



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

“Alcance de la madurez sexual del urodelo *Ambystoma mexicanum*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

NOMBRE DEL ALUMNO

Jessica Lucía Sánchez Ortiz

TUTOR(A)

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Cd. Mx. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza	angelica@iibiomedicas.unam.mx
Dr. Luis Zambrano González	zambrano@ib.unam.mx
Dra. Claudia Olivera Tlahuel	claudiaot@ciencias.unam.mx
M. en C. Eva Mendoza Cruz	evamendoza@ciencias.unam.mx
Biol. Gladys Molina Salinas	gladyzm8@gmail.com

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mis padres Lucy y Juan y a mi hermana Joanna, por creer en mí y brindarme siempre su apoyo y cariño, pero principalmente a mi abue Elvira, quien siempre me apoyó, cuidó y quiso por el tiempo que estuvo en mi vida y que sin su recuerdo constante no estuviera haciendo lo que más amo.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México que me permitió crecer como estudiante y persona.

También quiero agradecer a mi asesora, la Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz por la oportunidad de ser parte de este proyecto, por el conocimiento que me brindó desde que la conocí y por la tolerancia y apoyo que me dio por tanto tiempo. Así como a la Dra. Eva Mendoza Cruz, que me ayudó en este camino, durante la parte práctica y teórica del trabajo, así como su gran apoyo, amabilidad y consejos durante tanto tiempo. Agradezco en general al Laboratorio de Biología Tisular y Reproductora por abrirme las puertas desde mi trabajo de servicio social, hasta hoy en día.

Agradezco al M. en C. Ignacio Andrés Morales del Acuario de la Facultad de Ciencias por el apoyo con los organismos que se utilizaron para la realización de este trabajo y al Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología, significativamente al Dr. Luis Zambrano González y al MVZ Horacio Mena González por su interés en el proyecto y por la donación de organismos.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA-UNAM, por el apoyo del Proyecto de Investigación No. IN211920 “Identificación y caracterización de la línea germinal en ovario y testículo antes del inicio de la madurez sexual en el urodelo *Ambystoma mexicanum* del que derivó la Beca para la realización de esta tesis.

A mis sinodales, la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza, al Dr. Luis Zambrano, a la Dra. Claudia Olivera Tlahuel y a la Candidata al Doctorado en Biomédicas Gladys Molina Salinas.

A la Dra. Tania Janeth Porras Gómez por sus excelentes observaciones y por el tiempo dedicado a mi trabajo.

Quiero agradecer especialmente a mi familia, a mi mamá Lucy, por todo el apoyo incondicional, amor y respeto por mí, mi carrera y trabajo, así como la tolerancia y consejos que siempre me brindó. A mi papá Juan, que estuvo siempre para mí y me apoyó hasta el final, por sus palabras de aliento y apoyo en mis sueños, y a mi hermana Joanna, mi mejor amiga y confidente, que estuvo conmigo en los buenos y malos momentos siempre, dándome la confianza, esperanza, tolerancia y amor durante toda mi carrera. Y por último a mis mejores amigas, que conocí en esta Universidad, a Isabel por su amabilidad, apoyo incondicional y cariño, a Fer por sus consejos y palabras de ayuda para no rendirme, a Meli por siempre estar al pendiente de mí y de mi familia, así como de mis logros y a Pau, a pesar de estar tan lejos siempre pensando en mí y por todo el tiempo que pasamos, fueran días difíciles o llenos de felicidad, las quiero y aprecio todo lo que han hecho por mí.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes.....	7
Ciclos de vida en urodelos y el momento de metamorfosis.....	8
Pedomorfosis, Neotenia, Progénesis y Heterocronía.....	9
Madurez sexual- gametogénesis- reproducción.....	12
Ambystoma.....	15
Condición del Ambiente, ecología y conservación en <i>Ambystoma mexicanum</i>	17
Justificación.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	21
Material y Métodos.....	21
Obtención de organismos.....	21
Condiciones generales de mantenimiento.....	22
Trabajo de Laboratorio.....	22
Obtención de medidas somáticas y tejido gonadal.....	22
Procesamiento histológico.....	23
Interpretación y caracterización de las gónadas.....	23
Resultados.....	24
Gónadas de hembras de <i>A. mexicanum</i>	27
Ovario de larvas de 4 meses de edad.....	27
Ovario de larvas de 6 meses de edad.....	30
Ovario de larvas de 8 meses de edad.....	30
Ovario de larvas de 9 meses de edad.....	33

Ovario de larvas de 10 meses de edad.....	36
Ovario de larvas de 12 meses de edad.....	39
Gónadas de machos de <i>A. mexicanum</i>	48
Testículo de larvas de 7 meses de desarrollo.....	50
Testículo de larvas de 8 meses de desarrollo.....	50
Testículo de larvas de 9 meses de desarrollo.....	55
Testículo de larvas de 12 meses de desarrollo.....	58
Discusión.....	65
Diferencias entre machos y hembras en <i>A. mexicanum</i>	66
Características gonadales.....	70
Gónadas de larvas hembras.....	70
Gónadas de larvas de machos.....	73
Protandria	77
Heterocronía	79
Conclusiones	80
Literatura Citada.....	82

RESUMEN

El ajolote (*Ambystoma mexicanum*) es un anfibio endémico del orden Urodela, perteneciente a la familia Ambystomatidae. Esta especie tiene la capacidad de reproducirse conservando sus características de larva (pedomorfosis). Aunque es una especie que ha sido ampliamente estudiada en una diversidad de aspectos, no está descrito el proceso del desarrollo gonadal hasta el alcance de la madurez sexual, por lo que el objetivo de esta investigación ha sido definir con detalle y precisión este proceso. Se utilizaron las gónadas de larvas hembra de 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12 meses de edad y de machos de 7, 8, 9, 10 y 12 las cuales se procesaron histológicamente y se caracterizaron de acuerdo con su desarrollo gonadal. La histología revela que, aunque hay un progresivo aumento en el tamaño gonadal y del número de ovocitos reflejo del crecimiento primario, las gónadas de larvas hembras de 4, 6, 7, y 8 meses de edad son inmaduras. Los ovarios de 9 y 10 meses ya presentan predominantemente ovocitos en etapa de crecimiento secundario, los cuales muestran signos del inicio de la maduración como el aumento del volumen, la acumulación de vitelo y la presencia del pigmento cortical en un polo de la célula. A los 12 meses de edad la predominancia de ovocitos con estas características, así como y el aumento significativo del tamaño y la migración de la vesícula germinal hacia el polo animal pigmentado denota el alcance de la madurez sexual. En gónadas de larvas de machos de 7 y 8 meses de desarrollo ya es evidente el inicio del proceso espermatogénico en sentido cefalocaudal y dorsoventral del testículo, lo que marca una regionalización. En las gónadas de 9 meses, se inicia el proceso de espermiación y a los 10 meses este proceso es dominante, la región cefálica más dorsal presenta lóbulos vacíos y algunos con restos de espermatozoides. En gónadas de machos de

12 meses de desarrollo es evidente que mientras que en la región caudal y ventral ocurre la espermiación en la región más cefálica y dorsal se reinicia el proceso de espermatogénesis. Aunque la talla de los machos con respecto a las hembras al alcanzar la madurez sexual es menor, cuando esto ocurre ya presentan hiperplasia en la zona peri cloacal, lo que es un signo de madurez. Estos resultados son un reflejo del proceso de heterocronía e indican diferencias entre los dos sexos; es evidente que el temprano y acelerado proceso de gametogénesis en los machos, denota el alcance de la madurez sexual a los 9 meses de edad lo cual muy posiblemente está ligado al fenómeno de protandria. Muy posiblemente esta estrategia es un proceso adaptativo de la especie por su condición pedomórfica, causada por la incidencia del ambiente en el que se ha encontrado a lo largo de su historia de vida.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han realizado investigaciones sobre la morfología de anfibios, trabajos que han permitido caracterizar aspectos particulares de su ontogenia (esqueleto, tegumento, línea lateral, sistema digestivo, gónadas) y especialmente determinar la diversidad de los ciclos de vida de estos organismos (Quinzio et al., 2014). De acuerdo con Tribondeau et al. (2021) los anfibios presentan muy diversos ciclos de vida, los cuales se han agrupado en: 1) desarrollo directo, el cual ocurre dentro de los huevos y los jóvenes eclosionan directamente de estos, 2) bifásico, donde una larva acuática eclosiona y más tarde sufre metamorfosis seguido posteriormente de una maduración sexual y 3) una tercera estrategia más compleja, encontrada solo en urodelos en donde las larvas alcanzan la madurez sexual antes que la metamorfosis. En este caso los organismos resultantes son llamados pedomorfos, retienen caracteres anatómicos larvales (branquias, aleta de la cola, etc.) y viven en hábitats acuáticos (Tribondeau et al., 2021).

Tolosa et al. (2014) mencionan que el inicio de la madurez sexual es un parámetro crítico muy importante de la historia de vida y es muy útil para estudiar y comprender la dinámica poblacional de cualquier especie. Su conocimiento es esencial para hacer inferencias acerca de la historia evolutiva, tendencias poblacionales, estatus de conservación y con ello su importancia en determinar la aptitud de las especies (Tolosa et al., 2014).

El concepto de la madurez sexual cambia dependiendo del autor, ya sea por el momento en el que se puede reproducir un organismo, o que pueda producir gametos maduros (Zornosa, 2011). Dicha producción de gametos maduros se le llama gametogénesis y es un proceso muy importante en la actividad reproductora de las especies y ocurre de manera cíclica dependiendo de factores intrínsecos y extrínsecos (Sever, 2003).

Los embriones de anfibios han sido durante mucho tiempo un sistema experimental en biología del desarrollo, debido a la facilidad con la que se puede observar su patrón de desarrollo, las simples técnicas de cultivo necesarias para el crecimiento a lo largo de todo el ciclo de vida y la disponibilidad de un gran número de huevos contribuyen a la popularidad de este organismo en el área experimental (Malacinski y Brothers, 1974).

Los términos utilizados para referirse a los estadios posteriores a la metamorfosis en los urodelos y anuros son; postmetamórficos, metamorfoseados, jóvenes, subadultos y/o adultos. Sin embargo, no se sabe el límite entre cada una de estas etapas, por lo que se suele utilizar el tamaño del cuerpo para distinguirlas. De acuerdo con Gould (1977) siempre se encontrarán diferencias si no se establece un criterio, y distinción entre tamaño, edad y estadio del desarrollo. Del mismo modo en el desarrollo de larvas, la forma adulta madura sexualmente, puede ser alcanzada antes de que algunos procesos de crecimiento se hayan detenido, por lo que se puede decir que el tamaño alcanzado en la madurez sexual y el tamaño máximo que una especie puede alcanzar no se relacionan (Quinzio et al., 2015).

En un estudio de laboratorio (Ryan y Semlitsch, 1998) se encontró que la edad juega un papel importante en el primer evento reproductivo en *Ambystoma talpoideum*, ya que la maduración sexual ocurrió temprano en pedomorfos, mientras que esta se retrasó en metamorfos, y no se detectó variación en el crecimiento (Denöel y Joly, 2000). Asimismo estos investigadores, indican que varios autores han considerado que la pedomorfosis es una vía ontogenética alternativa que puede incrementar las aptitudes en hábitats variables y han planteado la hipótesis que la aceleración desarrollo gonádico como el objetivo de la selección natural ocurre bajo diferentes presiones ambientales. La pedomorfosis tiene la ventaja de proporcionar un período de rápido crecimiento y maduración sexual más temprana, mientras que, en los individuos metamórficos en

condiciones áridas y escasez de alimentos, la madurez sexual se retrasaría. Por lo tanto, los pedomorfos pueden madurar y reproducirse antes (Kristin, 2011).

Numerosos estudios han intentado definir las condiciones ambientales que trazan el curso ontogenético de tritones y salamandras. Se ha demostrado que la degradación de las condiciones en el hábitat acuático favorece la metamorfosis, mientras que las condiciones contrastantes favorecen la pedomorfosis (Harris, 1987; Semlitsch, 1987; Denöel y Poncin, 2001; Denöel, 2003; 2006). Sin embargo, también se ha asumido que las drásticas condiciones acuáticas favorecen la pedomorfosis cuando el costo energético de la metamorfosis no es soportable por larvas de crecimiento lento que luego optan por acelerar la maduración sexual a expensas de las transformaciones somáticas (Denöel et al., 2007).

Desde un punto de vista ecológico la pedomorfosis quita los límites relacionados con el cambio de nicho ecológico impuesto por la metamorfosis y permite más flexibilidad para elegir el hábitat, dependiendo de factores bióticos (depredadores, densidad poblacional) y abióticos (nivel del agua) (Tribondeau et al., 2020). Se sospecha que la pedomorfosis juega un papel importante en los procesos micro y macroevolutivos (Denöel y Joly, 2000).

El ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), es un anfibio acuático perteneciente al orden caudata. Es una salamandra pedomórfica microendémica del Valle Central de México y es una de las especies de anfibios de México con mayor peligro de desaparecer ya que se encuentra entre las especies que han experimentado una reducción poblacional dramática debido a la transformación de su hábitat natural (Eisthen y Krause, 2012). Se ha considerado un organismo modelo para la investigación en diversos temas, entre los que destacan los estudios de regeneración y desarrollo embrionario en general (Eisthen y Krause, 2012).

La conservación de la familia Ambystomatidae y especialmente de *A. mexicanum* es muy importante, como parte de la historia de la Ciudad de México y las áreas lagunares periféricas. La presencia de esta especie se estima que va desde el Plioceno-Pleistoceno, cerca de 3 a 12 millones de años en el pasado. Un paso importante en su conservación es la reproducción y explotación por medio de la UMA, de acuerdo con la regulación establecida en abril de 1994 (NOM-059-ECOL-2001). Además, es fundamental la creación de más programas para la erradicación de ciertas especies exóticas dentro de Xochimilco, como la carpa y tilapia. Así como la prohibición de la pesca de ajolotes en su hábitat natural. Es clave también, que las plantas de tratamiento de agua sean reparadas para que las aguas residuales no lleguen a los canales de Xochimilco y afecten en la supervivencia de esta especie y otras nativas del lugar (Soriano-López et al., 2006).

La gametogénesis es un proceso muy importante en la actividad reproductora de las especies y se inicia cuando se alcanza la madurez sexual, posteriormente ocurre de manera cíclica dependiendo de factores intrínsecos y extrínsecos (Sever, 2003). En anfibios generalmente la madurez sexual es posterior o se da a la par de la metamorfosis; pero en *A. mexicanum* por su condición pedomórfica no se tiene esta referencia y no se ha ubicado con precisión, solo se tiene el registro de algunos datos imprecisos como que ocurre de los 10 a los 15 meses de edad, incluso hasta los 18 (Humphrey 1975; Vázquez y Hunab, 2010).

Por lo que el objetivo de la presente investigación ha sido determinar el momento del alcance de la madurez sexual en *Ambystoma mexicanum*, para lo cual se hizo un análisis histológico de las gónadas de larvas desde los 4 hasta los 12 meses de edad. Los resultados indican que, por las características de las gónadas y la maduración de las células de la línea germinal a lo largo del tiempo, el alcance de la madurez sexual en esta especie es diferencial, ya que en los machos ocurre a los 9 meses de edad, antes que las hembras, en las cuales ocurre después de los

12 meses de edad. Consideramos que este conocimiento es básico y en un momento dado puede contribuir para planear programas de reproducción y conservación para esta especie.

ANTECEDENTES

Los anfibios muestran una notable diversidad de estrategias en sus ciclos de vida como resultado de su plasticidad en el desarrollo. Aunque comúnmente se encuentran en hábitats fronterizos entre el agua y la tierra, esta plasticidad les ha permitido colonizar sitios extremos (desiertos) o entornos casi sin agua (árboles); un proceso implícito en los ciclos de vida es que puede o no ocurrir la metamorfosis (Tribondeau et al., 2021).

De acuerdo con Tribondeau et al. (2021), la metamorfosis de los anfibios es el llamativo y espectacular proceso del desarrollo por el cual una larva acuática (renacuajo) se transforma en un animal terrestre (aunque algunos adultos permanecen en el hábitat acuático). Los profundos cambios anatómicos, reabsorción de características larvianas (como aleta caudal y branquias) y desarrollo de nuevas partes del cuerpo (extremidades, remodelación del esqueleto y osificación) ocurren simultáneamente con agudos efectos fisiológicos, celulares y transiciones moleculares. La mayor parte del conocimiento actual sobre el control fisiológico, celular y molecular de la metamorfosis como el modelo líder se ha establecido en anuros y en particular en especies de *Xenopus* (Tribondeau et al., 2021). El segundo modelo clave es el ajolote mexicano, *Ambystoma mexicanum*, como ejemplo de ciclo de vida alternativo y metamorfosis accesorias, aunque se sabe mucho menos a nivel molecular (Tribondeau et al., 2021).

Ciclos de vida en urodelos y el momento de metamorfosis

En los Urodelos los ciclos de vida pueden ser bastante diversos, más complejos y la metamorfosis puede no ser obligada. El caso más común es un ciclo de vida bifásico, donde las larvas eclosionan del huevo antes de sufrir una metamorfosis, este es también el ciclo de vida más común de los anuros. El segundo caso es el desarrollo directo (también encontrado en anuros), donde un joven nace directamente del huevo y la metamorfosis ocurre *in ovo*. En ambos casos, en el ciclo de vida bifásico y en el desarrollo directo, la madurez sexual ocurre después de la metamorfosis. Los urodelos muestran un ciclo de vida alternativo, donde la madurez sexual puede ocurrir antes de la metamorfosis. Los animales resultantes sexualmente maduros, llamados pedomorfos, retienen anatómicamente características larvarias (branquias, aleta caudal, etc.) y viven en hábitats acuáticos. En estas especies, la pedomorfosis puede ser obligada o facultativa, ya que algunas especies pueden sufrir metamorfosis más tarde en su vida como *Ambystoma mexicanum* y algunos nunca lo hacen como *Necturus* (Sever, 2003).

Voss y Shaffer, (1997) mencionan que la pedomorfosis en el ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) evolucionó a través de un efecto genético importante, en este caso un gen recesivo produce un fenotipo que es claramente adaptativo, esto es la falla metamórfica o pedomorfosis, lo cual altera su historia, porque los individuos permanecen en el hábitat acuático a lo largo de su ciclo de vida. Una interpretación adaptativa para la evolución de la pedomorfosis se apoya en un patrón de evolución convergente que se observa entre otros Ambystomátidos mexicanos (Voss y Shaffer, 1997). Por lo que, durante los últimos millones de años, la pedomorfosis obligada y facultativa ha evolucionado independientemente varias veces entre las diferentes especies mexicanas.

A nivel ecológico, la pedomorfosis relaja las limitaciones relacionadas con el cambio de nicho ecológico impuesto por la metamorfosis y permite una mayor flexibilidad para la elección del hábitat, dependiendo de señales bióticas (depredadores, densidad poblacional) y señales abióticas (nivel del agua). Lo que refleja la estrecha conexión entre la regulación del sistema endocrino, la transición del desarrollo y procesos adaptativos donde la pedomorfosis no es obligatoria y los animales pueden comprometerse con esta o con la metamorfosis dependiendo de varias señales internas y externas (Bruce, 2003; Tribondeau et al., 2021).

Pedomorfosis, Neotenia, Progénesis y Heterocronía

La historia de vida de un animal es la secuencia de estadios morfogenéticos desde la fertilización del huevo a la senescencia (proceso de envejecimiento) y muerte. Las salamandras muestran una mayor diversidad en las historias de vida que cualquier otro vertebrado. Muchas de ellas sufren un ciclo de vida bifásico que incluye una compleja metamorfosis de una larva acuática a un joven terrestre que finalmente madura a un adulto. Es probable que este sea el ciclo de vida ancestral; sin embargo, en numerosas especies en varios linajes independientes, la larva acuática adquiere madurez reproductora directamente sin metamorfosis, condición conocida como pedomorfosis, lo que implica un cambio en el ciclo de vida (Picasso, 2007).

Esta variación en la morfogénesis relacionada con la diversificación del ciclo de vida en salamandras puede estar bajo el encabezado de heterocronía, un término que refiere a los cambios evolutivos en el momento o tiempo de eventos ontogenéticos. Gould (1977, 2000) define la heterocronía como “cambios filéticos en el inicio o momento del desarrollo, de manera que la

aparición o velocidad de desarrollo de una característica en una ontogenia descendente es más acelerado o retrasa la aparición o tasa de desarrollo de la misma característica en un ancestro ontogenético”.

Bruce (2003) hace un análisis basado en los estudios previos de Gould (1977) y considera a la heterocronía como el resultado evolutivo adquirido por el proceso de aceleración y retraso en la velocidad de desarrollo ya sea de un organismo completo o un subconjunto particular de sus sistemas de órganos y esta aceleración y retraso afectan diferencialmente los tejidos y órganos reproductores y no reproductores. Lo que conlleva a que la pedomorfosis se alcance por dos procesos, aceleración en el desarrollo de órganos reproductores o progénesis y retraso en la velocidad de desarrollo de los órganos somáticos o neotenia.

La pedomorfosis facultativa es conocida en varias especies de *Ambystoma* en ambientes templados de Norte América, incluyendo *A. gracile*, *A. talpoideum* y *A. tigrinum* (Bruce, 2003) y se ha planteado la hipótesis que en *Ambystoma* es una adaptación a ambientes donde los estanques y lagos son permanentes, libres de peces y están rodeados de hábitats terrestres. Ryan y Semlitsch (1998) proponen que la pedomorfosis evoluciona por modificaciones del tiempo y/o tasa de eventos clave de desarrollo y en la evolución de la pedomorfosis facultativa, la edad de maduración es el objetivo principal de la selección y los cambios o la retención de la morfología larvaria son efectos secundarios. Las condiciones ideales para tal selección han incluido un confiable hábitat acuático, abundancia de recursos y bajos niveles de depredación y competencia. De lo contrario, la pedomorfosis obligatoria representa una ruta adaptativa para la exploración de hábitats acuáticos permanentes, ambientes terrestres extremos (secos, improductivos) incluyendo ambientes subterráneos, como los proteidos *Proteus anguinus* del sureste de Europa, varias especies de

ambystomátidos mexicanos y numerosos pletodóntidos hemidactyliine del este y centro de América del Norte (Ryan y Semlitsch, 1998)

La alta incidencia de pedomorfosis en ambystomátidos es vista en las especies mexicanas, donde la mayoría de estas especies son pedomórficas obligadas o facultativas. La mayoría de estas son especies que habitan en lagos de la meseta mexicana, tales como el ajolote *Ambystoma mexicanum*, y el achoque *A. dumerilii*. Algunas especies de ambystomátidos mexicanos de aguas corrientes son variables, tienen periodos larvarios prolongados y sus poblaciones pueden también incluir pedomorfosis (Anderson, 1961 mencionado en Bruce, 2003).

Ryan y Semlitsch (1998), mencionan que la pedomorfosis es adaptativa y es más probable que la selección natural actúe sobre los caracteres que son importantes para la aptitud del organismo, como la edad de la metamorfosis y la edad de maduración. Plantean la hipótesis de que, las salamandras que renuncian a la metamorfosis pueden tener más energía disponible para el crecimiento y (o) el desarrollo sexual. Los individuos que pasan por alto la metamorfosis deben alcanzar la maduración antes que las salamandras metamórficas, la energía y los recursos disponibles pueden ser canalizados al rápido desarrollo de gónadas y gametos en lugar de extenso reordenamiento morfológico o alcanzan la maduración al mismo tiempo que los metamorfos pero a un tamaño corporal más grande. Por lo que esperan que, si los pedomorfos y los metamorfos maduran con el mismo tamaño corporal, los pedomorfos deben madurar a una edad más temprana. Alternativamente, si los dos morfos adultos maduran en el mismo tiempo, se puede predecir que los individuos pedomórficos tienen un mayor tamaño corporal en relación con individuos metamórficos, con la energía y los recursos requeridos para la metamorfosis habiendo sido comprometidos en el crecimiento en pedomorfos.

Este aporte holístico de Ryan y Semlitsch (1998) que integra la heterocronía, las teorías de historia de vida, así como como la ecología de los organismos bajo estudio lleva a identificar la edad de maduración, el componente principal de la aptitud a nivel individual y poblacional, como el objetivo más probable de la selección, con retención de la morfología larval como un efecto secundario.

Madurez sexual – gametogénesis - reproducción

Se entiende por un anfibio maduro sexualmente cuando es capaz de reproducirse; en este caso, los machos tendrían que ser capaces de fertilizar los huevos de las hembras y las hembras poder producirlos (Zornosa, 2011). El estado de la madurez sexual puede ser evaluado de diversos modos, con características tanto internas como externas dependiendo del grupo de estudio. Los estados de madurez que se trabajan en este grupo son inmaduros y maduros. En el caso de las hembras se evidencia por la condición gonadal, el tamaño y coloración de los huevos y presencia de huevos vitelogénicos, anatómicamente ciertas características como el aumento del volumen abdominal. En machos las características externas que reflejan madurez sexual pueden identificarse por medio de la anatomía externa de la especie, ya que en el momento en que alcanzan este estado se evidencian estructuras secundarias que marcan el dimorfismo sexual, como en algunos anuros el prepólex y el saco vocal, la corpulencia, la condición muscular, la hipertrofia de la región cloacal en el caso de urodelos (Zornosa, 2011). El dimorfismo sexual se expresa por medio del tamaño corporal en aproximadamente el 90% de las especies de anuros, donde se reconocen las hembras con un mayor LHC (longitud hocico-cloaca) con respecto a los machos (Gramapurohit et al., 2004 en Zornosa, 2011). Tolosa et al. (2014) mencionan que el dimorfismo

sexual es el resultado de presiones selectivas divergentes entre los sexos que promueven diferencias morfológicas y de comportamiento. La edad y el tamaño en la madurez sexual son componentes críticos de los estudios de historia de vida debido a su importancia en determinar la aptitud.

Bruce (2003) menciona que muchos autores no han distinguido entre edad de maduración y edad de la primera reproducción. Dado que la espermatogénesis y vitelogénesis se inician meses antes de la transferencia de esperma, fertilización u ovoposición, la falta de claridad entre estos parámetros puede conducir a inconsistencias y comparaciones engañosas. Duelman y Trueb, (1986) hacen un análisis de la variación en la edad a la primera reproducción en varias especies de salamandras e indican dos posibilidades una es que los machos y hembras alcanzan la madurez a la misma edad, y la otra es que las hembras son de mayor edad que los machos en su primera reproducción.

Las viejas y nuevas metodologías de estudio han demostrado una gran variación geográfica y altitudinal en la edad y tamaño a la primera reproducción entre las especies y dentro de muchas especies de salamandras, a pesar del modo de historia de vida. La variación intraespecífica está correlacionada con la latitud y altitud y representa efectos ambientales directos en el crecimiento y desarrollo o una respuesta adaptativa para el gradiente ambiental (Bruce, 2003).

Zornosa (2011) discute que la diferencia de tamaños corporales entre hembras y machos se atribuye a que durante el tiempo requerido para alcanzar la madurez sexual las hembras aumentan su tasa de crecimiento ya que posteriormente asignan la mayor parte de los recursos consumidos para la reproducción debido a que la producción de ovocitos implica mayor energía que la producción de espermatozoides. Además el tamaño corporal es de gran importancia durante la época reproductora ya que se ha comprobado que machos de mayor tamaño tienen mayor éxito

reproductor y hembras de gran tamaño producen huevos más grandes o tienen puestas mayores, además tienen mayor probabilidad de tener más de una puesta durante la época reproductora, lo que permite estimar la fecundidad y el tamaño corporal, para el caso de los machos, permite estimar su éxito reproductor, lo que contribuye con el conocimiento de la historia de vida de la especie.

La madurez sexual marca el inicio de la actividad reproductora. Durante esta fase ocurre la gametogénesis y el aumento de las concentraciones de hormonas gonadales circulantes. Diversos factores externos como el manejo, nutrición, sanidad y características climáticas influyen de forma marcada en la edad de aparición de estas hormonas (López et al., 2016).

Los ovarios de los anfibios adultos son alargados y de forma irregular, se encuentran en la cavidad abdominal y están compuestos por uno o varios lóbulos. Normalmente, ambos ovarios tienen el mismo número de lóbulos (Tyler, 2003). El tamaño de los ovarios cambia estacionalmente según las etapas secuenciales de la ovogénesis. Durante el crecimiento primario (previtelogénesis) y el crecimiento secundario (vitelogénesis), los ovarios aumentan de tamaño progresivamente, alcanzando su volumen máximo durante la época de reproducción (Uribe, 2009). En este momento, los ovarios contienen numerosos ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos (Uribe, 2011). La ovogénesis en los anfibios, como en todos los demás animales, es un proceso complejo de cambios celulares y moleculares que ocurren durante la formación, crecimiento y maduración de los gametos. En cada ciclo reproductor, numerosas ovogonias se dividen mitóticamente inician el proceso meiótico y pasan a ser ovocitos. Después de la estimulación por hormonas gonadotrópicas, estos ovocitos emprenden un crecimiento primario y secundario dando lugar a ovocitos maduros que experimentan una maduración final y son ovulados durante la temporada de reproducción (Uribe, 2011).

El desarrollo de los espermatozoides en los urodelos procede de manera similar al resto de los vertebrados, la espermatogénesis (formación de los gametos masculinos) ocurre en los testículos y es mantenida por una población de células madre, las espermatogonias, que permiten un suministro constante de abundantes gametos masculinos (Uribe, 2009). Las espermatogonias se dividen por mitosis para producir generaciones de espermatogonias que entran en el ciclo espermatogénico y se convierten en espermatoцитos que experimentan meiosis a través de espermatoцитos primarios y secundarios para producir células haploides, las espermátidas. Las espermátidas se diferencian en espermatozoides maduros a través de cambios morfológicos y funcionales durante la espermiogénesis, lo que da como resultado los espermatozoides maduros (Uribe y Mejía-Roa, 2014).

La gametogénesis es un proceso muy importante en la actividad reproductora de las especies y una vez que se inicia ocurre de manera cíclica dependiendo de factores intrínsecos y extrínsecos (Sever, 2003).

Ambystoma

El género *Ambystoma* se distribuye desde el sur de Canadá y Alaska hasta el Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (Huacuz-Elías, 2003). Está constituido por 33 especies descritas, de las cuales hay 17 especies distribuidas en el noreste y centro de México; de éstas, 16 son endémicas, lo que representa más del 85% del total de especies del género *Ambystoma* que habitan en nuestro país. De las 16 especies endémicas, 15 se encuentran dentro del listado de la NOM-059-Semarnat-2010 en alguna categoría de riesgo; 3 están clasificadas como amenazadas y los 12 restantes están sujetas a protección especial. De las 16 especies endémicas, 4 son neoténicas: *A. mexicanum*, *A. andersoni*, *A. dumerilii* y *A. taylori* (SEMARNAT, 2018).

Ambystoma mexicanum, conocida como el ajolote de Xochimilco es una salamandra endémica de México perteneciente a la familia Ambystomatidae, se distingue de otros anfibios por su condición de pedomorfosis; esto es, tener la capacidad de conservar caracteres larvarios aun en su estado adulto y durante todo su ciclo de vida, por lo que permanece en el medio acuático.

La especie ha sido estudiada desde un punto de vista anatómico, fisiológico, evolutivo y ontogénico (Vázquez y Hunab, 2010). Los estudios comúnmente realizados en *A. mexicanum* se han basado en la capacidad para regenerar estructuras corporales como las extremidades y la cola, así como el sistema nervioso central y los tejidos del ojo y el corazón. Otras áreas de investigación que se han abordado son las relacionadas con la biología del desarrollo y el desarrollo embrionario, ya que los ovocitos son fáciles de obtener, las altas cantidades de embriones producidos por cada desove, el gran tamaño del embrión y la capacidad de injertar tejidos de individuo a individuo en cualquier etapa sin rechazo. Por estas razones se han desarrollado las herramientas genéticas, genómicas y de transgénesis más completas (Voss et al., 2009). También se ha observado que la crianza de esta especie es exitosa en condiciones artificiales en el laboratorio (Voss et al., 2009). Algunas investigaciones sobre esta especie incluyen la forma en que las hormonas influyen en la diferenciación sexual (Chardard et al., 1995), la reversión sexual relacionada con la temperatura (Chardard et al., 2004; Flament et al., 2011), el efecto de los andrógenos y la aromatasa P450 en la diferenciación sexual (Kuntz et al., 2003), así como estudios de la morfogénesis gonadal y expresión génica en la diferenciación gonadal (Mendoza-Cruz et al., 2017, 2021). Los avances recientes en herramientas tecnológicas y genómicas que se pueden aplicar a los sistemas de salamandras han permitido a los investigadores abordar modelos en biología del desarrollo, evolución y regeneración en estos organismos. La investigación más reciente en estos aspectos y de manera muy especial en *Ambystoma mexicanum*, se puede ver en McCusker et al. (2021).

En cuanto a su reproducción *A. mexicanum* se ha registrado que ocurre predominantemente en los meses invernales (Vázquez y Hunab, 2010), aunque se ha registrado que se pueden reproducir varias veces al año y generar más descendencia por evento reproductor (Voss, et al., 2015). Presentan fertilización interna y la ovoposición de huevos es en agua de manera estacional (anual o bianual). El dimorfismo sexual es sutil, ya que en machos adultos se observa un ensanchamiento de los labios de la cloaca, mientras que en las hembras adultas el cuerpo es más robusto por el incremento en el tamaño de los ovarios y los oviductos o, por la presencia de huevecillos (Aguilar-Miguel et al., 2009). En condiciones de laboratorio, se ha visto que algunas hembras alcanzan la madurez sexual entre los 12 y 18 meses de edad, algunos meses después que los machos, y su etapa reproductiva óptima tiene una duración de cinco a seis años (Humphrey, 1975; Loredó y van Vuren, 1996; Aguilar-Miguel et al., 2009; Vázquez y Hunab, 2010). El apareamiento se realiza después de un breve comportamiento de cortejo, en el que, al principio, juntan la región de las cloacas, el macho agita vigorosamente la cola liberando una masa gelatinosa con una cubierta de esperma en forma de cono, llamada espermatóforo; la hembra se desliza sobre el espermatóforo recogiendo con la cloaca. Aproximadamente 24 horas después de la fecundación, la hembra libera entre 600 y 1,500 huevos fecundados, los cuales deposita paulatinamente, tardando a veces, hasta tres días (CONABIO, 2011).

Condición del Ambiente, ecología y conservación en *Ambystoma mexicanum*

En los últimos años, las poblaciones y especies de anfibios han sufrido una drástica disminución causada directa e indirectamente por las actividades humanas (Beebee y Griffiths, 2005; Pounds, 2001). Los anfibios son particularmente sensibles a los impactos ambientales negativos (contaminación y eutrofización de los cuerpos de agua), por lo que es probable que la

alteración del hábitat sea una de las principales causas directas de su declive (Collins y Storfer, 2003). El cambio climático también ha sido identificado como una amenaza para las poblaciones de anfibios en las últimas décadas (Blaustein y Kiesecker, 2002; Pounds et al., 2006). Se ha señalado, que la desecación de lagunas y lagos del Valle de México, Toluca y Michoacán, el uso indebido de los cuerpos de agua en actividades humanas, así como la introducción de depredadores exóticos y la captura para su comercio ilegal, juegan un papel importante en la disminución de esta especie (Casas-Andreu et al., 2003). Debido a su tamaño poblacional reducido, *A. mexicanum* se encuentra en la Lista Roja de la UICN categorizada como en peligro crítico y está declarada bajo protección especial por la ley mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2001). Por lo que es sumamente urgente identificar aquellas áreas en donde aún existen poblaciones de ajolote para llevar a cabo acciones de conservación y restauración *in situ* (Contreras et al., 2009).

Voss et al. (2015) hacen un análisis del declive de los ajolotes en Xochimilco y mencionan que, en la década de 1990, los monitoreos de ajolotes y parámetros ecológicos registraron un colapso en la densidad la cual disminuyó de 6000 por kilómetro cuadrado en 1998 a 100 en 2008 y sus análisis en 2015 mostraron menos de 35 ajolotes por kilómetro cuadrado. En un análisis de viabilidad de la población del ajolote de Xochimilco se predijo que la posibilidad de extinción sería en 2017 (Zambrano et al., 2007). Asimismo, se ha mencionado que la mala calidad del agua, su disminución, la introducción de peces depredadores de larvas del ajolote y la constante urbanización que agotan los humedales se relacionan con la reducción de ajolotes (Marin, 2007; Zambrano et al., 2010). Todo esto hace evidente como lo mencionan Voss et al. (2015) que el reloj de extinción para *A. mexicanum* continúa avanzando.

El fenómeno de extinción de especies en anfibios indica que estamos enfrentando la crisis de extinción más grande de especies observada por la humanidad. La comunidad científica ha

planteado como respuesta a esta crisis una estrategia de conservación, que consiste en la reproducción *ex situ*, debido a que muchas especies tienen la amenaza de extinción en su propio medio (Gascon et al., 2007; Pavajeau et al., 2008).

La mala calidad del agua es un factor que ha generado enfermedades en la especie. Algunas cantidades de contaminantes químicos en el agua son extremadamente altas y contribuyen a la alta tasa de mortalidad de esta especie en ciertas áreas de Xochimilco. Se han encontrado estos contaminantes tanto orgánicos como no orgánicos en los canales, particularmente altas concentraciones de nitrógeno amoniacal son una de las causas de mortalidad. Además, las variables inorgánicas son mucho más altas que la norma NOM-127-SSAI-1994 que estipula que una calidad aceptable del agua debe contener: cloro libre residual, nitratos y trihalometano total. Estos contaminantes, junto con los metales pesados, también pueden estar ejerciendo presión sobre el nivel de población de los ajolotes (Soriano-López et al., 2006).

Las especies de peces presentes en Xochimilco son solo una muestra del desequilibrio del sistema. Muchos de los peces presentes son introducidos a los canales, por ejemplo, cuatro de las especies nativas de la familia *Cyprinidae* están extintas mientras que otras tres fueron introducidas, dejando solo una especie nativa de esta familia en el lago. *Cyprinus carpio*, es una de las especies introducidas al lago, esta especie hizo cambios importantes en la cadena alimentaria cuando se introdujo en la Ciudad de México, indirectamente la carpa también podría estar reduciendo la eclosión por parte de los ajolotes al provocar disminución de plantas que son fundamentales para la reproducción y conservación de la especie (Soriano-López et al., 2006).

De acuerdo con Aguilar-Miguel et al. (2009), consideramos que las especies prioritarias con las que trabajar esta estrategia de conservación con reproducción *ex situ*, deberían de ser las especies endémicas, siendo prioritario conocer los aspectos básicos para su reproducción.

Aunque *A. mexicanum* se ha criado y mantenido en condiciones de laboratorio durante varios años, sorprendentemente, el dato preciso del alcance de la madurez sexual aún no se ha registrado. Por lo que consideramos que, con el estudio histológico de las gónadas a través del tiempo, es posible determinar con precisión la edad del alcance de la madurez sexual bajo su condición pedomórfica.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de los diferentes procesos que conlleva el alcance de la madurez sexual y de manera muy especial la gametogénesis en las gónadas resulta ser básico e importante, pero el momento en el que se alcanza especialmente en un organismo que siempre presenta una apariencia larval o que no muestra características de adulto no ha sido determinado. Este es el caso de *Ambystoma mexicanum*.

Es bien sabido que en el ajolote *A. mexicanum* los individuos crecen y alcanzan la madurez sexual sin sufrir metamorfosis. Sin embargo, no se ha determinado, el momento preciso o la duración del tiempo necesario para lograr esta condición. Por lo que consideramos importante que abordar este aspecto desde el punto de vista de los cambios estructurales de la gónada a través del tiempo, enfocándonos básicamente al inicio de la gametogénesis, nos puede proporcionar la información precisa sobre la edad, el tamaño al alcance de la madurez sexual bajo su condición pedomórfica. Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el alcance de la madurez sexual en el urodelo *Ambystoma mexicanum*

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Analizar los cambios gonadales a través del tiempo e identificar el inicio de la gametogénesis hasta la observación de gametos maduros en machos

2) Analizar los cambios gonadales a través del tiempo e identificar el inicio de la gametogénesis hasta la observación de gametos maduros en hembras

MATERIAL Y METODOS

Obtención de organismos

Los ejemplares de *Ambystoma mexicanum* utilizados en esta investigación (8 hembras de 6, 8, 9, 10 y 12 meses de edad) y (5 machos de 8, 9, 10 y 12 meses de edad), fueron donados por el Dr. Luis Zambrano, Coordinador del Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología de la UNAM, y por el Acuario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Así mismo se utilizó material histológico ya procesado, el cual constó de preparaciones histológicas de cortes sagitales de ovario de tres larvas de 4 meses de desarrollo y de 8 y 9 meses de desarrollo (un ejemplar de cada uno); además de cortes sagitales de testículos de larvas de 7 y 8 meses de desarrollo (un ejemplar de cada uno de ellos), lo que hizo un total de 20 ejemplares.

Condiciones generales de mantenimiento

Los organismos del acuario de la Facultad de Ciencias se mantuvieron a una temperatura de $16 \pm 2^\circ\text{C}$ y fueron alimentados con *Artemia franciscana*, *Culex stigmatosoma* (mosquitos) y *Tubifex tubifex*. En cuanto a los organismos del Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología, se mantuvieron a $17 \pm 2^\circ\text{C}$ y se les alimentó con artemia en estadios juveniles.

Trabajo de laboratorio

Obtención de medidas somáticas y tejido gonadal

Tomando como base observaciones previas realizadas en el Laboratorio de Biología Tisular y Reproductora, solicitamos las donaciones de los ejemplares mensualmente (larvas de *A. mexicanum* posteriores a tres meses de desarrollo). Una vez obtenidos los ejemplares se procedió a tomar sus medias somáticas, peso en gramos (g), y longitud total LT en milímetros (mm). Posteriormente cada ejemplar fue sacrificado siguiendo las normas de la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Se realizó la disección y extracción de gónadas y se tomó la longitud en mm y el peso en g de cada una de ellas. Enseguida se procedió a fijarlas en una solución de Bouin por 12 horas y después de este tiempo las muestras se lavaron y fijaron en formol al 10% neutro para posteriormente realizar el procesamiento histológico de rutina para su observación al microscopio óptico. Para determinar la proporción del peso de las gónadas con relación al peso del cuerpo a lo largo del tiempo de cada uno de los ejemplares se determinó el Índice Gónado Somático (IGS), dividiendo el peso gonadal entre el

peso corporal y multiplicando por 100. Este índice utiliza para medir la madurez sexual de los animales en correlación con el desarrollo de los ovarios y los testículos (Pereira dos Santos et al., 2020).

Procesamiento histológico

Para iniciar la técnica histológica las gónadas conservadas en formol se lavaron con agua corriente por 30 minutos, se deshidrataron por 30 minutos en alcoholes graduales en serie desde 30% hasta el alcohol absoluto, los tejidos se aclararon con xilol en dos cambios por 30 minutos, el primero en una solución de alcohol absoluto-xilol y el segundo en xilol. Después de este tiempo se prosiguió a incluir el tejido en paraplast, con tres cambios de 30 minutos cada uno; el primero en xilol-paraplast, los dos siguientes solo en paraplast y finalmente se incluyó con paraplast. En un micrótopo de rotación se realizaron cortes seriados de 3 a 5 μm en sentido sagital y se colocaron en el portaobjetos 10 cortes, siendo un total de 15 portaobjetos o laminillas con 10 cortes histológicos por muestra. Se realizó una selección alternada de las laminillas para aplicar las técnicas de tinción con Hematoxilina - Eosina, para un examen histológico general, Azul Alciano - Rojo Nuclear (AARN), para detectar mucopolizacaridos ácidos contrastados con el colorante rojo nuclear y Tricrómica de Masson para demostración de tejido muscular y colágena (Estrada et al., 1982).

Interpretación y caracterización de las gónadas

Las características del desarrollo gonadal, la interpretación y categorización de los elementos gonadales y células de la línea germinal fueron realizadas de acuerdo con Uribe (2011) y Uribe y Mejía-Roa (2014) para ovario y testículo respectivamente. Se tomaron microfotografías con una cámara LANOPTIK MC500-W3 adaptada a un microscopio óptico Olympus BX43 y las láminas fueron editadas en Adobe Photoshop CC para su descripción.

RESULTADOS

Los resultados de los parámetros somáticos considerados (longitud y peso corporal, longitud y peso gonadal, así como el Índice Gónado Somático - IGS) en hembras y machos de *A. mexicanum* se resumen en las Tablas 1, 2 y 3 respectivamente. En donde podemos ver que los valores de estos parámetros se incrementan con el tiempo y esto está estrechamente relacionado con cambios en la condición gonadal, especialmente en las células de la línea germinal y el proceso de gametogénesis como un indicativo de la actividad gonadal – lo que marca el inicio de la madurez sexual, ya que analizamos larvas jóvenes desde los 4 y 7 hasta los 12 meses de desarrollo respectivamente para hembras y machos.

El reducido tamaño de los ovarios de larvas de 4 meses de desarrollo y la presencia de ovocitos en estadios muy tempranos (1 y 2) limitados aun de la cavidad ovárica por un epitelio escamoso denotan su grado de inmadurez. En las hembras a los 6 y 8 meses de desarrollo el evento gonadal más sobresaliente es el incremento de tamaño y crecimiento primario; esto es, los ovocitos en etapa de desarrollo 3 se incrementan en número y tamaño, pero es hasta los 9 y 10 meses cuando la longitud total es de 17.5mm y 49.5g de peso, cuando se inicia el crecimiento secundario, ya que es evidente el inicio de la vitelogénesis en ovocitos en estadio de desarrollo 4 y es hasta los 12 meses con una longitud total de 19mm y 50.1g de peso, cuando ya es posible observar ovocitos en estadio de desarrollo 6 con características de maduración (Tabla 1).

El IGS como un indicativo de la variación del peso gonadal en relación con el peso corporal de cada individuo, en el caso de los ejemplares analizados de ser muy bajo en larvas con gónadas

inmaduras a los 4, 6 y 8 meses de desarrollo, incrementa su valor cuando se inicia la vitelogénesis en los ovocitos y alcanza valores muy altos cuando ya se observan ovocitos en estadios avanzados de vitelogénesis a los 12 meses de desarrollo (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Datos somatométricos y de las gónadas de los ejemplares de *Ambystoma mexicanum* utilizados en este estudio.

edad	Sexo	Longitud total (cm)	Longitud Hocico cloaca (cm)	Peso Total (g)	Peso gónada Izq (g)	Peso gónada Der (g)	IGS	Longitud gónada Izq (cm)	Longitud gónada Der (cm)
6	♀	12	6.5	16.65	0.023	0.025	0.28	1.4	1.6
6	♀	16	8.5	32.3	0.046	0.040	0.26	2.2	1.9
8	♀	14.5		26.3	0.035	0.038	0.27	1.5	1.5
8	♀	13.5		22.26	0.030	0.035	0.29	1.5	1.3
8	♂	16	11	58.72	0.13	0.15	0.48	2.3	2.6
9	♀	22		38.2					
9	♂	18		40.1					
10	♀	17.5	10.3	49.5	0.26	0.29	1.11	2.5	3
10	♂	18	10.5	36.83	0.23	0.26	1.24	1.4	1.5
12	♀	19		50.1	0.68	0.54	2.43	4.5	3.7
12	♂	19		48.8	0.29	0.18	0.96	1.9	1.8
12	♀	19.5		70.42	0.84	0.82	2.35	3.8	4
12	♂	20.5		62.14	0.65	0.67	2.12	2.8	3

Tabla 2. Edad de los ejemplares hembra de *Ambystoma mexicanum* y su relación con los eventos en las gónadas, índice de la actividad gonadal y del inicio de la madurez sexual.

Edad	L/peso	IGS	Actividad Gonadal - Eventos Células de la línea germinal
4			Crecimiento primario, ovocitos en estadio de desarrollo 1 y 2 aun limitados de la cavidad ovárica por un epitelio plano
6	12/16.65	0.28	Crecimiento primario, ovocitos predominantes en estadio de desarrollo 3
8	14.5/26.3	0.27	Crecimiento primario, ovocitos predominantes en estadio de desarrollo 3
9	22/38.2		Inicia crecimiento secundario – vitelogénesis, Ovocitos predominantes en estadios de desarrollo 3, 4 y 5
10	17.5/49.5	1.11	Inicia crecimiento secundario – vitelogénesis, Ovocitos predominantes en estadios de desarrollo E 3 y 4
12	19.5/50.1	2.43	Avance del crecimiento secundario – vitelogénesis, Ovocitos predominantes en estadio 6 con vesícula germinal aun en el centro del citoplasma del ovocito y pigmentación cortical en el polo animal
12	19.5/70.42	2.35	Avance crecimiento secundario – vitelogénesis, Ovocitos predominantes en estadio 6 con vesícula germinal migrada hacia el polo animal del ovocito y pigmentación cortical en el polo animal

En el caso de los machos a los 7 - 8 meses de desarrollo, cuando presentan una longitud total de 14.5mm y 26.3 g de peso, la gónada ya muestra evidencias del inicio del proceso de espermatogénesis y del avance en la espermiogénesis, pero es hasta los 9 - 10 meses de desarrollo con una longitud total de 18 mm y 36.83 g de peso, cuando se inicia el proceso de espermiación y a los 12 meses cuando su longitud es de 19mm y su peso de 48.8g ya se observa un avance en el segundo ciclo de espermatogénesis (Tablas 1 y 3).

Tabla 3. Edad de los ejemplares machos de *Ambystoma mexicanum* y su relación con los eventos en las gónadas, índice de la actividad gonadal y de inicio de la madurez sexual.

Edad	L/P	IGS	Actividad Gonadal - Eventos Células de la línea germinal
7	14.5/26.3		Inicio del proceso de espermatogénesis, Eg1, Eg2, E1, E2
8	14.5/26.3	0.48	Avance en la espermatogénesis – Eg2, E1, E2, e
9	18/40.1		Avance en la espermiogénesis – Eg1, Eg2, E1, E2, e, ee, Z, inicio de espermiación
10	18/36.83	1.24	Avance en la espermiación e inicio de la formación del tejido intersticial
12	19/48.8	0.96	Fin de la espermiación y tejido intersticial e inicio de nuevo ciclo espermatogénico en la región cefálica y dorsal de la gónada
12	20.5/62.14	2.12	Avance del nuevo ciclo espermiogénico, espermiogénesis e, ee, Z e inicio de espermiación

En el caso de los machos los valores del IGS registrados desde los 7 meses se incrementan hasta alcanzar valores tan altos como en el caso del índice IGS de las hembras a los 12 meses de desarrollo (Tabla 3). La gran diferencia en el caso de las gónadas masculinas es que, aunque sus valores del IGS sean bajos el proceso de gametogénesis ya se ha iniciado desde los 7 meses de desarrollo. Es evidente que los machos inician y alcanzan la madurez sexual con tallas menores a las de las hembras (14.5mm y 18mm vs 17.5mm y 19.5mm respectivamente).

Gónadas de hembras de *A. mexicanum*

Ovario de larvas de 4 meses de edad

El análisis de las preparaciones histológicas de cortes transversales de ovario de larvas de cuatro meses de desarrollo, muestran la ubicación de las gónadas en la región media posterior del cuerpo a ambos lados del mesenterio que sostiene al tubo digestivo y en estrecha relación con el mesonefros (Fig. 1A). Los ovarios son de forma sacular con una luz central claramente definida y limitada aun por células somáticas epiteliales planas y en algunos sitios cúbicas (Fig. 1B - D). La pared ovárica consiste en un epitelio limitante de células cúbicas o aplanadas (Fig. 1D, F); unidas a esta pared en toda su periferia hacia el interior se pueden observar los ovocitos en estadio 1 y 2 y en algunos sitios relacionados con las ovogonias en los nidos (Fig. 1B, C). Las ovogonias son de citoplasma claro, tienen un diámetro promedio de $14 \pm 3.84 \mu\text{m}$, pueden estar dispersas entre el epitelio o en grupos en estrecho contacto unas con otras (nidos de ovogonias), son de forma esférica u ovalada con núcleo ovalado y un solo nucléolo evidente (Fig. 1C, D, F). Los ovocitos en estadio 1 son de citoplasma hialino, tienen un diámetro promedio de $37 \pm \mu\text{m}$, presentan núcleo esférico central con un nucléolo y los cromosomas (como finas fibras) se observan en alguna etapa de la profase temprana (leptóteno, zigóteno, paquíteno), indicando con esto que ya se ha iniciado la meiosis (Fig. 1C, D, F). Así mismo es evidente el inicio del proceso de foliculogénesis, ya que algunas células somáticas pre-foliculares se ponen en contacto con estos ovocitos y los empiezan a rodear. Los ovocitos en estadio 2 son más grandes tienen un diámetro promedio de $99 \pm 24.45 \mu\text{m}$, el núcleo (vesícula germinal) es esférico y central y pueden estar presentes uno o más nucléolos y son evidentes los cromosomas plumosos en diplóteno, los ovocitos en esta etapa ya se encuentran completamente rodeados de una capa continua de células foliculares escamosas formando el folículo primario (Fig. 1E, F).

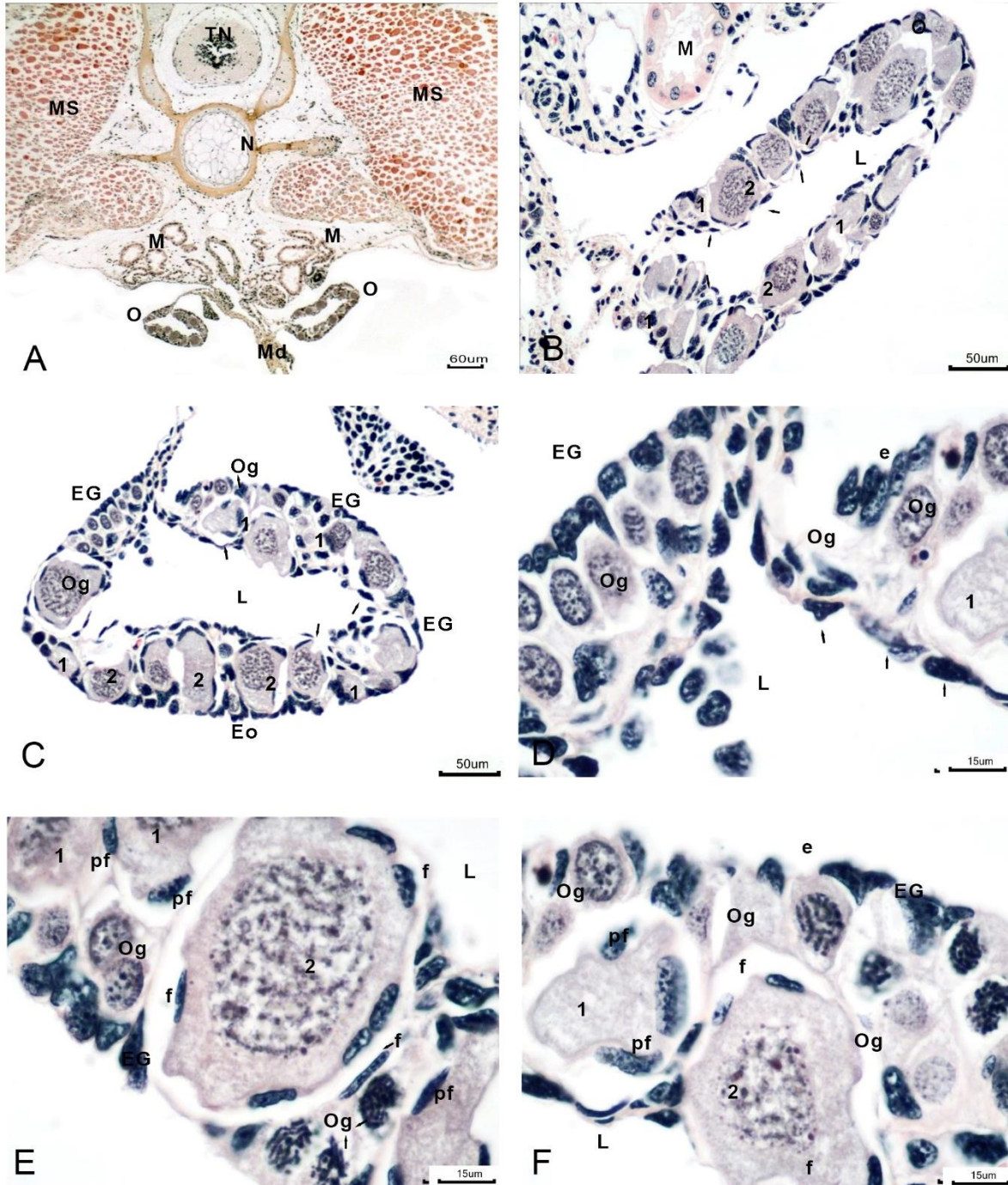


Fig. 1 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 4 meses de desarrollo. A Ubicación de los ovarios (O) a ambos lados del mesenterio dorsal (Md) y cercanos al riñón mesonéfrico (M), se puede ver la notocorda (N), el tubo neural (TN) y a ambos lados de estos el mesodermo somítico (MS). B y C Ovarios izquierdo y derecho respectivamente con ovocitos en estadios de desarrollo 1 y 2 unidos a la pared, note la luz central (L) del ovario limitada por un epitelio plano (flechas) y en el extremo izquierdo el epitelio germinal (EG). D Acercamiento de un extremo de la imagen anterior en donde se puede ver el epitelio germinal (EG) en donde se encuentra un nido de ovogonias (Og) y en el otro extremo algunas ovogonias limitadas por el epitelio del ovario (e), así como un ovocito en estadio de desarrollo 1, con una célula prefolicular muy cercana (cabeza de flecha), estas estructuras se encuentran limitadas hacia la luz del ovario por el epitelio escamoso (flechas). E y F ovocitos es estadio de desarrollo 1 y 2 con células prefoliculares (pf) en contacto con estos y en estrecha relación con el epitelio germinal (EG) en donde son evidentes las ovogonias (Og). Tinción con Hematoxilina – Eosina.

Ovario de larvas de 6 meses de edad

Los ovarios de larvas de 6 meses de desarrollo son más grandes de forma alargada y es posible observar los lóbulos que los constituyen (Fig. 2A), es evidente que ya no presentan el epitelio limitante de la cavidad o lumen ovárico y los ovocitos penden de la pared del ovario hacia la cavidad de este (Fig. 2B). Los ovocitos en estadio de desarrollo 3 han aumentado en número y en tamaño, siendo los predominantes. En estos se observan los cromosomas condensados en la vesícula germinal, y la capa de células foliculares escamosas que los rodean (Fig. 2C - E). En algunos sitios, en la periferia del ovario en el epitelio germinal se pueden observar también ovogonias en nidos (Fig. 2E, F).

Ovario de larvas de 8 meses de edad

A partir de los ocho meses de edad contamos con ejemplares vivos los cuales fueron sacrificados en el mes de agosto del 2021. Este mes obtuvimos dos hembras las cuales presentaron las siguientes medias somáticas de peso y talla 26.3 g y 14.5 cm y 22.2 g y 13.5 cm respectivamente (Tabla1). Las gónadas están ubicadas en la región media del cuerpo hacia la región posterior, están unidas a la pared dorsal por un mesenterio denominado mesovario, en general son alargadas, pero pueden presentar pliegues los que denotan el inicio o la marca de los futuros lóbulos, su pared es transparente y es posible ver los pequeños ovocitos dentro (Fig. 3A y B). Sus medidas de peso y longitud fueron 0.35 g y 1.5 cm y 0.38 g y 0.38 y 1.5 cm gónadas derecha e izquierda respectivamente de una de las hembras y de la segunda hembra fueron 0.35 g y 1.3 cm y 0.31 y 1.5 cm derecha e izquierda respectivamente (Tabla 1).

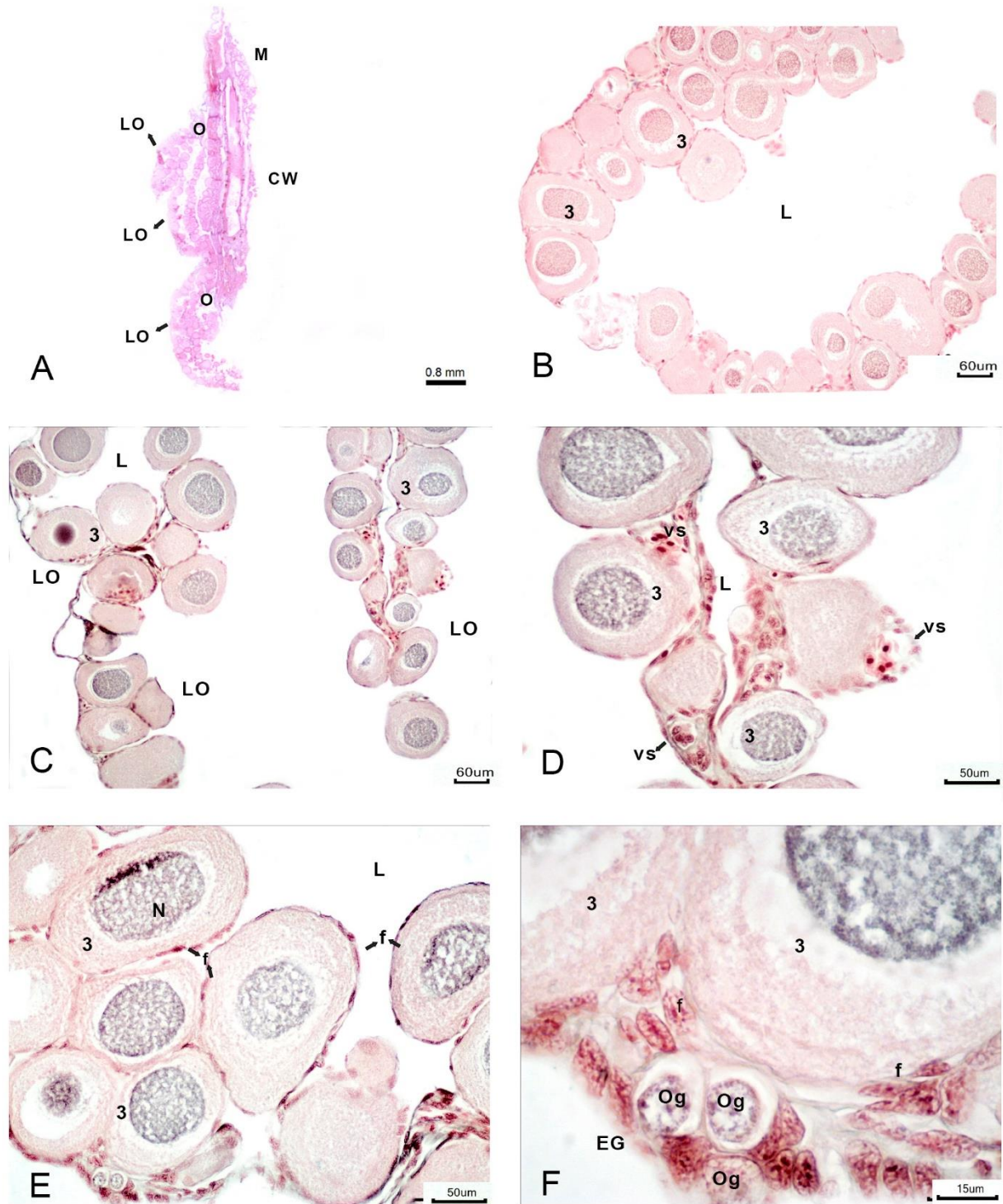


Fig. 2 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 6 meses de desarrollo. A. Imagen panorámica del ovario (O) y sus lóbulos (LO) adyacente al riñón mesonéfrico (M) y al conducto de Wolff (CW). B. Ovocitos en estadio de desarrollo 3 en la periferia del ovario y el lumen del mismo hacia el centro (L). C. Lóbulos ováricos (LO) con ovocitos en estadio de desarrollo 3. D. Detalle de un extremo del lóbulo ovárico, note los vasos sanguíneos de la pared ovárica (vs). E. Epitelio germinal (EG) en la pared del ovario y ovocitos en estadio 3 con núcleo central (N), citoplasma homogéneo y células foliculares planas que los rodean (f). F. Acercamiento del epitelio germinal (EG) donde se pueden ver tres ovogonias (Og) y dos ovocitos contiguos en estadio 3 y sus células foliculares rodeandolas. A. Tinción con Azul Alciano - Rojo Nuclear. B – F. Tinción con Hematoxilina - Eosina.

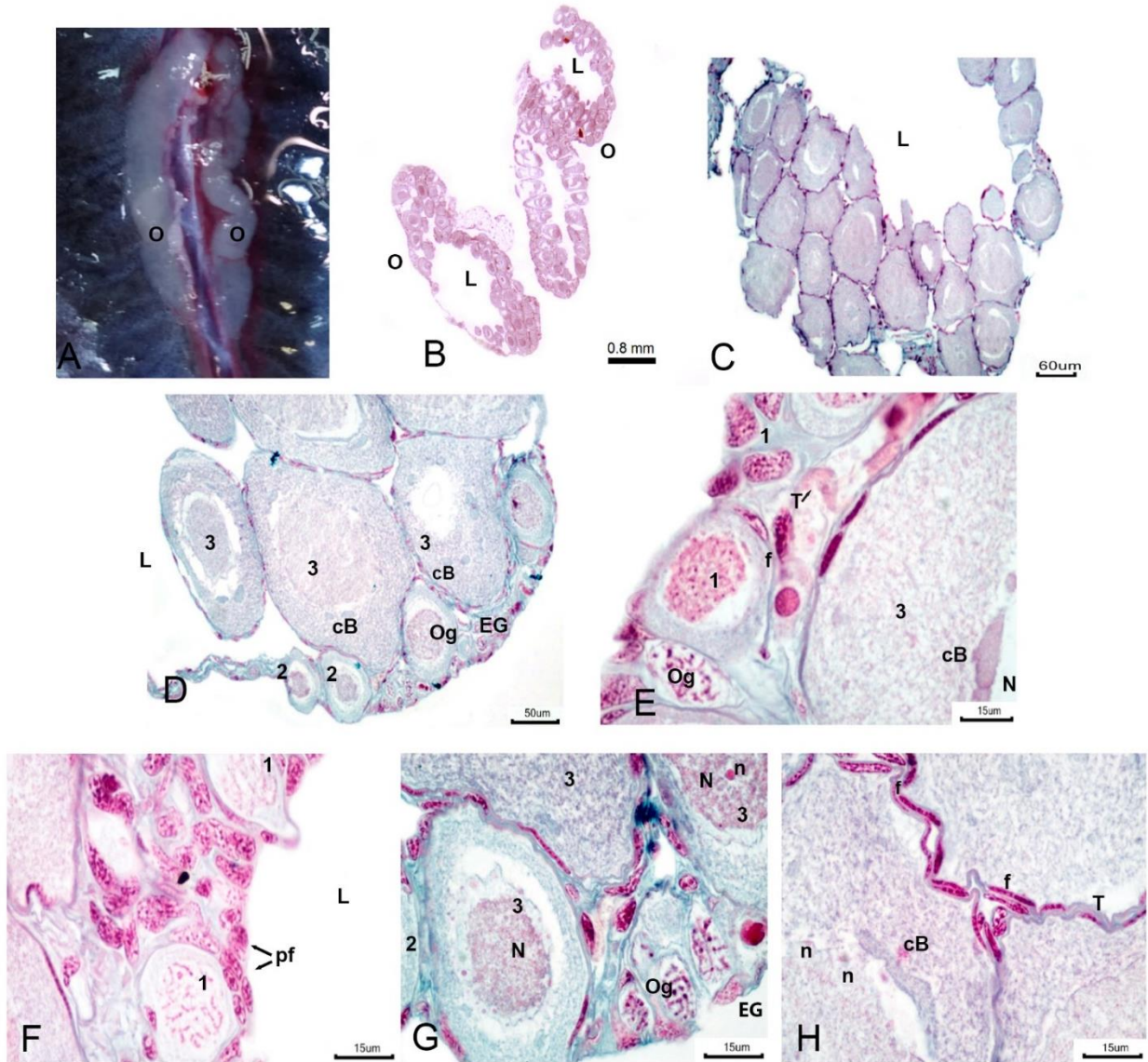


Fig. 3 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 8 meses de desarrollo. A Ovarios (O) unidos a la pared dorsal del cuerpo. B y C Imagen histológica panorámica del ovario, ovocitos en desarrollo en la periferia del ovario(O) y lumen central (L). D. Nido de ovogonias (Og) en el epitelio germinal (EG) en la pared del ovario y hacia la luz (L) ovocitos en estadio de desarrollo 3 en cuyo citoplasma son evidentes los cuerpos de Balbiani (cB). E. Detalle de un extremo del epitelio germinal con una ovogonia y dos ovocitos en estadio de desarrollo 1 y, a un lado uno en estadio 3 con citoplasma homogéneo y cuerpo de Balbiani (cB) y las células foliculares que lo rodean y la teca (T). F. Detalle de la pared del ovario con ovocitos en estadio 1 en los cuales se pueden observar en el núcleo los cromosomas con algunas figuras mitóticas, y solo algunas células prefolliculares (pf) adosadas, G. En la pared del ovario se observan algunas ovogonias (Og) en el epitelio germinal (EG) rodeadas de ovocitos en estadio de desarrollo 3, en los que se puede observar la vesícula germinal central (N) y los nucleólos periféricos (n). H Detalle de la pared folicular en ovocitos en estadio de desarrollo 3, con sus células foliculares aplanadas (f) y algunas células y fibras de las tecas (T), así como su membrana nuclear irregular, nucleólos periféricos (n). Note también el cuerpo de Balbiani (cB) cerca de la membrana nuclear. Tinción con Azul Alciano - Rojo Nuclear.

Histológicamente es evidente la estructura sacular del ovario y los ovocitos en crecimiento hacia el lumen central (Fig. 3 B, C), el epitelio limitante del ovario es cúbico y en algunos sitios se puede observar el epitelio germinal en donde se encuentran los nidos de ovogonias en relación con algunos ovocitos en estadio 1 y 2 y las células somáticas (pre-foliculares) que establecen contacto con ellos para rodearlos (Fig. 3D - G). En el ovario de 8 meses es visible la predominancia de los ovocitos en estadio de desarrollo 3 (Fig. 3B, C), con citoplasma basófilo, vesícula germinal grande, central y esférica, en donde son evidentes los cromosomas plumosos en diplóteno y numerosos nucléolos que en algunos casos ya se ubican en la periferia de la membrana nuclear (Fig. 3E). En ovocitos más grandes se observan ciertos acúmulos de forma irregular más basófilos ubicados cerca de la vesícula germinal, estos son los denominados cuerpos de Balbiani (mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi y material fibrogranular) (Fig. 3D, F, H). Las células foliculares que rodean a los ovocitos en estadio 1, 2 y 3 son escamosas (Fig. 3E - H), y en estos últimos en los de mayor tamaño se empiezan a notar externamente las células y fibras de la teca (Fig. 3E - H).

Ovario de larvas de 9 meses de edad

Las medidas somáticas de la hembra de 9 meses de edad obtenida en el mes de septiembre son 38.2 g de peso y 22 cm de talla (Tabla 1). La disección nos revela que el ovario es mucho más voluminoso con respecto al mes anterior, es evidente el aumento del tamaño, así como de los lóbulos que lo estructuran; una gran cantidad de ovocitos blanquecinos de diferente tamaño, así como de estructuras pigmentarias oscuras también de diferentes tamaños son evidentes a través de la pared transparente que envuelve al ovario (Fig. 4A).

La histología evidencia a los ovocitos en estadio 3 en diferentes etapas de crecimiento y ya son evidentes algunos en estadio 4 y estadio 5 (Fig. 4B, C), al igual que la gran cantidad y el

variado tamaño de cuerpos pigmentarios unidos a la pared del ovario, estructurados de grandes células cuyo citoplasma está completamente lleno de pigmento inmersas en una red de tejido estromático donde el pigmento puede verse como pequeños gránulos dispersos fuera de las células (Fig. 4E - F). Los ovocitos en estadio 3 son más grandes presentan la vesícula germinal central con pared irregular y numerosos nucléolos ubicados en la periferia del núcleo, así mismo son evidentes los cromosomas plumosos en diplóteno, el citoplasma sigue siendo basófilo y las células foliculares que los rodean son aplanadas (Figs. 4B - E, 5A, C). Los ovocitos en estadio 4 presentan un diámetro promedio de $539 \pm 60.27 \mu\text{m}$ con núcleo esférico central con membrana irregular, nucléolos periféricos y cromosomas en diplóteno (Fig. 5 B). En estos ovocitos es notable el inicio del proceso de vitelogénesis y con ello la etapa de crecimiento secundario evidenciado por la acumulación de plaquetas de vitelo en menor o mayor grado en el citoplasma periférico, esto es desde el inicio en el citoplasma periférico hasta casi la mitad del citoplasma del ovocito (Figs. 4B - E, 5C, D), las células foliculares que los rodean en general siguen siendo escamosas, pero en algunos ovocitos se observan más voluminosas y es notoria también la capa de finas fibras y células escamosas de la teca (Figs. 4E, 5D). Los ovocitos en estadio 5 son más grandes, presentan un diámetro promedio de $386 \pm 85.53 \mu\text{m}$, la vesícula germinal sigue siendo central y con características similares al estadio anterior. Cabe resaltar dos características importantes de los ovocitos en estadio 5, esto es el acúmulo de plaquetas de vitelo en todo su citoplasma excepto alrededor de la vesícula germinal, así como la ubicación de partículas pigmentarias (melanina) en el citoplasma cortical en uno de los polos de los ovocitos

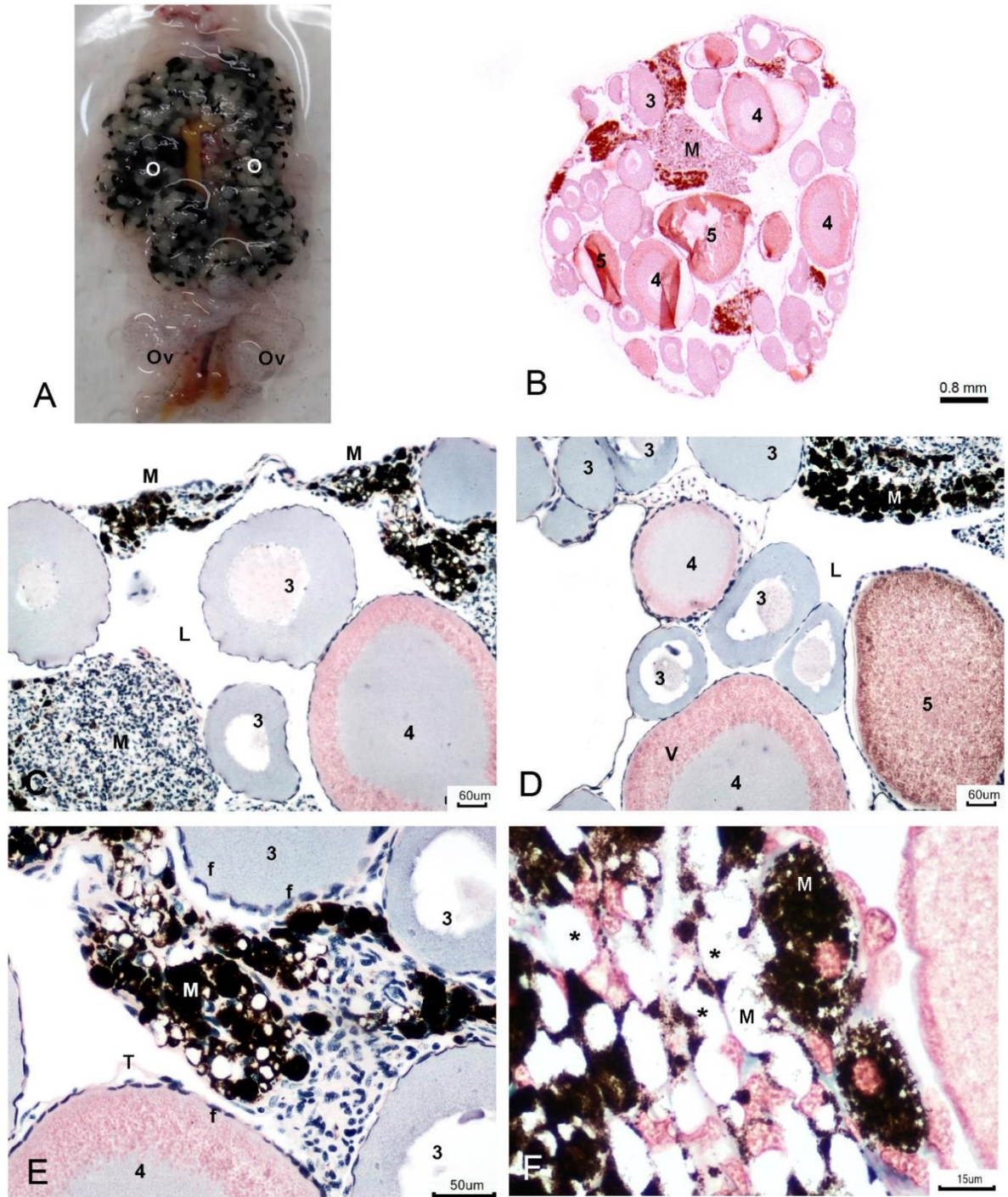


Fig. 4 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 9 meses de desarrollo. A Disección de los ovarios (O) y oviductos. (Ov). B Histología panorámica del ovario con ovocitos en estadios de desarrollo 3, 4, y 5, note también los cuerpos pigmentarios de melanina (M). C y D Ovocitos en estadios de desarrollo 3, 4 y 5 en la luz (L) del ovario. Note también los cuerpos pigmentarios con células secretoras de melanina (M). E. Ovocitos en estadio de desarrollo 3 en donde se puede ver la capa de células foliculares (f) que los rodean y el de estadio 4 las fibras y células de la teca (T) y en el centro las células secretoras de melanina, (M) inmersas en la malla de tejido de apariencia también secretora. F Acercamiento de dos células secretoras de melanina (M) con el citoplasma completamente lleno de secreción y puntos de esta misma secreción dispersa en el tejido circundante (*). Tinción con Hematoxilina-Eosina.

denotándose así su polarización. El polo en donde ocurre la acumulación del pigmento cortical y la presencia de plaquetas de vitelo más pequeñas determina el polo animal y el polo contrario donde las plaquetas de vitelo son más grandes y mayormente acumuladas es el vegetal (Figs. 4B, C, 5C, D), las células foliculares y las de la teca que los rodean son más voluminosas y son evidentes también las fibras de colágeno de esta última (Fig. 5D - F).

Ovario de larvas de 10 meses de edad

Las medidas somáticas de la hembra de 10 meses de edad fueron 17.5 cm de longitud total y peso de 49.5g. La disección muestra cuerpos grasos muy reducidos y los ovarios con características un poco menos desarrolladas a las mencionadas en el mes anterior, el peso registrado fue de 0.25 y 0.26 g para la gónada derecha e izquierda respectivamente y una longitud de 3 y 2.5 cm derecha e izquierda respectivamente (Tabla1), los oviductos si muestran diferencias, se observan como gruesos y blanquecinos tubos plegados (Fig. 6A). Es posible observar a través de la transparente pared ovárica la gran cantidad de ovocitos en desarrollo de diferentes tamaños y coloraciones que van de blanquecinos translucidos a amarillentos opacos, así como los cuerpos pigmentarios entre ellos también de diferentes tamaños (Fig. 6A).

Las imágenes histológicas nos permiten ver a los ovocitos en diferentes etapas de desarrollo (Fig. 6B - E), los cuales se encuentran en desarrollo hacia la luz ovárica. Los ovocitos en desarrollo 1 y 2 se observan en estrecha relación con los nidos de ovogonias los cuales pueden encontrarse en diferentes sitios adosados a la pared ovárica (Fig. 6D, E). Es posible ver también que los folículos en desarrollo también están en estrecha relación con la pared del ovario, pues se encuentran unidos a esta. Es mayor el número de folículos en desarrollo, pero los predominantes son los de estadio 3 de diferentes tamaños, le siguen los 4 en los que ya se puede ver la acumulación de vitelo en la periferia del citoplasma de los ovocitos (Fig. 6D, E).

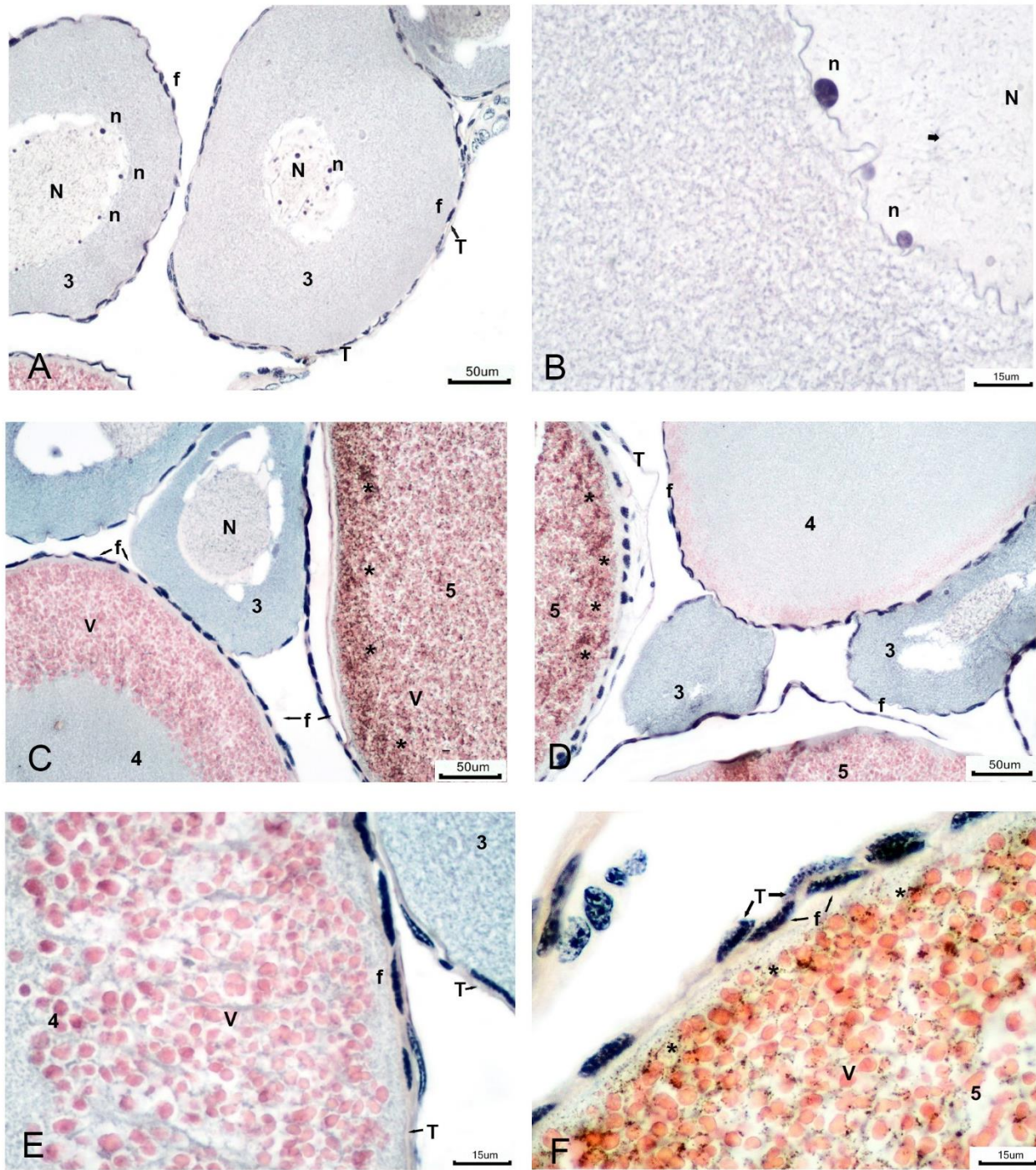


Fig. 5 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 9 meses de desarrollo. A. Ovocitos en estado de desarrollo 3 con vesícula germinal de pared irregular (N), nucléolos periféricos (n), citoplasma homogéneo y células foliculares y de la teca aplanadas (T). B Detalle de la vesícula germinal (N) de un ovocito en estado 4, nucléolos periféricos (n) y cromosomas plumosos (flecha). C y D Ovocitos en estadios de desarrollo 3, 4, y 5 note las diferencias en tamaño, acumulación de plaquetas de vitelo (V) y el pigmento cortical (*). E Detalle de la pared de dos ovocitos en estadios de desarrollo 3 y 4 note las células foliculares (f) y de la teca (T) que los rodean, además del vitelo (V) acumulado en el citoplasma del ovocito en estado 4. F Distribución del vitelo (V) y pigmento (p) de la región periférica de un ovocito en estado de desarrollo 5, las células foliculares y las de la teca son de forma alargada pero más voluminosas y puede alcanzar a verse su citoplasma granuloso. Tinción con Hematoxilina-Eosina.

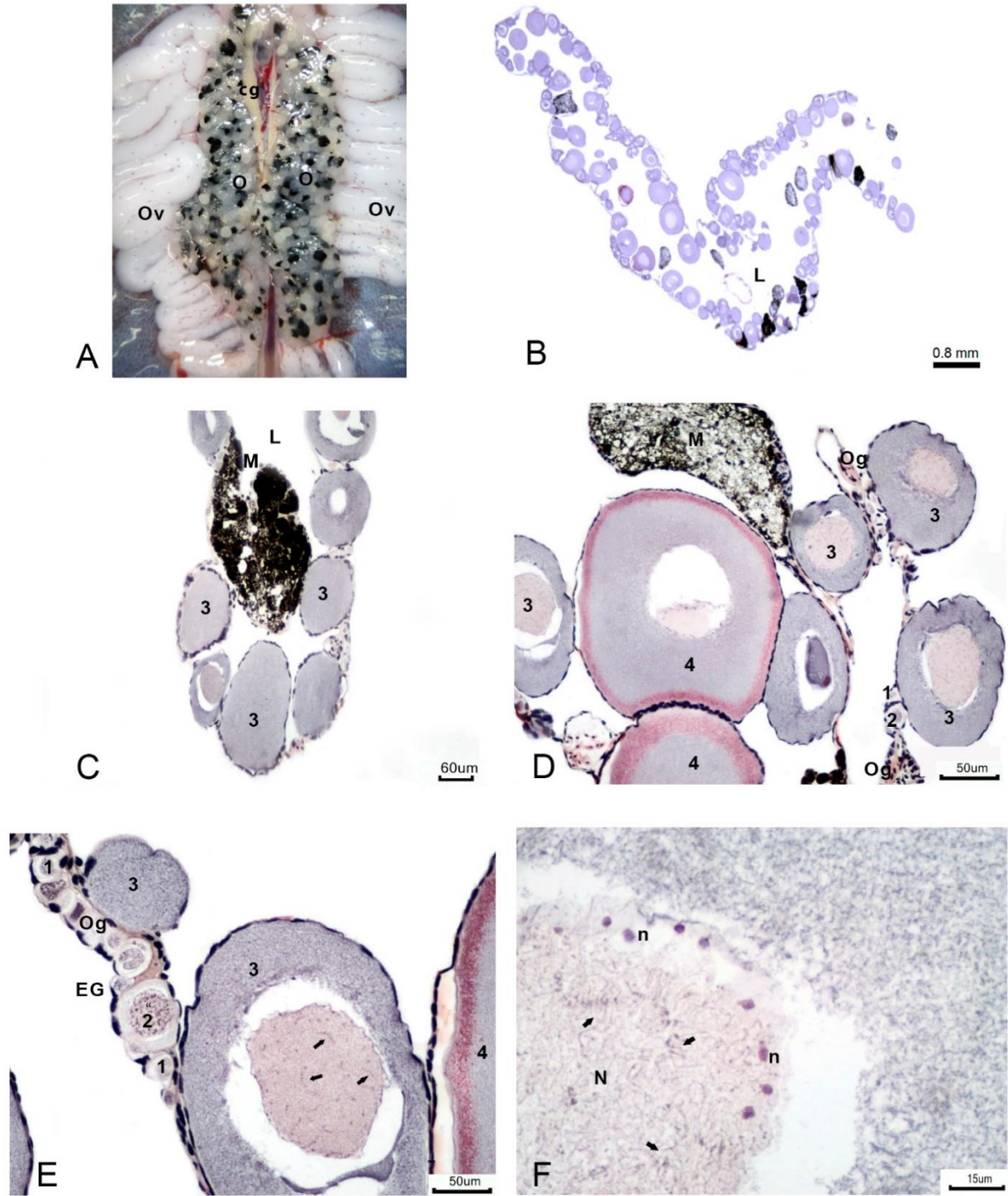


Fig. 6 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 10 meses de desarrollo. A. Disección de ovarios (O), oviducto (Ov) y cuerpos grasos (cg). B y C Histología panorámica del ovario, diferentes ovocitos en desarrollo unidos a la pared ovárica así como los cuerpos pigmentarios de melanina (M). D. Ovocitos en estadio de desarrollo; 1, 2, 3, y 4, note en el extremo derecho dos nidos de ovogonias y su relación con ovocitos en estadio 1 y 2, así como con un cuerpo pigmentario de melanina (M). E. Nido de ovogonias (Og) en el epitelio germinal (EG) y ovocitos en estadio de desarrollo 1, 2 y 3. F. Acercamiento de la vesícula geminal (N) de un ovocito en estadio de desarrollo 3 con los evidentes cromosomas plumosos en diplóteno (flecha) y los nucléolos periféricos (n). Tinción con Hematoxilina-Eosina.

El citoplasma de estos es homogéneo basófilo y con ciertos sitios más basófilos en su citoplasma, especialmente los periféricos al núcleo, en el cual son evidentes los cromosomas plumosos en etapa de diplóteno y los nucléolos periféricos (Fig. 6E, F). Las células foliculares que rodean a estos ovocitos son planas y externamente son visibles las células de la teca las cuales son también escamosas (Fig. 7A, B, F). Cabe hacer notar que las estructuras pigmentarias penden también de la pared del ovario y se desarrollan hacia el interior del lumen ovárico, las células secretoras se encuentran inmersas en una malla de tejido fibroso (Fig. 7C). Es importante destacar también que las células secretoras individuales también se encuentran en la pared ovárica y gránulos pigmentarios a su alrededor, indicando con ello que es el producto de secreción de la célula (Fig. 7D). Los folículos en estadio de desarrollo 4 muestran algunas diferencias en la estructura de las células foliculares y de las tecas, los que presentan una acumulación de vitelo muy inicial presentan células foliculares aplanadas (Fig. 7B) y conforme avanza esta acumulación de vitelo estas células son más voluminosas, incluso en algunas de ellas es posible ver su citoplasma granuloso (Fig. 7E, F).

Ovario de larvas de 12 meses de edad

Obtuvimos dos hembras de 12 meses de desarrollo, las medidas somáticas de una de ellas fueron de 19.5 cm de longitud total y 70.4 g de peso. Los ovarios de *A. mexicanum* de esta edad son más grandes y voluminosos sus medidas fueron 3.9 cm de largo y 0.84 g de peso y 4 cm de largo y 0.82 g de peso derecha e izquierda respectivamente, son mayormente lobulados, los cuerpos grasos son evidentes por su coloración amarilla y su gran tamaño, asimismo los oviductos son también más grandes, gruesos, plegados y de coloración blanca. Los ovocitos pueden ser observados a través de la transparente pared uterina, son de color blanquecino o amarillos claros y algunos presentan una cubierta oscura (Fig. 8A).

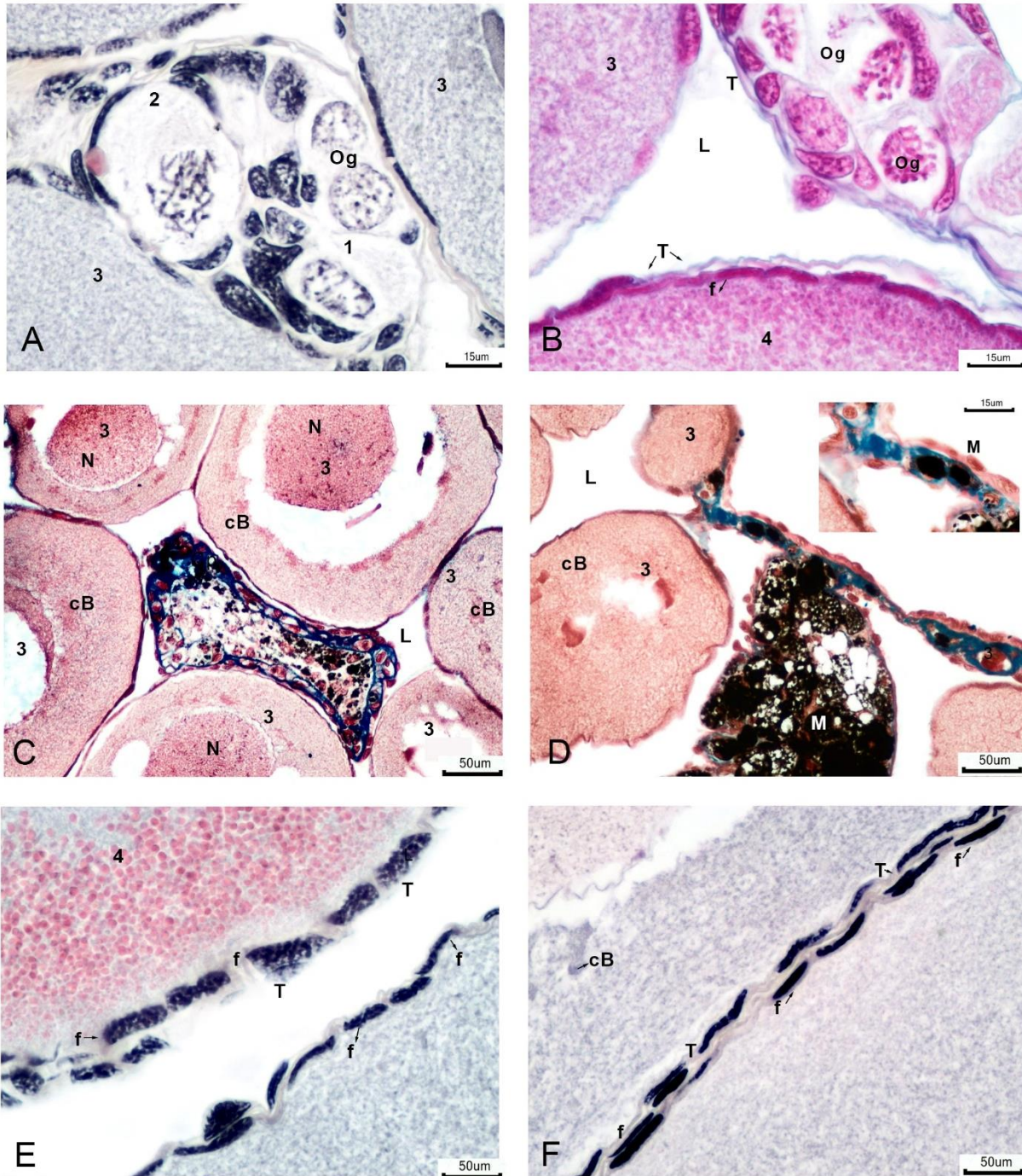


Fig. 7 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 10 meses de desarrollo. A Acercamiento de un nido de ovogonias (Og), un ovocito en estadio de desarrollo 1 y uno en 2, entre tres ovocitos en estadio de desarrollo 3. B Nido de ovogonias (Og), hacia la luz del ovario (L) puede verse un ovocito en estadio de desarrollo 3 y uno 4, en este último es posible definir las fibras y células de la teca (T), además de las foliculares (f). C Ovocitos en estadio de desarrollo 3, note los acúmulos de los corpúsculos de Balbiani (cB) en el citoplasma cercanos a la vesícula germinal (N) y en el centro de un cuerpo pigmentario de melanina (M), D Pared del ovario en donde se puede ver claramente que los cuerpos pigmentarios (CP) pueden estar unidos a esta o que células individuales están unidas al epitelio ovárico (acercamiento) y el pigmento disperso entre estas. E Detalle de la pared de un ovocito en estadio de desarrollo 3 y 4, note las diferencias entre las células foliculares (f) y de la teca (T) entre estos. F Detalle de la pared de dos ovocitos en estadio de desarrollo 3 en donde son evidente células alargadas y escamosas tanto foliculares (f) como de la teca (T). A, E y F Tinción con Hematoxilina - Eosina. B Tinción con Azul Alciano - Rojo Nuclear. C y D Tinción con Tricrómica de Masson.

La histología revela el crecimiento secundario, esto es un proceso de vitelogénesis activa en que la gran mayoría de los ovocitos se encuentran en estadio 6, ocupando el gran espacio del lumen ovárico y siguiendo en abundancia los de estadio 5 (Fig. 8B, C). En la periferia, unidos a la pared ovárica se observan los ovocitos en estadios 1, 2, 3 y cercanos a estos los de estadio 4; los 1 y 2 como siempre en relación con los nidos de ovogonias en el epitelio germinal en el epitelio que recubre al ovario (Fig. 8C, D). Los ovocitos en estadio 3 son los más variados en tamaños, presentan las características antes vistas, vesícula germinal central y citoplasma homogéneo, células foliculares y de la teca escamosas y son evidentes los vasos sanguíneos de esta última (Fig. 8E, F). Los ovocitos en estadio 4 tienen un tamaño promedio de $539 \pm 60.27 \mu\text{m}$ se reconocen por la acumulación de vitelo en la periferia del ovoplasma, los nucléolos se encuentran unidos a la irregular membrana de la vesícula germinal (Fig. 8C, 9A, B). Algunas de las células foliculares que los rodean muestran cambios en su forma y en algunos casos ya se observan ovaladas (Fig. 9A, B). Los ovocitos en estadio 5 son más grandes ($735 \mu\text{m}$), presentan una mayor acumulación de vitelo en el citoplasma, excepto en el área periférica a la vesícula germinal, el contorno de esta es irregular y el polo animal se distingue por la acumulación de melanina (Fig. 8C). Las células foliculares y de la teca que los rodean son más voluminosas y las fibras y vasos sanguíneos de la teca más evidentes (Fig. 8F). Los ovocitos en estadio 6, alcanzan un diámetro promedio de $773 \pm 144.23 \mu\text{m}$, y presentan una mayor acumulación de vitelo, la vesícula germinal con su membrana irregular aún puede verse en el centro del ovoplasma o un poco desplazada hacia el polo animal, el cual se distingue por su pigmentación más oscura, esto es por la deposición de melanina (Fig. 9C, D). Lo que hace evidente la polarización de los ovocitos vitelogénicos, el polo animal con su cubierta cortical de melanina y en polo vegetal sin esta última, pero con una mayor cantidad y más voluminosas plaquetas de vitelo (Fig. 9C – F). En algunos ovocitos de estos estadios de desarrollo 6 fue posible observar la zona pelúcida, esto la zona de comunicación entre la membrana del

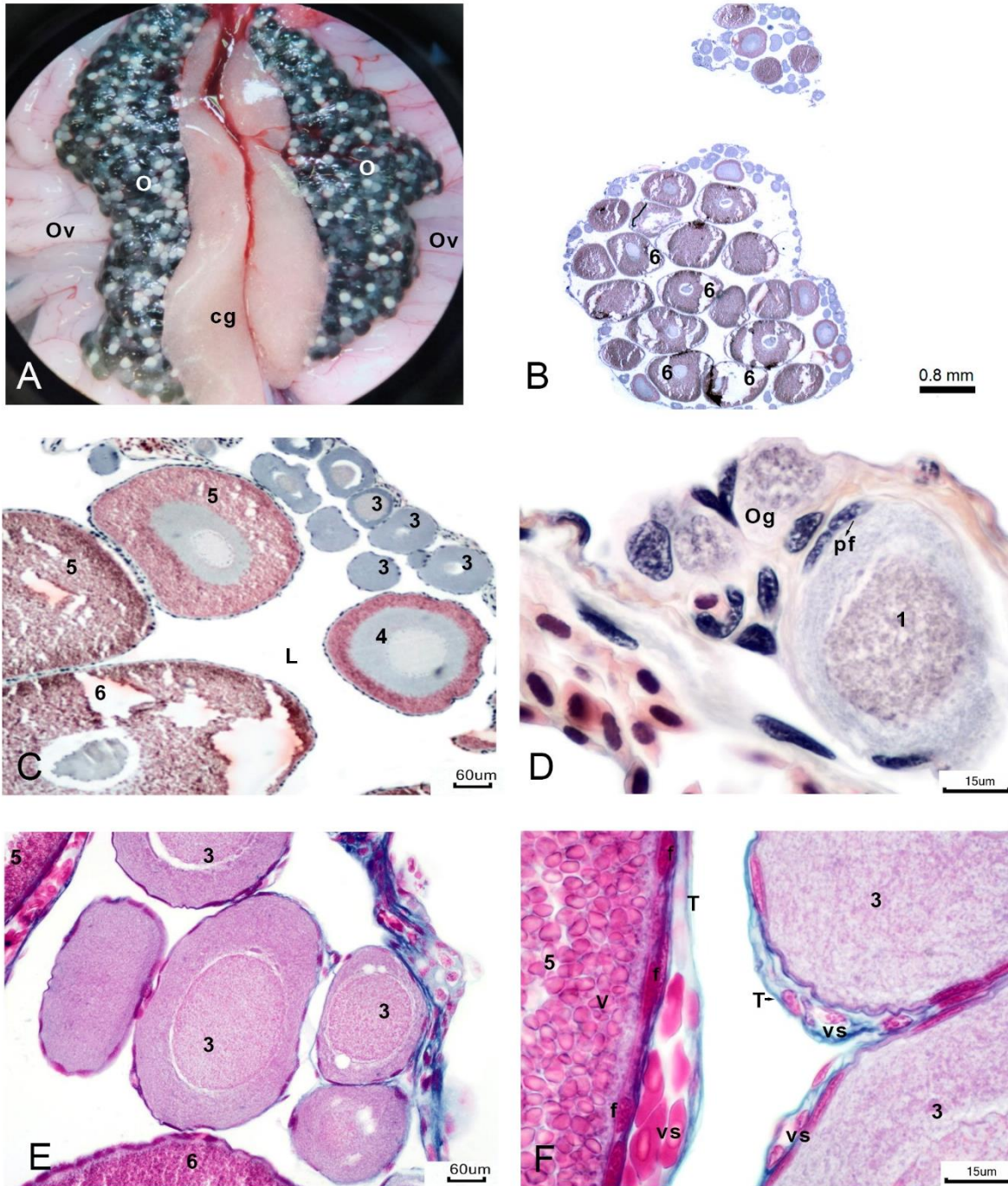


Fig. 8 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 12 meses de desarrollo. A ovario (Ov), oviductos (Ov) y cuerpos grasos (cg) con un mayor desarrollo respecto a los meses anteriores. B Histología panorámica en donde es evidente la predominancia de los ovocitos en estado de desarrollo 6. C Ovocitos en etapas de desarrollo 3, 4, 5 y 6, creciendo hacia la luz del ovario (L). D Pared del ovario en donde se pueden ver dos ovogonias (Og) y un ovocito en estado de desarrollo 1, con algunas células prefolliculares adosadas (pf). E. Ovocitos en estado de desarrollo 3 y pared de dos ovocitos en estado 5 y 6. F Acercamiento de dos ovocitos es estado de desarrollo 3 y uno en 6, note las diferencias en el ovoplasma con y sin vitelo (V), las células foliculares (f) y la teca (T) así como la vascularización de estas (vs). B,C y D Tinción con Hematoxilina-Eosina. E,F. Tinción con Azul Alciano - Rojo Nuclear.

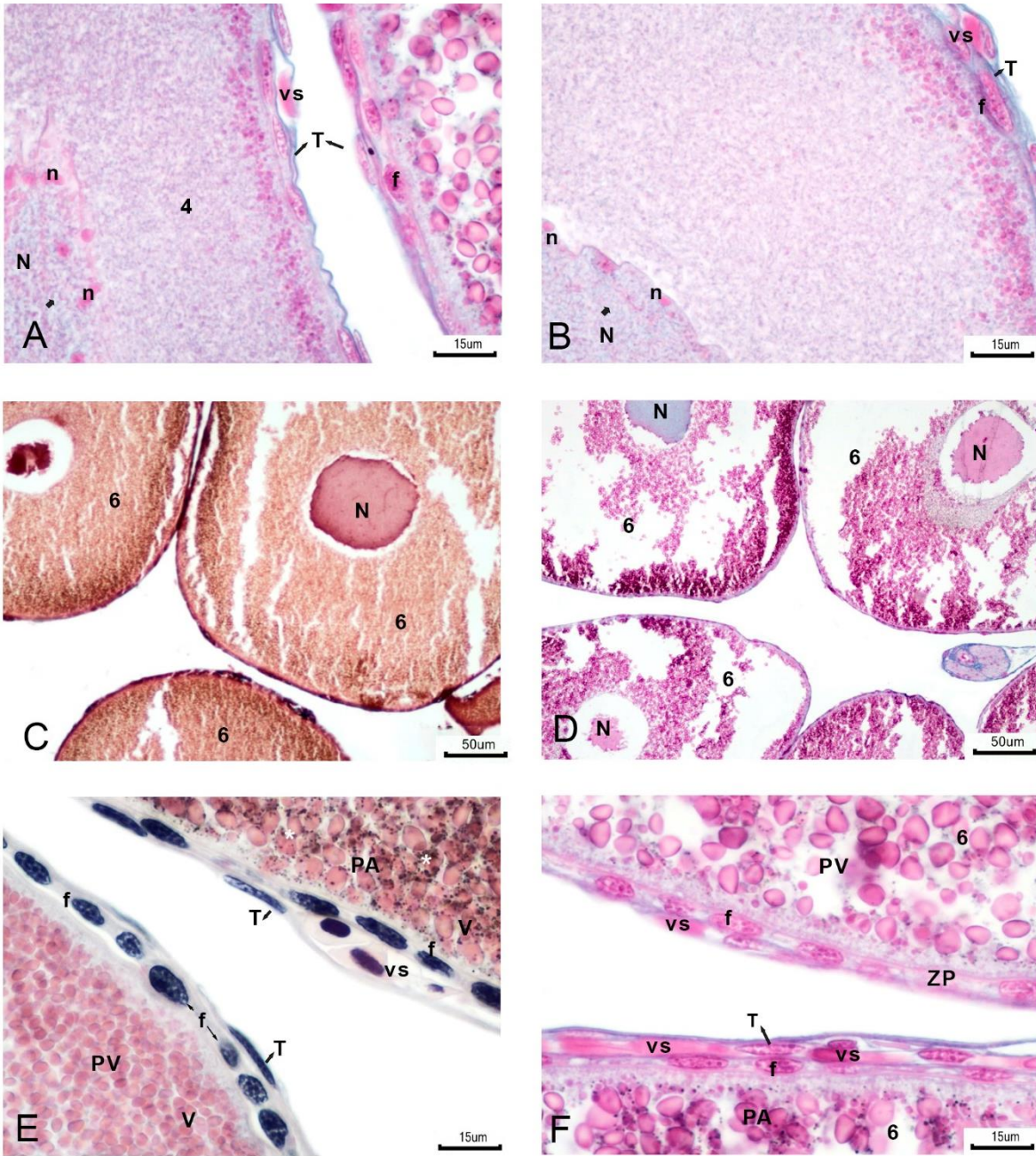


Fig. 9 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 12 meses de desarrollo. A y B Acercamiento de ovocitos en estado de desarrollo 4 con inicios de acumulación de vitelo (V), células de la teca (T), vasos sanguíneos (vs) y foliculares (f) más voluminosas, note la vesícula germinal (N) los evidentes nucléolos (n) y cromosomas plumosos (flecha). C y D Ovocitos en estado de desarrollo 6 en su gran mayoría con la vesícula germinal aún en el centro del ovocito. E. Pared del polo vegetal (PV) (inferior izquierda) y animal (PA) (superior derecha) de dos folículos vitelogénicos en estado de desarrollo 6, note el pigmento disperso (*) entre las plaquetas de vitelo (V) en el polo animal (PA), las células foliculares (f) y las de la teca (T) así como su vascularización (vs). F Contraste entre la pared del polo animal (PA) y el vegetal (PV) de dos ovocitos en estado de desarrollo 6, note la zona pelúcida (zp) entre el límite del citoplasma del ovocito y las células foliculares (f), externamente a estas se pueden ver las células de las tecas (T) y los vasos sanguíneos (vs). Tinción A, B, D y F con Azul Alciano - Rojo Nuclear. C Tinción Tricrómica de Masson. E Tinción con Hematoxilina - Eosina.

ovocito y las células foliculares que lo rodean, haciéndose evidente la zona estriada y la zona homogénea (Fig. 9 F) y especialmente el mayor diámetro que pueden alcanzar de 1.2mm. Es notable también el cambio en la estructura de las células foliculares y de las tecas las cuales son más voluminosas, además el tejido conjuntivo vascularizado y fibroso (Fig. 9E, F). Los datos somáticos de la segunda hembra de esta edad fueron de 19 cm de longitud total y de 50.1 g de peso. En esta larva de 12 meses de desarrollo, los oviductos y ovarios muestran características de desarrollo un poco más avanzado; esto es, macroscópicamente son más voluminosos y lobulados. El peso de los ovarios fue de 0.54 y 0.68 g y su longitud fue de 3.7 y 4.5 cm derecha e izquierda respectivamente, se distinguen a través de la pared ovárica los ovocitos más grandes y con la polaridad evidente el polo animal con su cubierta de melanina y el polo vegetal en tonos amarillos mayormente cargado de vitelo (Fig. 10A).

A nivel histológico en cortes longitudinales de la gónada es visible el predominio de estos ovocitos los cuales se encuentran en etapa 6 ocupando la mayor parte del lumen ovárico, son los más grandes registrados ya que el diámetro que pueden alcanzar es de 1.7mm. Son evidentes las características que los identifican como el ovoplasma completamente lleno de vitelo y el núcleo desplazado hacia el polo animal en donde se nota la cubierta cortical oscura de melanina (Fig. 10B, C, F). Es posible observar unidos a la pared ovárica ovocitos en etapa de desarrollo 3 y le siguen en abundancia los 2 y 1 estos últimos en su condición relacionados con los nidos de ovogonias, los cuales se encuentran distribuidos al azar y estrechamente relacionados con el epitelio ovárico (Fig. 11A).

Cabe resaltar que también unidos a la pared ovárica se encuentran las estructuras secretoras en donde se observan las células secretoras del pigmento o melanina (Fig. 10B - F).

Los ovocitos en etapa de desarrollo 4 ya en la fase de crecimiento secundario, se observa el inicio del depósito de vitelo en la periferia del ovoplasma (Figs. 10 D, F; 11C, D F). Los ovocitos en etapa 5 son significativamente más grandes y ya tienen más vitelo acumulado y los más sobresalientes son los ovocitos que se encuentran en etapa 6 notables por su tamaño, el ovoplasma completamente lleno de vitelo y la vesícula germinal migrada hacia el polo animal en donde es evidente la cubierta cortical de melanina (Fig. 10B, C, F). En los ovocitos en etapa de desarrollo 3 es evidente la vesícula germinal en el centro del ovoplasma, con su membrana irregular y los nucléolos periféricos, así como los cromosomas plumosos (Figs. 10D, E; 11B). Asimismo, es importante también identificar la estructura diferente de las células foliculares en cada uno de los tipos de ovocitos en desarrollo más evidentes; esto es, los que se encuentran en etapa 3 las células foliculares son planas o escamosas, así como las células de la teca (Figs. 10E; 11E), en los ovocitos en etapa 4 y 5 en vitelogénesis las células foliculares ya no se observan planas, estas son más voluminosas y grandes (Fig. 10D, F). Este tipo celular en ovocitos en etapa 6 en los que el ovoplasma está lleno de vitelo vuelve a ser de tipo plano, así como las células de la teca al igual que las células de la teca en donde también se identifican las fibras (Fig. 11F).

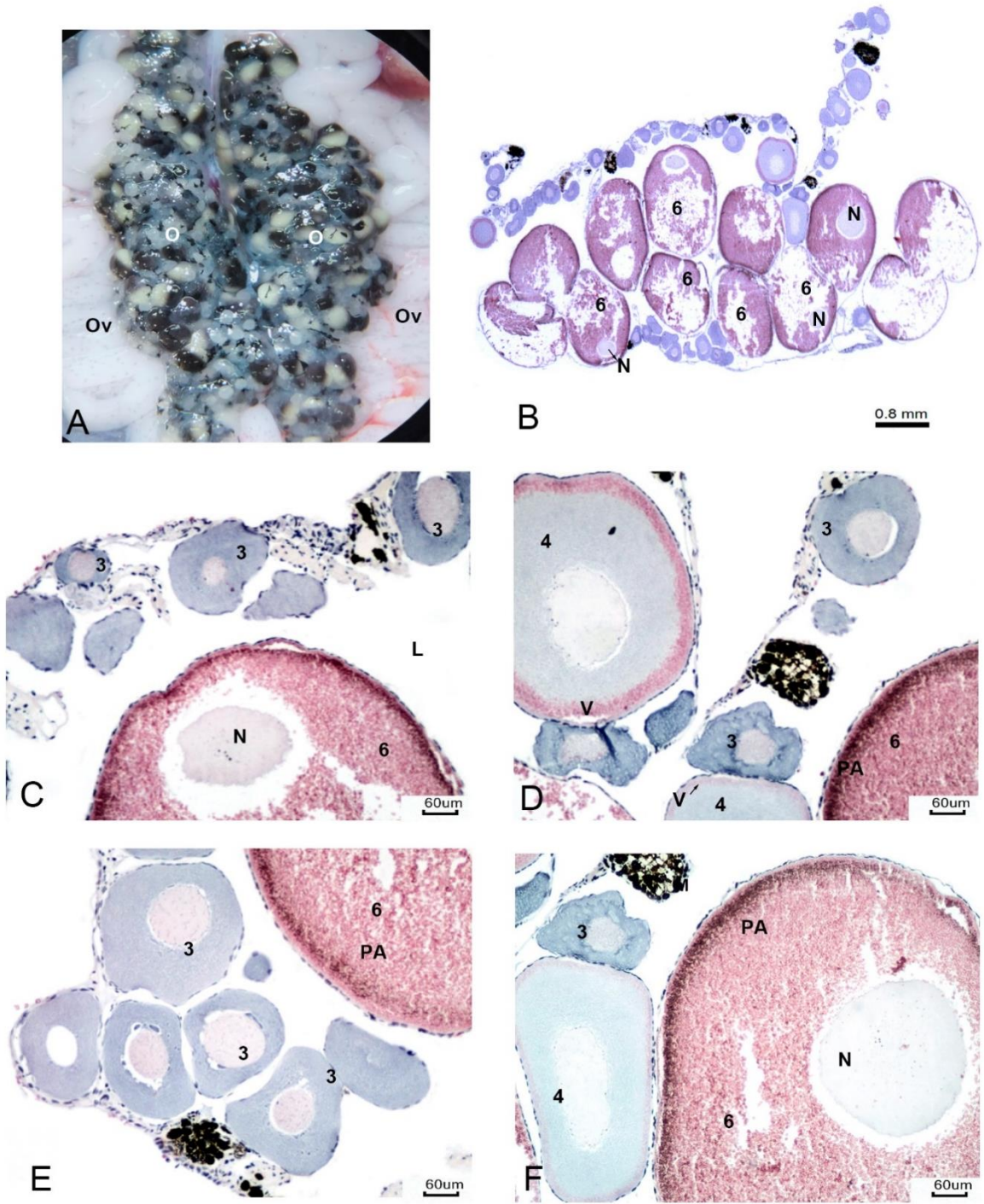


Fig. 10 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 12 meses de desarrollo. A Disección de ovarios (O) y oviductos (Ov). B. Panorámica histológica con la predominancia de ovocitos en estadio de desarrollo 6, note la vesícula germinal (N) desplazada hacia el polo animal. C. Ovocitos en estadio de desarrollo 3 cercanos a la pared ovárica y el polo animal (PA) de un ovocito en estadio 6 desarrollándose hacia la luz ovárica (L) donde es evidente la vesícula germinal (N) y la capa cortical de melanina. D y E Ovocitos en estadio de desarrollo 3, 4 y 6, note el inicio de la deposición de vitelo en el ovocito en estadio 4 y parte del polo animal (PA) de uno en estadio 6. F Ovocitos en estadio de desarrollo 3, 4 y 6, este último con la vesícula germinal (N) hacia el polo animal (PA). Note que aun es posible ver cuerpos pigmentarios de melanina (M) unidos en diferentes puntos a la pared ovárica. Tinción con Hematoxilina-Eosina.

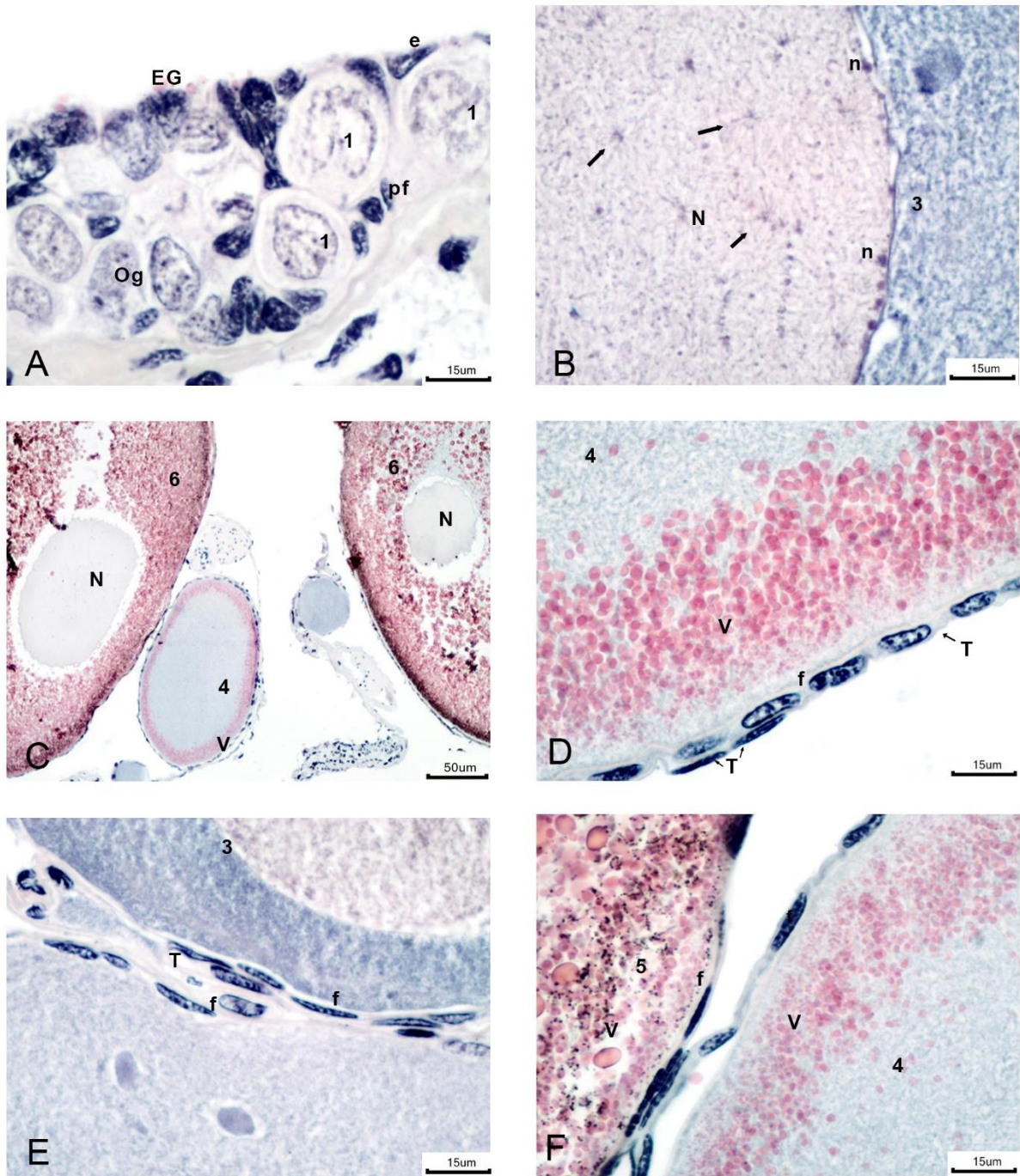


Fig. 11 Ovario de *Ambystoma mexicanum* de 12 meses de desarrollo. A. Epitelio germinal (EG) en donde se puede ver un nido de ovogonias (Og) y de tres ovocitos en estadio 1 limitados por el epitelio ovárico (e), note las células prefolliculares (pf) adosadas a la pared de los ovocitos. B Vesícula germinal (N), nucléolos (n) periféricos a la membrana nuclear y cromosomas plumosos (flecha) de un ovocito en estadio de desarrollo 3. C. Dos ovocitos en estadio de desarrollo 6 con su vesícula germinal (N) migrada hacia el polo animal y u ovocito en estadio de desarrollo 4 con vitelo en el citoplasma periférico. D. Pared de un ovocito en estadio de desarrollo 4 con su vitelo periférico (V), zona pelúcida evidente y rodeando las células foliculares (f) y externamente a estas las células y fibras (flecha) de la teca (T). E. Ovocitos en estadio de desarrollo 3, note la forma plana o escamosa de las células foliculares (f) y de la teca. F Pared de dos ovocitos en estadio de desarrollo 4 y 5, note las diferencias entre el citoplasma, vitelo (V), pigmento cortical y forma de las células foliculares. Tinción con Hematoxilina-Eosina.

Gónadas de machos de *A. mexicanum*

Testículo de larvas de 7 meses de desarrollo

Los testículos del urodelo *A. mexicanum* son órganos pareados ubicados en la región media posterior del cuerpo y están unidos a la pared dorsal por un mesenterio denominado mesorquio. Presentan la organización típica del grupo, en la periferia un tejido fibroso que recubre el testículo llamado túnica albugínea, en la región interna se encuentran los lóbulos seminíferos y dentro de ellos las células de la línea germinal estrechamente relacionadas con las células somáticas (Sertoli) estructurando así los quistes o cistos. Dentro de los cistos las células de la línea germinal maduran sincrónicamente; esto es, todos los cistos dentro de un lóbulo tienen el mismo tipo celular y la aparición de los diferentes tipos de cistos tiene una distribución cefalo-caudal en relación con el avance del proceso de espermatogénesis, lo que se ha denominado onda de espermatogénesis, lo que se puede ver en cortes longitudinales del testículo. Entre los lóbulos testiculares se puede observar tejido intersticial en donde son evidentes los vasos sanguíneos, tejido conjuntivo, fibras fibroblastos y las células de Leydig. En gónadas de larvas de 7 meses de desarrollo ya es evidente el inicio de la diferenciación celular del proceso espermatogénico en sentido anteroposterior o cefalocaudal y de manera muy especial en sentido dorso ventral del testículo, definiendo una clara regionalización de la gónada (Fig. 12 A - C). Son evidentes dos zonas testiculares, en la primera en la región anterior y dorsal de la gónada en la región periférica se observan espermatogonias primarias en proliferación en estrecho contacto con células somáticas y cistos de espermatogonias secundarias con un acomodo muy especial en la periferia de los lóbulos dejando una luz al centro de estos; entre los lóbulos se observa tejido conjuntivo intersticial (Fig. 12B - E). La segunda zona, hacia la región más ventral y posterior de la gónada, se observan lóbulos con cistos con células del

proceso de espermatogénesis en etapas tempranas, esto es, espermatocitos primarios y secundarios (Fig. 12D - G).

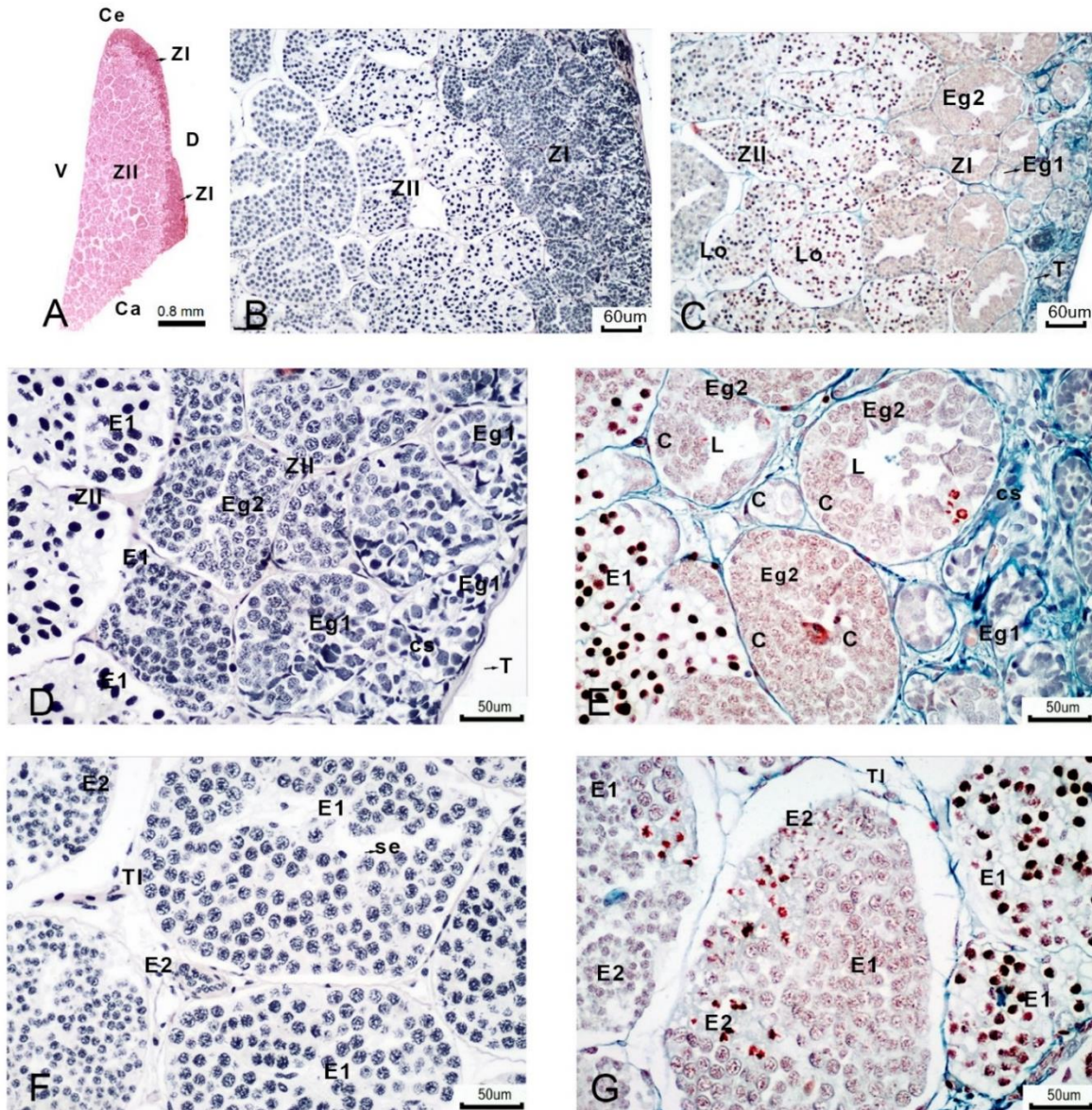


Fig. 12 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 7 meses de desarrollo. A. Histología panorámica del testículo y ubicación de las diferentes regiones, cefálica (Ce), caudal (Ca), dorsal (D) y ventral (V) note las dos zonas testiculares (ZI) y (ZII). B, C, D y E zonas del testículo, Zona I (ZI) y II (ZII), en la ZI en el límite de la pared testicular se pueden ver las fibras de la túnica albugínea (T), espermatogonias primarias (Eg1) ubicadas en la periferia testicular en relación con células somáticas (cs) y cistos (C) de espermatogonias secundarias (Eg2) en la periferia de los lóbulos (Lo). En la ZII lóbulos (Lo) con cistos (C) conteniendo espermatocitos primarios (E1) y espermatocitos secundarios (E2). F y G Zona II del testículo (Z2) con lóbulos conteniendo cistos de espermatocitos primarios (E1) y secundarios (E2), son evidentes los núcleos de las de Sertoli (Se) que rodean a los cistos y el tejido conjuntivo intersticial (TI). B, D, y F Tinción con Hematoxilina – Eosina; C, E y G, Tricrómica de Masson.

Testículo de larvas de 8 meses de desarrollo

En las gónadas de ejemplares de 8 meses de desarrollo se nota un ligero avance del proceso de espermatogénesis; esto es, se ha iniciado la espermiogénesis, por lo tanto, es notoria la regionalización del testículo en tres zonas (Fig. 13A B). La primera zona en donde se encuentran las espermatogonias secundarias en la región más cefálica y dorsal del testículo (Fig. 13A - C). Un poco más posterior y ventral de la gónada la segunda zona en donde se observan los lóbulos con cistos de espermatoцитos primarios y secundarios (Fig. 13B - D) y la tercera zona más ventral y posterior de la gónada en donde se observan lóbulos conteniendo cistos con espermátidas redondas y espermátidas en proceso de espermiogénesis (Fig. 13E, F).

Testículo de larvas de 9 meses de desarrollo

El análisis de las laminillas de las gónadas de 9 meses de desarrollo nos indica que en algunos organismos el proceso de espermatogénesis es muy similar a los de 8 meses con un ligero avance, esto es los lóbulos con cistos con células de la línea germinal en proceso de espermiogénesis ocupan una mayor parte de la gónada (Fig. 14A, B). Sigue siendo visible la zonación de la gónada en la región cefálica y dorsal con las evidentes periféricas espermatogonias primarias estrechamente relacionadas con células somáticas y las secundarias ya organizadas en cistos en la periferia de los lóbulos.

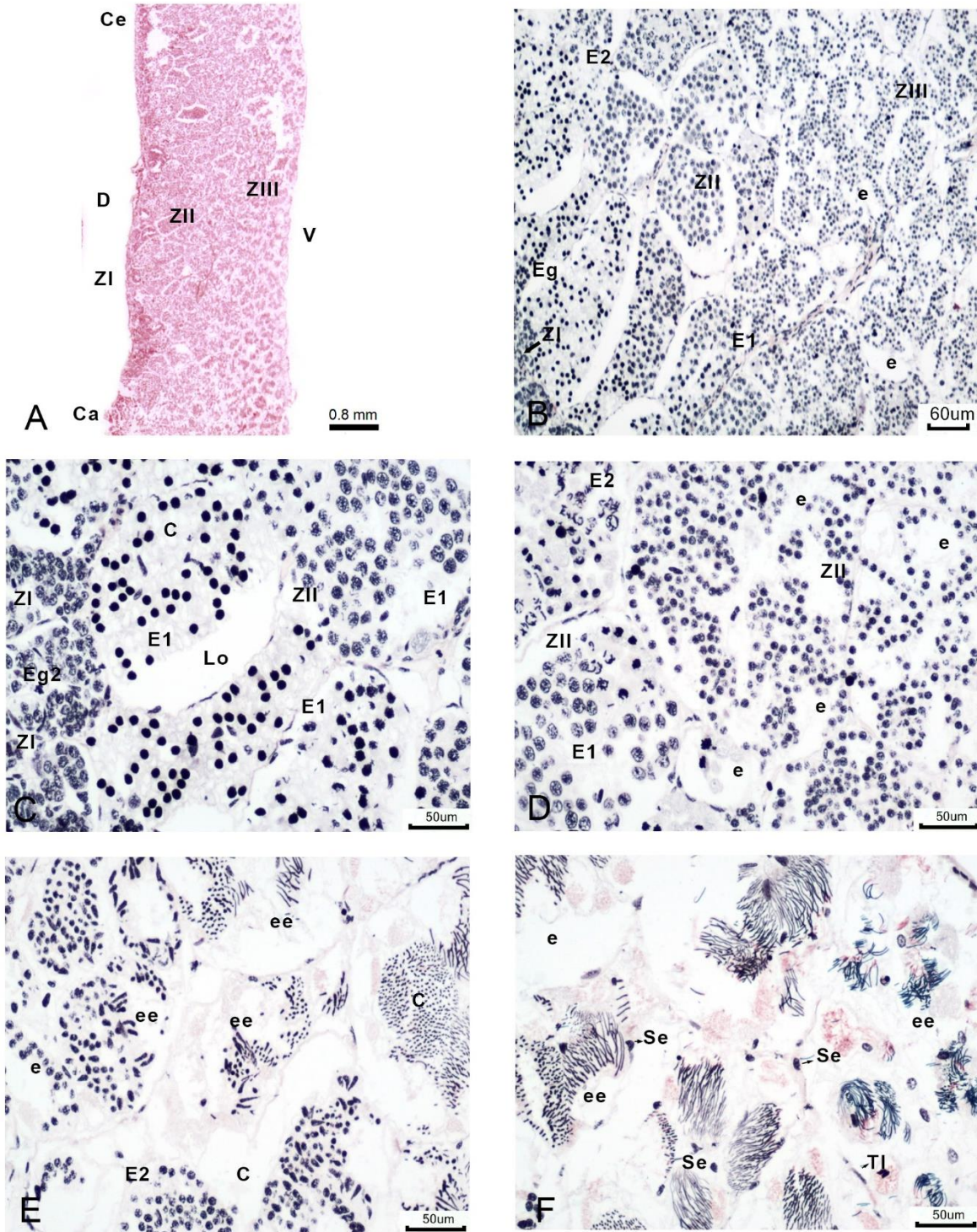


Fig. 13 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 8 meses de desarrollo. A. Histología panorámica del testículo y ubicación de las diferentes regiones, cefálica (Ce), caudal (Ca), dorsal (D) y ventral (V), note las diferentes zonas testiculares (ZI, ZII y ZIII). B Zonas testiculares, Zona I (ZI) en el límite inferior izquierdo de la imagen con algunas espermatogonias secundarias (Eg2), Zona II (ZII) con espermatocitos primarios (E1) y secundarios (E2) y Zona III (ZIII) con cistos de espermatidas redondas (e) en los lóbulos (Lo). C y D Transición entre la ZI y ZII y la ZII y la ZIII respectivamente. E y F Zona 3 (ZIII) con cistos (C) de espermatidas redondas (e) y espermatidas en espermiogénesis (ee). Son evidentes los núcleos de las de Sertoli (Se) que rodean a los cistosos el tejido conjuntivo intersticial (TI). Tinción con Hematoxilina – Eosina.

La segunda zona con lóbulos conteniendo cistos con espermatocitos primarios y secundarios (Fig. 14 C – E) y la tercera zona y la más predominante en el testículo es la que ocupan los lóbulos con cistos con espermatidas redondas y espermatidas en espermiogénesis hacia la región posterior y ventral (Fig. 14D - G). Nos fue posible obtener una larva macho de 9 meses cuya longitud total fue de 18 cm y peso de 40.1g. En la disección pudimos ubicar a los testículos en la región media posterior del cuerpo, son estructuras pareadas unidas a la pared dorsal del cuerpo. Se encuentran estrechamente relacionados con los cuerpos grasos y empiezan a ser evidentes los lóbulos que los constituyen (Fig. 15A). Los cortes histológicos en sentido longitudinal de las gónadas de estos organismos muestran la regionalización céfalo caudal y dorso ventral característica (Fig. 15B - F). En estos organismos el proceso de espermatogénesis es más avanzado y la mayor parte de la gónada ya muestra lóbulos con cistos en los que el proceso de espermiogénesis ya está ocurriendo (Fig. 15C - F). En algunos lóbulos más posteriores se observa un mayor avance de la espermiogénesis de tal forma que los lóbulos de la región ventro caudal son más distendidos ya se observan los cistos con espermatozoides en formación y más posteriormente lóbulos en donde ya ocurrió la espermiación; esto es, la liberación de los espermatozoides completamente formados fuera de los cistos aun dentro de los lóbulos, también se pueden ver restos de las células de Sertoli (Fig. 15F). Un poco más hacia la región posterior y hacia la región ventral se llegan a ver lóbulos con restos de espermatozoides y/o algunas células o restos de estas. Estos lóbulos están rodeados por las células de Leydig del tejido intersticial, estas son de forma cúbica y algunas son irregulares, estas células proliferan y algunos lóbulos se ven rodeados de dos o más capas de este tipo celular y la luz del lóbulo se reduce quedando en su interior solo restos celulares y de espermatozoides (Fig. 15F).

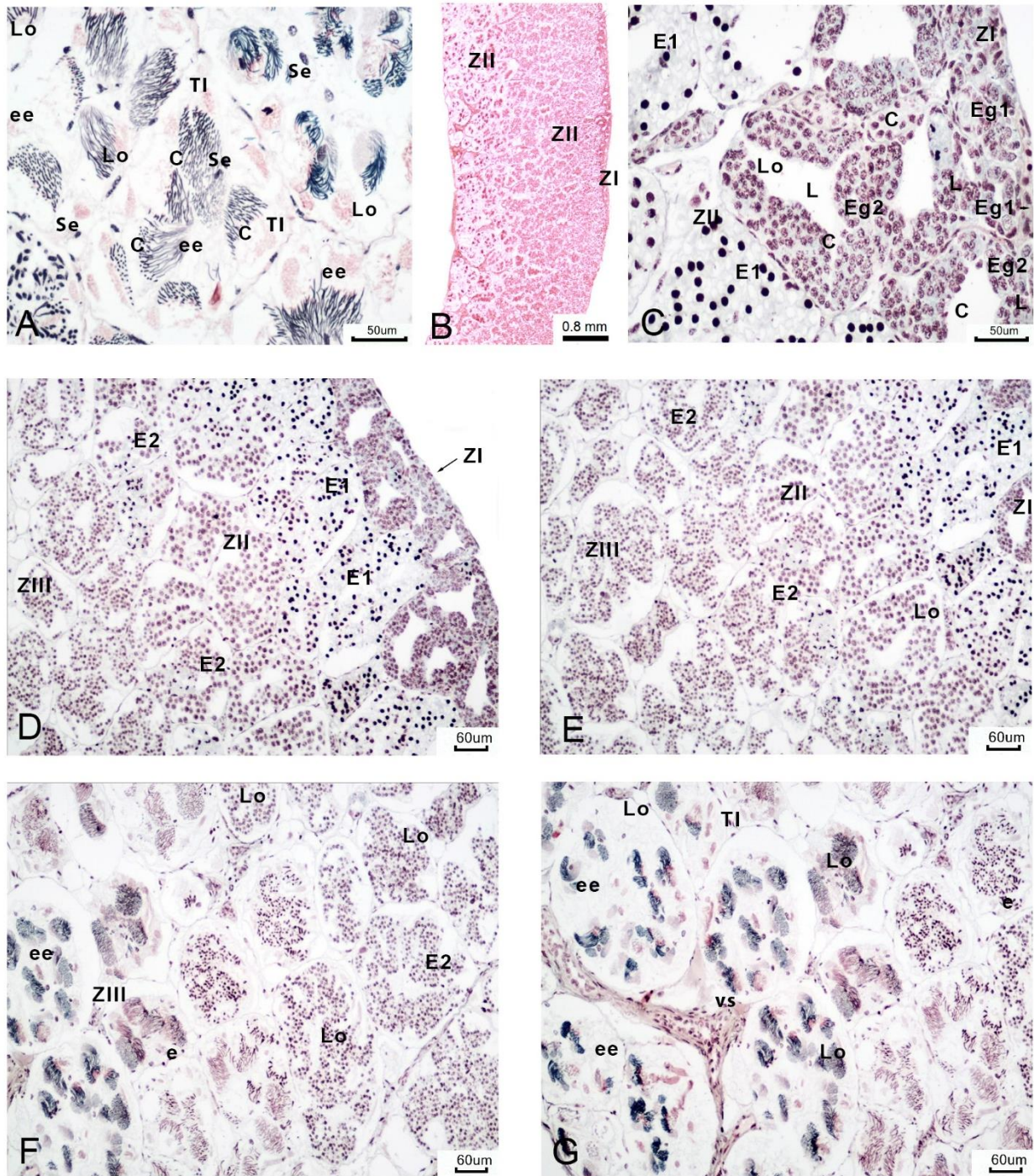


Fig. 14 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 9 meses de desarrollo. A Acercamiento de la Zona testicular III (ZIII) con cistos (C) de espermatidas en proceso de espermiogénesis (ee) dentro de los lóbulos (Lo). Note los núcleos de células de Sertoli (Se) que envuelven a cada cisto (C) y el tejido intersticial (ti) que separa los lóbulos (Lo). B Histología panorámica del testículo y zonación del mismo (ZI, ZII y ZIII). C Acercamiento de la zona testicular I (ZI) con grupos de espermatogonias primarias (Eg1) en proliferación cercanas a la pared testicular y espermatogonias secundarias (Eg2) en cistos (C) dentro de los lóbulos (Lo) y Zona II (ZII) con cistos de espermatocitos primarios (E1). D y E Zonación testicular (ZI), (ZII) y (ZIII). F y G Zona testicular III (ZIII) con espermatidas redondas (e) y en proceso de espermiogénesis (ee). Note el tejido intersticial (TI) y a vascularización (vs) en este entre los lóbulos testiculares (Lo). Tinción con Hematoxilina-Eosina.

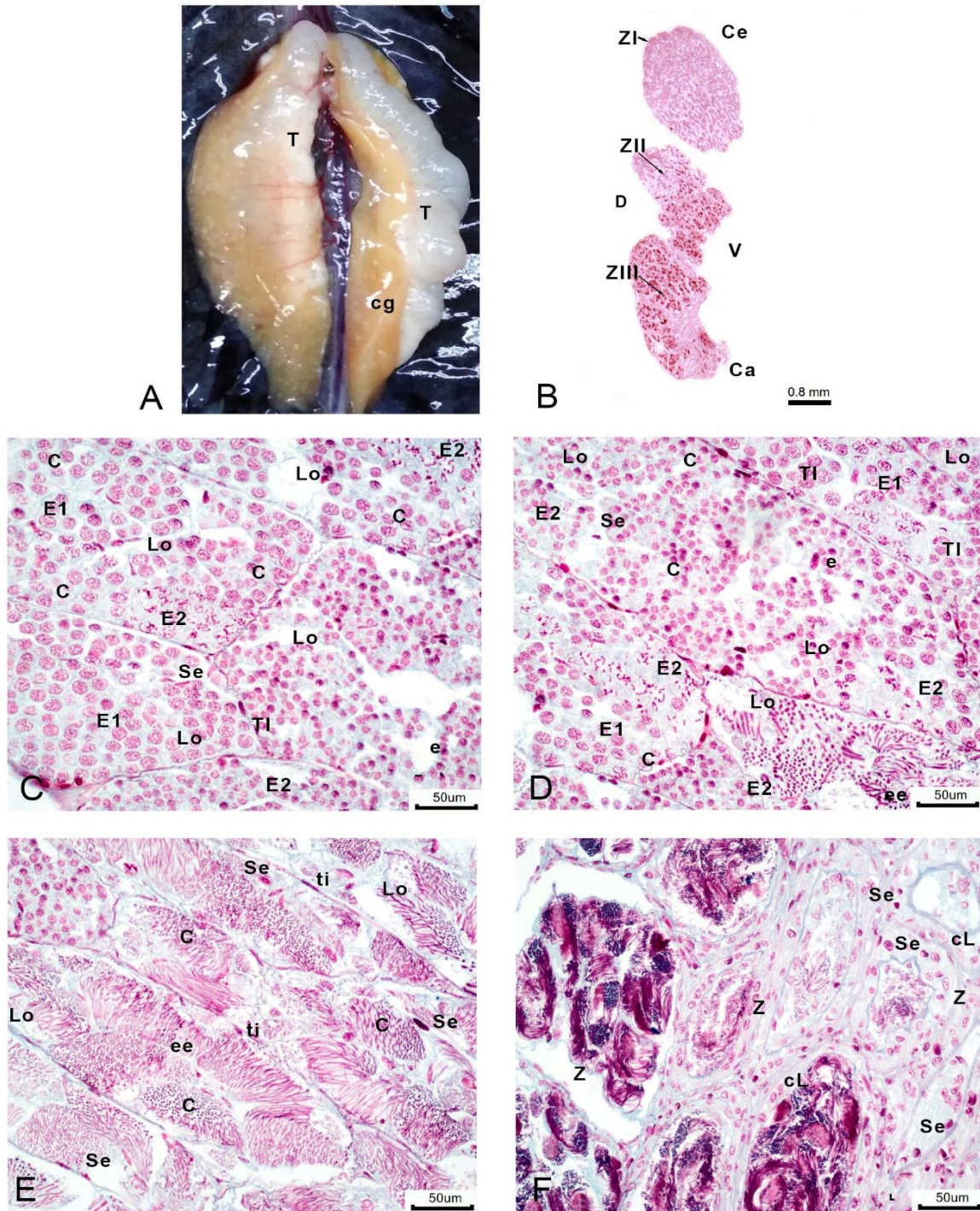


Fig. 15 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 9 meses de desarrollo. A disección de los testículos (T) en donde se pueden identificar los lóbulos y su relación con los cuerpos grasos (cg). B Histología panorámica de los diferentes lóbulos testiculares (Lo), note la regionalización céfalo – caudal y dorso ventral (ZI, ZII y ZIII). C y D Lóbulos testiculares con cistos de espermatocitos primarios (E1), secundarios (E2) y espermatidas en espermiogénesis temprana (ee). Note el tejido intersticial limitante (TI) entre los lóbulos y los núcleos de las células de Sertoli de los cistos. E lóbulos con cistos de espermatidas en espermiogénesis (ee), núcleos de células de Sertoli (cS) y tejido conjuntivo intersticial (ti) que rodea los lóbulos. F Espermiación-espermatozoides(Z) libres dentro de los lóbulos (Lo) y lóbulos con restos de espermatozoides en su reducida luz y rodeados de las células de Leydig (cL). Tinción con Azul Alciano - Rojo Nuclear.

Testículo de larvas de 10 meses de desarrollo

La morfología histológica de los testículos de 10 meses de desarrollo de algunos machos revela que el proceso de espermiación es dominante. La región cefálica más dorsal presenta lóbulos vacíos con reducida luz y algunos con restos de espermatozoides (Fig. 16A, B); en esa disposición hacia la región ventral los lóbulos presentan aun espermatozoides libres (Fig. 16B, D). Son evidentes las células de Leydig que rodean a los lóbulos que aún presentan pocos espermatozoides o restos de estos (Fig. 16C, E, F). Nos fue posible realizar la disección de un macho de 10 meses de desarrollo en octubre, el cual pesó 37 g y su longitud total fue de 18cm. Los testículos de esta edad muestran un aspecto más compacto y con pequeños lóbulos marcados (Fig. 17A), el peso fue de 0.23 g para ambas gónadas y presentaron una longitud de 1.5cm y 1.4 cm derecha e izquierda respectivamente. Histológicamente la zonación o regionalización testicular de nuevo es evidente (Fig. 17B); en la región periférica anterior dorsal se observa el tejido intersticial hipertrofiado con células cúbicas y poliédricas con un aspecto secretor (Fig. 17B, C). Hacia la región más posterior y ventral se pueden observar aun lóbulos con espermatozoides libres pero la gran mayoría solo presentan restos de las células de Sertoli y restos de espermatozoides (Fig. 17 B – F). Son notables las células de Leydig que rodean los lóbulos en dos o tres capas y algunas células presentan grandes vacuolas y núcleos pignóticos (Fig. 17D, F). Hacia la región más posterior y ventral de la gónada se observa la tercera región o zona, en la cual los lóbulos con restos celulares han disminuido en tamaño y el tejido intersticial que rodea a los lóbulos es más reducido y consta de una capa de células con núcleo central y citoplasma irregular y tiene un aspecto de reabsorción (Fig. 17 E G). Esta zonación revela que toda la gónada tiene una función de producción de espermatozoides y conforme va avanzando la espermiación los lóbulos son rodeados por las células de Leydig las cuales proliferan, se hacen secretoras y después entran a un proceso de regresión y/o de reabsorción.

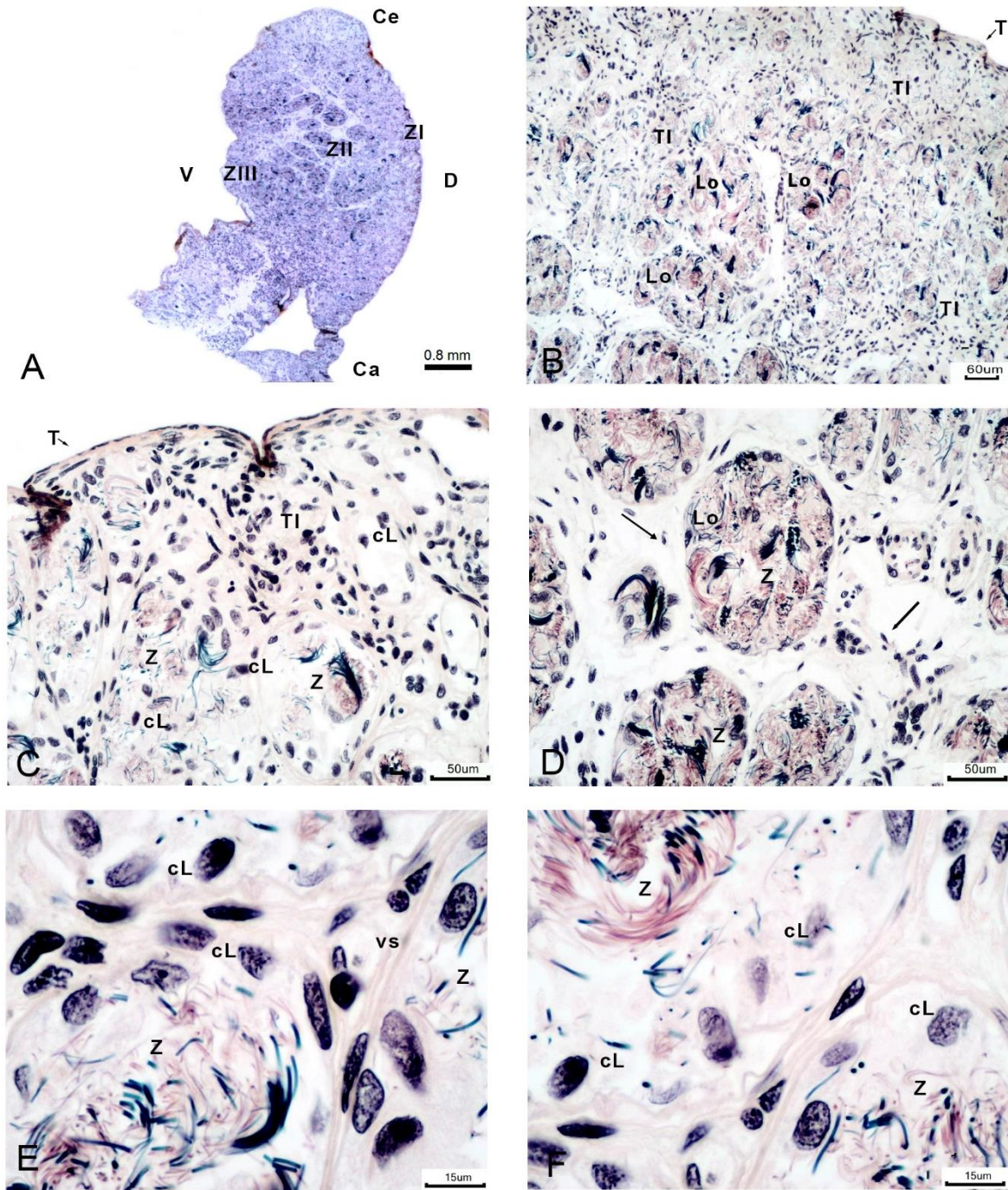


Fig. 16 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 10 meses de desarrollo. A Histología panorámica del testículo en el que se denotan las diferentes zonas (ZI, ZII y ZIII) con disposición cefálica y dorsal hacia la región caudal y ventral relacionadas con la espermiación. B y C Disposición del testículo en la región dorsal hacia la ventral en donde se puede ver la túnica albugínea en la periferia (T) y los lóbulos (Lo) vacíos con luz reducida en los que ya ha ocurrido la espermiación y/o con restos de espermatozoides (Z) rodeados de una o más capas de células de Leydig (cL) lo que estructura el tejido intersticial (TI). D Región de lóbulos con espermatozoides en donde el tejido conjuntivo intersticial circundante es más laxo (fechas). E y F Lóbulos en los que ha ocurrido la espermiación o solo quedan restos de espermatozoides, ya se pueden ver las células de Leydig (cL) poliédricas irregulares rodeándolos y el tejido conjuntivo fibroso entre los lóbulos y vasos sanguíneos (vs). Tinción con Hematoxilina – Eosina.

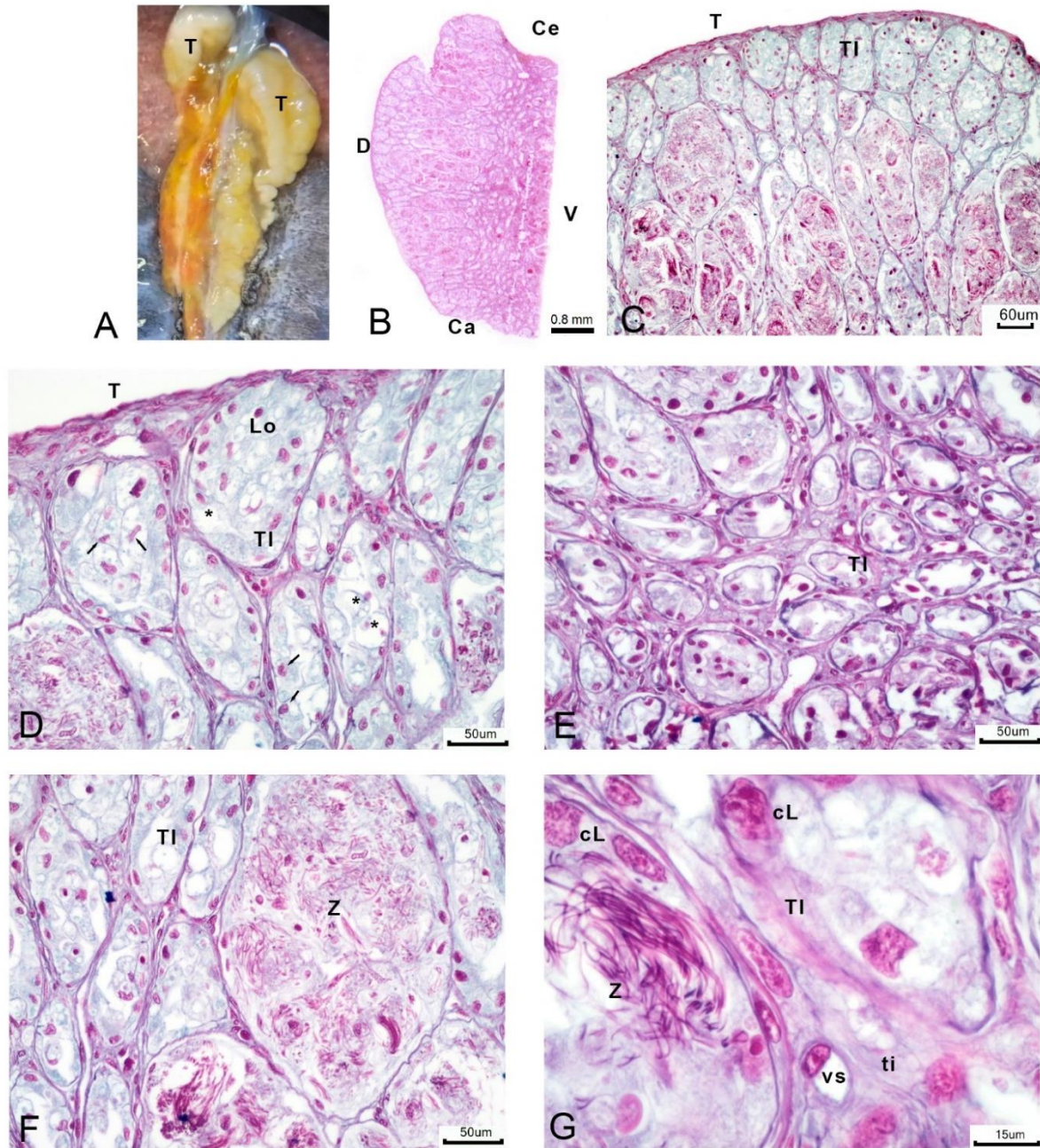


Fig. 17 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 10 meses de desarrollo. A disección del testículo compacto y lobulado. B Histología testicular panorámica denotando la regionalización. C Túnica albugínea rodeando al testículo (T), tejido intersticial periférico (TI) con una disposición dorsal en la gónada y lóbulos con espermatozoides libres hacia la región ventral. D Detalle de la túnica albugínea (T) y de la zona del tejido intersticial (TI) con núcleos picnóticos (flecha) y citoplasma vacuolado (*). E Detalle del tejido intersticial (TI) en reabsorción, note la reducción en el diámetro de los lóbulos y en las células intersticiales que los rodean. F Contraste entre los lóbulos vacíos estructurando el tejido intersticial (TI) con apariencia secretora y los lóbulos con restos de espermatozoides (Z) libres en la luz. G Detalle de lóbulos sin espermatozoides y solo restos celulares rodeado de células intersticiales y lóbulos (Lo) aun con restos celulares y de espermatozoides (Z) rodeado de una capa de células de Leydig (cL) limitados por tejido conjuntivo (ti) fibras y vasos sanguíneos (vs). Tinción con Hematoxilina – Eosina.

Testículo de larvas de 12 meses de desarrollo

Las medidas somáticas de uno de los machos obtenidos de 12 meses de desarrollo (diciembre) fueron 48.8 g de peso y 19 cm de longitud total, macroscópicamente sus gónadas tienen un color blanquecino y son evidentes los lóbulos, los reducidos cuerpos grasos se observan adosados a las gónadas y en la región más posterior o caudal de los testículos son notorios también los conductos de Wolff, los cuales son largos y plegados conductos con melanocitos evidentes (Fig. 18A). Las medidas de las gónadas fueron 0.28 g y 0.29 g de peso y longitud de 1.8 y 1.9 cm derecha e izquierda respectivamente (Tabla 1).

La histología revela que de nuevo en estas gónadas es visible la zonación (Fig.18B), esto es que de acuerdo a la actividad gonadal se marcan regiones, puesto que en la región más cefálica y dorsal de la misma se reinicia el proceso de espermatogénesis en la zona I haciéndose evidentes las espermatogonias primarias y la formación de los lóbulos con las células iniciales del proceso; esto es, espermatogonias secundarias, espermatoцитos primarios y secundarios (Figs.18C - D) y en algunos lóbulos más ventrales cistos con espermátidas en espermiogénesis (Fig. 18E, F). Un poco más hacia la región posterior y en la periferia dorsal pegada a la pared testicular se puede observar una pequeña región con espermatogonias primarias en proliferación estrechamente relacionadas con las células somáticas (Fig. 19A y B) y hacia la región ventral se puede identificar la segunda zona testicular ya que en los lóbulos se observan quistes con espermátidas al final del proceso de espermiogénesis y lóbulos con espermatozoides maduros así como lóbulos en los que ya ha ocurrido la espermiación en los que solo se ven restos celulares y de espermatozoides (Fig. 19 C).

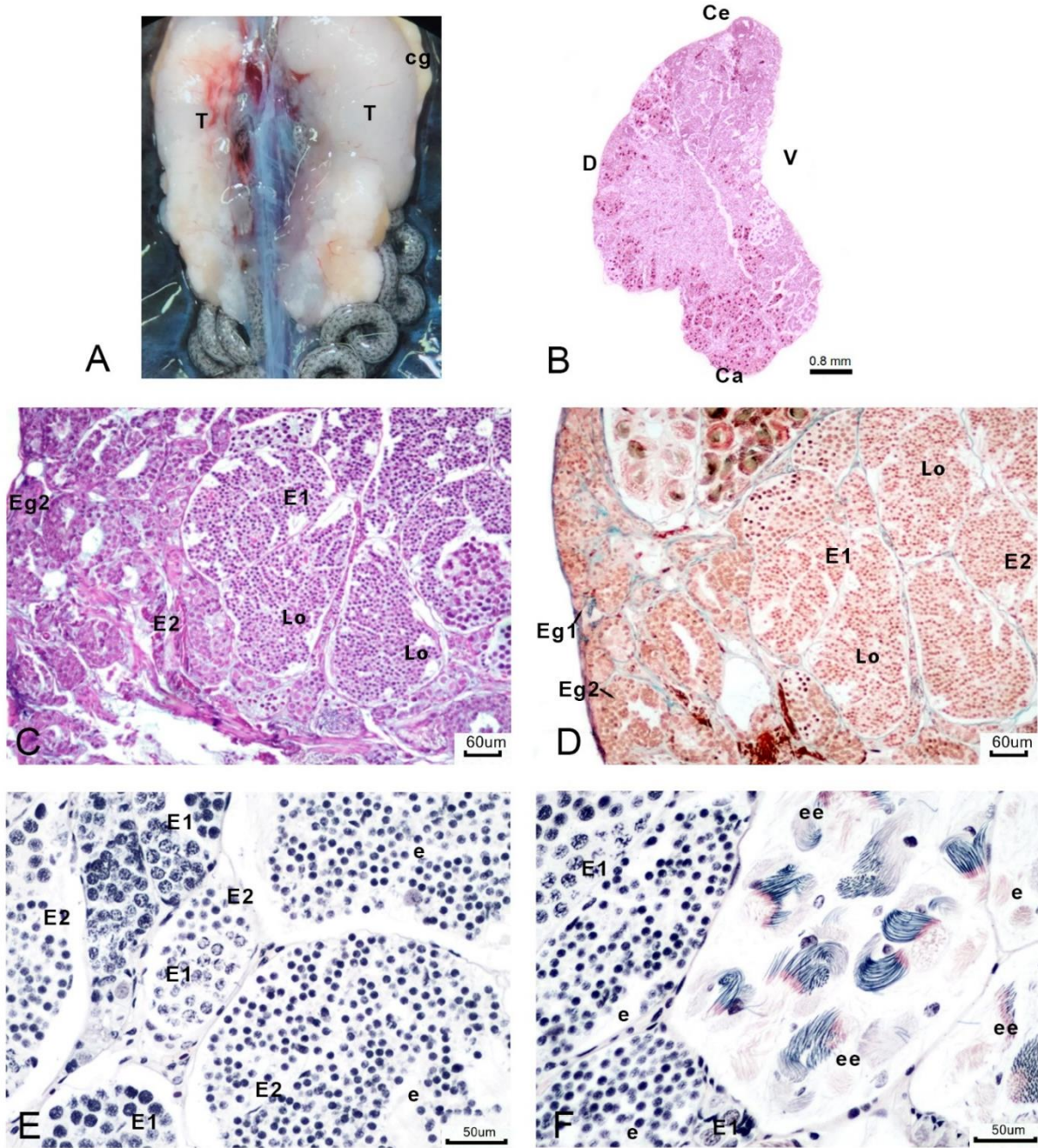


Fig. 18 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 12 meses de desarrollo. A. Testículos lobulados (T), cuerpos grasos (cg) y conductos de Wolff (CW). B Histología panorámica del testículo y su regionalización, región cefálica (Ce), caudal (Ca), dorsal (D) y ventral (V). C y D Región cefálica y dorsal del testículo, lóbulos (Lo) con células iniciales del proceso de espermatogénesis, espermatogonias primarias (Eg1) y secundarias (Eg2),espermatoцитos primarios (E1) y secundarios (E2). E y F Detalle del proceso de espermatogénesis con lóbulos con cistos con espermatoцитos primarios (E1) y secundarios (E2), espermátidas (e) y en algunos cistos se inicia la espermiogénesis (ee). B, C Tinción con Azul Alciano-Rojo Nuclear. D Tinción con Tricrómica de Masson, E,F Tinción con Hematoxilina – Eosina.

Estos lóbulos están rodeados de una capa de células de Leydig cúbicas, pero más ventralmente este tejido se transforma haciéndose evidente la tercera zona testicular, en la cual las células de Leydig que rodea a los lóbulos vacíos se hacen poliédricas de contornos irregulares, la luz se cierra y el tejido intersticial se hipertrofia tiene un aspecto secretor, el cual es transitorio y característico de este grupo de anfibios, el cual más tarde se reabsorbe (Fig. 18 D). Entre este tejido se pueden observar aun algunos lóbulos con cistos de espermatozoides o algunos solo con restos; asimismo se observan lóbulos con espermatogonias primarias o solo grupos de espermatogonias entre el tejido intersticial (Fig. 19F, G). Esta estructura testicular hace evidente que mientras un ciclo espermatogénico está finalizando en la región posterior y ventral, en la región más cefálica y dorsal de la gónada el siguiente ciclo se está iniciando, de tal forma que se puede ver que el proceso de espermatogénesis es continuo y lo que define o marca la zonación testicular.

Otro organismo de 12 meses de desarrollo presentó un peso de 62.14 g y una longitud total de 20.5 cm, en la disección el aspecto de las gónadas fue voluminoso, lobuladas, turgentes y de coloración blanco lechoso, los cuerpos grasos que están estrechamente relacionados a todo lo largo de las gónadas también son muy voluminosos y su coloración es amarillenta; asimismo también son evidentes las series de conductos eferentes y los conductos de Wolff (Fig. 20A).

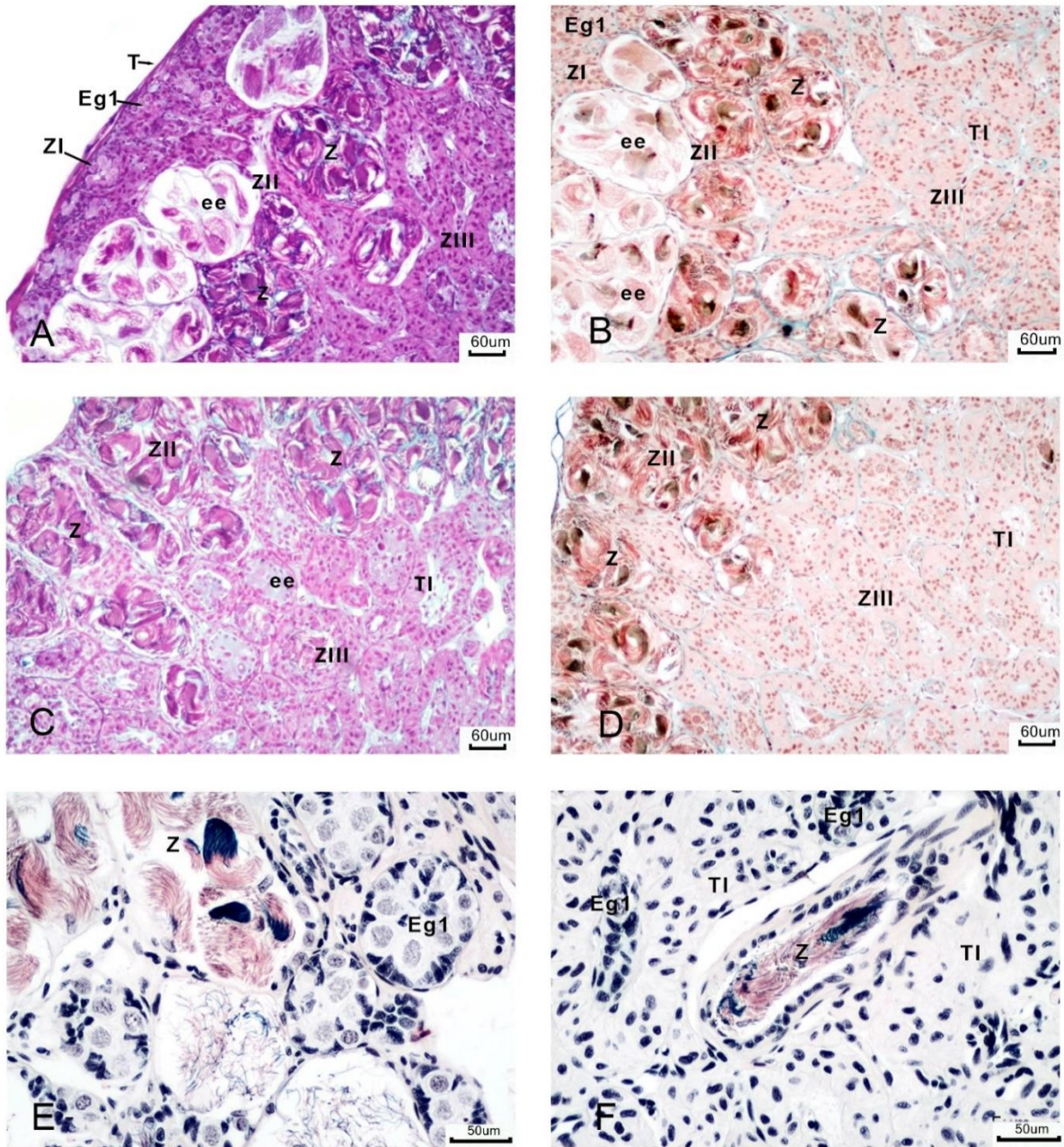


Fig. 19 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 12 meses de desarrollo. A y B Zonación testicular, Zona I (ZI) Espermatogonias primarias (Eg1) en la pared testicular por debajo de la túnica albugínea (T) en la región dorsal del testículo, Zona II (ZII) más ventralmente se observan lóbulos con cistos al final del proceso de espermiogénesis (ee) y lóbulos repletos de espermatozoides (Z), y la zona III (ZIII) con lóbulos vacíos o con restos de espermatozoides lo que estructura el tejido intersticial (TI) de aspecto secretor. C y D Zona II (ZII) con lóbulos con espermatozoides (Z) y Zona III (Z III) donde es evidente el tejido intersticial (TI). E y F. Lóbulos con restos de espermatozoides y grupos de espermatogonias primarias (Eg1) entre el tejido intersticial(TI), note en F un conducto testicular con espermatozoides (Z) entre el tejido intersticial (TI) así como espermatogonias primarias (Eg1) aisladas o en grupos en el mismo. A y C Tinción con Azul Alciano-RojoNuclear. B,D Tinción con Tricrómica de Masson. E y F Tinción con Hematoxilina – Eosina.

La histología nos revela un activo proceso de espermatogénesis y de nuevo es posible ver la zonación testicular; esto es, la zona cefálica dorsal con un aspecto más celular ya que en los lóbulos de esta región se observan las células iniciales del proceso de espermiogénesis, esto es espermátidas redondas (Figs. 20B, C; 21A, B), hacia la región más posterior y ventral se observa la segunda zona testicular, en donde los lóbulos contienen cistos con espermátidas es proceso de espermiogénesis (Fig. 20C, D; 21A - C), cabe hacer notar que los lóbulos de esta región están rodeados de fibras del tejido conjuntivo y se pueden ver algunos núcleos escamosos periféricos a los lóbulos los cuales pueden ser núcleos de células peritubulares, posteriormente, así como más ventral la tercera zona y la más predominante en donde se pueden identificar los lóbulos con espermatozoides libres (Figs. 20E, F; 21E, F) en los que llama la atención que estos lóbulos ya son rodeados de una capa de células cúbicas uniformes, estas son las células de Leydig. Cabe hacer notar también que en algunos lóbulos ubicados más ventralmente casi en la periferia de la gónada en los que ha ocurrido la espermiación (zona contraria a donde se inició el proceso de espermiogénesis), en donde solo se ven restos de las células de Sertoli (Se) y de espermatozoides en la luz (Z) y las células de Leydig cúbicas o irregulares rodeándolos externamente (Fig. 20F; 21F). En gónadas de larvas de 12 meses de desarrollo, es notable que entre los organismos puede haber diferencias en peso y longitud, pero el siguiente ciclo del proceso de espermatogénesis se da en un momento muy similar con un menor o mayor grado de avance.

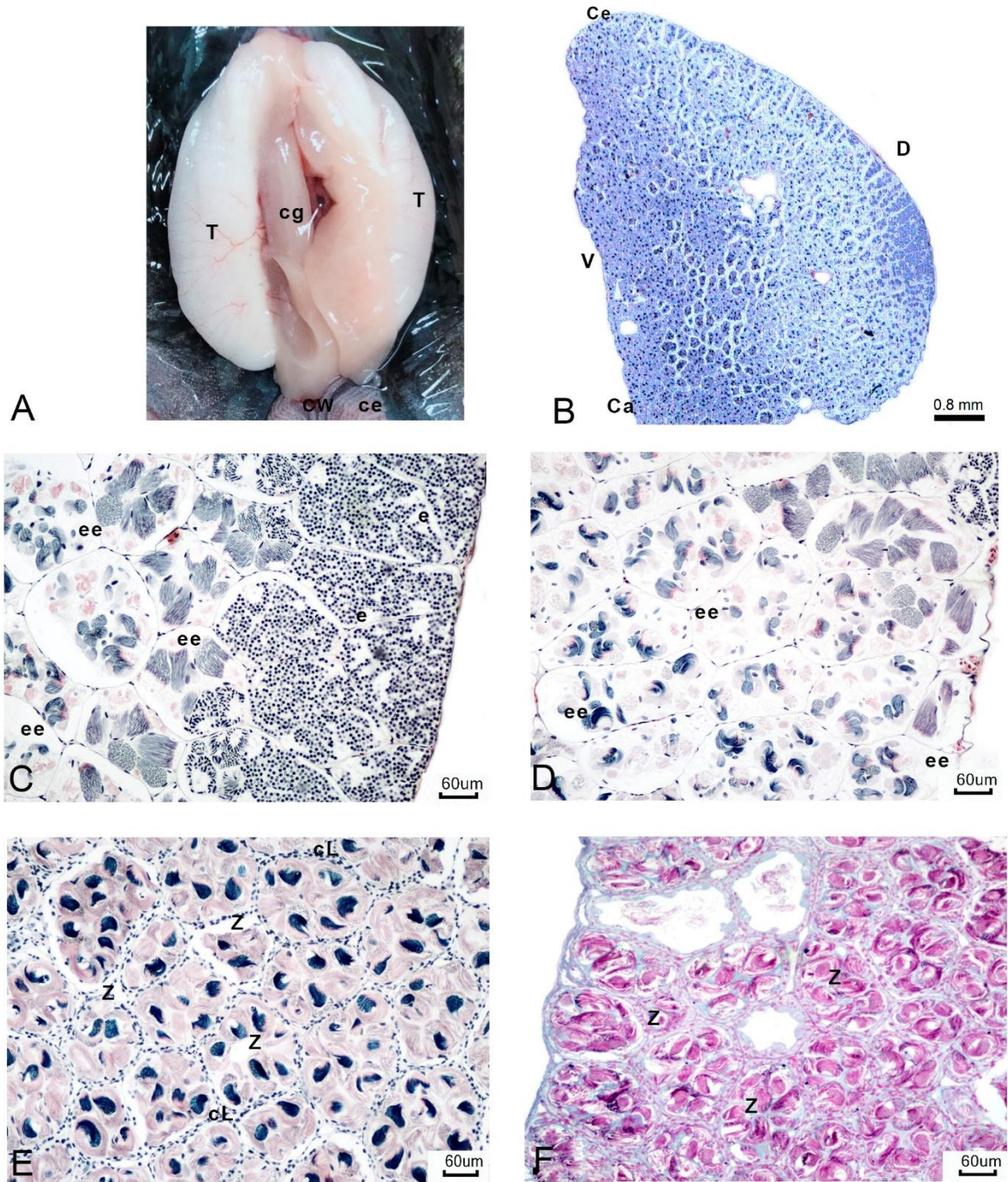


Fig. 20 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 12 meses de desarrollo. A Disección de los testículos (T), cuerpos grasos (cg), conductos eferentes (ce) y conductos de Wolff (CW). B Histología panorámica del testículo y sus diferentes regiones, cefálica (Ce), caudal (Ca), dorsal (D) y ventral (V). C Región dorsal del testículo que denota la zona con lóbulos que contienen cistos de espermátidas redondas (e) y la segunda zona con lóbulos los cuales contienen espermátidas en espermiogénesis (ee). D Lóbulos de la segunda zona con cistos de espermátidas en espermiogénesis (ee). E y F tercera zona testicular con lóbulos con una gran abundancia de espermatozoides en la luz (Z), se pueden observar una capa de células de Leydig (cL) rodeando a cada uno de los lóbulos. Note que en algunos lóbulos más ventrales ya ha ocurrido la espermiación y solo se observa en su luz restos celulares y de espermatozoides. C, D y E Tinción con Hematoxilina – Eosina. B, F Tinción con Azul Alciano-Rojo Nuclear.

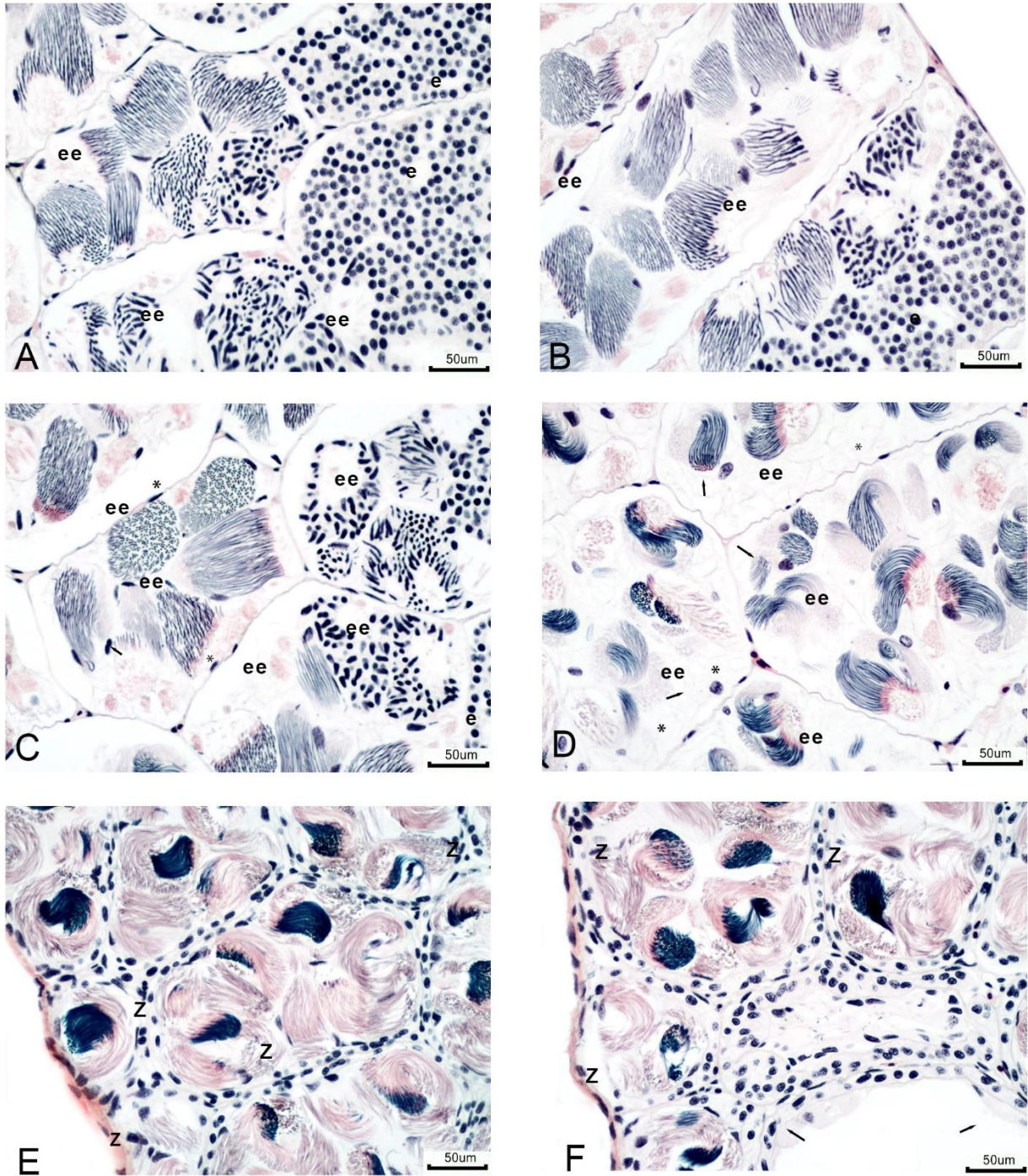


Fig. 21 Testículo de *Ambystoma mexicanum* de 12 meses de desarrollo. A, B y C Zona del testículo donde se pueden ver lóbulos con cistos que contienen espermatidas (e) y espermatidas en proceso de espermiogénesis (ee), note los núcleos de las células de Sertoli (flecha) que rodean a cada cisto, el tejido intersticial (t) que rodea a los lóbulos así como los núcleos de las células peritubulares (*). D Zona testicular con lóbulos con cistos que presentan espermiogénesis tardía. E y F. Tercera zona del testículo con lóbulos repletos de espermatozoides (Z) y con una capa de células de Leydig rodeándolos (cL). Note que en algunos lóbulos ya ha ocurrido la espermiación, esto es, ya no presentan espermatozoides solo restos de estos o restos de las células de Sertoli (flecha). Tinción con Hematoxilina – Eosina

DISCUSIÓN

El axolote *Ambystoma mexicanum* es un anfibio endémico de México que ha llamado mucho la atención por su condición pedomórfica y su capacidad regenerativa, por lo que ha sido ampliamente utilizado en trabajos de investigación en este sentido. Los avances recientes en herramientas tecnológicas y genómicas que se pueden aplicar a los sistemas de salamandras han permitido a los investigadores abordar modelos en biología del desarrollo, evolución y regeneración en estos organismos (McCusker et al., 2021). La investigación más reciente en estos aspectos y de manera muy especial en *Ambystoma mexicanum*, se puede ver en McCusker et al., (2021).

Cabe mencionar que *A. mexicanum* actualmente es una especie en peligro crítico o amenazada. Con relación a este punto, comparativamente las proporciones de mamíferos y aves solo son del 10 % y el 5 %, respectivamente; en anfibios el 21 % de las especies están en peligro crítico o en peligro de extinción y este alto nivel de amenaza podría estar subestimado, ya que el 23 % de los anfibios no han podido ser evaluados por falta de datos (Baillie et al., 2004).

En cuanto a la preservación, especialmente en el caso de los anfibios, los cuerpos de agua, humedales y arroyos en áreas urbanas y suburbanas a menudo están limitados en cuanto a su idoneidad para estos organismos con requisitos de hábitat más específicos porque muchos están repoblados artificialmente con peces exóticos, o reciben canales de agua contaminada (fertilizantes, sedimentos, pesticidas, grasa y aceite de la superficie de la carretera, metales pesados), y a la vez estos humedales tienen altas tasas de visitas humanas e iluminación artificial, lo que interrumpe la actividad reproductiva (Hammer y McDonnell, 2008). Este puede ser el caso particular de *A. mexicanum*, por lo que es importante tomar en cuenta que la mayoría de los ejemplares ya no se encuentran en su hábitat natural en los canales de Xochimilco, debido a la

perdida de hábitat, la introducción de especies depredadoras, contaminación del agua y la continua compra ilegal de esta especie; para comida, medicamentos o como mascota. Esta situación ha sido irreversible, por lo que la mayoría de los trabajos de investigación y conservación actualmente se realizan bajo condiciones de laboratorio. En este sentido son importantes este tipo de estudios para así reproducirlos satisfactoriamente, aumentando el número de organismos y en un momento dado posibles introducciones a zonas silvestres monitoreadas (Griffiths et al., 2004).

De acuerdo con Zornoza (2011) la reproducción cumple un papel fundamental en la historia de vida de los seres vivos y se considera dentro de los aspectos más importantes para la supervivencia de una especie y en este sentido los anfibios han desarrollado una gran variedad de estrategias reproductivas (Duellman y Trueb, 1986). Como ya se ha mencionado anteriormente los anfibios muestran ciclos de vida muy diversos, en estos el desarrollo puede ser directo, cuando ocurre *in ovo* y un juvenil eclosiona directamente, o bifásico, donde una la larva acuática eclosiona y luego sufre una metamorfosis seguida de una maduración. Una tercera estrategia, sólo encontrada en urodelos, es más compleja ya que las larvas alcanzan la madurez sexual directamente sin metamorfosis, condición conocida como pedomorfosis. La cual como derivada del ciclo de vida bifásico involucra retención de un conjunto completo de caracteres somáticos larvales (branquias, aleta caudal), conservan su hábitat acuático y además puede ser facultativa u obligada. Este es el caso o condición particular de *Ambystoma mexicanum* (Tribondeau et al., 2021).

Diferencias entre machos y hembras en *A. mexicanum*

Tolosa et al., (2014) mencionan que el dimorfismo sexual es el resultado de presiones selectivas divergentes entre los sexos que promueven diferencias morfológicas y de comportamiento (Howard 1981).

La condición tan especial de pedomorfosis en *A. mexicanum*, nos llevó a realizar un análisis histológico de las gónadas a través del tiempo de desarrollo para determinar el momento preciso en que se alcanza la madurez sexual en ambos sexos. Partimos de organismos en los que ya conocíamos el estado de la gónada de acuerdo con Mendoza et al. (2017), esto es después de los tres meses de desarrollo. Las tablas 3 y 4 resumen nuestros resultados para hembras y machos respectivamente. En donde podemos ver que los parámetros somáticos considerados (longitud, peso y el índice gónado somático - IGS) se incrementan con el tiempo y esto está estrechamente relacionado con cambios en las células de la línea germinal y el proceso de gametogénesis como un índice de la actividad gonadal lo que marca el inicio de la madurez sexual.

En los ovarios de hembras de 6 y 8 meses de desarrollo el evento más sobresaliente es el crecimiento primario; esto es, los ovocitos en etapa de desarrollo 3 se incrementan en número y tamaño, pero es hasta los 9 y 10 meses cuando la longitud es de 17.5cm y 49.5g de peso, cuando se inicia en los ovocitos el crecimiento secundario, ya que es evidente el inicio de la vitelogénesis en ovocitos en estadio de desarrollo 4. Posteriormente es hasta los 12 meses con una longitud de 19cm y 50.1g de peso, cuando ya es posible observar ovocitos en estadio de desarrollo 6 con características de maduración. En los machos la espermatogénesis se inicia a los 7 - 8 meses de desarrollo cuando presentan una talla mínima de 14.5cm y 26.3 g de peso, cuando ya hay un avance en la espermiogénesis, pero es hasta los 9 - 10 meses de desarrollo con una longitud de 18 cm y 36.83 g de peso, cuando se inicia el proceso de espermiación y a los 12 meses cuando su talla es de 19cm y su peso de 48.8g ya se observa espermiogénesis predominante y un avance en el segundo ciclo de espermatogénesis. Es evidente que los machos inician y alcanzan la madurez sexual con tallas menores a las de las hembras (14.5cm y 18cm vs 17.5cm y 19.5cm respectivamente). Zornosa (2011) indica que algunas investigaciones relacionan directamente el tamaño corporal y la edad tanto en anfibios como en reptiles, en la mayoría de las especies estas

dos variables están estrechamente relacionadas (Halliday y Verrell, 1988), y en muchas ocasiones el tamaño corporal está relacionado con la madurez sexual Gramapurohit et al. (2004) y Guarino et al. (2003).

Las diferencias entre el tamaño corporal de machos y hembras de *A. mexicanum* y las características que nos indican madurez sexual coinciden con literatura previa. El dimorfismo sexual se expresa por medio del tamaño corporal y en un análisis (90% de especies evaluadas) se ha encontrado que la mayoría de las hembras de anfibios tienen tamaños corporales más grandes que los machos; por lo tanto, las hembras generalmente alcanzan la madurez sexual en tamaños más grandes (Zornosa, 2011; Tolosa et al., 2014). Por otro lado, en el caso de los machos un menor tamaño pudiera tener relación con ciertas limitantes energéticas, porque la defensa territorial y el comportamiento, pueden requerir energía que de lo contrario se utilizaría para el crecimiento (Woolbright, 1983 en Tolosa et al., 2014).

Asimismo, hay una coincidencia si consideramos de acuerdo con Zornoza (2011), particularmente en el caso de los anfibios, la madurez se establece cuando los machos son capaces de fertilizar los huevos puestos por las hembras y éstas tienen la capacidad de producirlos (Hunter y Murcia, 1962).

La diferencia de tamaños corporales entre hembras y machos se atribuye a que durante el tiempo requerido para alcanzar la madurez sexual las hembras aumentan su tasa de crecimiento ya que asignan mayor parte de los recursos consumidos para la reproducción (Sarasola-Puente et al., 2010), debido a que la producción de ovocitos implica mayor energía que la producción de espermatozoides (Hartel et al., 2007). Asimismo, Zornosa (2011) argumenta que hembras de gran tamaño producen huevos más grandes o tienen puestas mayores, además tienen mayor probabilidad de tener más de una puesta durante la época reproductiva (Rodríguez da Silva y

Rossa-Feres, 2010). En el caso de las hembras la fecundidad se expresa en función del tamaño corporal por lo que es importante considerarlo.

Adicionalmente la madurez sexual puede identificarse por medio de la anatomía de la especie, ya que en el momento en que alcanzan este estado se evidencian estructuras secundarias como el prepólex y el saco vocal en machos en el caso de anuros (Gramapurohit et al., 2004; Guarino et al., 2003). En urodelos como *Triturus alpestris* y *A. mexicanum* se han basado en el dimorfismo sexual característico en la zona pericloacal, la cual presenta una hiperplasia en el macho en comparación con la hembra (Doenoël y Joly, 2000; Ramírez-Macal et al., 2022).

Tolosa et al. (2014) de acuerdo con Roff (1992) y Stearns (1992), mencionan que la edad, el tamaño mínimo de madurez y el dimorfismo sexuales son importantes características de la historia de vida, útiles para estudiar y comprender la dinámica poblacional de cualquier especie, además son parámetros importantes para determinar su aptitud.

La edad en la que un organismo alcanza la madurez sexual es un parámetro importante en su historia de vida, relacionado con rasgos como el tamaño y longevidad, al mismo tiempo influenciado por factores ambientales que afectan las tasas de crecimiento y desarrollo de las gónadas. Asimismo, se ha encontrado que la madurez sexual se alcanza a edades más tempranas en temperaturas cálidas en ambientes no estacionales; esto quiere decir que, aunque las estrategias de historia de vida afectan el tiempo de maduración, el clima puede retrasar o acelerar el desarrollo (Gamble et al., 2007).

Características gonadales

Gónadas de larvas hembras

El ovario es la estructura donde ocurre el proceso de ovogénesis, es decir, el desarrollo de ovocitos desde la ovogonia para dar lugar a ovocitos maduros, los cuales son ovulados hacia los oviductos, todo bajo un control endócrino que conducen a la secreción de hormonas sexuales femeninas y la regulación de cambios ováricos esenciales para la reproducción (Uribe, 2003). Este importante proceso nos ha sido posible observarlo en larvas de *A. mexicanum* y la estructura histológica de la gónada en este organismo coincide con lo registrado en otras especies de anfibios, y de manera especial con los estudios en urodelos adultos realizados por Uribe (2011) en *A. mexicanum* y *A. dumerilii*.

En la presente investigación a lo largo de los meses en que fueron analizados los ovarios de las larvas de *A. mexicanum* muestran cambios importantes en el aumento del tamaño, reflejo del incremento del número y tamaño de los ovocitos en desarrollo. El cambio más significativo ocurre en larvas de 9 meses de edad, ya que se inicia el crecimiento secundario y con ello la etapa de vitelogénesis. La vitelogénesis es el proceso que involucra la acumulación gradual de vitelo en el citoplasma del ovocito y por lo tanto crecimiento, desarrollo y maduración. Esta última evidente por la migración de la vesícula germinal hacia el polo animal entre otras características a los 12 meses de edad. La maduración de los ovocitos comienza cuando estos presentan la vesícula germinal migrada hacia el polo animal (Armstrong y Malacinski, 1989; Uribe, 2011). Se ha registrado que, en condiciones experimentales, las hembras de *A. mexicanum* alcanzan la madurez sexual entre los 12 y 18 meses de edad (Vázquez y Hunab, 2015). La precisión del análisis histológico en la presente investigación nos permite corroborar que los mecanismos que conllevan a la madurez sexual en las hembras de esta especie se inician a los 9 meses de edad y a los doce

meses ya se presentan ovocitos con signos de madurez listos para ser ovulados, esto es al año de su nacimiento. En algunas especies, la ovogénesis requiere más de un año, como se ha descrito en anfibios de ambientes templados y tropicales que se reproducen bienalmente, como los urodelos de los géneros *Desmognathus*, *Plethodon* y *Pseudotriton* (Uribe, 2011).

En este sentido, Ryan y Semlitsch (1998) plantearon la hipótesis de que las salamandras que no se metamorfosean pueden tener más energía disponible para el crecimiento o el desarrollo sexual. Ellos demostraron este punto en un marco experimental en el que los ambystomátidos pedomorfos maduraron antes que los metamórfos. Encontraron los mismos resultados en una población natural del tritón alpino, con la única diferencia de que los tritones alpinos pedomórficos y metamórficos diferían más en edad en la primera reproducción que las salamandras ambystomatidas. De hecho, los tritones alpinos metamórficos por lo general requieren varios años para madurar mientras que los pedomorfos pueden madurar al año (Miaud et al., 2000).

Cabe hacer notar que en el ovario de *A. mexicanum* a los 9 meses de edad los cambios son muy evidentes, además del aumento del tamaño, del volumen, del número y tamaño de los ovocitos en desarrollo lo que marca los lóbulos típicos del ovario. Es evidente a simple vista el cambio de coloración de este órgano y en los ovocitos puesto que ya se ha iniciado el proceso de vitelogénesis y en los de estadio 5 ya también se está acumulando el pigmento de melanina en el polo animal. Es poco conocido el mecanismo en el que la melanina se produce en los ovocitos; pero, según Hughes (1963) en la mayoría de los óvulos de anfibios, los gránulos de melanina se depositan mientras los ovocitos están aún dentro del ovario. Muchas especies de anuros producen huevos pigmentados durante la vitelogénesis (Altig y McDiarmid, 2007- en Goldberg et al., 2020). Con relación a esto Taylor y Hadley (1972) mencionan que uno de los componentes del citoplasma de los ovocitos son los gránulos de pigmento opaco que contienen melanina la cual se sintetiza en el melanosoma durante el desarrollo. Dependiendo de la especie, el color del huevo varía de un

bronceado claro a negro (Stebbins, 1951), lo cual pudiera deberse a la cantidad de melanosomas presentes. La mayoría se encuentran en la capa cortical del hemisferio animal, mientras que el hemisferio vegetal blanco está prácticamente desprovisto de ellos (Taylor y Hadley, 1972).

La histología del ovario en *A. mexicanum* reveló que estas estructuras pigmentarias ocurren a los 9 meses de edad y se encuentran distribuidas al azar en una red de tejido conjuntivo del escaso estroma ovárico, entre los ovocitos o como células individualizadas en el epitelio del ovario. Esto coincide con lo registrado para el anuro *Pseudis minuta* por Goldberg et al, (2020) quienes también han sugerido que, aunque su función no esté clara, puede tener relación con la adquisición de la madurez sexual temprana. Los melanocitos pueden acumularse en las gónadas por un proceso regulado por una vía endocrina (Zieri et al., 2015). La pigmentación ovárica y de los ovocitos parecen ser dos eventos independientes, el primero posiblemente es estimulado por esteroides y el segundo por gonadotropinas. La pigmentación de los ovocitos está presente entre las diferentes especies de anuros, pero los melanocitos ováricos son raros (Zieri et al., 2015), lo que de acuerdo con estos autores indica un proceso diferente que debiera ser abordado.

La melanina presente en el tejido ovárico podría tener funciones relacionadas con la protección del tejido contra los radicales libres o agentes potencialmente tóxicos producidos durante el proceso de degeneración celular (Zuasti et al., 1998; McGraw, 2005 – en Goldberg, 2020). Duellman y Trueb (1986) sugirieron que la presencia de melanina en huevos ovipositados expuestos a la luz solar protege a los embriones durante su desarrollo, tanto de la radiación ultravioleta como de la absorción de calor.

Por lo anteriormente argumentado, si la presencia de melanocitos es un proceso regulado por una vía endócrina estimulada por esteroides y/o gonadotropinas, sugerimos que la presencia de estos cuerpos pigmentarios melánicos en el ovario y ovocitos de *A. mexicanum* muy posiblemente están relacionados con el alcance de la madurez sexual lo que coincide

estrechamente con el inicio de la maduración de los ovocitos a los 9 meses de edad, proceso que también es regulado por una vía endocrina relacionada con esteroides y gonadotropinas (Norris, 2011). Sugerimos también que las células pigmentarias en el estroma o en el epitelio del ovario son las que secretan la melanina y esta entra al ovocito y se organiza dentro del mismo muy posiblemente a través de un proceso de endocitosis y organización en el citoplasma similar al de la vitelogénesis (Taylor y Hadley, 1972).

Norris (2011) hace una amplia revisión del control hormonal de la gónada femenina en anfibios y menciona que en respuesta a la estimulación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH – por sus siglas en inglés), la pituitaria produce la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que inician la gametogénesis y la esteroidogénesis en las gónadas. El desarrollo ovárico está bajo el control de la FSH mientras que la ovulación está regulada por la LH. El principal estrógeno es el 17 β -estradiol (E2) pero los ovarios también producen estrona, DHT y P4. El E2 estimula el desarrollo del oviducto y promueve la secreción una sustancia gelatinosa por las células epiteliales, la cual cubre a los huevos por su paso a través del oviducto en su camino hacia la cloaca y ovoposición final (Norris, 2011). La progesterona de vida corta secretada por el cuerpo lúteo postovulatorio prepara al oviducto para responder a la arginina vasotocina (AVT) liberada de la pars nerviosa de la hipófisis (Guillette, Norris y Norman, 1985 - en Norris, 2011). La AVT estimula las contracciones del oviducto las cuales son esenciales para el proceso de la puesta de huevos (Norris, 2011)

Gónadas de larvas de machos

La estructura histológica de las gónadas de larvas *A. mexicanum* de machos a los siete meses de edad cuando se inicia el proceso de espermatogénesis, coincide con lo que menciona Propper (2011), con base en la revisión de Uribe (2003) y Uribe y Mejía-Roa (2014); esto es, que,

en salamandras dentro de cada lóbulo testicular, hay quistes germinales. Un quiste se forma cuando una espermatogonia llega ser rodeada por una célula de Sertoli que sigue una secuencia de desarrollo sincrónico en la misma etapa de la espermatogénesis y la distribución de los quistes en los lóbulos sigue el sentido del proceso espermatogénico con una secuencia en sentido céfalo – caudal (Uribe y Gracia-Fernández, 2018). Este desarrollo quístico durante la espermatogénesis es similar en todos los anfibios y es una característica primitiva compartida con peces. En la presente investigación, coincidimos con lo que se ha descrito, en *A. mexicanum* el desarrollo de los espermatozoides se produce en una 'ola', comenzando en la región craneal de los testículos con quistes en etapas tempranas de la espermatogénesis y terminando en la región testicular caudal con quistes que contienen espermatozoides en la etapa final de la espermiogénesis (Proper, 2011; Uribe y Mejía-Roa, 2014). La progresión aparente u onda de quistes desde la orientación craneal a la caudal en los testículos probablemente se debe a la formación de nuevas etapas tempranas de quistes en la región testicular craneal (Pudney, 1995) y la en la región caudal se produce la desintegración de los quistes con la espermiación y las células de Sertoli degeneran junto con el tejido lobular después de la espermiación (Uribe, 2003, mencionado por Proper, 2011; Uribe y Mejía-Roa, 2014).

Como hemos mencionado anteriormente, sí efectivamente esta disposición de la distribución de los quistes en el proceso de espermatogénesis craneocaudal ocurre en *A. mexicanum*, pero en la presente investigación hemos observado además otra disposición de la maduración de las células de la línea germinal, la cual se da en sentido dorsoventral a manera de una curva. Esto es la ola del proceso de espermatogénesis en las larvas de esta especie se inicia a los siete meses de desarrollo y ocurre en dos sentidos uno que va de la región craneal hacia la región caudal del testículo y a su vez la disposición que va de la región dorsal a la ventral del testículo. Seguramente esta disposición dorsoventral se da por la tendencia de salida de los

espermatozoides hacia los conductos transversales que se disponen hacia la región ventral de la gónada para conectarse con el riñón. Uribe y Mejía-Roa, (2014) mencionan que el transporte de esperma de los lóbulos testiculares a los conductos de Wolff ocurre a través de las nefronas del riñón genital, que forman conductos transversales y estos conductos transversales corren hacia la región anterior del riñón.

Es importante también hacer evidente la estrecha relación en el proceso de espermatogénesis y los cambios que se observan en las células de Leydig o tejido intersticial en *A. mexicanum*, lo que coincide con lo registrado en las salamandras *Triturus marmoratus* (Fraile, Sáez y Paniagua, 1990), en *Taricha granulosa* (Specker y Moore, 1980), en *Ambystoma dumerillii* y *A. mexicanum* (Uribe y Mejía-Roa, 2014). Propper (2011) indica que el desarrollo del tejido glandular de Leydig sigue a la ola de espermiación y está bajo el proceso de maduración testicular y la estrecha relación física entre los lóbulos testiculares y el intersticio sugiere que hay mecanismos de señalización entre estos tejidos. Las células intersticiales inmaduras que rodean los lóbulos que contienen quistes en proceso de espermatogénesis tienen una apariencia fibrosa. Sin embargo, en la región distal y caudal de los testículos donde ya ha ocurrido la espermiación, estas células y sus núcleos se vuelven hipertrofiados y redondeados y están estrechamente asociados con vasos sanguíneos (Uribe y Mejía-Roa, 2014).

El inicio de la espermatogénesis en *A. mexicanum* a partir de los siete meses de desarrollo y la evidencia del proceso de espermiogénesis y espermatozoides libres a los nueve meses, sugiere que seguramente se ha encendido la regulación endócrina en estrecha relación con los cambios ambientales. De acuerdo con Norris (2011), la FSH estimula la espermatogénesis ya que incide sobre las células de Sertoli para regular el inicio de este proceso (reclutamiento celular, mitosis y meiosis). La LH actúa sobre las células de Leydig del intersticio y estimula la síntesis de

andrógenos. La testosterona (T) y la 5 α -dihidrotestosterona (DHT) son los principales andrógenos secretados por los testículos. Los andrógenos son importantes para la espermatogénesis, la espermiogénesis y especialmente en la espermiación y la alta concentración de andrógenos con el cese de la espermatogénesis. Los andrógenos inducen el desarrollo de características sexuales secundarias, son los encargados de estimular el crecimiento estacional de los conductos eferentes, la hipertrófia del epitelio del conducto deferente y el desarrollo de las glándulas cloacales y juegan un papel estimulante en el comportamiento de apareamiento (Norris, 2011).

En la presente investigación en *A. mexicanum* fue evidente la presencia de espermatozoides desde los 9 - 10 meses de edad en los meses de septiembre - octubre, esto es a fines del verano – principios del otoño, a los 11-12 meses en el otoño – invierno la predominancia en los lóbulos testiculares son los espermatozoides y ya se observa la segunda oleada de producción de estos. Esto coincide con la presencia de hembras de 12 meses de edad en diciembre con ovocitos maduros en los ovarios, lo que indica que la actividad reproductora es predominantemente de invierno, lo que no coincide con lo mencionado por Uribe y Mejía-Roa (2014) ya que registran que las hembras aparecen hasta la siguiente primavera y los machos entonces liberan los espermatozoides que han retenido en su sistema de conductos por varios meses.

Como hemos mencionado anteriormente, la actividad reproductora está regulada por las hormonas, así como por factores ambientales lo que conlleva a periodos de actividad gonadal diferente entre las especies dependiendo del ambiente en donde se encuentren. Se ha visto que en tritones y otras Salamandridae, hay dos picos de andrógenos circulantes estacionales uno en el otoño asociado con el desarrollo de los conductos deferentes y un segundo pico en la primavera durante la reproducción. Otras especies, como *Plethodon jordani* (Woodley, 1994) y la salamandra

tigre *Ambystoma tigrinum* (Norris et al., 1985), presentan sólo un pico de secreción de andrógenos a fines del verano y otoño.

Eisthen y Krause (2012) mencionan que la reproducción en *A. mexicanum* puede variar estacionalmente, como ocurre en muchas otras especies de ambystomidos. Las señales ambientales influyen en el control de la reproducción en los ajolotes, los factores estacionales, como el fotoperíodo y la temperatura del agua, pueden influir en la frecuencia de reproducción. En el laboratorio, y quizás en la naturaleza, machos y hembras de *A. mexicanum* parecen ser capaces de aprovechar las condiciones óptimas para reproducirse más de una vez al año, o incluso de forma continua (Eisthen y Krause, 2012).

Protandria

La diferencia de tamaños corporales entre hembras y machos se le atribuye a que durante el tiempo requerido para alcanzar la madurez sexual las hembras asignan mayor parte de los recursos para la reproducción, debido a que la producción de ovocitos implica mayor energía que la producción de espermatozoides (Zornosa, 2011).

La protandria, es un patrón común de sincronización sexual sesgada en muchos taxones de animales (por ejemplo, algunos insectos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos). El significado adaptativo de la protandria no se comprende completamente y, desde la década de 1970, se han propuesto al menos siete hipótesis para la protandria (Morbey e Ydenberg, 2001).

Esta ocurre cuando los machos llegan a las áreas de reproducción más temprano en la temporada en promedio que las hembras. Las hipótesis de protandria, se pueden dividir en dos clases; en la primera clase, el momento en que los machos son maduros sexualmente en relación

con las hembras no tiene consecuencias directas sobre la aptitud física de los machos o las hembras. en cambio, la selección actúa de manera independiente sobre el momento de llegada de cada sexo, ya sea directa o indirectamente sobre un carácter correlacionado, y así indirectamente produce una llegada sesgada por el sexo (Morbey e Ydenberg, 2001).

En el caso de *Ambystoma mexicanum*, podemos decir que el macho empieza a madurar sexualmente desde los 7 meses de edad, al encontrar características morfológicas que lo sugieren, como el crecimiento de las glándulas cloacales, y el adelgazamiento del cuerpo, así como histológicamente, se inicia la espermatogénesis en el testículo.

Las condiciones ambientales adversas en las áreas de reproducción pueden ocasionar que los organismos seleccionen protandria si los sexos son susceptibles de manera diferencial. Esto se refiere a la hipótesis de protandria por susceptibilidad, la cual asume beneficios similares para cada sexo, pero con costos diferentes. El grado de protandria debería depender de la severidad con la que las condiciones ambientales afecten a machos y hembras (Morbey y Ydenberg, 2001). Sin duda hay un sin número de hipótesis dentro de los sucesos que causan la protandria en un organismo, pero estos serían los más comunes y probables dentro de *A. mexicanum*.

El uso de neotenia tanto en sentido amplio (*sensu lato*) como en sentido estricto (*sensu stricto*) puede parecer confuso al principio; sin embargo, Gould (1977) ha proporcionado evidencia de que la reproducción larvaria en los anfibios urodelos es el resultado de un desarrollo somático retrasado y no de un desarrollo reproductivo precoz. Por lo tanto, parece que la pedogénesis no es una causa común de la reproducción larvaria en las salamandras, y el fenómeno general de la reproducción larvaria puede denominarse neotenia (tanto en el sentido amplio como en el sentido estricto del término). La pedogénesis debe aplicarse solo cuando la evidencia directa sugiere que

las larvas de anfibios son sexualmente maduras como resultado de un desarrollo reproductivo acelerado (Pierce y Smith 1979).

Gould (1977) reconoció la neotenia y la progénesis como dos procesos que producen fenotipos pedomórficos (desaceleración e hipomorfosis, respectivamente, en Reilly et al. 1997). Ambos procesos implican un retraso del desarrollo somático. Se diferencian en que la primera reproducción ocurre en individuos neoténicos a la misma edad que en individuos metamorfoseados, mientras que ocurre a una edad más temprana en individuos progenéticos (Denöel y Joly, datos no publicados).

Heterocronía

La heterocronía consiste en cambios en el tiempo relativo o la tasa de desarrollo de un rasgo biológico determinado. El subdesarrollo o el sobredesarrollo de un rasgo en relación con el curso ontogenético de este rasgo en el ancestro corresponde a pedomorfosis o peramorfosis, respectivamente. La heterocronía puede originarse como respuesta a un entorno variable (McKinney y McNamara 1991).

La variación en la morfogénesis que conduce a la diversificación del ciclo de vida en estos anfibios se puede evaluar bajo el título general de heterocronía, término que se refiere a los cambios evolutivos en la tasa o el tiempo de los eventos ontogenéticos. La heterocronía se logra mediante dos procesos; aceleración y retardo, así como la pedomorfosis, que también puede lograrse por estos dos procesos, en el ritmo de desarrollo de los órganos somáticos o neotenia. La aceleración en la tasa de desarrollo de los órganos somáticos implica el acortamiento del período larval y puede conducir a la eliminación del ciclo de vida de un estado larvario de vida libre, una

condición conocida como desarrollo directo. La hipermorfosis, se logra por el retraso en el ritmo de desarrollo hasta la maduración sexual, lo que lleva a una prolongación de la fase juvenil (Sever, 2003).

El pre y post desplazamiento en la edad de la metamorfosis arroja los mismos resultados que la aceleración (desarrollo directo) y la neotenia (pedomorfosis). La heterocronía se aplica a los rasgos individuales en lugar de a todo el organismo. Es útil en el contexto de las historias de vida de las salamandras para reconocer la heterocronía disociativa de los órganos somáticos y reproductivos en su totalidad; después de todo, la metamorfosis implica un conjunto de rasgos en varios sistemas de órganos y promueve un cambio de nicho de un entorno a otro, mientras que la maduración sexual afecta no solo al sistema reproductivo sino también a los componentes de otros sistemas de órganos que contribuyen con los caracteres sexuales secundarios (Sever, 2003).

CONCLUSIONES

- Machos y hembras de *A. mexicanum* muestran signos del inicio de madurez sexual en diferentes tiempos. Los machos inician y alcanzan la madurez sexual con tallas menores a las de las hembras, lo que coincide con la presencia del dimorfismo sexual característico de los machos, esto es la hiperplasia de la zona pericloacal.
- En las gónadas de machos de 7 – 8 meses de edad se Inicia el proceso de espermatogénesis. En donde es evidente el inicio de la diferenciación celular de este proceso en sentido cefalocaudal y dorso ventral del testículo, lo que define una clara regionalización de la gónada. A los 9 - 10 meses de desarrollo se inicia el proceso

de espermiación que continúa como proceso dominante hasta los 12 meses en donde además ya se observa un avance del siguiente ciclo espermatogénico.

- En los ovarios de hembras de 6 y 8 meses de edad solo ocurre el crecimiento primario, los ovocitos incrementan en número y tamaño, pero es hasta los 9 y 10 meses cuando se denota el inicio de la madurez sexual, es evidente el crecimiento secundario y el proceso de vitelogénesis. Posteriormente es hasta los 12 meses cuando ya es posible observar ovocitos con características de maduración o preovulatorios como grandes, voluminosos con citoplasma completamente lleno de vitelo, y migración de la vesícula germinal al polo animal el cual presenta una capa cortical de pigmento.
- Los resultados de la presente investigación muestran la histología del desarrollo gonadal de *A. mexicanum* y su momento en el que se consideran listos para la reproducción, esto es el alcance de la madurez sexual a los 9 meses en machos y a los 12 meses en hembras.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Miguel, X., Legorreta, G., & Casas-Andreu, G. (2009). Reproducción ex situ en *Ambystoma granulatum* y *Ambystoma lermaense* (Amphibia: Ambystomatidae). *Acta Zoológica mexicana*, 25(3), 443-454.
- Altig, R. & McDiarmid, R.W. (2007). Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. *Herpetological Monographs* 21, 1–32.
- Armstrong, J. B., & Malacinski, G. M. (1989). *Developmental biology of the axolotl*. Oxford University Press. Pp: 25-36
- Casas-Andreu, G., Aviña, R. C., & Aguilar-Miguel, X. (2003). Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia Ergo Sum*, 1(1), 304-308.
- Baillie, L. L., Simons, T. R., & Pollock, K. H. (2004). Spatial and temporal variation in detection probability of *Plethodon* salamanders using the robust capture-recapture design. *Journal of Wildlife Management*, 68:14-24
- Beebee, T. J., & Griffiths, R. A. (2005). The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology. *Biological conservation*, 125(3), 271-285.
- Blaustein, A. R., & Kiesecker, J. M. (2002). Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters*, 5(4), 597-608.
- Bruce, R. C. (2003). Chapter 13 Life Histories. In: Sever D, Volume editor. Jamieson BGM, Series editor. *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. Enfield (NH), USA/Plymouth, UK: *Science Publishers*; 2003. pp. 477-522
- Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C., & Dournon, C. (1995). Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodela Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *General and comparative endocrinology*, 99(1), 100-107.
- Chardard, D, Penrad-Mobayed M, Chesnel A, Pieau C, Dournon C. (2004). Thermal sex reversals in amphibians. In: Valenzuela N, Lance V (eds). *Temperature dependent sex determination*. Smithsonian Institution, Washington, DC, pp 59–67
- Collins, J.P., Storfer, A., 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9, 89–98.

- 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.
- Contreras, V., Martínez-Meyer, E., Valiente, E., & Zambrano, L. (2009). Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological conservation*, 142(12), 2881-2885.
- Denoël, M. (2003). How do paedomorphic newts cope with lake drying? *Ecography*, 26, 405–410.
- Denoël, M., & Joly, P. (2000). Neoteny and progenesis as two heterochronic processes involved in paedomorphosis in *Triturus alpestris* (Amphibia: Caudata). Proceedings of the Royal Society of London. Series B: *Biological Sciences*, 267(1451), 1481-1485.
- Denoël, M., Poncin, P., & Ruwet, J. C. (2001). Sexual compatibility between two heterochronic morphs in the Alpine newt, *Triturus alpestris*. *Animal Behaviour*, 62(3), 559-566.
- Denoël, M., Lena, J. P., & Joly, P. (2007). Morph switching in a dimorphic population of *Triturus alpestris* (Amphibia, Caudata). *Evolutionary Ecology*, 21(3), 325-335.
- Duelman, W. E. & Trueb, L. (1986). *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company, New York, NY. 670 pp.
- 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.
- Estrada, F. E., Peralta, Z. L., & Rivas, M. P. (1982). Manual de Técnicas Histológicas. México City, México: AGT Editor, S. A.
- Fraile, B.R., Paniagua, M.C., & Rodríguez-Saez, F. J. (1990). The cycle of follicular and interstitial cells (Leydig cells) in the testis of the marbled newt, *Triturus marmoratus*. *Journal of Morphology*; 204:89-101; PMID:2338719; <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1052040110>
- Flament, S., Chardard, D., Chesnel, A., & Dumond, H. (2011). Sex determination and sexual differentiation in amphibians. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, 1-19.
- Gamble, L. R., McGarigal, K., & Compton, B. W. (2007). Fidelity and dispersal in the pond-breeding amphibian, *Ambystoma opacum*: implications for spatio-temporal population dynamics and conservation. *Biological Conservation*, 139(3-4), 247-257.

- Gascon, C., J. O. Collins, R. D. Moore, D.R. Church, Mackay, & J. Mendelson III. 2007. *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland, 1-14.
- Goldberg, J., De Oliveira, C & Franco-Belussi, L. (2020). New insights about ovarian pigmentation in Anura. *Herpetological Journal* 30, 222-226. <https://doi.org/10.33256/hj30.4.222226>
- Gould, S. J. 1977. *Ontogeny and phylogeny*. Harvard University Press, Cambridge.
- Gould, S. J. 2000. Of coiled oysters and big brains: how to rescue the terminology of heterochrony. *Evolution & Development*, 2(5) 241-248.
- Gramapurohit, N; Shanbhag, B; & Saidapur, S. 2004. Growth, sexual maturation and body size dimorphism in the indian bullfrog *Hoplobatrachus tigerinus* (DAUD). *Herpetologica* 60(4): 414-419.
- Guarino, F; Lundari, S; Carlomagno, M; Mazzotti, S. (2003). A skeletochronological study of growth, longevity, and age at sexual maturity in a population of *Rana latastei* (Amphibia, Anura). *Journal of Biosciences*, 28(6): 775-782
- Guillette, L. J., Norris, D. O., & Norman, M. F. (1985). Response of amphibian (*Ambystoma tigrinum*) oviduct to arginine vasotocin and acetylcholine in vitro: influence of steroid hormone pretreatment in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 80(1): 151-154.
- Halliday, T.R. & Verrell, P.A. (1988). Body size and age in Amphibians and Reptiles. *Journal of Herpetology*; 22(3): 253-265.
- Hamer, A. J., & McDonnell, M. J. (2008). Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: a review. *Biological conservation*, 141(10), 2432-2449.
- Harris, R. N. (1987). Density-dependent paedomorphosis in the salamander *Notophthalmus viridescens dorsalis*. *Ecology* 68,705-712.
- Hartel, T; Sas, I; Pernetta, A; Geltsch, I.C. (2007). The reproductive dynamics of temperate amphibians: a review. *North-Western Journal of Zoology*. 3(2): 127-145.
- Howard, R. D. (1981). Sexual dimorphism in bullfrogs. *Ecology*, 62:303-310
- Huacuz-Elías, D. D. C. (2003). Estado de conservación de *Ambystoma rivulare* Taylor, (1940) en el santuario de Sierra de Chincua de la reserva de la Biosfera “Mariposa Monarca”. *Biológicas*, 5, 51-63.

- Hughes, A. (1963). On the labelling of larval neurones by melanin of ovarian origin in certain Anura. *Journal Anatomy London* 97(2): 217-224
- Humphrey, R. R. (1975). The axolotl, *Ambystoma mexicanum*. In *Handbook of genetics*. Springer, Boston, MA, 3-17.
- Hunter, A & Murcia de Valdivieso, B. Reproducción de *Hyla labialis*. *Revista Caldasia* 1962; 8 (40): 573- 583.
- Loredó, I., & van Vuren, D. (1996). Reproductive ecology of a population of the California tiger salamander. *Copeia*, 895-901.
- Malacinski, G. M., & Brothers, A. J. (1974). Mutant Genes in the Mexican Axolotl: Mutant genes of *Ambystoma mexicanum* can be used in classical and biochemical analyses of embryogenesis. *Science*, 184(4142), 1142-1147.
- Marin, A. I. (2007). Preferencia de plantas en la ovoposición del jolote *Ambystoma mexicanum*, en condiciones de laboratorio. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- McGraw, K.J. (2005). The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? *Animal Behaviour* 69, 757–764.
- McKinney, M. L. & McNamara, K. J. (1991) *Heterochrony: The Evolution of Ontogeny* (Plenum, New York).
- McCusker, C., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2015). The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration* 2015 May 11;2(2):54-71 <http://dx.doi.org/10.1002/reg2.32>.
- McCusker, C., Monaghan, & J. Whited, J. (2021). Special Issue: Salamander Models for Elucidating Mechanisms of Developmental Biology, Evolution & Regeneration/Repair: Part One. Issue Edited by: McCusker, C., Monaghan, & J. Whited, J. *Developmental Dynamics* 250 (6) :745-915 <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.351>
- Mendoza-Cruz, E., Moreno-Mendoza, N., Zambrano, L., & Villagrán-Santa Cruz, M. (2017). Development and gonadal sex differentiation in the neotenic urodele: *Ambystoma mexicanum*. *Zoomorphology*, 136(4), 497-509.
- Mendoza Cruz, E., Moreno Mendoza, N., Zambrano González, L., Porras Gómez, T. J., & Villagrán-SantaCruz, M. (2021). Dimorphic protein expression for Sox9 and Foxl2 genes in the testicles and ovaries of the urodele amphibian: *Ambystoma mexicanum*. *Acta Zoologica*, 102(2), 192-205.

- Miaud, C., Guyétant, R., & Faber, H. (2000). Age, size, and growth of the Alpine newt, *Triturus alpestris* (urodela: Salamandridae), at high altitude and review of life-history trait variation throughout its range. *Herpetologica* 56, 135-144.
- Morbey, Y. E. & Ydenberg, C. (2001). Protandrous arrival timing to breeding areas: a review. *Ecology Letters* 4,663-673
- Norris, D. O., Norman, M. F., Pankak, M. K., & Duvall, D. (1985). Seasonal variation in spermatogenesis, testicular weights, vasa deferentia and androgen levels in neotenic tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *General and Comparative Endocrinology* 1985;60:51-7; PMID:4054587; [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(85\)90291-6](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(85)90291-6)
- Norris, D. O. (2011). Hormones and Reproductive Patterns in Urodele and Gymnophionid Amphibians Chapter 10. In: Norris D. O, Lopez K. H, editors. Hormones and Reproduction of Vertebrates Vol. 2: Amphibians. Oxford, UK: Ac Press, Elsevier. pp 187 – 202.
- NOM-127-SSAI-1994 Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud Ambiental, agua para uso y consume humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. Noviembre 2000.
- NOM-059-ECOL-2001 Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Segunda Edición. SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Miércoles 6 de marzo de 2002. Diario Oficial (Segunda Sección)
- Pavajeau, L., Zippel, K. C., Gibson, R., & Johnson, K. (2008). Amphibian ark and the 2008 year of the frog campaign. *International Zoo Yearbook*, 42(1), 24-29.
- Pereira dos Santos, R. A., Ribeiro da Silva, A., Ribeiro Rocha de Moraes, I., Antunes M., Bielert Lopes, A. E., Caetano da Costa, R., & Leão Castilho, A. (2020). Gonadosomatic index and weight/length relationship in females of three penaeoidean shrimps impacted by fisheries on the southeastern Brazilian coast. *Nauplius* 28. <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2020045>
- Picasso, M. B. J. (2007). Heterocronía, generadora de cambios biológicos. *Museo*. Vol. 3, 21-27
- Pierce, B. A., & Smith, H. M. (1979). Neoteny or paedogenesis? *Journal of Herpetology*, 13(1), 119-121.
- Pounds, J. A. (2001). Climate and amphibian declines. *Nature*, 410(6829), 639-640.

- Pounds, J. A., Carnaval, A. C., Puschendorf, R., Haddad, C. F., & Masters, K. L. (2006). Responding to amphibian loss. *Science*, 314(5805), 1541-1542.
- Propper, C. R. (2011). Testicular structure and control of sperm development in amphibians. Chapter 3. In: Norris D. O, Lopez K. H, editors. *Hormones and Reproduction in Vertebrates. Vol. 2. Amphibians*. Oxford, UK: Ac Press, Elsevier; pp: 39-53
- Pudney J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microscopy Research and Technique*, 32:459-97; PMID:8605396; <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.1070320602>
- Quinzio, S. I., Goldberg, J., Cruz, J. C., Chuliver Pereyra, M., & Fabrezi, M. (2015). La morfología de los Anuros: pasado, presente y futuro de nuestras investigaciones. *Cuadernos de herpetología*, 29 (1). 51-67
- Ramírez-López, C. J., Rugeles-Pinto, C. C. Castaño-Villadiego, F. A., Gómez-León, V. E., Miranda- Neto, T., & Guimarães, J. D. (2016). Estadio de madurez sexual en toros de la raza nelore. *Revista de Medicina Veterinaria* 31: 11-22
- Ramírez-Macal, D. A., Conzuelo-Sierra, M. D. R., Salazar-de-Santiago, A., Chávez-Ríos, A., De-Velasco-Reyes, I., & Díaz, J. M. (2022). Descripción Morfométrica de la Anatomía Externa e Interna del *Ambystoma mexicanum*. *International Journal of Morphology*, 40(2), 401-406.
- Reilly, S. M., Wiley, E. O., & Meinhardt, D. J. (1997). An integrative approach to heterochrony: the distinction between interspecific and intraspecific phenomena. *Biol. J. Linn. Soc.*, 60, 119e143.
- Rodríguez da Silva, F & Rossa-Feres, D. (2010). Seasonal variation in body size of tropical anuran amphibians. *Herpetology Notes* 3: 205-209.
- Roff, D. A. (1992). *The evolution of life histories: Theory and analysis*. New York, (USA): Chapman & Hill. P 527.
- Ryan, T. J., & Semlitsch, R. D. (1998). Intraspecific heterochrony and life history evolution: decoupling somatic and sexual development in a facultatively paedomorphic salamander. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5643-5648.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación (DOF), México.
- SEMARNAT. (2018). Programa de Acción para la Conservación de las Especies *Ambystoma* spp, SEMARNAT/CONANP, México (Año de edición 2018). pp:76

- Sarasola-Puente, V; Gosá, A; Oromí, N; Madeira, M. J; Lizana, M. (2011). Growth, size and age at maturity of the agile frog (*Rana dalmatina*) in an Iberian Peninsula population. *Zoology*. 114: 150-154.
- Sever, D. M. (2003). Courtship and mating glands. In: Sever D (volume ed.) Jamieson BGM. (Series ed). *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. Science Publishers, Enfield (NH), USA. Plymouth/UK. pp:323-81.
- Semlitsch, R. D. (1987). Paedomorphosis in *Ambystoma talpoideum*: effects of density, food, and pond drying. *Ecology*, 68(4), 994-1002.
- Soriano-López, M., Mota-Rojas, D., Iglesias, A. V., Ramírez-Necoechea, R., Olmos-Hernández, A., Toca-Ramírez, J., & Alonso-Spilsbury, M. (2006). *The Axolotl (Ambystoma mexicanum)*: Factors That Limit its Production and Alternatives for its Conservation. 362-368.
- Specker, J. L., & Moore, F. L. (1980). Annual cycle of plasma androgens and testicular composition in the rough-skinned newt, *Taricha granulosa*. *General and Comparative Endocrinology*, 42, 297-303
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. New York (USA): Oxford University Press. P. 246.
- Stebbins, R. C. (1951). *Amphibians of Western North America*. University of California Press, Berkeley. Pp: 31-40
- Taylor, J. & Hadley, M. E. (1972). The fate of amphibian egg melanosomes. *The Journal of cell Biology*. 52, 493-501
- Tolosa, Y., Molina-Zuluaga, C., Restrepo, A., & Daza, J. M. (2014). Sexual maturity and sexual dimorphism in a population of the rocket-frog *Colostethus* aff. *fraterdanieli* (Anura: Dendrobatidae) on the northeastern Cordillera Central of Colombia. *Actualidades Biológicas*, 37(102), 287-294.
- Tribondeau, A., Sachs, L. M., & Buisine. N. (2021). Are paedomorphs actual larvae? *Developmental Dynamics*. 2021; 250 (6):779–787.
- Tyler, M. J. (2003). The gross anatomy of the reproductive system. In B. G. M. Jamieson (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny Series: Vol. 2. "Reproductive Biology and Phylogeny of Anura"* NH, USA: Science Publishers, Inc. Enfield.
- Uribe, M. C. (2003). The testes, spermatogenesis and male reproductive ducts. In: Sever D (volume ed.) Jamieson BGM (Series ed). *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. Science Publishers, Enfield (NH), USA/Plymouth, UK pp: 183-202

- Uribe, M. C. (2009). Spermatogenesis and male reproductive system. Urodela. Chapter 3. In: Ogielska M, editor. *Reproduction of Amphibians*. Enfield, NH, USA/Plymouth, UK: Science Publishers, Inc. pp. 100-124
- Uribe, M. C. (2009). Ovogenesis and female reproductive system. Urodela. Chapter 6. In: Ogielska M, editor. *Reproduction of Amphibians*. Enfield, NH, USA/Plymouth, UK: Science Publishers, Inc. pp. 275-304
- Uribe, M. C. (2011). Hormones and the female reproductive system of amphibians. Chapter 4. In: D.O. Norris, K.H. Lopez (ed). *Hormones and reproduction of vertebrates Volume 2: Amphibians*. Academic Press. Elsevier Inc. pp. 55-81
- Uribe, M. C., & Mejía-Roa, V. (2014). Testicular structure and germ cells morphology in salamanders. *Spermatogenesis*, 4(3), e988090. DOI: 10.4161/21565562.2014.988090
- Uribe, M. C., & Gracia-Fernández, S. (2018). Sequence of Germ Cells Differentiation during Spermiogenesis of the Amphibian Urodele *Ambystoma dumerilii*. Chapter 2 *Spermatozoa - Facts and Perspectives* <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71508>
- Vázquez, M., & Hunab, A. (2010). El ajolote de Xochimilco. *Ciencias*, 98(098). 55-59.
- Voss, S. R., & Shaffer, H. B. (1997). Adaptive evolution via a major gene effect: paedomorphosis in the Mexican axolotl. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25):14185-14189. DOI: [10.1073/pnas.94.25.14185](https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14185)
- Voss, S. R., & Shaffer, H. B. (2000). Evolutionary genetics of metamorphic failure using wild-caught vs. laboratory axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Molecular Ecology*, 9:1401–1407. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01025.x.
- Voss, S. R., Epperlein, H. H., & Tanaka, E. M. (2009). *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(8), pdb-emo128.
- Voss, S. R., Woodcock, M. R., & Zambrano, L. (2015). A Tale of Two Axolotls. *BioScience* 65(12):1134-1140 <https://doi.org/10.1093/biosci/biv153>
- Wells, K. M., Kelley, K., Baumel, M., Vieira, W. A., & McCusker, C. D. (2021). Neural control of growth and size in the axolotl limb regenerate. *eLife* 2021;0:e68584. DOI: <https://doi.org/10.7554>
- Woolbright, L. L. (1983). Sexual selection and size dimorphism in anuran amphibian. *The American Naturalist*, 121: 110-119.

- Woodley, S. K. (1994). Plasma androgen levels, spermatogenesis, and secondary sex characters in two species of plethodontid salamander with dissociated reproductive patterns. *General and Comparative Endocrinology*, 96,206-214.
- Zambrano, L., Vega, E., Herrera, G., Prado, E. A., & Reynoso, V. H. (2007). A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of an endangered species in a highly managed water system. *Animal Conservation* 10: 297–303.
- Zambrano L, Valiente E, & VanderZanden M. J. (2010). Stable isotope variation of a highly heterogeneous shallow freshwater system. *Hydrobiologia* 646: 327–336.
- Zieri, R., Franco-Belussi, L., de Souza Santos, L. R., Taboga, S. R., & de Oliveira, C. (2015). Sex hormones change visceral pigmentation in *Eupemphix nattereri* (Anura): effects in testicular melanocytes and hepatic melanomacrophages. *Animal Biology*, 65(1), 21-32.
- Zornosa Torres, C. I. (2011). Relación entre el tamaño corporal y los estados de madurez sexual en *Dendropsophus columbianus* (Anura, Hylidae) colectados en la cuenca del Río La Vieja (Quindío, Colombia) y preservados en el Museo de Historia Natural de la Pontificia Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Biología, Bogotá D.C.
- Zuasti, A., Jiménez-Cervantes, C., García-Borrón, J.C. & Ferrer, C. (1998). The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology* 61, 305–316.