



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

“DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD”

“MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL”

“DISTRIBUCIÓN DE CARBOHIDRATOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y
MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES DE LOS ESPERMATOZOIDES
DE LA RANA *Xenopus laevis* COMO INDICADORES DE UNA POSIBLE
MADURACIÓN ESPERMÁTICA EN ANFIBIOS ANUROS”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

Biól. Ileri Abizaday Fragoso Hernández

Comité tutorial:

Co-directora: Dra. Edith Arenas Ríos

Co-Director: Dr. Miguel Ángel León Galván

Asesor: Dr. Gerardo Figueroa Lucero

Ciudad de México a 20 de marzo de 2017.

COMITÉ TUTORAL

Co-directora

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción,
UAM-I.
editharenas2000@yahoo.com.mx

Co-director

Dr. Miguel Ángel León Galván

Departamento de Biología, UAM-I.
león@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Gerardo Figueroa Lucero

Departamento de Hidrobiología
gfiguer@xanum.uam.mx

JURADO DE EXAMEN

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
Instituto Nacional de Pediatría
rmvigeras@yahoo.com.mx

Dr. Gerardo Figueroa Lucero
Departamento de Hidrobiología, UAM-I
gfiguer@xanum.uam.mx

Dr. Mario García Lorenzana
Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I
mglo@xanum.uam.mx

Mtro. Matías Martínez Coronel
Departamento de Biología, UAM-I
marti@hotmail.com

El programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad de CONACyT registro **003797** y cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Se agradece a CONACyT la beca otorgada (CVU/Becario): **309562/570763**

Extiendo un agradecimiento a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal y a la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, por el financiamiento otorgado durante la participación en los congresos.

"Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Distribución de carbohidratos en la membrana plasmática y modificaciones ultraestructurales de los espermatozoides de la rana *Xenopus laevis* como indicadores de una posible maduración espermática en anfibios anuros". Que presentó Ireri Abizaday Fragoso Hernández.

El día 20 de marzo del año 2017.

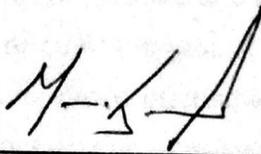
MIEMBROS DEL JURADO



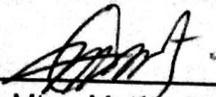
Presidente: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor



Secretario: Dr. Gerardo Figueroa Lucero



Vocal: Dr. Mario García Lorenzana



Vocal: Mtro. Matías Martínez Coronel

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

“Lo que encontramos cuando entramos en éstas llanuras mortales de la existencia es la materia prima de la cual debe crearse toda la vida. Una vida productiva y feliz no es algo que encuentres, es algo que haces”.

-Martin Luther King Jr.

Todo proyecto importante en la vida no sería posible de lograr si no fuera por la ayuda que nos brindan aquellas personas de quienes nos rodeamos y a quienes nos acercamos. Es por eso que esta tesis está dedicada a todos aquellos que contribuyeron de alguna manera a la realización de éste documento.

Quiero comenzar agradeciendo y reconociendo el infinito apoyo y amor que toda mi vida he recibido de mis papás, gracias por confiar siempre en mí. Gracias también a mi hermano, porque de alguna manera también me brindaste tu ayuda cuando la necesité. Todo lo bueno que soy y que tengo es gracias a ustedes. Ustedes son la mejor parte de mi vida.

Éste proyecto se logró gracias a la guía experta de mi comité de tutores. Dra. Edith Arenas Ríos, gracias por ser la mejor maestra que he tenido, gracias por su gran apoyo durante todo este proceso en el cual, me guio y me compartió su conocimiento, su confianza y su valiosa amistad, le estaré eternamente agradecida. Gracias también al Dr. Miguel Ángel León Galván, por el gran apoyo que en todo momento me brindó, por sus comentarios, por el tiempo dedicado y por sus conocimientos compartidos, mil gracias. Dr. Gerardo Figueroa Lucero, muchas gracias por ayudarme y orientarme durante todo el proyecto, su apoyo fue muy valioso para la realización de mi trabajo.

Por supuesto, le estoy muy agradecida a la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, porque me dedicó su enorme apoyo y su valioso tiempo durante parte de la realización de ésta investigación, además de que con sus comentarios se logró enriquecer este trabajo. Al Dr. Mario García Lorenzana, muchas gracias por las conversaciones y la retroalimentación de conocimientos que tuve oportunidad de compartir con usted,

gracias a eso y a sus comentarios éste proyecto se enriqueció. Y gracias también al Maestro Matías Martínez Coronel, por sus comentarios aportados que fueron una ayuda valiosa.

También quiero extender un sincero agradecimiento a quienes me brindaron su valiosa ayuda y me orientaron cuando acudí a ellos. Un agradecimiento a la Dra. Edith Cortés Barberena por su apoyo en el citómetro de flujo. Mil gracias al Dr. José David Sepúlveda Sánchez, a su hermano Jorge Sepúlveda Sánchez y a la M. en C. María Cristina Acosta García, gracias por su apoyo y su entusiasta disposición para el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión. Gracias también a los técnicos Pedro Medina Granados del laboratorio de Biología de la Reproducción y a Eduardo Farfán del depto. de Patología, así como también al Biól. Rafael Reynoso Robles del laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión del Instituto Nacional de Pediatría por su amable y cordial ayuda, ustedes me brindaron una orientación y un apoyo valiosísimo a mi trabajo y compartieron conmigo parte de sus conocimientos y eso, no tiene precio.

Finalmente, mil gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio de Reproducción Animal Asistida, Lorena Ruíz, Blanca López, Yolanda López y Fabiola Retana, les agradezco su ayuda, sus consejos y los buenos momentos que son abundantes con ustedes, gracias a Lorena Vadillo por su apoyo en el análisis de las imágenes de microscopía. Gracias al Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón, porque desde que me incorporé al laboratorio me orientaste y me ayudaste a empezar desde cero, tus consejos, tus pláticas, tu conocimiento compartido y sobre todo tu amistad, son cosas muy valiosas y que te agradeceré siempre. Gracias totales a Ernesto Rodríguez Tobón, porque sabes bien que tu apoyo incondicional, tu enorme cariño y tu placentera compañía, me han hecho recobrar la confianza en mí misma más de una vez, porque platicar, compartir y estar contigo son de las mejores situaciones que he tenido la oportunidad de vivir y esas cosas tan sencillas son las que le dan sentido a todo. Gracias por estar conmigo.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Aparato urogenital masculino de Anfibios Anuros.....	15
1.2. Morfología y ultraestructura de los espermatozoides de Anfibios Anuros.....	16
1.3. Maduración espermática posttesticular.....	18
1.4.- Glicocálix de la membrana plasmática de las células espermáticas.....	19
2. ANTECEDENTES.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL.....	24
5.1.-Objetivos particulares.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1.- Obtención de los ejemplares.....	26
6.2.- Obtención de espermatozoides para análisis espermático.....	26
6.2.3.- Análisis espermáticode las muestras de espermatozoides testiculares y extratesticulares.....	28
6.3.- Marcaje de residuos de carbohidratos con el uso de lectinas	28
6.4.- Procesamiento histológico.....	29
6.5.- Análisis Estadístico.....	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
8. CONCLUSIÓN.....	51
9. PERSPECTIVAS.....	51
10. ANEXO.....	52

10.1.- Reactivos y Soluciones.....	52
11. LITERATURA CITADA.....	54

Resumen

En vertebrados superiores como mamíferos, los espermatozoides producidos dentro de los túbulos seminíferos en los testículos dependen del paso a través del epididimo para adquirir la capacidad de fertilización. El proceso de maduración involucra una serie de eventos bioquímicos secuenciales que modifican al espermatozoide durante su tránsito por el túbulo epididimario. Sin embargo, en especies de vertebrados inferiores como los Anfibios Anuros no existe una estructura anatómica epididimaria, lo cual, hasta ahora, ha sugerido el hecho de que en éste grupo de vertebrados no se lleven a cabo modificaciones postesticulares en los espermatozoides, pero no existen estudios con los cuales contrastar éstas conjeturas. *Xenopus laevis* es un Anfibio Anuro que presenta un patrón reproductivo no estacional y sincrónico y no presenta estructuras de almacenamiento postesticular. Los resultados obtenidos de la evaluación espermática arrojan, para el caso de espermatozoides testiculares, un valor de 68.2% de viabilidad, 69 % de movilidad y una concentración de $4.63 \text{ células/ml} \times 10^6$, y para el caso de los espermatozoides extratesticulares se registró una viabilidad de 65 %, 0 % de movilidad y una concentración de $0.54 \text{ células/ml} \times 10^6$. A partir de los resultados observados en éste estudio, se puede deducir que los espermatozoides de *X. laevis* se someten a modificaciones bioquímicas postesticulares en su membrana plasmática de determinados carbohidratos, en diferentes regiones a medida que los espermatozoides avanzan por el tracto; esto posiblemente como respuesta a la interacción de los espermatozoides con el tejido y/o los fluidos de los conductos de transporte espermático del sistema reproductor. El recambio de GlcNAc/NeuAc, D-manosa y L-fucosa en diferentes regiones de la membrana plasmática de los espermatozoides de *X. laevis* indica la relevancia de dichos carbohidratos en la fisiología de éstos, es decir, juegan un papel fundamental que resulta en el reconocimiento, unión y fusión exitosos de los gametos derivado de una maduración postesticular. En lo que corresponde a los resultados del estudio de la ultraestructura de los espermatozoides de *X. laevis*, a pesar de no haberse obtenido diferencias significativas, se registró una ligera reducción en el área del núcleo de los espermatozoides extratesticulares con respecto a los espermatozoides testiculares, y no se no hubo diferencias significativas con respecto al área de la región del anillo mitocondrial de los espermatozoides extratesticulares en

relación con los espermatozoides de testículo. Con base en los resultados arrojados al estudiar el área de la cromatina, se puede inferir que los espermatozoides de *X. laevis*, que si bien, es un vertebrado que carece de una estructura epididimaria, se puede estar llevando a cabo un proceso de maduración posttesticular que favorezca un endurecimiento de las estructuras espermáticas que impide que el producto hipercondensado (cromatina), sufra una descondensación precoz, lo que conlleva a una reducción en el área del núcleo debido al incremento del grado de condensación, muy similar a lo que ocurre en vertebrados superiores.

ABSTRACT

In higher vertebrates such as mammals, sperm produced within the seminiferous tubules in the testis depend on passage through the epididymis to acquire fertilization capacity. The maturation process involves a series of sequential biochemical events that modify the spermatozoon during its transit through the epididymal tubule. However, in species of lower vertebrates such as Anfibios Anuros, there is no epididymal anatomical structure, which has hitherto been suggested by the fact that in this group of vertebrates no post-sperm changes are made in spermatozoids, but there are no Studies with which to contrast these conjectures. *Xenopus laevis* is an Anfibio Anuro that presents a non-seasonal and synchronous reproductive pattern and does not present post-formative storage structures. The results obtained from the sperm evaluation showed a value of 68.2% of viability, 69% of mobility and a concentration of 4.63 cells / ml x 10⁶, in the case of testicular spermatozoa, and in the case of the extratesticular spermatozoa, Viability of 65%, 0% mobility and a concentration of 0.54 cells / ml x 10⁶. From the results observed in this study, it can be deduced that the spermatozoa of *X. laevis* are subjected to biochemical post-systolic modifications in their plasma membrane Of certain carbohydrates, in different regions as sperm travel through the tract; This possibly as a response to the interaction of the sperm with the tissue and / or the fluids of the spermatic transport ducts of the reproductive system. The replacement of GlcNAc / NeuAc, D-mannose and L-fucose in different regions of the plasma membrane of the spermatozoa of *X. laevis* indicates the relevance of these carbohydrates in the physiology of these, that is, they play a fundamental role that results in The successful recognition, union and fusion of gametes derived from post-maturation maturation. Regarding the results of the study of the spermatozoa of *X. laevis*, although there were no significant differences, there was a slight reduction in the area of the nucleus of extratesticular spermatozoa with respect to testicular spermatozoa, And there were no significant differences with respect to the area of the mitochondrial ring region of extratesticular spermatozoa in relation to testis spermatozoa. Based on the results of the study of the chromatin area, it can be inferred that *X. laevis* spp., Which is a vertebrate that lacks an epididymal structure, may be carrying out a process of post- That favors a hardening of the spermatic structures that prevents the hypercondensed product

(chromatin) undergoes an early decondensation, which leads to a reduction in the area of the nucleus due to the increase of the degree of condensation, very similar to what happens in higher vertebrates.

1.- INTRODUCCIÓN

El orden Anura está compuesto por 54 familias, que conforman alrededor de 6200 especies (Frost, 2016), siendo el más abundante y diversificado de la clase anfibia. En México podemos encontrar 11 familias, lo cual representa el 20.37% de la riqueza total de las familias de vertebrados (Parra-Olea *et al.*, 2014). Sin embargo, existe una drástica reducción poblacional de anfibios a nivel mundial, lo cual se considera resultado de una degradación ambiental global, tan severa, que los anfibios iniciadores del modo de vida terrestre de los vertebrados, son ahora indicadores del declive de la calidad de vida de nuestro planeta.

Actualmente, se sabe que los anfibios están sufriendo la peor crisis de extinción de su historia (Wake y Vredenburg, 2008). Su tasa de extinción supera la de otros vertebrados (Collins y Storfer, 2003, Young *et al.*, 2004). Según la NOM-059-SEMARNAT-2014, se considera que de los anfibios de México, 164 especies están amenazadas, lo cual equivale al 43% de la diversidad total de anfibios de México. (Parra-Olea *et al.*, 2014). Los factores identificados como causantes de la disminución de las poblaciones de anfibios son el calentamiento global, la reducción, alteración y contaminación del hábitat, así como problemas de salud causados por un hongo quítrido (*Batrachochytrium dendrobatidis*), entre otros. Es por lo mencionado anteriormente que se requieren esfuerzos por entender la biología, fisiología y ecología reproductiva de los organismos que conforman este grupo de vertebrados, siendo la reproducción el principal proceso biológico que garantiza la perpetuación y mantenimiento de las especies, en tiempo y espacio, así como también su evolución.

En éste contexto reproductivo, se sabe que la morfología de los órganos de transporte y almacenamiento de espermatozoides es muy variada en las diferentes especies de vertebrados tetrápodos, lo que ha dado lugar a una gran variedad de estrategias reproductoras y sistemas de apareamiento a lo largo de la evolución (Emlen y Oring, 1977).

Los diversos organismos han desarrollado adaptaciones evolutivas para favorecer la fertilización bajo diferentes condiciones (Grassé, 1978), como ejemplo de estas

adaptaciones está la fertilización interna, que la presentan diversos grupos y que es propia de los vertebrados amniotas (reptiles, aves y mamíferos), los cuales presentan adaptaciones anatómicas y fisiológicas que han conducido finalmente a una estrategia reproductiva que permite la sobrevivencia de los embriones hasta el estadio final del desarrollo embrionario (Villagrán Santacruz, 2013); en cambio, la fertilización externa es realizada por muchos de los animales acuáticos como los peces (grupo ancestral de los anfibios) y los anfibios (vertebrados primitivos), siendo estos últimos, los primeros en lograr sobrevivir fuera del agua. Sin embargo existen pocos estudios sobre los aspectos reproductivos enfocados a la dinámica de cambios bioquímicos y estructurales de los gametos de especies de anfibios, específicamente anuros.

1.1.- Aparato urogenital masculino de Anfibios Anuros.

Los sistemas excretor y reproductivo en los Anfibios Anuros, se encuentran cercanamente asociados, aunque se originan a partir de diferentes tejidos embrionarios; están integrados por: riñones, testículos, conductos urogenitales (*rete testis*, conductos eferentes, conductos epididimarios, túbulos renales, conductos de Wolff y vesícula seminal), vejiga urinaria, cuerpos grasos y cloaca (Duellman y Trueb, 1994).

En el testículo, se encuentran los túbulos seminíferos que se unen posteriormente para formar lo que se nombra como *rete testis*, posteriormente, se interconectan en un único conducto del que parten los conductos eferentes, y estos a su vez, salen del testículo hacia la zona superficial del riñón (Hiragond y Saidapur, 2000). Dentro del riñón, se interconectan a un tubo perpendicular llamado canal lateral, y continúan su trayecto hacia la zona profunda, considerándose aquí como conductos epididimarios (Hiragond y Saidapur, 2000), que son conductos primitivos que no llegan a formar una estructura compleja como el epidídimo de los amniotas (Fig. 1).

Los conductos epididimarios se convierten en conductos renales, los cuales tendrán una función de excreción (Ogielska, 2009). En algunas especies, el conducto urogenital es también llamado conducto arquinéfrico o de Wolff y en su porción proximal a la

vejiga urinaria se ensancha y se convierte en el sitio cuya función es la de almacenamiento de espermatozoides solo en algunas especies de Anuros (Bhaduri y Basu, 1957).

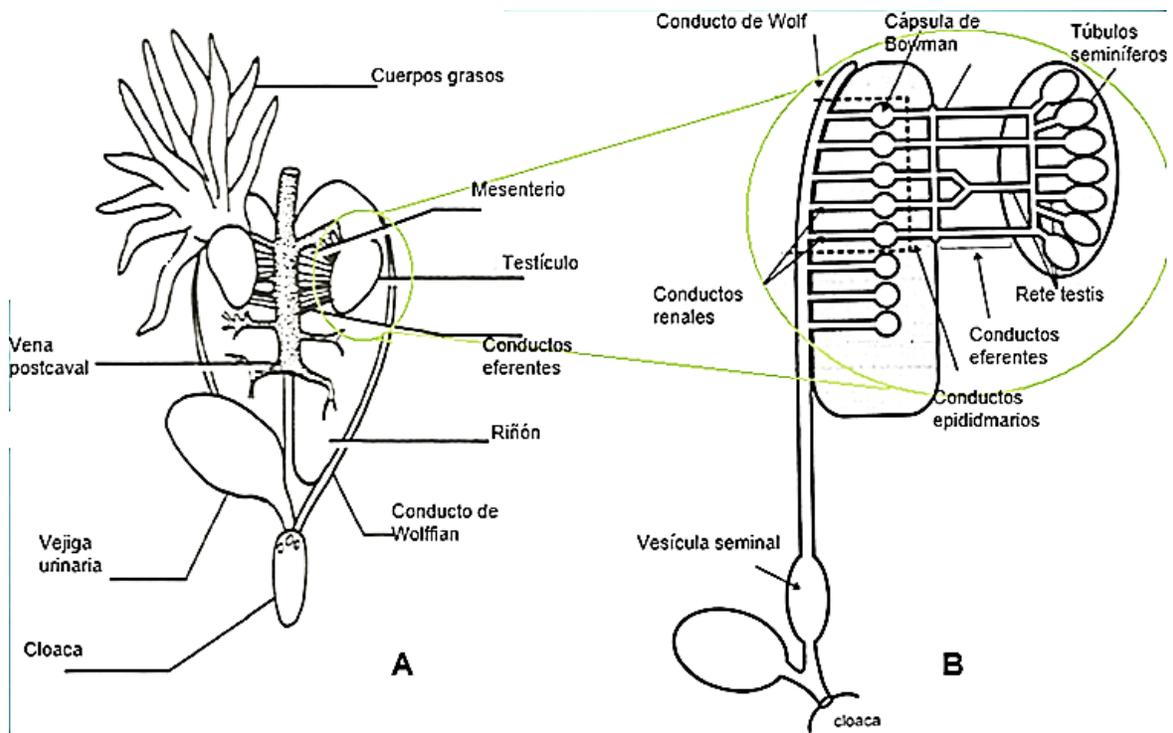


Fig. 1. Esquema del aparato reproductor masculino de los Anuros. **A,** Vista general del aparato. **B,** Detalle de los conductos de transporte de espermatozoides (Modificado de Jamieson, 1993 y de Ogielska, 2009).

1.2.- Morfología y ultraestructura de los espermatozoides de Anfibios Anuros.

Los espermatozoides de los anuros presentan la forma genérica característica: cabeza, pieza media y cola. En la cabeza se encuentran el núcleo y el acrosoma (Garda *et al.*, 2002), y en la parte apical se forma el complejo acrosomal, que está compuesto por la vesícula subacrosomal, situada entre el acrosoma y el núcleo (Koch y Lambert, 1990, Scheltinga *et al.*, 2001).

La pieza media del espermatozoide, a diferencia de lo que se ha descrito para otros vertebrados, no forma parte del flagelo, por lo que se considera independiente (Garda *et al.*, 2002). Dentro de esta región se encuentra la fosa nuclear, dos centriolos y la parte más apical del axonema, junto con su conexión con la fibra axial (pieza de conexión) (Jamieson *et al.*, 1993). Durante la espermiogénesis, las mitocondrias migran a ésta sección de la espermátida, y pueden encontrarse en el citoplasma o distribuidas alrededor de la base del flagelo en un pliegue de citoplasma llamado vaina mitocondrial o collar mitocondrial (Koch y Lambert, 1990).

El espermatozoide de la rana *Xenopus laevis* es una célula vermiforme, la cabeza es cilíndrica y forma una hélice de 1.5 vueltas, las mitocondrias rodean la porción terminal del núcleo, el centriolo proximal, el cuerpo basal y una porción del flagelo (Fig. 2), éstas tienen una forma redondeada con un diámetro promedio de 0.2 μm y no se encuentran fusionadas (Bernardini *et al.*, 1986). El axonema tiene la típica disposición de microtúbulos, compuesto por un par central, rodeado de nueve pares periféricos, los cuales se unen a la fibra axial por medio de sus partes proximales y forman una pieza conectiva rica en proteínas (Sanz-Ochotorena *et al.*, 2008).

Los espermatozoides considerados primitivos pertenecen a animales de fertilización externa, tienen un anillo sencillo de mitocondrias que presentan una forma semi redondeada, mientras que los espermatozoides de animales de fertilización interna, se han asociado con la necesidad de nadar en un medio viscoso (Bernardini *et al.*, 1986) y por ello presentan características adaptadas para ese fin. *Xenopus laevis* es un anuro de fertilización externa, sin embargo, el sistema de mitocondrias que posee, exhibe tanto características primitivas como características parecidas a las de los espermatozoides de fertilización interna, es decir, las mitocondrias conservan su forma semi redonda y no se encuentran fusionadas y por otro lado el número de éstas es muy alto en relación al de otras especies de Anuros (Bernardini *et al.*, 1986).

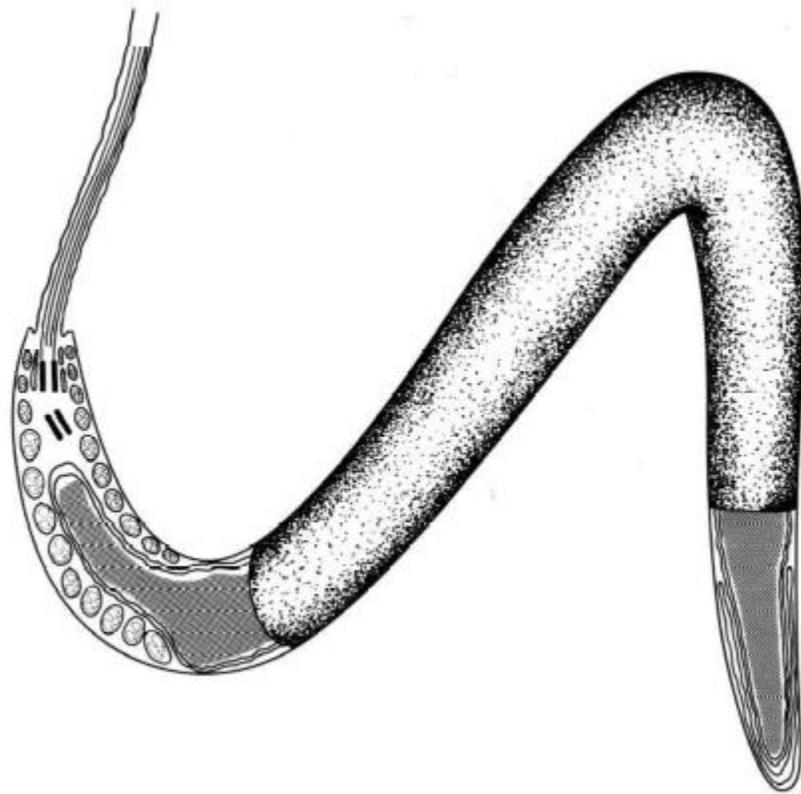


Fig. 2. Esquema que representa la ultraestructura de la cabeza y la porción inicial del flagelo del espermatozoide de *X. laevis* (Tomado de Bernardini *et al.*, 1986).

1.3.- Maduración espermática posttesticular

En vertebrados superiores por ejemplo, los mamíferos, los espermatozoides producidos dentro de los túbulos seminíferos en los testículos dependen del paso a través de una estructura anatómica llamada túbulo epididimario para adquirir la capacidad de fertilización (Cooper, 2007, Robaire *et al.*, 2006). El proceso de maduración envuelve una serie de eventos bioquímicos que pueden secuencialmente modificar al espermatozoide durante su tránsito a través del túbulo epididimario (Sullivan *et al.*, 2007). Los cambios que ocurren en los espermatozoides son inducidos por la presencia de sustancias secretadas y por la eliminación de otras que son absorbidas por tipos celulares particulares presentes en el epitelio epididimario (Cooper, 2007), lo que favorece el aumento de la carga negativa de la membrana plasmática, pérdida de gota citoplásmica, cambio en el coeficiente fosfolípidos/colesterol, reestructuración y/o

remodelación de la forma del acrosoma, disminución del diámetro de las mitocondrias e incremento del movimiento progresivo de los espermatozoides (Huang *et al.*, 1999, Lewis y Aitken, 2001, Naz y Rajesh, 2004, Sullivan *et al.*, 2007, Fabrega *et al.*, 2012).

La idea de que los espermatozoides de muchas especies de mamíferos deben recorrer el túbulo epididimario para alcanzar su maduración en la región del cuerpo y almacenarse en la región caudal del epidídimo surgió hace más de 70 años (Amann y Schanbacher, 1983); sin embargo, en especies de vertebrados inferiores como los Anfibios Anuros no existe una estructura epididimaria con las características anatómicas que se presenta en los mamíferos, lo cual, hasta ahora, ha sugerido el hecho de que en éste grupo de vertebrados no se lleven a cabo modificaciones post testiculares en los espermatozoides, sin embargo no hay reportes previos que comprueben éstas suposiciones.

1.4.- Glicocálix de la membrana plasmática de las células espermáticas

Durante la formación de los espermatozoides en los testículos (espermatogénesis), la membrana plasmática se prepara para reaccionar adecuadamente al tracto reproductor femenino y/o al ovocito (Flesch y Gadella, 2000). Debido a la pérdida de la mayoría de los organelos celulares y a la transcripción de DNA, los espermatozoides carecen de expresión proteica y de transporte vesicular. Esto implica que la membrana plasmática sea una estructura metabólicamente estable e inerte, ya que las proteínas, fosfolípidos, colesterol y otros componentes de la membrana plasmática no pueden ser sintetizados nuevamente (Flesch y Gadella, 2000).

Sin embargo, hasta éste punto, la membrana de los espermatozoides aún no ha madurado completamente, ya que durante el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo la membrana experimenta cambios como la liberación, modificación y adsorción de proteínas y lípidos y en la mayoría de las especies de mamíferos los espermatozoides logran la maduración cuando se encuentran en la cola del epidídimo.

La superficie de las células eucariotas consiste en una zona rica en carbohidratos conocida como glicocálix, ésta capa contiene cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente a proteínas integrales de membrana, a los lípidos y a cadenas de polisacáridos unidos covalentemente a una proteína central (Alberts *et al.*, 1996). En general las funciones del glicocálix son la mediación de eventos de reconocimiento específico y/o modulación de procesos biológicos (Varki y Schauer, 2009). La composición del glicocálix en los espermatozoides es muy dinámica, ya que como se menciona anteriormente, en los mamíferos la capa original de carbohidratos se modifica durante el paso a través del epidídimo y también en el aparato reproductor de la hembra (Eddy, 2006). El glicocálix de los espermatozoides representa la primera interfase entre el gameto masculino y su ambiente, y aunque las funciones específicas no han sido completamente determinadas, se sabe que están involucrados en la protección inmunológica en el interior del aparato reproductor de la hembra, en la adquisición de la capacidad de fertilización, en la reacción acrosomal y en la interacción entre los gametos (Schroter *et al.*, 1999, Diekman, 2003).

Los reportes sobre la composición, las modificaciones en la distribución durante la maduración posttesticular y las funciones fisiológicas del glicocálix de las células espermáticas, en su mayoría se han hecho en especies de mamíferos y un número muy limitado de investigaciones ha enfocado estos estudios en otros taxa (Pelaez y Long, 2007), por ejemplo en marsupiales (Cooper, 2007), peces (Rojas y Esponda, 2001), aves (Pelaez y Long, 2007), e incluso en invertebrados (Perotti y Pasini, 1995), que reportan la composición, distribución y/o función de los glicoconjugados de la superficie de membrana de los espermatozoides. En contraste, muy pocos datos informan sobre la composición, distribución espacial o función del glicocálix de los espermatozoides de Anfibios Anuros.

Bajo éste esquema, surge el interés de enfocar éste proyecto al estudio de la maduración espermática posttesticular en Anfibios Anuros, analizando los aspectos ultraestructurales y bioquímicos de los espermatozoides de la rana africana *Xenopus*

laevis, lo que permitirá aportar conocimiento sobre la fisiología espermática y dicha información puede ser utilizada para contribuir a la aplicación de métodos de reproducción animal asistida, enfocada hacia la ciencia básica y la conservación de especies de Anfibios Anuros mexicanos, aunado a que ésta información contribuye al conocimiento de la biología reproductiva de esta especie.

2.- ANTECEDENTES

Existen trabajos que describen la anatomía del aparato reproductor masculino de Anuros, haciendo mención de los conductos néfricos como conductos epididimarios y en los que se analizan de una manera descriptiva el arreglo de las estructuras extragonadales (Ogielska, 2009).

Por su parte, los reportes de (Hiragond y Saidapur, 2000) y, los de (Iwasawa y Michibata, 1972), hacen referencia a una amplia diversidad en la organización del sistema urogenital de anuros, mencionando que los conductos renales de la región craneal transportan principalmente espermatozoides y que estos conductos pudieran tener una homología con el conducto epididimario en mamíferos, también hacen mención de una expansión en la cauda del mesonefros, la cual pudiera estar implicada en el almacenamiento de espermatozoides en algunas especies. Ésta misma estructura fue analizada por (Duellman y Trueb, 1994), quienes reportan que ésta vesícula contiene epitelio glandular y está asociada con la formación de espuma o bien con el almacenamiento espermático en algunas especies.

En relación con reportes previos enfocados en el análisis de los cambios morfológicos vinculados con la maduración espermática, realizados en ciertas especies de mamíferos, se ha observado que las dimensiones del acrosoma se reducen durante el paso del espermatozoide por la cabeza del epidídimo (Bedford, 1968). También hay

reportes sobre modificaciones que incluyen una notable remodelación del acrosoma durante la espermiogénesis, las cuales son finalizadas en la cabeza del epidídimo (Fawcett y Phillips, 1969, Nicander y Bane, 1966).

En el caso de *Xenopus laevis* sólo se ha reportado la descripción morfológica de la ultraestructura de los espermatozoides testiculares (Bernardini *et al.*, 1986), y no hay reportes de modificaciones morfológicas de los espermatozoides durante su paso por los conductos de transporte de ésta o de otras especies de Anuros.

Las cadenas de carbohidratos de glicoproteínas y glicoesfingolípidos son moléculas altamente diversas involucradas en muchas funciones celulares, incluyendo reconocimiento celular, adhesión y señalización (Valbuena *et al.*, 2012). Existen proteínas de unión a glicoconjugados llamadas lectinas que reconocen específicamente secuencias de glicanos y que se han usado ampliamente para caracterizar carbohidratos en tejidos y células por medio de técnicas histoquímicas y citoquímicas. Los glicanos de ácido siálico (NeuAc) por ejemplo, son de especial interés por que la posición terminal de NeuAc en glicanos unidos a monosacáridos han demostrado estar involucrados en procesos biológicos, como los que desempeñan los gangliósidos, que han sido reportados como esenciales en la espermatogénesis en los mamíferos (Varki y Schauer, 2009).

En trabajos previos, se determinó la presencia de NeuAc mediante técnicas histoquímicas en los testículos de *Xenopus laevis* (Valbuena *et al.*, 2012). Los resultados muestran que NeuAc se expresa principalmente en el intersticio y se expresa muy débilmente en las células germinales y está siempre ausente en espermátidas y en el acrosoma de los espermatozoides, las variaciones en la expresión de éste azúcar encontrado en diferentes tipos celulares sugieren que ésta glicosilación se modifica durante el desarrollo espermatogénico.

Otros estudios han mostrado la importancia de las funciones mediadas por glicanos en la espermatogénesis y la composición de carbohidratos de los testículos en Anfibios; incluyendo métodos histoquímicos usando lectinas. (Valbuena *et al.*, 2010), llevaron a cabo un estudio histoquímico de glicoconjugados de fucosa (Fuc) mediante el uso de lectinas en tejido testicular de *Xenopus laevis*, detectando la presencia de Fuc. El posible papel de estos fucosilados en los testículos de éstos organismos aún no se ha identificado, pero se ha demostrado que la fucosa está implicada en el transporte vesicular de la red trans-Golgi al acrosoma y los cuerpos multivesiculares en testículo de rata (Martinez-Menarguez *et al.*, 1993). La identificación de glicanos en los testículos de Anfibios también ha demostrado la existencia de N-acetilgalactosamina (GalNAc), el marcaje en el acrosoma con lectinas que se unen a GalNAc ha permitido la identificación de éste glicano, el cual se encuentra relacionado con la biogénesis acrosomal (Valbuena *et al.*, 2011); y en el caso de *X. laevis* se ha determinado la expresión de GalNAc en tejido testicular usando lectinas específicas (Valbuena *et al.*, 2011).

Sáez *et al.*, (1999), realizaron una caracterización de los glicoconjugados en las espermátidas de un Anfibio Urodelo durante la espermiogénesis mediante el uso de lectinas en combinación con varios procedimientos químicos y enzimáticos, en orden de establecer la distribución de oligosacáridos de unión -N y de unión -O en éstas células. Con algunas lectinas el acrosoma mostró una composición variable de oligosacáridos en diferentes fases de la espermiogénesis; algunos residuos se encontraron solo en las primeras fases de la formación del acrosoma, mientras que otros se detectaron en etapas posteriores, mostrando que los glicoconjugados acrosomales se modifican durante el desarrollo acrosomal en la espermiogénesis. Los cambios observados durante la formación del acrosoma sugieren la existencia de un patrón predeterminado de almacenamiento de los componentes del acrosoma y una compresión progresiva de ellos.

3.- JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento no hay estudios particulares que señalen si los espermatozoides de Anuros presentan alguna modificación bioquímica o estructural post testicular que pudiera relacionarse con un proceso de maduración espermática. Por ello, resulta importante realizar un análisis de algunas características de los espermatozoides (composición de carbohidratos de la membrana y aspectos morfológicos) presentes en las diferentes regiones del aparato reproductor y observar si existen diferencias. Un conocimiento más amplio sobre la dinámica de los cambios bioquímicos y estructurales en los espermatozoides de Anuros, podría aportar información importante que permita continuar con la aplicación de métodos de reproducción asistida enfocada a la conservación de estos organismos al entender mejor los procesos que ocurren posttesticularmente.

4.- HIPÓTESIS

Si los espermatozoides testiculares y posttesticulares presentan modificaciones entre sí en su distribución de carbohidratos de membrana, así como diferencias en su ultraestructura, entonces estas diferencias indicarán un posible proceso de maduración espermática post testicular en Anfibios Anuros.

5.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar si ocurren modificaciones bioquímicas y ultraestructurales post testiculares en espermatozoides de *Xenopus laevis*.

5.1.- Objetivos particulares

- Evaluar si existen cambios post testiculares en la condición fisiológica de los espermatozoides.

- Determinar si existen modificaciones ultraestructurales después de que los espermatozoides abandonan el testículo.
- Analizar si existen cambios post testiculares en la distribución de carbohidratos de membrana plasmática de los espermatozoides.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

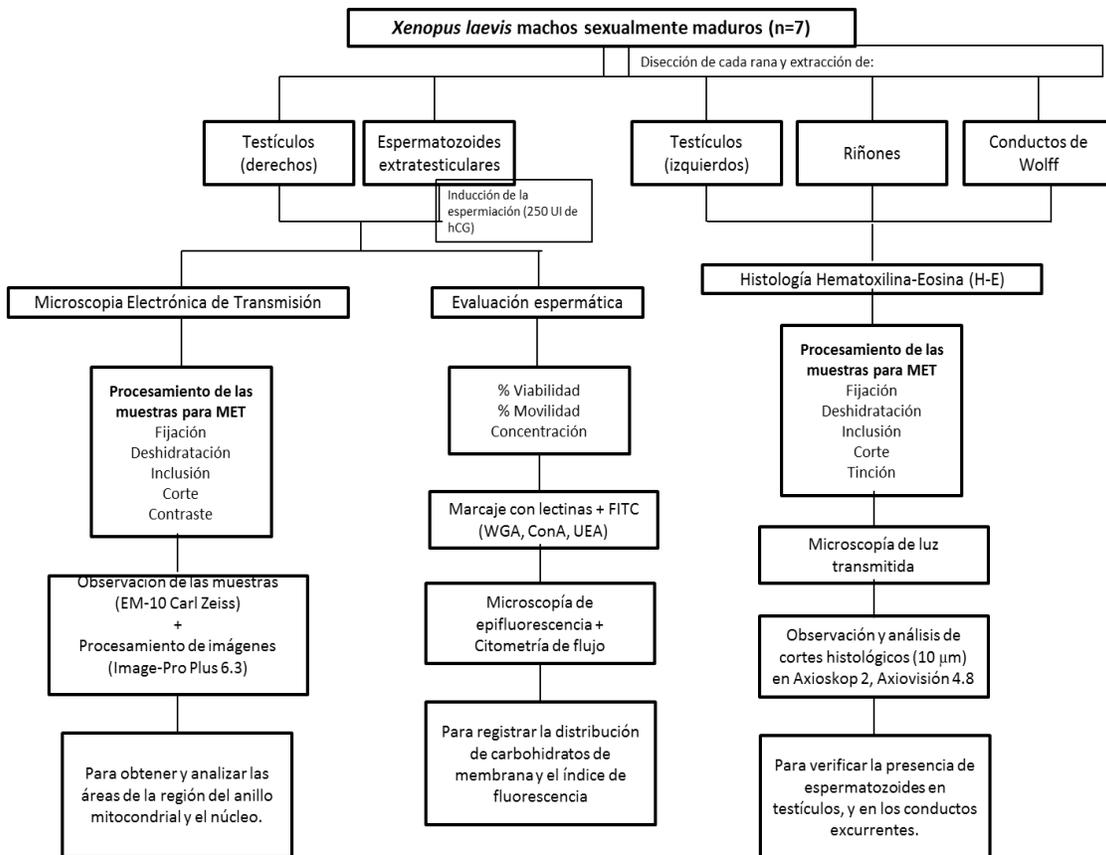


Fig.3. Diagrama de flujo del diseño experimental.

6.1.- Obtención de los ejemplares.

Machos sexualmente maduros de la rana africana *Xenopus laevis* (n=7), fueron adquiridos directamente de la Granja Aquanimals, localizada en el estado de Querétaro, México. Una vez en la Unidad Iztapalapa de la UAM, los ejemplares fueron mantenidos en una pecera de cristal, bajo las condiciones de laboratorio dentro de las instalaciones de la Planta Experimental Acuícola (PEXPA), en donde se alimentaron con *pelets ad libitum*. El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones sugeridas por el Institute of Laboratory Animal Resources (1996) para el cuidado animal y, se tomaron en cuenta las especificaciones establecidas en los lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

Para llevar a cabo los experimentos, se realizó la eutanasia de los individuos por anestesia con benzocaína al 1.6% (8 ml/L) diluida en el agua donde se encontraban los animales (Schaeffer, 1997), inmediatamente después se realizó una incisión abdominal horizontal para acceder a la cavidad abdominal y extraer los dos testículos, y con el objetivo de verificar la existencia de espermatozoides en los conductos de transporte mediante histología, también se extrajeron ambos riñones y los conductos mesonéfricos (conductos de Wolff). Los testículos, los riñones y los conductos mesonéfricos removidos fueron medidos con un calibrador vernier (precisión: 0,1 mm) (Asenjo *et al.*, 2011). Se emplearon 7 animales, uno por ensayo cada semana. En cada ensayo se obtuvieron ambos pares de cada uno de los siguientes tres tipos de órganos: a) testículos, b) riñones y c) conductos mesonéfricos.

6.2.- Obtención de espermatozoides para análisis espermático

Con la finalidad de observar si existían diferencias en las características de interés de los espermatozoides de *X. laevis*, éstos se obtuvieron de testículo y directo de la cloaca.

Extracción de espermatozoides testiculares: En cajas de cuatro pozos, cada uno con 500 µl de solución Ringer Simplificado para Anfibios (SAR; NaCl 113.0 mM; CaCl₂ 1 mM; KCl 2.0 mM; NaHCO₃ 3.6 mM, a 220 mOsmol kg⁻¹, pH 7,2) (Browne *et al.*, 2002), se depositó cada testículo derecho y se colocó sobre un refrigerante a una temperatura de entre -8 a -10°C para realizar picados con tijeras iris y propiciar la salida de los espermatozoides, el material biológico se filtró a través de una malla (98% nylon/poliamida, 2% lycra/elastano, diámetro de trama de 20µm) directamente en un tubo eppendorf de 500 µl . Los espermatozoides en suspensión fueron lavados dos veces por centrifugación a 500 g por 5 minutos y resuspendidos en 500 µl de SAR. A continuación se realizaron evaluaciones espermáticas para realizar el conteo celular y registrar los porcentajes de movilidad, viabilidad y concentración (León-Galvan *et al.*, 1999).

Extracción de espermatozoides extratesticulares: Los espermatozoides fueron extraídos directo de la cloaca, para lo cual se inyectaron 250 UI de hCG a través del saco límbico dorsal de cada rana y se mantuvieron a los animales en agua a una temperatura de 18 °C durante 12 horas (Ueda *et al.*, 2002). Posteriormente, con una cánula introducida en la cloaca se extrajo el fluido cloacal en donde se considera se encuentran los espermatozoides, depositándolo en tubos eppendorf con 500 µl de SAR. A continuación se realizaron 2 lavados por centrifugación a 500 g por 5 minutos, las muestras se resuspendieron en 500 µl de medio SAR y se realizaron las evaluaciones para obtener los porcentajes de movilidad y de viabilidad, así como la concentración espermática. Para las evaluaciones espermáticas se emplearon los métodos estándares descritos en el manual de la OMS (WHO, 2010), pero se hicieron las adaptaciones pertinentes de acuerdo a la especie de estudio y a la fuente de los espermatozoides.

6.2.3.- Análisis espermático de las muestras de espermatozoides testiculares y extratesticulares.

Movilidad espermática. Se colocaron 10 µl de la suspensión de espermatozoides sobre un portaobjetos y se realizó un conteo de 100 células en un microscopio de luz transmitida; de estas 100 células observadas, se registró el número de espermatozoides que presentaron movilidad.

Concentración espermática. Para llevar a cabo el conteo de células se realizó una dilución de la muestra dependiendo de la cantidad de espermatozoides observados en el microscopio a un aumento de 40x (WHO, 2010). A continuación se llevó a cabo el conteo en una cámara de Neubauer, agregando 10 µl de la dilución a cada lado de la cámara, dejando reposar por 1 minuto, los conteos se hicieron en un microscopio de luz transmitida con el objetivo de 40x.

Viabilidad. Se colocó una alícuota de 10 µl de la suspensión de espermatozoides sobre un portaobjetos y se añadió 5 µl de Eosina-Nigrosina, se mezclaron y se realizó un frotis, que se dejó secar por 10 minutos y posteriormente se hizo el conteo de 100 espermatozoides en microscopio de luz transmitida con el objetivo de 40x. Se distinguieron espermatozoides vivos cuando éstos no presentaban ninguna tinción y a los muertos cuando presentaban una tinción color morado.

6.3.- Marcaje de residuos de carbohidratos con el uso de lectinas

Con la finalidad de detectar la presencia y determinar el patrón de distribución de carbohidratos presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides de manera comparativa entre las muestras obtenidas del testículo y los extraídos de la cloaca, se utilizaron lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC): Aglutinina de *Triticum vulgare* (WGA), que se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, *Canavalia ensiformis* aglutinina (ConA), que se une a residuos de

manosa, y *Ulex europaeus* aglutinina (UEA), que se une a fucosa; adicionalmente se realizó un control negativo para cada muestra incubando cada lectina por 30 minutos con su respectivo azúcar específico a una concentración 0.3 M antes de ser puestas con los espermatozoides (Fierro *et al.*, 1996).

Cada diferente tipo de lectina fue utilizada a una dilución de 1:50 en PBS, con la cual se incubaron las muestras de espermatozoides durante 30 minutos a 28 °C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS; se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente y se observaron al microscopio de epifluorescencia (Olympus BX-41). Para evaluar la distribución de carbohidratos, se contaron 100 espermatozoides por cada muestra y se registró el patrón de distribución de cada azúcar marcada en la membrana de los espermatozoides.

Adicional a las observaciones al microscopio de epifluorescencia; de los espermatozoides testiculares y extratesticulares previamente marcados con las lectinas se emplearon alícuotas de 40 µl en 500 µl de PBS para realizar un análisis en el citómetro de flujo (FACScan), y así registrar la intensidad de fluorescencia de las células espermáticas que indican la cantidad de carbohidratos presentes en la membrana espermática (Jimenez *et al.*, 2003). Se evaluaron 10 000 eventos por muestra y se analizaron los histogramas de intensidad de fluorescencia (IF) contra el número de células marcadas (Fierro *et al.*, 1996).

6.4.- Procesamiento histológico

Procesamiento para histología con tinción Hematoxilina-Eosina. Para verificar la presencia de espermatozoides en los conductos de transporte, los testículos izquierdos, riñones y conductos mesonéfricos fueron sometidos a fijación en formaldehído al 4 % durante 24 horas, se realizó el procesamiento de inclusión en parafina (Paraplast plus) lavando con buffer de fosfatos las muestras, para luego deshidatarlas en soluciones de

concentración creciente de etanol, se realizaron cortes de 5 μm y 10 μm en un micrótopo de rotación Leica, modelo Jung Histocut. Después de la desparafinación, se realizó la tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E), las muestras se montaron permanentemente en portaobjetos y fueron observadas en Axioskop 2, Cámara AxioCam MRc5 y las imágenes se procesaron en el programa Axiovisión 4.8.

Procesamiento para microscopía electrónica de transmisión. Secciones de cada testículo izquierdo ($\sim 1 \text{ mm}^3$) se fijaron por inmersión en una mezcla de paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 3 % durante 24 horas, se realizaron 3 lavados con buffer de fosfatos, cada uno de 15 minutos y se post fijaron con tetraóxido de osmio al 1% a pH 7,4 por 2 horas, después se deshidrataron en un gradiente ascendente de etanol (30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100%) terminando con una preinclusión en una mezcla de acetonitrilo y resina epóxica (1:1), posteriormente se incluyeron en moldes con resina epóxica pura por 48 horas a 60°C para su polimerización. Se obtuvieron cortes de 75 a 80 nm con un ultramicrotopo (Ultracut de Leica, UCT), los cortes se observaron bajo microscopio electrónico de transmisión EM-10 (Carl Zeiss) (Bernardini *et al.*, 1986, Sanz-Ochotorena *et al.*, 2008). Para el caso de los espermatozoides extraídos de la cloaca, las muestras fueron fijadas en una mezcla de paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 3% en PBS 1M durante 2 horas, consecutivamente se realizaron 3 lavados por centrifugación con amortiguador de fosfatos a 500 g por 10 minutos, y en el último lavado, se retiró el sobrenadante dejando el botón celular para su procesamiento de inclusión en resina epóxica, siguiendo los pasos descritos para las muestras de tejido testicular.

Posteriormente, empleando la descripción hecha por (Bernardini *et al.*, 1986) se seleccionaron imágenes de los espermatozoides correspondientes a la región terminal del manchete mitocondrial para realizar un estudio morfométrico y analizar las características morfológicas finas y así realizar comparaciones de las características

ultraestructurales de los espermatozoides testiculares y de los extratesticulares, obteniendo el área del núcleo, así como el área de la región del collar mitocondrial utilizando para ello el programa Image-Pro Plus versión 6.3.

6.5.- Análisis Estadístico

Para cada variable evaluada, se realizó la comparación entre los dos grupos de espermatozoides (testiculares y extratesticulares), para ello se aplicó la prueba t de *Student* considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ (Sokal y Rohlf, 1995). No obstante, cuando la distribución de los valores no cumplía con la normalidad y/o homocedasticidad se aplicó el análisis no paramétrico respectivo (U de *Mann-Whitney* / t de *Student-Welch*).

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En éste trabajo se evaluaron los aspectos morfológicos generales de los órganos del aparato reproductor de *Xenopus laevis*, los cuales presentaron las siguientes características: los testículos son órganos pareados, ovoidales que miden en promedio 4.2 mm de longitud y 2.0 mm de ancho, los riñones son estructuras de color rojo oscuro elongados, aplanados y compactos que miden en promedio 16 mm de longitud y 3.3 mm de ancho (Fig. 3). Éstas características morfométricas son similares a las que han reportado para otras especies de anuros ya que en el caso de *Rana cyanophlyctis* se ha registrado una medida testicular de 4 mm de largo por 2 mm de ancho (Hiragond y Saidapur, 2000) y en *Allobates femoralis* se registró una medida testicular de 2.2 mm de largo y de 0.97 mm de ancho (Asenjo *et al.*, 2011).

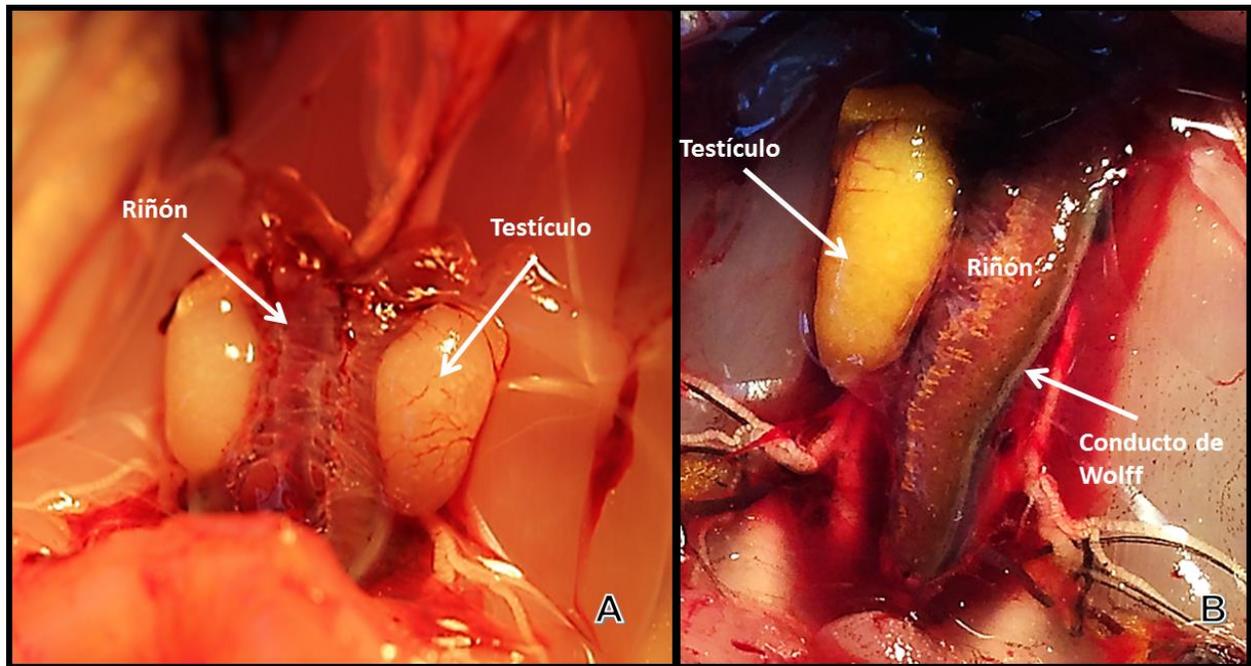


Fig.4. Morfología gruesa del aparato reproductor masculino de *Xenopus laevis*. A, Vista frontal de los testículos y riñones. B, Vista lateral del testículo y riñón izquierdos.

No obstante, los anuros se caracterizan por tener una gran variedad de estrategias reproductivas, lo cual sugiere variaciones morfológicas y funcionales en sus órganos sexuales (Duellman y Trueb, 1994, de Oliveira *et al.*, 2002), es así que diferentes autores reportan la presencia de ensanchamientos en la región distal del conducto de Wolff en algunas especies de los géneros *Rana* y *Bufo* (Bhaduri y Basu, 1957, Blüm, 1986, Hiragond y Saidapur, 2000), se ha propuesto que dichos ensanchamientos tienen la función de almacenar espermatozoides, puesto que los machos se enfrentan a la competencia por territorio y por las hembras, así como a un patrón de cópula con varias hembras durante la época de reproducción (Andersson e Iwasa, 1996). Éstas condiciones, junto con otros factores ambientales representan un costo significativo para la producción espermática, que puede conducir a la limitación de los suministros de espermatozoides o al agotamiento de éstos (Sato y Goshima, 2006). En consecuencia, se ha propuesto que los machos se ven obligados a economizar sus reservas de espermatozoides y para ello es necesaria una estructura anatómica que cumpla con dicho fin.

Sin embargo en *X. laevis* no se observó la presencia de dicha estructura de almacenamiento, lo cual puede deberse a factores como la estacionalidad reproductiva (Cynthia *et al.*, 2005), para la cual los anuros muestran dos patrones que están relacionados con el ambiente que habitan. Por un lado están las especies tropicales que pueden reproducirse durante todo el año, y la lluvia es el principal factor extrínseco que influye en promover la reproducción y por otro lado las especies de zonas templadas que se reproducen de manera estacional y dicha actividad depende de la combinación favorable de temperatura y de lluvia. (Cynthia *et al.*, 2005).

En las especies estacionales, resulta necesaria la presencia de una estructura de almacén espermático para hacer frente a la época reproductiva. Otro factor importante que puede influenciar la presencia de estructuras de almacenamiento espermático es el patrón reproductivo asincrónico (Wells, 1977), en el cual las hembras arriban al sitio de reproducción después que los machos, esta condición conlleva a la necesidad de los machos de almacenar espermatozoides para continuar con la producción espermática y poder hacer frente a la competencia espermática con otros machos a la llegada de las hembras. Sin embargo, *X. laevis* presenta un patrón reproductivo no estacional, es decir, que ésta especie tiene la capacidad de reproducirse durante cualquier época del año, siempre y cuando las condiciones ambientales y el abastecimiento de alimento sean adecuados. Sumado a esto el patrón reproductivo de *X. laevis* es sincrónico, esto significa que las hembras de ésta especie permanecen siempre en el mismo sitio de reproducción que los machos. Por lo tanto, es probable que debido a estas características propias de la especie, *X. laevis* no necesite estructuras de almacenamiento post testicular.

Para poder verificar la presencia de espermatozoides en los testículos se realizaron observaciones en cortes histológicos de éste órgano, de igual manera se hizo para los conductos de transporte espermático (conductos renales y conducto de Wolff). Los resultados de las observaciones histológicas evidenciaron actividad espermática, así

como la presencia de espermatozoides en los testículos, lo cual demostró que los animales empleados eran sexualmente maduros. No obstante, no se observó la presencia de espermatozoides en los conductos renales, ni en el conducto de Wolff (Fig. 4), contrario a lo reportado por otros autores (Hiragond y Saidapur, 2000), que mencionan que en los conductos renales de la región craneal de algunas especies de anuros se registró la presencia de espermatozoides, así como también, reportan la presencia de espermatozoides en el conducto de Wolff. La condición observada en *X. leavis* puede deberse al hecho de que ésta especie no posee un sitio de almacenamiento espermático post testicular y por ende, el transporte de espermatozoides del testículo hacia la red de conductos extra testiculares no sea continuo y se restrinja solo al momento del amplexo.

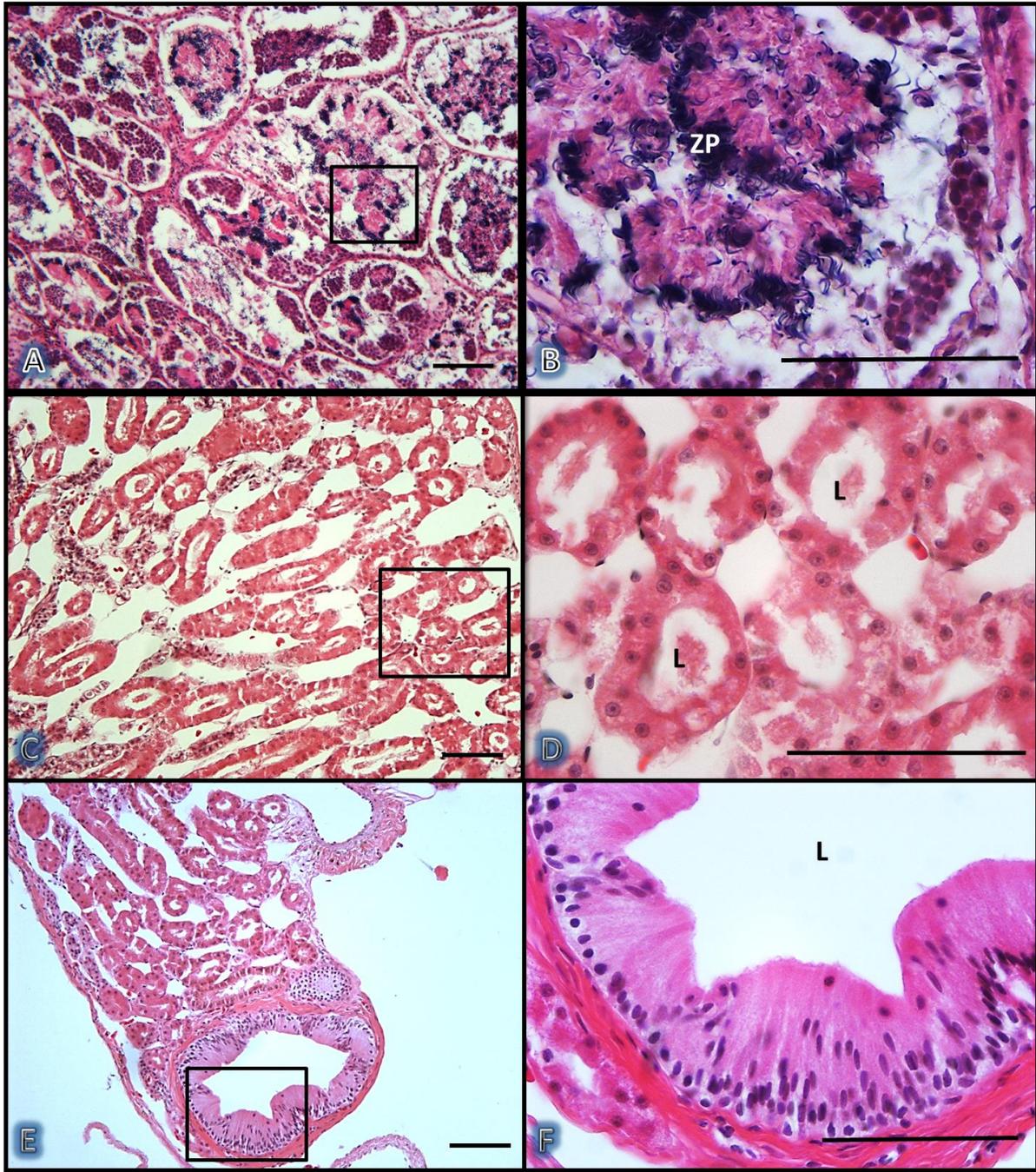


Fig. 5. Cortes histológicos de testículo y conductos de transporte espermático de *X. laevis*. **A**, Corte transversal de testículo. **B**, Testículo. Detalle de cisto espermatogénico con espermatozoides (ZP). **C** y **D**, Cortes transversales de los conductos renales de la región craneal, L= lúmen de los conductos. **F**, Corte transversal de la región caudal del conducto de Wolff y de los conductos de riñón. **F**, Detalle del conducto de Wolff. Tinción H-E. (Barras y aumento original fig: A, C y E 100 μ m x100, B, D y F 100 μ m x400).

Tabla 1. Parámetros evaluados en el análisis espermático de las dos regiones de donde se obtuvieron espermatozoides de *X. laevis*. Los valores representan el promedio \pm DE. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas cuando se comparan los valores entre regiones (T de Studet, $p < 0.05$, $n = 7$ ranas).

Región	Viabilidad (%)	Movilidad (%)	Concentración (células/ml $\times 10^6$)
Testicular	68.2 \pm 11.6 ^a	69 \pm 23 ^a	4.38 \pm 0.14 ^a
Extratesticular	65.4 \pm 13.7 ^a	0 ^b	0.54 \pm 0.16 ^b

La tabla 1, muestra los resultados obtenidos de la evaluación espermática que, para el caso de la viabilidad de los espermatozoides de testículo, se registró un valor de 68.2 \pm 11.6 %, lo cual es un valor similar al reportado para *Rana sylvatica* (64.7 \pm 2.8 %) y para *Bufo americanus* (77.6 \pm 4.6 %), mientras que en *Rana pipiens* se ha registrado un porcentaje de viabilidad alto comparado con lo obtenido en éste estudio para *X. laevis* (90.8 \pm 2.0 %) (Beesley *et al.*, 1998). La viabilidad espermática depende de parámetros como la temperatura, la concentración espermática, concentración iónica, entre otros y se puede correlacionar con la supresión de la movilidad (Wolf y Hedrick, 1971), la cual en éste estudio se vio reducida, ya que se obtuvo un porcentaje de 69 \pm 23 % en los espermatozoides testiculares, mientras que los espermatozoides extratesticulares no presentaron movilidad (0 %).

Existen reportes del 42 % de movilidad para espermatozoides de *Xenopus* en solución 75 mM de NaCl (Inoda y Morisawa, 1987), sin embargo, la movilidad aumenta cuando la salinidad disminuye, puesto que se alcanzó una movilidad del 89 % con una solución 25 mM de NaCl (Inoda y Morisawa, 1987); la disminución en la movilidad posiblemente sea el resultado de cambios en la estructura del espermatozoide o en su función debido al choque hipoosmótico, similar a lo que sucede en peces de agua dulce (Morisawa *et al.*, 1983, Hardy y Dent, 1986). Los resultados obtenidos por Inoda y Morisawa, (1987) sugieren que los espermatozoides de *Xenopus* son inmóviles en soluciones electrolitos y no electrolitos, isoosmolares al plasma seminal (240-250 mosmol/Kg) y que la

movilidad solo se inicia cuando los espermatozoides son diluidos en soluciones hipotónicas (con menor concentración de soluto). Se sabe que los espermatozoides de mamíferos permanecen inmóviles en la cauda del epidídimo, pero se activan rápidamente en medios fisiológicos (O'Brien *et al.*, 2011). Del mismo modo, los espermatozoides de animales de fertilización externa que no poseen epidídimo, permanecen en estado de reposo en los testículos y se vuelven móviles tras el cambio osmótico del medio circundante (O'Brien *et al.*, 2011). Con base en lo reportado, se puede sugerir que la nula movilidad registrada en los espermatozoides extratesticulares en éste estudio, se debe posiblemente a una osmolaridad alta en el medio donde fueron diluidos.

Además se sabe que, un fenómeno de inactivación de la movilidad espermática se presenta en espermatozoides de mamífero, en donde se ha reportado que la movilidad disminuye conforme los espermatozoides avanzan por el tracto reproductor masculino (Yeung *et al.*, 1993) como consecuencia de la adquisición de factores discapacitantes, que inactivan la movilidad de los espermatozoides con el fin de evitar la capacitación espermática prematura (Krapf *et al.*, 2009), este evento se presenta como consecuencia de la maduración espermática epididimaria en mamíferos. Éste fenómeno es similar a lo que se observó en el presente estudio respecto a la ausencia de movilidad de los espermatozoides extratesticulares.

Asimismo cabe mencionar que existen reportes que prueban que la movilidad de los espermatozoides de *Xenopus* aumenta con altas concentraciones de espermatozoides, es decir que la movilidad está en función de la concentración espermática (Wolf y Hedrick, 1971). En éste estudio se registró un descenso de la concentración espermática, en testículo se obtuvo una concentración de 4.38 ± 0.14 células/ml $\times 10^6$, mientras que la concentración extratesticular arrojó una diferencia significativa en la concentración, con un valor de 0.54 ± 0.16 células/ml $\times 10^6$, que posiblemente esté relacionado con la disminución de la movilidad. Cabe mencionar que los valores de concentración espermática en testículo de *Xenopus* son mayores con respecto a lo reportado para *R. sylvatica* (0.78 ± 0.14 células/ml $\times 10^6$), *R. pipiens* (1.20 ± 0.24 células

/ml x 10⁶) y para *B. americanus* (1.46 ± 0.31 células/ml x10⁶) (Beesley *et al.*, 1998), mientras que no existen registros previos de concentración espermática para espermatozoides extratesticulares. En el presente estudio se observó que la concentración espermática disminuye significativamente en los espermatozoides extratesticulares con respecto a los testiculares, esto posiblemente se deba a que al realizar el picado de los testículos se liberan no solo espermatozoides, sino también un gran número de células germinales de todos los tipos, entre ellas espermátidas secundarias, que son muy parecidas a los espermatozoides, sin embargo, cuando se realiza la inducción de la espermiación a través de la hCG solo se liberan espermatozoides que están totalmente formados y listos para salir a los conductos excurrentes, y el número de células que se liberan se reduce y tal vez éste fenómeno sea el que se ve reflejado en los resultados del análisis espermático.

Por otro lado, se tienen reportes en el modelo mamífero respecto a los carbohidratos presentes en la membrana espermática y se sabe que durante la espermatogénesis, las células germinales ensamblan sus propios glicanos mientras éstas células aún poseen retículo endoplásmico funcional y aparato de Golgi (Teclé y Gagneux, 2015). Una vez que la espermatogénesis está completa, los espermatozoides pierden la capacidad de producir glicoconjugados. Sin embargo, los glicanos de la membrana espermática continúan modificándose durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo con la intervención de glucosidasas extracelulares y glicosiltransferasas. Además las células epiteliales del epidídimo secretan glicoconjugados (glicoproteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol y glicolípidos) y microvesículas (epididimosomas) ricas en glicanos que pueden fusionarse con la membrana del espermatozoide (Schroter *et al.*, 1999, Teclé y Gagneux, 2015). Éstas modificaciones posttesticulares en la distribución y el contenido de los glicanos son importantes, ya que el glicocálix de los espermatozoides media numerosas funciones, como la inhibición de la capacitación prematura, protección inmunológica, enmascara proteínas de membrana implicadas en la fertilización e interacción con el óvulo, entre otras (Teclé y Gagneux, 2015).

Es así, que durante su paso por el testículo hasta el sitio de fertilización, los espermatozoides encuentran una amplia gama de fluidos de diferentes orígenes y composición (Sostaric *et al.*, 2008), los cuales tienen una influencia en el desarrollo posttesticular e inducen a los espermatozoides a experimentar cambios que les permiten desarrollar la capacidad fertilizante. En vertebrados mamíferos los cambios morfológicos y bioquímicos que enfrentan los espermatozoides están regidos por secreciones del tejido epididimario y sus numerosas proteínas, algunas de las cuales pasan a ser componentes de la membrana plasmática y otras dejan de formar parte de ella, éste fenómeno forma parte crucial de la maduración espermática posttesticular (Sostaric *et al.*, 2008).

En éste estudio se llevó a cabo una comparación entre la distribución de tres carbohidratos en la membrana de los espermatozoides testiculares y extratesticulares de la rana *X. laevis*. Se encontraron tres patrones para el caso de N-acetil glucosamina y/o ácido siálico (GlcNAc/NeuAc) (Fig. 5), el primero de ellos registrado en espermatozoides de testículo muestra un 27 % de las células con una clara distribución de GlcNAc/NeuAc a lo largo del espermatozoide de una manera homogénea, distinguiéndose la cabeza y el flagelo, pero sin exhibir sitios específicos de marcaje más intenso. El segundo patrón encontrado también en el testículo, arrojó un 62% de espermatozoides con un marcaje distribuido en la cabeza, pero con una fluorescencia más intensa en la región de la pieza media y con el flagelo visiblemente marcado, ninguno de estos dos patrones fue hallado en espermatozoides extratesticulares. El tercer patrón, hallado en los espermatozoides extratesticulares presenta un 20 % de células marcadas particularmente en la región de la cabeza, sin embargo se distingue una fluorescencia más intensa en la pieza media y el capuchón acrosomal, y no hubo marcaje en el flagelo. Estas comparaciones de los porcentajes de espermatozoides marcados en las dos regiones (testicular y extratesticular) arrojaron diferencias significativas en cada patrón de distribución.

No existen reportes previos sobre modificaciones en la distribución de los carbohidratos en la membrana de espermatozoides de alguna otra especie del género Rana o Bufo, sin embargo, los resultados obtenidos en éste estudio coinciden con los reportados para algunas especies de mamíferos (verraco, mono Rhesus), Kumar *et al.*, (1990) y Navaneetham *et al.*, (1996), reportan la presencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la cabeza de espermatozoides de mamífero de regiones extratesticulares y eyaculados, con patrones de distribución en la región acrosomal, similar a lo observado en los espermatozoides extratesticulares de *X. laevis*. La presencia de estos carbohidratos en estas regiones del espermatozoide, quizá pueda deberse a la posible función que desempeñan, la cual ha sido reportada como una función de reconocimiento primario del ovocito y una función de participación en la actividad de la hialuronidasa durante la reacción acrosomal (Schroter *et al.*, 1999).

El índice de fluorescencia (IF) obtenido a partir de citometría de flujo para GlcNAc/NeuAc, evidenció que a pesar de que no se presentaron diferencias significativas entre regiones, existe una tendencia a la disminución en la cantidad de éste carbohidrato en los espermatozoides de la región extratesticular en relación a los espermatozoides de testículo (Fig.6).

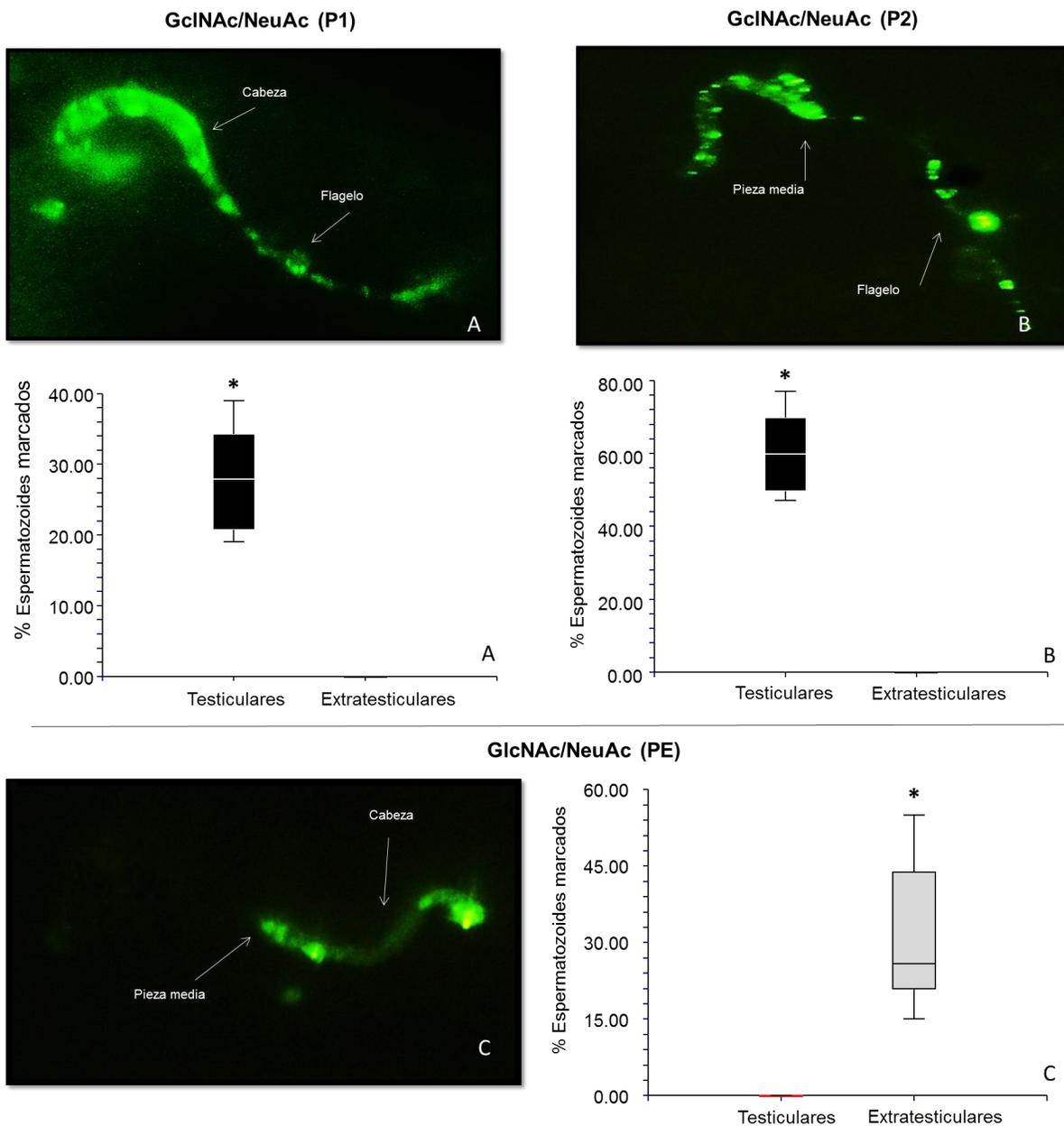


Fig. 6. Patrones de distribución y porcentajes de espermatozoides marcados con GlcNAc/NeuAc. **A** y **B.** Patrón de distribución y porcentajes registrados en testículo y en espermatozoides extratesticulares (P1 y P2). **C.** Patrón y porcentaje registrado en testículo y en espermatozoides extratesticulares (PE) de *X. laevis*. Las barras indican la distribución de los datos observados con respecto a la media. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre regiones (T de *Student-Welch*, $p < 0.05$, $n = 7$ ranas).

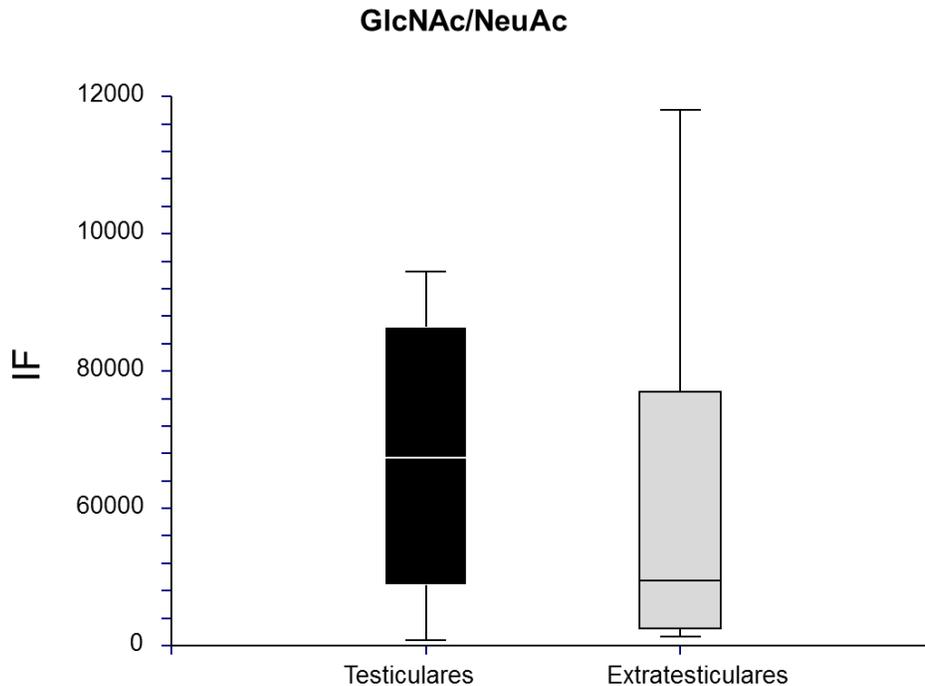


Fig. 7. Índice de fluorescencia registrado para GlcNAc/NeuAc en espermatozoides obtenidos de testículo y extratesticulares por citometría de flujo. Las barras indican la distribución de los datos respecto a la media. No se registraron diferencias estadísticas, $p = 0.287587$ (U de *Mann-Whitney*, $n=7$ ranas).

Para la distribución de la manosa en la membrana de las células espermáticas, se hallaron tres patrones distintos, registrándose diferencias significativas en cada caso (Fig. 7), dos de éstos patrones se presentaron en el testículo, en el primero se observa una distribución de la manosa en la cabeza del espermatozoide, particularmente en la región acrosomal y la pieza media en el 18 % de los espermatozoides, el segundo patrón encontrado igualmente en testículo fue el más abundante con un 50 % de los espermatozoides con un marcaje distribuido por toda la cabeza, pero con una fluorescencia más evidente en región acrosomal, ninguno de éstos dos patrones se presentó en la región extratesticular. Por otro lado para el caso de los espermatozoides extratesticulares, el 25 % de ellos presentó un patrón de distribución en toda la cabeza del espermatozoide pero sin ningún sitio específico de marcaje.

Estos resultados difieren con los reportados por Navaneetham *et al.*, (1996), quienes localizaron la presencia de manosa en la región acrosomal de espermatozoides eyaculados de diferentes especies de mamíferos. Los patrones de distribución de manosa en este estudio, también difieren de lo reportado (Nicolson y Yanagimachi, 1972), quienes mencionan que no existen modificaciones en la distribución de este carbohidrato en la membrana plasmática de los espermatozoides durante su paso por las estructuras de transporte y de los espermatozoides eyaculados. En éste estudio se evidenció mediante microscopía de fluorescencia, que la distribución de los residuos de manosa en la membrana de los espermatozoides cambia después de que éstos abandonan el testículo.

El índice de fluorescencia de manosa no presentó diferencias significativas de este carbohidrato entre las dos regiones (Fig. 8), sin embargo, se observa una ligera tendencia al aumento de éste carbohidrato en los espermatozoides extratesticulares con respecto a los espermatozoides testiculares.

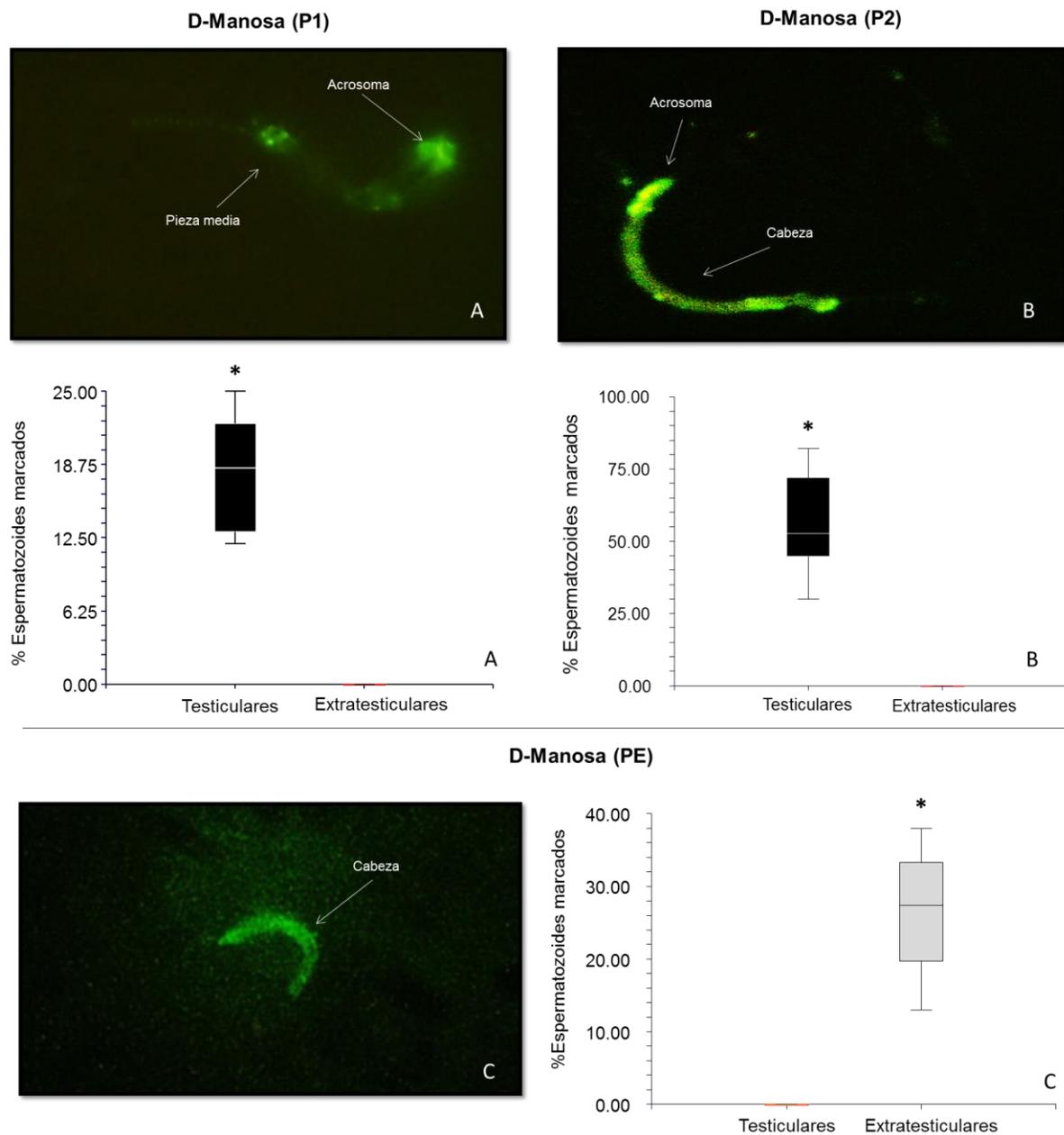


Fig. 8. Patrones de distribución y porcentajes de espermatozoides marcados con D-Manosa. **A** y **B.** Patrón testicular y porcentajes registrados en testículo y en espermatozoides extratesticulares (P1 y P2). **C.** Patrón de distribución y porcentaje registrado en testículo y en espermatozoides extratesticulares (PE) de *X. laevis*. Las barras indican la distribución de los datos observados con respecto a la media. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre regiones (T de *Student-Welch*, $p < 0.05$, $n = 7$ ranas).

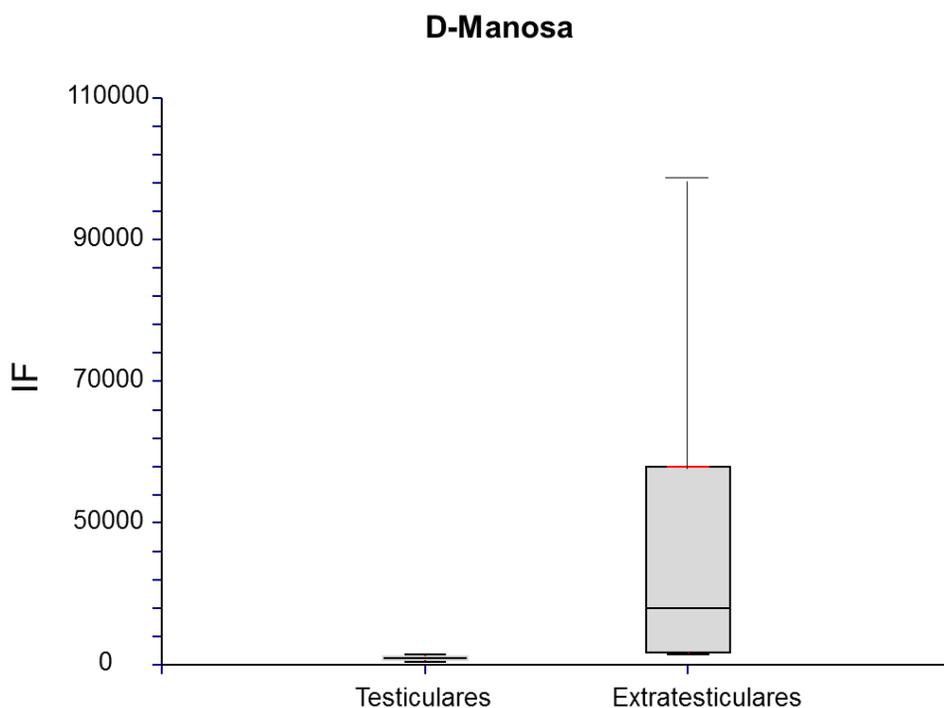


Fig. 9. Índice de fluorescencia registrado para D-Manosa en espermatozoides obtenidos de testículo y extratesticulares por citometría de flujo. Las barras indican la distribución de los datos respecto a la media. No se presentaron diferencias estadísticas, $p= 0.99847$ (U de *Mann-Whitney*, $n=7$ ranas).

En lo que respecta a los resultados de la distribución de fucosa en la membrana de los espermatozoides (Fig. 9), se observó la presencia de éste carbohidrato únicamente en espermatozoides de testículo, con sitios de marcaje en la pieza media, mientras que en el caso de los espermatozoides extratesticulares no se registró ningún patrón de distribución, ya que la fucosa no pudo detectarse mediante microscopía de fluorescencia. El índice de fluorescencia (IF) en los espermatozoides marcados con fucosa, reflejó una disminución significativa de éste carbohidrato en los espermatozoides extratesticulares en relación con los espermatozoides de testículo (Fig. 10).

Este resultado coincide con lo descrito por Jimenez *et al.*, (2003), quien reporta un marcaje negativo de fucosa en espermatozoides eyaculados de mamíferos, sin

embargo, los resultados de este estudio se contraponen a lo reportado por (Fierro *et al.*, 1996) y por (Schroter *et al.*, 1999), quienes establecen que la presencia de fucosa en espermatozoides está vinculada con el reconocimiento primario del gameto femenino y en especies como el verraco y el humano la presencia de fucosa en la membrana de los espermatozoides extratesticulares es importante.

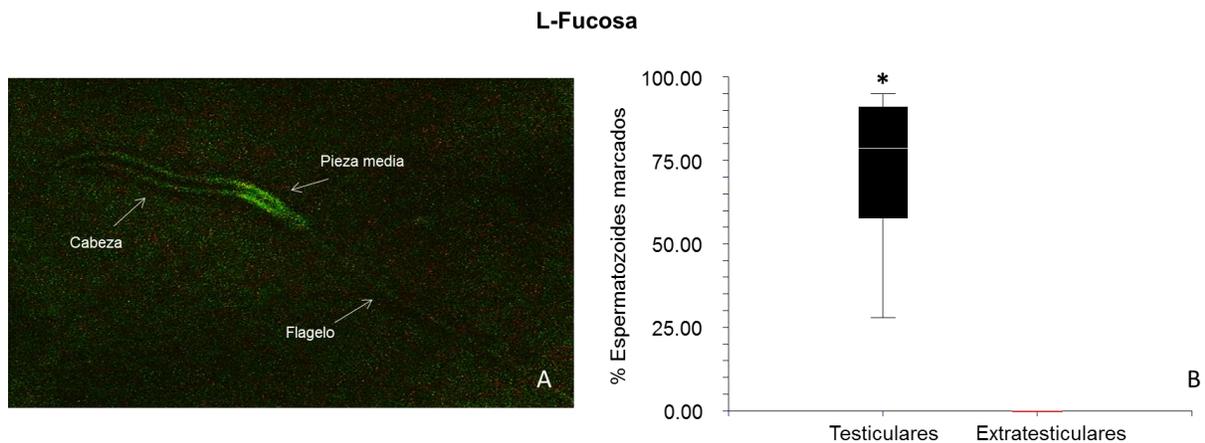


Fig. 10. Patrón de distribución y porcentaje de espermatozoides marcados con L-Fucosa. **A.** Patrón de distribución. **B.** Porcentaje registrado en testículo y en espermatozoides extratesticulares de *X. laevis*. Las barras indican la distribución de los datos observados con respecto a la media. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre regiones (T de *Student-Welch*, $p < 0.05$, $n = 7$ ranas).

A partir de los resultados observados en éste estudio, se puede deducir que los espermatozoides de *X. laevis* se someten a modificaciones bioquímicas posttesticulares en su membrana plasmática, lo que conlleva a la presencia y ausencia de determinados carbohidratos en diferentes regiones de ésta a medida que los espermatozoides avanzan por el tracto reproductor, esto posiblemente como respuesta a la interacción de los espermatozoides con el tejido y/o el fluido de los conductos de transporte espermático del sistema reproductor.

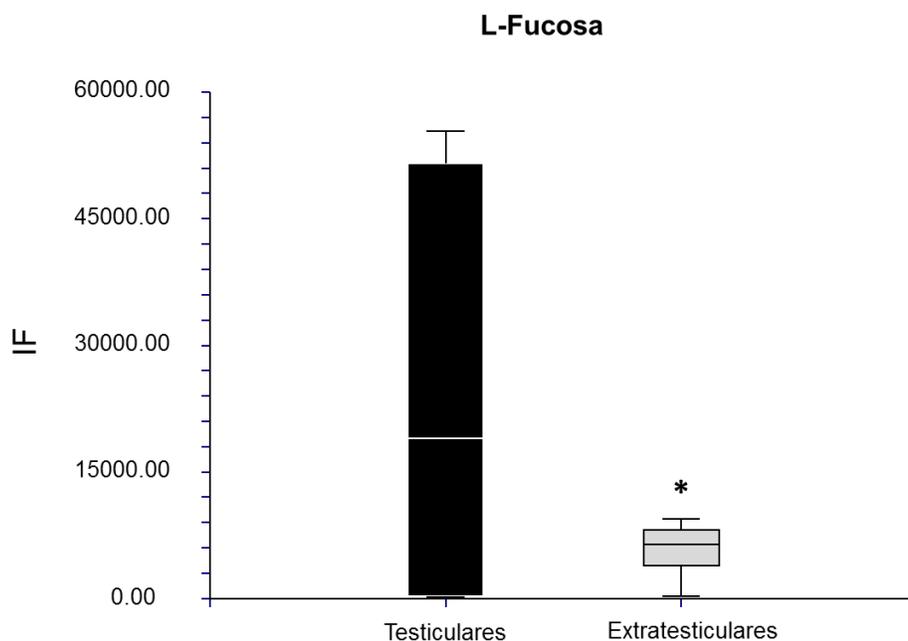


Fig. 11. Índice de fluorescencia registrado para L-Fucosa en espermatozoides obtenidos de testículo y extratesticulares por citometría de flujo. Las barras indican la distribución de los datos respecto a la media. El asterisco indica diferencias estadísticas (U de *Mann-Whitney* $p < 0.05$, $n = 7$ ranas).

La presencia y ausencia de GlcNAc/NeuAc, D-manosa y L-fucosa en diferentes regiones de la membrana plasmática de los espermatozoides de *X. laevis* indica la relevancia de dichos carbohidratos en la fisiología de las células espermáticas, es decir, juegan un papel fundamental que resulta en el reconocimiento, unión y fusión exitosos de los gametos derivado de una maduración posttesticular. Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de que una modificación postraduccional como la glicosilación en los espermatozoides es un proceso que evolutivamente se ha conservado en los diferentes grupos de vertebrados, también se considera un proceso especie-específico y esto conlleva a que la presencia, localización y cantidad de la gama de residuos de carbohidratos en la membrana plasmática de los espermatozoides presente una amplia diversidad de arreglos, así como diferencias en las funciones en las que cada uno de éstos carbohidratos está involucrado en la fisiología espermática de cada especie (Nagai *et al.*, 2009). Se espera que futuras investigaciones relacionadas a éste campo

ayuden a dilucidar y ampliar el conocimiento sobre las modificaciones bioquímicas postesticulares que experimentan los espermatozoides de vertebrados inferiores.

En lo que corresponde a los resultados del estudio de la ultraestructura de los espermatozoides de *X. laevis*, se analizaron cortes transversales de la región terminal del manchete mitocondrial de los espermatozoides, donde se apreciaba el núcleo rodeado por las mitocondrias (anillo mitocondrial), se observó que no hubo una reducción en el área de la región del anillo mitocondrial de los espermatozoides extratesticulares con respecto a los espermatozoides testiculares (Fig. 11). No obstante, se registró una ligera disminución del área de la región del núcleo de los espermatozoides extratesticulares en relación con los espermatozoides de testículo, aunque no se presentaron diferencias significativas (Fig. 12).

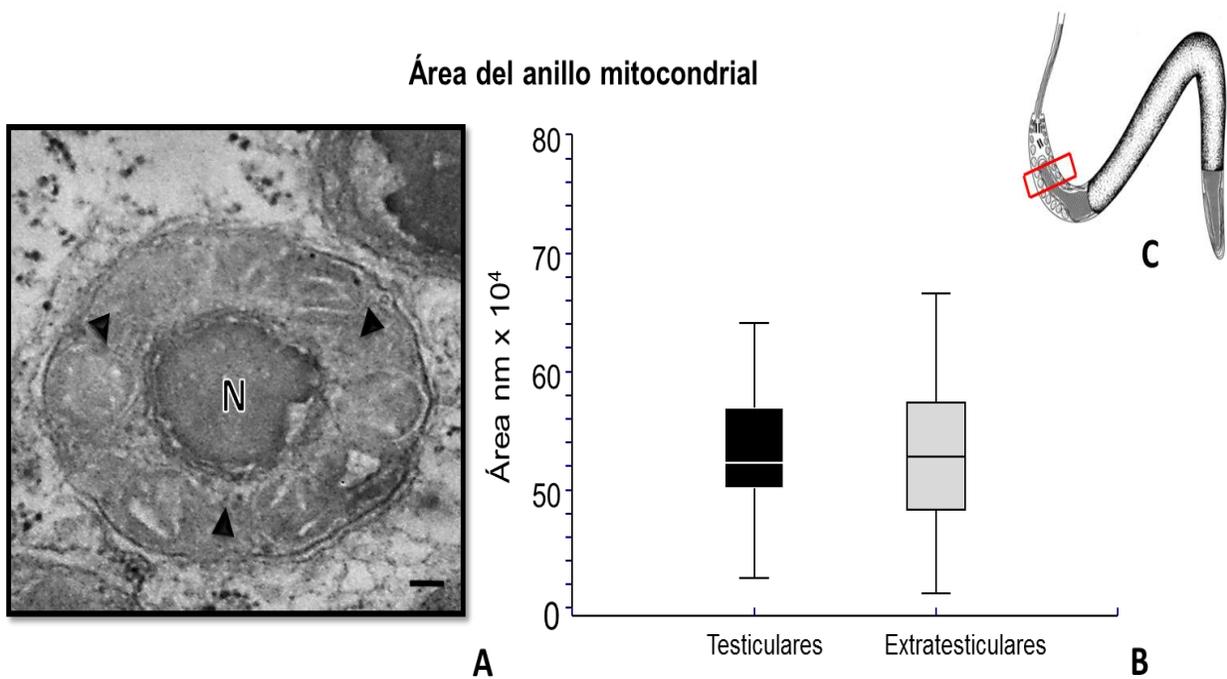


Fig. 12. **A.** Microfotografía de corte transversal de la sección terminal del manchete mitocondrial de espermatozoide de *X. laevis* (**C**). N=núcleo, las flechas indican la región del área del anillo mitocondrial, (la barra indica 100 nm x50000, MET). **B.** Área, de la región del anillo mitocondrial, de espermatozoides de testículo y espermatozoides externos de *X. laevis*, las barras indican la distribución de los datos con respecto a la media, nm=nanómetros. No se registraron diferencias estadísticas $p= 0.27219$. (U de Mann-Whitney $n= 7$ ranas).

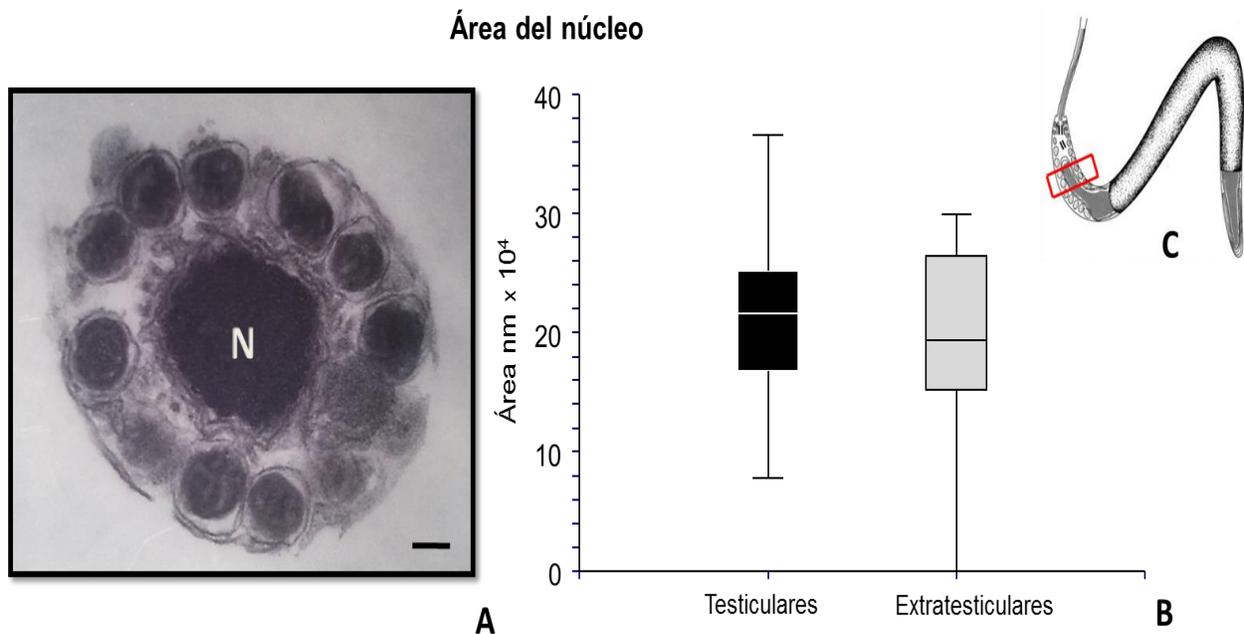


Fig. 13. A. Microfotografía de corte transversal de la sección terminal del manchete mitocondrial de espermatozoide de *X. laevis* (**C**). N=núcleo, (la barra indica 100 nm x50000, MET). **B.** Área, de la región del núcleo, de espermatozoides de testículo y espermatozoides externos de *X. laevis*, las barras indican la distribución de los datos con respecto a la media, nm=nanómetros. No se registraron diferencias estadísticas $p= 0.25766$. (T de Student, $n= 7$ ranas).

Este último resultado coincide con lo que se ha reportado acerca de las modificaciones morfológicas de los espermatozoides durante su paso por el epididímo, ya que se sabe que éstos cambios involucran un incremento en el grado de condensación de la cromatina espermática en los espermatozoides de vertebrados mamíferos (Meistrich *et al.*, 1976, Kosower *et al.*, 1992).

En los testículos, el proceso de desarrollo y maduración de los espermatozoides depende de la formación de enlaces disulfuro en las proteínas estructurales, durante las etapas posteriores a la espermiogénesis, las mitocondrias se unen a proteínas de la región de las fibras densas del axonema y la estructura se estabiliza mediante

numerosos enlaces disulfuro en varias proteínas (Sutovsky *et al.*, 1997, Su *et al.*, 2005). En el núcleo de las espermátidas, la cromatina se condensa y las histonas son reemplazadas por protaminas, las cuales son estabilizadas mediante puentes disulfuro; como resultado de éste y otros procesos, las estructuras nucleares y accesorias de los espermatozoides maduros se mantienen afianzadas debido a éstos enlaces disulfuro intra e intermoleculares específicos que se conservan en el espermatozoide hasta el momento de la fertilización (Sutovsky *et al.*, 1997).

Posteriormente, se incrementa el grado de condensación y de resistencia a la desnaturalización durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo debido a la reticulación de proteínas (Seligman *et al.*, 1994, Su *et al.*, 2005). Con base en los resultados arrojados al estudiar el área de la cromatina, se puede inferir que los espermatozoides de *X. laevis*, que si bien, es un vertebrado que carece de una estructura epididimaria, se puede estar llevando a cabo un proceso de maduración posttesticular que favorezca un endurecimiento de las estructuras espermáticas que impide que el producto hipercondensado (cromatina), sufra una descondensación precoz, lo que conlleva a una reducción en el área del núcleo debido al incremento del grado de condensación, muy similar a lo que ocurre en vertebrados superiores.

Sin embargo, es necesario que se realicen más estudios que complementen la información que se ha obtenido hasta ahora y que ayuden a incrementar el conocimiento y a esclarecer con mayor precisión si existen más cambios posttesticulares en la fisiología y la morfología de espermatozoides de Anfibios Anuros, en conjunto, éste conocimiento podrá aportar información útil para aplicación de métodos de reproducción animal asistida, enfocada hacia la ciencia básica y la conservación de especies de Anfibios Anuros mexicanos.

8.- CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos se puede concluir que en los espermatozoides de *Xenopus laevis*, es requisito la modificación en la distribución de residuos de carbohidratos cuando éstos abandonan el testículo; y no así la reducción en el área del núcleo o el área de la región del anillo mitocondrial.

9.- PERSPECTIVAS

En ésta investigación, se comprobó que existe una redistribución posttesticular de los residuos de carbohidratos presentes en la membrana de los espermatozoides de *Xenopus laevis*, lo que sugiere la presencia de modificaciones bioquímicas que posiblemente beneficien la capacidad fertilizante de los espermatozoides. No obstante, hace falta realizar estudios que complementen la información expuesta aquí, uno de ellos es la fertilización *in vitro* con espermatozoides testiculares y extratesticulares para determinar la capacidad fertilizante que tienen e integrar esa información con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Además queda la posibilidad de continuar con el estudio de la distribución de los residuos de carbohidratos durante la capacitación espermática y analizar qué glicanos están presentes durante dicho proceso, esto con el propósito de extender el análisis de las modificaciones en los carbohidratos una vez que los espermatozoides se encuentran en un medio externo.

También resulta importante llevar a cabo estudios relacionados con la actividad enzimática de fucosil, manosil y sialil transferasas en el tracto reproductor de *X. laevis*, para determinar el sitio en donde se está llevando a cabo la modificación en la distribución de los carbohidratos de la membrana de los espermatozoides. Todo esto

con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre la fisiología espermática de anuros y contribuir con información valiosa que ayude a generar protocolos en reproducción asistida en especies de anfibios anuros amenazadas

10.- ANEXO

10.1.- Reactivos y soluciones

Reactivos

Polilisina (0.1 %), Eosina-Nigrosina (Eosina 1 %; nigrosina 10 %), Hematoxilina de Harris, eosina, Lectinas dilución 1:50 WGA (*Triticum vulgare*), ConA (*Concavalina ensiformis*) y UEA (*Ulex europeus*), OsO₄, C₂H₃N.

Soluciones.

Ringer modificado para anfibios (SAR) (Browne et al., 2002) (NaCl 113.0 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 2.0 mM y NaHCO₃ 3.6 mM).

Fijador paraformaldehído (4 %)

Fijador Karnovsky (paraformaldehído al 2 %, glutaraldehído al 0.5 % y buffer de fosfatos)

Fijador Glutaraldehído 3%, PBS 1M

Buffer de fosfatos 1 M (Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄)

PBS (Phosphate-buffered Saline) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM).

Tinción Hematoxilina-Eosina

Colorante específico para tejidos animales.

- 1) Desparafinar (Xilol 3 min)
- 2) Hidratar los cortes (baños de alcohol decreciente)
- 3) Tinción (Hematoxilina 5 min)
- 4) Lavados
- 5) Diferenciar (alcohol ácido)
- 6) Virar
- 7) Tinción (Eosina 4 min)
- 8) Deshidratación (baños crecientes de alcohol hasta llegar a 100%)

Aclarar (Xilol 1 min)

11. - LITERATURA CITADA

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. 1996. *Biología Molecular de la Célula Ediciones Omega. SA, Barcelona.*
- AMANN, R. & SCHANBACHER, B. 1983. Physiology of male reproduction. *Jour An Sci*, 57, 380-403.
- ANDERSSON, M. & IWASA, Y. 1996. Sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 53-58.
- ASENJO, A., SIU-TING, K. & PINO, J. 2011. Morfometría de testículos y células germinales de *Allobates femoralis* (Boulenger 1883)(Dendrobatidae: Anura: Amphibia). *The Biologist*, 9, 167-175.
- BEDFORD, J. M. 1968. Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. *Am J Anat*, 123, 329-58.
- BEESELEY, S. G., COSTANZO, J. P. & LEE, R. E. 1998. Cryopreservation of spermatozoa from freeze-tolerant and -intolerant anurans. *Cryobiology*, 37, 155-62.
- BERNARDINI, G., STIPANI, R. & MELONE, G. 1986. The ultrastructure of *Xenopus* spermatozoon. *Journal of ultrastructure and molecular structure research*, 94, 188-194.
- BHADURI, J. & BASU, S. 1957. *A study of the urinogenital system of Salientia. Part I, Ranidae and Hyperoliidae of Africa*, Musée Royal du Congo Belge.
- BLÜM, V. 1986. Comparative Anatomy of the Urogenital System. *Vertebrate Reproduction: A Textbook*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- BROWNE, R. K., MAHONY, M. & CLULOW, J. 2002. A comparison of sucrose, saline, and saline with egg-yolk diluents on the cryopreservation of cane toad (*Bufo marinus*) sperm. *Cryobiology*, 44, 251-7.
- COLLINS, J. P. & STORFER, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and distributions*, 9, 89-98.
- COOPER, T. G. 2007. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl*, 9, 533-9.

- CYNTHIA, P. D. A., UETANABARO, M. & HADDAD, C. F. 2005. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 26, 211-221.
- DE OLIVEIRA, C., ZANETONI, C. & ZIERI, R. 2002. MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS ON THE TESTES OF *Physalaemus cuvieri* (AMPHIBIA, ANURA). *Revista Chilena de Anatomía*, 20, 263-268.
- DIEKMAN, A. B. 2003. Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60, 298-308.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1994. *Biology of amphibians*, JHU press.
- EDDY, E. M. 2006. The Spermatozoon. In: NEILL, J. D. (ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3era ed.
- EMLEN, S. T. & ORING, L. W. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197, 215-23.
- FABREGA, A., PUIGMULE, M., BONET, S. & PINART, E. 2012. Epididymal maturation and ejaculation are key events for further in vitro capacitation of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 78, 867-77.
- FAWCETT, D. W. & PHILLIPS, D. 1969. Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*, 6, 405-418.
- FIERRO, R., FOLIGUET, B., GRIGNON, G., DANIEL, M., BENE, M. C., FAURE, G. C. & BARBARINO-MONNIER, P. 1996. Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch Androl*, 36, 187-96.
- FLESCHE, F. M. & GADELLA, B. M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*, 1469, 197-235.
- FROST, D. R. 2016. Amphibian species of the World: an online reference. Version 5.6 Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. ed. American Museum of Natural History, New York, USA.

- GARDA, A. A., COLLI, G. R., AGUIAR-JÚNIOR, O., RECCO-PIMENTEL, S. M. & BÁO, S. N. 2002. The ultrastructure of the spermatozoa of *Epipedobates flavopictus* (Amphibia, Anura, Dendrobatidae), with comments on its evolutionary significance. *Tissue and Cell*, 34, 356-364.
- GRASSÉ, P. P. 1978. *Vertebrados: reproducción, biología, evolución y sistemática: agnatos, peces, anfibios y reptiles*, Toray-Masson.
- HARDY, M. P. & DENT, J. N. 1986. Regulation of motility in sperm of the red-spotted newt. *J Exp Zool*, 240, 385-96.
- HIRAGOND, N. & SAIDAPUR, S. 2000. The excurrent duct system of sperm transport in *Rana cyanophlyctis*, *Rana limnocharis*, *Polypedates maculatus*, *Microhyla rubra*, *Bufo melanostictus* and *Bufo fergusonii*. *Zoological Science*, 17, 453-458.
- HUANG, Y., CHUNG, Y. W. & WONG, P. Y. 1999. Potassium channel activity recorded from the apical membrane of freshly isolated epithelial cells in rat caudal epididymis. *Biol Reprod*, 60, 1509-14.
- INODA, T. & MORISAWA, M. 1987. Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 88, 539-542.
- IWASAWA, H. & MICHIBATA, H. 1972. Comparative morphology of sperm storage portion of Wolffian duct in Japanese anurans. 45, 218-233.
- JAMIESON, B. G., LEE, M. S. & LONG, K. 1993. Ultrastructure of the spermatozoon of the internally fertilizing frog *Ascaphus truei* (Ascaphidae: Anura: Amphibia) with phylogenetic considerations. *Herpetologica*, 52-65.
- JIMENEZ, I., GONZALEZ-MARQUEZ, H., ORTIZ, R., HERRERA, J. A., GARCII, A., BETANCOURT, M. & FIERRO, R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 1171-80.
- KOCH, R. A. & LAMBERT, C. C. 1990. Ultrastructure of sperm, spermiogenesis, and sperm-egg interactions in selected invertebrates and lower vertebrates which use external fertilization. *J Electron Microsc Tech*, 16, 115-54.
- KOSOWER, N. S., KATAYOSE, H. & YANAGIMACHI, R. 1992. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl*, 13, 342-8.

- KRAPF, D., O'BRIEN, E. D., CABADA, M. O., VISCONTI, P. E. & ARRANZ, S. E. 2009. Egg Water from the Amphibian *Bufo arenarum* Modulates the Ability of Homologous Sperm to Undergo the Acrosome Reaction in the Presence of the Vitelline Envelope. *Biology of Reproduction*, 80, 311-319.
- KUMAR, G. P., LALORAYA, M., AGRAWAL, P. & LALORAYA, M. M. 1990. The involvement of surface sugars of mammalian spermatozoa in epididymal maturation and in vitro sperm-zona recognition. *Andrologia*, 22, 184-94.
- LEÓN-GALVAN, M. A., FONSECA, T., LÓPEZ-WILCHIS, R. & ROSADO, A. 1999. Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Canadian journal of zoology*, 77, 7-12.
- LEWIS, B. & AITKEN, R. J. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biol Reprod*, 64, 1545-56.
- MARTINEZ-MENARGUEZ, J. A., AVILES, M., MADRID, J. F., CASTELLS, M. T. & BALLESTA, J. 1993. Glycosylation in Golgi apparatus of early spermatids of rat. A high resolution lectin cytochemical study. *Eur J Cell Biol*, 61, 21-33.
- MEISTRICH, M. L., REID, B. O. & BARCELLONA, W. J. 1976. Changes in sperm nuclei during spermiogenesis and epididymal maturation. *Experimental Cell Research*, 99, 72-78.
- MORISAWA, M., SUZUKI, K., SHIMIZU, H., MORISAWA, S. & YASUDA, K. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Biol*, 107, 95-103.
- NAGAI, K., ISHIDA, T., HASHIMOTO, T., HARADA, Y., UENO, S., UEDA, Y., KUBO, H. & IWAQ, Y. 2009. The Sperm-surface glycoprotein, SGP, is necessary for fertilization in the frog, *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ*, 51, 499-510.
- NAVANEETHAM, D., SIVASHANMUGAM, P. & RAJALAKSHMI, M. 1996. Changes in binding of lectins to epididymal, ejaculated, and capacitated spermatozoa of the rhesus monkey. *Anat Rec*, 245, 500-8.
- NAZ, R. K. & RAJESH, P. B. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 2, 75-75.
- NICANDER, L. & BANE, A. 1966. Fine structure of the sperm head in some mammals, with particular reference to the acrosome and the subacrosomal substance. *Cell and Tissue Research*, 72, 496-515.

- NICOLSON, G. L. & YANAGIMACHI, R. 1972. Terminal saccharides on sperm plasma membranes: identification by specific agglutinins. *Science*, 177, 276-9.
- O'BRIEN, E. D., KRAPP, D., CABADA, M. O., VISCONTI, P. E. & ARRANZ, S. E. 2011. Transmembrane adenylyl cyclase regulates amphibian sperm motility through protein kinase A activation. *Dev Biol*, 350, 80-8.
- OGIELSKA, M. 2009. Reproduction of amphibians.
- PARRA-OLEA, G., FLORES-VILLELA, O. & MENDOZA-ALMERALLA, C. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 460-466.
- PELAEZ, J. & LONG, J. A. 2007. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: I. Identification and distribution of carbohydrate residues using flow cytometry and epifluorescence microscopy. *J Androl*, 28, 342-52.
- PEROTTI, M. E. & PASINI, M. E. 1995. Glycoconjugates of the surface of the spermatozoa of *Drosophila melanogaster*: a qualitative and quantitative study. *J Exp Zool*, 272, 311-8.
- ROBAIRE, B., HINTON, B. T. & ORGEBIN-CRIST, M.-C. 2006. The Epididymis. In: NEILL, J. D. (ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3 era ed.
- ROJAS, M. V. & ESPONDA, P. 2001. Plasma membrane glycoproteins during spermatogenesis and in spermatozoa of some fishes. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 33, 133-40.
- SÁEZ, F. J., MADRID, J. F., APARICIO, R., LEIS, O. & OPORTO, B. 1999. Lectin histochemical localization of N- and O-linked oligosaccharides during the spermiogenesis of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Glycoconjugate journal*, 16, 639-648.
- SANZ-UCHOTORENA, A., SEGURA-VALDÉS, M. D. L., RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Y., LARA-MARTÍNEZ, R. & JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F. 2008. Estructura y ultraestructura de la gónada de los machos de *Bufo fustiger* (Anura: Bufonidae). *Tip. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11.
- SATO, T. & GOSHIMA, S. 2006. Impacts of male-only fishing and sperm limitation in manipulated populations of an unfished crab, *Hapalogaster dentata*. *Marine Ecology Progress Series*, 313, 193-204.

- SCHAEFFER, D. O. 1997. Chapter 15 - Anesthesia and Analgesia in Nontraditional Laboratory Animal Species A2 - Kohn, Dennis F. *In: WIXSON, S. K., WHITE, W. J. & BENSON, G. J. (eds.) Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* ABREVIAR LA REVISTA. San Diego: Academic Press.
- SCHELTINGA, D. M., JAMIESON, B. G., EGGERS, K. E. & GREEN, D. M. 2001. Ultrastructure of the spermatozoon of *Leiopelma hochstetteri* (Amphibia, Anura, Leiopelmatidae). *Zoosystema*, 23, 157-171.
- SCHROTER, S., OSTERHOFF, C., MCARDLE, W. & IVELL, R. 1999. The glycocalyx of the sperm surface. *Hum Reprod Update*, 5, 302-13.
- SELIGMAN, J., KOSOWER, N. S., WEISSENBERG, R. & SHALGI, R. 1994. Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J Reprod Fertil*, 101, 435-43.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. 1995. Biometry: the principles of statistics in biological research. New York, NY: WH Freeman and Co.
- SOSTARIC, E., AALBERTS, M., GADELLA, B. M. & STOUT, T. A. 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim Reprod Sci*, 107, 237-48.
- SU, D., NOVOSELOV, S. V., SUN, Q. A., MOUSTAFA, M. E., ZHOU, Y., OKO, R., HATFIELD, D. L. & GLADYSHEV, V. N. 2005. Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem*, 280, 26491-8.
- SULLIVAN, R., FRENETTE, G. & GIROUARD, J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*, 9, 483-91.
- SUTOVSKY, P., TENGOWSKI, M. W., NAVARA, C. S., ZORAN, S. S. & SCHATTEN, G. 1997. Mitochondrial sheath movement and detachment in mammalian, but not nonmammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. *Mol Reprod Dev*, 47, 79-86.
- TECLE, E. & GAGNEUX, P. 2015. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol Reprod Dev*, 82, 635-50.
- UEDA, Y., YOSHIKAWA, N. & IWAO, Y. 2002. Acrosome Reaction in Sperm of the Frog, *Xenopus laevis*: Its Detection and Induction by Oviductal Pars Recta Secretion. *Developmental Biology*, 243, 55-64.

- VALBUENA, G., ALONSO, E., DIAZ-FLORES, L., JR., MADRID, J. F. & SAEZ, F. J. 2011. Identification of N-acetylgalactosamine in carbohydrates of *Xenopus laevis* testis. *Anat Rec (Hoboken)*, 294, 363-71.
- VALBUENA, G., ALONSO, E., UBAGO, M. M., MADRID, J. F., DÍAZ-FLORES, L. & SÁEZ, F. J. 2012. Histochemical identification of sialylated glycans in *Xenopus laevis* testis. *Jour Anat*, 221, 318-330.
- VALBUENA, G., MADRID, J. F., HERNANDEZ, F. & SAEZ, F. J. 2010. Identification of fucosylated glycoconjugates in *Xenopus laevis* testis by lectin histochemistry. *Histochem Cell Biol*, 134, 215-25.
- VARKI, A. & SCHAUER, R. 2009. Sialic Acids. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. & ETZLER, M. E. (eds.) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.
- VILLAGRÁN SANTACRUZ, M. 2013. El huevo amniota y la evolución de los vertebrados. *Ciencias*, 007.
- WAKE, D. B. & VREDENBURG, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11466-11473.
- WELLS, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25, Part 3, 666-693.
- WHO 2010. *World Health Organization-Laboratory manual for the examination and processing of human semen-5th ed.*
- WOLF, D. P. & HEDRICK, J. L. 1971. A molecular approach to fertilization. *Developmental Biology*, 25, 348-359.
- YEUNG, C. H., COOPER, T. G., OBERPENNING, F., SCHULZE, H. & NIESCHLAG, E. 1993. Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol Reprod*, 49, 274-80.
- YOUNG, B. E., STUART, S. N., CHANSON, J. S., COX, N. A. & BOUCHER, T. M. 2004. Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el Nuevo Mundo. Arlington, Va.: NatureServe.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 08040

Matrícula: 2143800679

Distribución de carbohidratos de la membrana plasmática y modificaciones ultraestructurales de los espermatozoides de la rana *Xenopus laevis* como indicadores de una posible maduración espermática en anfibios anuros.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 20 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR
DR. MARIO GARCIA LORENZANA
MTRO. MATIAS MARTINEZ CORONEL
DR. GERARDO FIGUEROA LUCERO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: IRENI ABIZADAY FRAGOSO HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

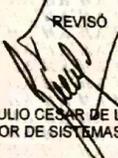
Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



IRENI ABIZADAY FRAGOSO HERNANDEZ
ALUMNA

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



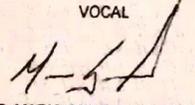
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA



DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

VOCAL



DR. MARIO GARCIA LORENZANA

VOCAL



MTRO. MATIAS MARTINEZ CORONEL

SECRETARIO



DR. GERARDO FIGUEROA LUCERO