>

REFERENCES

- Abramyan, J., Feng, C. W., & Koopman, P. (2009). Cloning and expression of candidate sexual development genes in the cane toad (*Bufo marinus*). *Developmental Dynamics*, 238(9), 2430–2441. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22055>.
- Bertho, S., Pasquier, J., Pan, Q., Le Trionnaire, G., Bobe, J., Postlethwait, J. H., ... Guiguen, Y. (2016). Foxl2 and its relatives are evolutionary conserved players in gonadal sex differentiation. *Sexual Development*, 10(3), 111–129. <https://doi.org/10.1159/000447611>
- Chassot, A.-A., Bradford, S. T., Auguste, A., Gregoire, E. P., Pailhoux, E., de Rooij, D. G., ... Chaboissier, M.-C. (2012). WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development*, 139, 4461–4472. <https://doi.org/10.1242/dev.078972>
- Christensen, A. K. (1975). Leydig cells. In: *Handbook of physiology*. Am. Physiol. Soc., Washington V, Sect 7, pp. 57–94.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., ... Veitia, R. (2018). Evolution and expression of FOXL2. *Letter to Journal of Medical Genetics*, 39(12), 916–921. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.12.916>
- Collenot, G., & Collenot, A. (1977). L'activite 3 (3-hydroxysteroides deshydrogenasique dans les gonades en differentiation de *Pleurodeles waltii* (Amphibien, Urodele); visualisation sur coupes seriees a l'aide d'une nouvelle technique histochemique. *Journal Embryol Experimental Morphology*, 42, 29–42.
- Dumond, H., Al-Asaad, I., Chesnel, A., Chardard, D., Boizet-Bonhoure, B., Flament, S., & Kuntz, S. (2011). Temporal and spatial SOX9 expression patterns in the course of gonad development of the caudate amphibian *Pleurodeles waltii*. *JEZ-B Molecular and Developmental Evolution*, 316B(3), 199–211. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21390>
- Eisthen, H. L., & Krause, B. C. (2012). Ambiguities in the relationship between gonadal steroids and reproduction in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *General and Comparative Endocrinology*, 176(3), 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.034>
- El Jamil, A., Kanhoush, R., Magre, S., Boizet-Bonhoure, B., & Penrad-Mobayed, M. (2008). Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Developmental Dynamics*, 237(10), 2996–3005. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21692>
- Erler, P., Sweeney, A., & Monaghan, J. R. (2017). Regulation of injury-induced ovarian regeneration by activation of Oogonial stem cells. *Stem Cells*, 35(1), 236–247. <https://doi.org/10.1002/stem.2504>
- Flament, S., Chardard, D., Chesnel, A., & Dumond, H. (2011). In: D. Norris, & K. Lopez 723 (eds) Amphibians, (Ed.), *Sex determination and sexual differentiation*, Vol. 724 (pp. 1–19). New York: Academic Press Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374931-4.10001-X>
- Goldman, A. S., Baker, M. K., & Stanek, A. E. (1972). Development of $\Delta 5-3\beta$ hydroxysteroid and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the testes, adrenals and ovaries of the rabbit fetus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 140, 1486–1492. <https://doi.org/10.3181/00379727-140-36701>
- Gore-Langton, R. E., & Armstrong, D. T. (1988). In E. Knobil, & J. Neil (Eds.), *Follicular steroidogenesis and its control. The Physiology of Reproduction*, Vol. 10 (pp. 331–385). New York: Raven Press. Ltd.
- Guerrero-Estévez, S., & Moreno, M. N. (2012). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *Journal of Fish Biology*, 80(3), 572–594. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03196.x>
- Harley, V. R., Clarkson, M. J., & Argentaro, A. (2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocrine Reviews*, 24(4), 466–487. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0025>
- Hsu, C. Y., Hsu, L. H., & Liang, H.-M. (1979). The effect of cyproterone acetate on the activity of D5-3 β hydroxysteroid dehydrogenase in tadpole sex transformation. *General and Comparative Endocrinology*, 39, 404–410. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0073>
- Hsu, C. Y., Yu, N. W., Ku, H. H., Chang, L. T., & Liu, H. W. (1991). Estradiol secretion by tadpole ovaries masculinized by implanted capsules of cyanoketone. *Development, Growth and Differentiation*, 33(3), 201–208. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1991.00201.x>
- Hu, Q., Meng, Y., Tian, H., Zhang, Y. U., & Xiao, H. (2016). Sexually dimorphic expression of Foxl2 and Ftz-F1 in Chinese Giant salamander *Andrias davidianus*. *JEZ-B Molecular and Developmental Evolution*, 326(6), 363–374. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22693>
- Humphrey, R. R. (1945). Sex determination in salamander. *American Journal of Anatomy*, 76, 33–66. <https://doi.org/10.1002/aja.1000760103>
- Humphrey, R. R. (1957). Male homogamety in the Mexican axolotl: A study of the progeny obtained when germ cells of a genetic male are incorporated in a developing ovary. *Journal Experimental Zoology*, 134(1), 91–101. <https://doi.org/10.1002/jez.1401340105>
- Kang, L., Marin, M., & Kelley, D. (1995). Androgen biosynthesis and secretion in developing *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology*, 100(3), 293–307. <https://doi.org/10.1006/gcen.1995.1160>

- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137–138.
- Keinath, M. C., Timoshevskaya, N., Timoshevskiy, V. A., Voss, S. R., & Smith, J. J. (2018). Minuscule differences between sex chromosomes in the giant genome of a salamander. *Scientific Reports*, 8, 17882. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36209-2>
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., & Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, 122(9), 2813–2822.
- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K., & Furusawa, M. (1994). Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 162(2), 354–363. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1093>
- Levy, H., Deane, H. W., & Rubin, B. L. (1959). Visualization of steroid 3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 65, 933–943. <https://doi.org/10.1210/endo-65-6-932>
- Marracci, S., Casola, C., Bucci, S., Ragghianti, M., Ogielska, M., & Mancino, G. (2007). Differential expression of two vasa/PL10-related genes during gametogenesis in the special model system *Rana*. *Developmental Genes Evolution*, 217(5), 395–402. <https://doi.org/10.1007/s00427-007-0143-6>
- Martínez-Juárez, A., López-Luna, M. A., Porras-Gomez, T. J., & Moreno-Mendoza, N. (2018). Expression of the Sox9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *JEZ-B Molecular and Developmental Evolution*, 330(3), 148–164. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22799>
- Molyneux, K., & Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(5–6), 537–544. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041833km>
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., & Lovell-badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the genes in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics*, 14(1), 62–68. <https://doi.org/10.1038/ng0996-62>
- Morel, Y., Meharki, F., Rheaume, E., Sanchez, R., Forest, M., & Simard, J. (1997). Structure-function relationships of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Contribution made by the molecular genetics of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Steroids*, 62(1), 176–184. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(96\)00178-x](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(96)00178-x)
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V. R., & Merchant-Larios, H. (1999). Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male-or female-promoting temperatures. *Journal of Experimental Zoology*, 284(6), 705–710. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19991101\)284:6<705::aid-jez12>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19991101)284:6<705::aid-jez12>3.0.co;2-1)
- Nagai, K. (2001). Molecular evolution of Sry and Sox gene. *Gene*, 270(1–2), 161–169. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00479-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00479-6)
- Nef, S., & Vassalli, J. (2009). Complementary pathways in mammalian female sex determination. *Journal of Biology*, 8(8), 74. <https://doi.org/10.1186/jbiol173>
- Osawa, N., Oshima, Y., & Nakamura, M. (2005). Molecular cloning of Dmrt1 and its expression in the gonad of *Xenopus*. *Zoological Science*, 22(6), 681–687. <https://doi.org/10.2108/zsj.22.681>
- Oshima, Y., Uno, Y., Matsuda, Y., Kobayashi, T., & Nakamura, M. (2008). Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the frog *Rana rugosa*. *General and Comparative Endocrinology*, 159(2–3), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.08.013>
- Penrad-Mobayed, M., Perrin, C., L'Hôte, D., Contremoulins, V., Lepesant, J.-A., Boizet-Bonhoure, B., ... Veitia, R. A. (2018). A role for SOX9 in posttranscriptional processes: Insights from the amphibian oocyte. *Nature Scientific Reports*, 8(1), 7191. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25356-1>
- Piprek, R. P., Damulewicz, M., Klóc, M., & Kubiak, J. Z. (2018). Transcriptome analysis identifies genes involved in sex determination and development of *Xenopus laevis* gonads. *Differentiation*, 100, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.02.004>
- Propper, C. R. (2011). Testicular structure and control of sperm development in Amphibians. In: D. O. Norris, & K. H. Lopez (editors). *Volume 2: Amphibians, "Hormones and reproduction in vertebrates."* (pp. 39–53) Boulder, CO: Academic Press. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374931-4.10003-3>
- Qin, Y., & Bishop, C. E. (2005). Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Human Molecular Genetics*, 14, 1221–1229. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi133>
- Rodríguez-Marí, A., Yan, Y. L., Bremiller, R. A., Wilson, C., Cañestro, C., & Postlethwait, J. H. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (Amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Expression Patterns*, 5(5), 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.02.008>
- Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Felsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A. C., & Treier, M. (2004). The murine Winged-Helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131(4), 933–942. <https://doi.org/10.1242/dev.00969>
- Sekido, R., Bar, L., Narváez, V., Penny, G., & Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental Biology*, 274, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.011>
- Shivanandappa, T., & Devaraj-Sarkar, H. B. (1979). Seasonal Lipid Cycle and Steroidogenic Activity in the Testis of the Tropical Skink, *Mabuya carinata* (Schneider): A Histochemical Study. *General and Comparative Endocrinology*, 38(4), 491–495. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(79\)90158-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(79)90158-8)
- Shoemaker-Daly, C. M., Jackson, K., Yatsu, R., Matsumoto, Y., & Crews, D. (2010). Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* Gonads. *Developmental Dynamics*, 239(4), 1061–1075. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22266>
- Smith, J. J., & Voss, S. R. (2009). Amphibian sex determination: Segregation and linkage analysis using members of the tiger salamander species complex (*Ambystoma mexicanum* and *A. t. tigrinum*). *Heredity*, 102(6), 542–548. <http://doi:10.1038/hdy.2009>
- Soatome, K., Isomura, T., Seki, T., Nakamura, Y., & Nakamura, M. (2010). Structural Changes in Gonadal Basement Membranes During Sex Differentiation in the Frog *Rana rugosa*. *JEZ-A Ecological and Integrative Physiology*, 313(6), 369–380. <https://doi.org/10.1002/jez.607>
- Spotila, L. D., Spotila, J. R., & Hall, S. E. (1998). Sequence and expression analysis of Wt1 and Sox9 in the red-ear slider turtle, *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 417–427. [http://10.1002/\(sici\)1097-010x\(19980801\)281:5<417::aid-jez7>3.0.co;2-r](http://10.1002/(sici)1097-010x(19980801)281:5<417::aid-jez7>3.0.co;2-r)
- Takase, M., Noguchi, S., & Nakamura, M. (2000). Two Sox9 messenger RNA isoforms: Isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa*. *FEBES Letter*, 466(2–3), 249–254. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01078-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01078-4)

- Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., ... Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, *139*(6), 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>
- Uribe, M. C. (2009). Ovogenesis and female reproductive system in amphibia - urodela. In M. Ogielska (Ed.), *Reproduction of Amphibians* (pp. 273–304). Plymouth, UK: Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
- Uribe, M. C. (2010). Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 2: Amphibians. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01699-7>
- Uribe, M. C. (2011). Hormones and the female reproductive system of amphibians. In D. O. Norris, & K. H. Lopez (Eds.), *Reproduction of Vertebrates, Volume 2: Amphibians* (pp. 40–81). San Diego, CA: Academic Press Elsevier. <http://10.1016/B978-0-12-374931-4.10004-5>.
- Uribe, M. C., & Mejia Roa, V. (2014). Testicular structure and germ cells morphology in salamanders. *Spermatogenesis*, *4*(3), e988090. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.988090>
- Villareal, S., & Aguilar, X. (2014). Genes relacionados en la diferenciación sexual. *Scientifica*, *12*(1), 64–69.
- Wattenberg, L.W. (1958). Microscopic histochemical demonstration of steroid-3 β -OL dehydrogenase in tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *6*(4), 225–232. <https://doi.org/10.1177/6.4.225>
- Yokoi, H., Kobayashi, T., Tanaka, M., Nagahama, Y., Wakamatsu, Y., Takeda, H., ... Ozato, K. (2002). Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Molecular Reproduction Development*, *63*(1), 5–16. <https://doi.org/10.1002/mrd.10169>

How to cite this article: Mendoza-Cruz E, Moreno-Mendoza N, Zambrano-González L, Porrás-Gómez TJ, Villagrán-SantaCruz M. Dimorphic protein expression for *Sox9* and *Foxl2* genes in the testicles and ovaries of the urodele amphibian: *Ambystoma mexicanum*. *Acta Zool.* 2020;00:1–14. <https://doi.org/10.1111/azo.12327>

CAPITULO III

Expresión de los genes *Sox 9* y *Vasa* durante la diferenciación gonadal en larvas
del anfibio urodelo: *Ambystoma mexicanum*

RESUMEN

En mamíferos, la determinación sexual involucra procesos moleculares que originan vías alternas en cuanto a la expresión génica previa a la diferenciación gonadal desde el establecimiento del primordio gonadal hasta un ovario o testículo ya diferenciado. Muchos de los genes que participan en la vía de diferenciación gonadal han sido estudiados ampliamente en varios grupos de vertebrados y se ha visto que conservan su función. En anfibios anuros el conocimiento en este sentido es más amplio en comparación con lo reportado para urodelos. El objetivo de este estudio es caracterizar la expresión de los genes *Sox9* y *Vasa*, durante la diferenciación gonadal en larvas del anfibio urodelo *A. mexicanum*. Se obtuvieron larvas de estadios (E) 50, 53, 55, 57 y 3 meses de edad, las cuales se procesaron para detectar por inmunofluorescencia en la región media del cuerpo la expresión de la proteína de los genes *Vasa*, *Sox9* y *laminina* bajo microscopía confocal. En larvas de E50, *Sox9* se detectó en el núcleo de células somáticas, *Vasa* se expresó en el citoplasma de células germinales y *laminina* se detectó en la membrana basal de la gónada indiferenciada. En larvas de E53, *Sox9* se expresó en el núcleo de células somáticas, *Vasa* se expresó en el citoplasma de células germinales y *laminina* delimitó la región medular y cortical de la gónada en diferenciación. Durante la diferenciación hacia ovario, en E55 y E57, *Sox9* se expresó en el núcleo de células somáticas mientras que en larvas de 3 meses, no hubo expresión de *Sox9*. *Vasa* se detectó en el citoplasma de células germinales en larvas de E55 y E57 y en larvas de 3 meses se expresó en el citoplasma de ovocitos. Por su parte, *laminina* se expresó en la región medular de la gónada en diferenciación, así como en la membrana basal que rodea a los ovocitos de larvas de 3 meses. Durante la diferenciación hacia testículo, *Sox9* se expresó en el núcleo de células somáticas de larvas E55 y E57 y en el núcleo de células de Sertoli en larvas de 3 meses, *Vasa* se detectó en el citoplasma de células germinales en larvas E55 y E57 y las espermatogonias, mientras *laminina*, se detectó en la membrana basal que rodea a los cordones testiculares de la gónada en diferenciación en larvas E55, E57 y 3 meses. Estos resultados sugieren que *Vasa* y *Sox9* son genes conservados en el anfibio urodelo *A. mexicanum*, al igual que en mamíferos y otros vertebrados.

Palabras clave: *Ambystoma mexicanum*, *Sox9*, *Vasa*, *laminina*

INTRODUCCIÓN

Se han investigado varios genes que participan en la vía de determinación sexual principalmente en mamíferos. Estos genes están evolutivamente conservados en todos los grupos de vertebrados, ya que la expresión de genes homólogos a los de mamíferos, tales como: *WT1*, *SF1*, *Dmrt1* y *Sox9*, se ha descrito durante en el desarrollo de gónadas de aves (Shimada, 1998), reptiles (Shoemaker y Crews, 2009), anfibios (Nakamura, 2009) y peces (Ijiri et al. 2008). Sin embargo, aún no se conocen del todo las vías de señalización celular empleadas para que, dentro de los distintos grupos de los vertebrados, se desarrollen ontogenéticamente estructuras similares en los órganos reproductores (ovario o testículo).

El gen *Sox9* es requerido durante la determinación testicular en mamíferos, pues este codifica para un factor de transcripción que se expresa en el citoplasma de las células somáticas del primordio gonadal, durante la embriogénesis temprana en ambos sexos (Santa-Barbara et al. 2000). En las células de las gónadas femeninas, *Sox9* permanece en el citoplasma y posteriormente disminuye su expresión ya que es regulado negativamente cuando la gónada se está diferenciando; por el contrario, en las gónadas masculinas, *Sox9* se transloca al núcleo de las células pre-Sertoli y sus niveles de expresión aumentan significativamente cuando es ya diferenciado en testículo (Santa-Barbara et al. 1998). Además de intervenir en el desarrollo gonadal en muchas especies, se ha demostrado que *Sox9* participa durante la condrogénesis y diferenciación de la cresta neural (Hong y Saint-Jeannet, 2005), así como en la diferenciación del ectodermo ótico (Barrionuevo et al. 2008).

En el anuro *Xenopus laevis*, *Sox9* fue expresado en el complejo gónada-mesonefros desde el estadio 53 hasta el 56 en ambos sexos (Osawa et al. 2005). En *R. rugosa* se han aislado 2 isoformas de *Sox9*, α y β , las cuales se han encontrado expresadas en ambos sexos

durante el desarrollo (Takase et al. 2000). En *Bufo marinus*, la expresión de *Sox9* fue similar en ambos sexos durante la metamorfosis (Abramyan et al. 2009). En un análisis de gonadogénesis de *Xenopus tropicalis*, se encontró que el ARNm y la proteína que codifica para el gen *Sox9* fue expresado en ambos sexos después de la metamorfosis y hasta que la gonada está bien diferenciada y se mantiene hasta que son organismos adultos. En el caso del testículo, la expresión de *Sox9* se restringe al núcleo de las células de Sertoli, como ya se mencionó para otros vertebrados, y en el ovario se restringe al citoplasma de ovocitos previtelogénicos, por lo que en este último se desconoce su función (El Jamil et al. 2008). En el anfibio urodelo, *Pleurodeles walt* en el estadio 56 (fin de la metamorfosis), *Sox9* se expresa en el citoplasma de células somáticas y germinales de individuos de ambos sexos. En testículo ya diferenciado, se expresó en el núcleo de células somáticas y en células germinales se observó una leve expresión en su citoplasma. En ovario ya diferenciado, *Sox9* se expresó en el citoplasma de ambos tipos celulares (Dumond et al. 2011).

Vasa es un gen que codifica para una RNA helicasa dependiente de ATP. El gen *Vasa* es conservado en varios grupos de vertebrados e invertebrados, lo que indica su universalidad en el desarrollo de la línea germinal (Olsen et al. 1997; Yoon et al. 1997; Castrillon et al. 2000). En mamíferos *Vasa* también se expresa en células germinales, primordiales y por ende, es empleado como un marcador de la línea germinal, tanto en gónadas embrionarias en desarrollo como en gónadas adultas (Gustafson y Wessel, 2010; De Felicci, 2010).

En anfibios anuros como *R. rugosa*, la expresión de *Vasa* se localizó en el citoplasma de células germinales tanto de ovario como de testículo en estadios larvarios tempranos como tardíos, lo que sugiere que *Vasa* evolutivamente tiene un papel conservado

en el desarrollo de células germinales en los anfibios, como en mamíferos (Soatome et al. 2010). En *Rana lessonae*, *Vasa* se expresa durante las primeras etapas de la gametogénesis, siendo específica de la línea germinal (Marracci et al. 2007). En el urodelo *Pleurodeles waltl*, *Vasa* se expresa en células germinales de larvas en estadio 35, cuando la eclosión ocurre (Bachvarova et al. 2004; Al Assad et al. 2012). En *Ambystoma mexicanum* se observó la presencia del ARNm de *Vasa* por RT-PCR en larvas estadio 40 en células germinales, sin embargo, su expresión no fue evidente en gónadas (Bachvarova et al. 2004).

Al inicio de la formación de los blastemas gonadales en machos y hembras de mamíferos, la laminina se expresa en sus isoformas $\alpha 5$ y $\beta 1$. La isoforma $\alpha 5$ es un marcador temprano en la diferenciación sexual, que se sugiere es regulado por factores determinantes de la vía testicular (Pelliniemi y Fröjdman, 2001). En testículos y ovarios indiferenciados de ratas, la colágena tipo III y las citoqueratinas se distribuyen de manera similar (Soatome et al. 2010); sin embargo, la citoqueratina sufre cambios en su distribución al iniciarse la diferenciación testicular (Fridmacher et al. 1995). La laminina, es una glicoproteína, no colágena del tejido conectivo, que estructuralmente predomina en las membranas basales de varios tejidos. Está constituida por tres cadenas, la α , β y γ , que presentan variantes e isoformas. Entre las funciones de la laminina están; la adhesión celular, el crecimiento, la morfología, la diferenciación y la migración (Tzu et al. 2008).

Estudios recientes en *Rana rugosa* durante el proceso de diferenciación sexual gonadal, emplearon a la laminina como marcador, que permitió observar que las membranas basales se forman en las gónadas que darán origen a un testículo durante la diferenciación sexual, como un indicativo del dimorfismo sexual en esta especie, al formarse los cordones testiculares durante el estadio 25 de su desarrollo. En el caso del

ovario durante las primeras etapas de desarrollo, la laminina se restringe a la cavidad ovárica, y posteriormente va cubriendo parcialmente a los ovocitos cercanos a esta cavidad, así como a ovocitos en crecimiento (Soatome et al. 2010).

Estudios en ratas, han revelado que la laminina es producida por células de Sertoli (Sawada y Esaki, 2003) y células de Leydig (Dickson et al. 2002) en el testículo, de igual manera las células mioides peritubulares que también la producen (Richardson et al. 1995; Fröjdman et al. 1999). En el caso del ovario las células de la granulosa y de la teca se les atribuyen la producción de laminina (Zhao y Luck, 1995; Fröjdman et al. 1999). En *R. rugosa* se observó un comportamiento similar al de la rata con relación a la producción de laminina por las células de Sertoli y Leydig en testículo y por las células de la teca y de la granulosa en el ovario (Soatome et al. 2010). Esta glicoproteína estructuralmente predomina en las membranas basales de varios tejidos, entre sus funciones están; la adhesión celular, el crecimiento, la morfología, la diferenciación y la migración (Tzu et al. 2008). Siendo el objetivo de este estudio caracterizar la expresión de los genes *Sox9*, *Vasa* y *laminina*, durante la diferenciación gonadal en larvas del anfibio urodela *A. mexicanum*.

Ambystoma mexicanum

Ambystoma mexicanum, es un anfibio que pertenece a la Clase Amphibia, al Orden Urodela y a la Familia Ambystomatidae (Servín 2011). Es una salamandra neoténica que alcanza la madurez sexual, conservando características morfológicas del estadio larvario (Eisthen y Krause 2012). Es una especie endémica de los lagos de Xochimilco y Chalco en la Ciudad de México (Zambrano et al. 2004; Eisthen y Krause 2012). Las alteraciones en su hábitat

para fines agrícolas, han ocasionado modificaciones graves a su entorno, por lo que se encuentra "en peligro crítico" en la Lista Roja de la UICN (Contreras et al. 2009).

El ajolote habita en aguas lénticas (ésto es, con poca o nula corriente de agua), a una temperatura que va de los 10 a los 18 °C y con poca iluminación. Utiliza refugios como plantas acuáticas y diferentes tipos de sustratos, al sentirse amenazado tiende a enterrarse en el fondo del sitio en donde se encuentren. La calidad del agua es un factor muy importante, parámetros físico-químicos que deben considerarse para evaluar la calidad de esta, son el pH, nitritos, nitratos, amonía, oxígeno disuelto, concentración de cloro, dureza y temperatura. Si estos parámetros no son los adecuados, los ajolotes serán susceptibles a contagiarse o enfermarse (Mena y Servin, 2014).

MATERIAL Y METODOS

Se obtuvieron 4 puestas de huevos de *A. mexicanum* que fueron donadas por el laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología, UNAM, FAUT-0112. Cada puesta se trasladó al acuario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, en dónde se mantuvieron en condiciones adecuadas para su desarrollo, es decir, con un fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad, a una temperatura de $16 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los organismos en estadios larvarios tempranos, fueron alimentados con larvas de *Artemia franciscana* y mosquito *Culex stigmatosoma* y *Tubifex tubifex*.

Se colectaron larvas en diferentes etapas de desarrollo y se clasificaron de acuerdo con las tablas elaboradas previamente por Bordzilovskaya et al. 1989 y Nye et al. 2003. Los días de desarrollo se contaron desde el momento de la fecundación (días posfecundación: dpf), y se correlacionaron con los estadios de desarrollo (E). De acuerdo con análisis

previos del desarrollo gonadal entre urodelos (Ikenishi y Nieuwkoop, 1978; Dumond et al. 2008), se decidió coleccionar y analizar organismos en E50, E53, E55, E57 y larvas de 3 meses (n = 10 por etapa). Para efectos del sacrificio, los animales utilizados en esta investigación fueron tratados de acuerdo con las normas de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica (CEARC) de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Los organismos se colocaron en una solución de NaHCO₃ al 2% a 4 C, con el fin de anestésarlos, procediendo inmediatamente a su sacrificio por decapitación (Guerrero y Moreno, 2012). Se realizó una microdissección para aislar las gónadas en los estadios antes mencionados.

Inmunofluorescencia

Para la detección de las proteínas *Vasa*, *Sox9* y *Laminina*, se empleó la técnica de inmunofluorescencia sobre cortes transversales de larvas de E50, E53, E55, E57 y 3 meses. Para ello se utilizó la región media posterior de las larvas en diferentes estadios de desarrollo de *A. mexicanum* que fueron tratadas para la detección de la proteína de los genes *Sox9*, *Vasa* y *laminina*. Se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min, se lavaron en PBS durante 5min y posteriormente se colocaron en sacarosa al 30% durante toda la noche. Pasado este tiempo se incluyeron en Tissue-teck y se congelaron en hexano. Posteriormente se obtuvieron cortes seriados por congelación de 20 µm de grosor, en un criostato (Leica CM1850). Los cortes obtenidos se colocaron en un desecador durante 2 hrs, posteriormente colocaron en cámaras húmedas y se lavaron en PBS 10 min, se colocaron después en Tritón al 1% por 10 min, se realizó un lavado rápido con PBS, pasado este tiempo se colocó albúmina al 1% durante 2hrs a temperatura ambiente, posteriormente

se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-*Sox9* (Abcam ab5535,1:200), anti-*Vasa* (Abcam ab13840-100, 1:250) y anti-*laminina* (Abcam ab11575,1:200). Después de este tiempo se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con PBS, posteriormente se colocan en albumina durante 15 min, incubándose posteriormente con el anticuerpo secundario (cy3 para *Sox9*, *Vasa* y *laminina*) durante 1hr, después se lavaron 4 veces con PBS, finalmente se montan las preparaciones con Dako. Los controles negativos fueron incluidos empleando el mismo protocolo pero sin anticuerpo primario. Las muestras fueron observadas bajo microscopio confocal (LSM5 Pascal, Zeiss; www.zeiss.com).

RESULTADOS

En larvas de *Ambystoma mexicanum* de E50, las gónadas se encuentran en una etapa indiferenciada, morfológicamente las gónadas se observan como estructuras alargadas, irregulares y compactas, se localizan en estrecha relación con el riñón mesonéfrico y cercanas a los conductos de Wolff, constituidas por células germinales y células somáticas en estrecha relación. La proteína *laminina* fue detectada en las membranas basales, delimitando a los conductos del mesonefros, conductos de Wolff, así como delimitando a las gónadas (Fig. 1A). La expresión de la proteína de *Vasa* fue observada en el citoplasma de las células germinales que conforman a la gónada (Fig. 1B). La expresión de la proteína de *Sox 9* fue observada en el núcleo de células somáticas de las gónadas, así como en células del mesonefros (Fig. 1C). En larvas E53, las gónadas son más grandes y están conformadas por una mayor cantidad de células germinales y células somáticas, algunas células somáticas localizadas en la región periférica de la gónada conforman un epitelio cúbico. La expresión de la *laminina* en este estadio evidencia el inicio de la diferenciación

gonadal, ya que delimita la región central o medular de la gónada y permite observar que las células germinales se localizan en la región cortical (Fig. 1D). La expresión de *Vasa* se localizó claramente en el citoplasma de las células germinales que se localizan dentro de la gónada (Fig. 1E). La expresión de *Sox9* en este estadio se observa principalmente en el núcleo de las células somáticas de la gónada, así como en el citoplasma de algunas células del mesonefros (Fig. 1F).

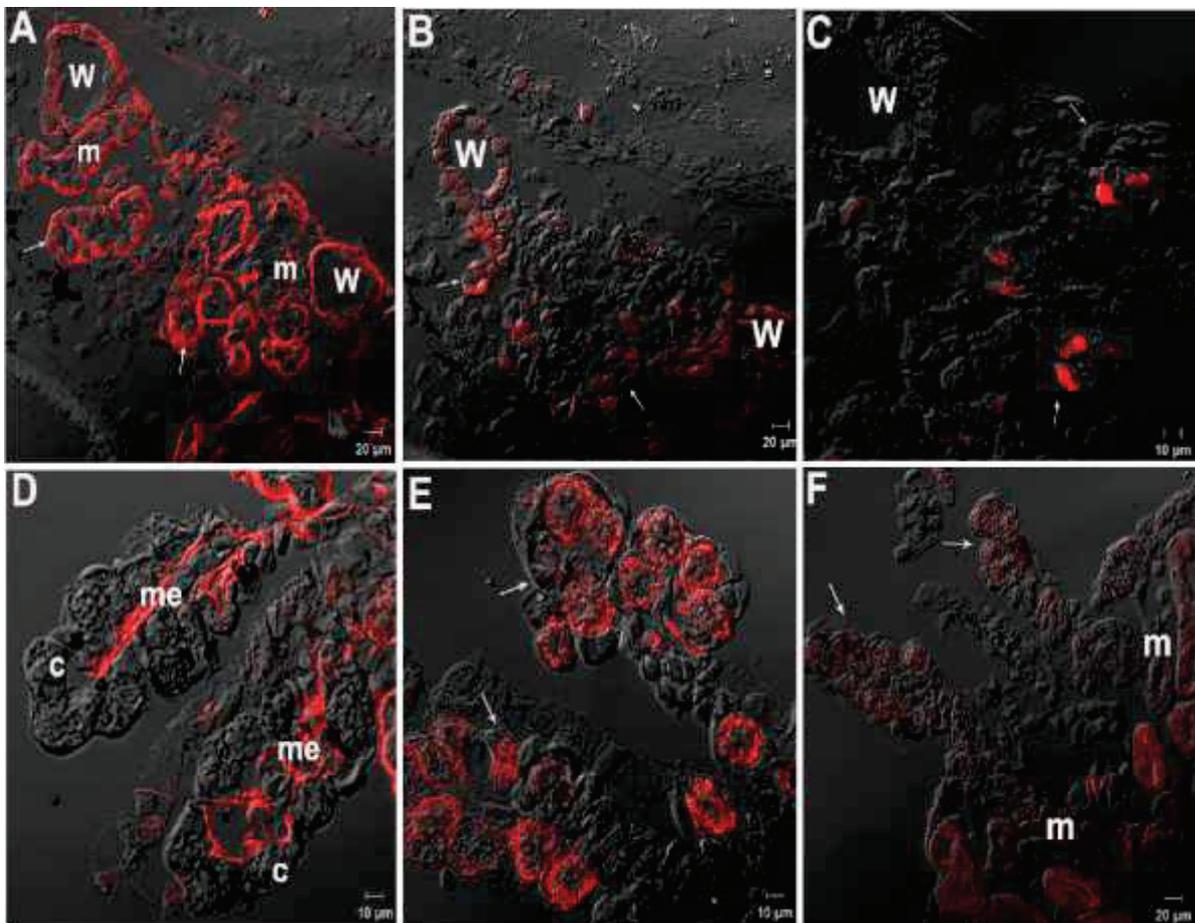


Figura 1. Detección de las proteínas *laminina*, *Vasa* y *Sox9* en larvas de estadios 50 y 53 *Ambystoma mexicanum*. A) Detección de *laminina* en la membrana basal de la gónada indiferenciada (flecha) y mesonefros (m) de larvas en E50. B) Inmunofluorescencia de *Vasa* detectada en el citoplasma de células germinales en la gónada indiferenciada (flecha) de larva E50. C) Detección de *Sox9* en el núcleo de células somáticas en la gónada indiferenciada (flecha) en larvas E50. D) Inmunofluorescencia de *laminina* en larvas en E53, se delimita la región medular interna (me) y la cortical (c). E) Detección de *Vasa* en el citoplasma de células germinales de gónada (flecha) al inicio de la diferenciación E53. F) Detección de *Sox9* en el núcleo de células somáticas de la gónada (flecha) y mesonefros (m). W, conducto de Wolff.

Diferenciación Ovárica

En E55 y E57 cuando las gónadas se están diferenciando hacia ovario, se observa una clara regionalización morfológica, definida por una región cortical y una región medular interna. En la región cortical son evidentes un mayor número de células germinales formando dos o tres hileras concéntricas, la región medular de la gónada presenta células somáticas de forma irregular, las cuales limitan una cavidad en el centro de la gónada. En estos estadios la *laminina* se expresó en la región medular de la gónada, lo que evidencia que la vía de diferenciación es hacia un ovario, por las características morfológicas particulares observadas (Fig. 2A y 2D). La expresión de la proteína de *Vasa* se observó en el citoplasma de células germinales, localizadas en la región cortical de la gónada (Fig. 2B y 2E). La expresión de la proteína de *Sox9* fue evidente en el núcleo de las células somáticas que rodean a las células germinales (Fig. 2C y 2F). A los 3 meses la gónada ya se ha diferenciado en un ovario y tiene una forma sacular con una cavidad central; en la región cortical, unidos al epitelio ovárico se observan folículos, conformados por ovocitos meióticos, rodeados de una capa de células foliculares y una delgada teca formada por células aplanadas. En este estadio, *laminina* fue expresada en la membrana basal que rodea a cada ovocito (Fig. 2G). La expresión de *Vasa* se localizó en el citoplasma de ovocitos (Fig. 2H). No hubo expresión de *Sox9* (Fig. 2I).

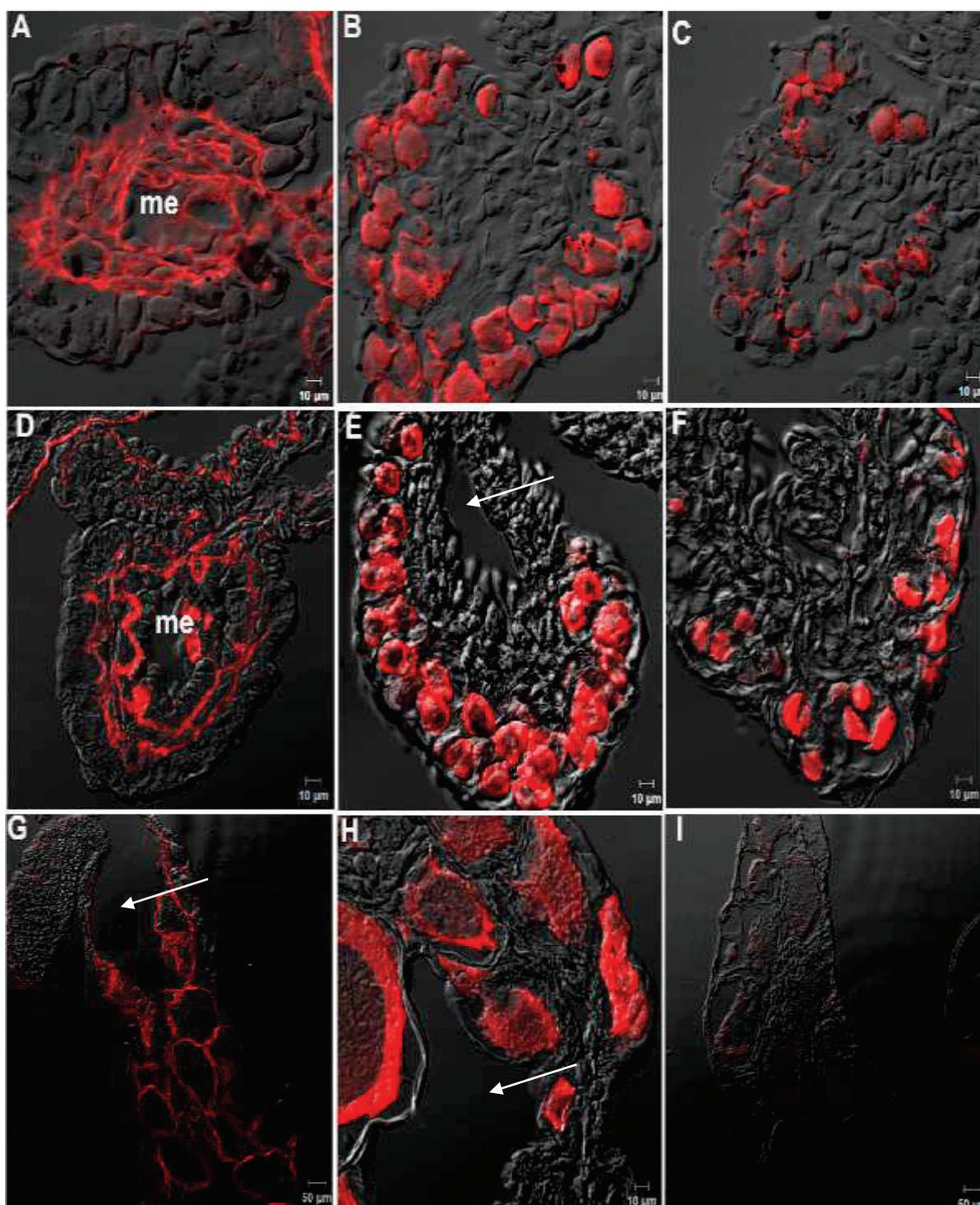


Figura 2. Detección de las proteínas *laminina*, *Vasa* y *Sox9* durante la diferenciación ovárica de larvas de *Ambystoma mexicanum*. A y D) Detección de *laminina* en la región medular (me) de gónada en diferenciación en larvas E55 y E57, así como en la membrana basal que rodea a los ovocitos de larvas de 3 meses (G). B y E) Inmunofluorescencia de *Vasa* detectada en citoplasma de células germinales en larvas E55 y E57, así como en el citoplasma de ovocitos en estadios 1 y 2 de larvas de 3 meses (H). C y F) Detección de *Sox9* en el núcleo de células somáticas de larvas E55 y E57. I) No hubo expresión de la proteína para *Sox9* en larvas de 3 meses. (—→ cavidad ovárica).

Diferenciación Testicular

En E55 y E57 durante la diferenciación testicular se observan dos regiones; la región cortical que se ha restringido a una capa de células epiteliales aplanadas que rodean a la gónada y la región medular formada por células germinales las cuales se encuentran formando grupos en estrecha relación con las células somáticas, dando origen a los cordones testiculares. Conforme avanza el desarrollo la línea germinal (espermatogonias) se encuentran en estrecha relación con las células somáticas (futuras células de Sertoli) y son evidentes las, células mioides o peritubulares y las células de Leydig). En estos estadios la proteína de *laminina* se observó rodeando a cada uno de los cordones testiculares, los cuales posteriormente darán origen a los lóbulos testiculares (Fig. 3A y 3D). La expresión de *Vasa* claramente se detectó en el citoplasma de células germinales (3B y 3E) y la proteína de *Sox9* se expresó en el núcleo de las células somáticas las cuales se encuentran rodeando a las células germinales (3C y 3F). A los 3 meses la gónada está completamente diferenciada en un testículo y es constituido por lóbulos testiculares. Cada lóbulo testicular consiste de varios cistos con espermatogonias y cada cisto es constituido por una o varias células de Sertoli las cuales forman la pared de cada uno, los lóbulos son rodeados por células mioides o peritubulares y las células de Leydig del intersticio se observan cercanas a vasos sanguíneos. En este estadio la *laminina* se expresó en la membrana basal que rodea a cada lóbulo testicular (Fig. 3G). La expresión de *Vasa* se localizó en el citoplasma de las espermatogonias (Fig. 3H), la expresión de *Sox9* se detectó en el núcleo de las células de Sertoli (3I).

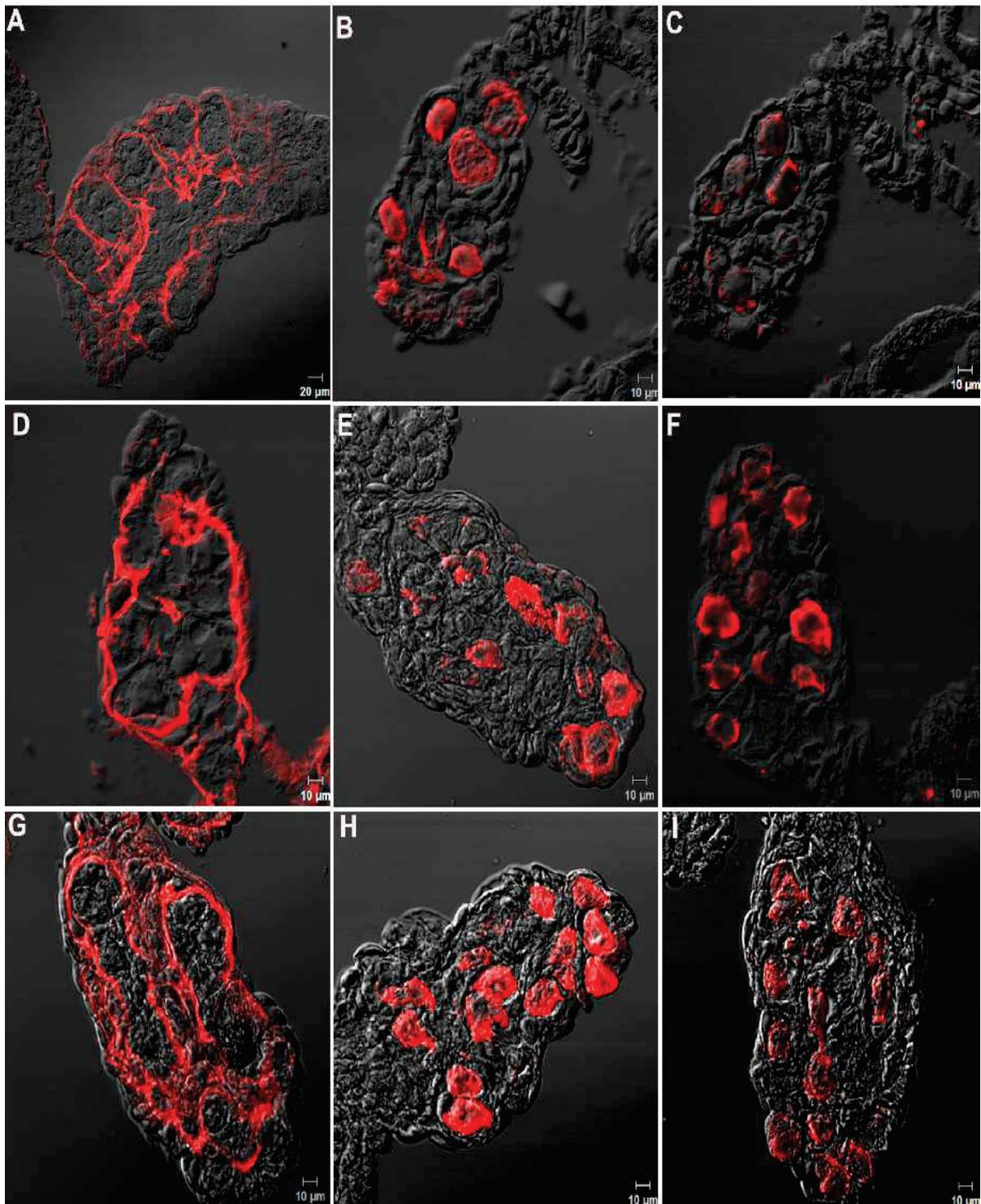


Figura 3. Detección de las proteínas *laminina*, *Vasa* y *Sox9* durante la diferenciación testicular en *Ambystoma mexicanum*. A, D y G) Detección de *laminina* en la membrana basal que rodea a los cordones testiculares de la gónada en diferenciación en larvas E55, E57 y 3 meses. B, E y H) Inmunofluorescencia de *Vasa* detectada en el citoplasma de células germinales en larvas E55, E57 y en espermatogonias de larvas de 3 meses respectivamente. C, F e I) Detección de *Sox9* en el núcleo de células somáticas de larvas E55 y E57, y en el núcleo de células de Sertoli en larvas de 3 meses.

DISCUSIÓN

La diferenciación sexual de la gónada en vertebrados ocurre temprano durante el desarrollo embrionario y éste es un proceso regulado genéticamente. Los mecanismos detrás de esta diferenciación, incluso el papel que tienen algunos genes durante este proceso, no han sido completamente entendidos (Falconi et al. 2004), lo que ha sido objeto de numerosas investigaciones. En este sentido, en la presente investigación nos enfocamos en las variaciones en los niveles de expresión de los genes *Vasa* y *Sox9* durante la diferenciación de sexual de la gónada de *Ambystoma mexicanum*.

En esta investigación *Vasa* fue localizado en el citoplasma de las células germinales de la gónada, durante diferentes las etapas, es decir, en la gónada indiferenciada, al inicio de la diferenciación, durante la diferenciación y cuando ya está la gónada diferenciada en ovario o testículo. Sin embargo, para *A. mexicanum* se ha reportado que el ARN materno para *Vasa* no es específico para células germinales, sino que éste se expresa aleatoriamente en embriones de etapas tempranas y es específico para células germinales primordiales (PGCs) en embriones tempranos, cuando éstas están ya en la gónada. Aunque la distribución de *Vasa* en larvas de ajolote aun no ha sido estudiada (Bachvarova et al. 2004, ver Porras et al. 2021).

Es evidente que en *A. mexicanum* *Vasa* también puede ser empleado como un marcador específico de la línea germinal, similar para otras especies de anfibios anuros del genero *Xenopus* en dónde el gen *Vasa* (*XVLG1*), se expresó en células germinales: ovogonias, ovocitos, espermatogonias y espermatocitos. Sin embargo, *Vasa* (*XVLG1*), también ha sido detectado en otros tipos celulares además de las gónadas adultas (Komiya et al., 1994; Mendoza et al., 2020), es decir, en células de somitas, medula espinal y

notocorda (Ikenishi y Tanaka, 2000).

La expresión de *Vasa* en *A. mexicanum* fue similar a lo encontrado para *R. rugosa*, en donde la expresión de *Vasa* se localizó en el citoplasma de células germinales tanto de ovario y testículo en estadios larvarios tempranos y tardíos (Soatome et al. 2010). En *A. mexicanum* documentamos la expresión de *Vasa* durante estadios tempranos a partir del E50, pero es muy posible que se exprese en estadios más tempranos del desarrollo similar a otros anfibios anuros o urodelos, como es el caso del urodelo *Pleurodeles waltl*, en donde *Vasa* se expresa en células germinales de larvas en estadio 35 cuando la eclosión ocurre (Bachvarova et al. 2004; Al Assad et al. 2012). Coincidiendo con lo reportado para *Rana lessonae*, en donde se identificó y caracterizó el ortólogo de *Vasa* (*RIVlg*), en este estudio se observó que este gen es específico de la línea germinal y se expresa también durante las primeras etapas de la gametogénesis (Soatome et al. 2010).

En *A. mexicanum*, al inicio de la diferenciación gonadal en el estadio de desarrollo 53, al igual que en los estadios 55 y 57 donde se está llevando a cabo la diferenciación de las gónadas, persiste la expresión de *Vasa* en el citoplasma de las células germinales, lo que coincide con lo observado en el anuro *Xenopus* (Soatome et al. 2010; Hansen y Pelegri, 2021).

En larvas de *A. mexicanum* de 3 meses de edad, la expresión de *Vasa* fue detectada en el citoplasma de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo, siendo similar a lo observado en *R. rugosa*, en donde la expresión de *Vasa* se localiza en el citoplasma de las células germinales de ovarios de renacuajos en etapa XX (Soatome et al. 2010). De igual forma en renacuajos de etapas 46 y 54 de *Xenopus*, el citoplasma de ovogonias es positivo para *Vasa* (Komiya et al. 1994). En relación al testículo, la expresión de este marcador de la línea germinal, fue localizada en el citoplasma de espermatogonias, coincidiendo con lo

documentado para *Xenopus* (Komiya et al. 1994), coincidiendo con lo reportado para *R. rugosa* en donde *Vasa* se distribuye homogéneamente en el citoplasma de espermatogonias (Soatome et al. 2010). En otras especies de vertebrados en edad adulta, la expresión de la proteína VASA, también se ve restringida a espermatogonias y espermatoцитos tempranos en los testículos y a ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos tempranos en el ovario (Guerrero et al. 2012), como lo observado en *A. mexicanum*.

Se ha propuesto que la proteína *Vasa* puede participar en la unión de los ARN necesarios para la determinación de células de la línea germinal (Yoon et al., 1997). Por otro lado, se ha visto que el gen *Vasa* también es necesario para la migración de células germinales primordiales (Guerrero et al. 2012).

En *A. mexicanum* la expresión de *Sox9* se localizó al inicio, durante y cuando la gónada ya se ha diferenciado en ambos sexos. En larvas de *A. mexicanum*, durante el estadio 50 cuando la gónada está indiferenciada, *Sox9* se detectó en células somáticas de la gónada estrechamente con las células germinales (futuras células de Sertoli) y en las células del mesonefros, lo que coincide con lo observado en *Xenopus laevis* en donde *Sox9*, fue detectado en el complejo gónada-mesonefros durante los estadios de desarrollo 53 hasta el estadio 56 (Dumond et al. 2011; Flament et al. 2011). De igual manera coincide con lo registrado para *Bufo marinus* en donde el ARNm de *Sox9* se detectó en el núcleo de las células de Sertoli de testículos en desarrollo (Abramyan et al. 2009). Así mismo coincide con lo registrado en el urodelo *Pleurodeles waltl*, en donde la expresión del ARNm de *Sox9*, fue localizada en el complejo gónada-mesonefros de larvas en E42, siendo mantenida la expresión sin cambio alguno durante el periodo termosensible del E42 al E54 (Dumond et al. 2011).

En *A. mexicanum* en larvas de estadios 55 y 57 durante la diferenciación hacia ovario la expresión de *Sox9* se observó en el citoplasma de las células somáticas, sin embargo, los estudios de inmunofluorescencia realizados en el ovario de larvas de estadio 56 de *P. waltl*, indican que la expresión de *Sox9* se localiza en el citoplasma de células somáticas y germinales (Dumond et al. 2011). En el anuro *X. tropicalis* la proteína y el RNAm de *Sox9* se detectaron cuando las gónadas están en diferenciación (El Jamil et al. 2008), similar a lo observado en etapas 55 y 57 en *A. mexicanum*. Cuando la gónada de *A. mexicanum* ya se ha diferenciado en un ovario, *Sox9* ha sido regulado negativamente, lo que coincide con lo observado en *R. rugosa* y otros vertebrados, lo que denota que la expresión de *Sox9* se vuelve sexualmente dimórfica (Dumond et al. 2011; Flament et al. 2011).

En el ovario de 3 meses de *A. mexicanum*, no se detectó expresión de *Sox9*, contrario a lo observado en individuos de *P. waltl* en estadio 56 (al finalizar la metamorfosis) en donde la expresión de *PwSox9* se localizó en el citoplasma de células germinales (Dumond et al. 2011), siendo similar a lo observado en el ovario de organismos de *X. tropicalis*, que han sufrido metamorfosis, en éstos la expresión de la proteína de *Sox9* se localizó en el citoplasma de ovocitos previtelogénicos y en el núcleo de ovocitos vitelogénicos (El Jamil et al. 2008; Flament et al. 2011).

Investigaciones realizadas por el grupo de Penrad-Mobayed (2018), indican que hallaron a la proteína SOX9 en el núcleo de ovocitos adultos de algunas especies de anuros como *Xenopus laevis*, *X. tropicalis* y del urodelo *Pleurodeles waltl*, por lo que sugieren un papel en los procesos post-transcripcionales y posiblemente juegue un papel diferente en las últimas etapas del proceso de ovogénesis (El Jamil et al., 2008; Penrad- Mobayed et al.,

2018). En el proceso de foliculogenesis, la expresión depende de la etapa de desarrollo del folículo, de tal forma que SOX9 se exprese más en los ovocitos preantrales y se vea reducida en los ovocitos antrales hasta su etapa de folículo (Martínez et al. 2018). La expresión de la proteína SOX9 en el ovario no es exclusiva de anfibios anuros ni urodelos, ya que se ha observado en otras especies de vertebrados como en los peces *Oryzias latipes* (Yokoi et al. 2002), *Danio reiro* (Rodríguez et al. 2005), *Chapalichthys encaustus* (Guerrero et al. 2012) y en reptiles como *Crocodylus moreletii* (Martínez et al. 2018). En estos estudios se han encontrado dos isoformas del gen *Sox9*, la isoforma *Sox9a* expresada en testículos y la isoforma *Sox9b* expresada en ovocitos previtelogénicos de *D. reiro* (Chiang et al. 2001), es posible que la presencia de estas isoformas sea la que provoca que *Sox9* se encuentre tanto en machos como en hembras en adultos y larvas de varias especies de vertebrados.

En *A. mexicanum* durante la diferenciación de la gónada hacia un testículo, la expresión de *Sox9* se detectó en el núcleo de células somáticas, similar a lo que ocurre en *X. tropicalis*, en donde la expresión del RNAm así como de la proteína de *Sox9*, se restringió a las células somáticas en la gónada masculina (El Jamil et al. 2008). En *A. mexicanum* en estadio 57 la expresión de *Sox9* se detectó en algunas células del mesonefros, similar a lo observado en *P. waltl*, (Dumond et al. 2011). En la etapa de gónada ya diferenciada en el testículo en *A. mexicanum*, la expresión de *Sox9*, se localizó en el núcleo de células de Sertoli, lo que coincide con lo que se observa en *X. tropicalis*. Estos resultados indican una expresión dimórfica tardía, lo que sugiere que *Sox9* participa durante la diferenciación sexual más que en la determinación del sexo. Muy posiblemente niveles de expresión dimórficos de *Sox9* existen durante los eventos de determinación y diferenciación gonadal (Takase et al. 2000; El Jamil et al. 2008). En larvas de 3 meses de edad en *A. mexicanum* la

expresión de *Sox9* fue detectada en el testículo, coincidiendo con lo reportado para organismos jóvenes de *Rana rugosa* en los cuales las isoformas *Sox9 α* y β se expresaron en testículo (Flament et al. 2011). En *Bufo marinus* los niveles de RNAm de *Sox9* en testículo, fueron idénticos que en ovario, esto ocurre cuando se está llevando a cabo el proceso de metamorfosis (Dumond et al. 2011). En *A. mexicanum* la expresión de *Sox9* se observó en el núcleo de las células somáticas en las diferentes etapas de desarrollo incluso en gónadas de adultos, contrario a lo que se observa en *P. waltl*, en donde la expresión de *Sox9* en el testículo fue en el núcleo de células somáticas y germinales y conforme avanza el desarrollo el marcaje es evidente en el citoplasma (Dumond et al. 2011).

Durante la formación del blastema gonadal de ratón en machos y hembras, los isotipos 5α y 1β son expresados, siendo la expresión del isotipo 5α que es un marcador molecular temprano de la diferenciación sexual, la que posiblemente sea regulada por factores de la determinación testicular (Pelliniemi et al. 1998; Fröjdman et al. 1999; Pelliniemi y Fröjdman, 2001). Lo que nos permitiría distinguir con facilidad a la gónada al ser la laminina un marcador temprano de la diferenciación sexual.

En la presente investigación, larvas de *A. mexicanum* en estadio 50, la laminina delimitó a la gónada indiferenciada y a los conductos del mesonefros, mostrando una estructura sacular de la gónada, coincidiendo con lo encontrado en larvas de *R. rugosa* en estadio de desarrollo 25, en donde no se observaron cambios en la estructura de la membrana basal y el marcaje de laminina reveló una estructura sacular de la gónada indiferenciada (Soatome et al. 2010).

En larvas de estadios 53, 55 y 57 de *A. mexicanum*, la expresión de laminina se observó limitando la cavidad ovárica cuando la gónada se está diferenciando. Este mismo patrón de expresión se observó en larvas de *R. rugosa* en estadio 25 y estadio I cuando las

extremidades son visibles (Soatome et al. 2010). Así mismo la laminina delimitó la zona pelúcida de los ovocitos que se localizan en la región más cercana a la cavidad. Siendo similar a lo observado en larvas de estadio V de *R. rugosa*, en dónde la expresión de laminina se observó a lo largo de la cavidad, así como rodeando a los ovocitos cercanos a ésta (Soatome et al. 2010).

En larvas de tres meses de edad de *A. mexicanum*, cuando la gónada ya se ha diferenciado en ovario, la expresión de laminina se observó rodeando completamente la superficie de los ovocitos de diferentes tamaños, coincidiendo con lo observado en larvas de *R. rugosa* en estadio XV (Soatome et al. 2010).

En larvas de *A. mexicanum* de estadios 55 y 57, que siguieron la vía de diferenciación hacia testículo, el patrón de expresión de laminina fue localizado rodeando y delimitando a los cordones testiculares, así como al testículo, siendo similar a lo observado en larvas de *R. rugosa* de estadios I al X, (Soatome et al. 2010).

En larvas de *A. mexicanum* de 3 meses de edad la gónada ya se ha diferenciado en un testículo, el patrón de expresión de laminina se observó rodeando a los lóbulos testiculares delimitando al testículo, lo que coincide con lo que se presenta en los estadios XV y XXV de larvas de *R. rugosa*, en donde el testículo incrementa su tamaño y la membrana basal divide internamente al testículo en pequeñas regiones que envuelven a las células germinales, ya que la *laminina* se observa a rodeando los lóbulos seminíferos (Soatome et al. 2010).

Al finalizar esta investigación podemos indicar que al igual que en otros vertebrados, así como en anfibios anuros y urodelos en *Ambysoma mexicanum*, los genes

Vasa, *Sox9* y *Foxl2* son conservados y estos dos últimos genes son dimórficos para organismos en estadio larvario como en adultos.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Diferenciación sexual gonadal

❖ Gónada indiferenciada

El axolotl mexicano (*Ambystoma mexicanum*) es una salamandra paedomórfica; es decir, se vuelve sexualmente madura conservando al mismo tiempo características morfológicas de la forma larval. A pesar de que *A. mexicanum* se encuentra en peligro de extinción en su hábitat natural y se ha tenido que mantener en condiciones de laboratorio, resulta sorprendente que sus patrones reproductivos hayan sido poco estudiados (Eisthen y Krause 2012). Se han descrito algunos aspectos morfológicos y moleculares relacionados con la especificación y migración de la línea germinal en algunos estadios del desarrollo embrionario y larval (Ikenishi y Nieuwkoop 1978; Dournon et al. 1989; Johnson et al. 2001; Bachvarova et al. 2004); pero la investigación sobre la morfología relacionada con los procesos de determinación y diferenciación sexual gonadal es escasa. No se ha reportado la correlación entre los eventos morfogenéticos y el establecimiento de la línea germinal. Al tratarse de un organismo neoténico, es muy importante conocer y correlacionar los procesos de diferenciación gonadal con los estadios de desarrollo embrionario, teniendo en cuenta lo observado en otros urodelos no neoténicos como *Pleurodeles waltl*. En *A. mexicanum*, al igual que en anuros y *P. waltl*, las gónadas se desarrollan como órganos pareados, localizados en la región media dorsal posterior del cuerpo en estrecha relación con el mesonefros y suspendidas en la cavidad celómica (Ogielska 2009; Flament et al. 2011).

El desarrollo sexual gonadal en anfibios es un proceso que ha sido descrito principalmente en anuros (Ogielska 2009; Piprek et al. 2010; Flament et al. 2011), mientras que en urodelos se conoce muy poco (Dournon et al. 1990). En el presente estudio, los principales eventos morfológicos que llevan al establecimiento de la gónada indiferenciada y su diferenciación morfológica en *Ambystoma mexicanum* fueron similares a los descritos en anuros y en el urodelo *P. waltl* (Dournon et al. 1990). En el E41 es evidente la formación de una cresta genital, cuando un grupo de células somáticas se localizan suspendidas por debajo del mesonefros y contiguas al conducto de Wolff. En este estadio la localización de células germinales primordiales (PGC) cercanas al conducto de Wolff, coincide con estudios previos (Ikenishi y Nieuwkoop 1978; Dournon et al. 1990; Johnson et al. 2001; Bachvarova et al. 2004; Dumond et al. 2008; Flament et al. 2011). Con base en nuestras observaciones, la cresta genital podría retener morfológicamente, el potencial para diferenciarse en un testículo o en un ovario según el complemento cromosómico que presente el organismo. Entre los E42 y 44 los cambios morfológicos son poco evidentes, sólo se ve incrementado el tamaño de la gónada, probablemente a la llegada de PGC, ya que al parecer y similar a lo reportado en *Xenopus laevis* y *Rana pipiens*, la gónada durante el estadio larval contiene pocas células somáticas (Falconi et al. 2004; Ogielska 2009). Además, se ha reportado que las PGC en estos estadios podrían estar en un periodo de reposo mitótico, se ha visto que en *P. waltl* existe un periodo caracterizado por un índice mitótico cero (Po) en el cual no hay proliferación y que va del E35 al E41 (Dournon et al. 1989, 1990).

A partir del E45 y hasta el E52, en *A. mexicanum*, se observa el primordio gonadal como una estructura más compacta en donde la línea germinal es distinguible de la línea somática. En nuestras observaciones, así como en estudios previos, el número de células

germinales se incrementa, así como su tamaño (Ikenishi y Nieuwkoop 1978; Dournon et al. 1990; Dumond et al, 2008). Sugerimos que en estos estadios del desarrollo larval del urodelo *A. mexicanum* e independientemente del sexo cromosómico del organismo, se establece la gónada indiferenciada constituida principalmente por células germinales y células somáticas. Las células germinales se caracterizaron por presentar una forma ovalada, de gran tamaño, con un núcleo prominente y en su citoplasma se observan gotitas lipídicas, cuerpos electrodensos y abundantes mitocondrias. De tal manera que, los eventos morfológicos que llevan al desarrollo y establecimiento de la gónada indiferenciada en *A. mexicanum* se dan entre el E41 al E53, similar a lo reportado para la salamandra *P. waltl* (Dournon et al. 1990; Dumond et al. 2008; Flament et al, 2011). Por sus características morfológicas, al igual que en la mayoría de los vertebrados, la gónada indiferenciada en *A. mexicanum* puede considerarse como una estructura bipotencial; es decir, que morfológicamente posee la capacidad para diferenciarse en un ovario o en un testículo.

Durante el E45, se ha reportado que la salamandra *P. waltl* presenta una estructura formada por células somáticas la cual se encuentra unida a la gónada llamada pedúnculo o región hiliar. En el caso de *A. mexicanum* esta estructura aparece en el E50 coincidiendo con lo descrito para otros anfibios anuros (El Jamil et al. 2008).

En ésta investigación se emplearon genes importantes y que participan en diferentes etapas del desarrollo embrionario, entre estos está el gen *Vasa* que es específico para la línea germinal (Soatome et al, 2010) y es empleado como un marcador de células germinales en vertebrados e invertebrados (Molyneaux y Wylie, 2004) y fue localizado en células germinales de la gónada de *A. mexicanum*, en los diferentes estadios de desarrollo, así como; durante la gónada indiferenciada, al inicio de la diferenciación, durante la

diferenciación y cuando ya está diferenciada en ovarios y testículos. En *A. mexicanum* *Vasa* puede ser empleada como marcador de la línea germinal, coincidiendo con otras especies de anfibios anuros como *Xenopus* en donde el gen *Vasa* (*XVLG1*), parece no ser expresado exclusivamente en células germinales, sino también en oogonias, ovocitos, espermatogonias y espermatoцитos de gónadas adultas (Komiya et al. 1994). En *Rana lessonae*, *Vasa* (*RVLg*) fue identificada, caracterizada y expresada en estadios tempranos de la gametogénesis, así como, durante la especificación de la línea germinal (Marracci et al. 2007).

El gen *Sox9* que es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación testicular, en anuros parece jugar un importante papel en la diferenciación de los cordones testiculares, así como en la diferenciación del testículo (Bagheri-Fam et al. 2010). En *A. mexicanum* la expresión de *Sox9* en larvas de E50, es detectado en células somáticas de la gónada y en las células del mesonefros, lo que coincide con lo observado en anfibios caudados como *P. waltl* en donde la expresión del ARNm de *Sox9*, fue localizado en el complejo gónada-mesonefros de larvas E42, siendo mantenida sin cambio alguno durante el periodo termo sensible (E42-E54). En anuros como *X. laevis* *Sox9*, fue detectado en el complejo gónada-mesonefros durante los estadios de desarrollo 53 hasta el estadio 56 (Dumond et al. 2011; Flament et al. 2011). En *Bufo marinus* se detectó el ARNm de *Sox9* en el núcleo de las células de Sertoli de testículos en desarrollo, así como en el citoplasma de ovocitos previtelogénicos de ovarios en diferenciación (Abramyan et al. 2009).

❖ **Gónada en diferenciación**

Cambios estructurales en la gónada indiferenciada como el rearreglo de las células

germinales en la región cortical, un incremento en su proliferación y el inicio de la formación de una cavidad en la zona interna por regresión de la región medular durante el E53 de *A. mexicanum*, sugieren que al final de este estadio se inicia la diferenciación sexual de la gónada. En *A. mexicanum* se observó que la primera manifestación morfológica de la diferenciación sexual gonadal se da en las gónadas femeninas, siendo similar a lo reportado en *P. waltil* y contrario a lo encontrado en otros vertebrados, en la gónada masculina los cambios morfológicos son poco evidentes con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada, sólo es evidente un incremento en tamaño, hecho que coincide con observaciones previas (Dournon et al. 1990). Para el E55 la morfología del testículo es clara, aquí las células germinales se localizan en la región medular de la gónada en estrecha relación con las células somáticas; la región cortical se encuentra delimitada a una capa de células epiteliales aplanadas, las cuales rodean a la gónada. Dichos procesos celulares en la diferenciación gonadal presentan patrones similares a los reportados para anfibios anuros y urodelos (Dournon et al. 1990; Kuntz et al. 2003; Dumond et al 2008; Flament et al. 2001; Al-Assad et al. 2013).

En las gónadas de *A. mexicanum* los cuerpos electrodensos contenidos en las células germinales que conforman la gónada en el E53, disminuyen conforme avanza el desarrollo gonadal. Ikenishi y Niewkoop (1978), indican la presencia de acomodados mitocondriales en el citoplasma de las células germinales de *A. mexicanum* durante el E40, a los que denominaron “nuage”, nombrados también como material electrodense o “cloud” en otros anfibios. En los urodelos *Triturus phyrrogaster*, *Hynobius* y *P. waltil*, también se han observado estos acomodados mitocondriales en las células germinales (Ogielska 2009), lo que indica que estas estructuras parecen ser específicas de la línea germinal, ya que se ha visto están en estrecha relación con las mitocondrias que forman parte del material nuclear y

contienen ribonucleoproteínas (Guerrero y Moreno 2012; Voronina et al. 2011). En mamíferos, los “núcleos densos” son los equivalentes al material “nuage” y se ha propuesto que estos organelos están especializados para recibir señales del medio extracelular que podrían modificar la conducta y el estado de diferenciación de las PGC (Merchant y Álvarez 1981; Voronina et al. 2011). Por lo tanto, la pérdida de material electrodensito en las células germinales cuando inicia la diferenciación morfológica de la gónada en *A. mexicanum* (E53), sugiere un papel importante en el mantenimiento del estado bipotencial de la línea germinal.

La morfología de los ovarios y testículos en desarrollo resultó parecida a la descrita para otras especies de anfibios anuros como *X. laevis* (Merchant y Villalpando 1981), *X. tropicalis*, *Rana pipiens*, *Bombina orientalis* entre otros (Hayes 1998), de igual manera lo fue para el urodelo *P. waltl* (Dournon et al. 1990; Hayes 1998; Kuntz et al. 2003; Dumond et al. 2008). En *A. mexicanum* durante el E55, observamos por primera vez una estructura localizada en la región anterior y adyacente a la gónada llamada progónada, que formara a los cuerpos grasos, lo que coincide con lo observado en otros urodelos (Ogielska 2009).

Los cambios morfogenéticos que llevan a cabo las gónadas indiferenciadas de ambos sexos para diferenciarse, así como el tiempo que involucran, podrían ser independientes del fenómeno neoténico presente en *A. mexicanum*. Al igual que en el urodelo *P. waltl*, el comienzo de la organización de las regiones cortical y medular cuando se diferencian en un testículo o un ovario da inicio en el E53, cuando ambas especies se encuentran en estadio larval (Dournon et al. 1990; Kuntz et al. 2003; Dumond et al. 2008). En otros anfibios, la diferenciación gonadal se presenta solo en la vida larvaria o cuando están cerca de la etapa de metamorfosis (Dournon et al. 1990; Hayes 1998). Durante los procesos de diferenciación gonadal, algunos de estos ocurren antes o después de la

metamorfosis; por ejemplo, la entrada en meiosis de la línea germinal. Durante la metamorfosis en el E56, en el ovario de *P. waltl* las ovogonias entran en meiosis (Dournon et al. 1990; Dumond et al. 2008), en el testículo, las células germinales lo hacen en la etapa de joven (Dumond et al. 2008; Flament et al. 2011; Al-Assad et al. 2013). En *A. mexicanum*, a pesar de no sufrir metamorfosis sucede algo similar a lo descrito en *P. waltl*. En *A. mexicanum*, las células germinales del ovario en el E55 inician la meiosis, cuando se observan los complejos sinaptonémicos.

En relación a la expresión de genes claves durante el proceso de diferenciación en *A. mexicanum*, podemos indicar que al inicio de la diferenciación gonadal en el E53, al igual que en E55 y E57 durante su diferenciación, la expresión de *Vasa* se localizó en el citoplasma de células germinales, lo que coincide con lo observado en el anuro *Xenopus*, en dónde se observó que la expresión de la proteína de *Vasa* fue localizada en el citoplasma de células germinales (Soatome et al. 2010). En el caso del gen *Sox9* cuando la gónada inicia su diferenciación a testículo, su expresión se detectó en el núcleo de células somáticas, siendo similar a lo que ocurre en *X. tropicalis*, en dónde la expresión del RNAm, así como de la proteína de *Sox9*, se restringió a las células somáticas en la gónada masculina (El Jamil et al. 2008). Esto es diferente a lo observado en *P. waltl* en dónde la expresión de *Sox9*, en E56 se localizó en el citoplasma de células del mesonefros y células tubulares (Dumond et al. 2011). Cuando la gónada se está diferenciando hacia ovario en larvas de estadios 55 y 57, la expresión de *Sox9* se observa en el núcleo de células somáticas. Estudios de inmunofluorescencia realizados en el ovario de *P. waltl*, indicaron que la expresión de *Sox9* se detectó en larvas de E56 y fue localizada en el citoplasma de células somáticas y germinales (Dumond et al. 2011).

❖ Gónada diferenciada

A los 3 meses de edad, la gónada se observa totalmente diferenciada en un ovario o en un testículo. El ovario de *A. mexicanum* morfológicamente tiene una forma sacular lo que coincide con lo observado en otros urodelos como *Necturus maculosus* (Kessel y Panjel 1968), *P. waltl* (Ogielska y Kotusz 2004; Dumond et al. 2008; Wallacides et al. 2009; Flament et al. 2011) y *A. dumerilli* (Uribe 2009, 2011). En relación al testículo, su estructura es compacta, coincidiendo con lo observado en otros urodelos como *P. waltl* (Dumond et al. 2008; Flament et al. 2011) y *A. dumerilli* (Uribe et al. 1994).

Al igual que en las etapas antes mencionadas (gónada indiferenciada y en diferenciación), la expresión de *Vasa* fue detectada en el citoplasma de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo. En el testículo la expresión de este marcador de la línea germinal, fue localizada en el citoplasma de espermatogonias. Siendo similar a lo observado en ovario adulto de *Xenopus*, en dónde la expresión de *Vasa* se localiza en el núcleo de ovocitos en etapas tempranas. En el testículo adulto de *Xenopus*, la expresión de *Vasa* es distribuida en el citoplasma y núcleo de algunas espermatogonias. En *R. rugosa*, *Vasa* se localiza distribuido homogéneamente en el citoplasma de espermatogonias (Soatome et al., 2010).

En el testículo en *A. mexicanum*, la expresión de *Sox9*, se localizó en el núcleo de células de Sertoli, coincidiendo con lo que se observa en *X. tropicalis*, en esta especie la expresión de la proteína de *Sox9* fue localizada en el núcleo de las células de Sertoli en el testículo. Estos resultados indican una expresión dimórfica tardía, lo que sugiere que *Sox9* participa durante la diferenciación sexual más que en la determinación sexual (Takase et al. 2000, El Jamil et al. 2008). En *Rana rugosa* se han aislado dos isoformas de *Sox9*, la α y la β . En ranas adultas de *R. rugosa* la isoforma *Sox9 α* se expresó en cerebro y testículo. En

Bufo marinus los niveles de RNAm de *Sox9* en testículo, fueron idénticos a los de ovario, esto ocurre cuando se está llevando a cabo el proceso de metamorfosis (Dumond et al. 2011). En *A. mexicanum* la expresión de *Sox9* se observó en el núcleo de las células somáticas en las diferentes etapas de desarrollo incluso en gónadas adultos, contrario a lo que se observa en *P. waltl*, en donde la expresión de *Sox9* en el testículo fue en el núcleo de células somáticas y germinales y conforme avanza el desarrollo el marcaje es evidente en el citoplasma (Dumond et al. 2011).

❖ Gónada adulta

En etapa adulta de *A. mexicanum* se analizó otro gen importante para el mantenimiento y función del ovario adulto (Uhlenhaut et al. 2009); el factor de transcripción *Foxl2*, encargado también de la transformación de andrógenos a estrógenos y de la diferenciación de las células de la granulosa (Nef y Vassalli, 2009; Villareal y Aguilar, 2014). La expresión de la proteína *Foxl2* en el ovario de *A. mexicanum* se localizó en el citoplasma de las células foliculares que envuelven a los ovocitos en crecimiento secundario durante los estadios V y VI (vitelogénico), en estos estadios ya es visible el almacenamiento de plaquetas vitelinas, siguiendo el patrón de expresión que es conservado durante la evolución (Bertho et al. 2016).

En el testículo de *A. mexicanum*, la expresión de la proteína *Foxl2* fue detectada débilmente por Western blot y por inmunohistoquímica, lo que indica un papel dimórfico durante la diferenciación ovárica y testicular en esta especie. En *A. mexicanum*, *Foxl2* mostró un patrón de expresión sexualmente dimórfico, por lo que podría emplearse como un indicador en la diferenciación ovárica (Cocquet et al. 2018). *Foxl2* ha sido poco estudiado en anfibios, pero como en mamíferos y otros vertebrados, está relacionado con el

mantenimiento y diferenciación de la gónada (Bertho et al. 2016). En algunas especies de anuros como *R. rugosa*, *X. laevis* y *Lithobates sylvaticus*, *Foxl2* se expresa en las gónadas de ambos sexos, pero posteriormente se expresa dimórficamente, es decir, la expresión en los ovarios es más evidentes (Flament et al. 2011; Bertho et al. 2016; Piprek et al. 2018). En el urodelo *Andrias davidianus*, filogenéticamente relacionado con *P. walt*, se caracterizó la expresión de *adFoxl2* al observarse un aumento significativo de los niveles del transcrito en el ovario durante los primeros 5 años de vida, en relación a lo expresado en el testículo. Basándonos en los resultados obtenidos para *A. mexicanum*, suponemos que *Sox9* y *Foxl2* pueden co-expresarse durante la morfogénesis de la gónada, con el fin de realizar alguna función relacionada con los mecanismos de determinación y diferenciación sexual, de tal forma que intervengan en el establecimiento de la funcionalidad ovárica y testicular en organismos sexualmente maduros.

Otro elemento estudiado en organismos adultos de *A. mexicanum* fue la hormona esteroidea $\Delta 5$ - 3β HSD, que es esencial para la biosíntesis de esteroides activos como son la progesterona, glucocorticoides, andrógenos y estrógenos. Juegan un papel crucial en la diferenciación, desarrollo, crecimiento y fisiología de la mayoría de los tejidos humanos (Morel et al. 1997). En testículos de *A. mexicanum* la actividad enzimática $\Delta 5$ - 3β HSD se detectó en células de Leydig, evidenciado por la acumulación de depósitos de formazán en las gotas lipídicas contenidas en el citoplasma de estas células esteroideogénicas. En cuanto a la actividad de la $\Delta 5$ - 3β HSD en ovarios, esta se detectó en células de la región de la teca que rodea a los folículos (ovocitos en previtelogénesis III), indicando que las células esteroideogénicas se encuentran activas a los 18 meses en hembras de *A. mexicanum*. En *Rana catesbeiana*, cuando la actividad de $\Delta 5$ - 3β HSD es baja o disminuye, se produce masculinización (Hsu et al. 1979; Hsu et al. 1991). Estudios en larvas y adultos de *X. laevis*

mostraron la actividad esteroidogénica de la enzima $\Delta 5$ - 3β HSD en el tejido interrenal, renal y gonadal. Esta actividad fue débil pero positiva durante etapas tempranas y avanzadas, siendo similar a la observada en larvas de *R. catesbeiana*. De igual forma, después de la diferenciación sexual ovárica y testicular, la actividad hormonal es débil y no hay diferencias entre los sexos (Kang et al. 1995). En *P. waltl*, esta enzima ha sido detectada por histoquímica en testículo y ovario (Collenot y Collenot, 1977). En el intersticio de los testículos entre los túbulos seminíferos de *A. mexicanum* encontramos actividad de la $\Delta 5$ - 3β HSD en células de Leydig que son las encargadas de producir hormonas esteroides, evidenciando que los machos de *A. mexicanum* de 18 meses de edad, ya son maduros sexualmente y que la localización de las células esteroidogénicas de Leydig en la región intersticial de los testículos coincide con lo observado en todos los vertebrados.

CONCLUSIONES

- ❖ El tiempo de desarrollo embrionario en *Ambystoma mexicanum* está estrechamente relacionado con las condiciones en las que se encuentran, especialmente en el laboratorio se ha visto que la temperatura es un factor muy importante.
- ❖ En *A. mexicanum*, el inicio del desarrollo gonadal ocurre a partir del estadio 41 (11-12 días post fertilización), cuando se establece el primordio gonadal. La gónada indiferenciada se observa a partir del E50.
- ❖ El inicio de la diferenciación sexual gonadal se lleva a cabo en el E53, evidenciándose por cambios estructurales ováricos, para testículo la diferenciación inicia en el E55, por lo que la condición neoténica no influye en los eventos de la morfogénesis gonadal. En relación a la expresión de los genes *Vasa* y *Sox9*, durante la diferenciación gonadal, esta fue dimórfica, siendo conservada como en otros grupos de vertebrados.
- ❖ El desarrollo gonadal es controlado por una regulación cronológica diferente de la del desarrollo somático, lo que sugiere que el desarrollo gonadal es completamente independiente de la metamorfosis lo que implica un proceso de heterocronía.
- ❖ Las hembras y machos de 18 meses de *A. mexicanum*, son sexualmente maduros.
- ❖ En machos y hembras de *A. mexicanum* de 18 meses (adultos), se corroboró la expresión de *Vasa*, así como la expresión dimórfica de los genes *Sox9* y *Foxl2*, lo que indica que algunos eventos moleculares, celulares y fisiológicos del proceso de diferenciación testicular y ovárica se conservan entre vertebrados.
- ❖ En hembras y machos de *A. mexicanum* de 18 meses de edad, por primera vez las células esteroideogénicas de la teca y de Leydig se identificaron por su actividad fisiológica, indicando actividad hormonal.

CONCLUSIÓN GENERAL

Esta investigación arrojó datos muy importantes para este anfibio urodelo *Ambystoma mexicanum*, organismo neoténico y endémico de México. Se lograron integrar y relacionar eventos de gran interés durante el desarrollo gonadal, desde etapas tempranas en donde inicia su desarrollo y aparece el primordio gonadal, pasando por etapas claves como el inicio de su diferenciación, su crecimiento y desarrollo, así como cuando ya es una gónada diferenciada en un ovario o en un testículo. Por lo que podemos concluir que en *Ambystoma mexicanum* la morfogénesis gonadal no está relacionada con la edad del organismo como en otros urodelos y que el desarrollo de la gónada difiere al desarrollo somático, lo que sugiere que su desarrollo es independiente al proceso de metamorfosis. Morfológicamente las gónadas de hembras y machos presentan una estructura similar a la de otros anfibios urodelos. Estas etapas se correlacionaron con eventos moleculares como la expresión de genes de gran importancia tales como *Sox9*, *Foxl2* y *Vasa* y podemos concluir que en larvas como en adultos de *A. mexicanum* la expresión de estos genes es dimórfica y que los mecanismos moleculares siguen un patrón de expresión similar a la de otros vertebrados y que la condición de neotenia no influye sobre estos mecanismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abramyan, J., Feng, C., Koopman, P. (2009). Cloning and expression of candidate sexual development genes in the cane toad (*Bufo marinus*). *Dev Dyn* 238:2430–2441. <https://doi.10.1002/dvdy.22055>
- Al-assad, I., Dumond, H., Chardard, D., Chesnel, A., Flament, S. (2012). Busul-fan-mediated germ cell depletion does not alter gonad differentiation in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Sex Dev.* 6: 188-200. [https:// doi. 10.1159/000337857](https://doi.10.1159/000337857)
- Al-Asaad, I., Chardard, D., Di Clemente, N., Picard, J. Y., Dumond, H., Chesnel, A., Flament, S. (2013). Müllerian inhibiting substance in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology.* 13: 154, 3931–3936. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1229>
- Angelopoulou, R., Lavranos, G., Manolaku, P. (2012). Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? *Reprod Biol Endocrinol*, 10:13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-13>
- Aoyama, S., Shibata, K., Tokunaga, S., Takase, M., Nakamura, M. (2003). Expression of Dmrt1 protein in developing and in sex-reversed gonads of amphibians. *Cytogenet Genome Res.* 101(3-4):295-301. [https://doi. 10.1159/000074352](https://doi.10.1159/000074352)
- Arenas, M., Royuela, M., Lobo, M., Alfaro, J., Fraile, B., Paniagua, R. (2001). Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and estrogen receptor-beta (ER-beta) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus marmoratus* during the anual cycle. *J Anat* 199: 465–472.
- Armstrong, J. B. y Duhon, S. T. (1989). Induced spawnings, artificial insemination and other genetic manipulations. In: *Developmental Biology of the Axolotl*, 228–235.
- Bachvarova, R., Masi, T., Drum, M., Parker, N., Mason, K., Patiet, R., Johnson, A. (2004). Gene expression in the axolotl germ line: Axdazl, Axvh, Axoct-4, and Axkit. *Dev Dyn* 231: 871–880. [https://doi. 10.1002/dvdy.20195](https://doi.10.1002/dvdy.20195)
- Bachvarova, R., Masi, T., Drum, M., Parker, N., Mason, K., Patiet, R., Johnson, A. (2004). Gene expression in the axolotl germ line: Axdazl, Axvh, Axoct-4, and Axkit. *Dev Dyn* 231: 871–880. [https://doi. 10.1002/dvdy.20195](https://doi.10.1002/dvdy.20195)
- Bachvarova, R., Crother, B., Johnson, A. (2009a). Evolution of germ cell development in

- tetrapods: comparison of urodeles and amniotes. *Evol. Dev.* 11, 603-609.
<https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00366.x>
- Bachvarova, R., Crother, B., Manova, K., Chatfield, J., Shoemaker, C., Crews, D., Johnson, A. (2009b). Expression of *Dazl* and *Vasa* in turtle embryos and ovaries: evidence for inductive specification of germ cells. *Evol. Dev.* 11, 525-534.
<https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00360.x>
- Bagheri-Fam, S., Sinclair, A. H., Koopman, P., Harley, V. R. (2010). Conserved regulatory modules in the *Sox9* testis-specific enhancer predict roles for SOX, TCF/LEF, Forkhead, DMRT, and GATA proteins in vertebrate sex determination. *Int J Biochem Cell Biol.* 42:472-7. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.001>
- Barrionuevo F. J., Hurtado A. L., Kim G. J., Real F. M., Bakkali M., Kopp J. L., Sander M., Scherer G., Burgos M., Jiménez R. (2016). *Sox9* and *Sox8* protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration *Elife.* Jun 21:5
- Baroiller, J. F., Guiguen, Y., Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell Mol Life Sci* 55:910–931.
- Bertho, S., Pasquier, J., Pan, Q., Le Trionnaire, G., Bobe, J., Postlethwait, J. H, Guiguen, Y. (2016). *Foxl2* and its relatives are evolutionary conserved players in gonadal sex differentiation. *Sexual Development*, 10(3), 111–129.
<https://doi.org/10.1159/000447611>
- Bordzilovskaya, N. P. y Detlaff, T. A. (1979). Table of stages of the normal development of axolotl embryos and the prognostication of timing of successive developmental stages at various temperatures. *Axolotl Newsletter* 7:2–22.
- Bride, I., Griffiths, R., Meléndez, A., Álvarez J. (2004). Conservación del axolote en Xochimilco, México. Curso de actualización. Kent University and Darwin initiative, México.
- Bull, J. J. (1985). Sex determining mechanisms: An evolutionary perspective. *Experientia.* 41, 1285.
- Cameron, F. J., y Sinclair, A. H. (1997). Mutations in *SRY* and *Sox9*: Testis-determining genes. *Human Mutation* 9:388-395. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)9:5%3C388::AID-HUMU2%3E3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:5%3C388::AID-HUMU2%3E3.0.CO;2-0)

- Capuron, A. (1968). Analyse experimentale de l'organogenese urogenitale d'embryons induits par la greffe de la lavre dorsale du blastopore chez l'Amphibien Urodele *Pleurodeles waltlii* (Vichah.). Ann. Embryol. Morphogen. 1, 3-27.
- Capuron, A. (1972). Mise en 6vidence de gonocytes dans divers territoires isoles au stade du bourgeon caudal et cultives in vitro chez *Pleurodeles waltlii* Nichah. (Amphibien Urodele). C. R. Acad. Sci. (Paris), Ser. D, 274, 277-279.
- Castrillon, H. D., Quade, J. B., Wang Y. T. (2000). The human Vasa gene is specifically expressed in the germ cell lineage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 9585–9590. <https://doi.org/10.1073/pnas.160274797>
- Chang-Soo H. y Jean-Pierre Saint-Jeannet P. J. (2005). Sox proteins and neural crest development, Seminars in Cell & Develop Biology, 16 (6): 694-703. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.06.005>.
- Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C., Dournon, C. (1995). Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltli* (urodele amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. Gen. Comp. Endocrinol. 99, 100–107. <https://doi.org/10.1006/gcen.1995.1089>
- Chardard, D., Kuntz, S., Chesnel, A., Flament, S. (2003). Effects of androgen on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltli*. J Exp Zool 296: 46–55. <https://doi.org/10.1002/jez.a.10240>
- Chiang, E. F., Pai, C. I., Wyatt, M., Yan, Y. L., Postlethwait, J., Chung, B. (2001). Two Sox9 Genes on Duplicated Zebrafish Chromosomes: Expression of Similar Transcription Activators in Distinct Sites. Devel. Biol. 231: 149-163. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0129>
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Serval, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M., Veitia, R. (2002). Evolution and expression of FOXL2. J Med Genet 39: 916-921.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Serval, N., Xia, X., Pannetier, M., Veitia, R. (2018). Evolution and expression of FOXL2. Letter to Journal of Medical Genetics, 39(12), 916–921. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.12.916>
- Collenot, G., & Collenot, A. (1977). L'activite 3 (3-hydroxys-teroiide deshydrogenasique dans les gonades en differentiation de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien, Urodele);

- visualisation sur coupes series a Taide d'une nouvelle technique histochimique. *J Embryol Experim Morpho*, 42, 29–42.
- Contreras, V., Martínez, M. E., Valiente, E., Zambrano, L. (2009). Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biol Conserv* 142:2881–2885.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.07.008>
- Deeming, C. y Ferguson, J. (1989). The mechanism of temperatura dependent sex determination in Crocodilians: A hypothesis. *Am Zool.* 29: 973-985.
- De Falco, T. y Capel, B. (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25:457–82.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.13350>
- De Felici M. (2010). Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, 9:632–636.
- Devlin, R. y Nagaham, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191–364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- D. R., Johnson H., Millena C. A., Khan A. S. (2002). Transforming growth factor- β effects on morphology of immature rat Leydig cells. *Mol Cel Endrocrynol.* 195:65-77.
[https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00216-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00216-2)
- Dournon, C., Guillet, F., Boucher, D., Lacroix, J. C. (1984). Cytogenetic and genetic evidence of male sexual inversion by heat treatment in the newt *Pleurodeles poireti*. *Chromosoma* 90: 261–264. <https://doi.org/10.1007/BF00287033>
- Dournon, C. y Houillon, C. (1984). De´monstration ge´ne´tique de l'inversion fonctionelle du phe´notype sexuel femelle sous l'action de la tempe´rature d'e´levage. *Reprod. Nutr. Dev.* 24: 361–378. <https://doi.org/10.1051/RND:19840403>
- Dournon, C. y Houillon, C. (1985). Thermosensibilite de la differenciacion sexuelle chez l'Amphibien Urodele *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phenotype sexuel de toutes les femelles genetiques sous l'action de la temperature d'elevege. *Reprod. Nutr. Dev.* 25, 671–688.
<https://doi.org/10.1051/rnd:19850508>

- Dournon, C., Demassieux, C., Durand, D., Lesimple, M. (1989). Promordial germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl*: genetic control before gonadal differentiation. *Int J Dev Biol* 33: 477-485.
- Dournon, C., Houillon, C., Pieau, C. (1990). Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. Dev. Biol.* 34:81–92.
- Dumond, H., Kuntz, S., Chesnel, A., Ko, C. I., Wallacides, A., Chardard, D., Flament, S. (2008). Sexual Development of the Urodele Amphibian *Pleurodeles waltl*. *Sex Dev*; 2:104–114. [https:// doi. 10.1159/000129695](https://doi.org/10.1159/000129695)
- Dumond, H., Al-Asaad, I., Chesnel, A., Chardard, D., Boizet-Bonhoure, B., Flamnet, S., Kuntz, S. (2011). Temporal and spatial SOX9 expression patterns in the course of gonad development of the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 316:199–211. [https:// doi. 10.1002/jez.b.21390](https://doi.org/10.1002/jez.b.21390)
- Eggert, C. (2004). Sex determination: the amphibian models. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 539–549. [https:// doi. 10.1051/rnd:2004062](https://doi.org/10.1051/rnd:2004062)
- El Jamil, A., Kanhoush, R., Magre, S., Boizet-Bonhoure, B., & Penrad- Mobayed, M. (2008). Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev. Dyn.*, 237: 2996-3005. [https:// doi. 10.1002/dvdy.21692](https://doi.org/10.1002/dvdy.21692).
- Elsik, C., Tellam, L. R., Worley, C. K. (2009). The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science.* 324: 522–528. [https:// doi: 10.1126/science.1169588](https://doi.org/10.1126/science.1169588).
- Eisthen, H. L. y Krause, B. C. (2012). Ambiguities in the relationship between gonadal steroids and reproduction in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Gen Comp Endocrinol* 176:472–480. [https:// doi: 10.1016/j.ygcen.2011.12.034](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.034)
- Erler, P., Sweeney, A., y Monaghan, J. R. (2017). Regulation of injury-induced ovarian regeneration by activation of Oogonial stem cells. *Stem Cells*, 35: 236–247. [https:// doi. 10.1002/stem.2504](https://doi.org/10.1002/stem.2504)
- Falconi, R., Dalpiaz, D., Zaccanti, F. (2004). Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura) 1. Sex differentiation. *J Exp Zool* 301A:378–388. [https:// doi. 10.1002/jez.a.20069](https://doi.org/10.1002/jez.a.20069)
- Flament, S., Dumond, H., Chardard, D., Chesnel, A. (2009). Lifelong testicular

- differentiation in *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Caudata). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7:1–12. [https:// doi. 10.1186/1477-7827-7-21](https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-21)
- Flament, S., Chardard, D., Chesnal, A., Dumond, H. (2011). Sex determination and sexual differentiation in amphibians. *Horm. And Reprod. of Verteb.* Vol. 2-amphibians. 1-19.
- Flament, S. (2016). Sex Reversal in Amphibians. *Sex. Dev.* 10:267–278. [https:// doi 10.1159/000448797](https://doi.org/10.1159/000448797)
- Fridmacher C. V., Berth L. M., Guillouc F., Magrea S. (1995). Switch in the expression of the K19K18 keratin genes as a very early evidence of testicular differentiation in the rat. *Mech of Develop* 52:199-207.
- Fröjdman K, Miner JH, Sanes JR, Pelliniemi LJ, Virtanen I. 1999. Sexspecific localization of laminin a5 chain in the differentiating rat testis and ovary. *Differentiation* 64:151–159.
- Gallien, L. (1951) Sur la descendance unisexue´e d’une femelle de *Pleurodeles waltlii* Michah ayant subi pendant sa phase larvaire l’action gynoge`ne du benzoate d’oestradiol. *C.R. Acad. Sci.*, 233, 828-830.
- Guerrero, E. S. y Moreno, M. N. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fisheries* 20: 101-121.
- Guerrero, E. S. y Moreno, M. N. (2012). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichtys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J of Fish Biology*, 80:572-594. [https:// doi. 10.1111/j.1095-8649.2011.03196.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03196.x)
- Gustafson E. A. y Wessel G. M. (2010). *Vasa* genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Byoessay* 32(7): 626-637. <https://doi.org/10.1002/bies.201000001>
- Gutiérrez, J. M; Taylor, T. R; Bolaños, R. (1979). Cario tipos de diez especies de serpientes costarricenses de la familia Viperidae. *Biol. Tropical* 309-316.
- Gutiérrez, J. M; Solórzano, A; Cerdas, L. (1984). Estudios cariológicos de cinco especies de serpientes costarricenses de la familia Colubridae. *Rev. Biol. Trop.* 263-267.
- Hansen, L. y Pelgri, F. (2021). Promordial germ cell specification in vertebrate embryos: phylogenetic distribution and conserved molecular features of preformation ans

- induction. *Front. Cell. Dev. Biol.* 9: 730332.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730332>
- Hayashi, K., de Sousa Lopez, S., Surani, M. (2007). Germ cell specification in mice. *Science* 316: 394–397. <https://doi.org/10.1126/science.1137545>
- Hayes, T. B. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool* 281:373–399.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5%3C373::AID-JEZ4%3E3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5%3C373::AID-JEZ4%3E3.0.CO;2-L)
- Hillis, D. y Green, D. (1990). Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibian. *J. Evol. Biol* 3: 49-64.
<https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1990.3010049.x>
- Humphrey, R. (1929). Studies on sex reversal in *Amblystoma*: II. Sex differentiation and modification following orthotopic 18implantation of a gonadic preprimordium. *J. Exp. Zool.*, 53:171–219. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1400530204>
- Humphrey H.C. Yao, Martin M. Matzuk, Carolina J. Jorgez, Douglas B. Menke, David C. Page, Amanda Swain, and Blanche Capel 2004. *Follistatin* Operates Downstream of *Wnt4* in Mammalian Ovary Organogenesis. *Dev Dyn* 230(2): 210-215.
- Hsu, C. Y., Hsu, L. H., & Liang, H.-M. (1979). The effect of cyproterone acetate on the activity of D5–3b hydroxysteroid dehydrogenase in tadpole sex transformation. *General and Comparative Endocrinology*, 39, 404–410.
<https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0073>
- Hsu, C. Y., Yu, N. W., Ku, H. H., Chang, L. T., & Liu, H. W. (1991). Estradiol secretion by tadpole ovaries masculinized by implanted capsules of cyanoketone. *Development, Growth and Differentiation*, 33(3), 201–208. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1991.00201.x>
- Ijiri S., Kaneko H., Kobayashi T., Wang D. S., Sakai F., Prasanth P. B., Nakamura M., Yoshitaka Nagahama Y. (2008). Sexual Dimorphic Expression of Genes in Gonads During Early Differentiation of a Teleost Fish, the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol of Reprod.* 78(2): 333–341.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064246>
- Iwata, T., Toyoda, F., Yamamoto, K., Kikuyama, S. (2000). Hormonal control of urodele

- reproductive behavior. *Comp. Biochem. Physiol, Part B* 126 221–229. [https:// doi. 10.1016/s0305-0491\(00\)00200-5](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00200-5)
- Ikenishi, K y Nieuwkoop, P. D. (1978). Location and ultrastructure of primordial germ cells (PGCs) in *Ambystoma mexicanum*. *Dev Growth Differ.* 20: 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1978.00001.x>
- Ikenishi, K. y Tanaka T. S. (2000). Spatio-temporal expression of *Xenopus* vasa homolog, XVLG1, in oocytes and embryos: the presence of XVLG1 RNA in somatic cells as well as germline cells. *Develop Growth Differ* 42:95–103. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1996.t01-4-00009.x>
- Johnson, A., Bachvarova, R., Drum, M., 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. *Dev. Biol.* 234, 402-415. [https:// doi. 10.1006/dbio.2001.0264](https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0264)
- Johnson, A., Drum, M., Bachvarova, R., Masi, T., White, E. M., Crother, I. B. (2003b). Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution. *Evol Dev* 5(4):414–431. [https:// doi. 10.1046/j.1525-142x.2003.03048.x](https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2003.03048.x)
- Johnson, A., Richardson, E., Bachvarova, R., Crother, I. B. (2011). Evolution of the germ line-soma relationship in vertebrate embryos. *Reproduction* 141, 291-300. [https:// doi. 10.1530/REP-10-0474](https://doi.org/10.1530/REP-10-0474)
- Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., McArdell S C., Ternes A. T., Thomsen A., Siegrista H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research.* 40 (8):1686-1696. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.014>.
- Kang, L., Marin, M., y Kelley, D. (1995). Androgen biosynthesis and secretion in developing *Xenopus laevis*. *Gen and Comp Endocrin*, 100(3), 293–307. <https://doi.org/10.1006/gcen.1995.1160>
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* 122 (9):2813-22. [https:// doi.org/10.1242/dev.122.9.2813](https://doi.org/10.1242/dev.122.9.2813)
- Kessel R y Panje W (1968) Organization and activity in the pre- and postovulatory follicle

of *Necturus maculosus*. J Cell Biol 39:1–34

Ko, C.I., Chesnel A., Mazerbourg, S., Kuntz, S., Flament, S., Chardard, D. (2008). Female-enriched expression of ER during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Gen Comp Endocrinol. 156:234–245.19.

<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.01.012>

Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K., Furusawa, M. (1994). Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. Dev. Biol. 162: 354–363.

<https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1093>

Kuntz, S., Chardard, D., Chesnel, A., Grillier-Vuissoz, I., Flament, S. (2003). Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. Cytogenet Genome Res 101: 283–288. <https://doi.org/10.1159/000074350>

Kuntz, S., Chesnel, A., Duterque-Coquillaud, M., Grillier-Vuissoz, I., Callier, M., Dournon, C., Flament, S., Chardard, D. (2003b). Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. Journal of steroid biochemistry and molecular biology 84 89-100.

[https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(03\)00009-8](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(03)00009-8)

Lacroix, J. C., Azzouz, R., Simon, F., Bellini, M., Charlemagne, J., Dournon, C. (1990). Lampbrush W and Z chromosome characterization with a monoclonal antibody and heat-induced chromosomal markers in the newt *Pleurodeles waltl*: W chromosome plays a role in female sex determination. Chromosoma 99, 307–314. <https://doi.org/10.1007/BF01731717>

Lang, J. W., Andrews, H., Whitaker, R. (1987). Sex determination and sex ratios in *Crocodylus palustris*. Am. Zool. 29: 935-952. <http://www.jstor.org/stable/3883495>

Larson, A. (1991). A molecular perspective on the evolutionary relationships of the salamander families. Evolutionary Biology, 25: 211-277.

<https://doi.org/10.2307/2413703>

Liu, Z., Wu, F., Jiao, B., Zhang, X., Hu, C., Huang, B., Zhou, L., Huang, X., Wang, Z., Zhang, Y., Nagahama, Y., Cheng, C., Wang, D. (2007). Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their

- possibl roles in sex differentiation. *J Endocrinol* 194 (1):223-241.
<https://doi.org/10.1677/joe-07-0135>
- Márquez, A. y López, A. (2004). Control molecular de la diferenciación. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. 10 (1) 74-81.
- Marracci, S., Casola, C., Bucci, S., Raghianti, M., Ogielska, M., Mancino, G. (2007). Differential expression of two vasa/PL10- related genes during gametogenesis in the special model system *Rana*. *Developmental Genes Evolution*, 217(5), 395–402.
<https://doi: 10.1007/s00427-007-0143-6>
- Martínez-Juárez, A. y Moreno-Mendoza, N. (2019). Mechanisms related to sexual determination by temperature in reptiles. *J Therm Biol*. 85: 1-16
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102400>
- Martínez-Juárez, A., López-Luna, M. A., Porrás-Gómez, T. J., Moreno-Mendoza, N. (2018). Expression of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *JEZ-B Molecular and Developmental. Evolution*, 330(3), 148–164. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22799>
- Maufroid, J. P. y Capuron, A. (1977b). Recent researches on primordial germ cells of *Pleurodeles waltlii* (Amphibia, Urodele). *Mem. Soc. Zool. Fr.*, 41, 43-60.
<https://doi.org/10.1159/000129695>
- Maufroid, J. P. y Capuron, A. (1985). A demonstration of cellular interactions during the formation of mesoderm and primordial germ cells in *Pleurodeles waltlii*. *Differentiation*, 29(1), 20-24. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1985.tb00287.x>
- Mawaribuchi, S., Musashijima, M., Wada, M., Izutsu, Y., Kurakata, E., Park, M. K., Takamatsu, N., Ito, M. (2017). Molecular evolution of two distinct *dmrt1* promoters for germ and somatic cells in vertebrate gonads. *Mol. Biol. Evol.* 34:724–733.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw273>
- McCoy, J. C., Vogt, C. R., Censky, J. E. (1983). Temperatura- controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivácea*. *J. Herpetol.* 17: 404-406.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw273>
- Mena, H. y Servín, E. (2014). Manual para el cuidado en cautiverio de axolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). Universidad Nacional Autónoma de México. 34 pp.

- Mendoza, C. E., Moreno, M. N., Zambrano, G. L., Villagrán-SantaCruz, M. (2017). Development and gonadal sex differentiation in the neotenic urodele: *Ambystoma mexicanum*. *Zoomorphology* (2017) 136:497–509.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00435-017-0361-z>
DOI 10.1007/s00435-017-0361-z
- Mendoza, C. E., Moreno, M. N., Zambrano, G. L., Porras, G. T., Villagrán-SantaCruz, M. (2020). Dimorphic protein expression for Sox9 and Foxl2 genes in the testicles and ovaries of the urodele amphibian: *Ambystoma mexicanum*. *Acta Zool*: 00; 1-14.
DOI: 10.1111/azo.12327. <https://doi.org/10.1111/azo.12327>
- Merchant, H. (1978). Ovarian differentiation. In: *The Vertebrate Ovary*. R.E. Jones, ed. Plenum Press, New York, pp. 47–81.
- Merchant, H. y Villalpando, I. (1981). Ultrastructural events during early gonadal development in *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *Anat. Rec.*, 199:349–360.
<https://doi.org/10.1002/ar.1091990305>
- Merchant L. H y Álvarez B. A (1981). The role of dense core granules of mammalian primordial germ cells: an in vivo and in vitro study. *Excerpta Médica* 559:119–121
- Merchant, H., Villalpando, I., Centeno, B. (1989). Gonadal morphogenesis undercontrolled temperatura in the sea turtle *Lepidochelys olivácea*. *Herpetol. Monogr.* 3:43-61.
<https://doi.org/10.2307/1466985>
- Molyneaux, K. y Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol.* 48(5-6):537-44. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041833km>
- Morais da Silva, S., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., Lovell-badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the genes in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics*: 14, 62-68.
<https://doi.org/10.1038/ng0996-62>
- Morel, Y., Mebarki, F., Rheaume, E., Sanchez, R., Forest, M., y Simardt, J. (1997). Structure-function relationships of 3[3-hydroxysteroid dehydrogenase: Contribution made by the molecular genetics of 3[3-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Steroids*, 62(1), 176–184. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(96\)00178-x](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(96)00178-x).
- Nakamura, M. (2009) Sex determination in amphibians. *Semin Cell Dev Biol.* May; (3): 271-82

- Nakamura, S., Watakabe, I., Nishimura, T., Picard, J. Y., Toyoda, A., Taniguchi, Y., Clemente, N., Tanaka, M. (2012). Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective antiMüllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Development* 139: 2283-2287. <https://doi.org/10.1242/dev.076307>
- Nef, S. y Vassalli, J. (2009). Complementary pathways in mammalian female sex determination. *Journal of Biology* 2009, 8:74. <https://doi.org/10.1186/jbiol1173>
- Nieuwkoop, P. (1947) Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells, and on the development of the lateral plates and germ ridges in Urodeles. *Arch. Neerl. Zool.*, 8, 1-205.
- Nieuwkoop, P. y Sutasurya, L. (1979). *Primordial Germ Cells in the Chordates*. Cambridge: Cambridge University Press. Nieuwkoop, P. y Sutasurya, L. (1981). *Primordial Germ Cells in the Invertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Nieuwkoop, P. y Sutasurya, L. (1981). “Primordial Germ Cells in the Invertebrates.” Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. <https://doi.org/10.1242%2Fdev.113993>
- Nye HL, Cameron JA, Chernoff EA, Stocum DL (2003) Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. *Dev Dyn* 226:555–560
- Ogielska, M. y Kotusz, A. (2004). Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anura amphibians. *J Morphol* 259:41–54. <https://doi.org/10.1002/jmor.10162>
- Ogielska, M. y Bartmanska, J. (2009). Spermatogenesis and male reproductive system in Amphibia–Anura. In *Reproduction of Amphibians*, Ed. M Ogielska. Enfield: Science Publishers. pp 34–99.
- Olsen, L. C., Aasland, R., Fjose, A. (1997). A Vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech Dev*. 66: 95–105. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00099-3)
- Osawa, N., Oshima, Y., Nakamura, M. (2005). Molecular cloning of *Dmrt1* and its expression in the gonad of *Xenopus*. *Zoological Science*, 22(6), 681–687. <https://doi.org/10.2108/zsj.22.681>
- Oshima, Y., Uno, Y., Matsuda, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M. (2008). Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*. *Gen Comp Endocrinol*. 159 (2-3): 170-7. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.08.013>

- Pelliniemi LJ, Fröjdman K, Sundström J, Pöllänen P, Kuopio T. 1998. Cellular and molecular changes during sex differentiation of embryonic mammalian gonads. *J Exp Zool* 281:482–493.
- Pelliniemi LJ, Fröjdman K. 2001. Structural and regulatory macromolecules in sex differentiation of gonads. *J Exp Zool* 290: 523–528.
- Penrad, M. M., Perrin, C., L'Hôte, D., Contremoulins, V., Lepesant, J. A., Boizet-Bonhoure., Poulat F., Baudin X., Veitia, R. A. (2018). A role for SOX9 in post-transcriptional processes: insights from the amphibian oocyte. *Scientific Reports* 8:7191. [doi:10.1038/s41598-018-25356-1](https://doi.org/10.1038/s41598-018-25356-1)
- Picheral, B. (1968). Les tissus élaborateurs d'hormones stéroïdes chez les amphibiens urodèles. I. Ultrastructure des cellules du tissu glandulaire du testicule de *Pleurodeles waltlii* Michah. *J Microscopie* 7:115-134.
- Pieau, C. (1971). Sur la proportion sexuelle chez les embryons de deux Chelonies (*Testudo graeca* L; et *Emysorbicularis* L), issus d'oeufs incubés artificiellement. *C R Acad Sci.* 272: 3071-3074.
- Pieau, C. (1972). Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Chelonies (*Emysorbicularis* L; et *Testudo graeca*). *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D.* 170: 373-382.
- Pieau, C., Dorozzi, M., Richard-Mercier, N. (2001). Temperature dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *EXS* 91: 117-141. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7781-7_7
- Piprek RP, Pecio A, Szymura JM (2010) Differentiation and development of gonads in the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* L., 1758 (Amphibia: Anura: Bombinatoridae). *Zool Sci* 27:1–9
- Piprek, R. P., Pecio, A., Laskowska-Kaszub, K., Kloc, M., Kubiak, J. Z., Szymura, J. M. (2013). Retinoic acid homeostasis regulates meiotic entry in developing anuran gonads and in Bidder's organ through Raldh2 and Cyp26b1 proteins. *Mech. Dev.* 130: 613-27. <http://doi.org/10.1016/j.mod.2013.09.001>
- Piprek, R. P., Damulewicz, M., Kloc, M., & Kubiak, J. Z. (2018). Transcriptome analysis identifies genes involved in sex determination and development of *Xenopus laevis* gonads. *Differentiation* 100, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.02.004>

- Porras, G. T., Villagrán, S. M., Moreno, M. N. (2021). Biology of primordial germ cells in vertebrates with emphasis in urodeles amphibians. *Mol Reprod Dev.* 88:773–792.
<https://doi.org/10.1002/mrd.23533>
- Raymond, C. S., Kettlewell, J. R., Hirsch, B., Bardwell, V. J., Zarkower, D. (1999). Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 215(2):208–220.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9461>
- Recuero, E., Cortes, C. J., Parra, G., Zamudio, R. K. (2010). Urban aquatic habitats and conservation of highly endangered species: the case of *Ambystoma mexicanum* (Caudata, Ambystomatidae). *Ann. Zool. Fennici* 47: 223–238.
<https://www.jstor.org/stable/23737072>
- Robertson K. M., O'Donnell L., Jones E. E. M., Meachem J. S., Boon C. W., Fisher R. C., Graves H. K., McLachlan I. R., Simpsonet R. E. (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. *Proc Natl Acad Sci.* 96 (14) 7986-7991.
- Roco S. A., Ruiz-García A., Bullejos M. (2021). Testis Development and Differentiation in Amphibians. *Genes (Basel)* 16; 12 (4): 578.
- Ruiz-García, A., Roco, Á. S., Bullejos, M. (2021). Sex-differentiation in amphibians: Effect of temperature and its influence on sex reversal. *Sex Dev* 15:157-167.
<https://doi.org/10.1159/000515220>
- Salame, M. y Villalpando, F. (1998). Diferenciación sexual en vertebrados: hipótesis y teorías. *Acta Zool. Mex.* (n.s). 73- 89-110.
<https://doi.org/10.21829/azm.1998.73731729>
- Sánchez, O., Pineda, A. M., Benítez, H., Berlanga, H., Rivera, T. H. (2015). Guía de identificación para las aves y mamíferos silvestres de mayor comercio en México protegidos por la CITES, 2a. Edición, Volumen II: MAMÍFEROS. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) - Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México, D. F.
- Santa Barbara P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P., Scherer G., Poulat F., Berta P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian

- hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6653–6665.
- Santa Barbara P., Moniot B., Poulat F., Berta P. (2000). Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev. Dinam.* 217 (3): 233-325. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200003\)217:3%3C293::AID-DVDY7%3E3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200003)217:3%3C293::AID-DVDY7%3E3.0.CO;2-P)
- Sarre D. S., Ezaz T., Georges A. (2011). Transitions between sex- determining systems in reptiles and amphibian. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 12:391-406. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082410-101518>
- Sawada H y Esaki M. (2003). Electron microscopic observation of 137Cs-irradiated rat testis: production of basal laminae for germ cells, despite their absence. *Microscopy.* 52 (4): 391-397. doi: 10.1093/jmicro/52.4.391
- Servín, E. (2011) Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el zoológico de Chapultepec. Tesis de Licenciatura. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, UNAM. https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000669778
- Shimada K. (1998). Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *J. Exp. Zool.* 281:450–456. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5%3C450::AID-JEZ9%3E3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5%3C450::AID-JEZ9%3E3.0.CO;2-N)
- Shivanandappa, T. y Devaraj-Sarkar, H. B. (1979). Seasonal Lipid Cycle and Steroidogenic Activity in the Testis of the Tropical Skink, *Mabuya carinata* (Schneider): A Histochemical Study. *Gen Com Endocrinol*, 38(4), 491–495. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(79\)90158-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(79)90158-8)
- Shoemaker, C. M. y Crews, D. (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:293–303. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.10.010>
- Shoemaker, C. M., Jackson, K., Yatsu, R., Matsumoto, Y., Crews, D. (2010). Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads. *Dev Dyn.* 239(4), 1061–1075. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22266>
- Smith, L. (1964). A test of the capacity of presumptive somatic cells to transform into primordial germ cells in the Mexican axolotl. *J Exp Zool* 156, 229-242.

<https://doi.org/10.1002/jez.1401560209>

Smith, J. y Voss, S. (2009). Amphibian sex determination: Segregation and linkage analysis using members of the tiger salamander species complex (*Ambystoma mexicanum* and *A. t. tigrinum*). *Heredity*, 102: 542-548. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.1>

Soatome, K., Isomura, T., Seki, T., Nakamura, Y., Nakamura, M. (2010). Structural Changes in Gonadal Basement Membranes During Sex Differentiation in the Frog *Rana rugosa*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313: 369–380.

<https://doi.org/10.1002/jez.607>

Song, W., Ren, D., Li, W., Jiang, L., Cho, K. W., Huang, P., Fan, C., Song, Y., Liu, Y., Rui, L. (2010). SH2B Regulation of Growth, Metabolism, and Longevity in Both Insects and Mammals. *Cell Metab* 11: 427–437.

<https://doi.org/10.1016%2Fj.cmet.2010.04.002>

Sugita, J., Takase, M., Nakamura, M. (2001). Expression of Dax-1 during gonadal development of the frog. *Gene* 12; 280 (1-2):67-74. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00739-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00739-9)

Takase, M., Noguchi, S., Nakamura, M. (2000). Two Sox9 messenger RNA isoforms: Isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa*. *FEBS Lett* 466: 249–254. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01078-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01078-4)

Tamori, Y., Iwai, T., Mita, K., Wakahara, M. (2004). Spatio temporal expression of a DAZ-like gene in the Japanese newt *Cynops ptyrhogaster* that has no germ plasm. *Dev Genes Evol* 14(2): 615-67. <https://doi.org/10.1007/s00427-004-0443-z>

Tiffoche, C., Chesnel, A., Jégo, P., Le Penneç, J. (1993). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a *Pleurodeles lectin*. *Eur. J. Biochem.*, 213(3), 901-907.

<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17834.x>

Thompson S., Muzinic L., Muzinic C., Niemiller M. L., Voss S. R. (2014) Probability of regenerating a normal limb after bite injury in the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Regeneration* 1:27–32

Trukina, A., Lukina, N., Wackerow, K., Smirov, F. (2013). The Variety of Vertebrate Mechanisms of Sex Determination. *BioMed Research International*. 1-8.

<https://doi.org/10.1155/2013/587460>

- Tzu J, Marinkovich MP. 2008. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 40:199–214.
- Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139(6), 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>
- Uribe MC (2009) Spermatogenesis and male reproductive system. Urodela. In: Ogielska M (ed) *Reproduction of amphibians*. Science Publishers, Enfield, pp 100–124
- Uribe MC (2011) Hormones and the female reproductive system of amphibians. In: Norris D, Lopez K (eds) *amphibians*. Elsevier, Amsterdam, pp 55–81
- Vannini, E. (1941). La partecipazione del tessuto interrenale nell'organogenesi della gonade e nei processi di intersessualità giovanile della *Rana agilis*. *R.C. Acad. Ital.*, 2:777–785. <https://docme.su/doc/1304688/668>
- Villareal, S. y Aguilar, X. (2014). Genes relacionados en la diferenciación sexual. *Scientifica*. 12 (1) 64-69. http://scientifica.umsa.bo/web/revista-scientifica/21/-/asset_publisher/0Gzk/content/genes-relacionados-en-la-diferenciacion-sexual
- Voronina, E., Seydoux, G., Sassone-Corsi, P., Nagamori, I. (2011). RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 22:1–27. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002774>
- Voss, S. R. y Smith, J. J. (2005). Evolution of salamander life cycles: A major effect QTL contributes to both continuous and discrete variation for metamorphic timing. *Genetics*, 170:275-281. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.038273>
- Wakahara, M. (1996). Primordial germ cell development: is the urodele pattern closer to mammals than to anurans? *Int J Dev Biol*. 40: 653-659.
- Wallace, H., Badawy, G. M., Wallace, B. M. (1999). Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell Mol Life Sci* 55: 901–909. <https://doi.org/10.1007/s000180050343>
- Wallace, H. y Wallace, B. (2000). Sex reversal of the newt *Triturus cristatus* reared at extreme temperature. *Int J Dev Biol*. 4: 807–810.
- Wallacides A, Chesnel A, Chardard D, Flament S, Dumond H. (2009). Evidence for a conserved role of retinoic acid in urodele amphibian meiosis onset. *Dev Dyn* 238:1389–139
- Warner D. A. (2011). Sex determination in reptiles. In: *Hormones y Reproduction of*

- Vertebrates. Vol. 3: Reptiles (Norris DO, K Lopez editors). pp 1-38. Academic Press. [doi:10.1016/B978-0-12-374930-7.10001-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374930-7.10001-9)
- Webb, G. J., Beal, W. A. M., Manolis, S. C., Dempsey, K. E. (1987). The effects of incubation temperatura on sex determination and embryonic development rate in *Crocodylus johnstoni* and *C. porosus*. Wild management: *Crocodylus* and *Alligator*. G. J. W. Webb, S. C. Manolis, and P J. Whitehead, eds. Surrey Beatty and Sons, Sydney, 507-531 p.
- Wilhelm, D., Yang, J., Thomas, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87: 1–28. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00009.2006>
- Witschi, E. (1957). The inductor theory of sex differentiation. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, Ser. VI. (Zool.), 13:428–439. <http://hdl.handle.net/2115/27269>
- Yntema, C. L. (1976). Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*. *J Morphol.* 150: 453-461. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051500212>
- Yokoi, H., Kobayashi, T., Tanaka, M., Nagahama, Y., Wakamatsu, Y., Takeda, H., Araki, K., Morohashi, K., Ozato, K. (2002). Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Mol. Repro. Dev.* 63:5-16. [doi: 10.1002/mrd.10169](https://doi.org/10.1002/mrd.10169)
- Yoon C., Kawakami K. & Hopkins N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124, 3157–3166.
- Yoshimoto, S. e Ito, M. (2011). A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *FEBS Journal* 278 -1020–1026. [doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08031.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08031.x)
- Zhao Y y Luck M. R. (1995). Gene expression and protein distribution of collagen, fibronectin and laminin in bovine follicles and corpora lutea. *J Reprod Fertil.* 104 (1): 115–123. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1040115>
- Zambrano, L., Reynoso, V. H., Herrera, G. (2004). Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulce acuícolas de Xochimilco y Chalco. Instituto de Biología. UNAM. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=64415002006>
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Storm, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser,

- C., Walker, A. P., McCabe, E. R., Meltinger, T., Monaco, A. P., Sassone- Corsi, P., Camerino, G. (1994). An unusual member of the nuclear hormonereceptor superfamily responsible for X linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372:635–641. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/372635a0>
- Zarkower, D. (2001). Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet* 2:175–185. <https://doi.org/10.1038/35056032>
- Zhen, Y. y Wan, X. (2014). Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. <https://doi.org/10.1530/jme-14-0018>
- Zippel, K. (2007). Amphibian larval biology and diversity /husbrandy of larval amphibian, Amphibian biology and management. Professional training program. EUA.