



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA GERMINAL EN EL  
*Ambystoma mexicanum*, DURANTE EL ESTABLECIMIENTO DE  
LA GÓNADA INDIFERENCIADA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

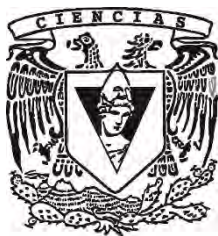
**P R E S E N T A:**

**GLADYS MOLINA SALINAS**

**DIRECTOR DE TESIS :**

**DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ**

**2016**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

### Hoja de datos del jurado.

- |   |  |
|---|--|
| 1. Datos del alumno<br>Apellido paterno<br>Apellido materno<br>Nombre (s)<br>Teléfono<br>Universidad Nacional Autónoma de México<br>Facultad de Ciencias<br>Carrera<br>Número de cuenta | 1. Datos del alumno<br>Molina<br>Salinas<br>Gladys<br>53581172<br>Universidad Nacional Autónoma de México<br>Facultad de Ciencias<br>Biología<br>307167004                           |
| 2. Datos del tutor<br>Grado<br>Nombre(s)<br>Apellido paterno<br>Apellido materno  | 2. Datos del Tutor<br>Dra.<br>Maricela<br>Villagrán<br>Santa Cruz  |
| 3. Datos del sinodal 1<br>Grado<br>Nombre(s)<br>Apellido paterno<br>Apellido materno  | 3. Datos del sinodal 1<br>Dra.<br>Patricia<br>Rivas<br>Manzano   |
| 4. Datos del sinodal 2<br>Grado<br>Nombre(s)<br>Apellido paterno<br>Apellido materno  | 4. Datos del sinodal 2<br>Dra.<br>Norma Angélica<br>Moreno<br>Mendoza  |
| 5. Datos del sinodal 3<br>Grado<br>Nombre(s)<br>Apellido paterno<br>Apellido materno  | 5. Datos del sinodal 3<br>Dra.<br>Sandra Milena<br>Guerrero<br>Estévez   |
| 6. Datos del sinodal 4<br>Grado<br>Nombre(s)<br>Apellido paterno<br>Apellido materno  | 6. Datos del sinodal 4<br>Eva<br>Mendoza<br>Cruz   |
| 7. Datos del trabajo escrito<br>Título<br><br>Número de páginas<br><br>Año  | 7. Datos del trabajo escrito<br>Caracterización de la línea germinal en el <i>Ambystoma mexicanum</i> , durante el establecimiento de la gónada indiferenciada<br>69 pp.<br><br>2016 |

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*, por ser el recinto que alberga los sueños de miles de estudiantes y profesores que se esmeran para la construcción de un futuro mejor. Porque en sus recintos y con sus magníficos profesores, descubrí mil mundos maravillosos.

A la Facultad de Ciencias, por permitirme la dicha y la emoción de descubrir el apasionante mundo de la Biología, de la mano de entrañables profesores que me servirán de guía toda la vida. Porque de cada rincón tengo un grato recuerdo. Ahí forjé entrañables amistades e inolvidables experiencias.

A la Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz, por su apoyo incondicional, asesorías y consejo, por sembrar en mí la semilla de la inquietud por la investigación. Le expreso mi más profundo respeto, admiración y cariño.

A la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza, por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo, por la formación que me dio y por fomentar en mí un pensamiento crítico, mi respeto, admiración y gratitud.

A la M. en C. Eva Mendoza Cruz, por su amistad y asesoría en múltiples aspectos. Una amiga para toda la vida.

Al Dr. Luis Zambrano y al MVZ. M en C. Horacio Mena González por proporcionarnos todos los organismos para realizar este proyecto.

Al M. en C. Ignacio Andrés Morales Salas y a la M. en C. Ma. Estela Pérez Cruz por ayudar al mantenimiento de los organismos utilizados en este trabajo, en el Acuario de la Facultad de Ciencias.

A mis sinodales, la Dra. Patricia Rivas Manzano, por sus acertados comentarios y a la Dra. Sandra Milena Guerrero Estévez, por todo el tiempo que me dedicó y por sus útiles observaciones.

A los “chicos de Biomédicas” por apoyarnos en todo y por compartir su conocimiento con nosotros, a la M. en C. Adriana Martínez Juárez, a la Biól. Tania Janeth Gómez Porras y a Iván Cabrera. A todos ellos por su amistad y cariño, el cual es mutuo, gracias.

A los amigos que he tenido la fortuna de conocer en este camino a la M. en C. Claudia Olvera Tehual, a Dianita, Luis, Miri, Mayra, Pau, Josué, Tux.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM, que bajo el proyecto IN223214 titulado Diferenciación gonadal y su expresión génica en el urodelo *Ambystoma mexicanum*, financio este trabajo y por la beca recibida.

Por último y especialmente quiero agradecer a mi familia, los pilares de mi vida y la fuente infinita de mi amor, son indiscutiblemente, mi trinomio perfecto. A ustedes debo todo quien soy y quien seré, por su apoyo incondicional ¡mil gracias! Los amo y doy gracias a Dios siempre por ustedes.

A mi padre, J. Guadalupe Molina Valdes, por ser mi guía, consejero y por amarme tanto, me ha dado los mejores regalos, no solo me ha dado la vida sino que gracias a su apoyo y amor incondicional he llegado a donde estoy ¡gracias papá!

A mi madre, Ma. Guadalupe Salinas Hernández, porque me ha enseñado el valor del trabajo duro, la generosidad y con su amor he vencido obstáculos.

A mi hermana Cynthia, mi mejor amiga, cómplice de la vida y *sensei*. Porque en los momentos más inciertos, eres mi faro, me llenas de fortaleza y felicidad. Gracias hermana, porque siempre alientas mis sueños.

A Mati, porque dentro de muchos años serás un gran científico (o artista) y quiero que leas esto que hizo tu tía.

A la vida...

*A mi padre, J. Guadalupe Molina Valdes.*

*A mi madre, Ma. Guadalupe Salinas Hernández.*

*A mi hermana, Cynthia.*

*Los pilares de mi vida...*

*Por ustedes y para ustedes, todo.*

*¿Qué es la vida? Un frenesí.  
¿Qué es la vida? Una ilusión,  
una sombra, una ficción,  
y el mayor bien es pequeño;  
que toda la vida es sueño,  
y los sueños, sueños son.*

*Pedro Calderón de la Barca.*

*“El azar, nada deja al azar”*

# Índice

Resumen.....	- 1 -
Introducción .....	- 2 -
1. Marco Teórico .....	- 4 -
1.1 ¿Qué es la línea germinal? .....	- 4 -
1.2 Plasma Germinal .....	- 5 -
1.3 Especificación de la línea germinal .....	- 5 -
1.4 Origen de las células germinales en los anfibios.....	- 9 -
1.5 Características morfológicas de células germinales primordiales (CGPs) en anfibios.....	- 9 -
1.6 Migración de CGPs .....	- 9 -
1.7 Gónada indiferenciada.....	- 10 -
2. Antecedentes.....	- 11 -
2.1 Estudios en urodelos.....	- 11 -
2.2 Estudios en <i>Ambystoma mexicanum</i> .....	- 11 -
3. Justificación .....	- 13 -
4. Especie de Estudio.....	- 14 -
5. Objetivos.....	- 15 -
6. Metodología.....	- 15 -
6.1 Colecta y mantenimiento de los ejemplares. ....	- 15 -
6.2 Obtención de las muestras. ....	- 15 -
6.3 Microscopía de campo claro .....	- 16 -
6.4 Medición de células germinales.....	- 17 -
6.5 Inmunofluorescencia .....	- 17 -
6.7 Citometría de flujo. ....	- 18 -
6.8 Western Blotting.....	- 19 -
7. Resultados.....	- 21 -
7.1 Microscopía de Campo Claro: Morfología .....	- 21 -
7.2 Medición de células germinales.....	- 32 -
7.3 Inmufluorescencias .....	- 32 -
7.4 Citometría de flujo: FacScan .....	- 41 -
7.5 Western Blotting.....	- 44 -
8. Discusión .....	- 48 -



8.1	Morfología.....	- 48 -
8.2	Expresión de Proteínas .....	- 54 -
8.3	Proliferación.....	- 57 -
8.4	Migración de células germinales.....	- 58 -
8.5	Expresión molecular de la proteína Vasa.....	- 59 -
9.	Conclusiones .....	- 61 -
10.	Bibliografía .....	- 62 -
Anexo 1	.....	- 68 -

## Resumen

Desde el momento mismo de la fertilización de un ovocito dos linajes celulares son establecidos: el somático y el germinal. La línea germinal es de vital importancia, puesto que se compone exclusivamente de aquellas células que dan lugar a los gametos, permitiendo así, la transmisión de la información genética a través de las generaciones y contribuyendo con ello a la perpetuación de las especies. Estas células son en principio de origen extragonadal y extraembrionario; tienen como destino final la colonización de las gónadas, donde a través del desarrollo presentan una serie de modificaciones morfológicas.

El presente trabajo buscó identificar y caracterizar, a nivel morfológico y molecular, los cambios que llevan a cabo las células germinales durante etapas clave del establecimiento de la gónada indiferenciada del urodelo, *Ambystoma mexicanum*. Este anfibio es un importante modelo de estudio en la biología del desarrollo y aún es poco lo que se conoce sobre su morfogénesis gonadal, incluyendo aspectos fundamentales de las células germinales, como lo es su migración.

Con el objetivo de identificar y caracterizar a las células germinales de *A. mexicanum* durante las etapas del establecimiento de la gónada indiferenciada e inicio de su diferenciación, se emplearon técnicas para microscopía de campo claro, confocal, citometría de flujo y Western blotting. Los resultados obtenidos indicaron que, en cuanto a su morfología, las células germinales son en estadio tempranos ovoides y conforme avanza el desarrollo son redondas, con un núcleo prominente e inmerso en un citoplasma claro, con plaquetas vitelinas y con gránulos de pigmento, que van disminuyendo en cantidad conforme avanzan los estadios de desarrollo.

Las células germinales encontradas en los estadios de desarrollo analizados, son limitadas en número y no es sino hasta la formación de una gónada indiferenciada que se nota su incremento. A nivel molecular la proteína del gen *Vasa* se expresa en el citoplasma de las células germinales.

Finalmente, se concluye que las células germinales del *A. mexicanum* de E-40 a E-55 son una población celular ya presente en las gónadas, y conforme avanza el desarrollo cambian su morfología, así como la relación que mantienen con las células de la línea somática. El marcador molecular *Vasa*, resultó específico para detectar células germinales en este urodelo; lo cual indica, que es un gen, en efecto, ampliamente conservado a lo largo de la filogenia.

## Introducción

El objetivo del presente trabajo titulado *Caracterización de la línea germinal en el Ambystoma mexicanum, durante el establecimiento de la gónada indiferenciada*, fue describir a nivel morfológico las características de las células germinales de este anfibio urodelo, por medio de técnicas de microscopía de campo claro y confocal, esta última para la detección de los anticuerpos Laminina y Vasa.

Laminina es una glucoproteína que forma parte de la lámina basal y se considera un potente regulador del comportamiento de las células epiteliales con diversas funciones como la migración, crecimiento y diferenciación celular (Sasaki et al., 1988). Mientras que *Vasa* es una ARN helicasa dependiente de ATP, y es un gen esencial para el desarrollo de células germinales de vertebrados e invertebrados (Gustafson & Wesse, 2010). De esta manera, se correlacionaron las observaciones realizadas con microscopía de campo claro con el patrón de expresión de laminina y de Vasa.

También se emplearon las técnicas de citometría de flujo y Western blotting, para obtener un patrón semi-cuantitativo de la población de células germinales en los diferentes estadios de desarrollo analizados. Esto a nivel molecular, con lo cual, se reforzaron las observaciones hechas con los diferentes tipos de microscopía utilizados.

*Ambystoma mexicanum* es un anfibio de la clase Urodela, (del griego *oura*, cola y *delo*, visible) que pertenece a la familia *Ambystomatidae*. Es una salamandra que desarrolla rápidamente sus extremidades, posee branquias a ambos lados de la cabeza y suelen ser carnívoros. El *A. mexicanum*, a diferencia de otras salamandras y anfibios como las ranas, no presenta metamorfosis, alcanza la madurez sexual sin perder las características físicas y morfológicas de su estado larvario, condición que se conoce como neotenia. Este anfibio permanece en un medio acuático toda su vida y es capaz de regenerar todas las partes de su cuerpo, incluido el sistema nervioso, situación que lo ha hecho muy atractivo para científicos de todo el mundo, además de ser el ancestro de los tetrápodos (Voss, 2009).

Pese a su relevancia en el ámbito de la investigación, este organismo endémico de los lagos de Xochimilco, Chalco y Tláhuac se encuentra en peligro de extinción (P) en México, según la NOM-059 - SEMARNAT- 2010 (Mena & Servín, 2014). A pesar de su estatus, se ha estudiado muy poco

los aspectos relacionados con la morfogénesis de los aparatos reproductores y formación de gametos.

De manera particular, el estudio del establecimiento de la línea germinal en *A. mexicanum* resulta un modelo experimental muy interesante. Como se mencionó, la línea germinal posee exclusivamente células germinales, las cuales son de vital importancia ya que, en ellas es transmitida la información genética a través de las generaciones (Saitou & Yamaji, 2010). En general, en los vertebrados el linaje germinal se establece de manera temprana en el desarrollo embrionario, prácticamente desde la fertilización de un ovocito, cuando se segrega de la línea somática; sin embargo, el mecanismo de especificación varía entre los diferentes grupos de vertebrados, ya sea por medio de la presencia de plasma germinal (preformación) o bien por medio de un mecanismo de inducción (Bachvarova et al., 2004).

La especificación de la línea germinal refiere a la formación de las células germinales primordiales (CGPs), las cuales migran desde su sitio de origen (extragonadal) hacia las crestas genitales, donde posteriormente se forman las gónadas, mismas que se diferenciarán de acuerdo al sexo establecido por mecanismos involucrados en la determinación sexual, en ovarios o testículos. Estos órganos contendrán a las CGPs, las cuales interactúan con el linaje somático que las dirigirá para transformarse en ovogonias o espermatogonias (Ogielska, 2009). Es así que organismos como *Xenopus laevis* y *Danio rerio* (pez cebra) poseen plasma germinal como resultado de una porción especializada de citoplasma, la cual se segrega a un grupo de células y que posteriormente se especificarán como CGPs. Por otro lado, los mamíferos no poseen este plasma germinal, al igual que en los urodelos como *A. mexicanum*. Lo que ocurre entonces, es que se da una especificación de la línea germinal por medio de inducciones a partir del mesodermo y bajo la presencia de la proteína morfogenética del hueso (BMP) (Lawson & Hage, 1994; Voss, 2009).

En el caso particular de *A. mexicanum*, Humphrey (1929) realizó trabajos con microscopía de campo claro en *A. mexicanum* para identificar a las CGPs y, posteriormente Ikenishi y Nieuwkoop (1978) siguieron sus pasos, aunque a nivel de microscopía electrónica de transmisión y recientemente Johnson (2003) y Bachvarova (2004) emplearon la expresión de la proteína del gen *Vasa* para identificar a las células germinales. A pesar de estos estudios aún es poco el conocimiento que se tiene sobre la línea germinal en este urodelo, aspectos tan fundamentales

como su migración, colonización y diferenciación permanecen sin ser comprendidos en su totalidad.

Es por ello, que el presente trabajo busca contribuir al conocimiento de la morfología que presentan las células germinales en el *A. mexicanum*, en un periodo específico y determinante como lo es el establecimiento de la gónada indiferenciada. En este trabajo se analizaron embriones y larvas de los estadios de desarrollo del 40 al 45 así como el 55 por medio de microscopía de campo claro, confocal, citometría de flujo y Western blotting. La evidencia de los resultados aquí presentados sugiere, que existe una serie de cambios morfológicos en las células germinales durante la formación de las crestas genitales y el establecimiento de la gónada indiferenciada. La expresión positiva de la proteína del gen *Vasa*, indica dos ideas sustanciales: por un lado, corrobora de manera precisa las observaciones morfológicas sobre la identificación de las células germinales y por el otro, indica que *Vasa* es un gen ampliamente conservado entre los vertebrados. En el presente trabajo se sugiere una posible ruta migratoria para el tipo celular estudiado.

## 1. Marco Teórico

### 1.1 ¿Qué es la línea germinal?

La línea germinal se define como un linaje celular establecido muy temprano en el desarrollo embrionario, desde la fertilización del ovocito cuando se segrega de la línea somática ya sea a través de la presencia de plasma germinal o por un mecanismo de inducción (Bachvarova et al., 2004). El linaje germinal está compuesto por una población exclusiva de células, las cuales, en etapas muy tempranas del desarrollo y antes de que arriben a las gónadas en formación se denominan, células germinales primordiales (CGPs). Las CGPs migran para llegar a su destino último, que es la colonización de las gónadas, donde proliferan y maduran, ahora se les conocen como células germinales (CG) propiamente dichas. Una vez que las gónadas pasan del estado indiferenciado al diferenciado, las CG pasan a ser ovogonias o espermatogonias (Ogielska, 2009).

El hecho de que las CG sean las células precursoras de los gametos le confiere a este linaje celular un papel fundamental, en la diversidad de las especies, puesto que las CG son las encargadas de transmitir la información genética a través de las generaciones, contribuyendo con ello a la perpetuación y diversificación de las especies (Saitou & Yamaji, 2010).

En lo que anuros se refiere, se ha propuesto una clasificación particular de la línea germinal: células germinales primordiales presuntivas (CGPp) para denominar a aquellas células que contienen plasma germinal pero que se hallan en un periodo extragonadal y que son exclusivas de anuros; células germinales primordiales (CGPs) para células que migran, colonizan y se multiplican dentro de una gónada indiferenciada, presentes tanto en anuros como en urodelos y finalmente; ovogonias o espermatogonias cuando acontece la diferenciación gonadal (Ogielska, 2009).

## 1.2 Plasma Germinal

Con la propuesta de Weismann en 1885 surge el concepto de plasma germinal, definido como una región especializada del citoplasma que contenía el material necesario para establecer al linaje germinal; tiempo después esta teoría se corroboró y se encontró la presencia de plasma germinal tanto en protostomados como deuterostomados (Johnson et al., 2003).

Para establecer si verdaderamente el plasma germinal poseía un efecto directo sobre el establecimiento de la línea germinal, se hicieron experimentos de explantes y deleción por medio de radiaciones con luz UV y en todos los casos lo que resultó de la falta del plasma fue una ausencia total de células germinales. Por lo tanto, así se confirmó la importancia de esta región citoplásmica del huevo para la especificación de la línea germinal (Ogielska, 2009).

Ahora se sabe que este plasma germinal, una región citoplásmica especializada, se compone de mitocondrias, ARNs de origen materno y factores de transcripción. Para el grupo de los anfibios y en particular para los anuros, se ha caracterizado la presencia del plasma germinal y se ha visto que ya desde el desarrollo embrionario temprano éste se segrega asimétricamente a solo un blastómero por cada división, las células que reciben el plasma germinal eventualmente dan lugar a las CGPs (Ogielska, 2009).

## 1.3 Especificación de la línea germinal

Pareciera así que el mecanismo de especificación de la línea germinal quedaba resuelto al fin; sin embargo, la ausencia de éste en mamíferos (Eddy, 1975) y en modelos animales como tortugas (Bachvarova et al., 2009) y urodelos (Ikenishi & Nieuwkoop, 1979) puso de manifiesto la existencia de otro mecanismo de especificación que no era de tipo autónomo. En embriones de ratón se identificó que las CGPs se originan a partir de una zona particular: en la base del alantoides (Lawson & Hage, 1994) y que células somáticas presentes en esa región inequívocamente daban

lugar a CGPs (Tam & Zhou, 1996) esta evidencia indicó, que la especificación no era de tipo autónoma, sino más bien de tipo inductivo.

Ahora se sabe que la especificación de la línea germinal en los mamíferos es de tipo inductivo mediado por una compleja red de señales donde están involucrados una serie de factores como la proteína morfogenética del hueso 4 (BMP4 por sus siglas en inglés), la cual es una molécula de señalización miembro de la familia de los factores de crecimiento transformantes (TGF), *Blimp1* que es la proteína de maduración de linfocitos-B y *Prmd14* un regulador transcripcional (Saitou & Yamaji, 2012). La BMP4 es emitida por el ectodermo extraembrionario, esto activa la expresión de *Blimp1* y consecuentemente la de *Prmd14*; el papel de *Blimp1* en la especificación de la línea germinal, tiene que ver con que actúa como un represor transcripcional de genes de la línea somática (Kurimoto et al., 2008). Se ha visto además que ratones *knockout*, para los genes *Blimp1* y *Prmd14*, muestran un decremento de las células germinales, las cuales no migran y tienen un corto periodo de vida. Ambos genes se conservan a lo largo de la filogenia (Saitou & Yamaji, 2012).

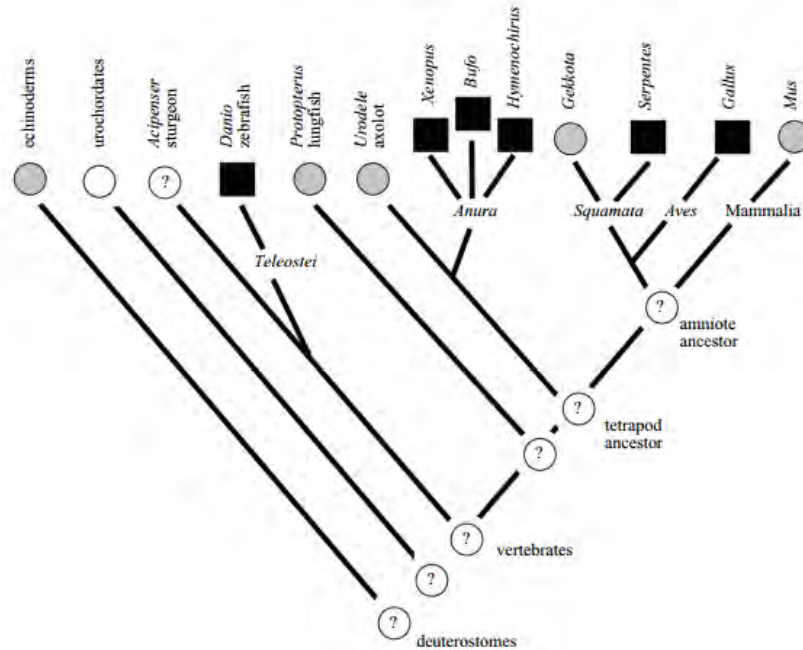
Por lo tanto, en la filogenia (Fig. 1) se presentan dos mecanismos básicos para la especificación de la línea somática: la preformación y la epigénesis (modo inductivo). En el primer mecanismo hay una herencia a través de determinantes, los cuales están en el plasma germinal y por otro lado la epigénesis que obedece a mecanismos de inducción a partir de células embrionarias pluripotentes. El modo de preformación está presente en vertebrados e invertebrados como *C. elegans*, *D. melanogaster*, *Danio rerio*, y *Xenopus laevis*. La epigénesis, por su parte, se halla representada fundamentalmente en mamíferos, tortugas y urodelos (Bachvarova et al., 2009) (Ver Cuadro.1).

A continuación, se presenta un cuadro comparativo que resume las diferencias entre los dos mecanismos de especificación de las CGPs.

Preformación	Epigénesis
<p>*Hay presencia de un plasma germinal, que contiene las determinantes de origen materno que especificarán a la línea germinal.</p>	<p>*No hay plasma germinal, lo que ocurre es un mecanismo de inducción a partir de células embrionarias pluripotentes.</p>
<p>*La actividad transcripcional en CGPs se reprime desde blástula a néurula, con ello se impide que la línea germinal siga un destino somático, mediante la inhibición de la fosforilación de residuos de serina 2 en RNA-pol-II (Ogielska, 2009)</p>	<p>*Se desencadenan señales extracelulares sobre células pluripotentes.</p>
<p>*Se especifican desde antes de la gastrulación</p>	<p>*La segregación de la línea germinal ocurre a finales de la gástrula.</p>
<p>*Presente en <i>D. melanogaster</i>, <i>C. elegans</i> y <i>X. laevis</i></p>	<p>*Se presenta en urodelos, tortugas y mamíferos (Johnson et al., 2003)</p>

**Cuadro 1.** Se comparan los dos mecanismos de especificación de las CGPs.





**Fig. 1.** Se muestra la distribución de los 2 tipos de especificación de CGPs en diferentes organismos. Las figuras negras muestran aquellos grupos con preformación y las figuras grises el modo inductivo. Tomado de Johnson et al., (2004).

Considerando lo anterior, pareciera que a nivel evolutivo el mecanismo epigenético es más ancestral con respecto a la preformación, que surge independientemente en múltiples ocasiones (Fig. 1). Esto podría deberse, tal vez a que este mecanismo posiblemente favorezca la conservación de la línea germinal protegiéndole de modificaciones estructurales (Johnson, 2009). Si bien es cierto que el modo de especificación de las CGPs es diferente, un rasgo que ambos mecanismos comparten es la propiedad de la represión de las CGPs para impedir que estas sigan el programa de diferenciación de la vía somática, la cual se lleva a cabo en el modo de la preformación mediante la represión de la actividad de una ARN-polimerasa de tipo II, por medio de PIE-1 un represor transcripcional del que no se conoce aún su funcionamiento; sin embargo, lo que se tiene claro, es que inhibe el inicio de la transcripción y la elongación de la RNA-pol-II.

Por otro lado, en el caso de la epigénesis se propone que *Blimp1*, un represor transcripcional apaga la expresión génica para la diferenciación somática del mesodermo (Saitou & Yamaji, 2010) y esto basado en el hecho que las presuntivas CGPs surgen a partir del mesodermo presuntivo (Johnson et al., 2004).

#### 1.4 Origen de las células germinales en los anfibios

En los anfibios el origen de las células germinales, del mismo modo que su especificación es diferente en los dos grandes grupos de anfibios: anuros y urodelos. Para los anuros existe un plasma germinal, localizado en una región especializada del citoplasma en el polo vegetal de huevos fertilizados. Se ha descrito que el plasma germinal se segrega de manera inequitativa durante la segmentación dando lugar a las CGPs, ya que solamente las células que reciben dicho plasma germinal serán las futuras células germinales, por lo que se argumenta que en los anuros el origen de las CGPs se establece a partir del endodermo (Wakahara et al., 1998).

En los urodelos en particular en *A. mexicanum*, el origen de las células germinales se ha situado en dos regiones. Humphrey (1929) e Ikenishi y Nieuwkoop (1978) realizaron, por un lado, experimentos de trasplantes en el mesodermo de la placa lateral, que arrojaban un aumento de CGPs y por otro lado, la extirpación de esta misma región, que resultaba en una ausencia total de CGPs. Con estos experimentos se concluyó, que el sitio de origen de las CGP era a partir del mesodermo, tal como ocurre en los mamíferos, donde las CGPs se ha visto que se localizan en el mesodermo extraembrionario: en el epiblasto proximal en la base del alantoides (Lawson & Hage, 1994). Sin embargo, tanto Ikenishi y Nieuwkoop (1978) como Johnson y colaboradores (2003) aseveraron que era factible inducir la formación de CGPs a partir del ectodermo.

#### 1.5 Características morfológicas de células germinales primordiales (CGPs) en anfibios

Las CGPs en anuros, son células grandes de alrededor de 25-30  $\mu\text{m}$  de diámetro, su núcleo es prominente esférico u ovoide con una envoltura nuclear lisa, su citoplasma es claro y en él se hallan inmersas mitocondrias en un arreglo especial, denominado nube mitocondrial. También hay presencia de gránulos germinales, pigmento y plaquetas vitelinas, las cuales por medio de un proceso de vitelolisis (consumo de vitelo) disminuyen cuando las células germinales derivadas de las CGPs se establecen en la gónada indiferenciada (Ogielska, 2011; Norris, 2011).

#### 1.6 Migración de CGPs

Como ya antes se ha mencionado las CGPs son de origen extragonadal, lo cual quiere decir que deben de llevar a cabo un proceso de migración para arribar a su destino: la colonización de las gónadas. Se sabe que en la mayoría de los organismos la migración de las CGPs se da primeramente por medio de una migración activa, donde participan proyecciones citoplásmicas

(lobopodios y filopodios) que se mueven sobre el sustrato de la matriz extracelular; o bien de manera pasiva, debido a los movimientos morfogenéticos propios del desarrollo (Gilbert, 2012). En recientes estudios se ha visto que la prolongación citoplásmica mediante la cual se mueven las CGPs de peces, anfibios y mamíferos están guiadas por moléculas quimioatrayentes Cxc112-a-Cxcr4b donde, las CGPs emiten el receptor Cxcr4b y las células somáticas el ligando Cxc112-a (Aman & Pitrowski, 2010).

En el caso de los mamíferos como el ratón, las CGPs surgen en el epiblasto en la base del incipiente alantoides, estas células se dividen y migran a la vez, a través del intestino y del mesenterio dorsal (que conecta el intestino a la región donde están formándose los órganos mesodérmicos) para colonizar el primordio gonadal. Las células que migran expresan el gen *Stella* y además al igual que en anfibios se desplazan por medio de lobopodios y filopodios (De Falco & Capel, 2009).

A diferencia de los otros grupos, las CGPs de aves y ciertos reptiles utilizan un mecanismo distinto para llegar a las gónadas y es mediante el torrente sanguíneo. Las CGPs se adentran en vasos sanguíneos de la región anterior del embrión mediante un tipo de movimiento ameboideo: diapédesis, mecanismo común a los linfocitos y macrófagos, que les permite atravesar las células endoteliales para arribar a la zona posterior donde se localizan las gónadas (Gilbert, 2012).

Las CGPs de *X. laevis* llevan a cabo una migración activa mediante la prolongación de un único filopodio, que se mueve sobre la matriz extracelular, migrando sobre el mesenterio intestinal hasta que llegan a las crestas genitales, la migración es guiada por fibronectina y la lámina basal del epitelio celómico (Ogielska, 2011).

### 1.7 Gónada indiferenciada

La gónada indiferenciada es una estructura embrionaria caracterizada por contener una población de células germinales que darán lugar a los gametos y una población de células somáticas. Se dice que inicialmente la gónada indiferenciada es morfológicamente bipotencial, dado que tiene la capacidad de diferenciarse en un ovario o bien en un testículo, proceso que se denomina determinación sexual primaria, la cual refiere al desarrollo del fenotipo sexual en las células somáticas de la gónada. (De Falco & Capel, 2009). Así para el grupo de los anfibios la gónada indiferenciada es una estructura sólida que tiene una zona cortical y una medular, donde no hay diferencias histológicas entre ovarios o testículos (Hayes, 1998). Es cuando ocurre la

diferenciación gonadal, que a nivel morfológico se distingue que las células germinales localizadas en la corteza proliferan y entra en regresión la zona medular, es entonces que se puede hablar de un ovario; en un testículo en desarrollo, lo característico es que la zona medular contenga a las células germinales en proliferación, mientras que la zona cortical presenta regresión (Hayes, 1998; Norris, 2011).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Estudios en urodelos

Dentro del grupo de los urodelos han sido *Pleurodeles waltl* y *Triturus phirogaster*, junto con *A. mexicanum*, los modelos más estudiados en el ámbito de la diferenciación gonadal y células germinales. Maufroid y Capuron (1981) demostraron utilizando a *P. waltl* la inducción de las células germinales desde el mesodermo a partir de señales emitidas por el ectodermo. Además hicieron notar que a nivel morfológico las células germinales eran identificables solo en estadios posteriores a la eclosión.

La identificación de las células germinales primordiales en salamandras como *P. waltl* ha sido reportada por Dournon y colaboradores (1989) a partir del estadio de desarrollo 33, donde las ubicó en vecindad con los conductos de Wolff y cercanas al orificio de la futura cloaca. Además, hizo notar que la proliferación de dichas células ocurría en dos etapas: antes de colonizar las gónadas y antes de que comenzara la diferenciación gonadal, puesto que las CGPs no proliferaban cuando la cresta genital se formaba (Dournon et al., 1990).

### 2.2 Estudios en *Ambystoma mexicanum*

El primero en identificar a las CGPs citológicamente en urodelos y particularmente en *A. mexicanum* fue Humphey en 1925, las ubicó en larvas de estadio de yema caudal, específicamente en la región de la placa dorso lateral en el tronco posterior (Wakahara, 1996). Trabajos posteriores de Maufroid (1972) e Ikenishi y Nieuwkoop (1978) corroboraron lo observado por Humphey localizando a las CGPs justo en la misma región en larvas de *A. mexicanum*. Para complementar esta información también se realizaron años después estudios de destino de mapeo que arrojaron que las CGPs en urodelos derivaban de la zona marginal ventrolateral de gástrulas tempranas, adyacentes a las células precursoras de sangre (Nieuwkoop, 1947; Smith, 1964). Sin embargo y después de tantos años no se tiene certidumbre de cuál es el

momento en que las células son llevadas a su destino de la línea germinal en los urodelos (Bachvarova et al., 2009).

Los trabajos de Ikenshi & Nieuwkoop (1978) empleando microscopía electrónica y de transmisión describieron a las CGPs en el *A. mexicanum* como células grandes, con núcleos lobulados, citoplasma claro, gránulos electrodensos, gotas lipídicas, pigmento, abundante retículo endoplásmico y mitocondrias. Estos autores sugieren que las CGPs aparecen en espacios entre el endodermo y la placa del mesodermo lateral, entre los estadios 23 al 35 cerca de los conductos de Wolff y finalmente se localizan en las crestas genitales. De igual manera, Johnson y colaboradores (2003) evidenciaron que las CGPs podían ser inducidas ectópicamente en el polo animal en presencia de señales correctas. Estas señales son entre otras una alta concentración de la proteína morfogenética del hueso 4 o (BMP4)

Estudios a nivel molecular sobre las células germinales en *A. mexicanum*, han sido realizados por Johnson y colaboradores (2003) quienes lograron producir el gen *Dazl* para *A. mexicanum*: *Axdazl*. El gen *Dazl* se ha relacionado con la meiosis y espermatogénesis en varios vertebrados (Johnson et al., 2001) y además en *X. laevis*, se ha empleado como marcador del plasma germinal, y por ende de las células germinales. Johnson no logró encontrar transcritos para dicho gen, ni en ovocitos ni en estadios tempranos del desarrollo, lo cual indicó que no había funcionalidad de la proteína; esta evidencia experimental a nivel molecular apoyó de manera contundente las observaciones con microscopía que previamente realizaron Ikenisihi y Nieuwkoop (1978) sobre la usencia de plasma germinal en las células germinales de urodelos.

Por otro lado, Bachvarova y colaboradores (2004) realizaron un estudio por medio de hibridaciones *in situ* (ISH) con larvas de *A. mexicanum* en diferentes estadios de desarrollo, utilizaron genes relacionados con la especificación de la línea germinal tales como *Vasa* y *Dazl*, este último se expresó en embriones más tempranos desde el estadio 33 en comparación con *Vasa* cuyo mensajero se localiza hasta el estadio 43.

Otros genes asociados con la especificación de la línea germinal se utilizaron, como *Axoct-4* cuya señal se localizó únicamente en el mesodermo de gástrulas y en ovocitos, en células germinales propiamente estuvo ausente. Por otro lado *c-kit*, un receptor de tirosin-cinasa (Saitou et al., 2012) cuya expresión se ha localizado desde la gástrula temprana y durante la migración de las CGPs hacia las gónadas en roedores (Manova & Bachvarova, 1991) también se empleó.

En *A. mexicanum* *Axot-4* y *C-kit* no se expresaron en células germinales, sino solo en gametos diferenciados (Bachvarova et al., 2004).

El estudio más reciente basado en la especificación de las células germinales en *A. mexicanum* fue realizado por Chatfield y colaboradores (2014) quienes demostraron a nivel molecular, que la zona marginal ventral (ZMV) del mesodermo es el sitio de origen de las CGPs adyacente a las células sanguíneas, tal como Smith (1964) lo predijo. La novedad es que este estudio contribuyó a aclarar que el gen *Nodal* y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) compiten para dirigir la especificación de un “pool” celular hacia sangre o CGPs respectivamente.

### 3. Justificación

El *A. mexicanum*, es un urodelo particularmente interesante porque se asemeja a los antepasados tetrápodos, en ese sentido, es un punto de referencia para entender cómo han ido cambiando los mecanismos de desarrollo y en particular el comportamiento de la línea germinal (Chatfield et al., 2014).

El presente trabajo de investigación busca contribuir con el conocimiento sobre la línea germinal del *A. mexicanum* en una etapa clave como es la determinación de la gónada indiferenciada. Poco se sabe de la caracterización de las células germinales en dicha etapa y al ser el *A. mexicanum* un modelo de interés para la biología del desarrollo por presentar características como neotenia, así como la regeneración de extremidades y órganos (Perez et al., 2009) es importante conocer a detalle los aspectos de su desarrollo, en este caso particular, la línea germinal, estrechamente relacionada con el ámbito reproductor.

Por si fuera poco, el urodelo *A. mexicanum* es un anfibio endémico del sistema lagunar del Valle de México conformado por el lago de Texcoco, Chalco, Zumpango, Xaltocán y Xochimilco (CONABIO, 2011) no obstante, en los últimos años su población se ha visto mermada considerablemente, a tal grado que en vida libre, solo se hallan en el sistema de canales de Xochimilco (Contreras et al., 2009). Por ello se ha incluido en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) y cuenta con protección especial por la NOM-059-SEMARNAT-2001 (CONABIO, 2011) por encontrarse en peligro crítico. Ello propicia la necesidad de conocer más aspectos sobre la biología del desarrollo y reproductora de este organismo endémico de México.

## 4. Especie de Estudio

La salamandra *Ambystoma mexicanum* es un anfibio urodelo endémico del Valle de México (Zambrano, 2009), que presenta una serie de características muy particulares que le proporcionan un lugar privilegiado como modelo de estudio en el ámbito ecológico, inmunológico y en la biología del desarrollo. Entre estas áreas, se halla su potencial para la regeneración de tejidos, extremidades e inclusive órganos completos, tales como corazón e hígado. Además, se trata de un organismo de fácil mantenimiento en condiciones experimentales. Entre las características más relevantes que presenta *A. mexicanum* es su condición de neotenia, esto significa que los organismos son capaces de reproducirse sexualmente, pero sin pasar por metamorfosis, es decir que retienen características larvianas durante toda su vida como la presencia de aleta dorsal, así como de las branquias (Mengen et al., 2010).

La clasificación taxonómica del urodelo *Ambystoma mexicanum* de acuerdo con la CONABIO es la siguiente:

Reino: ANIMALIA

Phylum: CHORDATA

Clase: AMPHIBIA

Orden: CAUDATA

Familia: AMBYSTOMATIDAE

Nombre científico: *Ambystoma mexicanum* (Shaw, 1789)

Nombre común: Ajolote

Náhuatl: Axolotl.



En cuanto a su distribución, el *A. mexicanum* se localizaba de manera natural en todo el Valle de México incluyendo los lagos de Chalco, Texcoco y Zumpango (Aguilar, 2005). Sin embargo, con el paso de los años y de la urbanización de esos sitios, la población de esta salamandra se ha reducido dramáticamente, a tal punto que actualmente solo es en los canales de Xochimilco el último remanente natural de su hábitat (Zambrano, 2009) es por ello que esta especie se encuentra en calidad de peligro (P) (CONABIO, 2011) y bajo la protección de la NOM-059-SEMARNAT-2001.

## 5. Objetivos

### **General:**

Caracterizar a las células germinales del urodelo *Ambystoma mexicanum* durante la etapa del establecimiento de la gónada indiferenciada.

### **Particulares:**

- 1. Analizar la morfología de las células germinales del *A. mexicanum* durante los estadios del desarrollo 40 al 45.
- 2. Determinar el patrón de expresión de la proteína de los genes *Vasa* y *Laminina*, en las células germinales durante su migración y establecimiento en la gónada indiferenciada.
- 3. Establecer el comportamiento proliferativo de las células germinales del *A. mexicanum* durante los estadios larvales 40 y 45.
- 4. Describir la posible ruta de migración de las células germinales del *A. mexicanum*

## 6. Metodología

### 6.1 Colecta y mantenimiento de los ejemplares.

Se utilizaron embriones y larvas de la especie *A. mexicanum* los cuales fueron donados por el Dr. Luis Zambrano del Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología, UNAM, el cual cuenta con una granja de reproductores. La colecta se llevó a cabo bajo el permiso FAUT-0112. Una vez que se colectaron, los organismos fueron trasladados al acuario de la Facultad de Ciencias de la UNAM para su mantenimiento, el cual se hizo bajo condiciones estándar de temperatura (18 °C +/- 1) y fotoperiodo (12h luz, 12h oscuridad).

### 6.2 Obtención de las muestras.

Los embriones de *A. mexicanum* fueron colectados y posteriormente clasificados por medio de las tablas de desarrollo de elaboradas por Bordzilovskaya y colaboradores (1989) y de Nye (2003). Los estadios colectados para la elaboración de este trabajo incluyeron del 40 al 45 (E-40, E-41, E-42, E43, E-44, E-45) así mismo, se utilizaron dos ejemplares correspondientes al estadio 55 (E-55) con el fin de dar seguimiento a los cambios que presentan las células germinales en estadios avanzados del desarrollo gonadal; de igual manera como control de la expresión de las proteínas *Vasa* y *Laminina* con respecto a estadios tempranos como lo son los correspondientes al E40 y al



E45. Las larvas una vez clasificadas se destinaron dos ejemplares para diferentes técnicas: microscopía de campo claro (4), inmunodetección (2), citometría de flujo (2) y para el ensayo de Western blotting 3 organismos para el E-41 y 2 muestras para E-50. Lo cual significó que para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron 8 larvas por estadio (E-40 a E-45 y E-55) y un total de 55 organismos para todo el estudio. Los organismos fueron anestesiados con hielo, para bajar al máximo su metabolismo y posteriormente se decapitaron, para poder llevar a cabo las técnicas antes mencionadas (Cuadro 2).

Estadio	Microscopía de Campo Claro	Inmuno-detección	Citometría de flujo	Western Blotting	Total
E-40	4	2	2	*	8
E-41	4	2	2	3	11
E-42	4	2	2	*	8
E-43	4	2	2	*	8
E-44	4	2	2	*	8
E-45	4	2	2	*	8
E-50	*	*	*	2	2
E-55	*	2	*	*	2
<b>Total</b>					<b>55</b>

**Cuadro 2.** Se muestra la distribución de los organismos empleados para cada técnica del presente trabajo, así como el total de larvas utilizadas

### 6.3 Microscopía de campo claro

Con el objeto de realizar la caracterización de las células germinales a nivel morfológico, se recurrió por un lado a la técnica de histología convencional (parafina) y para detallar los hallazgos encontrados con dicha técnica se procedió a realizar la técnica convencional de microscopía de alta resolución.

En este caso las larvas de E-40 al E-45, así como las gónadas aisladas correspondiente con el E-55 se fijaron en fijador de Karnovsky (Paraformaldehído 1%-Glutaraldehído 2.5% en

amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4) (Karnovsky, 1965) durante 12 h a 4 °C, se lavaron con buffer de cacodilatos pH 7.3 y se realizó una postfijación con tetraóxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% durante 1 h. Luego de ello, se llevó a cabo un lavado con agua destilada y una deshidratación en una serie de alcoholes graduales desde 70% a 100% por un lapso de 15 min en cada uno; las muestras se pusieron en acetonitrilo por 40 minutos, posteriormente se llevaron a una mezcla de acetonitrilo- epón (1:1) por 1 hora, acetonitrilo-epón (1:2) por otra hora, finalmente se dejaron en epón puro toda la noche; ya por último se procedió a incluir las muestras en resina epóxica y se polimerizaron 12 h a 60 °C. De estos bloques se obtuvieron cortes semifinos de 1-2  $\mu\text{m}$  por medio de uso de ultramicrotomo y se tiñeron con azul de toluidina. Únicamente del E-55 se obtuvieron cortes finos, los cuales, se contrastaron con plomo y uranilo, para su observación al microscopio electrónico.

Para la técnica de histología convencional, se utilizó el fijador Bouin (Acido pícrico saturado y formol al 10%) luego de ello se lavó para eliminar el fijador y se llevó a cabo una deshidratación con alcoholes graduales a partir del 30% al 100%, se prosiguió a realizar un aclarado con xileno e inclusión en paraplast. Se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor por medio del micrótopo de rotación y finalmente se hizo la tinción de Hematoxilina-Eosina.

#### 6.4 Medición de células germinales

Con el objetivo de caracterizar a las células germinales durante los estadios abarcados en el presente estudio, así como los cambios morfológicos que presentan, se llevó a cabo la medición de largo y ancho de cada una de ellas en los estadios de desarrollo E-41, E-45 y E-55, ello para comparar estadios contrastantes. Las células fueron observadas en cortes semifinos y se midió su largo y ancho por medio de una reglilla micrométrica y con microscopía de luz, con el objetivo 40X. Se realizó el promedio y la desviación estándar para la medición de cada estadio. La n (tamaño de la muestra) fue de 6.

#### 6.5 Inmunofluorescencia

Con el objetivo de detectar la expresión de la proteína Vasa en células germinales de larvas de E-40 al E-45 y E-55, por medio de inmunodetección, las muestras se fijaron en Paraformadehído al 4% (PFA 4%) en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.1 por 20 minutos, se lavaron con PBS 1X pH 7.1 por 5 minutos y se dejaron en sacarosa al 30% hasta el momento de la inclusión en medio tissue-

teck y su posterior congelación con hexano a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Una vez que los cortes transversales de  $20\mu\text{m}$  se realizaron, se depositaron en una cámara húmeda por 1 h. se realizó un lavado con PBS 1X pH 7.1 por 10 minutos sobre los cortes, se les agregó Tritón 1% en PBS por 10 minutos, se les hizo un lavado rápido con PBS, para proseguir con el bloqueo de uniones inespecíficas con albumina 1% en PBS durante 2 horas y en oscuridad. Se prosiguió a colocar el anticuerpo primario contra la proteína Vasa (cuadro 3) durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego de 4 lavados con PBS de 5 minutos cada uno, se colocó albumina 1% en PBS por 15 min. Los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (cuadro 3) por 1 h; transcurrido el tiempo se hicieron 4 lavados con PBS por 5 minutos y finalmente las secciones se montaron con medio acuoso DAKO, se hicieron las observaciones correspondientes al microscopio confocal.

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
<b>Vasa</b>	conejo	[1:200]	Cy3 (anti-rabbit)	[1:100]
<b>Laminina</b>	conejo	[1:200]	Cy3 (anti-rabbit)	[1:100]

**Cuadro 3.** Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la caracterización de células germinales.

### 6.7 Citometría de flujo.

La citometría de flujo, es una técnica que permite clasificar poblaciones celulares en función de características tales como tamaño, volumen, densidad, dispersión de la luz, entre otras; así es posible realizar la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula, con lo cual, se pueden hacer análisis cuantitativos y multiparamétricos para definir una población celular (Salgado, 2002). Ello hace posible distinguir poblaciones específicas de células dentro de un complejo celular y consecuentemente es posible separar dichas poblaciones en función de su tamaño relativo, granularidad y la intensidad relativa de fluorescencia cuando hay presencia de un fluorocromo en las células (Salgado, 2002). Esta técnica se conoce como FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting por sus siglas en inglés).

Con el objeto de distinguir la población de células germinales se procedió a realizar esta técnica para los estadios 40 y 45 para así mostrar cuantitativamente el incremento esperado en el número de células correspondientes específicamente a células germinales.

Se colectaron larvas de *A. mexicanum*, del estadio 40 y 45, se fijaron con Paraformaldehído (PFA) al 4% por 15 minutos, se les dio un lavado con Buffer de fosfatos (PBS) 1x pH 7.1 por 5 minutos y posteriormente se dejaron en sacarosa al 30%. Los ejemplares fueron homogeneizados en PBS 1x pH 7.1 con un pistilo y almacenados a 4 °C. El homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min, después de ello se prosiguió a re suspender con pipeta.

Se tomaron 500 µl para obtener el control positivo y el negativo. Se llevaron los tubos de cada estadio a la centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos. El “pellet” que resultó se conservó y se desechó el sobrenadante. Se colocaron 500 µl de albúmina al 1% durante 2 horas a 4°C y en rotación. Se incorporó el anticuerpo Vasa [1:250] durante toda la noche a 4°C y en rotación solo en los tubos positivos.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 30 minutos cada uno a 4°C y en rotación, centrifugado y re suspendido por cada lavado. Se agregó nuevamente albumina al 1% y se colocó el anticuerpo secundario Cy3 [1:100] a cada tubo, positivos y negativos.

Se realizaron 3 lavados con PBS 1x pH 7.1 de 30 minutos cada uno con su respectivo centrifugando y re suspendido. Finalmente los tubos resultantes los controles y los experimentales se leyeron en el clitómetro FACS y se analizaron los datos con el programa Cell-Quest.

### 6.8 Western Blotting

La técnica de Western Blotting es ampliamente utilizada en la biología molecular, puesto que permite la separación e identificación de proteínas específicas de la célula a partir de un complejo proteico (Mahmood & Yang, 2012). En el presente estudio para corroborar la presencia de la proteína Vasa a nivel molecular se procedió a realizar un ensayo de Western blotting en embriones y larvas de los estadios de desarrollo 41 y 50.

### 6.8.1 Extracción de Proteínas

La extracción de proteínas es un paso previo para llevar a cabo la identificación de proteínas por medio de Western Blotting. Se utilizaron 3 larvas de *A. mexicanum* en estadio 41 y 2 larvas de estadio 50. Las larvas fueron maceradas mecánicamente con pistilos de biología molecular en PBS 1x pH 7.1. Posteriormente se re suspendió cada estadio en 250  $\mu$ l de buffer Tyrodes-BSA (Ver anexo 1), luego de ello se lisaron las células con buffer de lisis Laemmli 2x (anexo 1). Se agitaron con vortex y fueron calentadas en ebullición a baño maría por 3 minutos, se repitió este proceso 3 veces y se almacenó la proteína hasta su uso. Como control se utilizó una muestra de testículo de ratón. Finalmente se cuantificó la proteína mediante un espectofotómetro. Las cantidades de proteínas tanto el total como en 20  $\mu$ g y 10  $\mu$ g aparecen en el cuadro 4.

Estadio	Cantidad de proteína total ( $\mu$ g)	Cantidad de proteína en 20 ( $\mu$ g)	Cantidad de Proteína en 10 ( $\mu$ g)
<b>41</b>	28.90	14.45	7.22
<b>50</b>	43.66	21.83	10.91
<b>Testículo de ratón (control)</b>	47.61	23.80	11.90

**Cuadro 4.** Cuantificación de proteínas totales extraídas de estadio 41 y 50 de larvas de *A. mexicanum*.

### 6.8.2 Western Blotting

Las proteínas totales obtenidas a partir de la extracción de las larvas de estadio 41 y 50 de *A. mexicanum*, así como el control de testículo de ratón, fueron separadas mediante electroforesis. Para ello se corrieron en un gel de poliacrilamida al 30% (anexo 1). En cada pozo se corrieron 2 tratamientos: 20  $\mu$ g de proteína para cada estadio y 10  $\mu$ g de proteína para cada estadio (Cuadro 4). Ello con el propósito de estandarizar cuál era la cantidad de proteína adecuada para el corrimiento. La corrida de electroforesis se realizó en buffer Tris-Glicina pH 8.3 durante 2 horas a 15 Volts.

Después de la obtención del gel se procedió a realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa por medio de la realización de un sándwich de transferencia (anexo 1). Nuevamente se corrió en cámara de electroforesis en buffer de transferencia: Tris-Glicina-Metanol pH 8.3 durante 2 horas, a 25 Volts y 200 mA de corriente.

Al finalizar la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se tiñó con rojo de Ponceau por un minuto, esto para corroborar la integridad de las proteínas en la membrana, luego se lavó con agua corriente y con buffer TBS-Tween (anexo 1) hasta que se limpió por completo. Luego de ello, se realizó una inmunodetección, esto con el objeto de identificar de manera específica la proteína de interés: Vasa. Para ello, la membrana se bloqueó con leche descremada Svelty al 10% en buffer TBS-Tween por dos horas a temperatura ambiente. Se colocó el anticuerpo primario Vasa en concentración [1:1000] en buffer TBS-Tween toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se le realizaron 3 lavados con TBS-Tween por 15 minutos cada uno a la membrana. Después de ello, se incubó el anticuerpo secundario acoplado a HRP anti-conejo [1:6000] en buffer TBS-Tween por una hora a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados con buffer TBS-Tween por 20 minutos cada uno.

Finalmente se llevó a cabo la detección de proteínas por medio de una solución para reacciones de quimioluminiscencia para biología molecular: BM Chemical Western Blotting Mouse/Rabbit. La membrana fue expuesta a placas para rayos X de Kodak de 1 a 5 minutos. Posteriormente se revelaron con fijador y revelador para su análisis.

## 7. Resultados

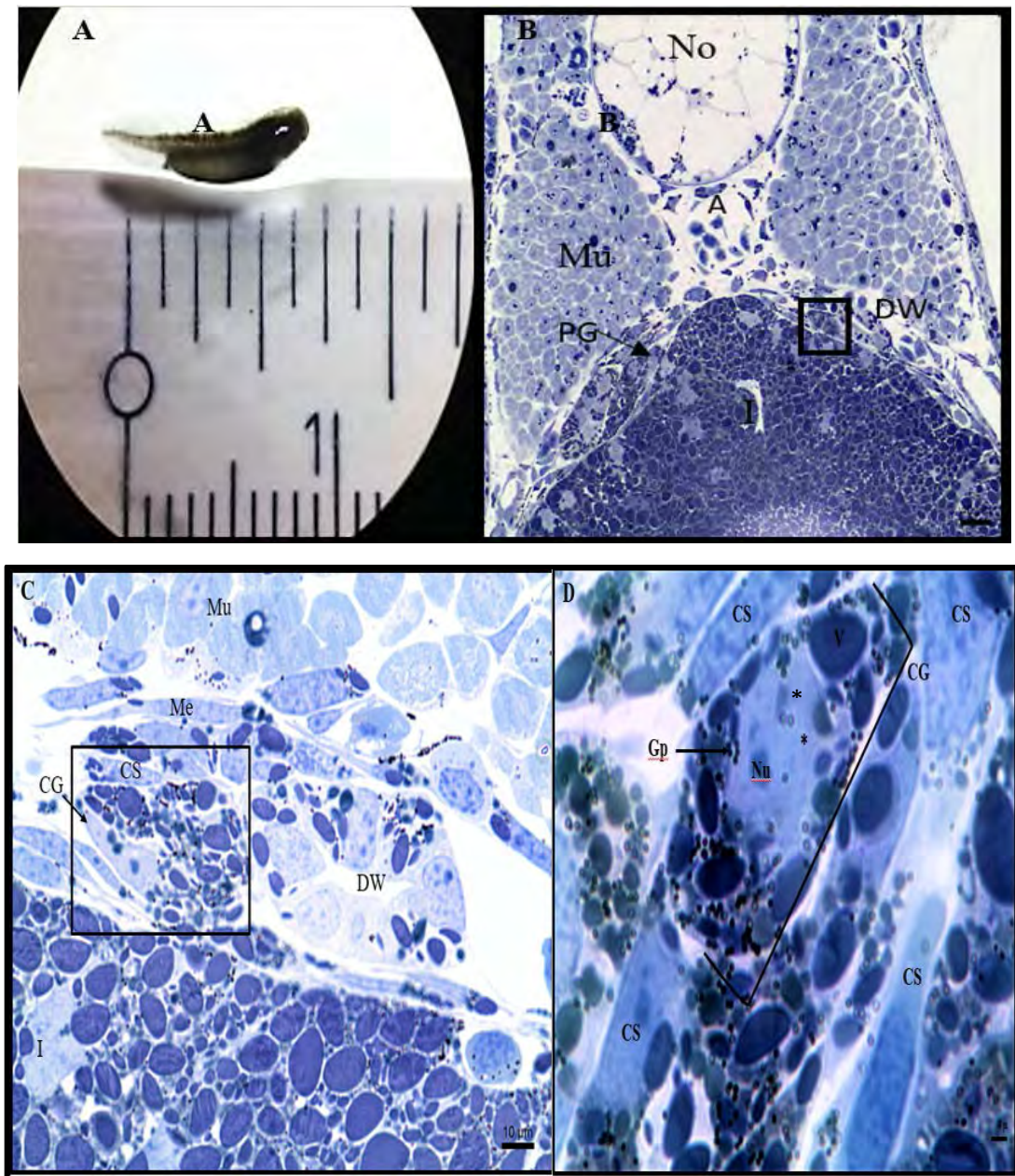
### 7.1 Microscopía de Campo Claro: Morfología

La microscopía de campo claro permitió identificar la morfología que presentan las células germinales, así como sus cambios e interacciones con otros tipos celulares, a lo largo de los estadios de desarrollo analizados en este trabajo.

#### Estadio 40 (11 dpf)

En embriones de *A. mexicanum* en estadio 40 con 11 días post-fertilización (dpf) (Fig. 2 A) se encontró la formación de un primordio gonadal, localizado en la porción media dorsal de los embriones, en cercanía con los conductos de Wolff y del mesonefros (Fig. 2B). Este primordio gonadal está constituido por un escaso número de células germinales en estrecha relación con células somáticas (Fig. 2C). Las células germinales se caracterizaron por ser más grandes que el resto de los tipos celulares, por la presencia de un núcleo grande inmerso en un citoplasma con abundantes plaquetas vitelinas, así como la presencia de gránulos de pigmento (Fig. 2D).





**Fig. 2.** **A)** Embrión de *A. mexicanum* en E-40 con 11 días post-fertilización (dpf). Talla correspondiente a 10mm. **B)** Corte transversal teñido con azul de toluidina de un embrión en E-40. Notocorda (No), Aorta dorsal (A), Músculo (Mu), Mesonefros (Me), Conducto de Wolff (DW), Intestino (I) Primordio gonadal (PG) en 100x. **C)** Primordio gonadal (recuadro) compuesto por células somáticas (CS) y células germinales (CG) visto en 400x **D)** Célula germinal (GG) con un citoplasma grande con abundantes gránulos de pigmento (Gp) y plaquetas de vitelo (V) Un núcleo prominente (\*) y su nucléolo (Nu) que se rodea por células somáticas (CS) en 1000x.

#### Estadio 41 (12 dpf)

Para el estadio 41 el embrión con 12 dpf se encuentra a punto de eclosionar de su cápsula gelatinosa, la cual se compone de elementos que le proveen de nutrimentos y soporte (Fig. 3A). Por otro lado el primordio gonadal se nota que aumenta ligeramente de tamaño con respecto al estadio anterior y mantiene la misma ubicación; es decir, adyacente a los conductos de Wolff y mesonefros (Fig. 3B). Las células germinales que conforman al primordio son escasas y se hallan rodeadas por células somáticas (Fig. 3C). Dichas células germinales son grandes (Cuadro. 5) con un núcleo prominente, el cual presenta un nucléolo evidente, el citoplasma casi en su totalidad presenta plaquetas vitelinas y unos cuantos gránulos de pigmento (Fig. 3D).

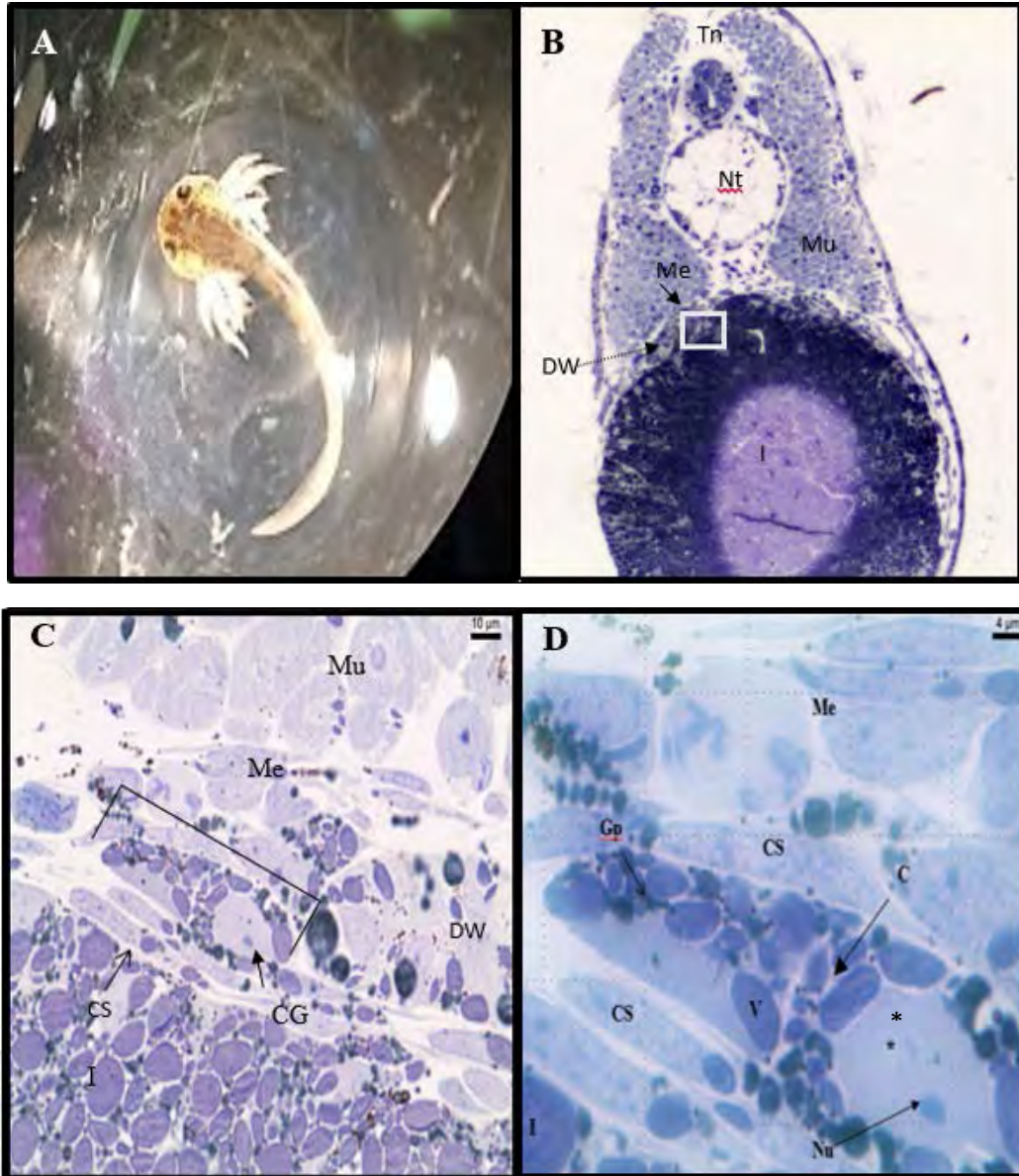
#### Estadio 42 (13 dpf)

En el estadio 42 la larva ya se ha desprendido por completo de su cápsula gelatinosa y ha crecido un poco más con respecto al E-41 (Fig. 4A). El primordio gonadal conserva la ubicación: adyacente a los conductos de Wolff y por debajo del mesonefros (Fig. 4B). Las células germinales que lo conforman muestran un núcleo más redondo con respecto a los estadios anteriores, la presencia de plaquetas vitelinas tiende a disminuir con respecto a los E-40 y E-41 (Fig 4C). En algunas larvas de este estadio se pueden observar células germinales dada su morfología, que presuntamente migran hacia la región donde se localiza el primordio gonadal (Fíg. 4D).

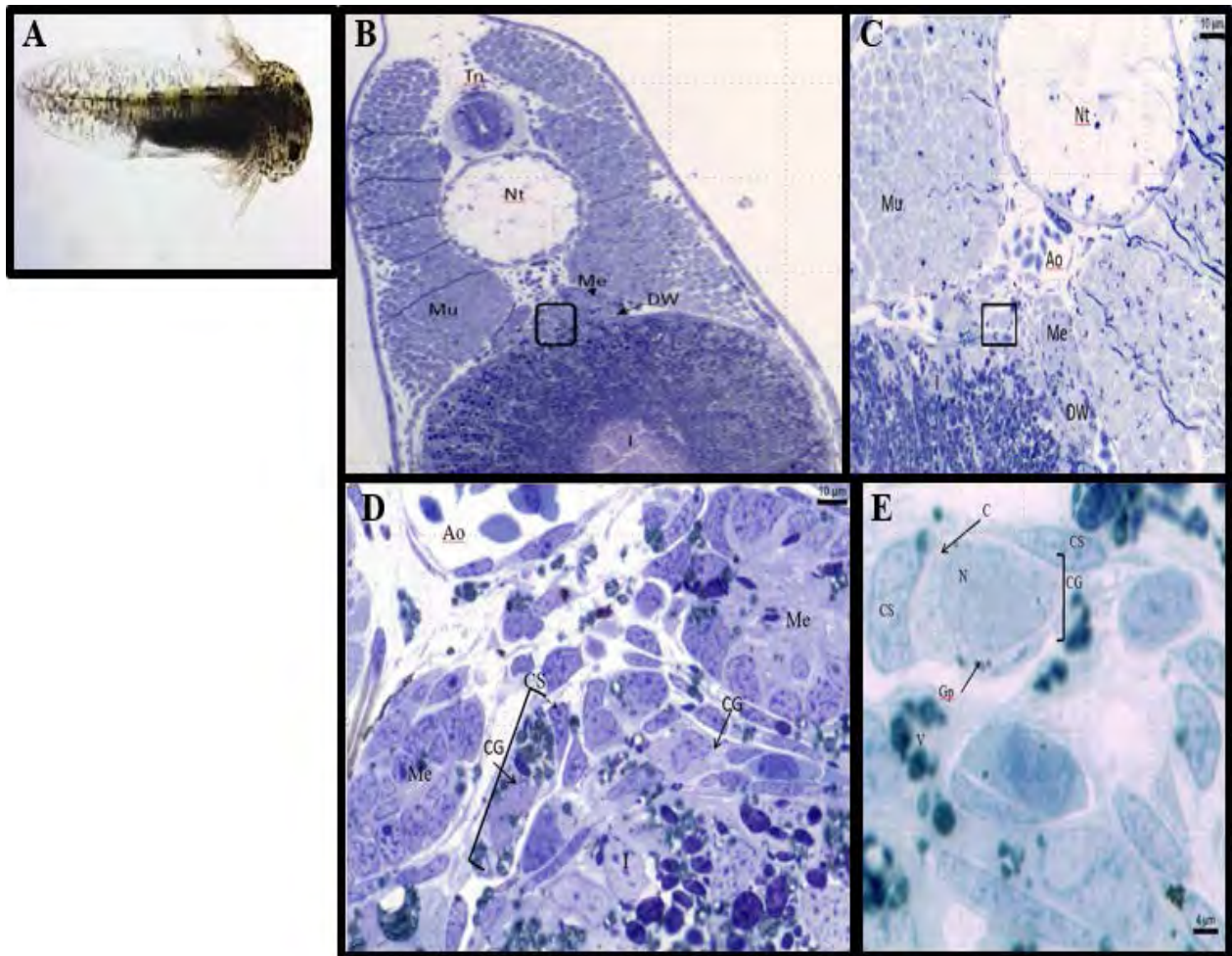
#### Estadio 43 (14dpf)

Con respecto al estadio 43 (E-43) en las larvas se nota un incremento en el tamaño y complejidad de las branquias con respecto al estadio anterior (Fig. 5A). Las gónadas indiferenciadas son pareadas, se observan entre los riñones mesonéfricos y los conductos de Wolff. Es notoria la presencia de grandes vasos sanguíneos adyacentes a dichas estructuras (Fig. 5B). Las gónadas como estructuras pareadas, compactas y suspendidas sobre la cavidad celómica por medio de un mesenterio (Fig. 5C) se hallan conformadas por células germinales con núcleo prominente y citoplasma claro. Como en el E-43 las plaquetas vitelinas en el citoplasma disminuyen notablemente, aunque es continúa la presencia de gránulos de pigmento. Así mismo, es clara su interacción con células somáticas (Fig. 5D).



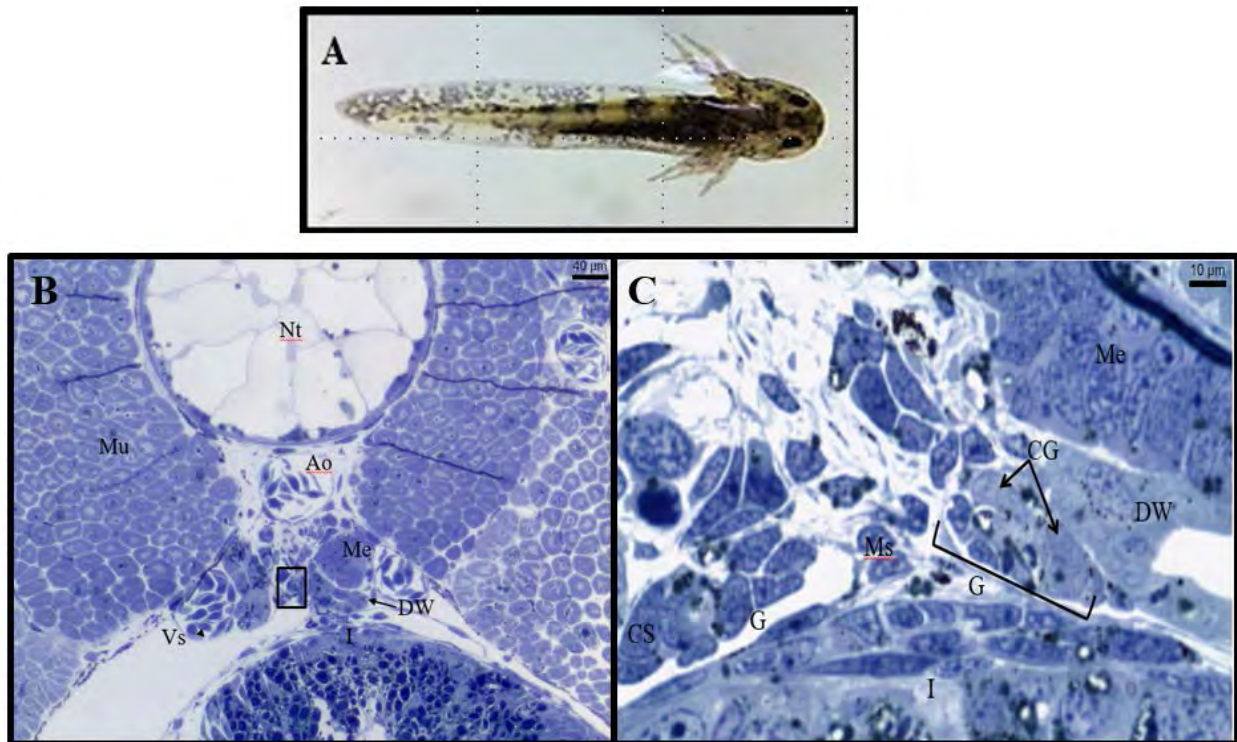


**Fig. 3.** Embrión de *A. mexicanum* en E-41 (12 dpf). **A)** Fotografía de embrión que aún no eclosiona de su membrana gelatinosa. **B)** Corte transversal en E41 teñido con azul de toluidina. Se aprecia de la parte más anterior a la posterior el tubo neural (Tn), notocorda (Nt), músculo (Mu) y en la zona media, se observan los conductos de Wolff (DW) en vecindad con los mesonefros (Me) y en estrecha relación con ambas estructuras, es evidente el primordio gonadal (recuadro) 40X. **C)** Detalle del primordio gonadal compuesto por células germinales (CG) en estrecha relación con las células somáticas (CS). El primordio gonadal esta adyacente al conducto de Wolff (DW) y al mesonefros (Me) 400X. **D)** Detalle de la imagen anterior en donde es evidente que las células germinales, cuentan con un núcleo redondo grande (\*) con un nucléolo evidente (Nu) y un citoplasma con plaquetas vitelinas (V) así como por gránulos de pigmento (Gp) las células germinales (CG) están rodeadas por varias células somáticas. 1000X.



**Fig.4.** Larva de *A. mexicanum* en E-42 (14 dpf). **A)** Imagen de la larva. **B)** y **C)** Corte transversal, panorámico para mostrar la ubicación del primordio gonadal. Se identifica de la parte anterior a la posterior el tubo neural (Tn), la notocorda (Nt), a ambos lados el músculo (Mu) y por debajo a los costados el mesonefros (Me), los conductos de Wolff (DW) y primordio gonadal en la región media posterior (recuadro) 40X. **D)** Detalle del primordio gonadal el cual se encuentra por debajo del mesonefros (Me), la aorta dorsal (Ao) y adyacente a los conductos de Wolff (DW) y por encima del Intestino (I) 400X. **E)** Detalle de la célula germinal (CG), en donde se aprecia su núcleo redondeado y prominente (N) el cual esta inmerso en un citoplasma claro y homogéneo (C) que cuenta con la presencia de gránulos de pigmento (Gp) es evidente la estrecha relación de las células somáticas (CS) con la célula germinal 1000X.



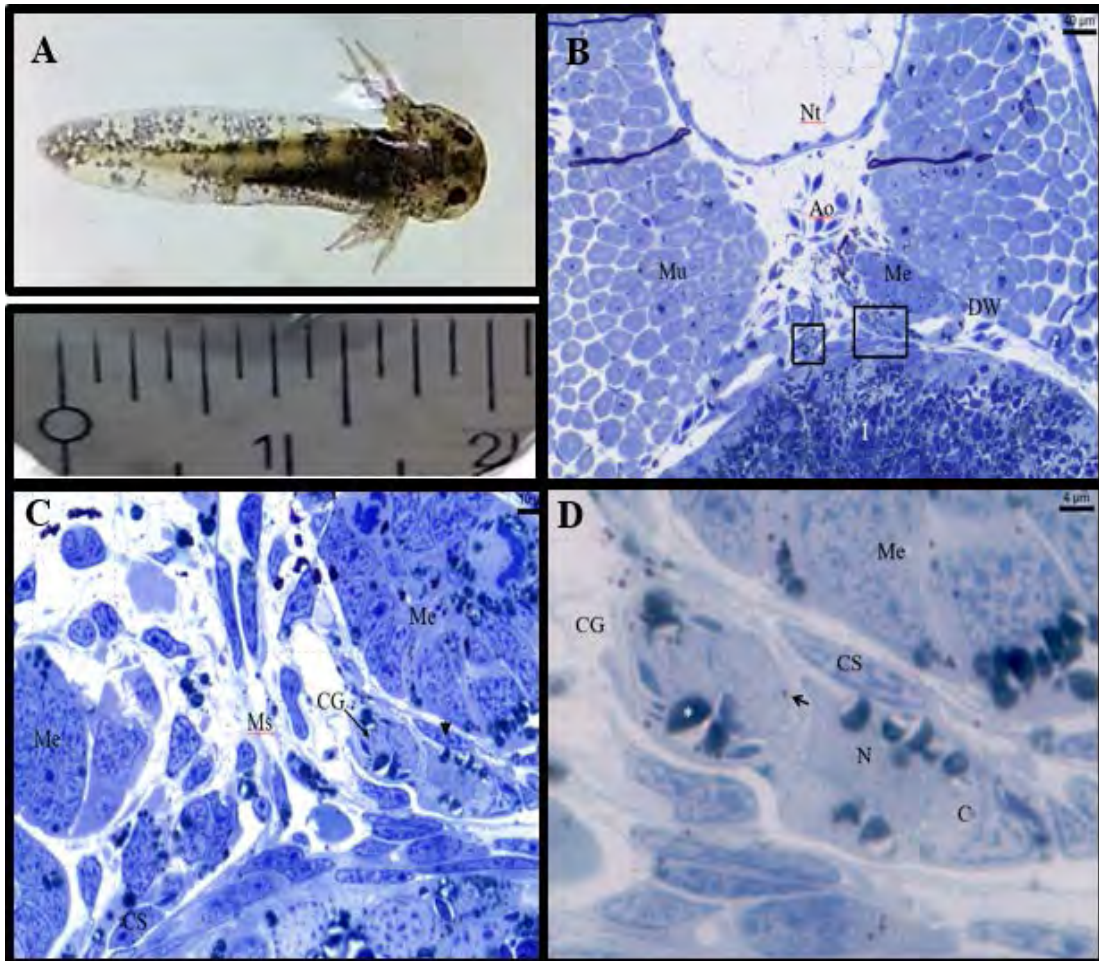


**Fig. 5.** Larva de *A. mexicanum* en E-43 (15 dpf). **A)** Se muestra la fotografía de una larva en E 43, la mayor diferencia con respecto al estadio 42 está en el incremento del tamaño de sus branquias y la longitud del cuerpo. **B)** Corte transversal semifino de la larva teñido con azul de toluidina, en donde se ubica la gónadas (recuadro) se hallan entre el complejo formado por el mesonefros (Me) y conductos de Wolff (DW), se aprecian también vasos sanguíneos adjuntos a ellos con eritroblastos en su interior (Vs) también se ubica la parte anterior del embrión con la localización de la notocorda (Nt) la aorta dorsal (Ao) y el músculo (Mu) 40x. **C)** Detalle de la imagen anterior, donde se pueden ubicar claramente ambas gónadas (G) en estrecha relación con los conductos de Wolff (DW) y el mesonefros (Me). Las gónadas se conforman por células germinales (CG) y células somáticas (CS). Ms, mesenterio que va al intestino (I) 400X.

#### Estadio 44 (16 dpf)

En el estadio 44 aunque es muy parecido al estadio anterior, hay un aumento ligero en la talla del cuerpo y en la cabeza de las larvas con respecto al E-43 (Fig. 6A). Las gónadas se encuentran pareadas y se observan como estructuras compactas localizadas en la porción media dorsal del cuerpo adheridas mediante un mesenterio y continúa su estrecha relación con los conductos de Wolff y con el mesonefros (Fig. 6B). Las células germinales son escasas en las gónadas, apenas dos de ellas por gónada, en el plano del corte; sin embargo, un mayor número de células somáticas las delimitan (Fig. 6C). Las células germinales con su ya característica morfología presentan

núcleos grandes y lobulados embebidos en un citoplasma claro y disperso. Como en el E-43 las células germinales presentan una disminución en la cantidad de plaquetas vitelinas, pero no así en los gránulos de pigmento que siguen presentes. La interacción con las células somáticas es evidente, puesto que estas últimas se encuentran rodean a las CG (Fig. 6D).



**Fig. 6.** Larva de *A. mexicanum* en E-44 (16 dpf). **A)** Fotografía de la larva en E-44, es notable el incremento en el tamaño corporal (12mm), cabeza y branquias. **B)** Corte transversal de la larva teñido con azul de toluidina. Imagen panorámica que ubica la localización de las gónadas (recuadros), en donde se observa su relación con respecto a mesonefros (Me) y conductos de Wolff (DW) en la parte media del cuerpo, notocorda (Nt), músculo (Mu) y aorta dorsal (Ao) son otras estructuras que se aprecian. 40X. **C)** Las gónadas, cercanas al mesonefros (Me), se aprecia que son estructuras pareadas y con un número escaso de células germinales (CG) que son rodeadas por células somáticas (CS), se aprecia también un mesenterio (Ms).100X. **D)** Detalle de una gónada en donde se observa que es una estructura compacta, pequeña y formada por dos células germinales (CG), las cuales cuentan con un núcleo (N) ovalado embebido en un citoplasma claro (C), que tiene gránulos de pigmento (→) y plaquetas de vitelo (\*) y células somáticas (CS) en estrecha relación.1000X.

### Estadio 45 (17 dpf)

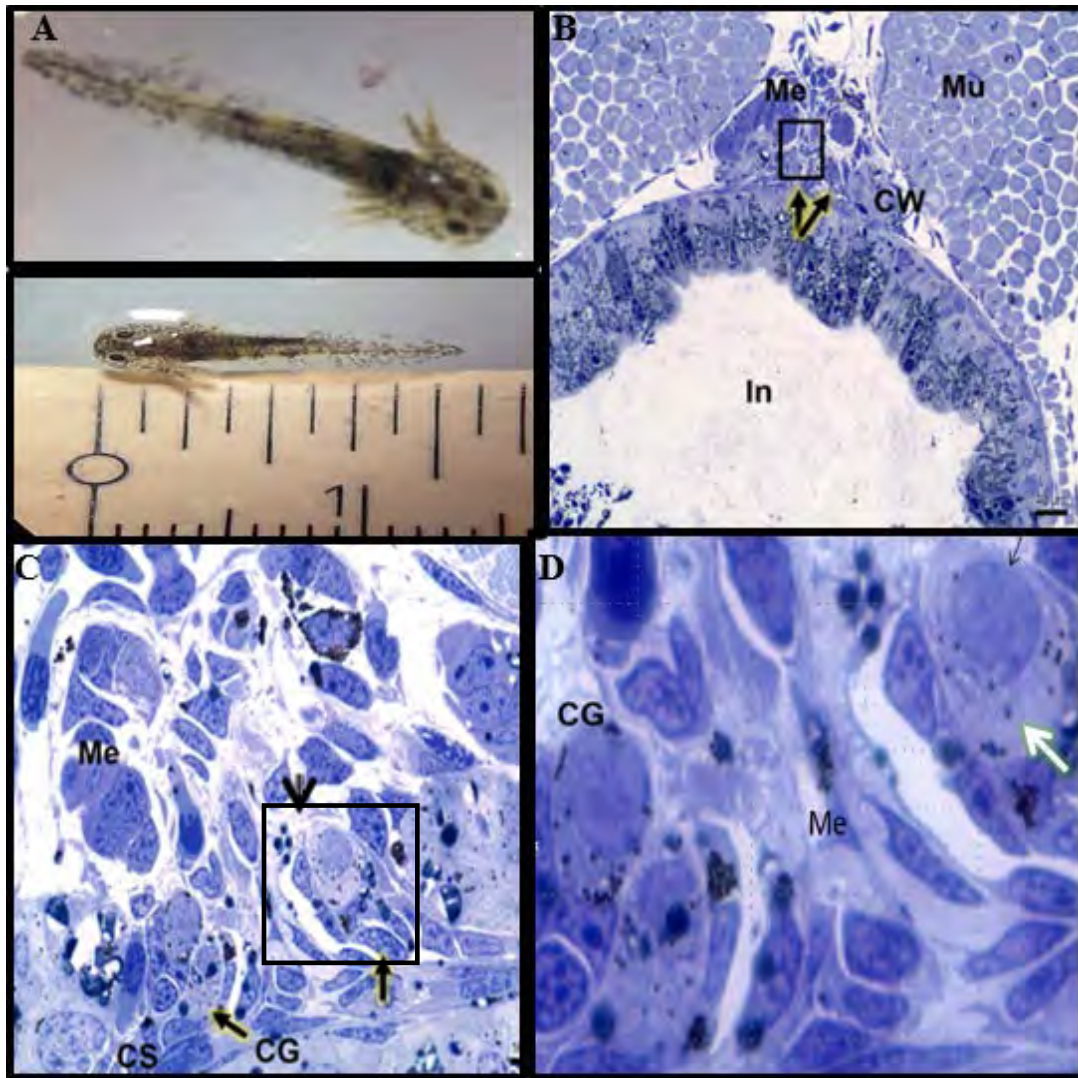
Para el estadio 45 (E-45) las larvas continúan creciendo observándose un leve incremento en el tamaño del cuerpo y en la cabeza (Fig. 7A). En cuanto a la morfología de las gónadas, éstas se ubican en la cavidad celómica y continúan situándose en estrecha cercanía con los conductos de Wolff y mesonefros (Fig. 7B y Fig. 8B). Las gónadas presentan un número limitado de células germinales (Fig. 7C) es evidente que las células germinales presentan la morfología típica común a todos los vertebrados: un núcleo que es totalmente redondo, citoplasma claro y presencia de gránulos de pigmento. Han aumentado su talla con respecto a estadios previos (Cuadro. 5). Es de notar la total ausencia de plaquetas vitelinas en el citoplasma (Fig. 7D). Hay una relación más estrecha de las CG con las células somáticas, que en conjunto constituyen la gónada indiferenciada (Fig. 7D).

En este estadio también se sugiere la presencia de unas células germinales muy cercanas a los conductos de Wolff, situadas en la región más posterior de la larva, cercanas a la cloaca. No se aprecian células somáticas que rodeen a las CG, puesto que la gónada quedo situada en la región más anterior de la larva (Fig. 8 C y D).

### Estadio 55

Para comparar cómo son los cambios en la morfología que llevan a cabo las células germinales durante el establecimiento de la gónada indiferenciada, se analizó el estadio 55. Observamos que la gónada ha aumentado considerablemente en tamaño y se aprecia como una estructura compacta y alargada, así mismo se observó una estructura anexa la cual se identificó como la epigónada, estructura que dará origen a la formación de los cuerpos grasos (Fig. 9A) La gónada se compone de células germinales, las cuales tienen un acomodo particular, se encuentran formado grupos en estrecha relación con las células somáticas (Fig. 9B, C). La morfología de éstas muestra la presencia de un prominente núcleo redondeado que ocupa gran parte del citoplasma, el cual carece por completo tanto de plaquetas vitelinas como de pigmento, contrario a los estadios previos analizados: E-40 al E-45 (Fig. 9C). La ultraestructura corrobora estas características (Fig. 9D).





**Fig 7.** Larva de *A. mexicanum* en E-45 (17 dpf). **A)** Fotografía de la larva E-45 se nota un ligero incremento en longitud total (15mm) y en el tamaño de la cabeza. **B)** Corte transversal de la larva teñido con azul de toluidina, se muestra las gónadas (recuadro). Se localizan en la cavidad celómica en estrecha relación con el conducto de Wolff (CW) y con el mesonefros (Me) También se aprecia el Intestino (In) 100X. **C)** Gónadas (recuadro) conformadas por pocas (una o dos) células germinales (CG) y por células somáticas (CS), las gónadas son estructuras pareadas compactas y de forma oval. 400X. **D)** Detalle de la imagen anterior de las células germinales (CG) se aprecia su núcleo (→) mismo que ya es de forma redonda, se halla embebido en un citoplasma claro con numerosos gránulos de pigmento (→) Las CG son notablemente más grandes que las células somáticas (CS) las cuales les rodean y conforman también a las gónadas.

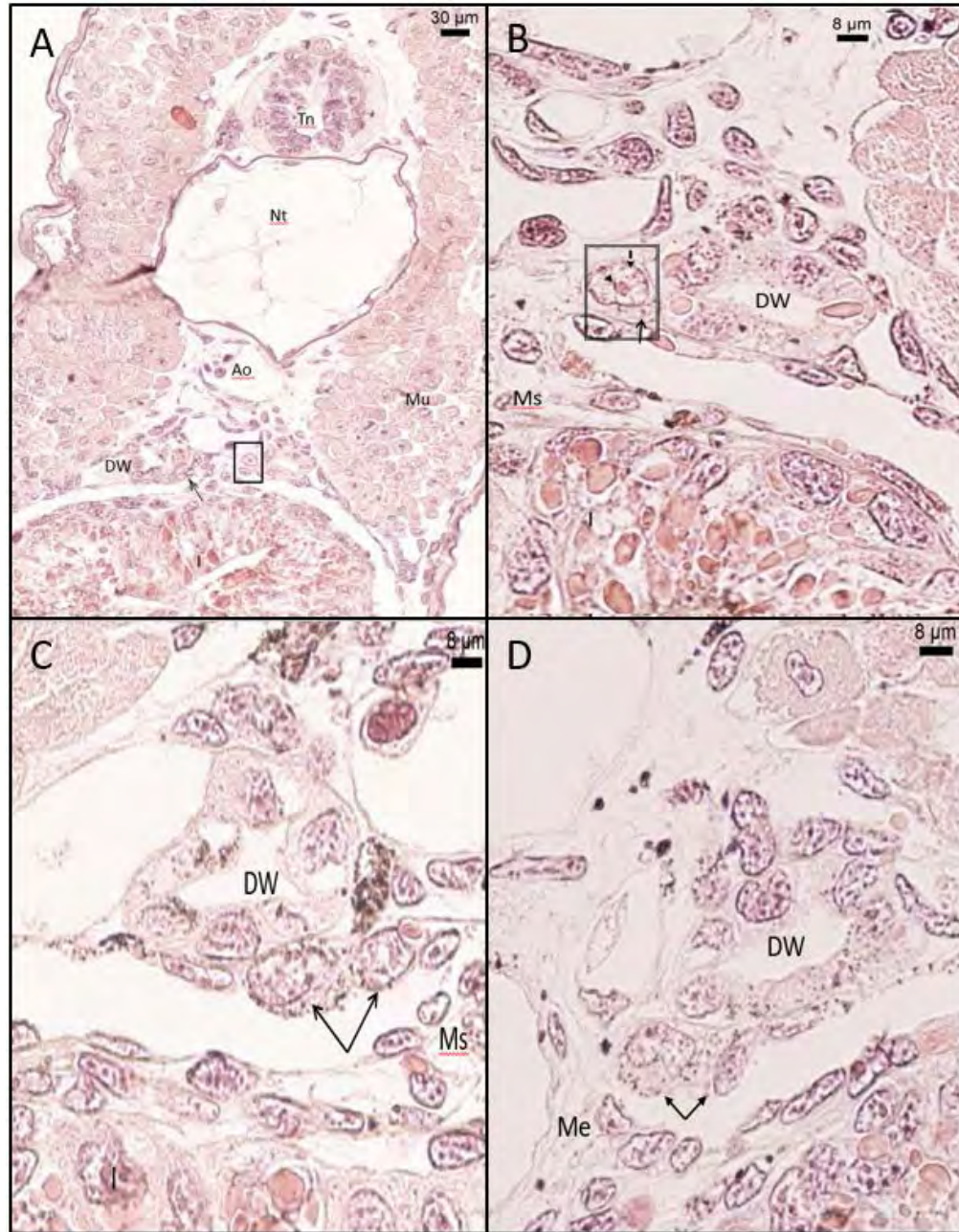
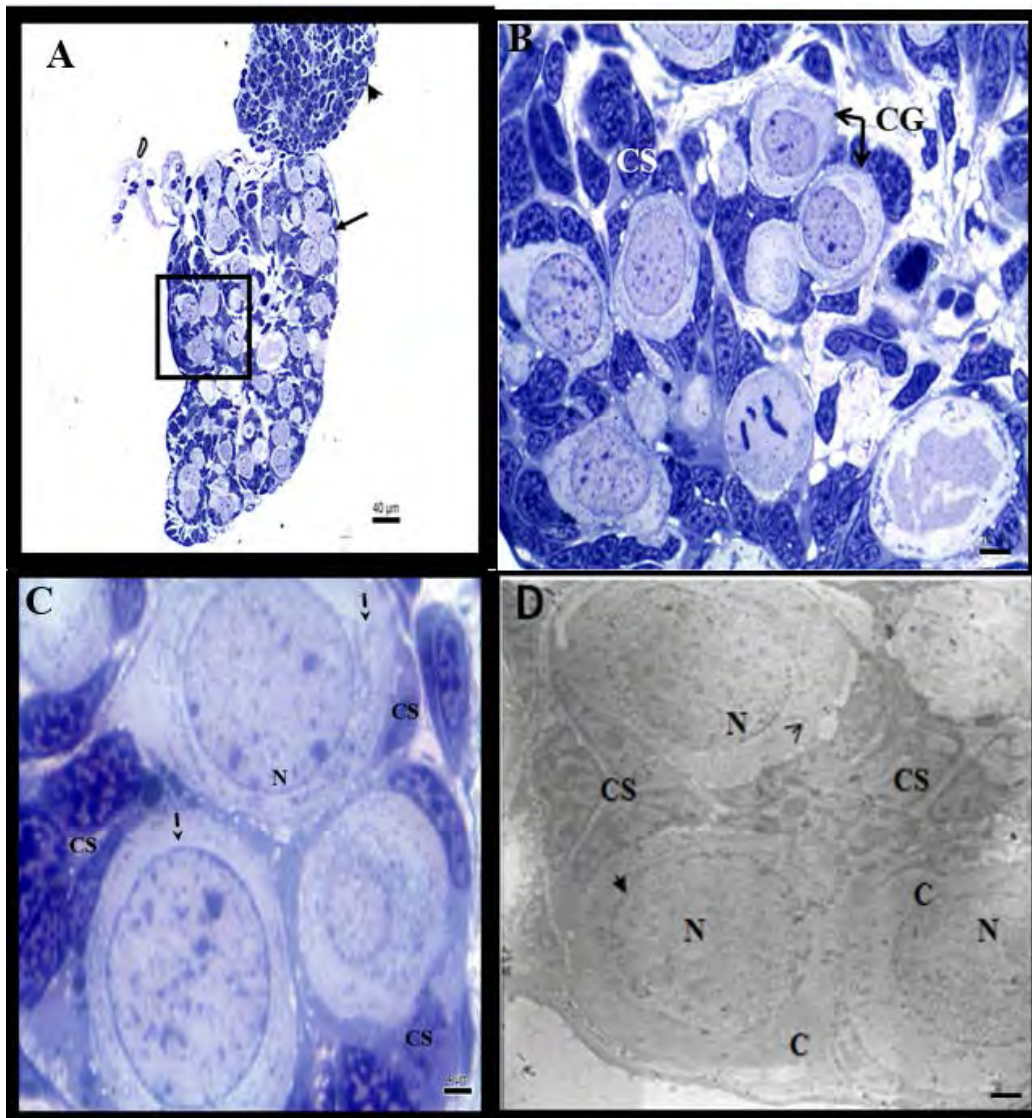


Fig. 8. Larva de *A. mexicanum* en E-45 ( 17 dpf). **A**) Imagen panorámica de corte transversal de la región media posterior en donde se ubica la gónada (recuadro y flecha) se sitúa a CG adyacentes a los conductos de Wolff (DW) 40X. **B**) Acercamiento de la imagen anterior en donde se aprecia una célula germinal (CG), con su gran núcleo (---►) y nucléolo (►) y citoplasma claro (—►). **C**) y **D**) Se presentan dos células germinales (—►) con pigmento en su citoplasma en estrecha relación con los conductos de Wolff (DW) Tinción H-E, B, C y D. 400X.





**Fig. 9.** Larva de *A. mexicanum* en E-55 (90 dpf). **A)** Imagen panorámica de la gónada aislada, la cual se presenta como estructura alargada y compacta rodeada por un epitelio simple ( —▶), en el interior. Se aprecian grupos de células germinales (recuadro), en la región anterior adyacente a la gónada se aprecia la epigónada (▶) **B)** Detalle de un grupo de células germinales (CG) rodeadas por células somáticas (CS) 100x **C)** Acercamiento de la imagen anterior en donde se aprecian las células germinales (CG) de forma redonda, un núcleo (N) muy prominente que ocupa gran parte del volumen de la célula y un claro citoplasma sin gránulos de pigmentos ni plaquetas de vitelo (▶), note la estrecha relación de las células somáticas (CS) con las germinales 1000x. **D)** Micrografía electrónica de transmisión que muestra la ultraestructura de las células germinales: un núcleo prominente y esférico (N) rodado por una envoltura nuclear (▶) un citoplasma claro (C) y abundantes mitocondrias (▶) y células somáticas en estrecha relación. 2000X.



## 7.2 Medición de células germinales

Se llevó a cabo la medición de las células germinales de los estadios más representativos del presente trabajo: 41, 45 y 55. Se midió tanto el largo como el ancho de las mismas, para determinar en promedio su talla. Los resultados se muestran en el cuadro 5. Se nota un creciente aumento en la talla de las células germinales. En el E-41 el largo de las células germinales fue de 9.2  $\mu\text{m}$  y un ancho de 5.3  $\mu\text{m}$ , mientras que en E-45 hubo un aumento de 0.6  $\mu\text{m}$  en el largo y 0.3  $\mu\text{m}$  en ancho. Se observó que el aumento en estos estadios de desarrollo (41 y 45) fue mínimo. Sin embargo, en el E-55 el aumento de talla por parte de las células es notorio, con respecto a los estadios previos (41 y 45) puesto que, su largo es de 11.3  $\mu\text{m}$  y su ancho de 8.3  $\mu\text{m}$ .

Estadio	Células germinales	
	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )
<b>41</b>	9.2 $\pm$ 2.3 $\mu\text{m}$	5.3 $\pm$ 1.0 $\mu\text{m}$
<b>45</b>	9.6 $\pm$ 2.9 $\mu\text{m}$	5.6 $\pm$ 1.3 $\mu\text{m}$
<b>55</b>	11.3 $\pm$ 0.8 $\mu\text{m}$	8.3 $\pm$ 0.8 $\mu\text{m}$

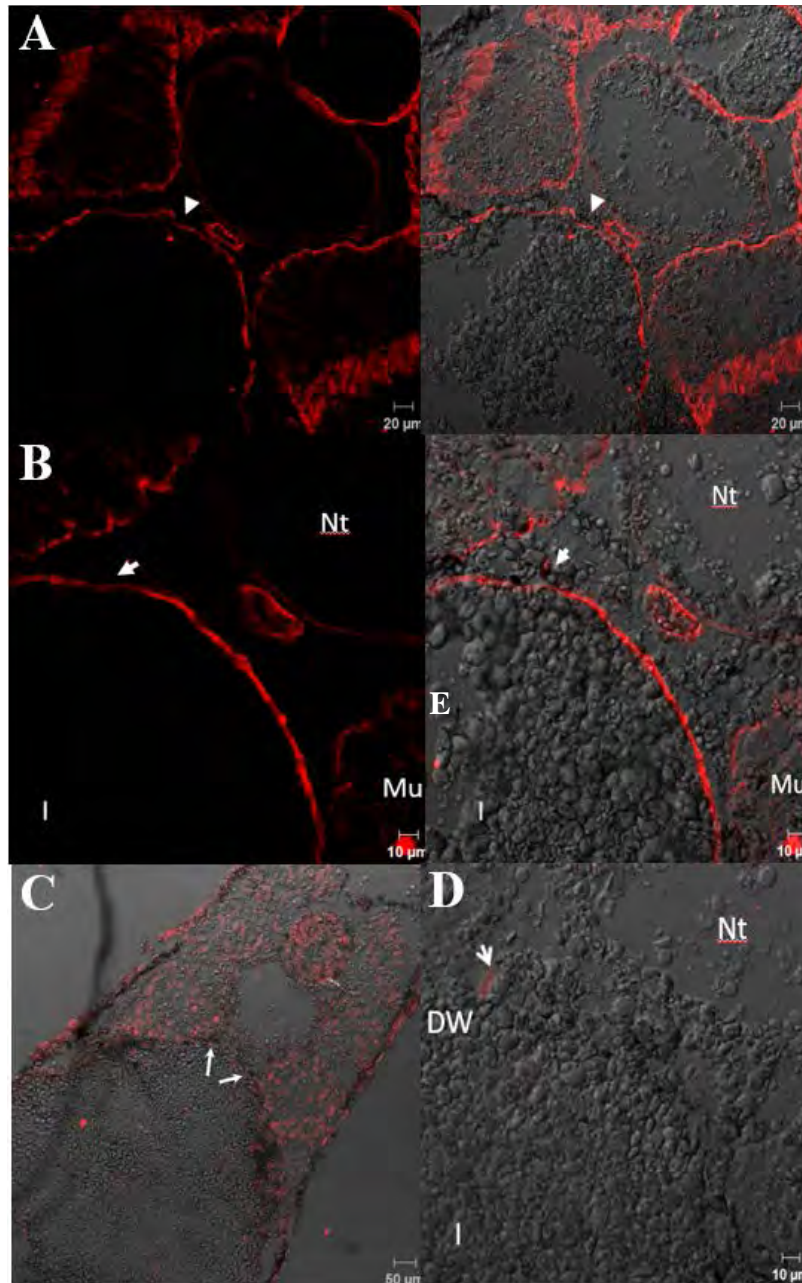
**Cuadro 5.** Medidas del largo y ancho de las células germinales de E-41, E-45 y E-55 de *A. mexicanum*.

## 7.3 Inmuflorescencias

### Expresión de Laminina y Vasa

#### Estadio 40

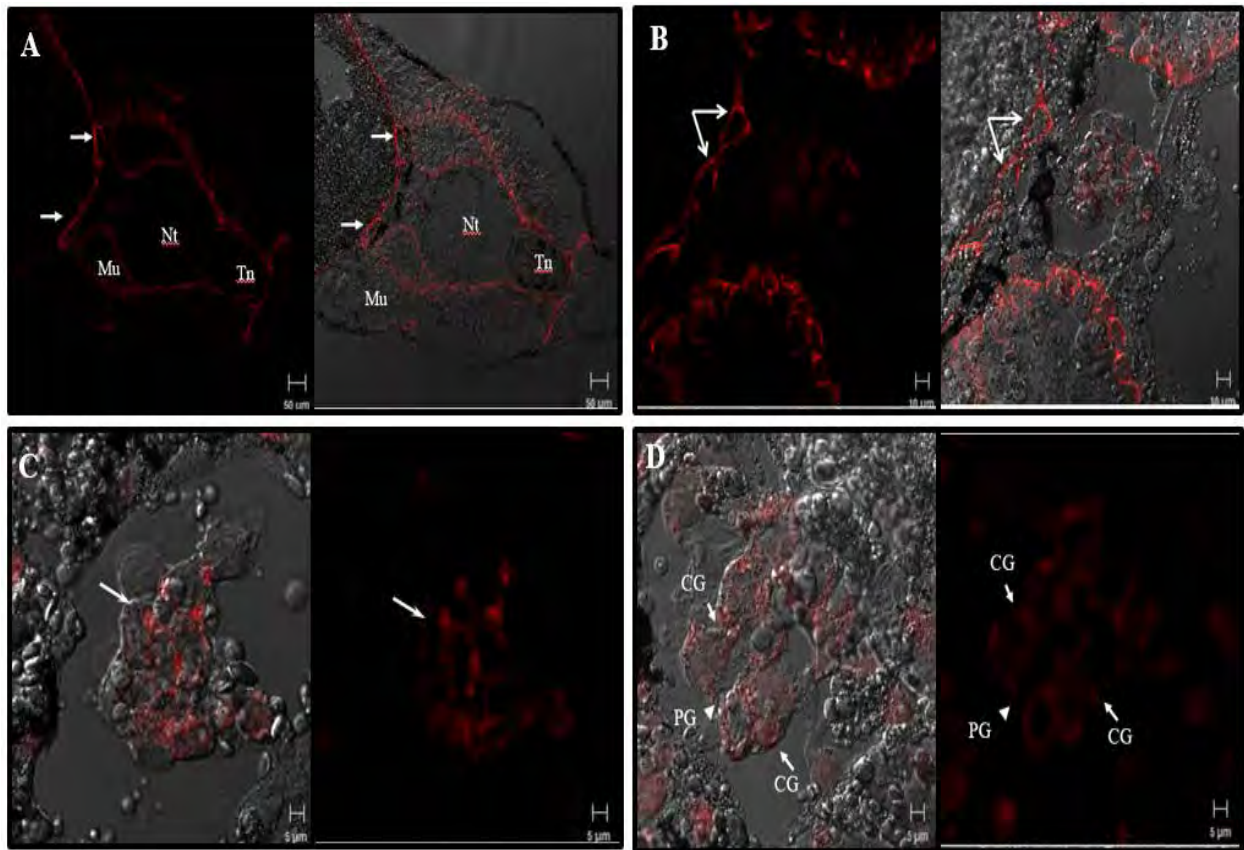
En larvas de *A. mexicanum* en el E-40, la expresión de laminina muestra de manera panorámica la distribución espacial de los órganos en el interior de la larva a nivel de la región media posterior, lo cual ayudó a ubicar la zona donde ocurre la formación del primordio gonadal. Este se localiza en la región media dorsal del cuerpo, cercana al riñón mesonéfrico y los conductos de Wolff (Fig. 10 A-C). Sin embargo, la expresión de la proteína Vasa no parece tan clara puesto que hay cierta inespecificidad (Fig. 10D); no obstante, una marca positiva a Vasa en una célula cercana al conducto de Wolff (Fig. 10E) podría indicar que se trata de una célula germinal presuntiva.



**Fig. 10.** Embrión de *A.mexicanum* en E-40. Expresión del marcador laminina y Vasa para la identificación del primordio gonadal y células germinales. **A) – B)**, la expresión la laminina delimita el tubo neural (Tn), notocorda (Nt), músculo (Mu), e intestino (I). La punta de flecha señala la posición en la que ocurre la formación del primordio gonadal. **C)** Se muestra la expresión de la proteína Vasa en el mismo embrión, se observa cierta inespecificidad. **E)** Se muestra la expresión de Vasa en el citoplasma de una célula cercana a conductos de Wolff (DW), posición correspondiente con una célula germinal (flecha).

### Estadio 41

En la larva de *A. mexicanum* en E-41 es visible una estructura adjunta a los conductos de Wolff, en la región media a la que se denomina primordio gonadal, el marcaje revelado por laminina delimita bien esta zona (Fig. 11A y B). Por otro lado, la expresión de la proteína Vasa también es clara y evidente en el citoplasma de células que por correspondencia con la ubicación dentro del primordio y por ser positivas a Vasa son células germinales (Fig. 11C) dichas células (dos de cada lado) forman parte del primordio gonadal (Fig. 11D).



**Fig. 11.** Larva de *A. mexicanum* en E- 41. **A)** Expresión de laminina que delimita tubo neural (Tn), notocorda (Nt), músculo (Mu) y el complejo mesonefros-conducto de Wolff (→) **B)** Detalle de la zona donde ocurre la formación del primordio gonadal (flechas) **C)** Región que presuntamente da lugar al primordio gonadal (flecha) con la expresión de la proteína Vasa. **D)** Detalle de primordio gonadal (PG), note la expresión de Vasa en el citoplasma de las células germinales (CG).

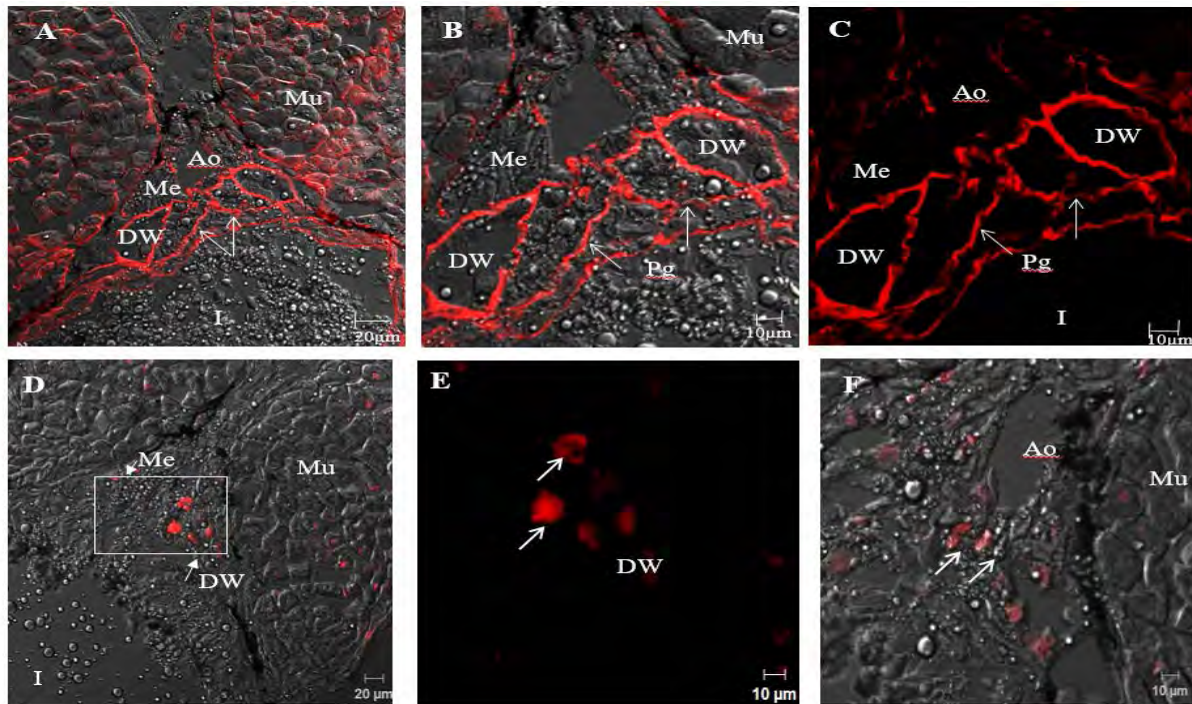
#### Estadio 43.

En larvas de E-43 se identifica al primordio gonadal en la parte media dorsal del cuerpo del organismo y por encima del intestino (Fig. 12A y B). La marca de laminina nuevamente ayuda a delimitar la estructura de la gónada en formación, la cual se halla en estrecha relación con los conductos de Wolff, puesto que se localizan adyacentes a estos y por debajo del mesonefros (Fig. 12B y C). Este primordio gonadal, se aprecia como una estructura compacta y ligeramente más grande con respecto a estadios previos (Fig. 12B y C). Por su parte la expresión de la proteína Vasa se torna más específica, puesto que las células que se marcan, se localizan en la estructura que corresponde a la estructura delimitada por laminina, ello sugiere que las células positivas a este marcador, en efecto son células germinales (Fig. 12D y E). La marca citoplásmica de Vasa es evidente en dos células del primordio gonadal, que se localiza a un lado del conducto de Wolff (Fig. 12E y F). Se muestra además la expresión citoplásmica de dos células que presuntivamente son germinales dado que presentan expresión de Vasa en su citoplasma y además porque se hallan en la posición acorde con la gónada en formación. De manera interesante algunas células del conducto de Wolff (DW) también presentan marca (Fig. 12F).

#### Estadio 44

En larvas de *A. mexicanum* en E-44, se observa un aumento en el tamaño del mesonefros como de los conductos de Wolff (Fig. 13A y B); sin embargo, la gónada en formación aún aparece como una estructura pequeña y compacta, que se encuentra en estrecha relación con estas estructuras, evidenciado por la expresión de laminina (Fig. 13A-C). Por otro lado, se aprecia que son pocas las células germinales dentro de la gónada en formación; sin embargo, es evidente la expresión citoplásmica característica de la proteína Vasa en dichas células, las cuales, además se hallan agrupadas y contenidas en una estructura que aparentemente es una gónada pequeña (Fig. 13D y E). Se reconocen células positivas a Vasa localizadas por debajo del mesonefros, en donde ocurre la formación de la gónada. Dado que son positivas a la marca citoplásmica de Vasa y por su ubicación, se sugiere que son células germinales (Fig. 13E y F).

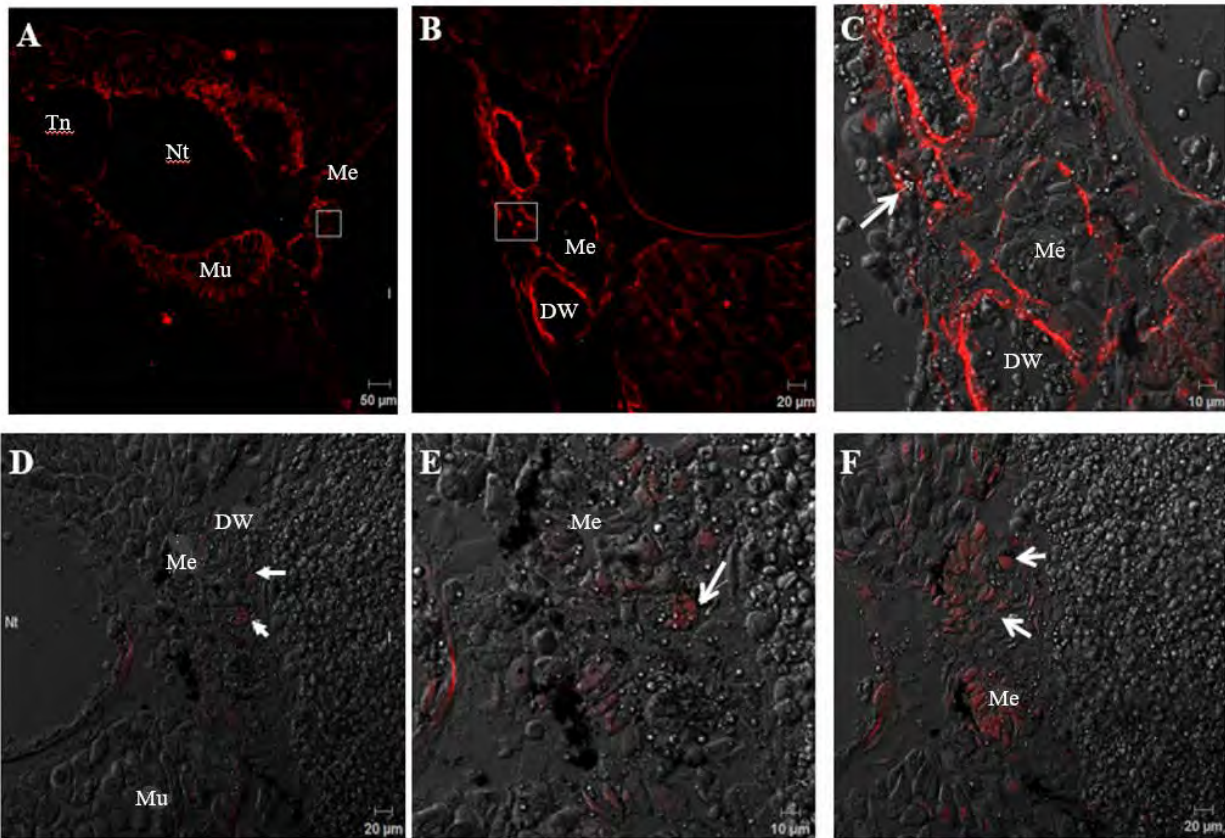




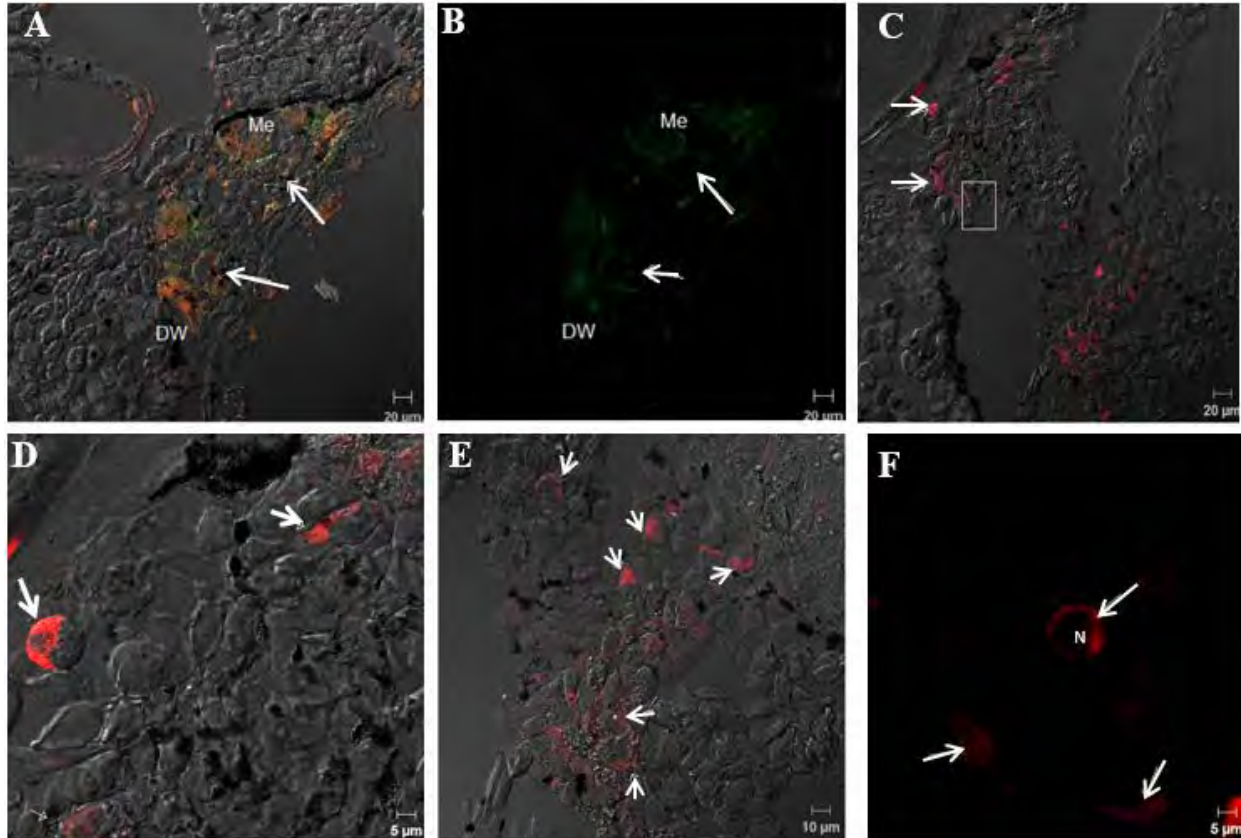
**Fig. 12.** Larva de *A. mexicanum* en E-43. **A)** Expresión de laminina en cortes transversales de la larva, donde se delimita el músculo (Mu) y el complejo mesonefros-conducto de Wolff en la parte media del cuerpo por arriba del intestino (I). **B y C)** Detalle de la zona donde se ubica el primordio gonadal (Pg) en estrecha relación con conducto de Wolff (DW) y mesonefros (Me). **D)** Expresión de la proteína del gen *Vasa*, la marca (recuadro) se localiza en células cercanas al mesonefros y conducto de Wolff. **E)** Detalle de la imagen anterior, en donde son evidente células que presentan una típica marca citoplásmica (flecha) de *Vasa*, evidenciando que se trata de células germinales en vecindad con el conducto de Wolff (DW). **F)** Se muestra la expresión citoplásmica de dos células que presuntivamente son germinales (flechas).

#### Estadio 45

En larvas de *A. mexicanum* en E-45. Es identificable una estructura compacta cercana al mesonefros y conductos de Wolff que se sugiere por la marca de la expresión de laminina y *Vasa* es una gónada indiferenciada (Fig. 14 A y B). Por otro lado, células que expresaron en su citoplasma a la proteína *Vasa*, se identificaron en este estadio como células germinales (Fig. 14 C-F) éstas muestran un aumento en tamaño, su forma tiende a ser redonda y se localizan en la región donde se lleva cabo la formación de las gónadas (Fig.14C y E). Así mismo se localiza un grupo de células positivas al marcaje de *Vasa* en la región media del cuerpo (Fig. 14E). Se nota que las células germinales encontradas poseen un núcleo grande que ocupa gran parte del volumen del citoplasma (Fig. 14D y F).



**Fig. 13.** Larva de *A. mexicanum* en E-44. **A)** Imagen panorámica en donde el marcaje con laminina permite identificar tubo neural (Tn), notocorda (Nt), músculo (Mu), mesonefros (Me), conducto de Wolff (DW) y gónada en formación (recuadro). **B)** Acercamiento de la zona donde se forma la gónada indiferenciada (recuadro). **C)** Detalle de la zona de la gónada en formación (flecha) estrechamente relacionada con el complejo mesonefros conductos de Wolff. **D)** Expresión de Vasa en las células germinales (↔), ubicadas en la zona de las gónadas en formación. **E)** Acercamiento de la imagen anterior, se aprecia la marca citoplasmática de Vasa en posibles células germinales. **F)** Detalle de la expresión de la proteína Vasa en el citoplasma en algunas células (flechas).



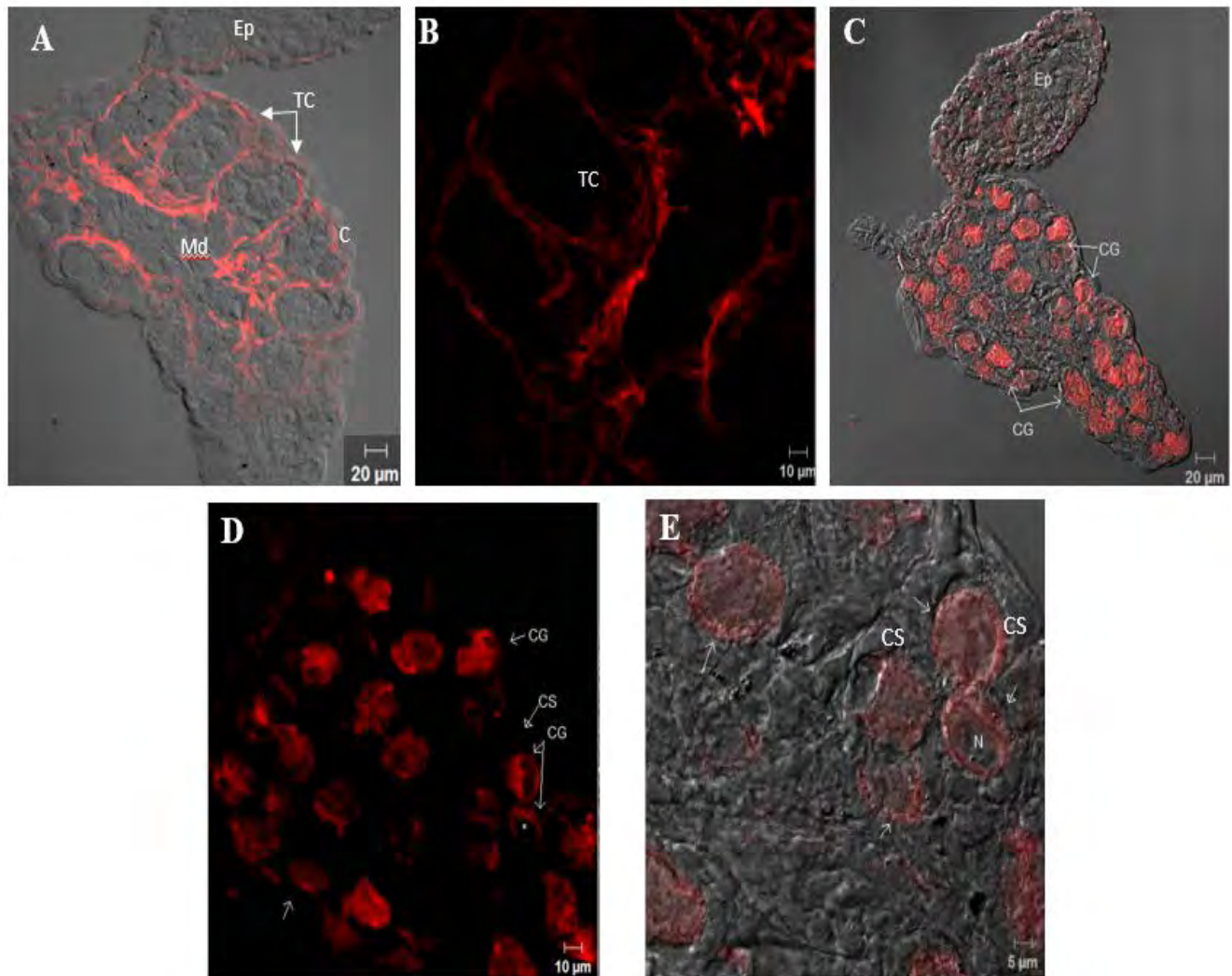
**Fig. 14.** Larva de *A. mexicanum* en E-45. **A)** Doble inmunofluorescencia, en verde la expresión de laminina que delimita estructuras como mesonefros (Me) y conductos de Wolff (DW); en rojo la expresión de Vasa, y se observa las gónadas en formación (flechas). **B)** Laminina delimita la región donde se lleva a cabo la formación de las gónadas (flechas). **C).** Expresión de la proteína Vasa (flecha) en el citoplasma de algunas células en la región gonadal (recuadro). **D)** Detalle de dos células positivas a Vasa (flechas). **E)** Grupos de células germinales que son positivas a Vasa en la región media del cuerpo. **F)** Acercamiento de la misma imagen, se nota la clara expresión del marcador Vasa en el citoplasma (flechas) y se aprecia el núcleo (N).

#### Estadio 55 (Gónada aislada -testículo-)

En larvas de *A. mexicanum* en E-55, ya se aprecia una gónada bien estructurada, alargada y que presenta incluso un anexo que es la epigónada conformado únicamente por células somáticas (Fig. 15A y C). Así mismo, se dan indicios por la morfología que presenta de cuál será su destino próximo: un ovario o un testículo. El marcaje con laminina refuerza esta observación, ya que su marca delimita de manera clara y evidente la formación de cordones testiculares (Fig. 15A y B). Vasa se detectó en el citoplasma de las células germinales, las cuales se hallaron agrupadas en la parte interna (medular) de la gónada con una disposición que sugiere la formación de los futuros



cordones testiculares, lo cual indica la diferenciación hacia testículo (Fig. 15C y D). Dentro de éstos (cordones testiculares) se localizan a las células germinales, las cuales tienen un tamaño considerablemente mayor, con respecto a estadios previos: el núcleo que presentan es grande, su citoplasma es reducido y se rodean por células somáticas (Fig. 15E).

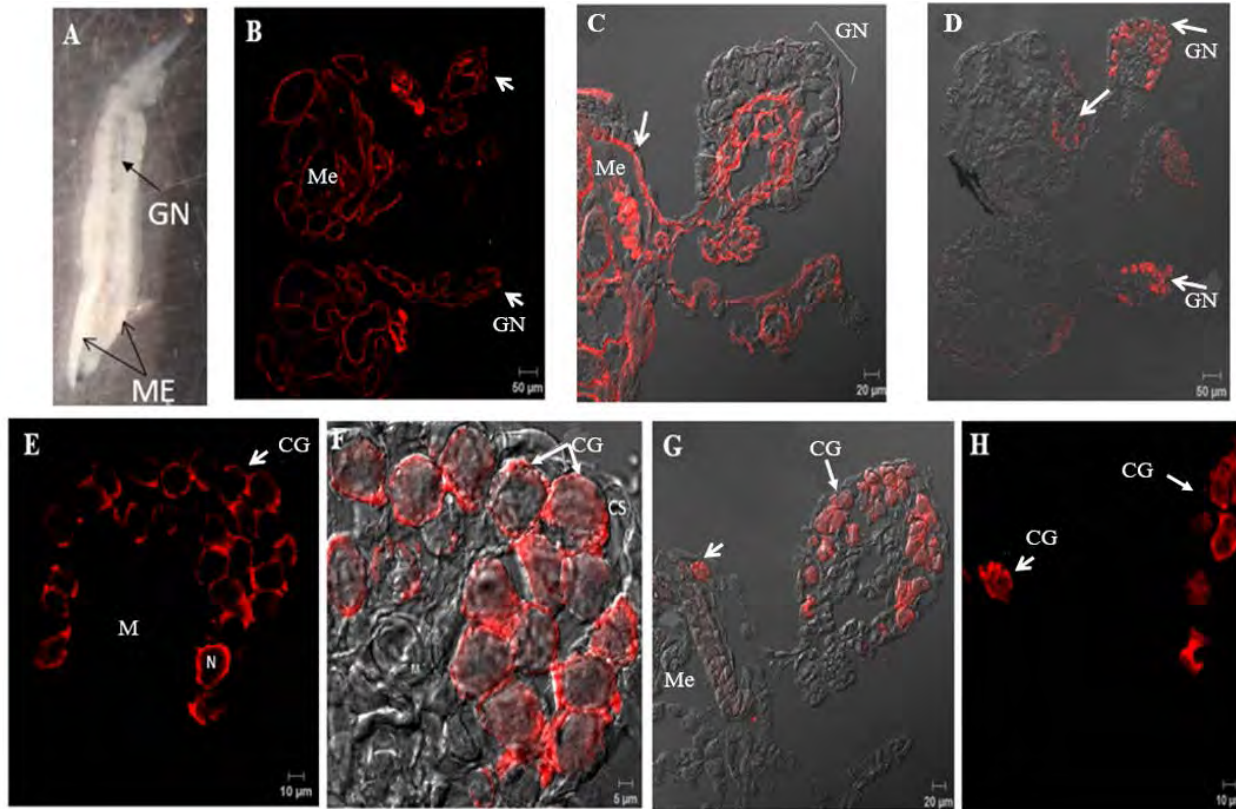


**Fig. 15.** Larva de *A. mexicanum* en E-55. **A)** Se muestra el marcaje del anticuerpo contra laminina, que permite apreciar el arreglo de células germinales, agrupadas en cordones testiculares (TC) estos se localizan en la zona medular de la gónada (Md), adyacente a la gónada se aprecia la epigónada (Ep). **B)** Detalle de la periferia de un cordón testicular (TC) delimitado por la laminina. **C)** Marcaje con Vasa en células germinales (CG) de una gónada en vías de diferenciación testicular (espermatogonias), note la epigónada (Ep) adyacente. **D)** Células germinales con marca de Vasa en un arreglo específico agrupadas en cordones. **E)** Detalle de la marca citoplásmica de Vasa en células germinales, se nota el núcleo (N) y además que son rodeadas por células somáticas sin marca (CS).



### Estadio 55 (Gónada aislada -ovario-)

En cortes transversales de la gónada aislada junto con el mesonefros (complejo gónada – mesonefros) de otra larva en el mismo estadio de desarrollo 55, se aprecian las gónadas y una estructura anexa en la región anterior que es la epigónada (Fig. 16B y C). Las gónadas se encuentran bien organizadas: cuentan con células germinales y somáticas que les dan soporte, (Fig. 16C); sin embargo, su particularidad es el arreglo que presentan las células germinales ya que aparecen en la periferia de la gónada, esto es en la región cortical (Fig. 16C-G). Por otro lado, el marcaje de laminina ayudó a evidenciar no solo la estrecha relación de la gónada con el mesonefros (Fig. 16B) sino que también hace evidente la formación de una cavidad en la porción medular de la gónada (Fig. 16D) lo cual, es un indicio de que la diferenciación gonadal es hacia ovario. Las células germinales dispuestas en la periferia tienen marcaje citoplásmico positivo a Vasa, sus núcleos son muy prominentes (Fig. 16E) y se rodean por células somáticas que les dan soporte (Fig. 16 F). Es de resaltar la presencia de células germinales en la región del mesonefros, lo que nos indicaría una posible ruta migratoria de las células germinales, desde el mesonefros hacia la gónada, a través del mesenterio que los une (Fig. 16C y G).



**Fig. 16.** Larva de *A. mexicanum* en E-55. **A)** Complejo Gónada (GN) - Mesonefros aislados (ME). **B)** Evidencia de la expresión de laminina, delimitando los conductos mesonefricos (Me) y las gónadas pareadas suspendidas (GN) por un mesenterio. **C)** Expresión de laminina en la región medular de una gónada (GN) en diferenciación hacia ovario, note el límite definido por laminina en la cavidad central de la gónada. **D)** Expresión de la proteína Vasa en gónadas (GN). **E)** y **F)** Células germinales en la región cortical de la gónada, evidenciadas por la expresión específica de Vasa en el citoplasma, son notorias las células somáticas (CS) rodeando a las germinales en la periferia de la gónada; en la región medular (M) no hay marcaje. **G)** Expresión de vasa en células germinales (CG) en la región cortical de la gónada, note la presencia de una célula germinal (flecha) en la zona del mesonefros (Me). **H)** Detalle de la imagen anterior, célula germinal (CG) ubicada en el mesonefros.

#### 7.4 Citometría de flujo: FacScan

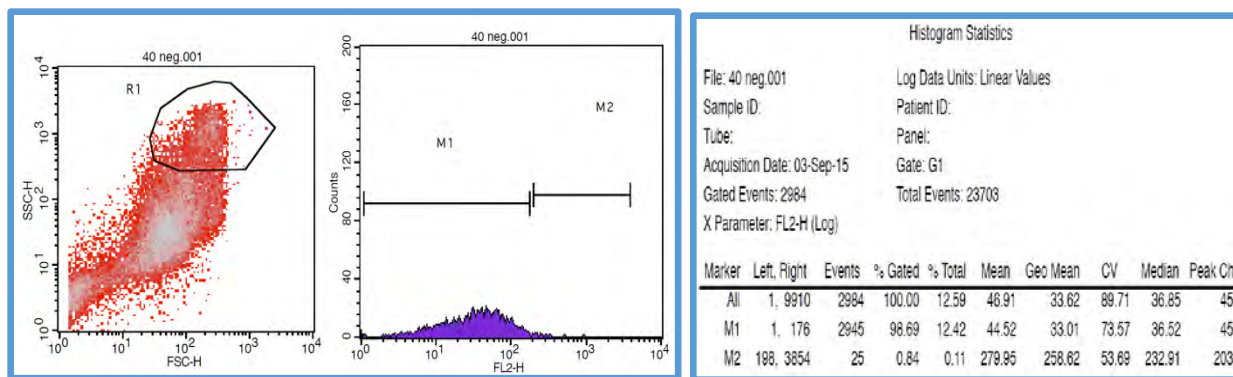
##### Estadio 40

Para saber cuál fue la proliferación, esto es el aumento en el número de células germinales durante el establecimiento de la gónada indiferenciada, desde el primordio gonadal en el estadio inicial de estudio (E-40), en contraste con la gónada indiferenciada en larvas en el estadio 45 (E-45) y especialmente, poder hacer una comparación entre dichos estadios, se recurrió a la técnica de citometría de flujo de tipo FacScan, la cual permitió por medio de un fluorógeno como Cy3 acoplado a Vasa, específico para la línea germinal, hacer una separación de las células positivas a la marca.

Con base en los datos arrojados por la citometría, se sugiere que hay una tendencia de proliferación, en términos de aumento en el número de células que tienen fluorescencia, producto del fluorógeno Cy3 que está conjugado a Vasa, lo cual sugiere, que dichas células podrían tratarse de germinales y que en efecto, hay un incremento en número del estadio 40 con respecto al 45. Los resultados indican que el 3.07% del total de las células (“gate” 100%) fueron positivas a Vasa en el estadio 40 (Cuadro. 7), mientras que en el estadio 45 se observó un incremento de 8.15% de células positivas a Vasa (Cuadro. 9). Esto indica posiblemente un aumento en el número de células germinales entre los estadios.

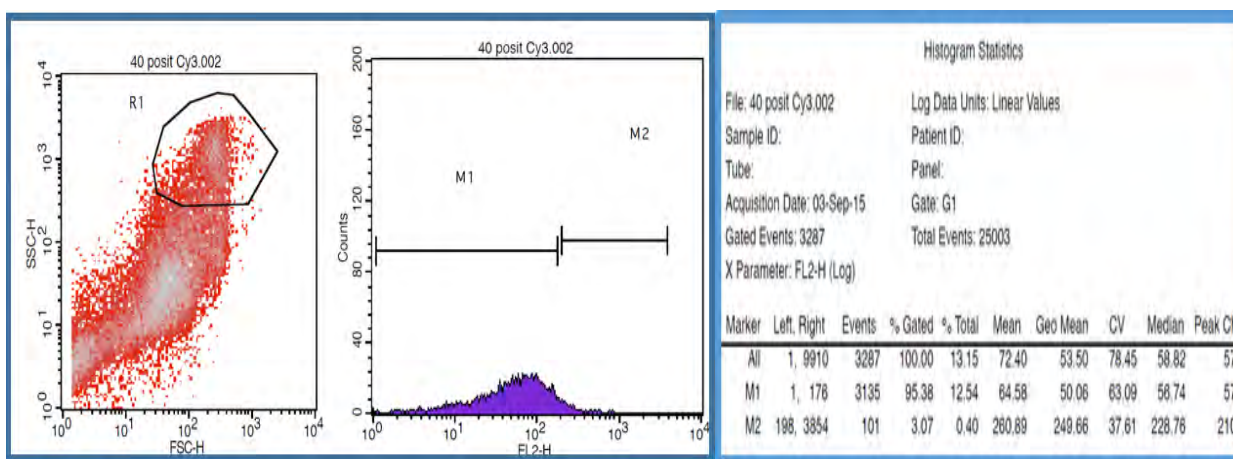
Los resultados de este análisis en embriones de *A. mexicanum* en E-40 se muestran en la figura 18, en donde se aprecia de lado izquierdo toda la población celular que se eligió, por cumplir con las características de una célula germinal, tamaño (FSC-H) y granularidad (SSC-H), que se nombró como R1. Esa población fue considerada la de interés; de lado derecho (Fig. 18), se halla el histograma que indica que el control fue correcto puesto que M2 (células que deben de responder a la marca), no demuestra expresión. De igual manera la estadística (Cuadro. 6) indica que de del 100% del “gate”, 98.69% cayó en M1 (células que no llevan la marca) (Fig. 18).

Por otro lado, la población escogida para el experimento positivo se encuentra en la figura 19, en la parte superior delimitada como R1, nuevamente bajo los mismos criterios de granularidad y tamaño; a la derecha se muestra el histograma que señala un incremento en las células que caen la zona de M2, aquellas que fueron positivas al marcador Cy3 para Vasa, la estadística arrojó que del 100% del “gate”, 95.38% caen en la región denominada como M1 (células que no están marcadas) pero el 3.07% sí mostraron expresión de Cy3 y por ende de Vasa (Cuadro. 7), por lo tanto fueron consideradas como células germinales. En el estadio 40 se observó un 3.07% de células que se marcaron positivas a Vasa, por medio de la detección de fluorescencia del anticuerpo secundario Cy3 (Cuadro. 7).



**Fig.18.** Citometría E-40 sin Vasa.

**Cuadro 6.** Estadística de E-40 sin Vasa.



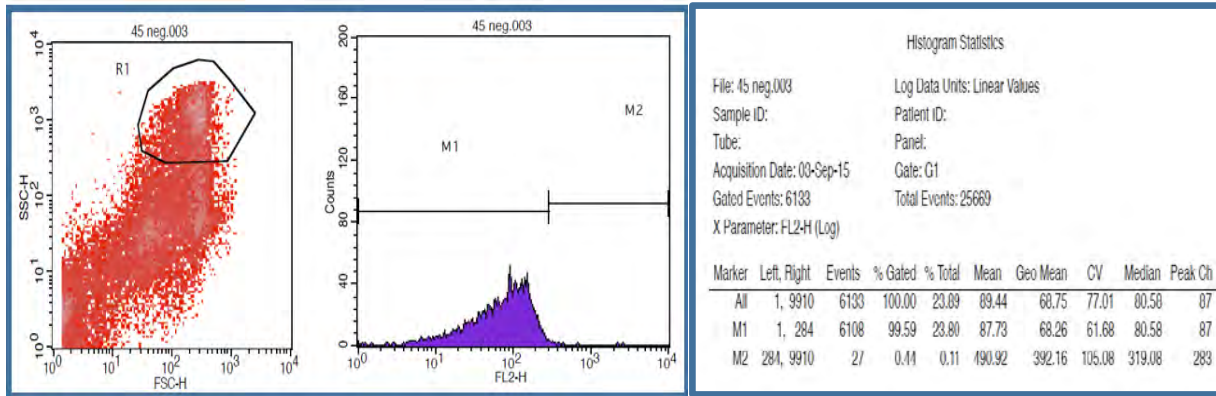
**Fig. 19.** Citometría E-40 con Vasa.

**Cuadro 7.** Estadística de E-40 con Vasa

Estadio 45.

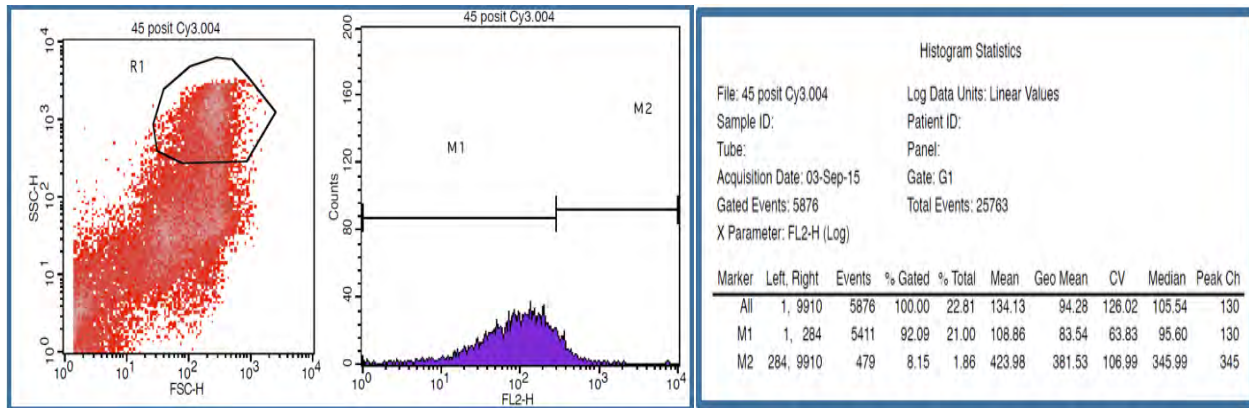
En el estadio 45 de larva de *A. mexicanum* se observó un incremento, que aunque moderado es significativo en cuanto al número de células germinales. En la Fig. 20 se muestra de lado derecho la población de células que se eligió para este estudio: R1, por sus características de gran tamaño y granularidad, correspondientes con las células germinales; a su lado, el histograma que indicó la ausencia de células positivas a Cy3, fluorógeno que se pegó a Vasa (Fig. 20). La estadística corroboró, que del 100% del “gate”, el 99.59% cayó en el rango de M1 (células que no fueron positivas a Vasa) lo cual, funcionó como un buen control. Ahora bien, en la Fig. 21, la población celular que fue analizada bajo los mismos parámetros que en el control. Dicha población se denominó igualmente R1; a un costado, se muestra el histograma correspondiente que indicó un visible aumento en la población de células que cae en la región M2 (Fig. 21); es decir, células que

tienen fluorescencia que corresponde al anticuerpo Cy3 conjugado a Vasa. Por lo tanto, resultaron ser células positivas a Vasa. El análisis estadístico reveló que del 100% del “gate”, 92.09% fueron células sin marca. Sin embargo, 8.15% resultaron células positivas a Vasa (Cuadro. 9) y por ende, sugerimos que se trataron de células germinales.



**Fig. 20.** Citometría E-45 sin Vasa

**Cuadro 8.** Estadística de E-45 sin Vasa



**Fig. 21.** Citometría de E-45 Con Vasa

**Cuadro 9.** Estadística de E-45 con Vasa.

### 7.5 Western Blotting

La técnica de Western Blotting es ampliamente utilizada en la biología molecular, ya que permite la separación e identificación de proteínas específicas a partir de un complejo proteico del cual, las proteínas se separan con base en su peso molecular por medio del principio de electroforesis; las proteínas ya separadas en función de su tamaño, se transfieren a una membrana, a la cual se le hace un proceso de inmunodetección para determinar finalmente la presencia de la proteína de interés (Mahmood & Yang, 2012).

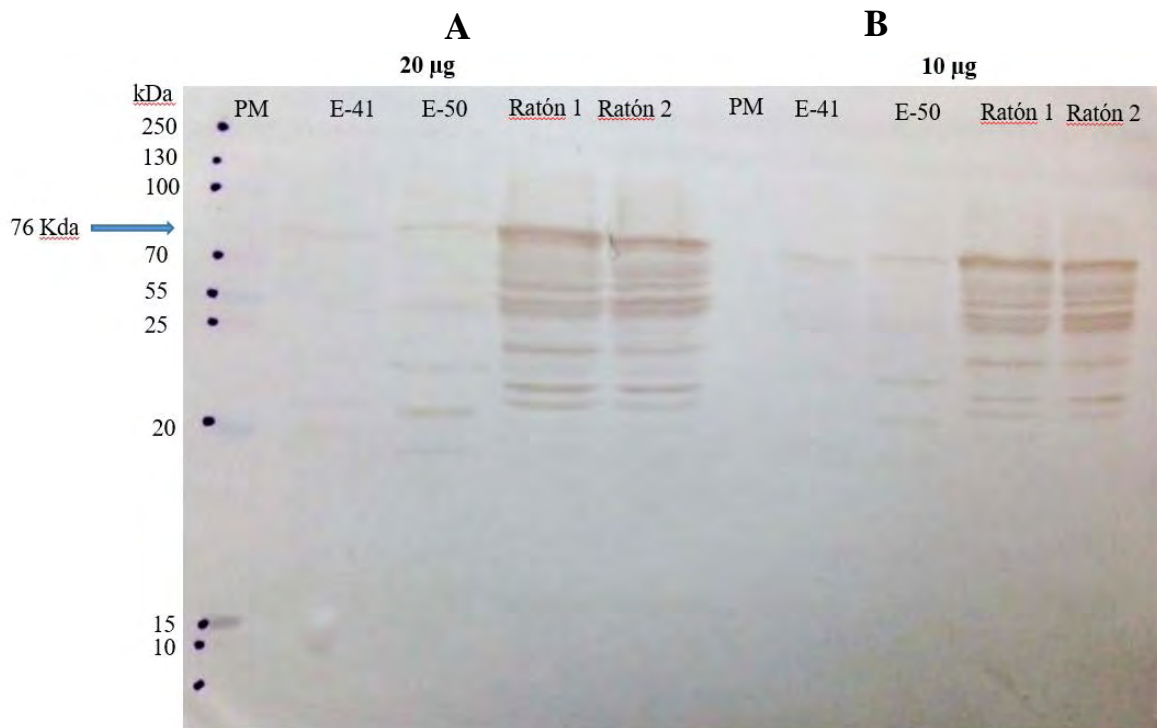


Para corroborar la presencia de la proteína Vasa a nivel molecular se realizó un ensayo de Western blotting en larvas de *A. mexicanum* correspondientes a los estadios 41 y 50. Se eligieron dichos estadios debido a que se buscó determinar no solo la presencia de Vasa, sino también comparar estadios contrastantes donde por un lado hay un primordio gonadal y por el otro hay una gónada indiferenciada. Testículo de ratón fue utilizado como control experimental.

Una vez realizada la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, que en principio fueron extraídas y después separadas en función de tamaño a partir de electroforesis, se procedió a realizar una inmunodetección para la proteína Vasa el cual fue revelado con anticuerpo secundario HRP. Se obtuvieron bandas de diferentes pesos moleculares; sin embargo, las bandas de interés fueron aquellas que por un lado respondieron a la marca de HRP que reacciona a Vasa y sobre todo a las bandas marcadas que correspondieran al peso molecular del anticuerpo Vasa que es 76 kDa (abcam cat 13840) (Fig. 22). Como control experimental se utilizaron dos testículos de ratón.

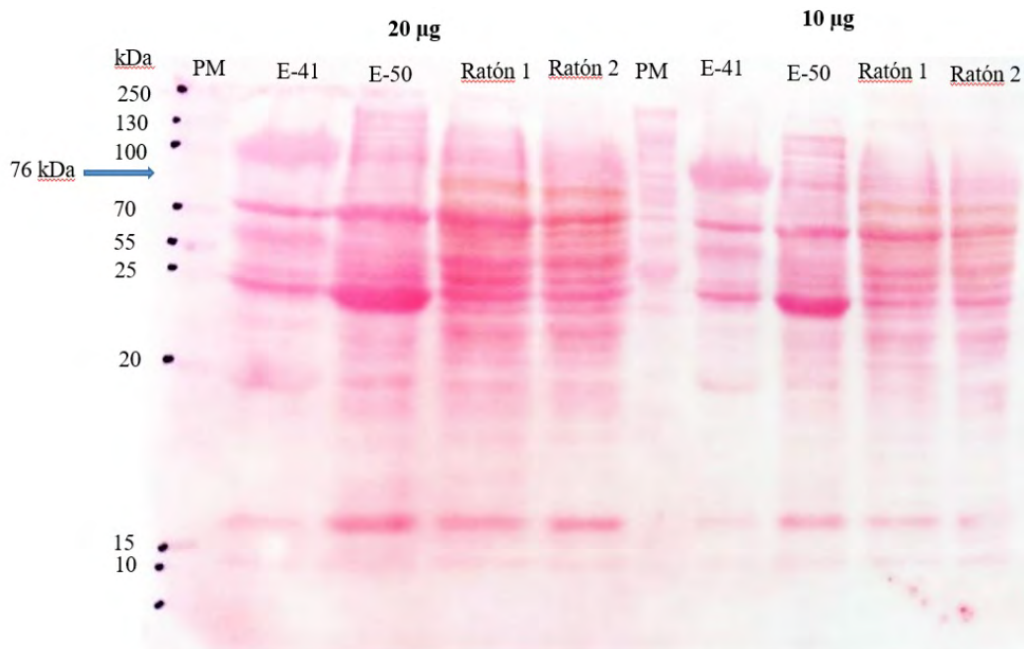
Adicionalmente dos tratamientos fueron realizados para el Western blotting. Se corrieron 20 µg de proteína para cada estadio con su respectivo control (Fig. 22A) y por otro lado se corrieron 10 µg de proteína para cada estadio y su respectivo control (Fig. 22B) esto para estandarizar cual cantidad de proteína funcionaba mejor para el experimento, dada la falta de literatura que permitiera conocer una metodología previa con el *A. mexicanum* y con el anticuerpo contra Vasa.

En la Fig. 22 se aprecian bandas marcadas intensamente por la reacción de HRP en los controles, por otro lado, en los E-41 y E-50 dichas bandas que corresponden al peso molecular determinado para Vasa (76 kDa) son mucho más tenues con respecto a los controles y en ambos casos: con 20 µg y 10 µg. De hecho con 20 µg de proteína, la expresión de Vasa aunque tenue es más evidente con respecto a los 10 µg de proteína (Fig. 22A); sin embargo, aunque es leve el marcaje correspondiente al peso de Vasa, hay evidencia que sugiere su presencia (flecha). No obstante, si hay una notoria diferencia entre los estadios 41 y 50, puesto que, la marca de E-41 en ambos tratamientos con 20 µg y 10 µg es mucho menor comparado con la banda marcada en los E-50 de 20 y 10 µg.



**Fig. 22.** Membrana de nitrocelulosa de Western Blot para larvas de *A. mexicanum* E-41, E-50 y testículo de ratón como control, con su respectivo peso molecular.

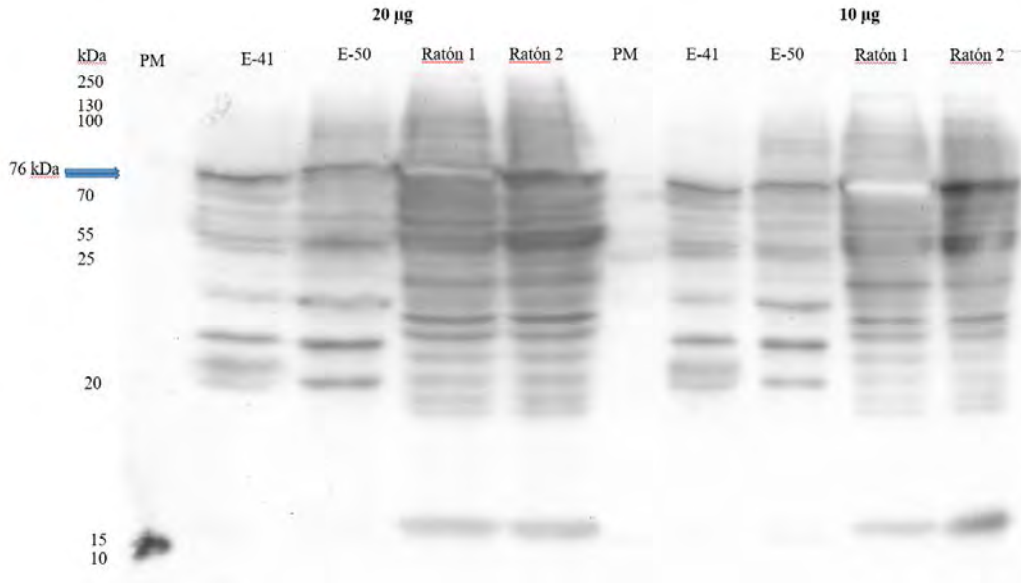
Por otro lado, para verificar de manera cualitativa la integridad de las proteínas luego de haberse llevado a cabo la transferencia de las mismas a la membrana de nitrocelulosa, se realizó una tinción rápida con colorante rojo de Ponceu a la membrana. En efecto, se aprecia que para ambos tratamientos 20 y 10 µg tanto el corrimiento de las proteínas totales, así como la separación de las mismas en función de su peso, fue el adecuado (Fig. 23). Por tanto, la integridad de las proteínas se conservó. La marca de HRP acoplada a Vasa nuevamente se observa más nítida en los testículos de ratón que fueron los controles; sin embargo, si hay un rastro leve de Vasa en las bandas correspondientes a su peso y marca (flecha) y es notorio que en el E-50 la banda es más clara con respecto a E-41.



**Fig. 23.** Membrana de nitrocelulosa de Western Blot para larvas de *A. mexicanum* E-41, E-50 y testículo de ratón como control, teñida con rojo de Ponceu para verificar cualitativamente la integridad de la proteína extraída y transferida.

Finalmente, ya en una placa para rayos X se llevó a cabo la reacción quimio luminiscente con HRP acoplada a Vasa, que permitió visualizar en la placa después del revelado, las bandas proteicas de manera más precisa. Las bandas que correspondieron al peso molecular de Vasa (76 kDa) fueron más nítidas en los testículos de ratón que funcionaron como los controles experimentales. Aunque la evidencia sugiere que Vasa se halló presente en E-41 y E-50 no importando la cantidad de proteína cargada, no obstante, en los E-50 hay una marca más clara puesto que la banda se apreció más grande en ambos tratamientos para 20 y 10 µg de proteína, con respecto a los E-41 (Fig. 24, flecha), aunque de cualquier manera, no hay lugar a dudas de que la marca de Vasa estuvo presente en los E-41 y E-50 de larvas de *A. mexicanum*.





**Fig. 24.** Western Blotting para larvas de *A. mexicanum* de E-41, E-50 y testículo de ratón como control. Se muestran dos tratamientos: 20 µg de proteína cargada (izquierda) y 10 µg de proteína cada (derecha) con las respectivas bandas que corresponden a Vasa (flecha).

## 8. Discusión

### 8.1 Morfología

En embriones y larvas de *A. mexicanum* en los estadios 40 y 41 respectivamente se encontró la formación de un primordio gonadal que tienen una estrecha relación con el mesonefros y el conducto de Wolff. Las células germinales en este primordio gonadal son escasas. Se caracterizan por su gran tamaño respecto a los tipos celulares somáticos (Cuadro. 5), por poseer un núcleo grande y lobulado que ocupa gran parte del citoplasma, en el cual, hay una gran cantidad de plaquetas vitelinas y pigmento. Esta morfología coincide con lo reportado por Ikenishi y Niuewkoop (1978) en *A. mexicanum* y en *P. watl*, aunque en este último no se hace referencia a la presencia de gránulos de pigmento en el citoplasma Dourdon y colaboradores (1989).

En anuros como *Rana temporaria*, se ha reportado que las CGPs son células grandes de 25-30 µm de diámetro, con un núcleo esférico u ovoide y abundancia de plaquetas vitelinas (Ogielska, 2011) lo cual coincide con lo observado en *A. mexicanum* puesto que el núcleo en estos estadios (E-40 y E-41) es ovoide e irregular; sin embargo, no hay correspondencia con el tamaño, pues en *A. mexicanum* en E-41 las células germinales son de menor tamaño (Cuadro. 5).

En cuanto a la ubicación de las células germinales, en la presente investigación las encontramos cercanas a los conductos de Wolff, es así porque la gónada tiene una estrecha relación con el mesonefros y por lo tanto con el conducto de Wolff, como lo determinan también en *A. mexicanum* (Ikenishi y Nieuwkoop, 1978) y en *P. walt* Dournon (1980), así como en los anuros *Rana pipiens* y *Rana catesbiana* (Ogielska, 2011).

Otro aspecto que pareciera ser común al grupo de los urodelos, es que las células germinales se identifican en estadios avanzados del desarrollo, en comparación con anuros como la *Rana pipiens* puesto que al poseer plasma germinal, se les ubica desde etapas tan tempranas como la gastrulación (Ogielska, 2011). En el presente trabajo las células germinales se localizaron en el estadio 40; sin embargo, trabajos anteriores realizados en *A. mexicanum* a nivel de ultraestructura, las localizan cercanas a los conductos de Wolff desde el estadio 23 al 35 (Ikenishi & Nieuwkoop, 1978). Por otro lado, en *P. walt* Dournon y colaboradores (1989) las localizan en el estadio 35 y afirman que no son fáciles de ubicar, puesto que se confunden con células somáticas, ya que en este estadio aún no tienen las características propias de células germinales.

En el estadio 42 se aprecia un leve aumento en el tamaño y la organización de la gónada en formación, es notable como las células somáticas delimitan la gónada; aunque el número de células germinales es reducido, sus núcleos parecen aumentar en tamaño y el número de gránulos de pigmento en el citoplasma, permanece constante con respecto al estadio 41, tal como estudios previos afirmaron (Ikenishi y Nieuwkoop, 1978).

En los estadios 43 y 44 las células germinales mostraron una tendencia a perder progresivamente tanto los gránulos de pigmento como la cantidad de plaquetas vitelinas en su citoplasma. Si bien es cierto que, dado al tipo de huevo (mesolécito) y al tipo de segmentación (holoblástica), en los anfibios las plaquetas vitelinas se distribuyen en todas las células embrionarias. La tasa de consumo del vitelo es altamente específica según el tejido, lo cual sugiere que el consumo de vitelo es un aspecto temprano en la diferenciación celular en los anfibios (Jorgensen et al., 2009).

En larvas de *A. mexicanum* en estadio 45 se puede hablar de una gónada indiferenciada y por ende bipotencial ya que de acuerdo a la literatura ésta es una estructura compacta y formada por células germinales que se rodean por células somáticas y esta disposición es común a todos los vertebrados (De Falco y Capel, 2009). En *A. mexicanum* de acuerdo a las observaciones realizadas, las gónadas indiferenciadas son estructuras compactas, pareadas, suspendidas en la cavidad celómica y

adheridas a la pared dorsal del cuerpo por un mesenterio y especialmente en estrecha relación con el mesonefros y los conductos de Wolff. Ubicación que coincide con *P. waltl* (Doumond et al., 1990; Domund et al, 2008) y *Rana temporaria* (Ogielska, 2011) así como con otros grupos de vertebrados como mamíferos (De Falco y Capel, 2009).

En este estadio de desarrollo las células germinales han cambiado notablemente su morfología los núcleos son redondos, lo cual corresponde con descripciones anteriores hechas por Ikenishi y Nieuwkoop (1978) también en *A. mexicanum*. Otro punto notable es que las plaquetas vitelinas en el citoplasma de las células germinales desaparecen, pero no así los gránulos de pigmento, aunque sí disminuyen en comparación con estadios previos. Esto coincide con las observaciones de Dournon y colaboradores (1989) en *P. waltl* quienes afirman que las plaquetas vitelinas se presentan desde la identificación de las células germinales en el estadio 35, pero en el 38 se nota que van consumiéndose y finalmente en el 41 cuando las células germinales se hallan en las gónadas en formación ya no hay indicios de ellas. Ello probablemente se debe a un proceso denominado vitelolisis, en el cual el vitelo como reserva energética se destina a ser utilizado en procesos como la división celular (Ogielska, 2009). Es de resaltar que cuando las células germinales se establecen definitivamente en las gónadas estas plaquetas desaparecen.

Con base en las observaciones hechas en el presente trabajo lo que se notó es que la presencia de estas plaquetas vitelinas es constante desde el estadio 40 al 42, se consumen gradualmente entre los estadios 43 y 44 y finalmente en el estadio 45 ya no hay rastro de ellas; sin embargo, una discrepancia con *P. waltl* radica en que las células germinales de *A. mexicanum* presentan las plaquetas de vitelo aun cuando ya se han establecido en la gónada observaciones apoyadas por trabajos previos de Ikenishi y Nieuwkoop (1978).

Otro punto a considerar es la presencia de gránulos de pigmento en el citoplasma en este estadio, puesto que en éste, a diferencia de los anteriores, es claro que los gránulos de pigmento no solo se hallan en el citoplasma de las células germinales tal como Ikenishi y Nieuwkoop (1978) lo describieron, sino que es posible hallarlos en relación con el núcleo, en la periferia del mismo. Este punto no es trivial, puesto que contribuye con la discusión acerca de la función de estos pigmentos, la cual hasta el momento sigue incierta (Wakahara, 1998). Dado que estos pigmentos se hallan presentes desde estadios tempranos, pero disminuyen progresivamente conforme avanza el desarrollo gonadal, en este trabajo, se sugiere que posiblemente tengan algún papel no solo en la

especificación de la línea germinal, tal como Wakahara (1998) lo propone. Además dado que en estadios avanzados del desarrollo donde la gónada ya presenta diferenciación como lo es el E-55 el pigmento está ausente, se podría suponer que los gránulos de pigmento probablemente estén relacionados con la diferenciación morfológica de las gónadas, puesto que cuando ocurre el arreglo morfológico característico de un ovario o testículo, ya no están presentes.

Lo que si se tiene claro es que a nivel de MET en *A. mexicanum* se ha descrito la presencia de unos cuerpos electrodensos denominados gránulos germinales, los cuales fueron identificados primero por Williams y Smith (1971) (en el presente trabajo dichos cuerpos no se apreciaron pues no se trabajó la MET del estadio 40 al 45, únicamente en el 55). Posteriormente Ikenishi y Nieuwkoop (1978) los identifican por vez primera en el estadio 40 y hasta el 46 y refieren que hay un decremento de ellos con respecto al tiempo. También se han encontrado cuerpos electrodensos en otros urodelos como *Triturus pyrrhogaster* que asemejaban a la nube mitocondrial de *A. mexicanum* y de *X. laevis* (Hamashima & Kotani, 1979). Dado que estas estructuras aparecen en estadios avanzados del desarrollo, en *A. mexicanum* esto sugiere un indicativo de la misma especificación de las células germinales que también es tardía respecto a otros vertebrados e incluso entre anfibios como los anuros (Wakahara, 1998; Bachvarova et al., 2009).

Los cuerpos electrodensos también se han descrito en anuros y se localizaron en el plasma germinal y en contacto directo con las mitocondrias (Eddy, 1975; Nieuwkoop y Sutasurya, 1979). Así mismo Ikenishi y Kotani (1975) describen una serie de cambios que llevan a cabo estas estructuras en *X. laevis*: en células germinales primordiales presuntivas se aprecian como estructuras fibrogranulares que cambian a material granular y forman parte de una nube (arreglo específico de mitocondrias con gránulos germinales) en larvas en metamorfosis.

Si bien es cierto que los cuerpos electrodensos también llamados gránulos germinales en *A. mexicanum* y *X. laevis* (Wakahara, 1998) se han descrito y localizado, la función que desempeñan sigue incierta. A pesar de que en este estudio no se identificaron por no llegar al nivel de la microscopía electrónica de transmisión (MET) en los estadios del 40 al 45. En la MET que se tiene del estadio 55, la presencia de estos gránulos germinales es nula, lo cual podría ser indicativo de que cuando las células germinales se ubican en una gónada en proceso de diferenciación, los gránulos se han consumido, puesto que las células germinales están ya especificadas.

Recientes estudios afirman que los gránulos germinales son cuerpos citoplásmicos ricos en RNAs (Veronina et al., 2011) característicos de las células germinales de varios grupos de vertebrados como mamíferos, anfibios y peces (Eddy, 1975; Guerrero y Moreno, 2012). Se dice además que contienen el RNA y proteínas como Vasa y Nanos requeridas para el desarrollo de las células germinales y su regulación post-transcripcional (Veronina et al., 2011). En aquellos organismos que presentan plasma germinal los gránulos germinales se encuentran en él, mientras que en mamíferos y posiblemente en urodelos al no tener plasma germinal (Ikenishi y Niewkoop, 1978; Saitou y Yamaji, 2010), los gránulos germinales se localizan después de la especificación de la línea germinal, por lo tanto, no todos los organismos requerirían de los gránulos germinales para la especificación de la línea germinal, pero pareciera ser que todos los necesitan para la funcionalidad de las células germinales (Veronina et al., 2011).

En cuanto al estadio 55, otras características notables de las células germinales, es que los núcleos son realmente prominentes y redondos en el citoplasma hay abundantes mitocondrias en un arreglo peculiar tal como en observaciones en otros anfibios (Ogielska, 2009; Norris, 2011) y de particular interés es que los gránulos de pigmento en el citoplasma desaparecieron en su totalidad.

En este punto queda la duda aun de cuál es la función del pigmento en las células germinales del *A. mexicanum*, puesto que conforme avanza el desarrollo gonadal de ser numerosos en las células germinales, una vez que estas han sido establecidas en las gónadas disminuyen y finalmente cuando ocurre el proceso de diferenciación gonadal desaparecen, siguen un patrón de comportamiento muy similar al de los gránulos germinales o cuerpos electrodensos descritos hace más de 30 años (Ikenshi y Niewkoop, 1978; Wakahara, 1998). Justo por esas similitudes es que en este trabajo y con base a las observaciones realizadas, se sugiere que los gránulos de pigmento probablemente comparten una función similar a los gránulos germinales o cuerpos electrodensos.

En el estadio 55 la gónada presenta características estructurales que indican la diferenciación hacia testículo u ovario. Dichos indicios morfológicos están dados por la localización de las células germinales y las células somáticas en la gónada indiferenciada, en principio esta estructura de la cual se obtendrá un ovario o u testículo (Hayes, 1998) presenta 2 regiones: médula y corteza (Flament et al., 2009). Sin embargo, cuando las células germinales proliferan en la zona cortical y se da una regresión del tejido medular, se habla de una diferenciación ovárica; por el contrario, si se presenta una diferenciación testicular el proceso cambia, puesto que ahora las células germinales

se asocian en grupos y migran progresivamente hacia la zona medular, la parte cortical eventualmente dará pie a la formación de la túnica albugínea (Flament et al., 2009).

No obstante, según nuestras observaciones en microscopía de campo claro, las células germinales se localizaron en la corteza y en la médula, por lo que posiblemente, en la diferenciación testicular las células germinales se agrupan por acción de la línea somática, tal y como se ha reportado para *Xenopus tropicalis*. Pareciera que la línea somática induce a las células germinales hacia la diferenciación testicular, puesto que en el comienzo de la diferenciación testicular, las células somáticas entran en contacto directo con las células germinales, las cuales se distribuyen en toda la gónada. (Jamil et al., 2008). Estas observaciones corresponden con el modelo de diferenciación sexual gonadal para anfibios de Falconi y colaboradores (2004) en el cual, la línea germinal controla a la línea somática y las células germinales tienen diferente comportamiento, en función de si son gónadas femeninas o masculinas. En las gónadas masculinas, las células germinales se rodean por células somáticas, mientras que en las gónadas femeninas las células germinales están en la zona cortical.

A diferencia del modelo asimétrico de Witschi (1957) donde, la diferenciación gonadal es el resultado de la interacción antagonista entre las células somáticas de la médula y la corteza. Supone que el linaje somático es el que dirige la morfología de la gónada y la línea germinal, queda en un papel pasivo.

En el estadio 55 lo que se apreció claramente fue la asociación de las células germinales en grupos, tanto en la región cortical como en la medular y que da la impresión de que forman cordones testiculares; es notable también como las células somáticas establecen una estrecha relación con las células germinales asociadas, tal como ocurre en la diferenciación testicular de otros vertebrados como mamíferos, aves y reptiles (De Falco y Capel 2009).

En cuanto a las características propias de las células germinales, se notó un incremento en el tamaño y así mismo, un aumento considerable en su número. Lo cual es correspondiente con las observaciones por Dourdon y colaboradores (1990) y por Dournon et al. (1989) en *P. waltl*. Puesto que hay dos periodos de proliferación el primero que abarca de los estadios de desarrollo 35 al 41 y el otro que ocurre poco antes del comienzo de la diferenciación gonadal, tal cual como en el caso de estadio 55 de *A. mexicanum*. Otro dato adicional es que en *P. waltl* no hay proliferación de las células germinales cuando se ubican en las crestas genitales (Dournon et al., 1989; Dournon et al.,

1990). Lo cual nuevamente apoya el hecho de que en los estadios estudiados (40 al 45) las células germinales observadas fueran escasas.

Cabe hacer notar que la estructura anexa a las gónadas evidente en este estadio se trata de la epigónada, formada exclusivamente por células somáticas y que da lugar a los cuerpos grasos de acuerdo con Ogielska (2009). Tanto en anuros como en urodelos la estructura gonadal pasa por un reacomodo, lo cual se refleja en la división de la misma en 3 regiones: progónada (parte anterior) epigónada (posterior) y la gónada como tal. Aunque hay una diferencia significativa, puesto que en el grupo de los anuros la progónada da origen a los cuerpos grasos, contrario a lo que ocurre en los urodelos, donde es la epigónada es la encargada de esa tarea (Ogielska, 2009).

## 8.2 Expresión de Proteínas

### Laminina.

La expresión de laminina, una proteína presente en la membrana basal, ayudó a la identificación de dicha membrana basal. Se ha reportado que laminina, no solo delimita estructuras que presentan membranas basales, sino que además se le ha implicado como base en la migración celular, ya sea como sustrato para el movimiento o bien dirigiendo la misma migración de las células en anfibios y mamíferos (Willem et al., 2002; Morris et al., 2003).

El propósito de su uso, en el presente trabajo radicó en que su empleo facilitó la identificación y delimitación de estructuras como cresta genital, primordio gonadal y gónada indiferenciada, así como para corroborar la estrecha relación con los conductos de Wolff y con el mesonefros, En todos los estadios descritos (40-45) fue posible delimitar estas estructuras y ubicar con ello la zona de interés donde se encontraron las células germinales.

De manera particular es de resaltar la expresión de laminina en el estadio 55 puesto que en la gónada la expresión de laminina ayudó a la identificación de cordones sexuales, indicativo de la diferenciación gonadal hacia testículo, y por otro lado, tuvo una fuerte expresión en la zona medular donde se forma la cavidad ovárica. Estas observaciones se corresponden con las hechas en *R. rugosa* (Saotome et al., 2010) y *Xenopus tropicalis* (Jamil et al., 2008) en donde se indica que la primera marca de dimorfismo sexual en la gónada se debe a cambios en la membrana basal y en la matriz extracelular, lo cual se aprecia con la formación de cordones sexuales testiculares y con la delimitación de la cavidad ovárica.

## Vasa

Si bien es cierto que hay varios marcadores moleculares mediante los cuales ya se pueden identificar células germinales como el gen *Dazl* y la fosfatasa alcalina (Johnson et al., 2003; Bachvarova et al., 2009; Wakahara, 1998), el gen *Vasa* es ampliamente conocido por ser un marcador de la línea germinal y además ampliamente conservado a lo largo de la filogenia (Bachvarova et al., 2009). De manera que el gen universal para identificar a línea germinal es *Vasa*, el cual codifica para una helicasa de RNA de la familia de proteínas de la caja DEAD (Gustafson y Wesse, 2010).

*Vasa* se ha empleado como marcador para la identificación de células germinales en *D. melanogaster*, *C. elegans*, (Gustafson y Wesse, 2010), *D. rerio*, *X. laevis* (Ogielska, 2011), *A. mexicanum* (Bachvarova et al., 2004; Johnson et al., 2009) y ratón (Saitou y Yamaji, 2012). A pesar de que se tiene certeza sobre su presencia en los gránulos germinales de *D. melanogaster* y en general en las células germinales de invertebrados y vertebrados, su función es motivo de discusión. Se sabe que actúa como un regulador transcripcional. En estudios con ratones machos y hembras *knockout* para *Vasa*, se ha visto que en las hembras no hay problema de fertilidad, pero no así en los machos, que resultan infértiles (Tanaka, 2010); a la inversa ocurre en *D. melanogaster*, pues la ausencia de *Vasa* afecta la fertilidad de las hembras (Johnstone et al., 2005).

Esta evidencia sustenta que el gen *Vasa* es esencial y evolutivamente conservado entre los vertebrados e invertebrados, y está implicado en el mantenimiento de la línea germinal incluyendo, desarrollo, especificación y proliferación (Bachvarova et al., 2004; Johnson et al., 2009; Gustafson y Wesse, 2010).

En las inmunodetecciones realizadas para la identificación de las células germinales utilizando la marca de la expresión de la proteína del gen *Vasa* durante el establecimiento de la gónada indiferenciada, se notó en primera instancia, que en el estadio 40, no es clara la marca de la proteína *Vasa*, lo cual también se corrobora con estudios por hibridación *in situ* (ISH) en *A. mexicanum* realizados por Bachvarova y colaboradores (2004) y por Johnson et al., (2003) a pesar de que por microscopía de campo claro en el presente trabajo si se localizó presencia de posibles células germinales en el mismo estadio. Ello posiblemente se deba a que los fluorógenos en ocasiones reaccionan con los pigmentos y por la cantidad de éstos que presentan las células germinales en E-40 pudieron enmascarar la marca de *Vasa*.



En *A. mexicanum* en los estadios de desarrollo analizados (41, 43, 44), aunque fue muy bajo el número de células marcadas positivas a Vasa, fue posible la identificación de su expresión característica en el citoplasma de células germinales ubicadas en el primordio gonadal y en la gónada. Estos resultados difieren con lo registrado por Bachvarova y colaboradores (2004) y de Johnson et al., (2001, 2003) ya que ellos no encontraron clara expresión de las células germinales entre los estadios 40 al 44.

Es hasta el estadio 45 que el número de células germinales parece incrementar ligeramente, según la marca citoplásmica de Vasa, lo cual coincide con lo observado por Duournon y colaboradores (1990) en *P. waltl*. En la presente investigación es de notar que a nivel de mesonefros también se encontraron algunas células con el marcaje característico de Vasa, se sugiere que la razón por la cual se observa esto, es porque posiblemente, estas células ubicadas en el mesonefros están relacionadas con las células germinales, e incluso el que estas células positivas se localicen ahí, podría ser un indicio de una posible ruta migratoria de las células germinales de la parte superior del mesonefros hacia la zona donde se localiza la gónada.

En el estadio 55 de una gónada aislada se observó la marca citoplásmica de Vasa en las células germinales, las cuales incrementaron en tamaño y número respecto a los estadios (40-45), esto ayudó por un lado a corroborar que el anticuerpo utilizado fue específico también de la línea germinal de *A. mexicanum*. Por otro lado, el aumento en número de las mismas parece que ocurre en etapas cercanas a la diferenciación gonadal, tal como en *P. waltl*, donde se ha visto, que justo antes de llevarse a cabo este proceso se presenta un aumento en el índice mitótico de las células (Dournon et al., 1989; Dournon et al., 1990; Doumond et al., 2008).

Con respecto la diferenciación, esta gónada al parecer se halla en proceso de diferenciación hacia testículo, puesto que las células germinales positivas a Vasa se hallan agrupadas en lo que parecieran cordones, ello se evidenció por la delimitación del marcaje dado por laminina; la disposición de las células germinales en este arreglo específico, habla de la formación de un testículo, tal como otros autores lo describen en diferentes grupos de vertebrados desde peces hasta mamíferos (Flament et al., 2009; Hayes, 1998; De Falco y Capel, 2009).

Las otras gónadas observadas de E-55, aunque aisladas mantiene su relación con el mesonefros por medio de un mesenterio; de igual manera, la marca citoplásmica de las células germinales fue evidente y clara; sin embargo, el proceso de diferenciación gonadal que se llevó a cabo es contraria

a la descrita anteriormente. Dado que se observó una evidente distribución de las células germinales en la zona cortical de la gónada así como, la presencia de una cavidad en la región correspondiente con la zona medular, denominada cavidad ovárica. Esta descripción se ha hecho en otros vertebrados como en los anuros (Ogielska, 2009; Yoshimoto et al., 2010).

Por otro lado la expresión de Vasa no solo se mostró en células germinales, de hecho en estadios tempranos como 43 y 44 una leve expresión de la proteína Vasa se notó en mesonefros y conductos de Wolff, esto puede ser explicado de dos maneras: en primer lugar, si bien es cierto que Vasa es una ARN-helicasa dependiente de ATP y característica de la línea germinal y ampliamente conservado entre los vertebrados; se ha reportado, que es posible su expresión en células somáticas dependiendo del tejido y del ciclo celular por el que pasen las células. Tanto en *D. melanogaster* como en *X. laevis*, se ha implicado a Vasa como un regulador de proliferación celular y se ha asociado su expresión con células generadoras de teratomas (Poon et al., 2016).

La otra posibilidad a este hecho, es que con base en la evidencia de que en estadios avanzados como lo es el 55 hay marca de Vasa en células germinales localizadas en el mesonefros, en estadios tempranos se marca esta zona con Vasa porque posiblemente exista alguna relación entre células germinales, conducto de Wolff y mesonefros, como lo constata la microscopía de campo claro, así que se sugiere que la marca de Vasa en ese sentido, en las estructuras antes mencionadas, lejos de ser una marca inespecífica, se sugiere podría tener relación con la propia migración de las células germinales

### 8.3 Proliferación

El análisis de citometría de flujo por FacScan, que busco establecer si había cambios significativos en el número de células entre los estadio 40 y 45, determinaron que en efecto hay un incremento en el porcentaje de células positivas a Vasa en el estadio 40 con respecto al 45 del 3.07% al 8.15%, lo cual es coincidente con los índices mitóticos registrados para *P. walt* (Dourdon et al., 1989).

Sin embargo, queda la pregunta obvia de por qué si hay un incremento de células germinales según el análisis de citometría, no se ve reflejado ese aumento en el número de células en los cortes histológicos. La respuesta que apela quien suscribe, es que por un lado, los cortes histológicos aunque seriados fueron de manera transversal lo cual explica por qué se aprecian en los cortes

pocas células germinales, si se considera que la gónada es una estructura alargada y delgada en los estadios estudiados. Así es que, en los cortes transversales el largo y ancho de la gónada son limitantes para observar células germinales, al parecer en los estadios 40 al 45 la gónada es muy estrecha, aunque es constata la presencia de una o dos células germinales o incluso tres en el estadio 45. Finalmente según los resultados obtenidos parece indicar que en efecto hay un incremento en el número de células germinales entre los estadios 40 al 45, lo cual habla del potencial proliferativo de las mismas, una vez establecidas en la gónada.

#### 8.4 Migración de células germinales.

Una vez que las células germinales primordiales se han especificado, requieren de motilidad para poder migrar a su destino último que es la gónada (Marlow, 2015) es un fenómeno común a todos los vertebrados dado que las células germinales son de origen extragonadal (De Falco y Capel, 2009). En anuros, la ruta de migración que siguen las células germinales es la siguiente: se mueven de la parte dorsal del intestino, migran a través de un mesenterio intestinal hacia las crestas genitales, donde se formaran las gónadas; la migración está dada por fibronectina en la lámina basal del epitelio celómico (Ogielska, 2009; Wakahara, 1998). Esta migración es típica también en otros vertebrados como los mamíferos que del lugar de especificación (epiblasto proximal) se mueven a través de un mesenterio intestinal hacia las crestas genitales (De Falco y Capel, 2009; Saitou y Yamaji, 2012).

En el estadio 45 de *A. mexicanum* se observaron células germinales en estrecha relación con el conducto de Wolff y que estaban formando la estructura gonadal, pareciera que se estaban moviendo por debajo de los conductos mesonéfricos; tal como se ha reportado para *P. waltl* en el estadio 35 donde sitúan a las células germinales en la región posterior de la larva cerca de los conductos de Wolff y en estrecha relación con la cloaca. (Dourdon et al., 1989; Dournon et al., 1990).

Otra observación que apoya la presencia de células germinales en el mesonefros también se presentó en los resultados de este trabajo. Como ya se menciona anteriormente, se observó que en la gónada E-55 acompañada de complejo mesonéfrico (ovario), una porción del mesonefros posterior y cercano a las gónadas presentó células positivas al marcaje citoplásmico de Vasa, por lo tanto, se dedujo que eran células germinales, pero lo más interesante es que parecían migrar de esa posición hacia las gónadas. Si las inferencias de este trabajo son correctas, las células

germinales migrarían por el mesenterio que lo une a la gónada; es decir, por arriba de la gónada, caso contrario a lo observado para anfibios y mamíferos (Ogielska, 2009; Saitou y Yamaji, 2012).

Desafortunadamente estudios sobre la ruta migratoria de células germinales en urodelos son escasos, Dourdon et al., (1990) en *P. waltl* describió que las células germinales en estadio 42 se hallaban suspendidas en la cavidad celómica junto con células somáticas, que formaban un pedículo sobre el cual se hallaban células germinales y finalmente en el estadio 50 la gónada estructurada se formaba. Con base en nuestras observaciones en *A. mexicanum*, en la gónada en diferenciación aún hay presencia de células germinales que migran, lo cual no se ha reportado para *P. waltl*.

### 8.5 Expresión molecular de la proteína Vasa

Los resultados arrojados por el ensayo de Westerns Blotting, el cual ayuda a la separación e identificación de proteínas específicas (Mahmood y Yang, 2012); para larvas de *A. mexicanum* de los estadio 41 y 50 indican que la extracción de proteínas, la electroforesis de las mismas, así como su transferencia a una membrana de nitrocelulosa fue la adecuada para los dos tratamientos utilizados: 20 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína. Esto se evidenció mediante la tinción de la membrana con el colorante rojo de Ponceu (Fig. 23) el cual ayudó a corroborar de manera cualitativa la cantidad e integridad de las proteínas transferidas, de hecho es el colorante por excelencia para el Western blotting, porque permite seguir con el proceso de inmunodetección, sin afectar la reacción, además de ser más preciso que otros colorantes como el azul de Coomassie (Corley, 2005).

Con respecto a las bandas que se marcaron en el Western blotting gracias a la reacción quimio luminiscente de HRP (enzima peróxidasa del rábano) acoplado a Vasa, se nota que en el ensayo con 20  $\mu\text{g}$  de proteína, la banda que cae por encima del peso molecular de 70 kDa es muy probablemente la que corresponde a Vasa, dado que su peso es de 76 kDa. En el estadio 50 (E-50) esta banda tendió a ser más nítida y gruesa con respecto a la banda del mismo peso del estadio 41 (E-41). Por otro lado en el ensayo con 10  $\mu\text{g}$  de proteína cargada, sucedió la misma tendencia, E-50 tuvo una banda más nítida comparada a la banda de E-41. Los controles de testículo de ratón en ambos casos presentaron las bandas más notorias; de hecho, en la banda correspondiente al ratón 1 en ambos ensayos, la proteína detectada por la reacción producida por la HRP es tanta que el sustrato se terminó con rapidez, de ahí que se aprecie un pequeño espacio en blanco. Esto, sin

embargo, apporto una prueba más para suponer que las bandas en efecto podrían corresponder a Vasa.

Si bien es cierto que ensayos a nivel molecular donde se ha utilizado a Vasa y al *A. mexicanum* como modelo han sido realizados por Bachvarova y colaboradores (2004) por medio de un análisis por transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) describieron la expresión de genes relacionados con la línea germinal como *Oct-4*, *C-kit* y *Vasa*. Johnson y colaboradores (2001) por su parte detectaron con PCR la expresión del gen *Dazl*, relacionado también con la línea germinal y Chatfield et al., (2014) por medio de ensayos de transcripción reversa cuantitativa en tiempo real de PCR (q-RT-PCR) de *Vasa* y *Dazl* determinaron el momento de la especificación de la línea germinal en el *A. mexicanum*. Estudios donde se aplique Western blotting para la detección de Vasa en este urodelo no se registran hasta el momento.

En *A. mexicanum* los estudios de Western blot se han enfocado más al sentido de la regeneración de tejidos, (Jia et al., 2008; Abuqarn et al., 2011) y a la parte inmunología (Suzuki, 2015; Alibardi, 2015).

La proteína Vasa se ha aislado por Western blotting en organismos como en *Scaphirhynchus* (pez esturión) donde se ha visto diferencias en la expresión de Vasa entre las células germinales de ovarios y testículos (Ye et al, 2016). Por su parte en anfibios, Ikenishi y Takana (1997) detectaron a Vasa en *X. laevis* por medio de inmunoblotting. Sin embargo, no hay trabajos previos con Vasa en *A. mexicanum* donde se utilice Western blotting para su identificación; de ahí, la relevancia del presente trabajo, donde se aplicó y estandarizó una técnica específica para la detección de Vasa en *A. mexicanum*.

Finalmente el análisis por Western blotting corroboró a nivel molecular, que la expresión de la proteína Vasa está presente desde estadios tempranos como el E-41, lo cual robustece y apoya los resultados obtenidos con la microscopía confocal, porque no hay lugar a dudas que la proteína está presente, lo cual se traduce, en que las células germinales de *A. mexicanum* están presentes desde estadios tempranos.

## 9. Conclusiones

- ✓ En *A. mexicanum* es posible identificar morfológicamente células germinales desde el E-40. Poseen un núcleo grande, inmerso en un citoplasma claro, que contiene abundantes plaquetas vitelinas y gránulos de pigmento, los cuales disminuyen progresivamente conforme avanza el desarrollo. Cambios de forma y tamaño también fueron observados en estadios tempranos (E-40 al E-45) donde las células germinales presentan una forma ovoide, mientras que en el estadio de gónada en diferenciación (E-55), cambian a una forma más redondeada e incrementan su tamaño.
- ✓ En el E-45 la gónada indiferenciada está conformada por células germinales las cuales están en estrecha relación con los conductos de Wolff, se rodean de células somáticas, y en su conjunto forman una estructura compacta suspendida sobre la cavidad celómica.
- ✓ El arreglo y localización que tienen las células germinales dentro de la gónada en el E-55 puede tomarse como un indicador morfológico de la diferenciación sexual gonadal. En los machos, las células germinales junto con las células somáticas forman cordones testiculares, mientras que en las hembras, el ovario forma una cavidad en la región medular y las células germinales se localizan en la región cortical. El nivel de interacción somático-germinal pareciera ser dimórfico, siendo en el testículo la línea somática la que dirige a la línea germinal a la diferenciación testicular; mientras que en el ovario la línea germinal parece controlar los arreglos estructurales de la línea somática.
- ✓ La proteína del gen *Vasa* en el *A. mexicanum* está conservada en las células germinales, al igual que en otros vertebrados e invertebrados, y se puede emplear como un marcador molecular de este tipo celular en anfibios urodelos.
- ✓ La localización de células positivas a la proteína *Vasa* en una región del mesonefros cercana a la región gonadal, sugiere una ruta migratoria para las células germinales de *A. mexicanum*: desde el mesonefros, pasando por el mesenterio que lo une a la gónada y de esta manera arriban a ella.
- ✓ El aumento en el porcentaje de células positivas a *Vasa* entre los estadios 41 y 45, sugiere que durante estos estadios de desarrollo las células germinales podrían estar proliferando, o en su caso la actividad migratoria incrementándose.



## 10. Bibliografía

- Abuqarn M, Allmeling C, Amshoff I, Menger B, Nasser I, Vogt PM y Reimers K (2011). The yeast two hybrid system in a screen for proteins interacting with axolotl (*Ambystoma mexicanum*) Msx1 during early limb regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 1814(7):843-899.
- Aguilar-Miguel X (2005). *Ambystoma mexicanum*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIBCONABIO. Proyecto W035. México. D.F.
- Alibardi L (2015). Immunodetection of telomerase-like immunoreactivity in normal and regenerating tail of amphibians suggests it is related to their regenerative capacity. *J Exp Zool*. 323 (11):757-766.
- Aman A y Piotrowski T (2010). Cell migration during morphogenesis. *Dev Biol*. 341(1):20-33
- Bachvarova RF, Masi T, Drum M, Parker N, Mason K, Patient R y Johnson AD (2004). Gene Expression in the Axolotl Germ Line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axoct-4*, and *Axkit*. *Dev Din*. 231(4):871–880.
- Bachvarova RF, Crother BI y Johnson AD (2009). Evolution of germ cell development in tetrapods: comparison of urodeles and amniotes. *Evol Dev*. 11(5): 603-609.
- Bachvarova RF, Crother BI, Manova K, Chatfield J, Shoemaker CM, Crews DP y Johnson AD (2009). Expression of *Dazl* and *Vasa* in turtle embryos and ovaries: evidence for inductive specification of germ cells. *Evol Dev*. 11 (5):525-534.
- Bordzilovskaya NP, Dettlaff TA, Duhon ST y Malacinski GM (1989) Developmental-stage series of axolotl embryos. En *Developmental Biology of the Axolotl* (Malacinski JB eds.), pp. 201-219. Oxford: Oxford University Press.
- Chatfield J, O'Reilly M, Bachvarova RF, Ferjentsik Z, Redwood C, Walmsley M, Patient R, Loose M y Johnson AD (2014). Stochastic specification of primordial germ cells from mesoderm precursors in axolotl embryos. *Development* 141(12):2429-2440.
- CONABIO. (2011) *Fichas de especies prioritarias. Ajolote Mexicano (Ambystomamexicanum)* 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 y Zambrano L (2009). Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological Conservation*. 142:2881–2885.

Corley RB (2005). A guide in methods. En *The Biomedical science*. Springer Science, Boston, USA.

De Falco T y Capel B (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 25:457–482.

Di Carlo A, Travia G y De Felici M (2000). The meiotic specific synaptonemal complex protein SCP3 is expressed by female and male primordial germ cells of the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol*. 44:241-244.

Dournon C, Demassieux C, Durand D y Lesimple M (1989). Primordial germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl*: genetic control before gonadal differentiation. *Dev. Biol*. 33(4):477-485.

Dournon C, Durand D, Demassieux C y Lesimple M (1990). Differential germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl*: controls by sexual genotype and by thermal epigenetic factor before differentiation of sexual phenotype of gonads. *Int J Dev Biol*. 34:365-375.

Dumond H, Kuntz S, Chesnel A, Ko C, Wallacides A, Chardard D y Flament S (2008). Sexual Development of the Urodele Amphibian *Pleurodeles waltl*. *Sex Dev*. 2(2):104-114.

Dumond H, Maufroid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A, Flament y Freemartin (2008). Parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. *Mol Reprod Dev*. 75:439–449.

Eddy EM (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol*. 43: 229-280.

Falconi R, Dalpiatz D y Zaccanti F (2004). Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura). *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 301(5):378-388.

Flament S, Dumond H, Chardard D y Chesnel A (2009). Lifelong testicular differentiation in *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Caudata). *Reprod Biol Endocrinol*. 7:21.

Flament S, Chardard D, Chesnel A y Dumond H (2011). Sex determination and sexual

- differentiation in amphibians. En *Hormones and Reproduction of vertebrates*. Vol.2 Amphibians. Chapter 1. Pp. 1-19.
- Gilbert SF (2013). *Developmental biology*. Tenth edition. Ed. Sinauer Associates Inc. USA.
- Guerrero S y Moreno N (2012). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J Fish Biol.* 80(3):572-594.
- Gustafson EA y Wessel MG (2010). Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays* 32:626–637.
- Hayes TB (1998) Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool* 281(5):373-399.
- Humphrey RR (1929). The early position of the primordial germ cells in urodeles: evidence from experimental studies. *Anat Rec.* 42:301-314.
- Ikenishi K y Nieuwkoop PD (1978). Location and ultrastructure of primordial germ cells (pgcs) in *Ambystoma mexicanum*. *Develop. Growth and Differ.* 20(1):1-9.
- Ikenishi K y Kotani M (1975). Ultrastructure of the 'germinal plasm' in *Xenopus* embryos after cleavage. *Dev. Growth Differ.* 17:101-110.
- Ikenishi K, Tanaka TS (1997). Involvement of the protein of *Xenopus* vasa homolog (*Xenopus* vasa-like gene 1, XVLG1) in the differentiation of primordial germ cells. *Dev Grow Differ.* 39(5): 625-33.
- Jamil A, Kanhoush R, Magre S, Boitze-Bonhouer B y Penrad-Mobayed M (2008). Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn.* 237 (10): 2996-3005.
- Jia P, Zhang C, Huang XP, Poda M, Akbas F, Lemanski SL, Erginel-Unaltuna N y Lemanski LF (2008). A novel protein involved in heart development in *Ambystoma mexicanum* is localized in endoplasmic reticulum. *J Biomed Sci.* 15(6):789-799.
- Johnson AD, Bachvarova RF, Drum M y Masi T (2001). Expression of axolotl DAZL RNA, a marker of germ plasm: widespread maternal RNA and onset of expression in germ cells approaching the gonad. *Dev. Biol.* 234(2):402-415.
- Johnson AD, Crother B, White ME, Patient R, Bachvarova RF, Drum M y Masi T (2003).

- Regulative germ cell specification in axolotl embryos: a primitive trait conserved in the mammalian lineage. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 358(1436):1371-1379.
- Johnson AD, Richardson E, Bachvarova RF y Crother BI (2011). Evolution of the germ line-soma relationship in vertebrate embryos. *Reproduction* 141(3):291-300.
- Johnson AD y Alberto R (2015). Primordial germ cells: the first lineage or the last cells standing? *Development.* 142 (16) 2730-2790.
- Johnstone O, Deuring R, Bock R, Linder P, Fuller MT y Lasko P (2005). Belle is a Drosophila DEAD-box protein required for viability and in the germ line. *Dev Biol.* 277(1): 92-101.
- Jorgensen P, Steen JA, Steen H y Kirschner MW (2009). The mechanism and pattern of yolk consumption provide insight into embryonic nutrition in *Xenopus*. *Development.* 136(9):1539-1548.
- Karnovsky MJ (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J of Cell Biology* 27-137A.
- Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K y Saitou M (2008). Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev.* 22:1617-1635.
- Lawson KA y Hage WJ (1994). Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Foundation Symposia* 182:68-84.
- Marlow F (2015). Primordial Germ Cells Specification and Migration. *Faculty Rev*-1462.
- Martínez, Juárez. A. (2010) *La cinasa Lyn modula la respuesta inmune innata participando en la transducción de señales del receptor TLR-4 en células cebadas*. L. Biología. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 71-86.
- Maufroid JP y Capuron AP (1985). A demonstration of cellular interactions during the formation of mesoderm and primordial germ cells in *Pleurodeles waltlii*. *Differentiation.* 29(1):20-24.
- Mengen B, Vogt PM, Kuhbier JW y Reimers K (2010). Applying Amphibian Limb Regeneration to Human Wound Healing: A Review. *Anns Plast Surg.* 65(5):504-510.
- Morris AR, Drawbridge J y Steinberg SM (2003). Axolotl pronephric duct migration requires an epidermally derived, laminin 1-containing extracellular matrix and the integrin receptor

a6b. *Development*. 130 (23):5601-5608.

Murugan S, Shan J, Khul SJ, Tata A, Pietila I, Kulh M. y Vainio SJ (2012). Wt1 and Sox11 regulate synergistically the promoter on the Wnt4 gene that encodes a critical signal for nephrogenesis. *Exp Cell Res*. 318(10):1134-1145.

Norris OD y Lopez HK (2011). *Amphibians Vol.2: Hormones and reproduction of vertebrates*. Elsevier Publisher, CO. USA. 1-19.

Nye LD, Cameron JA, Chernoff AG y Stocum L (2003). Extending the Table of Stages of Normal Development of the Axolotl: Limb Development. *Dev Dyn*. 226:555-560.

Nieuwkoop PD (1947). Experimental Investigations on the Origin and determination of the germ cells, and on the development of the lateral plates and germ ridges in the urodeles. *Arch Nerl Zoo*. 8:1-205.

Ogielska M (2011). *Reproduction of amphibians*. Science Publisher, Enfield, NH USA.

Poon J, Wessel GM y Yajima M (2016). An unregulated regulator: Vasa expression in the development of somatic cells and in tumorigenesis. *Dev Biol*. 415:24-32.

Saitou M y Yamaji M (2010). Germ cell specification in mice: signaling, transcription regulation, and epigenetic consequences. *Reproduction*. 139:931-942.

Saitou M y Yamaji M (2012). Primordial Germ Cell in Mice. *Cold Spring Harb Perspect Biology*. 4:a008375.

Salgado M (2002). Citometría de flujo [Internet] Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/FACS.pdf> [Consultado, 15 de octubre de 2016]

Saotome K, Isomura T, Seki T, Nakamura Y y Nakamura M (2010). Structural changes in gonadal basement membranes during sex differentiation in the frog *Rana rugosa*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 313(6):369-380.

Sasaki M, Hynda K, Kleinman H, Huber S, Rainer SQ y Yoshihiko Y (1988). Laminin, a Multidomain Protein. *J Biol Chem*. 263(32):16536-16544.

Smith LD (1964). A test of the capacity of presumptive somatic cells to transform into primordial germ cells in the Mexican axolotl. *J Exp Zool*. 156:229-242.

- Sutasuaya LA y Nieuwkoop PD (1974). The induction of the primordial germ cells in the urodeles. *W Roux Arch Entw Mech.*175:199-2.
- Suzuki H y Yamamoto T (2015). Localization of amylin-like immunoreactivity in melanocyte-stimulating hormone-containing cells of the pars intermedia but not those of the pars distalis in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) pituitary. *Acta Histochem.*118 (3):213-8.
- Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M y Noce T (2000).The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14(7):841–53.
- Veronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P y Nagamori I (2011). RNA Granules in germ cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:a002774.
- Voss RS, Epperlein HH y Tanaka EM (2009). *Ambystoma mexicanum*, the Axolotl: A Versatile Amphibian Model for Regeneration, Development, and Evolution Studies. *Cold Spring Harbor Protocols.*10:111-128.
- Wakahara M (1996). Primordial germ cell development: is the urodele pattern closer to mammals than to anurans? *Int J Dev Biol.* 40:653-659.
- Witschi E (1957). The inductor theory of sex differentiation. *J Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI (Zool)* 130:428-439.
- Willem M, Miosge N, Halfter W, Smyth N, Jannetti L, Burghardt E, Timpl R y Mayer U (2002). Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma-1 chain interferes with kidney and lung development. *Development* 129:2711-2722.
- Yamamura Y, Aoyama S, Oshima Y, Kato T, Osawa N y Nakamura M (2005). Molecular cloning and expression in gonad of *Rana rugosa* *Wt1* y *Fgf9*. *Zoolog Sci.* 22(9):1045-1050.
- Yoshimoto S, Ikeda N, Izutsu Y, Shiba T, Takamatsu N, e Ito M (2010). Opposite roles of *DMRT1* and its W-linked paralogue, *DM-W*, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. *Development.*137:2519-2526.
- Zambrano L, Contreras M, Mazari-Hiriart AE, Zarco-Arista (2009) Spatial heterogeneity of water quality in a highly degraded tropical freshwater ecosystem. *Environmental Management,* 43:249-263.



## Anexo 1

### **Soluciones y reactivos empleados para biología molecular.**

- Buffer (Amortiguador) de Tirodes-BSA

Para preparar 1 L de esta solución se necesita mezclar los siguientes reactivos: 0.788g de NaCl, 0.372g KCl, 0.203g de MgCl<sub>2</sub>, 0.264g de KCl<sub>2</sub>, 1.009g de Glucosa, Hepes 1M con un pH de 7.0 y 0.5 g de Albumina. El pH final se debe de ajustar a 7.4 y se afora a 1 litro con agua estéril. (Martínez, 2010)

- Buffer (Amortiguador) de Laemmli 2x

Si se desea hacer 1 litro de este amortiguador se deben de mezclar: 20 µl/ml de orto-vanadato, 100 nM, 20 µl de β-mercapto-etanol. Esta mezcla se coloca en baño María a 100 Celcius por 5 minutos. (Martínez, 2010)

- Buffer (Amortiguador) del Gel Separador 1M-Tris-HCl pH 8.8

Para realizar este buffer se debe de pesar los siguientes reactivos: 30.3g de Tris y se le agrega 150 ml de agua estéril, una vez que se han mezclado hay que ajustar el pH a 8.8 con HCl. Finalmente se afora a 250 ml con agua estéril destilada. (Martínez, 2010)

- Buffer (Amortiguador) del Gel Concentrador

El buffer del gel concentrador lleva la siguiente preparación: 11.4g de Tris-base en 150 ml de agua destilada, el pH se debe de ajustar a 6.8 utilizando HCl y se afora en 250 ml de agua estéril destilada.

- Buffer (Amortiguador) de Corrida 1X

Si se quiere prepara 1 L del amortiguador de corrida, el cual se usa para llevar a cabo la electroforesis se deben de mezclar los siguientes reactivos: 100 ml de amortiguador de corrida 10X, a los cuales se les agrega 900 ml de agua estéril destilada. Se guarda a 4 Celcius.

- Buffer (Amortiguador) de Transferencia Tris-Glicina 25X

El buffer de transferencia Tris-Glicina 25X se compone de 18.2 g de Tris- base 12 mM y 90 g de glicina, se le agrega agua destilada estéril hasta que se homogenicen y se afora a 500 ml de agua estéril destilada y finalmente se ajusta su pH a 8.8. (Martínez, 2010)

- Buffer (Amortiguador) de Transferencia 1X.

Para 1 litro de este buffer que permite la transferencia de las proteínas a la membrana, en un Western blot se requiere de 40 ml de buffer Tris-Glicina 25X, 250 ml de metanol y 760 ml de agua destilada, se mezcla y se almacena en frío. (Martínez, 2010)

- TBS-T

Se necesita de 6 g de Tris, 9 g de NaCl y 1 ml de Tween lo cuales se mezclan y se aforan a 1 litro de agua

- Gel Separador Acrilamida al 30%

Soluciones	Cantidades
Acrilamida al 30%	8.5ml
Buffer Tris-HCl (gel separador)	9.4ml
SDS	250 $\mu$ l
Sacarosa al 50%	4ml
Agua estéril destilada	2.5ml
TEMED	625 $\mu$ l
Catalizador	313 $\mu$ l

- Gel Concentrador de Acrilamida al 10%

Soluciones	Cantidades
Acrilamida al 30%	1.7 ml
Buffer Tris-HCl (gel concentrador)	4.2 ml
SDS	125 $\mu$ l
Agua destilada	415 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
Catalizador	1 $\mu$ l