



Tesis Doctoral

El sistema genital masculino y el control androtrófico en un ampulárido

Presentada al Programa de Postgrado en Biología
de la Universidad Nacional de Cuyo por

Carlos Gamarra-Luques

Médico por la Universidad Nacional de Cuyo

Director: Prof. Dr. Alfredo Castro-Vazquez

Institutos afiliados:
Laboratorio de Fisiología [IHEM-CONICET] y Departamento de
Morfología y Fisiología, (Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Cuyo)



Mendoza
2006

El presente trabajo de tesis está dedicado a
mi esposa, María Belén.

Agradecimientos:

- Al Dr. Alfredo J. Castro Vazquez, director de esta tesis, por su amistad, generosa enseñanza y dirección.
- A la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por ser las instituciones en las cuales se realizó la presente tesis.
- A las autoridades y miembros del Programa del Postgrado en Biología (PROBIOL).
- A todos los integrantes del Área de Fisiología Normal de la Facultad de Ciencias Médicas y del Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), por generar un ámbito propicio y cordial de trabajo.
- A Pablo R. Martín y Alejandra “Luli” Estebenet, por su seguimiento y sugerencias.
- Al jurado de esta tesis: Pablo Penchaszadeh, Roberto Yunez y, especialmente, a Graciela Jahn por sus valiosas observaciones y continuo acompañamiento.
- A Elisa Moyano, por su cariño y respuesta incondicional a mis inquietudes.
- A mis amigos y compañeros de laboratorio, Juan Cueto, Maximiliano Giraud Billoud, Martín Godoy y Eduardo Koch; por compartir el “día a día” de este trabajo.
- A Israel Vega, por su amistad, invaluable colaboración y enseñanzas.
- A Alberto Koninckx, por su amistad, desinteresado consejo y enseñanzas.
- A mis padres, por su ejemplo y apoyo.
- A mis hermanos, por su incondicional compañía.
- A mi esposa, por su inestimable confianza.
- A mis hijos, por ser un acicate constante para mi voluntad y motivación.

Todas las personas, anteriormente enumeradas, han formado parte de una empresa que ha sido mi desvelo durante los últimos años. La participación de cada uno, y en consecuencia mi agradecimiento, excede ampliamente las pocas palabras colocadas junto a cada uno. Cada cual, desde su rol particular, fue absolutamente indispensable para que esta tesis fuera una realidad consumada. Por ello, nuevamente y convencido de que nunca será suficiente...

...Gracias totales!

Índice

I. Introducción a la biología de <i>Pomacea canaliculata</i>	7
I.1. Una nota taxonómica y biogeográfica	7
I.2. Cladística de la familia Ampullariidae	9
I.3. Características reproductivas y dimorfismo sexual	9
I.4. El apareamiento y la oviposición	11
I.5. Inversión reproductiva. Semelparidad e iteroparidad	11
I.6. Los objetivos de esta tesis	11
II. Crítica de algunas “impoteorías”	13
II.1. Algunos fenómenos ecotoxicológicos y sus “nombres de fantasía”	13
II.1.1. “Imposex”	13
II.1.2. Imposex “natural”	13
II.1.3. Las “superhembras”	15
II.2. “Impoteorías”, o la imposición a los gasterópodos de conceptos de la fisiología de los vertebrados	15
II.2.1. La teoría de la diferenciación sexual de Jost, aplicada a los gasterópodos	15
II.2.2. Las gónadas como secretoras de esteroides tróficos del aparato genital	16
III. El sistema genital masculino	19
III.1. Introducción	19
III.2. Materiales y métodos	20
III.2.1. Animales y condiciones de cultivo	20
III.2.2. Microscopía óptica y electrónica	20
III.3. Los órganos reproductivos masculinos	21
III.3.1. Testículo	21
III.3.2. Vaso deferente	22
III.3.3. Vesícula seminal	22
III.3.4. Próstata	22
III.3.5. Papila genital	25
III.3.6. Complejo peniano	25
III.3.7. Vaina peniana	27
III.4. Resumen y conclusiones	32

IV. Diferenciación sexual y trofismo genital	34
IV.1. Introducción	34
IV.2. Materiales y métodos	35
IV.2.1. Animales y condiciones de cultivo	35
IV.2.2. Estudio microscópico del desarrollo	35
IV.3. Resultados	36
IV.3.1. Crecimiento y comportamiento reproductivo de <i>Pomacea canaliculata</i> desde la eclosión a la madurez sexual	36
IV.3.2. Organogénesis reproductiva	37
IV.3.2.1. Recién eclosionados (largo de la protoconcha, 2 mm)	37
IV.3.2.2. Juveniles de 5 mm	38
IV.3.2.3. Juveniles de 10 mm	38
IV.3.2.4. Juveniles de 15 mm	41
IV.3.2.5. Adultos jóvenes de 20 mm	43
IV.3.2.6. Adultos de 25 mm	46
IV.3.2.7. Animales viejos	46
IV.4. Resumen y conclusiones	46
V. Esteroides en el sistema genital masculino	47
V.1. Introducción	47
V.2. Material y métodos	47
V.2.1. Animales	47
V.2.2. Órganos y tejidos estudiados	47
V.2.3. Extracción de esteroides	48
V.2.4. Cromatografía en capa delgada (TLC)	48
V.2.5. Radioinmunoensayos (RIAs)	49
V.2.5.1. RIA de progesterona	49
V.2.5.2. RIA de androstenodiona	49
V.2.5.3. RIA de testosterona	49
V.2.5.4. RIA de estradiol	50
V.2.6. Determinación de colesterol libre y esterificado	50
V.3. Resultados	51
V.3.1. Exploración cromatográfica de los esteroides presentes en los extractos tisulares	51
V.3.2. Cuantificación por radioinmunoensayo de los esteroides presentes en los extractos tisulares	51
V.3.3. Cuantificación del colesterol total y de su fracción esterificada en los extractos tisulares	51
V.4. Resumen y conclusiones	53

VI. ¿Un receptor de progesterona?	55
VI.1. Introducción	55
VI.2. Material y métodos	57
VI.2.1. Animales	57
VI.2.2. Obtención de las muestras	57
VI.2.3. Purificación del RNA	57
VI.2.4. Retrotranscripción	58
VI.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa	58
VI.2.6. Separación de los productos de reacción y revelado	59
VI.2.7. Clonación del segmento amplificado (326 pb) correspondiente al PR	59
VI.2.8. Control de la incorporación del vector en las colonias de <i>E. coli</i> y posterior aislamiento	60
VI.2.9. Secuenciación y comparación con bases de datos	60
VI.3. Resultados	61
VI.3.1 Expresión del PR en distintos órganos reproductivos de <i>P. canaliculata</i>	61
VI.3.2. Secuencia de bases del fragmento de DNA amplificado y clonado	61
VI. 4. Resumen y conclusiones	64
VII. Consideraciones finales	65
VIII. Bibliografía citada	72

Capítulo I

Introducción a la biología de *Pomacea canaliculata*

I.1. Una nota taxonómica y biogeográfica

Deberemos primero poner a la especie en estudio (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822, Ampullariidae) en el amplio contexto de la diversidad de los moluscos, y de los gasterópodos en particular.

Con excepción del phylum Arthropoda, cuya diversidad es realmente extraordinaria, ya que su número de especies excede largamente la mitad de todas las especies animales, el phylum Mollusca es el más diverso de los phyla del reino Animales. Dentro de este phylum, la clase Gastropoda tiene un número de especies que duplica con creces al número de especies en el phylum Chordata. Esto debe enfatizarse para ser cautelosos cuando se pretende extrapolar los hallazgos hechos en una especie de gasterópodo a otras filogenéticamente apartadas dentro de la misma clase, o más aun, a otras clases de moluscos. La Tabla **I.1** indica la posición de *P. canaliculata* en el contexto del estado actual de la rápidamente cambiante taxonomía de Gastropoda (Jeffery, 2006).

Ampullariidae (Caenogastropoda, Architaenioglossa) es una familia dulceacuícola distribuida en ambientes templados, tropicales y sub-tropicales en Africa, América (desde Florida, EE.UU., hasta el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina) y el sudeste de Asia. En la literatura anglosajona se los suele referir como “apple-snails”. Junto a los Viviparidae, también de agua dulce, integran la superfamilia Ampullarioidea. Los ampuláridos incluyen a las especies de mayor tamaño entre los gasterópodos dulceacuícolas (*Pomacea urceus* (Müller) puede alcanzar un largo de 145 mm - Burky, 1974; *P. maculata* Perry puede sobrepasar los 155 mm - Pain, 1960) y son un componente frecuente de la malacofauna de esas regiones. En los nueve géneros recientes que suelen reconocerse (Berthold, 1991) están comprendidas unas 120 especies, siendo los más politípicos *Pomacea* Perry (americano), con algo más de 50 especies, y *Pila* Röding (africano y asiático), con aproximadamente 30, y *Lanistes* (africano, incluyendo Madagascar) con 21 (Berthold, 1991).

Berthold (1989, 1991) ha dividido la familia en los Afropominae (con un solo género africano, *Afropomus* Pilsbry et Bequaert) y los Ampullariinae, subdivididos a su vez en la tribu Sauleini (un solo género africano, *Saulea* Gray, con dos especies, una de ellas fósil) y la tribu Ampullariini (que comprende el resto de la familia).

Clase	Subclase	Superorden	Orden	Superfamilia	Familia
Aplacophora					
Monoplacophora					
Polyplacophora					
Gastropoda	{ Eogastropoda Orthogastropoda	{ Cocculiniformia Neritopsina Vetigastropoda Caenogastropoda Heterobranchia	{ Architaenioglossa Sorbeoconcha	{ Cyclophoroidea	{ Ampullariidae Bellamyidae Viviparidae
Bivalvia					
Scaphopoda					
Cephalopoda					

Tabla I.1. Posición taxonómica de *Pomacea canaliculata* Lamarck 1822 en el contexto de la diversidad de los gasterópodos.

Se ha hipotetizado un origen gondwánico para la familia Ampullariidae (Berthold, 1989, 1991). Se supone que el grupo se habría originado en la parte de ese protocontinente que daría origen a África, y que se habría extendido y diversificado en las placas sudamericana e índica, sin haber alcanzado la placa australiana/antártica antes de que esta se separara de Gondwana¹. Con posterioridad al choque de la placa índica con la asiática, los ampuláridos se habrían extendido hacia el sudeste de Asia.

El género *Pomacea*, al que pertenece la especie estudiada en esta tesis, se encuentra en la mayor parte de América Central y del Sur (exceptuando Chile y sur de Argentina) y en el Caribe, con dos especies, *Pomacea paludosa* Say y *P. canaliculata* Lamarck, que se han extendido a Florida (EE.UU.). La distribución antropocórica de *P. canaliculata* al sudeste de Asia, al Japón y a la Polinesia, ha producido y produce estragos en la agricultura de esas regiones (Cowie, 2002), la invasión de esta especie, en ausencia de sus predadores naturales, la convierte en una verdadera peste de los arrozales.

I.2. Cladística de la familia Ampullariidae

Berthold (1989) y Bieler (1993) han analizado cladísticamente la familia, basándose principalmente en caracteres de la concha y del aparato copulatorio. Si bien Bieler ha criticado fuertemente el trabajo de Berthold desde el punto de vista metodológico, arriba a un cladograma muy semejante (Fig. I.1). El más reciente análisis de Simone (2004) incorpora numerosos caracteres adicionales, y en base a ellos ha cuestionado la monofilia de la superfamilia Ampullarioidea y del orden Architaenioglossa tal como hoy se los concibe (Tabla I.1). Sin embargo, las especies de Ampullariidae se entremezclan en su cladograma, que él considera provisional, ya que requeriría un mayor análisis de algunas estructuras, como el riñón y el oviducto paleal.

I.3. Características reproductivas y dimorfismo sexual

Los ampuláridos son ovíparos, dioicos y con fertilización interna. Las hembras suelen ser más grandes que los machos en algunas especies, entre ellas la que nos ocupa (Prashad, 1925; Robins, 1971; Keawjam, 1987; Marwoto, 1988; Lum-Kong y Kenny, 1989; Cazzaniga, 1990; Perera y Walls, 1996; Wada, 1997; Estebenet y Cazzaniga, 1998). Además de este dimorfismo sexual en el largo de la concha, los machos de *Pomacea canaliculata* (Cazzaniga, 1990) difieren de las hembras por la convexidad de su opérculo y las proporciones de la apertura de la concha².

Aunque se han reportado cambios de sexo (protandria) en especies de *Pila*, y quizás de *Pomacea* (Keawjam, 1987; Keawjam y Upatham, 1990) esto no ha sido confirmado por otros autores (Andrews, 1964; Estebenet y Cazzaniga, 1998; Albrecht, 1998).

¹ Alternativamente, podrían haber habido extinciones en estas placas.

² Este dimorfismo no parece estar presente en *Pomacea scalaris* y en *P. insularum* (observaciones no publicadas).

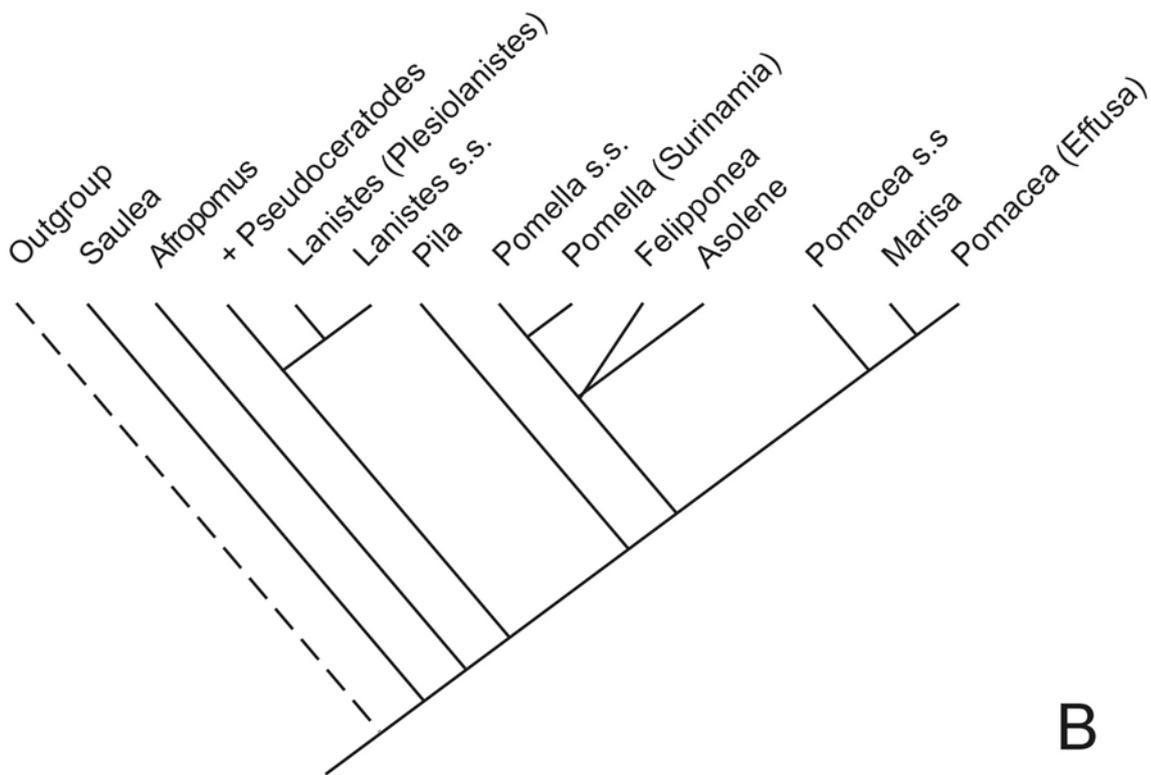
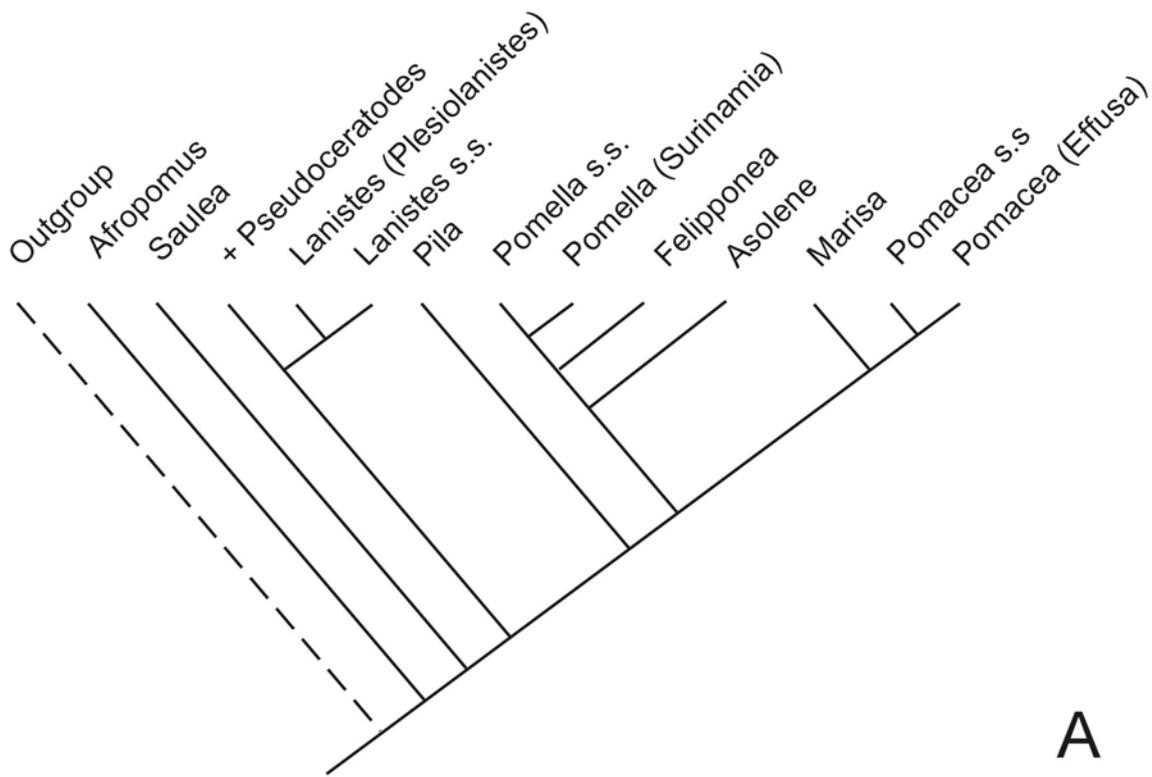


Fig. 1.1. Árboles filogenéticos de Ampullariidae de acuerdo a Berthold (1989), **A**; y de acuerdo a Bieler (1993), **B**.

I.4. El apareamiento y la oviposición

En muchas especies de ampuláridos la reproducción es estacional. En *Pomacea canaliculata* y en condiciones de disponibilidad de agua, esta ritmicidad está aparentemente ligada a los cambios de la temperatura (Albrecht *et al.*, 1998; 2005). Sin embargo, en lugares donde los cuerpos de agua se desecan estacionalmente, la falta de agua también afecta indirectamente la reproducción, ya que los caracoles se entierran en el fondo de barro, cierran firmemente su opérculo, y sobreviven así por meses, en un estado de quiescencia llamado “estivación”, hasta el retorno de la estación lluviosa.

Las especies de *Pomacea* ponen sus huevos sobre el nivel del agua³, sobre plantas, piedras u otros objetos emergentes, o sobre el suelo de la orilla. Sus puestas arracimadas tienen una cubierta calcárea y colores muy definidos (rosado, salmón, verde o blanco, según las especies). Se ha hipotetizado que el rosado brillante de las puestas de *P. canaliculata* podría tener un significado aposemático (Snyder y Snyder, 1971; Kushlan, 1978), sin embargo, esto ha sido refutado por otros (Cazzaniga, 2002). El pigmento rojo acumulado en los huevos (astaxantina, un carotenoide) está unido a una de las proteínas del perivitelo (ovorrubina, Cheesman, 1958; PV2, Heras y Pollero, 2002) y tiene un importante poder antioxidante, que sería significativo por las condiciones de stress a que son sometidos los huevos durante su incubación (Dreon *et al.*, 2006). La oviposición en *P. canaliculata* puede tomar más de una hora y ocurre principalmente durante la noche (Albrecht *et al.*, 1996).

Andrews (1964) y Albrecht *et al.* (1996) han descrito la copulación en *P. canaliculata*, la que dura 10-18 horas, y es más frecuente durante el día (Albrecht *et al.*, 1996). La copulación en animales sexualmente activos ocurre unas tres veces por semana mientras que la oviposición ocurre aproximadamente cada cinco días (Albrecht *et al.*, 1996). A 24-26 °C, la eclosión ocurre unas dos semanas después de la oviposición, postergándose con la disminución de la temperatura ambiente.

I.5. Inversión reproductiva Semelparidad e iteroparidad

A partir de los datos de Albrecht *et al.* (1996) puede calcularse que una hembra sexualmente activa pone semanalmente una masa de huevos equivalente a un 10% de su masa corporal, inversión considerable que debe ser repuesta por la ingesta de nutrientes (Castro-Vazquez *et al.*, 2002). Por su parte, la reproducción también representa para los machos una inversión energética, aunque “negativa” (Albrecht *et al.*, 2005), ya que, a diferencia de las hembras, no comen durante los largos y frecuentes episodios copulatorios (Albrecht *et al.*, 1996).

³ Los huevos de *Pila* tienen una cubierta calcárea (Prashad, 1925) y son puestos fuera del agua, al comienzo de la estación lluviosa (Prashad, 1925) en pequeñas depresiones que los caracoles practican en las orillas (Michelson, 1961; Andrews, 1964). Los huevos de *Turbinicola* también tienen una cubierta calcárea y son puestos fuera del agua, sobre piedras (Prashad, 1925). Los géneros *Asolene*, *Marisa*, y *Lanistes* ponen huevos en el agua, y están desprovistos de una cubierta calcárea (Hylton-Scott, 1958; Michelson, 1961; Robins, 1971).

En condiciones de reproducción estacional, muchos de los ejemplares nacidos en una estación reproductiva sobreviven el invierno y vuelven a reproducirse a partir de la primavera siguiente, es decir, son iteróparos. Sin embargo, Estebenet y Cazzaniga (1992) han observado que se vuelven semélparos (es decir, que muestran una sola estación reproductiva antes de morir) si se prolongan artificialmente las condiciones ambientales del verano en el laboratorio. La muerte anticipada de los animales semélparos puede estar relacionada a la sostenida inversión energética de la reproducción durante un largo período.

I.6. Los objetivos de esta tesis

Como objetivo general, el presente trabajo, pretende conducir los estudios reproductivos de *P. canaliculata* hacia un nivel organizacional definitivamente suborganísmico.

Para ello, nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Describir la anatomía microscópica del sistema genital masculino adulto de *P. canaliculata*.
2. Caracterizar el desarrollo del sistema genital desde su estado indiferenciado hasta la adultez.
3. Explorar la presencia de hormonas esteroides y su rol en el control androtrófico de los órganos sexuales masculinos.
4. Avanzar en el estudio de la expresión, distribución y caracterización de receptores para las hormonas esteroides, así como sus posibles implicancias.

Capítulo II

Crítica de algunas “impoteorías”

II.1. Algunos fenómenos ecotoxicológicos y sus “nombres de fantasía”

II.1.1. “Imposex”

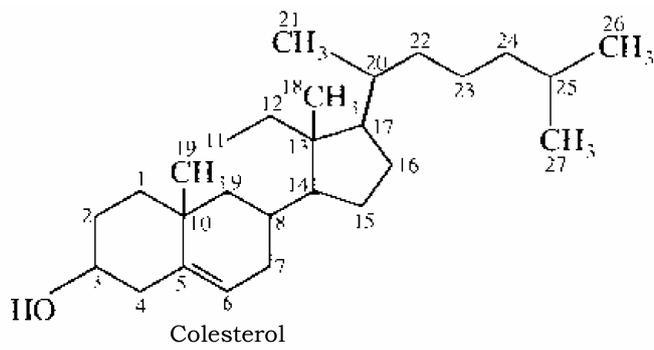
Algunos conceptos de la fisiología reproductiva de los gasterópodos han surgido de observaciones ecotoxicológicas. La observación central de todas éstas (revisadas por Oetken *et al.*, 2004) es la masculinización de los *genitalia* de las hembras por determinados tóxicos ambientales, es decir, lo que se designaría como un pseudohermafroditismo femenino en la nomenclatura común a la biología reproductiva. Curiosamente, este fenómeno ecotoxicológico en gasterópodos ha recibido un nombre de fantasía que se ha hecho camino, “imposex”, el cual parecería querer enfatizar que a la hembra se le ha impuesto un sexo que no es el propio.

Corto, eufónico, de tono reivindicatorio, este nombre ha tenido un mágico impacto y no pretenderemos cambiarlo.

II.1.2. Imposex “natural”

Un aspecto notable de su éxito ha sido que se lo utilice también para designar características normales de la hembra, como son los órganos copulatorios más o menos vestigiales que muestran las hembras de muchas especies de gasterópodos, a los que se ha designado a veces como “pseudohermafroditismo natural” o “imposex natural” (p. ej., Fioroni *et al.*, 1991), opción sin paralelo en especies mejor estudiadas, como la humana, en la que nadie hasta ahora se le ha ocurrido designar al clítoris de la mujer como un caso de pseudohermafroditismo o imposex “natural”.

El punto que queremos resaltar, no es tanto el uso de un término en particular (que tiene siempre una dosis de arbitrariedad), sino el escaso espíritu crítico que ha invadido el contexto en que se lo usa. En efecto, se ha dicho que la inducción de imposex por tributilestaño (*tributyltin*, TBT) es mediada por una inhibición de la aromatasa (Fig. II.1), deteniendo la vía de síntesis de estrógenos, resultando en una mayor producción de andrógenos (Oehlmann *et al.*, 1992; Bettin *et al.*, 1996; Oberdörster *et al.*, 1998), y que este es un caso bien substanciado del efecto de un xenobiótico sobre el sistema genital (Matthiessen y Gibbs, 1998). Nos preguntamos cómo podría serlo, si no conocemos con certeza cuáles son las hormonas tróficas del sistema genital de los gasterópodos, ni cuáles son sus enzimas de síntesis, ni los órganos, tejidos o células en que estas se expresan, o



REFERENCIAS

1. Colesterol Desmolasa (P450 scc)
2. 3 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β HSD)
3. 17 α Hidroxilasa (P450 c17)
4. 17, 20 Liasa (P450 c17)
5. Aromatasa (P450 arom)
6. 17 β Hidroxireductasa (17β HSD)

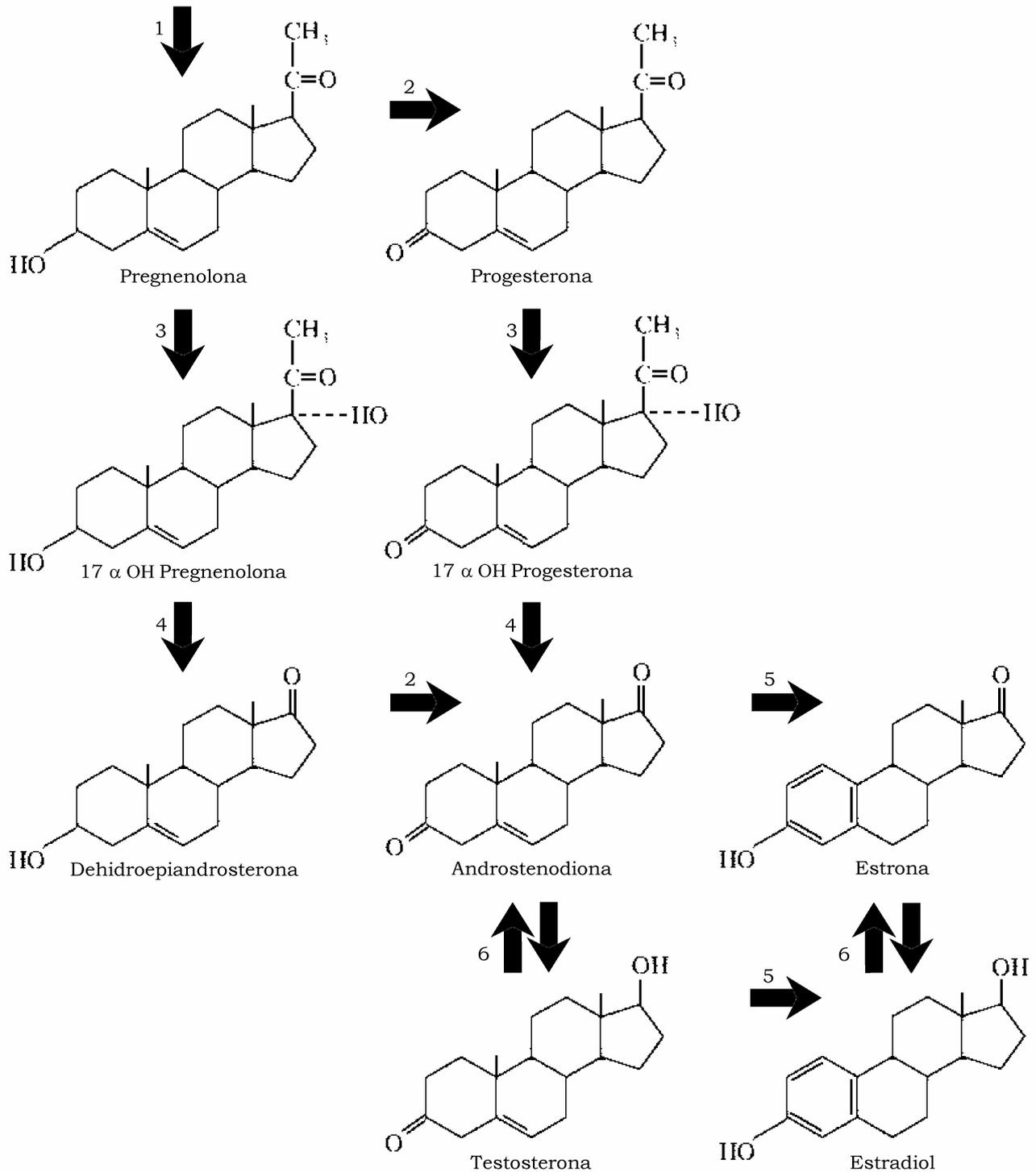


Fig. II.1. Esquema generalmente aceptado en mamíferos para la biosíntesis de esteroides a partir del colesterol, con las enzimas intervinientes.

donde se expresan los receptores hormonales. A menos que creamos que aplicar a los gasterópodos ciertos conocimientos de la endocrinología de los vertebrados sea una forma de “conocer”. En efecto, el campo parece haber sido invadido por los “metafísicos de Tlön”⁴.

II.1.3 Las “superhembras”

Y uno parece desesperar cuando hasta una investigadora por lo demás seria, como Ulrike Schulte-Oehlmann, dice y repite (Oehlmann *et al.*, 2000; Schulte-Oehlmann *et al.*, 2000; 2004; Tillmann *et al.*, 2001) que un xenobiótico causa un cuadro de “superhembras” en *Marisa cornuarietis* (Linneo 1758). En realidad, lo que quiere decir es que el bisphenol A, el octilfenol (considerados xenoestrógenos) y el etinilestradiol produjeron roturas del tracto genital femenino, que ella considera (sin probarlo) asociadas a una excesiva producción de huevos, y que en tres casos vio una aparente duplicación de la papila genital de la hembra. Está claro que decir “superhembras” causa asombro (el *desideratum* de los pensadores de Tlön), y que en nuestro planeta Tierra quizás ayude a publicar o a conseguir fondos.

Por eso, sabemos que vamos a bucear en una ciénaga, y nos moveremos con zapatones de plomo, como los buzos de antaño.

II.2. “Impoteorías”, o la imposición a los gasterópodos de conceptos de la fisiología de los vertebrados

Los mecanismos de la diferenciación sexual en los gasterópodos son poco conocidos, y no es infrecuente la aplicación acrítica a estos moluscos de esquemas conceptuales de la fisiología de los vertebrados. Analizaremos a continuación dos enfoques teóricos de este tipo, a los cuales ofreceremos alternativas en este trabajo de tesis:

II.2.1. La teoría de la diferenciación sexual de Jost, aplicada a los gasterópodos

Esta teoría tiene el mérito, para los mamíferos, de su vigencia de casi seis décadas (Jost, 1947; 1953; Jost y Magre, 1993). Se apoya en la existencia en este taxón de dos primordios genitales diferentes (ambos bilaterales, Fig. **II.2**): el conducto mesonéfrico, o de Wolff, que da origen al tracto masculino, y el conducto paramesonéfrico, o de Müller, que da origen al tracto femenino. La gónada masculina, genéticamente determinada a serlo, secreta un esteroide, que desarrolla el primordio de Wolff, y una proteína, el MIF (*Müllerian inhibiting factor*)

⁴ En el cuento “Tlön, Uqbar, Orbis Tertius”, el ingenio de Jorge Luis Borges describe un mundo fantástico (Tlön) en que los pensadores “no buscan la verdad, ni siquiera la verosimilitud: buscan el asombro”.

que produce la involución del primitivo tracto femenino. Alternativamente, el ovario no participa con ninguna influencia hormonal, y esto resulta en el desarrollo del tracto femenino y la involución del masculino. Esta teoría no es siquiera aplicable a otras clases de vertebrados (Hayes, 1998), y como no es sorprendente, tampoco a los gasterópodos, ya que no hay estudios en ellos que señalen conductos equiparables a los primordios de Wolff y Müller. Sin embargo, los efectos de xenobióticos sobre los genitales de diversos gasterópodos (y en especial, de ampuláridos: Takeda, 2000a; Oehlmann *et al.*, 2000; Schulte-Oehlmann *et al.*, 2000; Tillmann *et al.*, 2001) se han interpretado sobre la base implícita de la teoría de Jost, o de alguna variante no explicitada de la misma, calificando a estos xenobióticos ya sea como “androgénicos” o como “estrogénicos”, y suponiendo su acción sobre el equivalente de uno de los dos primordios jostianos. Veremos en la parte correspondiente nuestra reinterpretación de algunos de estos fenómenos.

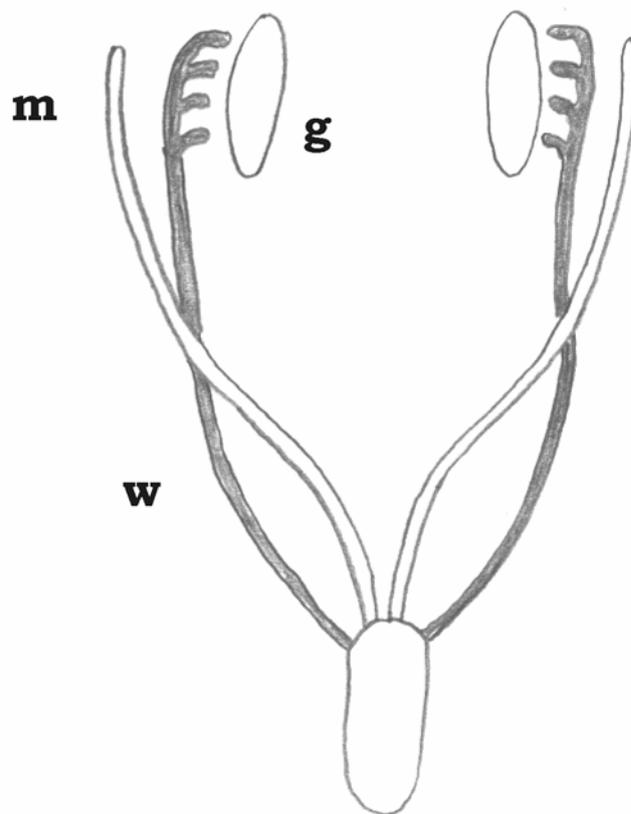


Fig. II.2. Esquema de los primordios del tracto genital en los mamíferos: **w**, conducto mesonéfrico o de Wolff; **m**, conducto paramesonéfrico o de Müller; **g**, gónada indiferenciada.

II.2.2. Las gónadas como secretoras de esteroides tróficos del aparato genital

Como ya hemos dicho, la fisiología de invertebrados está infiltrada de conceptos y términos que han sido tomados prestados, más o menos acríticamente, de la fisiología de los vertebrados. Otro de ellos es la idea, bien establecida en los mamíferos, de que la gónada es un órgano endócrino, que origina las hormonas

tróficas del tracto genital. Y más aún, que estas hormonas son necesariamente esteroides, como los son en los vertebrados.

Existen receptores intranucleares y sustancias esteroides presuntamente asociadas a ellos, tanto en moluscos como en nemátodos e insectos (D'Aniello *et al.*, 1996; Di Cosmo *et al.*, 1998; Thornton *et al.*, 2003; Novillo *et al.*, 2005), por tanto, no sería sorprendente que alguna molécula semejante, juegue un rol androtrófico en los ampuláridos (ver Cap. V). Sin embargo, también debemos considerar otras posibilidades, ya sea en cuanto a los órganos o tejidos de origen de las androtrofinas, no necesariamente gonadales, o en cuanto a la naturaleza química de estas hormonas, ya que podrían ser proteínas, péptidos, derivados de aminoácidos, etc.

En este contexto, debemos primero destacar que no se ha demostrado en el testículo de *P. canaliculata* la existencia de células intersticiales epitelioides, semejantes a las células de Leydig que producen testosterona en los mamíferos (ver Gamarra-Luques *et al.*, 2006, para la discusión de este aspecto). Por eso, en relación al origen de las androtrofinas, deben considerarse posibilidades alternativas, como que puedan ser producidas extratesticularmente, quizás por tejidos parácrinos (*e.g.*, Gamarra-Luques *et al.*, 2003). Además, también sería posible que ciertas terminaciones nerviosas pudieran generar, localmente, las androtrofinas que actúan en ese órgano blanco. Se deberán desarrollar estrategias investigativas que pongan a prueba estas hipótesis, y en este trabajo de tesis exploraremos la primera de ellas.

Otra cuestión diferente es cuál es la naturaleza química de las androtrofinas en los gasterópodos, y en los ampuláridos en particular. En los vertebrados, esas hormonas tróficas son químicamente esteroides, que son estructural y funcionalmente identificados como progestinas (esteroides de 21 carbonos), andrógenos (esteroides de 19 carbonos) y estrógenos (esteroides aromáticos de 18 carbonos) (Fig. II.1). Esos esteroides hormonales actúan a través de la unión a cinco receptores específicos (aunque estructuralmente relacionados): dos para progesterona, uno para andrógenos y dos para estrógenos.

En esta tesis, sólo usaremos esas designaciones de los esteroides en el sentido estricto arriba descrito, que se apoya en sus características químicas y en la afinidad específica de sus receptores, y admitiendo *a priori* que sus acciones en los gasterópodos podrían ser diferente a las conocidas en los vertebrados. Por su parte, también usaremos el término “androtrofina” (así como sus derivados, p.ej., “hormona androtrófica”) para referirnos, a toda sustancia hormonal que estimule el crecimiento y desarrollo de los órganos accesorios masculinos, con prescindencia de su naturaleza química. Siguiendo un criterio semejante, usaremos “gonadotrofina” para las que actúen tróficamente sobre la gónada.

Deberemos entonces preguntarnos si las androtrofinas de los ampuláridos son andrógenos (en el estricto sentido de los vertebrados), o si deben considerarse otras posibilidades. Por ejemplo, en otros cenogasterópodos (Nassariidae), se ha postulado el rol androtrófico de un neuropéptido, APGWamida (Oberdörster y McClellan-Green, 2000; 2002; Oberdörster *et al.*, 2005).

Por el contrario, las evidencias a favor de acciones androtróficas de los andrógenos en los gasterópodos son hasta ahora fragmentarias y muestran numerosos claroscuros. Por ejemplo, es llamativo que en un ampulárido (*Marisa cornuarietis*) un agonista androgénico sintético como la metiltestosterona comparte una acción androtrófica con el etinilestradiol (otro agonista sintético, pero estrogénico; Tillmann *et al.*, 2001, Schulte-Oehlmann *et al.*, 2004). Como la metiltestosterona parece ser un agonista androgénico que no se convierte a estrogénico (es decir, que es poco aromatizable), se debería considerar, entre otras posibilidades, que la especificidad de los receptores de andrógenos y de estrógenos (si es que existen así diferenciados en *Marisa*) podría ser muy distinta a la de los vertebrados.

Capítulo III

El sistema genital masculino

III.1. Introducción

La morfología gruesa del tracto genital masculino de *Pomacea canaliculata* ha sido descrita detalladamente por otros autores (Hylton-Scott, 1958; Andrews, 1964; Martín, 1980 y Thiengo *et al.*, 1993).

Este tracto está integrado (Fig. III.1) por (1) el testículo, masa blanquecina que ocupa en parte las dos o tres primeras vueltas de la espira conchiliar, (2) un espermiducto único, que se continúa a través de cuatro órganos dispuestos en serie (el vaso deferente, la vesícula seminal, la próstata y la papila genital) para desembocar finalmente en el “pozo espermático” (“sperm pit” de Andrews, 1964); y (3) por un aparato copulatorio complejo, apto para recuperar los espermatozoides desde el pozo espermático, y luego transferirlos al organismo de la hembra.

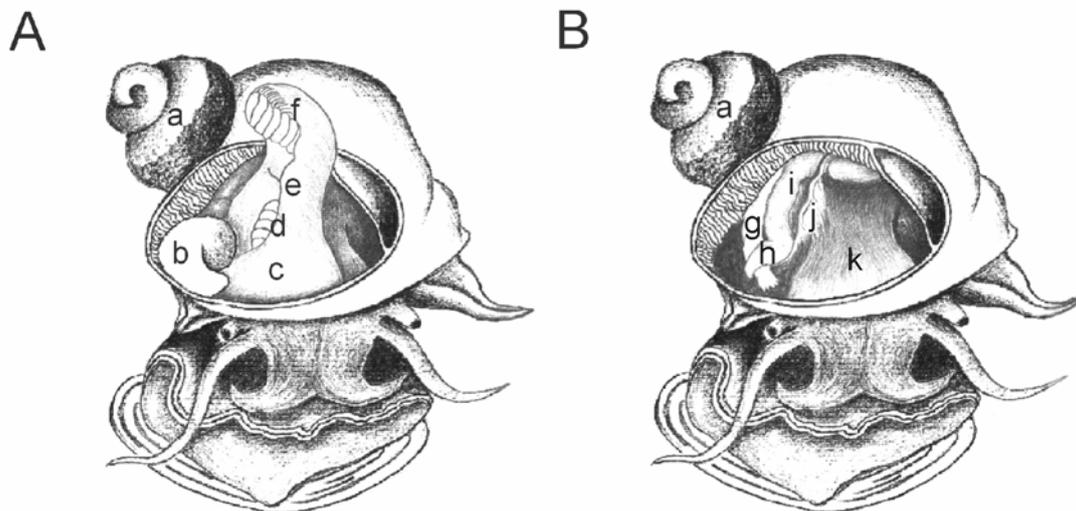


Fig. III.1. Visión esquemática de un macho maduro disecado en el cual se ha removido la conchilla. Se muestra al testículo por contraste sobre el fondo oscuro de la glándula del intestino medio; también se observan, a ambos lados de la cabeza, los repliegues nucales (el izquierdo, más desarrollado, funciona como sifón). En el panel **A** se observa el aparato copulatorio (el techo de la cavidad del manto, el ctenidio y el pulmón han sido parcialmente removidos, y por la abertura emerge la vaina peniana): **a**, testículo; **b**, complejo peniano; zona proximal de la vaina peniana, incluyendo la glándula externa (no visualizable); **c**, glándula proximal de la vaina; **d**, surco en forma de “T”; **e**, glándula distal de la vaina. El panel **B**, donde se halla removido el aparato copulatorio, muestra los órganos del piso de la cavidad del manto: **g**, recto terminal; **h**, papila genital; **i**, próstata; **j**, epitenia; **k**, nuca.

Aunque algunos autores mencionan observaciones histológicas (Andrews, 1964; Martín, 1980) la única descripción in extenso que conocemos es la de una tesis de grado no publicada (Winik, 1982). En este capítulo relataremos nuestras propias observaciones de la histología óptica del sistema genital de *P. canaliculata*, acompañada de algunas observaciones sobre la ultraestructura de los gránulos secretorios presentes en algunos órganos.

III.2. Materiales y métodos

III.2.1. Animales y condiciones de cultivo

Los animales usados en esta tesis provinieron de una línea de cultivo, derivada de ejemplares colectados en el Lago del Rosedal (Palermo, Buenos Aires, Argentina). Muestras del material original así como de la línea cultivada, están depositados en la colección del Museo Argentino de Ciencias Naturales (Buenos Aires, Argentina; lotes MACN-In 35707 y MACN-In 36046, respectivamente). La temperatura del agua y del aire circundante fue regulada a 23-25 °C, mientras que la iluminación artificial fue provista durante 14 horas diarias.

A menos que se indique lo contrario, los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta mixta compuesta de lechuga, alimento balanceado para peces y papel higiénico. Sólo se utilizaron animales que fueron observados copulando ese mismo día.

III.2.2. Microscopía óptica y electrónica

Los animales fueron sumergidos en agua a 4°C durante al menos cinco minutos (hasta lograr relajación) antes de ser sacrificados. En la mayoría de los casos se tomaron muestras (1-2 mm de espesor) de los distintos órganos estudiados, y se las fijó en los líquidos de Bouin (diluido) o de Zencker, para microscopía óptica, o de Karnovsky para microscopía electrónica. En casos especiales se muestrearon piezas más grandes, para la reconstrucción de estructuras mediante cortes seriados.

Las piezas para microscopía óptica fueron deshidratadas en serie de alcoholes y acetona, para después ser incluidas en una mezcla de parafina y resina (Histoplast). Los cortes de tejidos fijados en el líquido de Bouin fueron teñidos con hematoxilina de Harris y eosina o con la hematoxilina férrica de Heindenhain (Clark, 1981): Los tejidos fijados en el líquido de Zencker se tiñeron con un tricrómico (hematoxilina de Harris, seguida por eosina y verde luz, utilizando ácido molíbdico como mordiente).

Las muestras destinadas a microscopía electrónica fueron refijadas en tetróxido de osmio (1%) y acetato de uranilo (2%), para ser después deshidratadas e incluidas en resina de Spurr. Los cortes semifinos (1 µm) para orientación topográfica se tiñeron con azul de toluidina al 1%. Los cortes ultrafinos obtenidos con cuchilla de diamante fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo.

III.3. Los órganos reproductivos masculinos

III.3.1. Testículo

El testículo es una masa de túbulos de diámetro similar, interconectados como en una esponja, y que están tapizados por el epitelio espermatogénico. Como en todos los cenogasterópodos que conocemos, este epitelio está organizado en nidos de células germinales, cada uno de ellos en un único estadio de maduración y probablemente descendientes de una única espermatogonia. Sin embargo, se observan varios estadios diferentes en cada una de las secciones tubulares. Las células de Sertoli son grandes y achatadas y tapizan toda la superficie externa de los túbulos. Sus núcleos son de gran tamaño y muestran conspicuos nucleolos (Fig. III.2).

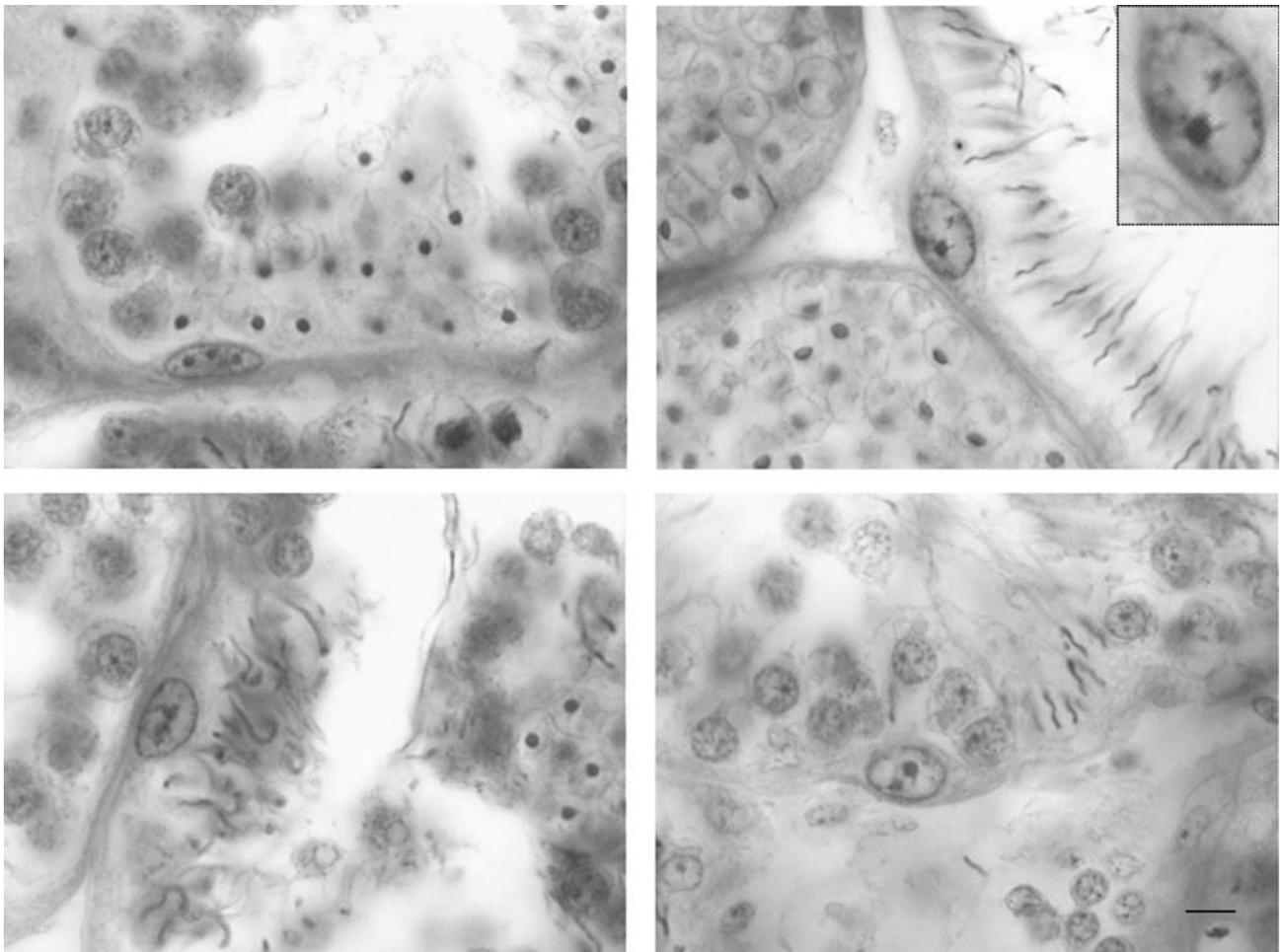


Fig. III.2. Túbulos testiculares mostrando los nidos presuntamente isogénicos. Se distinguen los grandes núcleos de las células de Sertoli (mostrando 1-3 nucleolos, ver recuadro en ángulo superior derecho). Pueden observarse células de núcleo claro con un único nucleolo –espermatoцитos-, de núcleo redondeado oscuro –espermátides-, y de núcleo oscuro helicoidal, que son las cabezas de los espermatozoides eupirénicos (hematoxilina férrica de Heindenhein; la barra indica 10 μm , salvo para el recuadro que muestra un núcleo a mayor aumento).

El diagnóstico de los estadios germinales es muchas veces incierto en las preparaciones ópticas, pero aun así, en ellas puede percibirse la formación de más de un tipo de espermatozoides (Andrews, 1964; Winik *et al.*, 1989; 1994;

2001), mostrando que esta especie genera a la vez euspermios fértiles, y dos tipos de paraspermios infértiles. Las cabezas de los espermatozoides maduros se orientan perpendicularmente a la banda citoplasmática de las células de Sertoli, lo que es más evidente para las cabezas espiraladas de los euspermios.

Hay numerosas células musculares que rodean a los túbulos seminíferos, cuyas contracciones podrían cooperar para que los espermatozoides maduros atraviesen el laberinto testicular y entren en el vaso deferente. En estos cenogasterópodos, no se observa ninguna estructura análoga a la rete testis de los mamíferos, que se interponga entre el testículo y el vaso deferente.

III.3.2. Vaso deferente

Este delgado conducto, tapizado por un epitelio cilíndrico y ciliado, se origina, junto a la parte más distal⁵ del testículo, dentro de la masa fibroconectiva y muscular que se encuentra debajo del epitelio del manto, en la cara columelar de la masa visceral. Debemos reconocer que, en repetidas observaciones de cortes seriados, no hemos podido observar la continuidad entre los túbulos testiculares y el vaso deferente. Este último desciende por la masa fibromuscular, hasta que, ya cercano al límite posterior de la cavidad paleal, se ensancha en la vesícula seminal.

III.3.3. Vesícula seminal

Es un órgano que se percibe externamente como cónico, en el que desemboca el deferente por su vértice proximal, y que se ajusta como una capucha sobre el extremo proximal de la próstata (Fig. **III.3**). Está tapizado internamente por un epitelio cilíndrico ciliado, plegado en numerosas crestas. La base de la vesícula seminal es en realidad un infundíbulo (no observable externamente), cuyas crestas convergen en el orificio que comunica con la próstata.

III.3.4. Próstata

Este órgano, cuya apariencia externa es la de un cilindro suavemente contorneado, transcurre como una saliente en el fondo de la cavidad paleal. Su extremo distal se encuentra del lado izquierdo de esta cavidad, y desde allí se extiende hacia la derecha, cruzando por debajo de la epitenia (ligamento paleal de Andrews, 1964), después se curva hacia delante, acompañando al recto a la derecha de éste. Está conformado por un conducto central, en el que desembocan perpendicularmente numerosos conductos ramificados. Tanto el conducto central como sus afluentes están tapizados por un epitelio cilíndrico ciliado, en donde se destacan grandes células caliciformes, y están rodeados por un sector aparentemente subepitelial, muy desarrollado, como veremos a continuación.

⁵ Los términos "proximal" y "distal" se usan con referencia al ápice conquiliar.

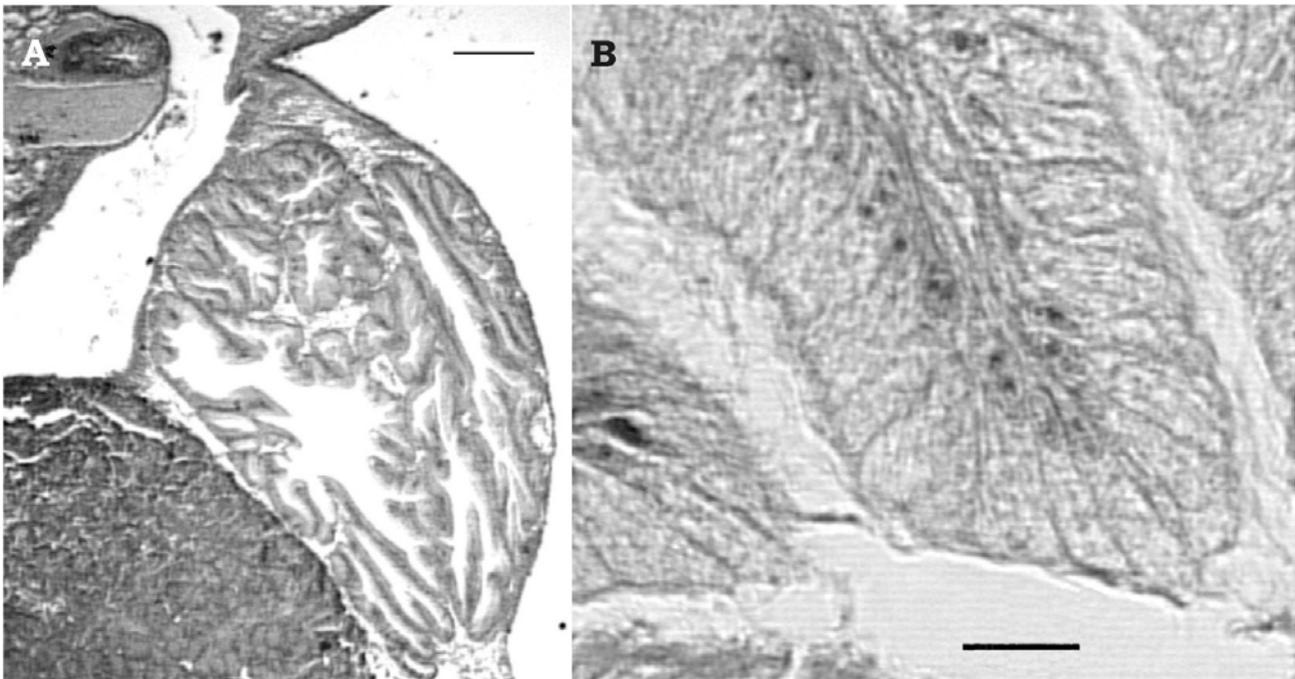


Fig. III.3. Vesícula seminal (hematoxilina férrica de Heidenhain). En panel **A**: Disposición general del órgano donde es evidente la organización interior en forma de crestas (la barra indica 200 μm). En panel **B**: Puede observarse, a mayor aumento, el epitelio cilíndrico que tapiza las crestas (la barra indica 10 μm).

Voltzow (1994) ha llamado la atención sobre este tipo de epitelio en las glándulas pedales de algunos “prosobranquios”. Nuestros estudios muestran que este tipo de epitelio está presente también en otros órganos de *P. canaliculata*, como en el surco anterior del propodio de esta especie (observaciones no publicadas). El sector “subepitelial” está formado por largas células piriformes, cuyos extremos se ubican entre las células ciliadas y las caliciformes que rodean la luz ductal, aflorando en esta última. Catalán *et al.* (2002), han mostrado en la glándula uterina de *P. canaliculata*, que la lámina basal se dobla hacia la profundidad rodeando a cada célula piriforme, lo que sugiere que es incorrecto hablar de “epitelio” y “subepitelio”, ya que se trata de un único epitelio simple, algunas de cuyas células, las piriformes, penetran en dirección al estroma conformando ese segundo sector (Fig. III.4). Hablaremos entonces de un sector superficial, en contacto con la luz de los túbulos, y de un sector profundo en proximidad de espacios hemolinfáticos. También se observan espacios hemolinfáticos y fibras musculares inmediatamente por debajo del sector superficial, lo que, en las preparaciones ópticas, contribuye a separarlo visualmente del sector profundo; esta delgada zona es atravesada por los extremos de las células piriformes que van a terminar en la luz ductal. Las células piriformes muestran gruesos gránulos secretorios que son volcados hacia la luz. En la próstata, estos gránulos se tiñen a la vez con eosina y hematoxilina en las preparaciones teñidas con tricrómico, por lo que parecería apropiado calificarlos de anfófilos, mientras que en la microscopía electrónica se observa que contienen una trama interior en forma de encaje (Fig. III.5) que los hace diferentes a los gránulos secretorios de todas las demás glándulas del sistema genital masculino.

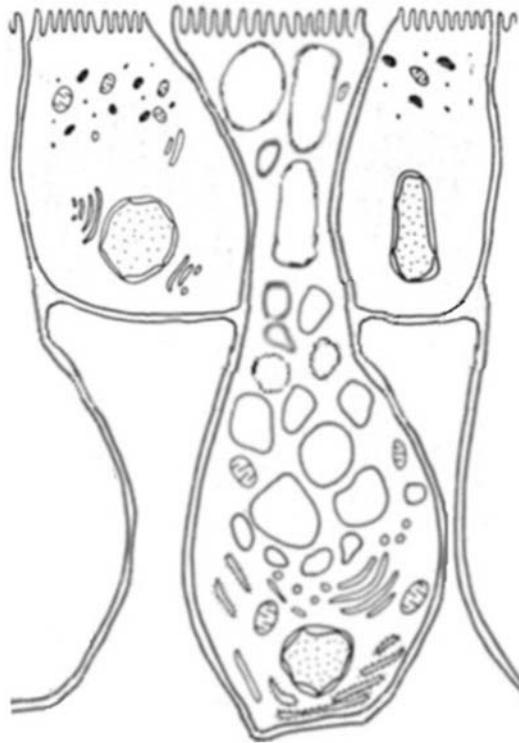


Fig. III.4. Esquema del arreglo epitelial característico de muchos órganos glandulares de *P. canaliculata*. Nótese como la lámina basal acompaña la prolongación, en profundidad, de las células de mayor tamaño, que pueden ser proporcionalmente más largas que en este esquema.

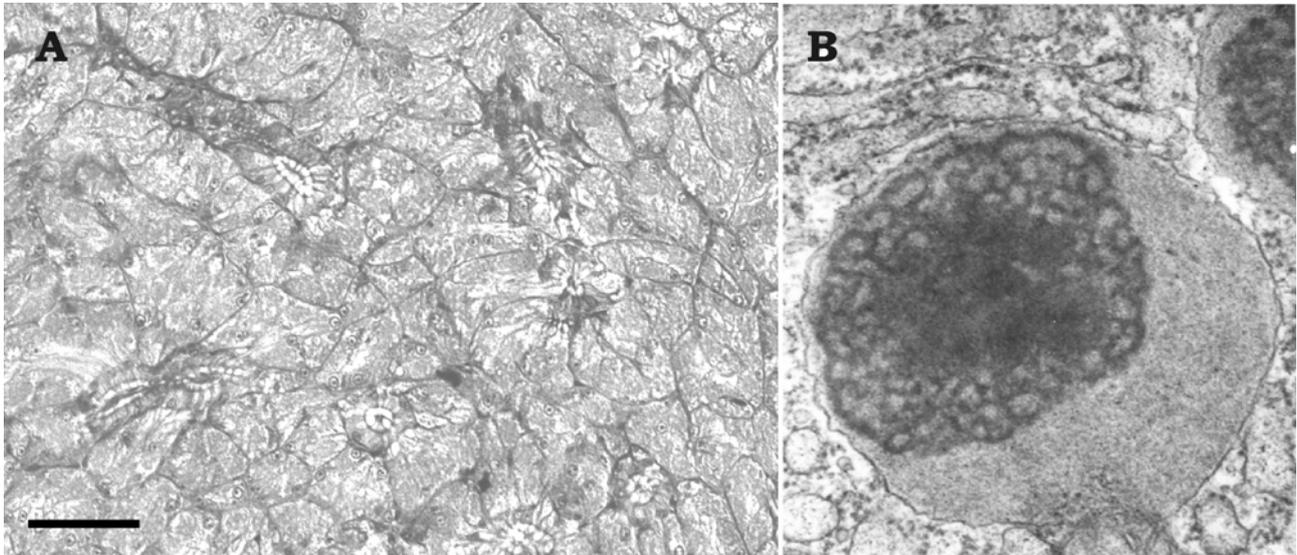


Fig. III.5. Próstata. En el panel **A**, se observa el arreglo general de los acinos de este órgano (la barra negra indica 50 μm), donde se distinguen las células del sector superficial y del sector profundo (“subepiteliales” de Voltzow, 1994). En el panel **B**: micrografía electrónica de los gránulos característicos de las células prostáticas.

III.3.5. Papila genital

Este órgano es una continuación de la próstata, que cruza por encima del recto, y que se adelgaza en forma de cono hacia su extremo distal. Con ella el espermiducto, que venía descendiendo con la próstata a la derecha del recto, va a terminar a la izquierda del recto, en el pozo espermático.

Aunque no se perciben diferencias macroscópicas externas entre la próstata y la papila genital, en la microscopía óptica se observa que los conductos que desembocan en el conducto principal de la papila genital son lineales y aproximadamente paralelos (en la próstata eran ramificados y se entrecruzaban). Asimismo, el sector profundo del epitelio de los ductos está menos desarrollado que en la próstata, mostrando gránulos que se tiñen con verde luz (Fig. III.6). En la microscopía electrónica estos gránulos se muestran conformados a su vez por gránulos mucho más finos, y sin la trama en forma de encaje que habíamos visto en la próstata. Además, presentan en la periferia del gránulo un notorio desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (Fig. III.6, panel B). Estos gránulos de las células piriformes de la papila genital también son volcados hacia la luz ductal y su función es, hasta el momento, desconocida.

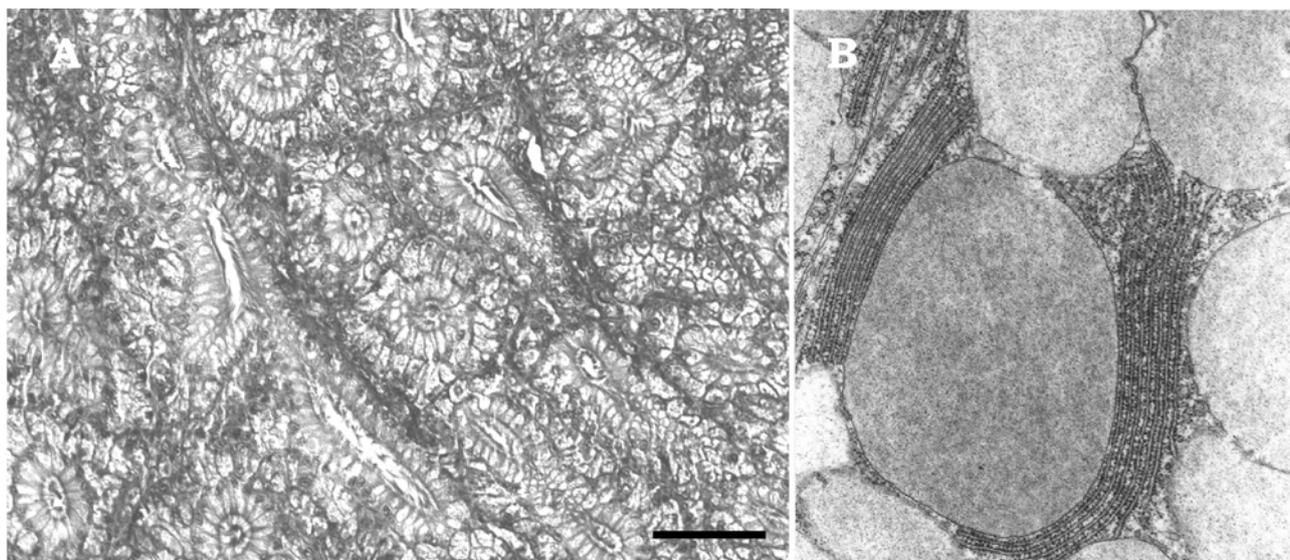


Fig. III.6. Papila genital. En el panel **A**, se observa el arreglo general de los acinos (la barra indica 50 μm). En el panel **B**: micrografía electrónica de los gránulos característicos de las células de este órgano rodeados de retículo endoplásmico rugoso.

III.3.6. Complejo peniano

El complejo peniano y la vaina peniana son las estructuras que conforman el aparato copulatorio de esta especie. Son derivados del borde superior derecho de la cavidad paleal, y como tales constituyen una sinapomorfía de la familia Ampullaridae. Como contraste podemos decir que en la familia Viviparidae (también en la superfamilia Ampullarioidea) el aparato copulatorio es una transformación del tentáculo derecho (Hyman, 1967), mientras que en el resto de los cenogasterópodos conocidos sólo existe un pene que se desarrolla en el costado derecho del cuello.

Debe remarcarse que este aparato copulatorio no está en continuidad con el espermiducto que, una vez atravesada la papila genital, termina en el pozo espermático. Es desde allí, a cielo abierto, de donde los espermatozoides deben pasar al conducto peniano.

Este conducto, que constituye la porción final de las vías espermáticas (Fig. III.7), no es un surco sino un tubo cerrado en toda su longitud, tapizado de un epitelio cilíndrico ciliado, y que atraviesa tres sectores del pene que están bien diferenciados: (1) el bulbo peniano, que es una estructura muscular aproximadamente esférica, muy aparente en el material fresco por su color rojizo, en la que el conducto peniano se origina junto al pozo espermático y dentro del cual da su primera vuelta completa; (2) una prolongación de este bulbo, también muscular y aproximadamente cilíndrica, dentro de la cual el conducto se tuerce en un espiral de numerosas vueltas; y (3) el pene vermiforme, caracterizado por tener solo una delgada capa muscular exterior y un tejido conectivo esponjoso por el que transcurren el conducto central y dos venas. El conjunto está envuelto en un saco membranoso, el saco peniano, dentro del cual la prolongación cilíndrica del bulbo y la mayor parte del pene vermiforme se encuentran arrolladas en espiral durante el reposo. Este saco tiene una abertura que comunica con el surco de la vaina peniana (que describiremos enseguida), en donde el extremo distal del pene vermiforme se aloja.

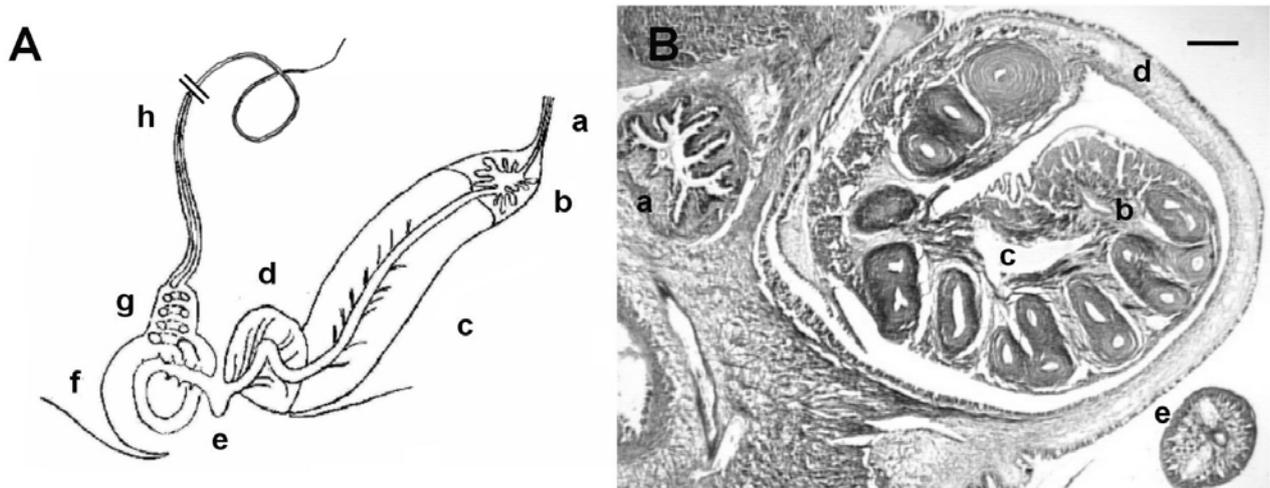


Fig. III.7. En el panel **A**, se presenta el esquema general de las vías espermáticas extragonadales en el que se han marcado: el vaso deferente (**a**), la vesícula seminal (**b**), la próstata (**c**), y la papila genital (**d**), que termina en el pozo espermático (**e**). Desde allí, el bulbo peniano contiene la porción curva del conducto peniano (**f**) y su extensión muscular al mismo conducto enrollado (**g**); luego comienza la parte vermiforme del pene (**h**). El esquema no es un dibujo a escala, en general las estructuras han sido acortadas y el saco peniano no ha sido dibujado. En el panel **B**, se presenta una sección del complejo peniano (hematoxilina férrica de Heidenhain, la barra indica 200 μ m): **a**, recto; **b**, extensión cilíndrica del bulbo, conteniendo múltiples cortes de la porción enrollada del conducto peniano; **c**, vena central; **d**, saco peniano; **e**, pene vermiforme, mostrando el conducto central y las dos venas laterales.

Los espermatozoides serían succionados desde el pozo espermático por las contracciones del bulbo peniano, y serían transportados por la corriente ciliar hacia el extremo distal del pene vermiforme. El conducto dentro del pene vermiforme es acompañado por dos vénulas rodeadas de un tejido conectivo laxo y por células de citoplasma claro. Este sector vermiforme del pene se vuelve progresivamente más delgado en su extremo distal, donde el espermiducto termina sin ninguna diferenciación particular.

Las fibras musculares del bulbo peniano y de su prolongación cilíndrica serían las responsables de bombear la hemolinfa para desplegar el pene vermiforme, y hacer que su extremo distal se deslice por el surco de la vaina (que enseguida veremos) y después penetre en el tracto femenino. Las contracciones de las fibras musculares también podrían contribuir a la propulsión de los espermatozoides.

III.3.7. Vaina peniana

Esta vaina nace del reborde derecho y superior de la cavidad paleal, y su forma exterior asemeja la de un cono muy alargado, y aplanado dorsoventralmente. Este órgano es quien conduce al pene vermiforme hacia el orificio genital de la hembra, posibilitando la penetración vaginal.

Para mayor claridad de la descripción llamaremos “ventral” y “dorsal” a las superficies de la vaina que están ubicadas en estas posiciones durante el reposo y durante el acto copulatorio. Asimismo, llamaremos “derecho” e “izquierdo” en referencia a lo así ubicado en esa posición de la vaina. A su vez, denominaremos “proximal” a lo que está más cercano a la base e inserción de la vaina en el reborde paleal, y por el contrario será “distal” lo que se ubique más apartado de esta base y más cercano al extremo libre de la vaina.

La vaina es una esponja vascular, cuyos espacios hemolinfáticos derivan de la arborización de una única arteria y están incluidos en una masa fibrosa (conectiva y muscular). El complejo arreglo músculo-conectivo de esta masa fibrosa, así como su profusa inervación (ver más abajo) estarían involucrados en el bombeo o compartimentalización de la hemolinfa dentro de la esponja, y explicarían la gran movilidad y adaptabilidad que la vaina muestra durante la copulación, llegando a adherir el surco en T sobre el oviporo de la hembra, y así permitir la penetración peniana en la vagina.

La vaina está recubierta por un epitelio cilíndrico, principalmente compuesto por células ciliadas y mucosas. Sin embargo, muestra también en su superficie ventral un tercer tipo celular, de células elongadas, cuyo citoplasma es finamente granular (tingible con verde luz) y que también pueden verse en la masa músculo-conectiva subyacente, donde se disponen perpendicularmente a la superficie epitelial. Cuando están incluidas en el epitelio de cubierta, muestran a veces una extrusión del citoplasma apical. Aunque no hemos podido, hasta ahora, observarlas con el microscopio electrónico, estamos inclinados a creer que se trata de neuronas receptoras sensoriales, semejantes a las descritas por Zaitseva (1998) en *P. paludosa*: debe tenerse en cuenta que la superficie ventral de la vaina está expuesta a las corrientes de agua de la cavidad paleal, tanto las

de la cavidad de la hembra durante la copulación, como las de la del macho en los períodos de reposo sexual.

Además, la vaina muestra cuatro conspicuas estructuras: la primera de ellas, la glándula externa, se encuentra incluida en la parte basal del cono, mientras que las otras tres son visibles desde su superficie ventral: (1) el surco de la vaina; (2) la glándula proximal y (3) la glándula distal.

La **glándula llamada “externa”** por Andrews (1964), e “hipobranquial” por otros autores (Sachwatkin, 1920) es de color anaranjado y se percibe por transparencia en la base de la vaina, junto al extremo anterior del ctenidio y a la inserción de la vaina en el reborde paleal (Fig. **III.8**). Tiene un orificio excretor macroscópicamente visible hacia el frente, que elimina hacia el exterior, durante la copulación, una secreción espesa que es ingerida por la hembra (Burela, comunicación personal). Andrews (1964), quien no observó este comportamiento de ingestión, ha especulado que esta secreción podría tener un efecto aversivo sobre otros machos que pudieran intentar competir con el residente durante el prolongado acto copulatorio de esta especie.

El gran conducto excretor que se abre en ese orificio macroscópico penetra hacia el centro de la glándula donde se divide en numerosas ramas, que se originan simultáneamente y se apartan de ese centro en forma radiada. Curiosamente, también hay conductos excretorios menores que se abren hacia el surco de la vaina, y parecería evidente que la secreción vehiculizada por estos últimos conductos cumpliría una función lubricante para el deslizamiento del pene en el surco.

El epitelio del conducto principal es cilíndrico ciliado, mientras que el que tapiza los demás conductos es en muchos sentidos semejante al ya descrito para la próstata y la papila genital, aunque remarcándose la presencia de numerosas células caliciformes entre las células ciliadas del sector superficial. El sector profundo está muy desarrollado y sus células portadoras de gránulos también vuelcan sus productos en los conductos. Sin embargo, son notorios los espacios hemolinfáticos que rodean al sector profundo y que penetran entre las células de éste, y en menor medida, los que se encuentran en el límite entre los dos sectores. Una característica notable de los gránulos de esta glándula es la formación de cristaloides poliédricos en su interior. Estos cristaloides, visibles al microscopio electrónico, son de difícil conservación (por lo que a veces sólo se percibe su imagen negativa). Su trama proteica interior recuerda la de los cristaloides de Reinke que se encuentran en las células de Leydig de los mamíferos (Fig. **III.8**).

El **surco de la vaina** se origina junto a la glándula externa y es continuación de la cavidad del saco peniano; es profundo y parece formado como consecuencia del arrollamiento de la vaina. Se extiende por la cara dorsal de la vaina y termina hacia la mitad de su largo máximo, formando en su superficie un pequeño surco en “T”, rodeado de una mucosa corrugada. Esta terminación en “T” se apone sobre el orificio genital de la hembra durante la copulación, y es por ella por donde el pene sale del surco para penetrar en la vagina. Aún en los animales que no están copulando, el extremo del pene vermiforme sale del mencionado saco

por la comunicación con el surco de la vaina y se aloja en el primer sector de éste.

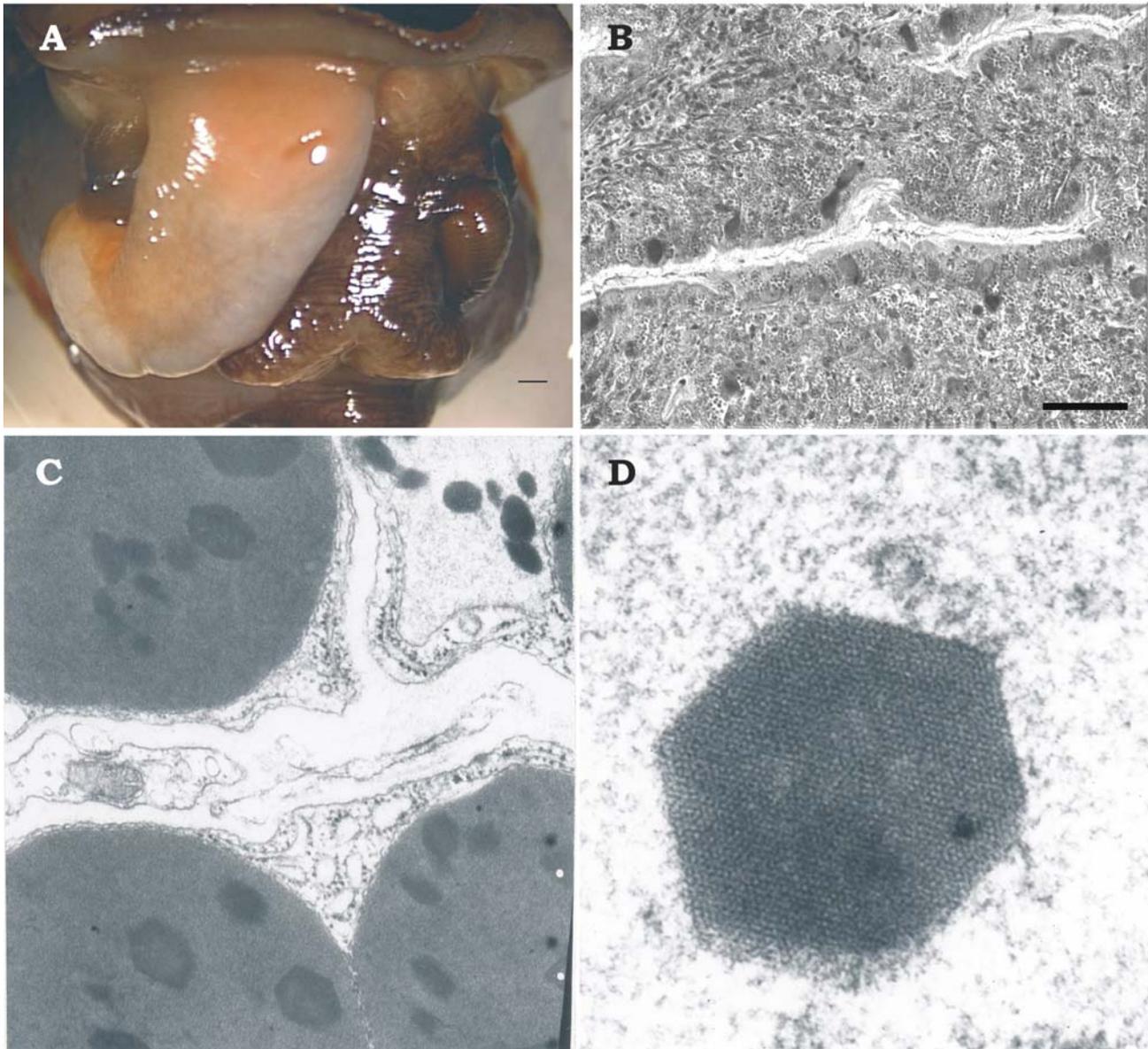


Fig. III.8. Panel **A**, se observa la cabeza de un macho, con la vaina peniana desplegada hacia fuera, como ocurre al comienzo de la copulación. En la base de la vaina, que está adherida al reborde del manto, se ve por transparencia el color anaranjado de la glándula externa de la vaina, donde puede verse el ojal excretor (la barra indica 1 mm). Panel **B**, detalle microscópico de la glándula externa, mostrando un conducto excretor y las células piriformes de sector profundo, con sus gránulos (hematoxilina férrica de Heindenhain; la barra indica 50 μ m). Panel **C**: gránulo de la glándula externa de la vaina, con los cristaloides poliédricos en su interior, y rodeados de retículo endoplásmico rugoso. Panel **D**: detalle de la trama interna de los cristaloides.

Parcialmente alojada dentro del trayecto medio del surco se observa, como un resalto ovoide y de superficie corrugada, la **glándula proximal de la vaina**. El epitelio de cubierta de esta glándula ofrece semejanzas estructurales con la próstata, la papila genital y la glándula externa (particularmente, por mostrar los dos sectores, superficial y profundo), pero difiere de éstas por carecer de conducto excretor, ya que el sector superficial de este epitelio, que parece carecer de cilias, está en contacto inmediato con el agua.

El sector profundo del epitelio se extiende hacia la profundidad de la masa fibroconectiva de la vaina, también observándose espacios hemolinfáticos en la zona límite entre el sector superficial y el profundo. Los extremos más profundos de estas células, que suelen contener el núcleo, se agrupan en manojos rodeados de espacios hemolinfáticos. Sus gránulos son semejantes a los de la papila genital, y a diferencia de éstas, y por carecer de conductos, los vuelcan directamente al exterior (Fig. III.9).

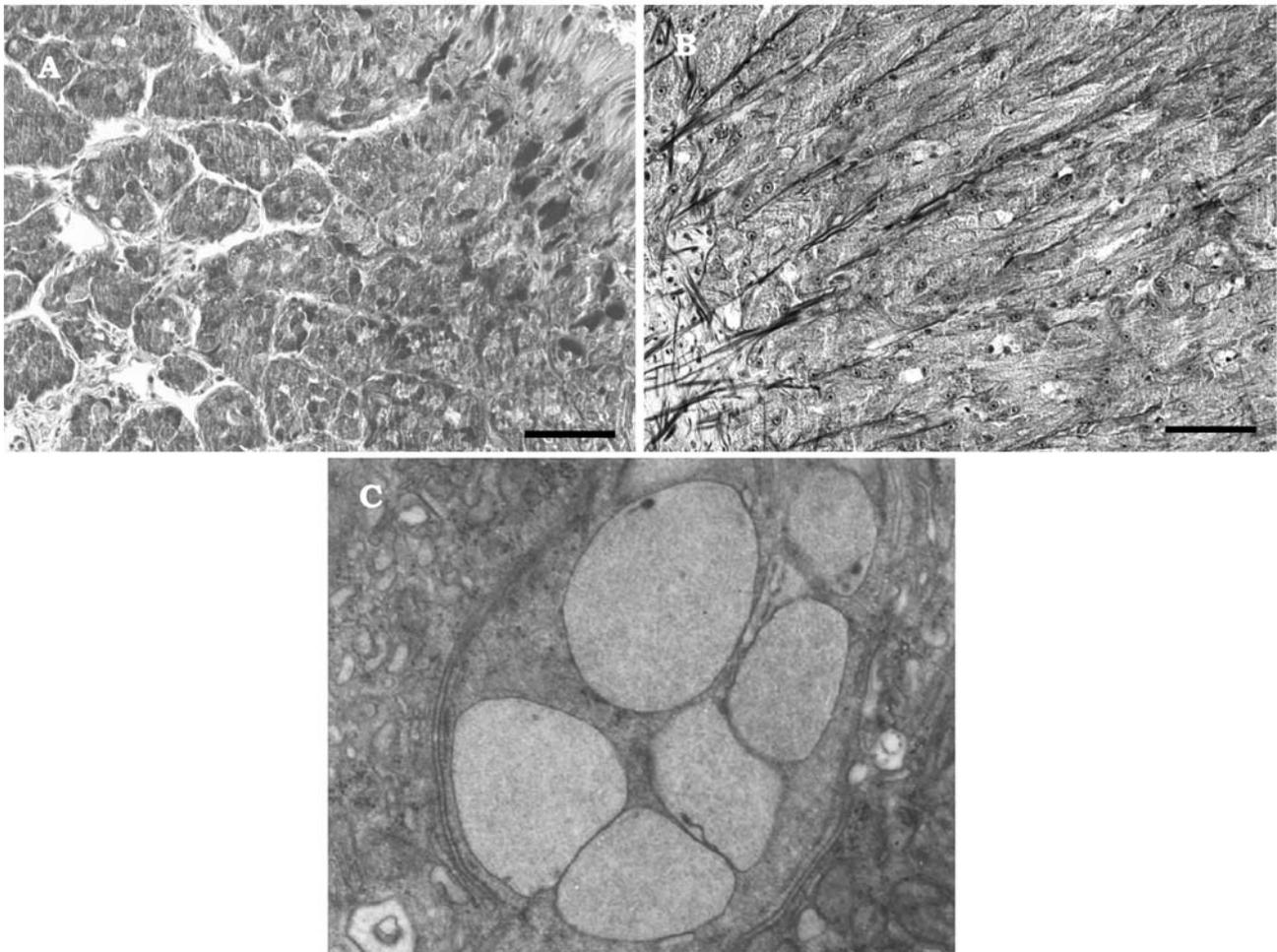


Fig. III.9. Disposición general de las glándulas proximal (panel **A**) y distal (panel **B**) de la vaina peniana. Las células piriformes de la glándula proximal se disponen en nidos, mientras que las de la glándula distal forman haces de células alargadas (hematoxilina férrica de Heidenhain, la barra indica 50 μ m). En el panel **C** se observa en detalle la conformación de los gránulos característicos (la foto corresponde a gránulos de la glándula distal).

La **glándula distal de la vaina** está ubicada sobre el extremo distal de este órgano, extendiéndose paralelamente a una extensa superficie mucosa corrugada, la que contribuye aparentemente a la fijación del extremo distal de la vaina, en el fondo de saco paleal, durante la copulación. Su anatomía microscópica es muy semejante a la de la glándula proximal, particularmente por la carencia de un conducto excretor, y la disposición de su epitelio en dos sectores, uno superficial, en contacto con el agua, y otro profundo, en contacto con espacios hemolinfáticos. Sin embargo, las células de su sector profundo parecen más alargadas que las de la glándula proximal, y se extienden paralelamente formando masas compactas en vez de manojos más o menos

aislados. Sus gránulos secretorios, que se vuelcan hacia el agua, son semejantes a los de la papila genital y los de la glándula proximal (Fig. III.9).

La **inervación de la vaina peniana** tiene una complejidad acorde con la complejidad estructural de este órgano. Se origina en el nervio pleural derecho (Fig. III.10) el cual a su vez se origina en el sector pleural del ganglio pleuropedal de ese lado. Este nervio derecho es insignificante en las hembras, así como también es insignificante en el lado izquierdo de ambos sexos.

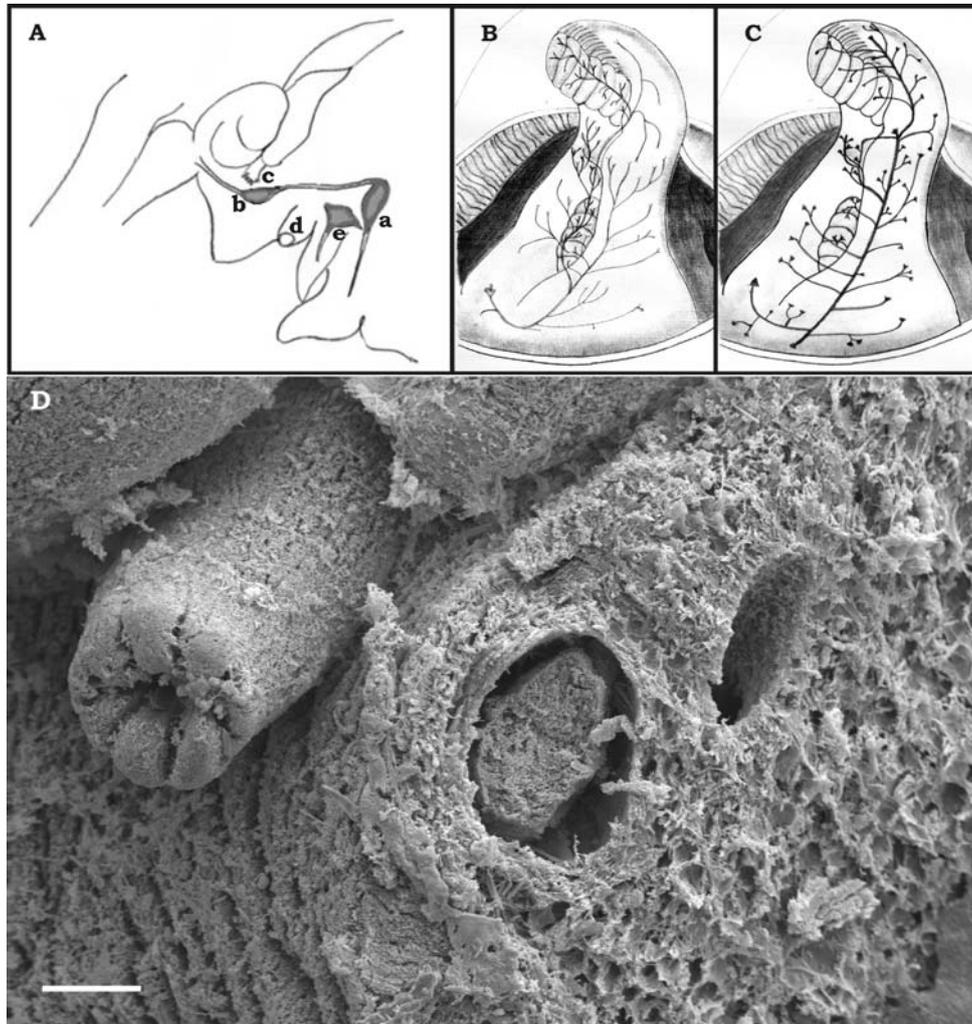


Fig. III.10. Panel **A**: Esquema del ganglio pedopleural (**a**) dando origen al nervio pleural derecho, el cual termina en el ganglio copulatorio (**b**) próximo al ano (**c**); de este ganglio deriva toda la inervación del aparato copulatorio. El ganglio cercano al ojo (**d**) y que da un nervio hacia el tentáculo es el ganglio cerebroide (**e**). Panel **B**: Distribución esquemática de las ramas del nervio copulatorio en la vaina peniana. Panel **C**: Distribución esquemática del árbol arterial de la vaina. El sistema vascular, también originado de una única arteria, muestra cierto paralelismo con el sistema nervioso, aunque algo menos ramificado. Panel **D**: Micrografía de barrido que muestra un corte a la altura del repliegue nuchal derecho. En él se observan, cortados transversalmente próximos al ano, el ganglio copulatorio y el vaso arterial principal de la vaina.

En los machos, el nervio pleural derecho penetra en la masa muscular céfalopodal, primero en dirección al pliegue nuchal derecho, pero luego sobrepasándolo, en dirección al complejo peniano y la base de la vaina, y deslizándose entre el lóbulo nuchal y el ano. Precisamente al pasar entre estos dos

reparos se ensancha en un ganglio que resulta interpuesto en su trayecto, al que llamamos ganglio copulatorio, pues da origen a la inervación de todo el complejo aparato copulatorio de esta especie, según hemos podido comprobar en cortes seriados teñidos con el tricrómico hematoxilina-eosina-verde luz.

A la salida de este ganglio nace un nervio único (Fig. **III.10**), el que da ramas para (1) el complejo peniano, (2) la parte basal y derecha de la masa fibromuscular, (3) el borde del manto y (4) para la glándula externa. Después, este nervio se dispone cerca del fondo del surco, acompañándolo a todo su largo, y da ocho ramas, cinco de las cuales terminan en el sector izquierdo y basal de la esponja fibrosa, mientras que otras tres alimentan un circuito aproximadamente circular, ubicado entre las glándulas externa y proximal de la vaina. De este circuito circular salen numerosas ramas que inervan el sector medio y derecho de la esponja fibrosa, así como el surco en T; de las proximidades del surco en T salen tres ramas que corren aproximadamente de derecha a izquierda, y que alimentan otro circuito circular ubicado en la proximidad de la glándula distal, del que salen ramas que se pierden en la proximidad de esta glándula y de la mucosa corrugada adyacente. De este circuito también salen ramas para el sector más distal de la esponja (que es sólo izquierda y anterior), así como ramas recurrentes que se pierden en el sector medio e izquierdo de la esponja fibrosa.

El **árbol arterial de la vaina** muestra cierto paralelismo con la inervación (Fig. **III.10**), yendo la arteria principal también cercana al fondo del surco, pero ubicada más profundamente que el nervio. El conjunto del árbol es menos ramificado e interconectado que el nervioso, ya que la mayoría de las pequeñas ramas son terminales, y estas terminaciones están más regularmente distribuidas que los troncos nerviosos más pequeños reconocibles.

III.4. Resumen y conclusiones

La disposición de los túbulos testiculares como un laberinto esponjiforme nos propone el problema de cómo se orientan los espermatozoides para salir de ése dédalo hacia el espermiducto. Por otra parte, no hemos encontrado ningún sector de este largo conducto que pueda servir de reservorio espermático. Sólo estaríamos tentados a hipotetizar que las fibras musculares que rodean los túbulos podrían generar aumentos de presión intraductal, de tal manera que los espermatozoides, ya libres en la luz, serían impulsados fuera del laberinto hacia el vaso deferente.

Éste último es el más simple de todos los sectores del espermiducto, y con la vesícula seminal que lo continúa, se caracterizan por tener un epitelio cilíndrico, en que predominan las células ciliadas, con escasa o nula presencia de células secretoras.

Por el contrario, los túbulos prostáticos y los de la papila genital muestran ya ese conspicuo epitelio simple, pero constituido de un sector superficial y otro profundo. Este sector profundo es el que Voltzow (1994) refiere como estrato "subepitelial". Si bien el sector superficial, que está en contacto con la luz, muestra abundantes células ciliadas, también incluye grandes células caliciformes, y aparentemente, también los extremos de las grandes células

piriformes, cuyos núcleos y citoplasma perinuclear conforman el sector profundo de este epitelio. Estas células están cargadas de grandes gránulos, de característica tintoriales y ultraestructurales diferentes en la próstata y la papila genital. Quizás lo más significativo de este epitelio, desde el punto de vista funcional, es su contigüidad con espacios hemolinfáticos, tanto en su base como en el espacio intermedio entre el sector superficial y el profundo, lo que nos ha llevado a proponer que estos epitelios pudieran cumplir una función endócrina, o más precisamente parácrina (Gamarra-Luques *et al.*, 2003).

Sin duda el aspecto más conspicuo del sistema genital de los ampuláridos es el aparato copulatorio, y su discontinuidad, o mejor dicho, su continuidad a cielo abierto, con el espermiducto paleal. En efecto, el pozo espermático no es más que un pequeño repliegue de la cavidad paleal, del cual los espermatozoides deben ser succionados por el bulbo espermático, y probablemente impulsados por la musculatura del pene y por los movimientos ciliares de su epitelio, hasta la desembocadura distal de éste. Como bien notó Berthold (1989), este aparato copulatorio ha alcanzado en el género *Pomacea* su máxima complejidad, mostrando una vaina peniana muy desarrollada, y con tres glándulas bien diferenciadas (la externa, la proximal y la distal) caracterizadas por epitelios semejantes a los descritos en la próstata y la papila genital. La particularidad de la glándula externa es que muestran cuerpos cristaloides dentro de sus gránulos, mientras que la particularidad de las glándulas proximal y distal es la carencia de un conducto excretor, por lo que el sector superficial de su epitelio está en contacto directo con el exterior.

La inervación del aparato copulatorio está dada a partir del nervio pleural derecho, que se expande en el ganglio copulatorio, para luego seguir como un nervio único a la salida de este ganglio antes de ramificarse. La inervación más notable es la de la misma vaina, la cual parece servir, no sólo al aparato fibromuscular, sino también a las glándulas de la vaina, y a la terminación del surco en T, que es el sector de la vaina que se apone al orificio genital de la hembra durante la copulación. La vaina es irrigada también por una única arteria, cuyas ramificaciones siguen un patrón semejante al de los trayectos nerviosos.

La correlación de estas variadas y complejas estructuras con las funciones reproductivas es el desafío para lo que queda de esta tesis y para los próximos años.

Capítulo IV

Diferenciación sexual y trofismo genital

IV.1. Introducción

La diferenciación sexual de los tejidos primordiales estaría primariamente ligada a los factores que determinan el sexo. En ésta especie en particular, los factores genéticos de determinación sexual, son de una complejidad no totalmente dilucidada (Yusa y Suzuki, 2003; Yusa, 2004; 2006). El desarrollo trófico, es decir la epigénesis de los primordios ya diferenciados en un sentido o en otro, estaría ligado a factores endógenos (hormonas) que actuarían independientemente, y posiblemente *a posteriori*, de los que determinaron la diferenciación sexual.

Estudios embriológicos (Ranjah, 1942) en otra especie de ampulárido (*Pila globosa*), han encontrado que el gonoducto primordial es originado a partir de la fusión de tres componentes: (1) el primordio gonadal, que se origina a partir de un engrosamiento del techo del celoma pericárdico; (2) el riñón izquierdo rudimentario, también de origen mesodérmico, el cual originaría el gonoducto visceral; y (3) el conducto eferente del riñón izquierdo rudimentario, que es un derivado ectodérmico y que originaría las estructuras del gonoducto paleal. Sin embargo, la descripción de Ranjah (1942) fue continuada solamente hasta 4-5 días antes de la eclosión. En *Marisa cornuarietis*, también ha sido descrito detenidamente el desarrollo embriológico (Demian y Yousif, 1973a, 1973b; 1973c; 1973d; 1975), detallando el desarrollo de distintos sistemas, pero curiosamente, no el desarrollo del sistema reproductor. Por tanto, la generación del complejo conjunto de estructuras reproductivas del adulto, que ocurre en el período posterior a la eclosión, no ha sido estudiada en ninguna de estas especies.

Un estudio de la organogénesis reproductiva en *Pomacea canaliculata*, debe dar cuenta tanto del desarrollo de las estructuras masculinas, que hemos descrito en el capítulo precedente, como de las femeninas (Hylton Scott, 1958; Andrews, 1964; Catalán *et al.*, 2002). Estas incluyen al ovario, el oviducto visceral, el útero (un órgano complejo que incluye el receptáculo seminal, la *bursa copulatrix*, la glándula del albumen y la glándula de la cápsula), y la vagina. Asimismo, debe dar cuenta del desarrollo del aparato copulatorio en los dos sexos.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1. Animales y condiciones de cultivo

Para definir el patrón de crecimiento de los juveniles en nuestras condiciones de cultivo, se recolectaron 20 puestas de la sala de cultivo, y se incubaron en cápsulas de Petri a 23-25 °C. La eclosión ocurrió 14 días después, cuando 120 ejemplares fueron seleccionados al azar y distribuidos en acuarios de 48 x 32 x 16 cm, donde el nivel del agua fue mantenido aproximadamente en 4 cm de profundidad. El día de la eclosión (día 0), se colocaron 20 juveniles por acuario, y estos fueron medidos semanalmente con un calibre (0.1 mm de precisión). Como Estebenet y Cazzaniga (1992) han reportado el efecto negativo del hacinamiento sobre el crecimiento de los caracoles, la densidad en los acuarios fue reducida progresivamente (día 10, 14 animales/acuario; día 30, 12 animales/acuario; día 40, 10 animales/acuario). Los animales fueron alimentados *ad libitum* con lechuga fresca durante las dos primeras semanas post-eclosión. Luego, se suministró *ad libitum* una dieta mixta de lechuga, pellets de alimento para peces y papel higiénico. Durante todo el experimento, se registraron los cambios en la forma del opérculo (Cazzaniga, 1990), así como las cópulas y oviposiciones. Ningún animal murió durante el período de observación.

IV.2.2. Estudio microscópico del desarrollo

Para las otras observaciones se criaron caracoles en las mismas condiciones, pero los individuos fueron seleccionados según el largo mayor de la conchilla a los 2, 5, 10, 15, 20 y 25 mm (al menos 5 caracoles por grupo). Los ejemplares de estos tamaños fueron seleccionados a los 0, 10, 20, 30, 40 y 50 días de vida, respectivamente, se rompieron las conchillas y el animal entero fue colocado en fijador de Railliet-Henry (Thiengo *et al.*, 1993). A los 30 días, se removieron los restos de conchilla, completamente descalcificados, y el opérculo. Dos animales de cada tamaño fueron posteriormente deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol y embebidos en Histoplast (punto de fusión 56-58 °C), para ser luego cortados seriadamente, y después teñidos con hematoxilina de Harris y eosina. La mayor parte de los demás ejemplares fueron disecados bajo microscopio estereoscópico. Algunas piezas selectas, fruto de la microdissección, fueron fijadas nuevamente con tetróxido de osmio (1%, en buffer fosfato salino) durante toda la noche y posteriormente teñidas con acetato de uranilo (2%, 45 min) luego de los cual las piezas fueron deshidratadas a punto crítico, montadas en portaobjetos de aluminio, doradas y examinadas con un microscopio electrónico de barrido marca LEO 1450 VP.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Crecimiento de *Pomacea canaliculata* desde la eclosión hasta la madurez sexual. Copulación y oviposición

En condiciones del corriente estudio, el aumento del largo de la conchilla mostró una curva sigmoideal (Fig. IV.1 y Tabla IV.1). Se pueden observar opérculos con características masculinas (Cazzaniga, 1990), así como actividad copulatoria, desde la quinta semana de desarrollo posterior a la eclosión (*i.e.*, alrededor de los 17.7 mm de largo de conchilla; rango 13.3-21.5 mm). La diferenciación masculina del opérculo parece preceder a las primeras cópulas; sin embargo será necesario diseñar experimentos *ad hoc*, identificando individualmente los animales, para poder establecer la secuencia temporal entre ambos fenómenos. La oviposición en las hembras comienza en la séptima semana (*i.e.*, alrededor de los 23.6 mm de largo de conchilla; rango 17.5-29.6 mm), y los huevos son fértiles desde entonces. No se registraron las diferencias en el crecimiento según el sexo de los ejemplares. No obstante, tal diferencia no fue evidente durante las mediciones.

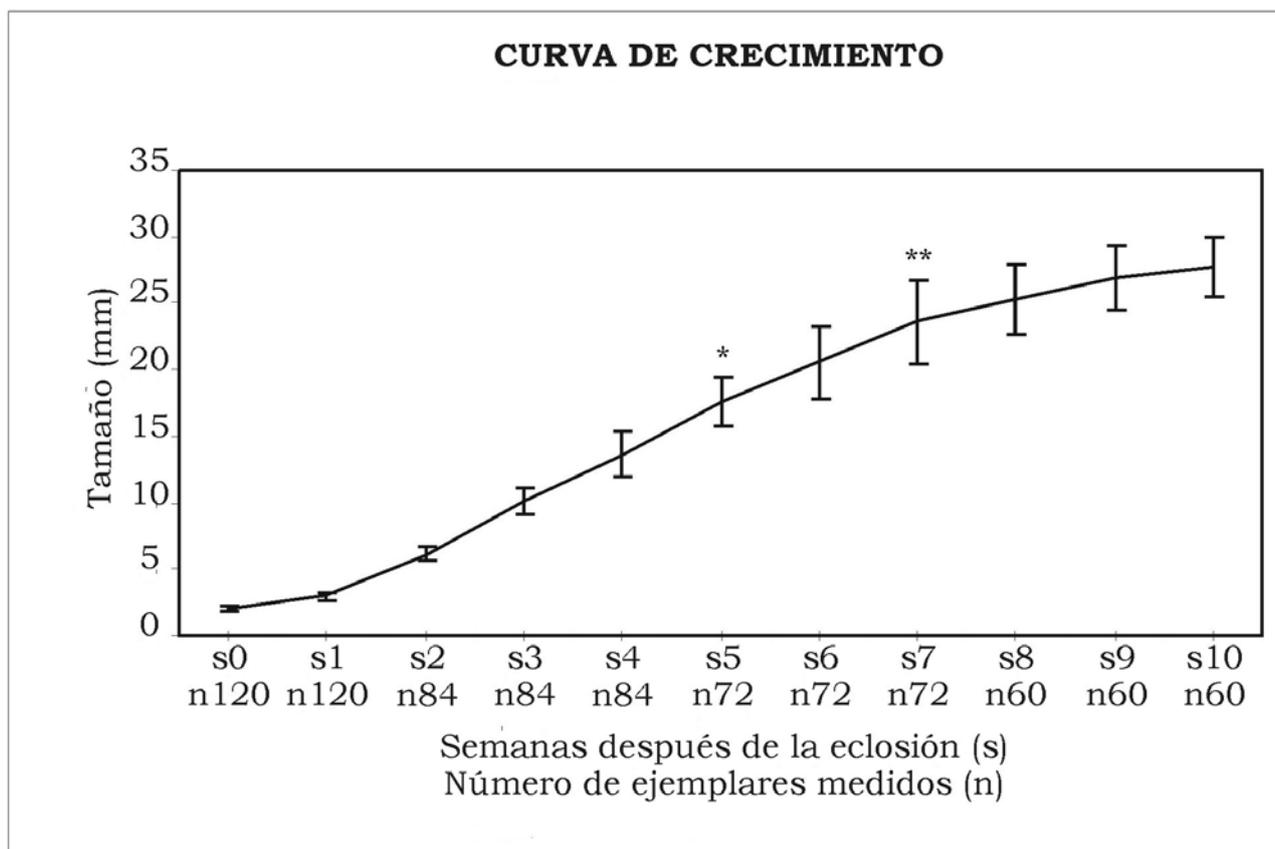


Fig. IV.1. Curva sigmoideal del crecimiento del largo de la conchilla (tamaño) en nuestras condiciones de cultivo ($R^2=0.99$). Las barras indican desvío estándar. Se señalan las etapas cuando comienzan a observarse copulaciones y la diferenciación masculina del opérculo (*), y aquella cuando se observan las primeras oviposiciones (**), las cuales presentan huevos fértiles desde el comienzo.

IV.3.2. Organogénesis reproductiva

IV.3.2.1. Recién eclosionados (largo de la protoconcha, 2 mm): La apariencia externa de los ejemplares recién eclosionados es similar a la de los caracoles adultos. Además del menor tamaño, las mayores diferencias se observan en la conchilla transparente, el color rojizo de la glándula del intestino medio, y la pigmentación incompleta del manto y la región cefalo-podal. En este estadio las estructuras reproductivas sólo pueden apreciarse en cortes microscópicos, y no se distinguen sexualmente.

La sección gonadal del gonoducto es ahora un cordón muy delgado, de células epitelioides indiferenciadas, que se encuentran por debajo del epitelio del manto, sobre la cara columelar de la glándula del intestino medio. La sección siguiente del gonoducto (la sección visceral) desciende la columela como un único cordón celular, también subyacente al epitelio del manto, hasta localizarse dentro de la delgada lámina que forma la pared posterior de la cavidad del manto, donde comienza la sección paleal del gonoducto. Este último se dirige entonces a la derecha, y cruza la epitenia (grueso ligamento que divide las corrientes de agua en la cavidad del manto).

Luego de cruzar la epitenia el gonoducto paleal se dirige adelante, junto a la cara izquierda del recto. A diferencia de las porciones gonadal y visceral del gonoducto, la porción paleal no es maciza, sino que es un conducto rodeado de un epitelio cilíndrico ciliado. Este conducto termina en la cavidad del manto, aproximadamente a media distancia entre la epitenia y el ano (Fig. IV.2.A).

No hay estructuras reconocibles en la cara interna del manto, donde el aparato copulatorio se desarrollará más tardíamente (Fig. IV.2.B).

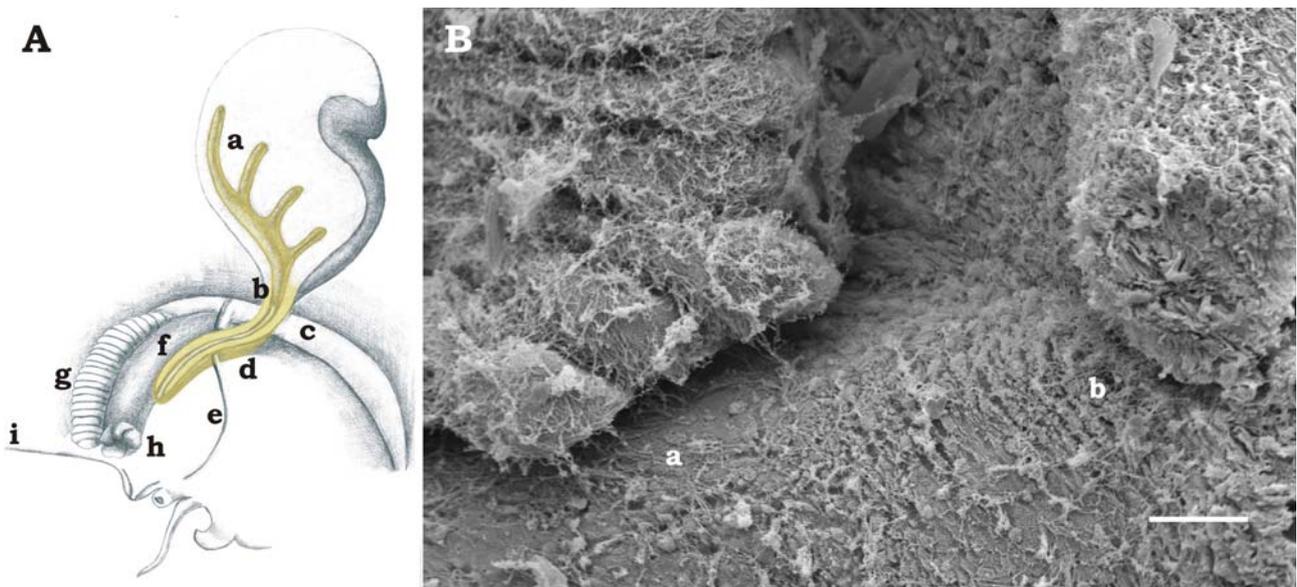


Fig. IV.2. Individuos recién eclosionados, ejemplar de 2 mm. **A**, esquema del gonoducto. En el gonoducto primordial, en amarillo, se ha señalado la parte gonadal del gonoducto, **a**; el gonoducto visceral, **b**; la pared posterior de la cavidad del manto, **c**; el gonoducto paleal, **d**; la epitenia, **e**; el recto, **f**; el ctenidio, **g**; el ano, **h**; y el borde libre del manto, **i**. **B**, micrografía de barrido del borde libre del manto, mostrando la región comprendida entre el extremo distal del ctenidio, (**a**); y el ano, (**b**); este es el sitio donde desarrollará, en estadios futuros, el primordio del aparato copulatorio. La barra indica 30 μ m.

IV.3.2.2. Juveniles de 5 mm: La conchilla es todavía totalmente transparente en este estadio. La glándula del intestino medio ha adquirido el color verdoso oscuro de los adultos y muchos puntos pigmentados oscuros se ven en el epitelio exterior del manto.

La luz del gonoducto se extiende ahora a la mayor parte de la sección visceral, mientras que la sección gonadal se presenta como un cordón sólido ramificado de células epitelioides indiferenciadas sobre la glándula del intestino medio. Una capa de tejido conectivo laxo, de espesor variable, se observa alrededor de los cordones. Por su parte, la sección visceral del gonoducto es un delgado conducto compuesto por un epitelio cilíndrico ciliado, rodeado de una delgada capa muscular; está localizado por debajo del epitelio del manto, y muestra una incipiente distensión próxima al límite paleal. Por lo demás, el gonoducto paleal no difiere, aún, del que se observa en los recién eclosionados (Fig. **IV.3.A**).

El primordio del aparato copulatorio aparece en este estadio, en el borde interior derecho del manto, y consiste en un promontorio con forma de pera, extendido entre el recto y el extremo distal del ctenidio. Un conducto interno del promontorio se abre en la cara que enfrenta al ctenidio. Dentro del promontorio este conducto se divide en dos ramas, las cuales originarán en los machos, presumiblemente, el conducto espermático y el saco peniano. Debe notarse que esta estructura aparece por igual en todos los individuos, y no es por tanto diagnóstica de sexo (Fig. **IV.3.B**).

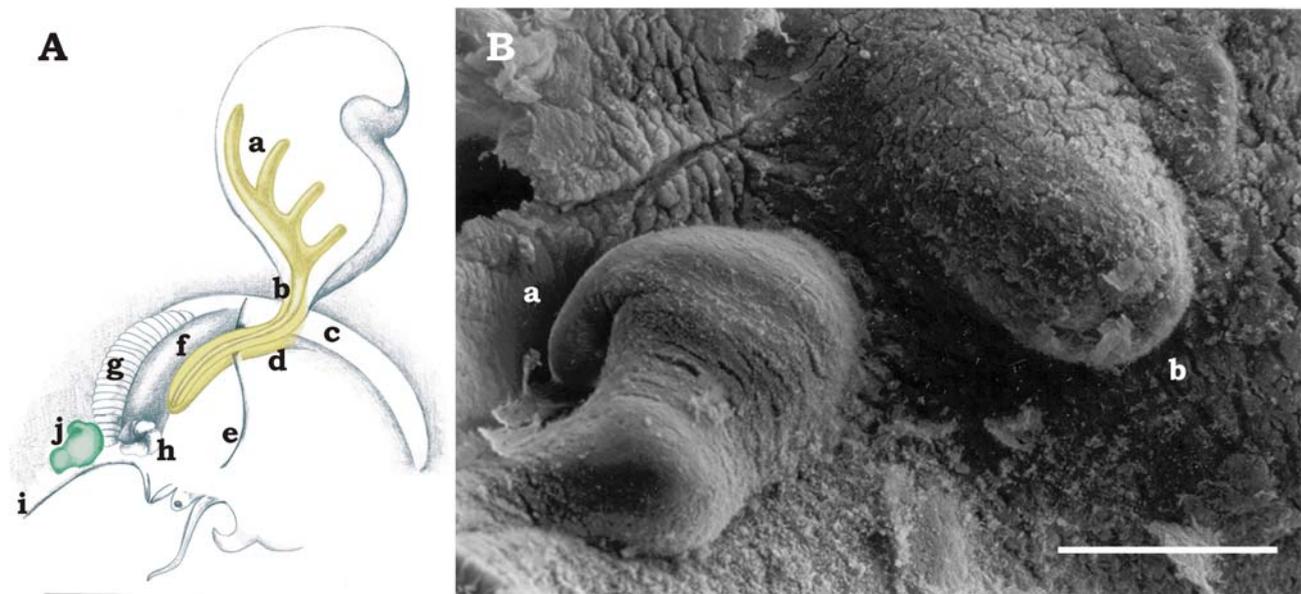


Fig. IV.3. Juveniles de 5 mm. **A**, esquema del gonoducto. En el gonoducto primordial, en amarillo, se ha señalado la parte gonadal del gonoducto **a**; el gonoducto visceral, **b**; la pared posterior de la cavidad del manto, **c**; el gonoducto paleal, **d**; la epitenia, **e**; el recto, **f**; el ctenidio, **g**; el ano, **h**; el borde libre del manto, **i**; y, en verde, el primordio del aparato copulatorio, **j**. **B**, micrografía de barrido del primordio del aparato copulatorio (**a**) mostrando su relación espacial con el ano (**b**). La barra indica 100 μ m.

IV.3.2.3. Juveniles de 10 mm: La conchilla permanece transparente. Sin embargo, el crecimiento y fusión de los puntos negros pigmentados, determinan que el epitelio del manto progresivamente forme una cubierta negra y continua en la superficie externa del manto. En consecuencia, los órganos internos son ahora

más difíciles de reconocer externamente, salvo la glándula del intestino medio (que ocupa la primera vuelta de la conchilla) y el estómago (en la porción más baja de la penúltima vuelta de la conchilla) que son bien visibles.

La sección gonadal del gonoducto puede ahora distinguirse como testículo o como ovario (Fig. **IV.4. A y B**). En el primer caso, con el microscopio estereoscópico, se reconocen pequeños puntos pálidos sobre la cara interna (columelar) de la glándula del intestino medio, que predominan en la primera espira. Estos puntos corresponden, probablemente, a la dilatación de los túbulos testiculares que se observa en los cortes microscópicos. Estos túbulos están rodeados de una capa simple de células de Sertoli y numerosas espermatogonias aparecen libres en la luz. Los núcleos de las células de Sertoli son definidamente más pequeños que en los animales adultos (Gamarra-Luques *et al.*, 2006; Cueto *et al.*, 2006). Una capa bien desarrollada de tejido conectivo laxo rodea a estos túbulos.

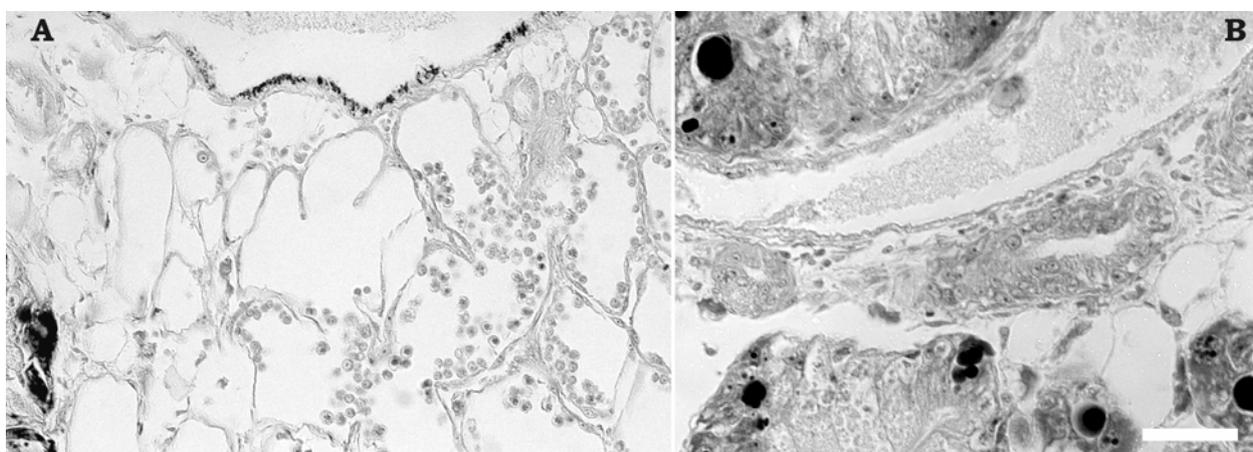


Fig. IV.4. Juveniles de 10 mm. **A**, micrografía de los túbulos testiculares. **B**, micrografía de los túbulos ováricos. La barra indica 50 μ m.

En las hembras, no hay estructuras gonadales que puedan ser identificadas al microscopio estereoscópico; sin embargo, la microscopía de los cortes muestra túbulos con una luz estrecha, en los que ya se distinguen las células de la línea germinal. La capa de tejido conectivo que rodea la gónada primitiva femenina no se halla tan desarrollada como en los machos.

La sección visceral del gonoducto es un delgado conducto en ambos sexos, sin embargo, un definido aumento de la luz, con crestas en su mucosa interna, se observa en ambos sexos precisamente donde el gonoducto alcanza la pared posterior del manto. Este ensanchamiento (que consideramos la primera parte del gonoducto paleal) es mucho más marcado en las hembras (Fig. **IV.5.B**), en las cuales puede ser reconocido ya con el microscopio estereoscópico. Esta zona ensanchada originará el útero en las hembras, y la vesícula seminal en los machos (Fig. **IV.5.A**), i.e., dos órganos que estarán parcial o totalmente localizados dentro del saco visceral en los caracoles adultos (Hylton-Scott, 1958; Andrews, 1964). Sin embargo, consideraremos a estos rudimentos como la primera parte del gonoducto paleal, ya que se forman dentro de la pared posterior del manto. La porción restante del gonoducto paleal es un delgado conducto que se prolonga hacia la derecha y que alcanza el extremo distal del recto.

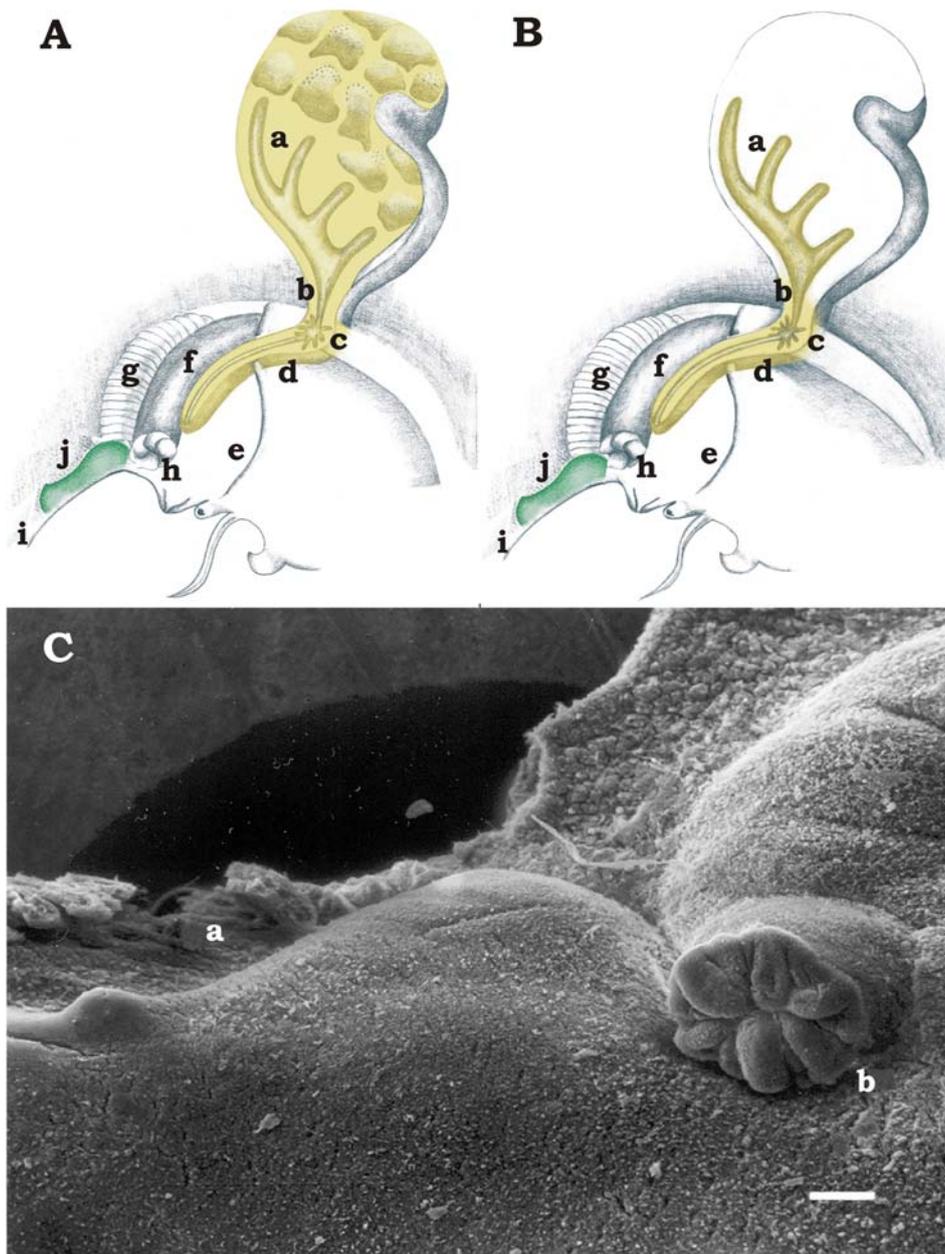


Fig. IV.5: Juveniles de 10 mm. **A**, esquema del gonoducto en machos. Se ha señalado el testículo, **a**; el gonoducto visceral, **b**; dilatación correspondiente a la vesícula seminal, **c**; el gonoducto paleal, **d**; la epitenia, **e**; el recto, **f**; el ctenidio, **g**; el ano, **h**; el borde libre del manto, **i**; y, en verde, el primordio del aparato copulatorio, **j**. **B**, esquema del gonoducto en hembras. Se ha señalado: el ovario, **a**; el gonoducto visceral, **b**; la glándula uterina, **c**; el gonoducto paleal, **d**; la epitenia, **e**; el recto, **f**; el ctenidio, **g**; el ano, **h**; el borde libre del manto, **i**; y, en verde, el primordio del aparato copulatorio, **j**. En **A** y **B**, se muestra en amarillo al gonoducto primordial. **C**, micrografía de barrido del primordio del aparato copulatorio (**a**) mostrando su relación espacial con el ano (**b**). La barra indica 100 µm.

El primordio del borde del manto es aún similar en los dos sexos, y aparece como dos promontorios unidos entre sí y poco pronunciados: el más grande de ellos cercano al recto, y el más pequeño ubicado junto al ctenidio. En este último promontorio se distingue ya la forma de la primitiva vaina peniana, mientras que el más grande originará el saco peniano (Fig. IV.5.C). En las hembras, las proporciones de este rudimento copulatorio permanecerán sin cambios a lo largo

de la vida, excepto por el aumento de tamaño que acompañará el crecimiento general del cuerpo.

IV.3.2.4. Juveniles de 15 mm: En este estadio, el arreglo general del gonoducto presenta cambios más notorios en los machos que en las hembras (Fig. **IV.6.A** y **B**). No obstante, en ambos sexos, el análisis microscópico de la mayor parte de las estructuras (a excepción del gonoducto visceral), resulta sexualmente inequívoco para esta etapa del desarrollo. La pigmentación externa del manto es similar a la de los caracoles adultos. Sin embargo, el testículo es reconocible en la observación por el microscopio estereoscópico como una capa bien delimitada de tejido amarillo claro sobre la cara columelar de la glándula del intestino medio (predominantemente en la primera vuelta). Los túbulos testiculares, más ramificados que en el estadio anterior, se hallan totalmente tapizados de células germinales, ubicadas por dentro de las células de Sertoli (Fig. **IV.7.A**). En los “squash” de testículo se reconocen las primeras formas móviles. Los túbulos del ovario (Fig. **IV.7.B**) presentan mayor calibre que en los individuos de 10 mm, y continúan diferenciándose las células de la línea germinal.

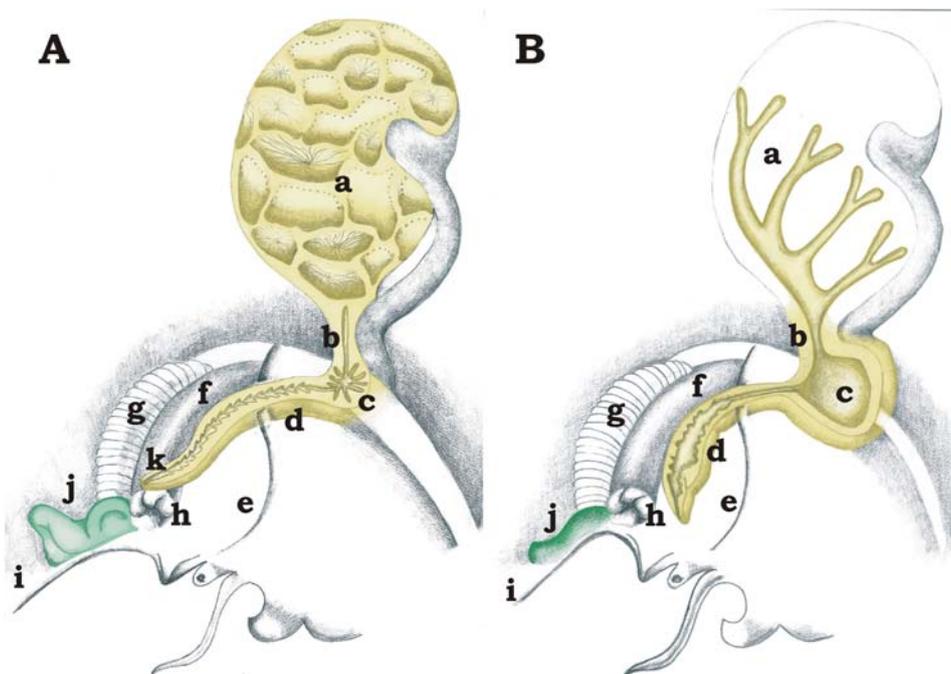


Fig. IV.6. Juveniles de 15 mm. **A**, esquema del gonoducto en machos. Se ha señalado el testículo, **a**; el gonoducto visceral, **b**; la vesícula seminal, **c**; la próstata, **d**; la epitenia, **e**; el recto, **f**; el ctenidio, **g**; el ano, **h**; el borde libre del manto, **i**; en verde, el aparato copulador inmaduro, **j**; y, la papila genital, **k**. **B**, esquema del gonoducto en hembras. Se ha señalado el ovario, **a**; el gonoducto visceral, **b**; la glándula uterina, **c**; la vagina, **d**; la epitenia, **e**; el recto, **f**; el ctenidio, **g**; el ano, **h**; el borde libre del manto, **i**; y, en verde, el primordio del aparato copulador, **j**.

Al igual que en estadios previos, el gonoducto visceral es solamente un delgado conducto que desciende la columela y se continúa con el gonoducto paleal. La futura vesícula seminal continúa su crecimiento en los machos permaneciendo dentro de la pared posterior del manto. En las hembras, el desarrollo del útero es mucho más notable; el receptáculo seminal, así como los primordios de las glándulas de la cápsula y del albumen, aumentan su tamaño dentro de la pared posterior de la cavidad del manto, a la derecha e izquierda, respectivamente, de la intersección de la membrana yuxtacolumelar del manto y la pared posterior de la cavidad paleal.

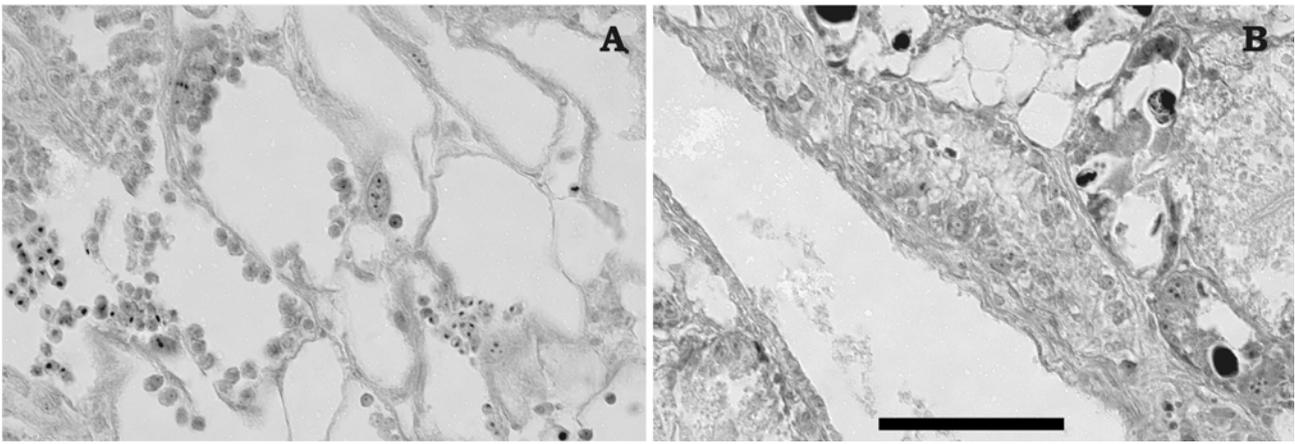


Fig. IV.7. Detalle microscópico de juveniles de 15 mm. **A**, testículo; **B**, ovario. La barra indica 100 μ m.

En los machos, pasado el ensanchamiento de la vesícula seminal, el gonoducto paleal está constituido principalmente por la próstata en desarrollo, la cual comienza como un conducto delgado en el fondo de saco de la cavidad del manto, que dirigiéndose a la derecha cruza la epitenia para dirigirse luego hacia adelante, donde se aproxima a la cara izquierda del recto. Los tributarios del conducto principal de la próstata comienzan a desarrollarse en este estadio, principalmente en la porción distal del conducto principal. Como continuación de este conducto principal, se observa un conducto simple sin tributarios (la futura papila genital) que cruza sobre el recto y termina en relación al ano. Todos los conductos se hallan delimitados por un epitelio cilíndrico, sin diferenciación del sector profundo o “subepitelial” que caracteriza estos tejidos en la vida adulta (ver **III.3.4**).

En las hembras, por el contrario, el gonoducto paleal es también delgado en el fondo de saco de la cavidad del manto, pero luego de la epitenia, se observa una vagina de proporciones aproximadamente adultas, que se dirige hacia adelante, y acompaña el lado izquierdo del recto, terminando en la proximidad del ano, y sin cruzar sobre el recto.

Los derivados del borde del manto también presentan notorias diferencias entre los machos y las hembras de este tamaño. En los machos se diferencian el saco peniano, con un bulbo muscular de color rojo, y la vaina del pene. En los cortes microscópicos se distinguen ya las tres porciones del pene propias de los caracoles adultos (una porción contorneada intrabulbar, una porción enrollada con gran desarrollo de la capa muscular, y una extensión final vermiforme, fig. **IV.8.A**). También, la vaina muestra el surco con su terminación en forma de “T” (apta para la fijación al oviporo, fig. **IV.8.B**); y en su base se observa la brotación, hacia el interior de la base, del primordio glandular de la glándula externa de la vaina peniana. En las hembras, tal como hemos mencionado anteriormente, los derivados internos del borde del manto se asemejan a los machos juveniles de 10 mm.

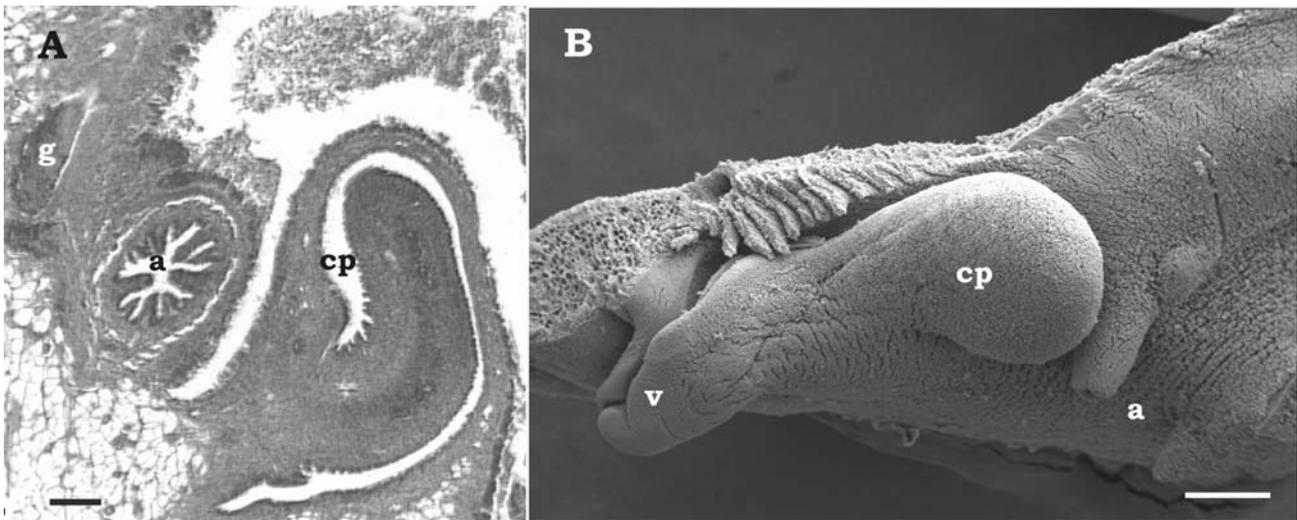


Fig. IV.8. Reborde paleal de machos juveniles de 15 mm. **A**, corte que muestra el complejo peniano (**cp**), los sectores del pene y sus relaciones. Se ha señalado el ganglio copuladorio, **g**; y el ano, **a**. La barra indica 100 μ m. **B**, micrografía de barrido del aparato copuladorio inmaduro, mostrando dos estructuras bien diferenciadas: la vaina, **v**; y el complejo peniano, **cp**; y su relación espacial con el ano (**a**). La barra indica 300 μ m.

IV.3.2.5. Adultos jóvenes de 20 mm: En los machos, el testículo alcanza las proporciones del adulto; dentro de los túbulos se distinguen, además de las células de Sertoli, las células de la línea germinal, con generación de espermios y paraespermios (Fig. **IV.9.A**). En las hembras, un ovario blanquecino, arborescente, con ramificaciones de segundo orden, se extiende sobre la superficie interna de la glándula del intestino medio; en los cortes microscópicos, se observan ovocitos y otras células germinales (Fig. **IV.9.B**). En este estadio, ambos sexos muestran la diferenciación adulta del opérculo y ocurren las primeras copulaciones.

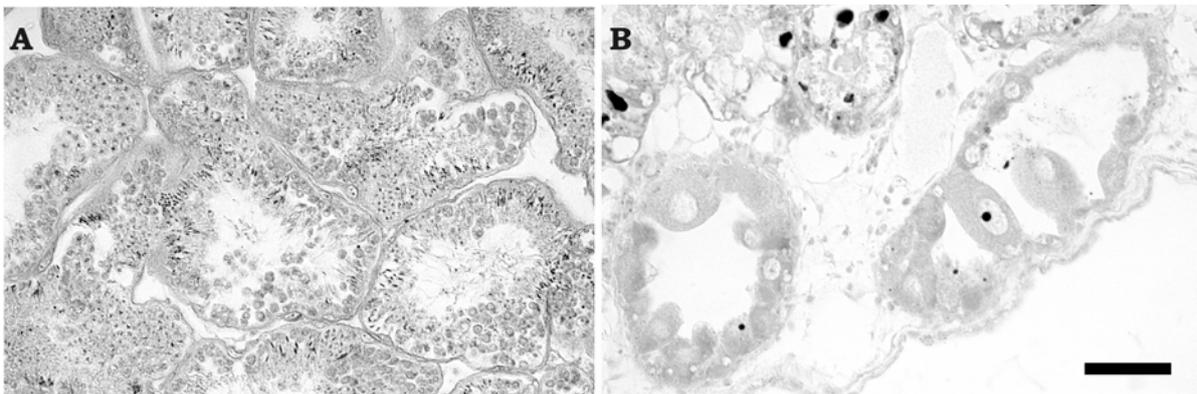


Fig. IV.9. Adultos jóvenes de 20 mm. **A**, micrografía de los túbulos testiculares. **B**, micrografía de los túbulos ováricos. La barra indica 50 μ m.

El gonoducto visceral es un delgado conducto continuo que conecta la gónada con la vesícula seminal (en los machos) o con el útero (en las hembras) (Fig. **IV.10.A** y **B**). Se encuentra recubierto por un epitelio cilíndrico ciliado y se halla por dentro de la capa muscular debajo de la superficie del manto y que es una extensión del músculo aductor.

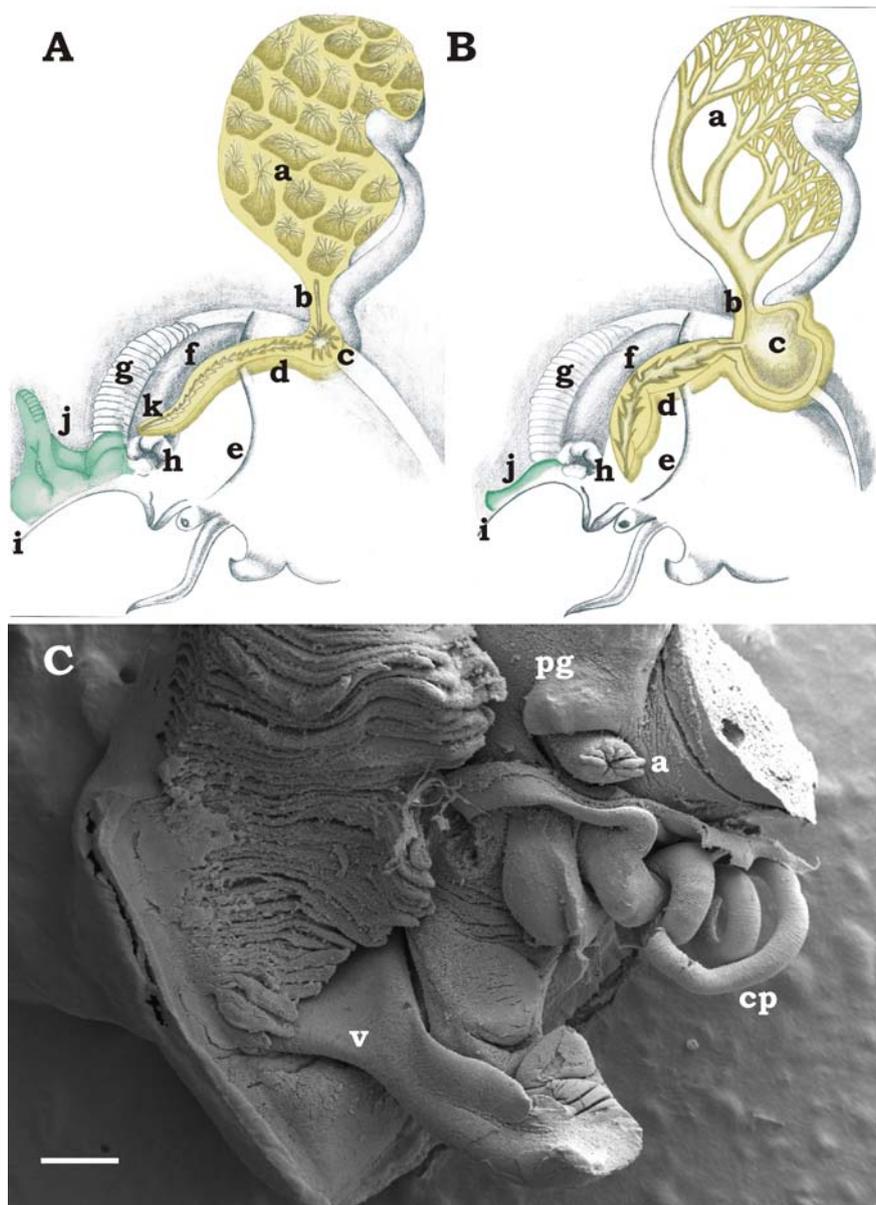


Fig. IV.10. Adultos jóvenes de 20 mm. **A**, esquema del gonoducto en machos. Se ha señalado el testículo, **a**; el gonoducto visceral, **b**; la vesícula seminal, **c**; la próstata, **d**; la epitenia, **e**; el recto, **f**; el ctenidio, **g**; el ano, **h**; el borde libre del manto, **i**; en verde, el aparato copulatorio, **j**; y, la papila genital, **k**. **B**, esquema del gonoducto en hembras. Se ha señalado el ovario, **a**; el oviducto visceral, **b**; el útero (nótese la protrusión de este órgano en la cavidad paleal), **c**; la vagina, **d**; la epitenia, **e**; el recto, **f**; el ctenidio, **g**; el ano, **h**; el borde libre del manto, **i**; y, en verde, el primordio del aparato copulatorio, **j**. **C**, micrografía de barrido del aparato copulatorio mostrando el completo desarrollo de la vaina y sus glándulas (**v**); además, se observa el complejo peniano (**cp**), en el que se ha resecado parte del saco peniano para mostrar el pene. Por otro lado, se observa el completo desarrollo de la papila genital (**pg**) y su relación espacial con el ano (**a**). La barra indica 500 μm .

En los machos, la vesícula seminal se asemeja ya histológicamente a la del adulto: una cavidad cónica, que en su interior presenta crestas longitudinales mucosas, sobre la terminación proximal de la próstata, y en comunicación con el conducto principal de ésta. Por otro lado, se observa crecimiento de los conductos tributarios del conducto principal de la próstata, lo que determina un aumento del grosor en relación a los ejemplares de 15 mm. Todavía no hay desarrollo de tributarios en la papila genital. Tampoco puede ser reconocido, ni

en la próstata, ni en la papila genital, el sector profundo, o “subepitelial”, propio de los epitelios adultos.

En las hembras, la glándula uterina es ya un órgano piriforme que muestra los lineamientos generales de la complejidad del órgano adulto, el cual incluye el receptáculo seminal, la *bursa copulatrix* y las glándulas del albumen y de la cápsula. El crecimiento de este órgano está contenido dentro de la pared posterior del manto, pero haciendo protuberancia dentro de la cavidad renal posterior. La glándula de la cápsula se continúa con la vagina, la cual es un tubo bien desarrollado más delgado proximalmente que en su porción distal. En su superficie interna se observan crestas mucosas longitudinales (principalmente en la porción proximal), y transversas (en la porción distal, cercana al oviporo). Todas las crestas se hallan recubiertas de un epitelio ciliado. Presumiblemente, la mayor altura de las crestas distales determinan el aumento del grosor de la porción distal de la vagina.

En los machos, el saco del pene y la vaina peniana están ya próximos a alcanzar las proporciones adultas (Fig. **IV.10.C**). El conducto de la glándula externa de la vaina se halla ramificado, y las otras glándulas de la vaina (proximal y distal) comienzan a distinguirse. El desarrollo histológico de estas tres glándulas todavía es incompleto, particularmente porque el conspicuo sector profundo o “subepitelial” aún no se ha diferenciado. En las hembras, el aparato copulatorio permanece similar al de los ejemplares de 10 mm.

IV.3.2.6. Adultos de 25 mm: En este estadio, tanto la anatomía macroscópica como la histología del tracto genital es ya la típica de los ejemplares adultos (Cap. III.3, y Hylton Scott, 1958; Andrews, 1964; Thiengo *et al.*, 1993; Catalán *et al.*, 2002; Gamarra-Luques *et al.*, 2006). En los animales de este tamaño se observan frecuentemente copulaciones y puestas fértiles.

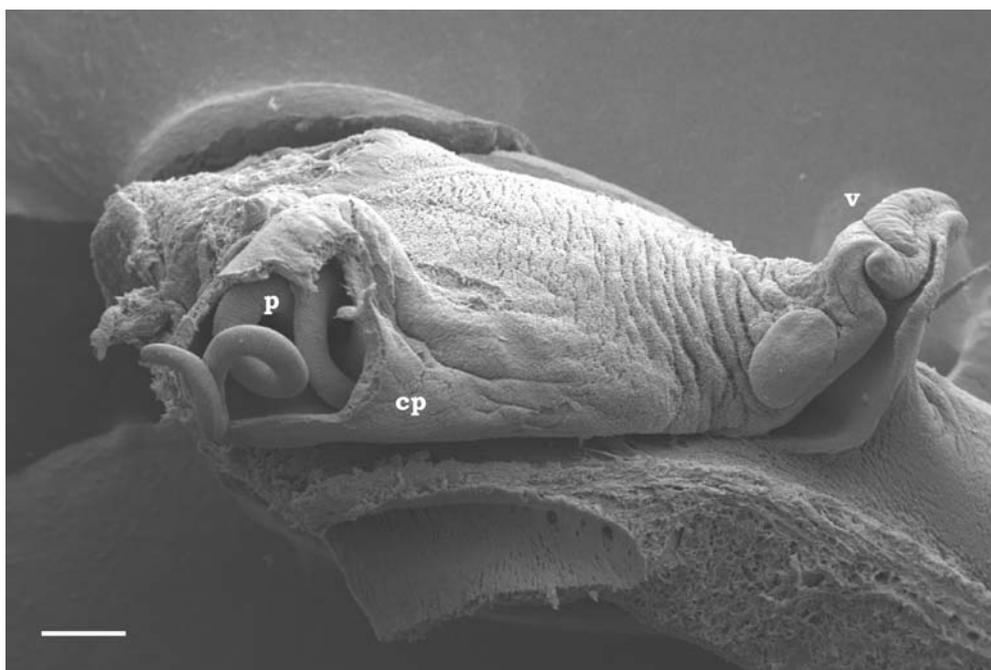


Fig. IV.11. Desarrollo de las estructuras del borde del manto en una hembra vieja. Se muestran: la vaina peniana, **v**; el complejo peniano, **cp**; y, por disección del saco peniano, el pene desarrollado, **p**. La barra indica 300 μm .

IV.3.2.7. Animales viejos (> 50 mm): En nuestras condiciones de cultivo los ejemplares llegan a éste tamaño sólo ocasionalmente, y alrededor del año de vida. Sólo hemos podido caracterizar en las hembras algunos cambios estructurales propios del envejecimiento: (1) la disminución de la concavidad del opérculo femenino, que tiende a volverse plano; y (2) el mayor desarrollo de la vaina peniana (Fig. **IV.11**). Excepcionalmente hemos podido observar el desarrollo de un incipiente pene vermiforme.

IV. 4. Resumen y conclusiones

El crecimiento de los juveniles en nuestras condiciones de cultivo mostró una curva sigmoideal, en la que el enlentecimiento del crecimiento sigue a la aparición de las primeras cópulas. Las puestas tardan unas dos semanas más en aparecer, y son fértiles desde el comienzo.

La organogénesis reproductiva se produce a partir de dos primordios diferentes. El primero está ya presente en los individuos que acaban de eclosionar, y consiste en un cordón sexualmente indiferenciado, macizo en su mayor parte, que se extiende desde la primera vuelta de la protoconcha hasta el margen derecho de la cavidad del manto. Designamos a esta estructura como el gonoducto primordial, y lo suponemos producto de la fusión del primordio gonadal, del riñón rudimentario izquierdo y de su conducto excretor, como Ranjah (1942) mostró en *Pila globosa*.

Este gonoducto debe diferenciarse sexualmente, ya que originará, en el macho, el testículo y los distintos sectores del espermiducto: el vaso deferente, la vesícula seminal, la próstata y la papila genital, mientras que en la hembra originará el ovario y los distintos sectores del oviducto: el oviducto visceral y los dos sectores del oviducto paleal, que son el útero y la vagina. La diferenciación sexual estaría primariamente ligada a la determinación sexual poligénica, ya que no existe, como en los mamíferos (Jost, 1947) un conjunto doble de primordios gonoductales entre los cuales elegir. Otra diferencia con el modelo de Jost (1947) para los mamíferos es que la diferenciación de la gónada no precede sino que es simultánea a la diferenciación del gonoducto extragonadal.

Aproximadamente 10 días después de la eclosión (5 mm de largo de la conchilla), se desarrollará el segundo primordio en la cara interna de la cavidad del manto, entre la terminación anterior del recto y el ctenidio. Este segundo primordio, que dará origen al aparato copulatorio, no se diferencia sexualmente, sino que, simplemente, o se desarrollará plenamente en los machos, o permanecerá vestigial en las hembras.

Capítulo V

Esteroides en el sistema genital masculino

V.1. Introducción

Si bien los primeros estudios de la existencia de esteroides en las gónadas de gasterópodos, y de ampuláridos en particular, fueron conformando lo que hemos llamado una “impoteoría” (ver Cap. II), no es hoy menos cierto que existen, tanto en moluscos como en nemátodos (D’Aniello *et al.*, 1996; Di Cosmo *et al.*, 1998; Thornton *et al.*, 2003; Novillo *et al.*, 2005), sustancias esteroides asociadas a receptores nucleares, y que por tanto, no sería sorprendente que alguna molécula semejante, no necesariamente producida por la gónada, esté jugando un rol androtrófico en los ampuláridos (ver Caps. III y IV).

Como ya dijimos en el Cap. II, las evidencias a favor de un papel fisiológico de esteroides en los ampuláridos se restringen actualmente a dos informes de Takeda (2000a; 2000b), uno sobre la acción de la testosterona sobre el aparato copulatorio de *Pomacea canaliculata*, y otro sobre la detección de esteroides en gónadas y glándula uterina de esta misma especie, así como también a experimentos realizados con xenobióticos, en el ampulárido *Marisa cornuarietis* (Oehlmann *et al.*, 2000; Schulte-Oehlmann *et al.*, 2000; 2004; Tillmann *et al.*, 2001).

En esta parte de nuestro estudio describiremos la distribución de esteroides en sectores del sistema genital masculino de *P. canaliculata* que fueron seleccionados como posibles sitios de producción y/o acción de androtrofinas.

V.2. Material y métodos

V.2.1. Animales

Se utilizaron machos adultos (de más de 3.5 cm de largo total de la conchilla) y sexualmente activos (ver III.2 para más detalles).

V.2.2. Órganos y tejidos estudiados

Previo a la disección, los ejemplares fueron colocados durante 15 minutos a 4°C, y después de la remoción de la conchilla, se disecaron sobre hielo muestras del testículo, y de una serie de órganos seleccionados como blancos presuntos de

androtrofinas (próstata, glándula externa de la vaina, el extremo de la vaina -que contiene las glándulas proximal y distal-, y el complejo peniano). También se obtuvieron muestras de la glándula del intestino medio y de hemolinfa (obtenida por punción del músculo columelar).

V.2.3. Extracción de esteroides

Las muestras de tejido (N=10 para cada grupo) fueron homogenizadas en un aparato Ultraturrax®, en una concentración de 100 mg/ml de tejido en buffer PBS-BSA-EDTA (PBS 0,1M; ClNa 0,9%; BSA 0,1%; EDTA 1mM; pH 7,4) en presencia de azida sódica al 0,1 %.

Para las corridas cromatográficas en capa delgada (TLC) se utilizaron 2 ml de homogenado, los que se extrajeron con 5 ml de éter de petróleo (para las corridas de progesterona) o con 5 ml de éter etílico (para las corridas de androstenodiona, testosterona o estradiol). Posteriormente, cada tubo fue agitado vigorosamente, y fue luego enfriado durante 10 minutos a -70°C para que se congelara la fase acuosa, luego de lo cual, la fase orgánica se retomó en un nuevo tubo. Las etapas de adición de solvente, agitación y congelamiento se realizaron un total de tres veces para cada alícuota. El volumen de solvente correspondiente a las tres extracciones se evaporó a seco utilizando una corriente de nitrógeno.

Para las determinaciones por radioinmunoensayo se obtuvieron tres alícuotas del homogenado de cada muestra, así como de las muestras de hemolinfa; dos de ellas fueron utilizadas para los duplicados del radioinmunoensayo y la restante para el control de la recuperación hormonal en la extracción (ver más adelante). Las alícuotas de homogenado fueron de 300 μl para progesterona, 100 μl para androstenodiona y 150 μl para testosterona y estradiol. A cada alícuota de homogenado o de hemolinfa se agregaron 5 ml de éter de petróleo (30° - 65°C) para la extracción de progesterona, o 1,5 ml de éter etílico para la extracción de androstenodiona, testosterona y estradiol.

V.2.4. Cromatografía en capa delgada (TLC)

El extracto seco obtenido de cada muestra de tejido fue redissuelto en 50 μl de éter etílico y sembrado en placas de sílica con indicador de fluorescencia (Merck cód: 1.05554, G-60 F254, 0.2 mm de espesor), previamente secadas y activadas a 60°C . Como controles, en las mismas placas fueron sembrados los estándares correspondientes: progesterona, Sigma P-0130; 4-androsteno-3,17-diona, Sigma A-9630; β -estradiol, Sigma E-8875 y; Testosterona, Sigma T-1500. El solvente de corrida utilizado fue cloroformo con el agregado de 3% de metanol. Las corridas se interrumpieron cuando el frente alcanzó 1 cm por debajo del límite superior de la placa, calculándose el Rf como la relación entre la distancia recorrida por cada banda y la recorrida por el frente. Las placas fueron primero observadas bajo luz ultravioleta, bajo la cual los esteroides con doble ligadura en el ciclo A, tales como progesterona, androstenodiona y testosterona, dan señal fluorescente; mientras que los esteroides aromáticos como estradiol, no la dan. Posteriormente, todas las bandas fueron reveladas por carbonización, mediante el tratamiento de rociado con ácido sulfúrico en agua al 50%, y calentamiento a 140°C (que revela la presencia de compuestos orgánicos).

V.2.5. Radioinmunoensayos (RIAs)

Al producto seco de la extracción se le agregó un volumen de buffer PBS-BSA-EDTA equivalente al volumen inicial de la alícuota y se incubó en baño ultrasónico a 36°C, durante 1,5 horas, agitando vigorosamente, mediante vórtex, por 1 minuto a los 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos de la incubación. Luego de lo cuál las muestras se mantuvieron selladas a 4°C.

A una alícuota de cada caso se le agregó hormona radioactiva (H^3 -progesterona, H^3 -androstenediona, I^{131} -testosterona o I^{131} -estradiol), antes de que los tubos fueran extraídos como acabamos de describir. Los tubos fueron después contados para evaluar la eficiencia de la extracción de cada caso en particular.

V.2.5.1. RIA de progesterona: el método ha sido descrito y validado previamente [Castro-Vazquez y Carreño, 1981]. Se utilizó, [1,2,6, 3H]progesterona (New England Nuclear, Boston, MA; spec. act. 90-115 Ci/nmol). El suero anti-progesterona fue generado en conejos, en nuestro laboratorio, y fue usado en una dilución 1:15000, para obtener un 40% de unión a la progesterona marcada. La reactividad cruzada del antisuero (considerando el desplazamiento producido por la progesterona como 100%) fue determinado para 20α -hidroxiprogesterona, 17α -hidroxiprogesterona, corticosterona, pregnenolona, testosterona y 17β -estradiol; presentando todos valores menores al 1%. El mínimo detectable en 4 ensayos fue 2.5 ng/ml o menos; los coeficientes porcentuales de variación en los mismos ensayos fueron 6.3% (3% - 9%, intraensayo) y 17% (interensayo).

V.2.5.2. RIA de androstenediona: el método ha sido validado y descrito anteriormente (Buzio, 2001). Se utilizó [1,2,6,7- 3H]androst-4-eno-3,17 β -diona (Amersham International: Buckinghamshire, England; spec. act. 96 Ci/nmol). El suero anti-androstenediona fue generado en conejos en nuestro laboratorio y usado en una dilución de 1:7000, para obtener un 40% de unión de la androstenediona marcada. Se utilizó carbón activado para separar la fracción libre de la unida. La reactividad cruzada del antisuero (considerando al desplazamiento producido por la androstenediona como 100%) fue determinado para dehidroisoandrosterona (8.32%), dehidroepiandrosterona (5.71%), testosterona (0.5%); dihidrotestosterona (0.45%); 5α -androstano- $3\beta,17\beta$ -diol, 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol, corticosterona, cortisol, pregnenolona, 17α -hidroxiprogesterona, 20α -dihidroxiprogesterona, progesterona y 17β -estradiol (< 0.1%). El mínimo detectable en 3 ensayos fue 200 pg/ml o menos. Los coeficientes porcentuales de variación en los mismos ensayos fueron 9.5% (8.1% - 12.1%, intraensayo) y 7% (interensayo).

V.2.5.3. RIA de testosterona: Se utilizó un kit comercial (DSL-4100, Diagnostic System Laboratories, Inc.) que emplea [^{125}I]-testosterona como marcador y con el que se separan las fracciones libre y unida con un segundo anticuerpo y polietilenglicol. La reactividad cruzada del antisuero (testosterona: 100%) fue determinada por el proveedor del kit para dihidrotestosterona (6.6%); 5 -androstano- $3\beta,17\beta$ -diol (2.2%); 11-oxotestosterona (1.8%); androstenediona (0.9%); 5β -dihidrotestosterona (0.6%); 5β -androstano- $3\beta,17\beta$ -diol (0.5%); 17β -estradiol (0.4%); 5α -androstano- 3α -ol-17-ona (0.2%); 11β -hidroxitesterona, 11β -hidroxiandrostenediona, 5α -androstano- $3\beta,17\beta$ -diol-11-ona, 5α -androstano-

3,17-diona, 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol, 5 β -androstano-3,17-diona, dehidroepiandrosterona, estrona, estriol, corticosterona y progesterona (< 0.1%). El mínimo detectable en 3 ensayos fue 100 pg/ml. Los coeficientes porcentuales de variación en los mismos ensayos fueron 5% (intraensayo) y 3% (interensayo).

V.2.5.4. RIA de estradiol: También se utilizó un kit comercial (DSL-4800, Diagnostic System Laboratories, Inc.). Se utilizó [¹²⁵I]-estradiol como marcador y se separaron las fracciones libre y unida con un segundo anticuerpo y polietilenglicol. La reactividad cruzada del antisuero (17 β -estradiol: 100%) fue determinada por el proveedor del kit para D-equilenin (3.4%); 17 β -estradiol-3-glucurónido (2.56%); estrona (2.4%); estriol (0.64%); equilin (0.34%); 17 α -estradiol y 16-ketoestradiol (0.21%); estrona- β -D-glucurónido (0.2%); estradiol-3-sulfato (0.17%); estrona-3-sulfato (0.01%); testosterona, dehidroepiandrosterona, dietilestilbestrol y 17 β -estradiol-17-glucurónido (< 0.01%). El mínimo detectable en 3 ensayos fue 5 pg/ml. Los coeficientes porcentuales de variación en los mismos ensayos fueron 5% (2% - 10%, intraensayo) y 4% (interensayo).

V.2.6. Determinación de colesterol libre y esterificado

Se utilizaron 10 agregados ("pools") de 500 mg, correspondientes a cada uno de los órganos estudiados, los que fueron extraídos en 10 ml de una solución de cloroformo y metanol (2:1) durante toda la noche a 4°C. Luego, los tubos fueron centrifugados a 4°C, a 10 g, durante 30 minutos. Los sobrenadantes obtenidos fueron traspasados a nuevos recipientes, previamente tarados, a los que se secó con una corriente de nitrógeno, obteniéndose la cantidad de lípidos totales por diferencia de peso. Cada extracto seco fue disuelto en 1 ml de hexano, separándose una alícuota de 150 μ l para la determinación de colesterol total y otra para cromatografía en capa delgada. Se prepararon estándares de colesterol (Sigma C8667) de 0,25; 0,50 y 1 mg/ml. Estándares y totales fueron secados mediante corriente de nitrógeno y mantenidos a 4°C. Otra alícuota de 150 μ l se separó mediante cromatografía de capa delgada. Las placas de sílica gel (Merck cód: 1.05554. G-60 F254. 0.2 mm) previamente activadas se corrieron con solvente (hexano : éter etílico : ac. acético (80:20:1)) hasta 2 cm del borde superior luego de lo cual se revelaron mediante vapores de yodo, marcando las bandas en la sílica mediante una aguja fina. Una vez que el color dado por el yodo desapareció (generalmente al otro día) las zonas marcadas fueron raspadas y colocadas en un nuevo tubo. Estos tubos, más el extracto seco de estándares y totales fueron incubados a 60°C durante una hora con 3 ml de una solución saponificante de KOH (Merck) al 2% en etanol 95°. Para la extracción del colesterol se agregaron 3 ml de hexano (agitando vigorosamente durante 1 minuto), seguidos de 3 ml de agua destilada. Una vez decantada la fase orgánica, se la separó y secó con una corriente de nitrógeno. La reacción de coloración se efectuó mediante el agregado de 3 ml de ácido acético glacial, seguidos de 2 ml de una solución de ácido sulfúrico y cloruro férrico al 10% en ácido acético glacial. Luego de una agitación vigorosa, se dejaron los tubos en la oscuridad durante 30 minutos. La cuantificación espectrofotométrica se realizó a 560 nm.

V.3. Resultados

V.3.1. Exploración cromatográfica de los esteroides presentes en los extractos tisulares

Con la excepción del testículo, cuyo extracto tisular mostró una sola banda fluorescente en la TLC, los demás extractos tisulares estudiados (glándula del intestino medio, próstata, complejo peniano, glándula externa de la vaina, y el extremo distal de ésta, que incluye las glándulas proximal y distal), todos mostraron tres bandas fluorescentes en el cromatograma. En ninguno de los tejidos estudiados se observaron bandas carbonizadas, fuera del origen, que no hubieran sido fluorescentes.

La banda menos polar mostró un Rf de 0,84 (rango 0,83-0,85 entre los distintos órganos estudiados), idéntico al de la progesterona control. La siguiente banda mostró un Rf de 0,79 (rango: 0,78-0,79), semejante al estándar de androstenodiona (Rf=0.81). Y la tercera banda (Rf=0,66, rango: 0.65-0,66) corrió con un Rf mayor que el de la testosterona auténtica (Rf=0.51). Esta banda fue la única presente en tejido testicular.

V.3.2. Cuantificación por radioinmunoensayo de los esteroides presentes en los extractos tisulares

Radioinmunoensayos sensibles y específicos para progesterona, androstenodiona, testosterona y estradiol no detectaron a ninguno de estos compuestos en el testículo.

Las Figs. **V.1** (para progesterona) y **V.2** (para androstenodiona) muestran los niveles tisulares detectados en los demás órganos. Se detectaron niveles de progesterona, entre 18 y 46 ng/100 mg tejido, en la glándula del intestino medio, la próstata, el complejo peniano y la glándula externa de la vaina. En el extremo distal de ésta se detectaron valores muy bajos en los cuales la cuantificación no resulta confiable. Lo mismo ocurrió con la hemolinfa.

Asimismo, se detectó androstenodiona en todos esos tejidos (230-752 pg/100 mg tejido). Esta vez, las cantidades presentes en el extremo distal de la vaina, aunque no en la hemolinfa, pudieron ser medidas con precisión.

V.3.3. Cuantificación del colesterol total y de su fracción esterificada en los extractos tisulares

Las concentraciones de colesterol libre (mg/g de tejido) en los distintos órganos estudiados se muestra en la Fig. **V.3**. Sólo la glándula del intestino medio mostró una alta relación esterificado/libre (0,27), mientras que, en los demás tejidos esta relación fue igual o inferior a 0,05, indicando que sólo la glándula digestiva tiene una significativa capacidad de generar o almacenar esta forma de depósito del colesterol, la que podría ser utilizada para sintetizar los esteroides detectados.

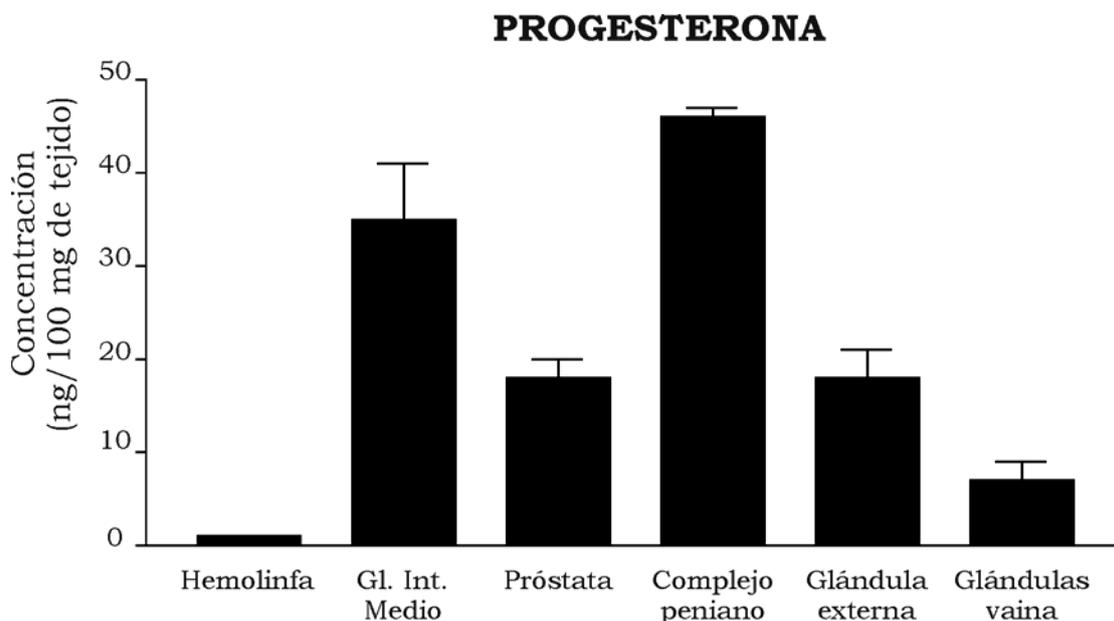


Fig. V.1. Concentración de progesterona (ng/100 mg de tejido) en distintos órganos de machos adultos de *P. canaliculata* (valores medios indicados al pie de cada barra).

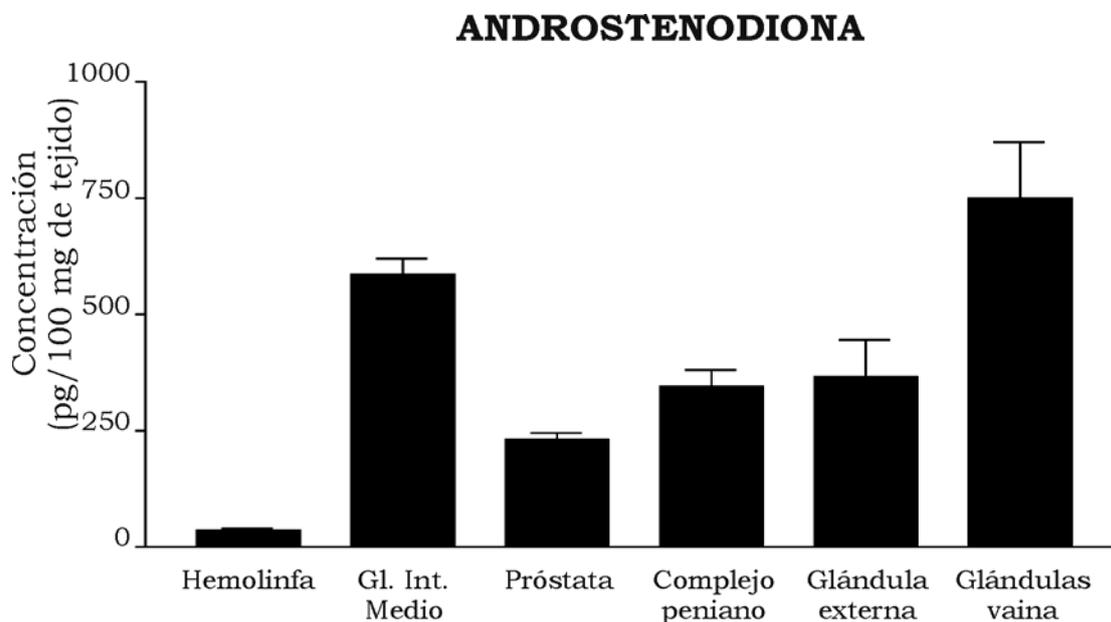


Fig. V.2. Concentración de androstenediona (pg/100 mg de tejido) en distintos órganos de machos adultos de *P. canaliculata* (valores medios indicados al pie de cada barra).

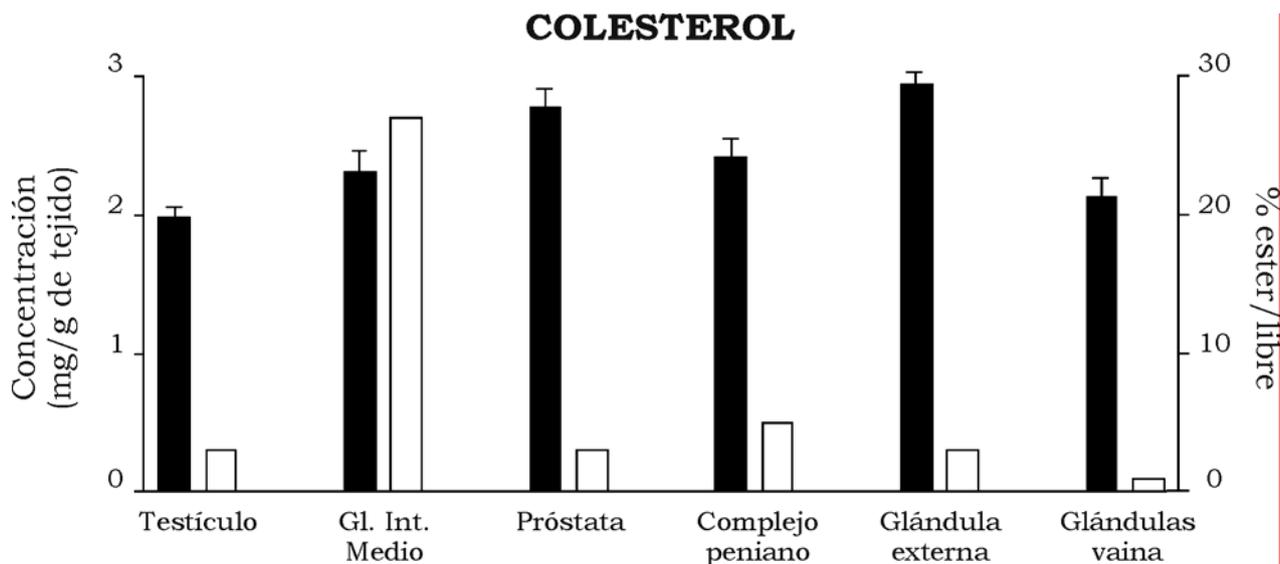


Fig. V.3. Cantidad absoluta de colesterol libre (barras oscuras), colesterol esterificado (barras intermedias) y la relación entre las cantidades de colesterol esterificado y libre (barras claras) en distintos órganos de machos adultos de *P. canaliculata*.

V.4. Resumen y conclusiones

La progesterona y la androstenodiona resultaron los esteroides presentes en mayor concentración en los órganos estudiados. Sus concentraciones son comparables a las concentraciones de esteroides reportadas en moluscos por otros autores (*e.g.*, D'Aniello *et al.*, 1996). Sin embargo, estas concentraciones fueron relativamente bajas si se las compara con las concentraciones circulantes en algunos mamíferos, taxón en el que hay una extensa experiencia (*e.g.*, Buzzio y Castro-Vazquez, 2002). Como era de esperar, los niveles en el plasma hemolinfático fueron aun menores a los observados en tejidos, y fueron difícilmente mensurables. Por su parte, en los extractos de tejido testicular no se detectó progesterona ni androstenodiona.

Una tercera sustancia, presuntamente esteroidal, fue detectada mediante TLC en todos los órganos estudiados, aun el testículo. Como su movilidad es algo mayor que la de la testosterona, es posible que sea una forma esterificada de este esteroide, tal como lo han reportado Gooding y LeBlanc (2001) en el nasárido *Ilyanassa obsoleta*. La testosterona en su forma libre no ha sido detectada en ninguno de los órganos de *Pomacea canaliculata* estudiados.

Todas las bandas carbonizables de los cromatogramas mostraron previamente fluorescencia a la luz ultravioleta, lo que indica la ausencia de esteroides aromáticos en los tejidos estudiados. Concordantemente, no se detectó estradiol por radioinmunoensayo en ninguno de ellos.

Entre los órganos estudiados, sólo la glándula del intestino medio mostró la capacidad de acumular ésteres de colesterol, lo que asociado con la presencia de progesterona y androstenodiona en sus extractos, sugiere su posible importancia central en un sistema organizado para la generación de estas sustancias hormonales, desde el cual la progesterona y la androstenodiona fueran liberados a la circulación, para actuar y/o ser transformados en los órganos efectores.

Como resulta claro, no hemos confirmado aquí la presencia de concentraciones significativas de testosterona en el testículo (reportada por Takeda, 2000b), y por tanto, la hipótesis de la gónada como un órgano endócrino, que sea el lugar de síntesis de los esteroides tróficos del tracto genital en esta especie, parece rechazada.

En la Discusión General (Cap. VII) estos resultados serán integrados, con los del próximo capítulo, en una hipótesis general de la regulación androtrófica en esta especie.

Capítulo VI

¿Un receptor de progesterona?

VI.1. Introducción

El hallazgo de progesterona y androstenodiona como los esteroides de mayor concentración en los tejidos de *Pomacea canaliculata*, propone la cuestión de sus posibles roles androtróficos.

Una exploración detallada de esta cuestión, sin embargo, excede los límites de esta tesis, ya que la demostración directa de la acción androtrófica misma, en alguno o en varios sitios del complejo sistema reproductivo de esta especie, se toparía con la imposibilidad de utilizar el clásico método de ablación y sustitución, con el que se construyeron las bases de la endocrinología de los vertebrados. En efecto, las características propias del sistema genital de la especie en estudio, y en general, las de todos los sistemas de regulación parácrina, hacen imposible la aplicación de ese método.

Una estrategia alternativa involucraría la búsqueda de secuencias de receptores en el genoma de *P. canaliculata*, el mapeo de los tejidos que expresan esos genes y la demostración de la capacidad de las proteínas receptoras para unir los ligandos con especificidad y alta afinidad. Esto debería coronarse con la demostración de la acción de estos esteroides en algún fenómeno crítico del trofismo genital en esta especie y, eventualmente, la inhibición de ésta acción por antagonistas específicos (por ejemplo, mifepristona para las acciones tróficas mediadas por progesterona).

En este capítulo daremos un primer paso en el marco de esa estrategia, mostrando la expresión de una secuencia propia del receptor de progesterona, y mapeando la expresión de esa secuencia en distintos órganos del sistema genital masculino de *P. canaliculata*. Otros estudios en nuestro laboratorio han obtenido evidencias semejantes, aunque aún preliminares, respecto del receptor de andrógenos.

No obstante, no debemos perder de vista que la interpretación de éstos resultados debe hacerse en el marco de lo que se conoce o se ha teorizado sobre la evolución de los receptores nucleares (De Mendonca *et al.*, 1999; Nagl *et al.*, 1999; Escrivá *et al.*, 2000).

Estos receptores conforman una superfamilia de factores transcripcionales, que son típicamente activados por ligandos específicos, y que regulan una amplia variedad de funciones. Como consecuencia de la unión de estos receptores

activados a secuencias específicas del DNA, se expresan otras proteínas a través de las cuales se ejercen las acciones tradicionalmente atribuidas a las hormonas.

La estructura común a todos los receptores nucleares incluye tres dominios distintos: el dominio amino-terminal, el dominio central de unión al DNA (que está compuesto por dos estructuras estabilizadas por Zn^{++} , llamadas “dedos de zinc”) y por el dominio de unión al ligando. Cuando el ligando se une al receptor, éste sufre un cambio conformacional que altera su afinidad por el DNA, así como por otras proteínas que funcionan como co-activadoras o co-represoras (McKenna y O'Malley, 2000; Rosenfeld y Glass, 2001; Smith y O'Malley, 2004), resultando a través de estos cambios la transcripción de genes que es característica de la respuesta hormonal.

De la especificidad y afinidad de la unión ligando-receptor depende la precisión y efectividad de la respuesta. Los receptores de hormonas esteroideas de los mamíferos nos proveen algunos ejemplos notables de esa especificidad, en que pequeñas diferencias en la estructura química del ligando (por ejemplo, las diferencias existentes entre progesterona y aldosterona) se asocian a diferencias sorprendentes en las funciones que se cumplen (mientras que la progesterona tiene un rol destacado en la regulación de la reproducción, la aldosterona lo tiene en la homeostasis del medio interno).

Los receptores nucleares habrían aparecido muy temprano en la evolución de los metazoos, y están hoy presentes en muchos de sus *phyla*⁶. Las moléculas a partir de las cuales los receptores nucleares habrían evolucionado, son los llamados receptores ancestrales (Amero *et al.*, 1992) cuya función podría haber sido similar a la del receptor de estrógenos (Thornton, 2001; Thornton *et al.*, 2003). En el proceso evolutivo estos receptores habrían aumentado progresivamente la especificidad del dominio de unión al ligando, permaneciendo más conservada la secuencia correspondiente al dominio de unión al DNA. El análisis filogenético de estos dominios conservados es el que ha permitido dividir a estos receptores en seis familias (Escriba *et al.*, 2000). En estas familias se incluyen receptores para los cuales su ligando es conocido (como los receptores de hormonas tiroideas, ácido retinoico, vitamina D y esteroides), así como una importante cantidad de receptores “huérfanos”, para los cuales el ligando no ha sido identificado, o quizás, no exista.

Al final de este capítulo comentaremos las posibles implicancias de lo que ahora describiremos: la presencia y expresión de secuencias correspondientes al dominio de unión al ligando de un posible receptor de progesterona en *P. canaliculata*.

⁶ No se conocen receptores nucleares en los Ecdysozoa, lo que incluye nada menos que al *phylum* Arthropoda. Thornton *et al.* (2003) han propuesto que los receptores nucleares habrían aparecido antes de la diferenciación de los Bilateria, y que los Ecdysozoa habrían perdido estos genes.

VI.2. Material y métodos

VI.2.1. Animales

Se utilizaron machos adultos (de más de 3,5 cm de largo total de la conchilla) y sexualmente activos (ver **III.2** para más detalles). Para demostrar la expresión de un “receptor de progesterona” en la glándula externa de la vaina fue necesario utilizar animales sacrificados al menos 12 horas después de la copulación, esto estaría relacionado a la presencia de inhibidores de la polimerasa en el producto de esta glándula secretado durante la copulación.

VI.2.2. Obtención de las muestras

Previo a la disección, los ejemplares fueron colocados durante 15 minutos a 4°C, y después de la remoción de la conchilla, se disecaron sobre una planchuela de aluminio colocada sobre hielo muestras del testículo, la glándula del intestino medio, la próstata, el complejo peniano y las glándulas externa, proximal y distal de la vaina (a diferencia del estudio del Cap. **V**, las glándulas proximal y distal fueron separadas del tejido esponjoso de la vaina, pero fueron, aquí también, procesadas juntas). Para la puesta a punto de los métodos se utilizó como control positivo ovario de rata del día 19 de gestación. Después de la disección de los caracoles, se pusieron 100 mg de cada tejido, a excepción de la glándula del intestino medio (ver más adelante), en un tubo (siempre correspondiendo a un solo animal), a los que se agregó 1 ml de Trizol® (InVitrogen Life Technologies) a 4°C. La homogenización se hizo en baño de hielo, hasta la licuefacción total de los tejidos, con un Ultraturrax®. Previo a las homogenizaciones, el vástago del homogenizador fue tratado por 2 h con dietilpirocarbonato (0.1%, v/v) y autoclavado a 120°C durante 15 min. Después de homogenizar cada muestra, el vástago fue lavado con agua destilada, secado y enjuagado en Trizol®. Después de la homogenización, los aglomerados celulares fueron precipitados mediante un solo golpe de centrifuga. Se tomaron 800 µl del sobrenadante en un nuevo tubo y se continuó con la purificación.

El procesamiento de la glándula del intestino medio requirió un paso previo para remover las células de sus endocitobiontes (Castro-Vazquez *et al.*, 2002; Vega *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2006) cuyo extracto contiene potentes inhibidores de la PCR (Vega *et al.*, 2005). Ese paso consistió en homogenizar 600 mg de tejido en 800 µl de cloruro de sodio 0.1 % estéril a 4°C, precipitar el homogenado con un golpe de centrifuga, y tomar 100 µl del sobrenadante, mezclarlos con 1 ml de Trizol®, y recoger 800 µl en un nuevo tubo. A partir de ese momento todas las muestras fueron tratadas de la misma forma.

VI.2.3. Purificación del RNA

Se continuó con la purificación de RNA según el método de Trizol® (InVitrogen Life Technologies) obteniendo un precipitado de RNA que fue resuspendido en 100 µL de agua libre de RNAsa (InVitrogen Life Technologies). Esta resuspensión fue disuelta 1/50 en buffer TE (Tris-Cl-, 10mM y EDTA, 1 mM; pH 7,4), tomándose luego 1 mL para las lecturas espectrofotométricas a 260 y 280 nm.

Para la cuantificación se utilizó la lectura a 260 nm, mientras que para el control de la pureza se utilizó la relación de ambas lecturas. Sólo se utilizaron muestras en las que la relación 260/280 resultó mayor o igual a 1,65.

VI.2.4. Retrotranscripción

Para obtener el cDNA correspondiente al RNA extraído de los distintos órganos (Fig. VI.1), se utilizaron 10 µg de éste, los que se incubaron con retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina tipo Moloney, y con hexámeros cebadores al azar (ambos de InVitrogen Life Technologies) a 37°C, en un volumen final de reacción de 20 µl. Como control negativo se procesaron todos los reactivos pero sin el agregado de cDNA.

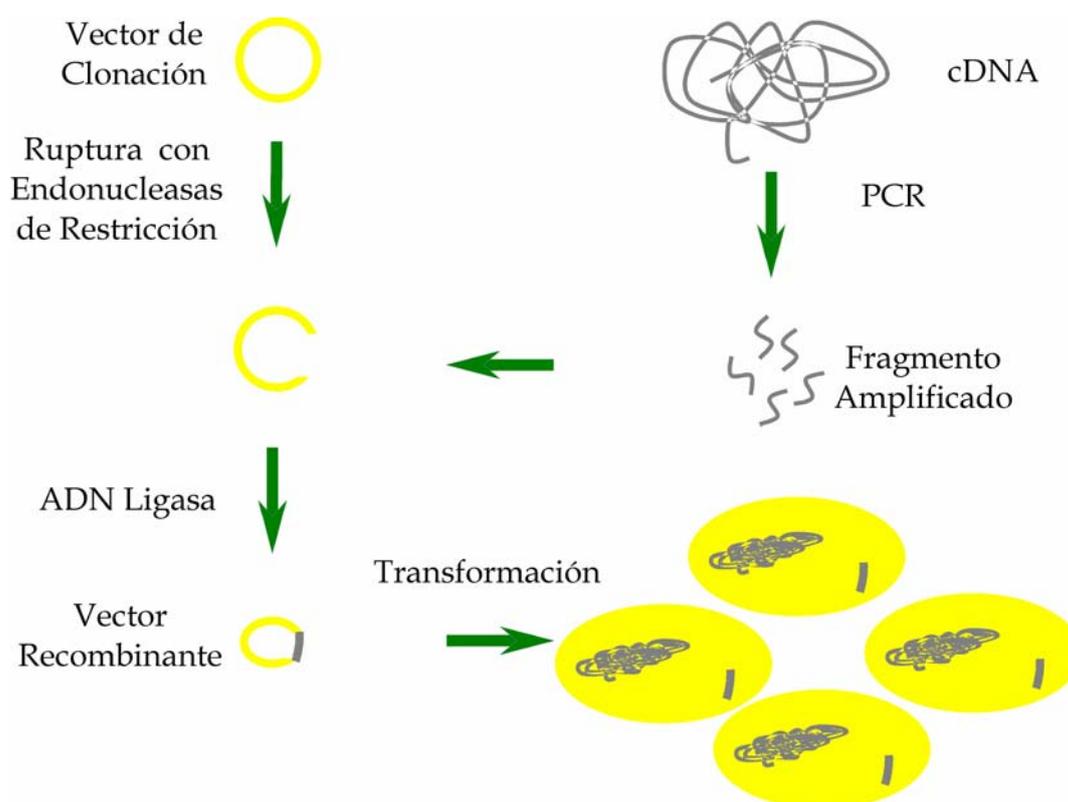


Fig. VI.1. Resumen de algunos aspectos metodológicos de este capítulo.

VI.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR fue realizada sobre el cDNA obtenido por retrotranscripción de las diferentes muestras (Fig. VI.1), utilizando cebadores específicos correspondientes a la zona de unión al ligando del PR, a β -actina y a las proteínas ribosomales L19 y S16, todos de *Rattus norvegicus*. La reacción se cumplió en un volumen total de 35 µl, con 10 µl de una solución de cDNA (1 µg/10 µl); 0,5 µl de cebadores específicos (0,2 µM) (InVitrogen Life Technologies, Tabla VI.1); 0,7 µl de nucleótidos (0,4 mM; 0,1mM cada uno) (dNTPs, Promega); 0,5 µl de Taq polimerasa (1 U) (Go Taq, Promega); 7 µl de buffer de reacción (Green Go Taq, Promega); y, 15,8 µl de agua RNasa free (Invitrogen Life Technologies). El programa de PCR usado incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de: 1 minuto de desnaturalización a 94°C; 1 minuto de “annealing” a 50 ó 57°C, según se trate de β -actina o del PR,

respectivamente; y, por último, 1 minuto de extensión a 72°C. Terminados los ciclos, se realizó una extensión adicional de 5 minutos a 72°C.

	Secuencias utilizadas (sentido y antisentido)	Producto de reacción
Receptor	CCC ACA GGA GTT TGT CAA GCT C	326 pb
	TAA CTT CAG ACA TCA TTT CCG G	
β -Actina	TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG	763 pb
	GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG	
L19	CGC CAA TGC CAA CTC TCG TCA	119 pb
	TTC CGT CGG GCC AAA GGT GTT C	
S16	TCC AAG GGT CCG CTG CAG TC	99 pb
	CGT TCA CCT TGA TGA GCC CAT T	

Tabla VI.1. Secuencias específicas del PR, de β -actina y de las proteínas ribosomales L19 y S16, que fueron utilizadas para la PCR. Se indica además el tamaño de los productos de reacción.

VI.2.6. Separación de los productos de reacción y revelado

Los productos de la reacción fueron separados mediante electroforesis a voltaje constante (50mV) en un gel de agarosa al 1,5 %, inmerso en buffer TBE al 0.5 M. La tinción se realizó mediante incubación con bromuro de etidio.

VI.2.7. Clonación del segmento amplificado (326 pb) correspondiente al PR

Se tomaron las bandas correspondientes a los testículos de 4 ejemplares de *P. canaliculata*, que fueron separadas en agarosa de bajo punto de fusión, cortadas, redisueltas y purificadas utilizando el kit Perfect Prep® Cleanup (Eppendorf). Posteriormente se realizó la ligación en un volumen final de 10 μ l. Para ello se incubaron durante toda la noche, a 18°C, 5 μ l del producto de PCR purificado con: 50 ng del vector pGEM®-T Easy (Promega), 3 unidades Weiss de DNA ligasa T4, 1 μ l de buffer de ligación, y 2,5 μ l de agua libre de DNAsas (Invitrogen Life Technologies). La incubación se realizó con agitación en PTC-100 (MJ Research system).

Posteriormente, 5 μ l de la solución de ligación se agregaron a 100 μ l de una suspensión de *E. coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989) competentes. Esta solución de transformación se colocó a 4°C, durante 30 minutos; luego durante 2 minutos, a 42°C; nuevamente a 4°C, por 10 minutos; todas estas incubaciones se realizaron en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient). Finalmente, se agregaron a 1 ml de medio Luria-Bertani (LB) y se incubaron en baño termostático a 37°C durante 45 minutos.

Las células obtenidas se transfirieron a medio LB- agar con 50 μ g/ml de ampicilina, 50 μ l de una solución de isopropil-tio- β -D-galactósido (24mg/ml) y 32 μ l de una solución de X-gal (20mg/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

VI.2.8. Control de la incorporación del vector en las colonias de *E. coli* y posterior aislamiento

Para determinar si las colonias de *E. coli* habían incorporado el vector con el inserto de cDNA se controló el color de las colonias en crecimiento, ya que las colonias azules representan los clones negativos, en los cuales el vector no contiene el inserto, mientras que las colonias blancas representan los positivos, en los cuales el vector con el inserto han sido incorporados. El ácido nucleico de ambos tipos de colonias fue extraído separadamente por el método del Trizol® (Invitrogen Life Technologies) y separado en un gel de agarosa al 0,8%, luego de lo cual fue revelado con bromuro de etidio. En todas las muestras se observaron bandas correspondientes al DNA genómico, al DNA del vector y al RNA total. Sin embargo, los dos tipos de colonias pudieron ser diferenciados por la masa molecular del DNA del vector, mostrando las colonias blancas un aumento correspondiente a las 326 pb insertados. Como control, el DNA del vector de cuatro colonias blancas fue purificado (Sambrook *et al.*, 1989) y tratado con enzimas de restricción (Eco RI y PST I), desprendiéndose el fragmento de 326 pb que había sido insertado.

VI.2.9. Secuenciación y comparación con bases de datos

Los cuatro fragmentos obtenidos fueron secuenciados por el método de Sanger y Coulson (1977) en el Laboratorio de Secuenciación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar, Argentina). La reacción de secuenciación se inició en presencia de Taq polimerasa, que incorpora nucleótidos fluorescentes en la cadena de DNA polimerizada y los cebadores del vector universal (T7: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG; SP6: ATT TAG GTG ACA CTA TAG). Se identificaron los extremos 3' y 5' de la secuencia correspondiente a los 326 pb (posiciones 2382 a 2708 del mRNA correspondiente al PR de *R. norvegicus*) y se compararon con secuencias depositadas en el GenBank, utilizando el programa BLAST ("Expect" \leq 0,05).

VI.3. Resultados

VI.3.1 Expresión del PR en distintos órganos reproductivos de *P. canaliculata*

La retrotranscripción del RNA extraído de los distintos órganos, seguida de su amplificación por PCR, resultó en la aparición de las correspondientes bandas electroforéticas de aproximadamente 320 pb, lo que indica la expresión de una proteína con un sector muy similar al receptor de progesterona de *R. norvegicus*, en todos los tejidos estudiados, excepto la glándula digestiva, mostrada en la segunda calle (Fig. VI.2). En cambio, la expresión del control de β -actina (bandas de aproximadamente 760 pb) resultó positiva también en la mencionada glándula, lo que indica que una proteína similar a la β -actina de *R. norvegicus* se expresa en *P. canaliculata* y, que la ausencia de la banda de 320 pb se debió efectivamente a la falta de expresión de la secuencia correspondiente al receptor en ese órgano. Las proteínas ribosomales L19 y S16 dieron negativas en todos los órganos.

VI.3.2. Secuencia de bases del fragmento de DNA amplificado y clonado

Las secuencias correspondientes a un receptor de progesterona en *P. canaliculata*, fueron obtenidas de cuatro clones bacterianos procesados, y fueron idénticas entre sí (Fig. VI.3).

La comparación de esta secuencia con las depositadas en el GenBank (“Expect” \leq 0,05) resultó en una superposición de al menos 101 pb entre la secuencia obtenida de *P. canaliculata* y las secuencias seleccionadas. Éstas pertenecieron a 19 especies de cordados (Tabla VI.2⁷). No resultó seleccionada ninguna secuencia de PR perteneciente a otro *phylum*. Disminuyendo las exigencias del índice “Expect” aparecieron muchas secuencias cortas (< 50pb) de metazoos (incluyendo invertebrados), y también de algunas bacterias, que se alineaban con la del “receptor” de *P. canaliculata*, pero ninguna de ellas había sido designada por los depositantes como perteneciente a un receptor de progesterona (datos no mostrados).

Catorce de las 19 especies de cordados fueron mamíferos, y mostraron secuencias que se alinearon con la de *P. canaliculata* en 286 pb o más, y con porcentajes de similitud superiores a 82, lo que se correspondió, por tanto, con valores muy bajos de “Expect”. Las tres especies de mridos encontradas (*R. norvegicus*, *Mus musculus* y *Mesocricetus auratus*) quedaron al tope de la Tabla, con 100, 94 y 91% de similitud, respectivamente. El rango de similitud para las restantes especies de mamíferos fue 83-87%. Hubieron también representantes de otras clases de cordados (Amphibia, 1 especie; Reptilia, 3 especies; Aves, 2 especies), con similitudes entre 78 y 83%.

⁷ Algunas especies estuvieron representadas en la base de datos por 2 a 8 secuencias de distinto largo, idénticas entre sí en sus partes correspondientes. En estos casos se seleccionó para la Tabla VI.2 sólo la secuencia más larga, de forma tal que cada especie es representada en la tabla una sola vez.

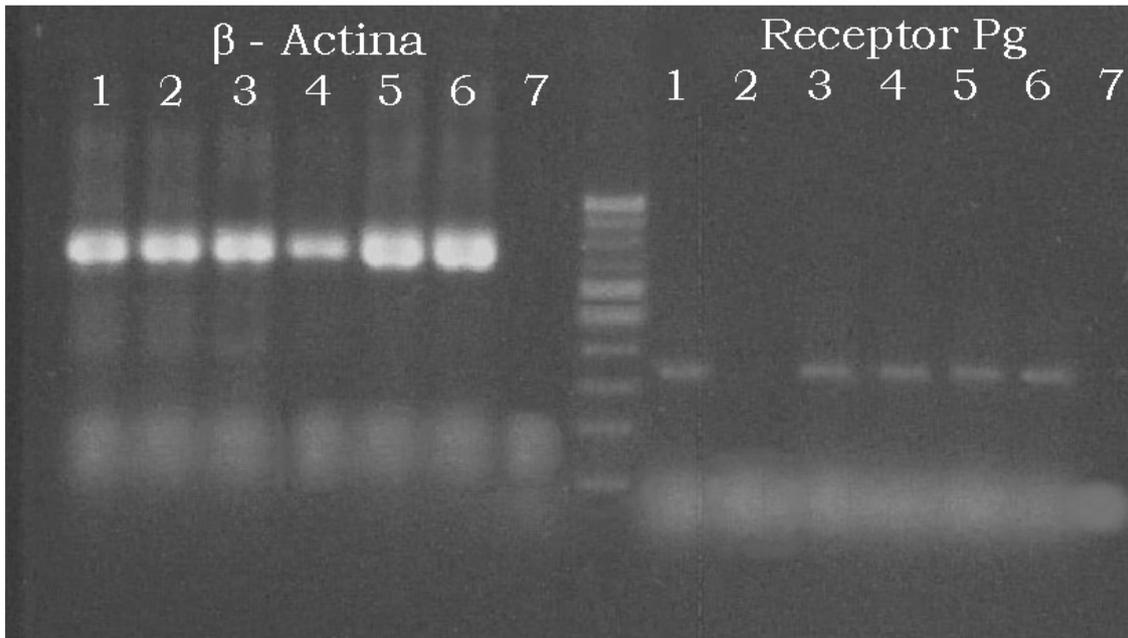
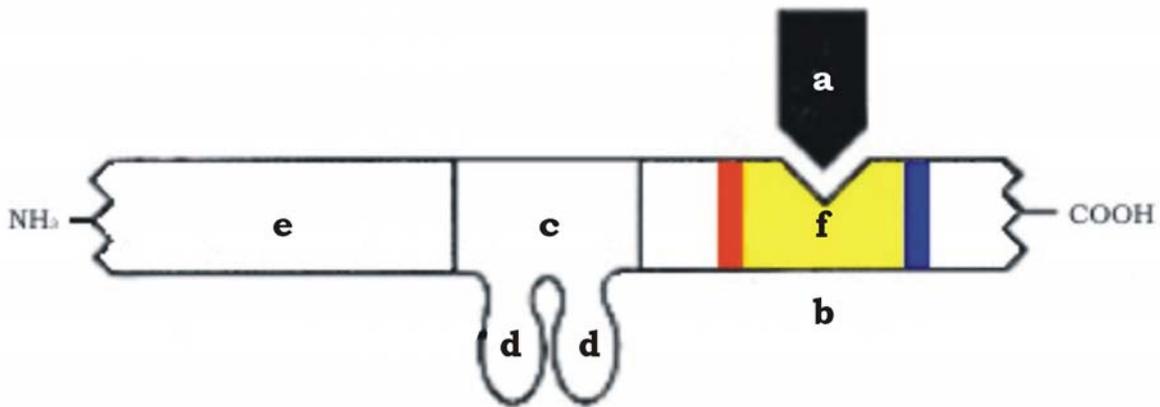


Fig. VI.2: Electroforesis de los productos amplificados, por PCR con cebadores de β -actina y de PR, del cDNA obtenido a partir de los distintos órganos. Las calles corresponden a: (1) testículo; (2) glándula del intestino medio; (3) próstata; (4) complejo peniano; (5) glándula externa de la vaina; (6) glándulas proximal y distal de la vaina; y (7) control negativo.

RECEPTOR DE PROGESTERONA



```

2341 gagttgtcat tctactcgct gtgccttacc atgtggcaaa tcccacagga gtttgtcaag
2401 ctccaggtga cccacgagga gttcctctgt atgaaagtct tacttcttct taacacaatt
2461 cttttggaag gcctgaggag tcaaagccag tttgaagaga tgagggtcaag ctatattcgg
2521 gaattgatca aggcaattgg cttaagacag aaaggggtgg tccccagttc acaacgcttc
2581 tatcaactta caaaacttct tgacagcttg catgatcttg tgaaacagct ccacctgtac
2641 tgcttgaata cgttcatcca atcccgggca ctggctgtgg aatttcogga aatgatgtct
2701 gaagttattg ctgcccagtt gcccaagatc ctggcgggca tggatgaagcc tctcctcttt

```

Fig. VI.3. Arriba, esquema del receptor de progesterona (**a**, ligando; **b**, sitio de unión al ligando; **c**, sitio de unión al DNA; **d**,dedos de Zn^{++} ; **e**, sitio regulador de la transcripción); la ubicación aproximada del fragmento amplificado (**f**), se indica en color (**rojo**, cebador sentido, y **azul**, cebador antisentido). **Abajo,** secuencia de cDNA del receptor de progesterona de *R. norvegicus*, idéntica a la amplificada a partir de mRNA extraído de testículo de *P. canaliculata*.

Espece	Clase	Orden	Expect	Tramo comparado (pb)	Similitud (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	Mammalia	Rodentia	0	326	100
<i>Mus musculus</i>	"	"	0	326	94
<i>Mesocricetus auratus</i>	"	"	$2e^{-101}$	286	91
<i>Bubalus bubalis</i>	"	Artiodactyla	$4e^{-34}$	157	87
<i>Camelus dromedarius</i>	"	"	$7e^{-36}$	160	87
<i>Callithrix jacchus</i>	"	Primates	$2e^{-30}$	159	86
<i>Homo sapiens</i>	"	"	$2e^{-70}$	326	85
<i>Macaca mulatta</i>	"	"	$4e^{-68}$	325	85
<i>Sus scrofa</i>	"	Artiodactyla	$2e^{-70}$	326	85
<i>Canis familiaris</i>	"	Carnivora	$4e^{-68}$	326	85
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	"	Lagomorpha	$4e^{-68}$	322	85
<i>Bos taurus</i>	"	Artiodactyla	$6e^{-61}$	326	84
<i>Ovis aries</i>	"	"	e^{-65}	326	84
<i>Equus caballus</i>	"	Perissodactyla	$4e^{-56}$	326	83
<i>Alligator mississippiensis</i>	Reptilia	Crocodylia	$3e^{-13}$	122	83
<i>Crocodylus siamensis</i>	"	"	$6e^{-14}$	135	82
<i>Cnemidophorus uniparens</i>	"	Squamata	0.003	101	81
<i>Gallus gallus</i>	Aves	Galliformes	$2e^{-16}$	252	79
<i>Xenopus laevis</i>	Amphibia	Anura	$5e^{-05}$	188	78

Tabla VI.2. Correspondencia de la secuencia del PR obtenida de testículos de *P. canaliculata* con secuencias depositadas en el GenBank (“Expect” ≤ 0,05).

VI. 4. Resumen y conclusiones

En conclusión, una secuencia correspondiente al sector de unión al ligando del receptor de progesterona estaba presente en los transcritos de RNA de los órganos de *P. canaliculata* estudiados (testículo, próstata, complejo peniano y glándulas de la vaina), aunque con la sola excepción de la glándula del intestino medio, donde no se detectó la secuencia buscada.

Para nuestra sorpresa, esta secuencia de RNA resultó idéntica a la de *R. norvegicus*. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación de los materiales utilizados parece descartarse por la ausencia de bandas en los controles “negativos” de la PCR, así como por la falta de amplificación por PCR cuando se usaron cebadores correspondientes a las proteínas ribosomales L19 y S16.

Sin embargo, esto no implica ninguna sugerencia de que el “receptor” de *P. canaliculata* sea idéntico al de *R. norvegicus*, ya que el fragmento detectado corresponde sólo a una parte del sector de unión al ligando (Fig. VI.3), y sus 326 pb equivalen sólo a una pequeña parte de las 3056 pb de la secuencia completa (sin intrones) del receptor de progesterona descripto para *R. norvegicus*.

A la luz de lo que se conoce y de lo que se ha propuesto sobre la evolución de los receptores nucleares, estos hallazgos pueden ser interpretados al menos de tres maneras distintas.

La primera, llevaría a considerar al segmento secuenciado como parte de un receptor huérfano; sin embargo, la presencia de progesterona en estos caracoles, detectada por radioinmunoensayo (ver **Cap. V**), convierte en poco probable esta posibilidad.

La segunda opción, consiste en considerar a las 326 pb como integrantes del gen de un receptor cuya especificidad no esté completamente determinada, y que por tanto, su dominio de unión al ligando pueda incluir secuencias compatibles con otros esteroides, por ejemplo, estrógenos (recordemos que Thornton -2001- ha propuesto al receptor de estrógenos como el precursor inmediato del receptor de progesterona).

Por último, debe considerarse la posibilidad de que el segmento secuenciado corresponda a un gen que, efectivamente, codifique una proteína con alta afinidad y especificidad por la progesterona. Esto no necesariamente implicaría que, como consecuencia de la unión del ligando, se activen genes similares a los que se activan en los mamíferos. Por el contrario, la expresión del receptor en órganos sexuales de *P. canaliculata*, inducen más bien a relacionarlo con el control androtrófico en los machos de esta especie.

Capítulo VII

Consideraciones finales

Cuando uno escribe siempre lo hace para alguien que, desde dentro de uno mismo, acompaña en un diálogo continuo cada línea y cada párrafo. Ese interlocutor es alguien a la vez comprensivo y crítico, quien por momentos hasta toma los rostros y los nombres de personas reales.

Y al comenzar este capítulo final siento que mi interlocutor me dice ¿tanto te previniste de las “impoteorías” para terminar diciendo que los esteroides pueden tener un rol androtrofico significativo en *Pomacea canaliculata*? ¿no te has enredado en cuestiones meramente semánticas? ¿no te has perdido en los numerosos detalles de un sistema tan complejo? ¿no has dejado cosas sin terminar?

Y para empezar a responderle, quiero decirle que nos costó aceptar que a eones de distancia filogenética entre los cordados y los moluscos, sin siquiera poder trazar con certeza una homología entre los sistemas genitales de unos y otros, nuestras ampularias pudieran usar las mismas moléculas lipídicas como señales, y hasta usar receptores semejantes a los de los cordados. Esta incredulidad nuestra se agravó cuando, en los comienzos de este trabajo, no pudimos hallar en el testículo la testosterona que otro autor había reportado (Takeda, 2002b). Nuestra incredulidad sólo empezó a ceder cuando conocimos, más tardíamente, los bien fundamentados hallazgos sobre esteroides del grupo napolitano en *Octopus vulgaris* (D’Aniello *et al.*, 1996; Di Cosmo *et al.*, 1998).

Y que nuestros “zapatonos de plomo” estuvieron sin duda justificados si nos han mantenido abiertos al rol del sistema nervioso y de los neuropéptidos (aunque no hayamos aportado aquí nada en cuanto a estos últimos), y sobre todo, si hemos podido mostrar que la gónada masculina no juega aquí el papel de órgano endócrino, es decir, de productor de androtrofinas para los otros órganos del sistema genital (Fig. **VII.1**). Esta desconfianza por las impoteorías también nos llevó a rastrear la histología de los otros órganos genitales, buscando “la glándula” de las androtrofinas como si ésta hubiera sido “El Dorado”. También nos llevó a buscar y encontrar, en esos órganos, los esteroides que no habíamos encontrado en el testículo. Sin embargo, hasta hace pocos meses (Oehlmann *et al.*, 2006) el grupo alemán aún persistía en utilizar el término “superfeminización”, al modo de los metafísicos de Tlön (Cap. **II**), lo que nos hace pensar que no estarán muy dispuestos a atender la sutil diferencia conceptual entre una androtrofina y un andrógeno, como hemos hecho en esta tesis, así como en una publicación reciente (Gamarra-Luques *et al.*, 2006).

Y también quiero decirle a mi interlocutor que nuestros zapatonos de plomo también nos permitieron descubrir la belleza de la organogénesis reproductiva en *P. canaliculata*, a partir de dos primordios genitales que no son aquellos que Jost

(1947) mostró para los mamíferos. Y que creemos que este estudio organogenético será la base de otros, que podrán mostrar los actores, los lugares y los momentos críticos de la diferenciación sexual en esta especie.

Mi crítico interlocutor ya ha aceptado, creo, que no podía esperar ser deslumbrado por “metodologías de punta” en la realización de este trabajo, y si considera la temática, tan amplia, que hemos abordado, también creo que aceptará que no podía esperar ver agotado cada aspecto de ella. Como él ha acompañado cada paso de este trabajo, sabe que éste ha sido un *thriller* intelectual, que ha tomado casi seis años de abrir cajas llenas de sorpresas.

Porque aunque la biología reproductiva de los ampuláridos en su conjunto no puede calificarse, ni mucho menos, como un desierto de conocimientos, sí lo eran cada uno de los pequeños temas que abordamos dentro de ella. Y a veces, estos pequeños desiertos estaban infestados de animales venenosos (como impoteorías y datos no reproducibles).

Esta tesis ha sido hecha para comprender, no para *sorprender*: para comprender cómo funciona un sistema genital sorprendentemente complejo. Y esto, hecho a más de cien años de los comienzos de la biología reproductiva de los cordados, y de los mamíferos en particular (Greep, 1974), y aunque nos hemos servido de las herramientas que el adelanto general de la biología ha generado, hemos evitado caer por el fácil tobogán de forzar un caracol dentro de esquemas de mamíferos.

Ahora podemos decir que hemos comprendido muchas cosas, y que hemos construido aquí la plataforma para elaborar, sobre ella, muchos otros proyectos que sólo ahora son posibles.

Doy aquí por terminada esta licencia que me he tomado de discutir globalmente mi tesis en este tono más vital, y poco habitual en discusiones científicas. Quiero entonces pasar a discutir algunos aspectos más específicos de los capítulos precedentes.

En cuanto a las contribuciones morfológicas de esta tesis, ella ha sido precedida por las descripciones ya clásicas de la estructura gruesa del tracto genital de *P. canaliculata* (principalmente las de Hylton-Scott, 1958, y de Andrews, 1964) pero sobre todo por las descripciones histológicas de Winik (1982) en su tesis de licenciatura.

De estos trabajos antecedentes, así como de nuestras contribuciones, surge la existencia de un sistema estructuralmente muy complejo, y cuya complejidad plantea, inevitablemente, preguntas sobre el significado funcional y las interrelaciones de esas estructuras.

Las especulaciones más sencillas sobre su significado funcional, sugerirían un rol de la vesícula seminal, la próstata y la papila genital en la elaboración de un “plasma” seminal, o al menos, de secreciones que contribuyan a la maduración final de los espermatozoides en el tracto genital masculino. Sin embargo, aquí nunca hemos encontrado evidencias, en animales sacrificados durante el coito, de un “eyaculado” voluminoso, como si los espermatozoides fueran transferidos en un *quantum* significativo. Tampoco hemos encontrado una “fila india” de espermatozoides, ni en el espermiducto de los derivados del gonoducto, ni en el conducto peniano, lo que esperaríamos que ocurriera si los espermatozoides fueran transferidos de un modo continuo (o casi) durante el prolongado coito propio de esta especie (Albrecht *et al.*, 1994).

Sin embargo, el grupo de Winik y colaboradores han encontrado dos veces masas espermáticas que podrían corresponder a un eyaculado más o menos voluminoso. Una de estas veces ha sido en lo que podría identificarse como la conjunción de la papila genital y el pozo espermático (Winik, 1982) y la otra en el comienzo del conducto intraglandular de la cápsula (parte de la glándula uterina de las hembras, Catalan y Winik, comunicación personal). Este último hallazgo ha inducido a Catalan *et al.* (2002) ha proponer que este conducto intraglandular tendría dos rampas, una de las cuales sería para el ascenso de los espermatozoides, mientras que la otra sería para el descenso de los huevos. Ambas rampas existen, de hecho, y bien diferenciadas citológicamente. Sin embargo, algunas observaciones preliminares (Gamarra-Luques, observaciones no publicadas) indican que la rampa que ellas designaron como “espermática” sería la que albergaría en su ascenso al pene vermiforme, el cual penetraría hasta la *bursa copulatrix* o el receptáculo seminal, donde efectivamente ocurriría la transferencia espermática desde el organismo masculino al femenino. Futuros estudios deberán tratar de conciliar estas observaciones, aparentemente contradictorias.

Debemos decir algunas palabras sobre los notorios gránulos secretorios que son producidos en estas glándulas (Fig. **III.3**). Efectivamente, estos gránulos son exócrinos, y están compuestos por una fina matriz granular, aparentemente proteica.

La secreción exócrina de la glándula externa parece tener dos vías de salida: una por el gran conducto excretor de esta glándula, y otra por los pequeños ductos que se abren hacia la primera porción del surco de la vaina peniana. Es probable que la función de la secreción vehiculizada por estos últimos sea como lubricante del ascenso del pene por ese surco.

En cambio, la secreción del conducto principal se vuelca abundantemente al exterior durante la copulación, y como ya dijimos, Andrews (1964) ha hipotetizado que tendría una acción aversiva para los machos que a veces se agrupan alrededor de una pareja copulando. Esta hipótesis no parece condecir con la interesante observación del grupo bahiense (Burela y Martín, en preparación) en cuanto a que esa secreción es ingerida por la hembra repetidas veces durante el coito.

Otra observación interesante sobre los gránulos excretorios de la glándula externa es la presencia, dentro de ellos, de cristaloides poliédricos. No hemos

podido fijar siempre adecuadamente a estos cristaloides, pero cuando lo hemos logrado, han mostrado una apretada trama proteica, semejante a la de los cristaloides de Reinke de las células intersticiales de Leydig en el hombre (Nagano y Ohtsuki, 1971). Es curioso que estos cristaloides, que están también presentes en algunas células adrenales del hombre (Magalhaes, 1972) hayan sido observados, hasta ahora, sólo en primates (*Callithrix jacchus*, Prince *et al.*, 1999; *Saimiri sciureus*, Belt y Cavazos, 2005).

No se ha podido nunca correlacionar funcionalmente a los cristaloides de Reinke con la capacidad generadora de andrógenos de las células de Leydig, pero es llamativo que aparezcan cristaloides semejantes dentro de los grandes gránulos de la glándula externa de la vaina, uno de los órganos con alta concentración de androstenodiona en *P. canaliculata*.

En cuanto a la secreción exócrina de las otras glándulas de la vaina, cabría preguntarse si podrían cumplir una función adhesiva durante la copulación. En efecto, estas glándulas se deforman durante la copulación, elongándose considerablemente, alisando su superficie habitualmente corrugada y adhiriéndola al epitelio de la cavidad del manto de la hembra (Gamarra-Luques, observaciones no publicadas).

Sin embargo, el rol de estas estructuras, al que le hemos prestado mayor atención en esta tesis, está vinculado específicamente al control androtrófico, del cual hemos explorado principalmente el posible rol de esteroides. Sin embargo, el control androtrófico no debe circunscribirse a estas hormonas, ya que los órganos del sistema genital están profusamente inervados, y puesto que, en otras especies, se ha mostrado el rol morfogenético genital de neuropéptidos como la APGWamida (Oberdörster y McClellan-Green, 2000). En particular, nuestro estudio de la inervación del aparato copulatorio en general, y de la vaina peniana en particular (Fig. **III.10**) abre la posibilidad de un estudio más detallado de la participación de distintos neuropéptidos, y de su interacción con neurotransmisores clásicos como la serotonina.

La Fig. **VII.1** muestra un diagrama de flujo de cómo se integrarían los factores externos o ambientales (Albrecht *et al.*, 1996; 2004), con los neurales (Cap. **III**) y los hormonales (Caps. **III**, **V** y **VI**) en el control de la reproducción en esta especie. Según ese diagrama, los ganglios cerebrales y pleurales actuarían como analizadores/integradores de primer orden para la información ambiental relevante, los cuales pasarían la información al ganglio copulatorio y a los ganglios viscerales (paracardiaco y subintestinal, Hylton-Scott, 1958). Estos tres últimos ganglios son los que inervan directamente a la glándula del intestino medio y al sistema genital masculino, y serían los analizadores/integradores de segundo orden. En el control hormonal participarían la glándula del intestino medio (como regulador endócrino) y los órganos reproductivos (como reguladores parácrinos), que aparecen divididos, en este esquema, de acuerdo a su origen ontogenético.

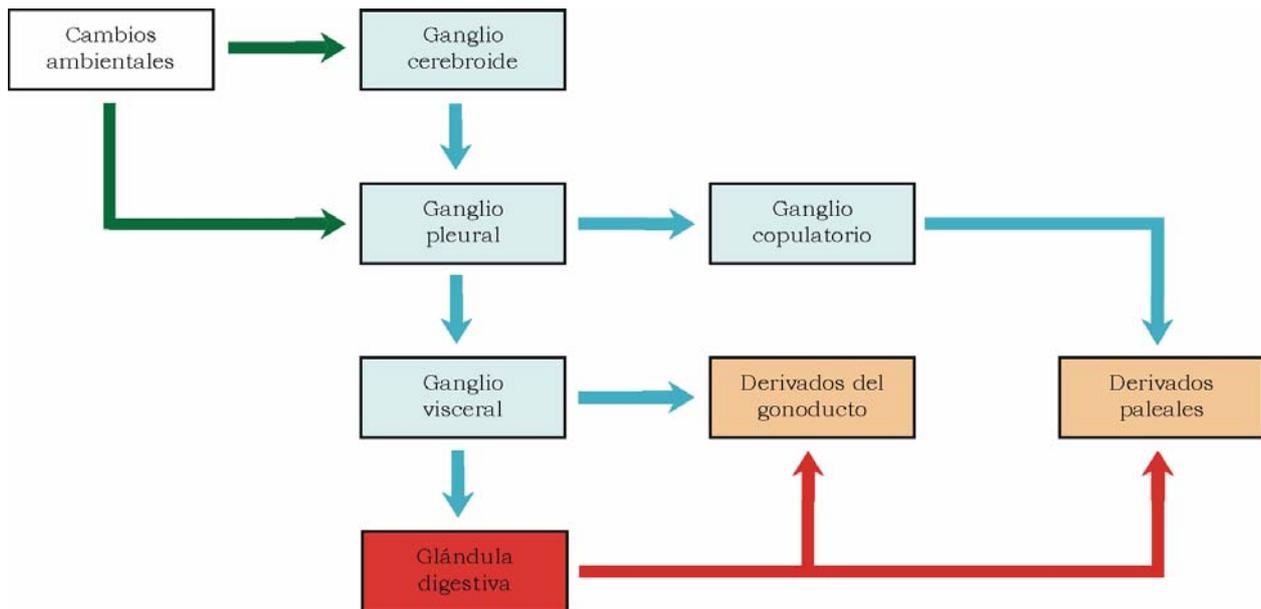


Fig. VII.1: Relaciones hipotéticas entre los cambios ambientales (sin relleno), y los componentes neurales (azul), endócrinos (rojo) y parácrinos (naranja) del control androtrófico.

En la Fig. **VII.2.** se presenta una hipótesis de trabajo más detallada sobre el modo de participación de los esteroides en la regulación androtrófica de *P. canaliculata*. El regulador endócrino –la glándula del intestino medio– sería el lugar donde los esteroides androtróficos son sintetizados desde acetyl-coenzima A (AcetilCoA) y colesterol (Col), y sería el único órgano con capacidad de acumular el colesterol esterificado (Col/éster). En ella, a partir de colesterol, se sintetizarían progesterona ($P=0$) y androstenodiona (A_2); se postula, además, la síntesis de testosterona ($T=0$) en la glándula del intestino medio (así como en los otros órganos donde se encontraron evidencias de ésteres de la testosterona), la cual sería rápidamente esterificada ($T=0/éster$), y por tanto, no sería detectable por radioinmunoensayo.

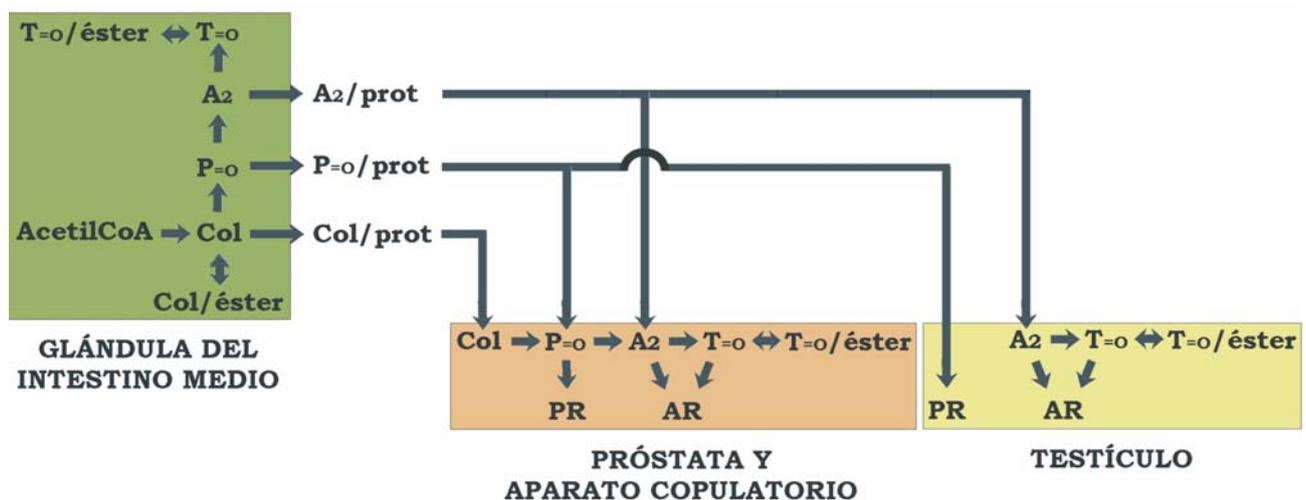


Fig. VII.2. Hipótesis de trabajo sobre la participación de los esteroides en el control androtrófico de *P. canaliculata*. Las abreviaturas están explicadas en el texto.

Además, esta glándula aportaría colesterol, progesterona y androsteno-diona al plasma hemolinfático, donde estos lípidos circularían unidos a proteínas (Col/prot; P₀/prot; A₂/prot) para alcanzar los órganos efectores: la próstata y el aparato copulatorio, por un lado, y el testículo, por otro. Debe notarse que la glándula del intestino medio no sólo es uno de los órganos con mayores concentraciones de esteroides, sino que su masa (y por tanto, su presunta capacidad esteroidogénica absoluta) es mucho mayor que la de cualquiera de los demás órganos involucrados.

En la próstata y el aparato copulatorio podrían ingresar tanto colesterol como progesterona o androstenodiona desde la hemolinfa. La conversión del colesterol a progesterona y a androstenodiona, y después a testosterona y a ésteres de testosterona podría ocurrir en este órgano. Allí también, la progesterona y los dos andrógenos (androstenodiona y testosterona) encontrarían sus receptores específicos (PR y AR).

En el testículo, por otra parte, la progesterona y la androstenodiona circulantes podrían ingresar y ser convertidas rápidamente a testosterona y a ésteres de testosterona, escapando la detección por radio-inmunoensayo. Aquí también, la progesterona y los andrógenos encontrarían sus receptores específicos. Indudablemente, esta hipótesis de trabajo debería ser puesta a prueba, en primer lugar, por un mapeo de la actividad de las enzimas esteroidogénicas, que nos dijera si, efectivamente, los lugares de mayor concentración de cada esteroide son o no son sus lugares de síntesis.

En el contexto del emergente campo de la ecotoxicología, otro interesante fenómeno que puede verse con una nueva luz derivada de nuestro estudio es el pseudohermafroditismo (imposex) inducido en hembras por xenobióticos como el tributilestaño (TBT), o por otras sustancias como la metil-testosterona y el etinilestradiol (Schulte-Oehlmann *et al.*, 2000; 2004; Tillmann *et al.*, 2001), la APGWamida (Oberdörster y McClellan-Green, 2000; 2002) o como el ácido retinoico (Nishikawa *et al.*, 2004; Nishikawa, 2006). Es interesante que estas acciones androtróficas parezcan estar limitadas (con una excepción que enseguida analizaremos) a los órganos cuyo origen es el primordio paleal (Cap. **IV**), sin afectar a derivados del gonoducto, como la próstata o el testículo (Schulte-Oehlmann *et al.*, 2000; 2004; Tillmann *et al.*, 2001). En relación a esto, recientes hallazgos de nuestro laboratorio sugieren que puede haber una expresión diferente de los receptores de progesterona y de andrógenos entre los derivados de ambos primordios (Gamarra-Luques, Giraud-Billoud, resultados no publicados), lo que podría estar a la base de la respuesta diferente a esos xenobióticos.

La excepción a lo antedicho es que el desarrollo de la papila genital en las hembras de *Marisa cornuarietis*, que aparece como una respuesta a los xenobióticos, y que Schulte-Oehlmann *et al.* (1994) designan como el mayor grado de su escala de imposex en esta especie. Si bien la papila genital aparece en el macho adulto, tanto en *P. canaliculata* (**III.3**) como en *M. cornuarietis*, como una continuación del espermiducto prostático, sus características citológicas en *P. canaliculata* la muestran como bien distinta a éste (**III.3**), y su crecimiento por sobre el recto, cruzándolo hacia la derecha para terminar en el pozo espermático, lo constituye como el único sector del sistema genital masculino que no tiene una

clara correspondencia en la hembra. Cabe preguntarse si el desarrollo de la papila, tanto en el macho como en la hembra pseudohermafrodita, podría originarse de algún primordio distinto al del gonoducto que origina la próstata, y que sólo secundariamente la luz de su conducto central se uniera a la del conducto prostático. Existe la posibilidad de que la papila derivase del primordio nugal derecho, el cual da origen al pene en la mayoría de los cenogasterópodos, y que de ese modo, estaría aún presente en los ampuláridos. Como esta hipótesis supondría un estadio, quizás muy breve, en que la papila no esté aún conectada a la próstata, hemos buscado esta situación en juveniles, o como una malformación en adultos, pero hasta ahora sin éxito. De otra manera, no sabemos cómo podríamos poner a prueba esta hipótesis.

Por último, señalaremos que la posible presencia de receptores semejantes al de progesterona y de andrógenos en órganos y tejidos de esta especie (Cap. VI) podría estar relacionada a la presencia de progesterona y androstenodiona en esos mismos órganos y tejidos, y por tanto, a una posible acción androtrófica y parácrina de estos esteroides. De acuerdo a lo que se conoce y a lo que se ha propuesto sobre la evolución de los receptores nucleares (Thornton, 2001), cabe esperar que los genes cuya transcripción caracteriza la respuesta al ligando puedan ser diferentes a los que han sido estudiados en los mamíferos.

La similitud entre el segmento correspondiente a un posible receptor de progesterona en *P. canaliculata* y el segmento correspondiente que ha sido reportado para *R. norvegicus* sugiere la posibilidad de una convergencia evolutiva, en que secuencias semejantes, y vinculadas a un ligando específico (progesterona) han sido seleccionadas dos veces en regiones apartadas del árbol filogenético.

Somos conscientes de que, a pesar de nuestros esfuerzos, aún comprendemos muy mal el control androtrófico del sistema genital de *P. canaliculata*. Sin embargo, podemos decir que lo logrado hasta ahora es una buena plataforma, apta para el lanzamiento de variados estudios.

Presumiblemente, tanto esteroides como neuropéptidos y otros neurotransmisores pueden estar involucrados en el control androtrófico. Creemos que la participación de los esteroides en este control puede ser iluminada por la consecución del estudio de los receptores que hemos comenzado en esta tesis, y de un mapeo de las enzimas esteroidogénicas en los distintos órganos. Un estudio del rol de los neuropéptidos y de otros neurotransmisores deberá iniciarse por un mapeo inmunocitoquímico que aproveche lo que hoy sabemos de la innervación de los órganos masculinos.

¿Podrán estos estudios, algún día, darnos una clave para inhibir la reproducción de esta especie invasora?

Capítulo VIII

Bibliografía citada

- ALBRECHT EA (1998). Control de la estacionalidad reproductiva en el gastrópodo *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia, Ampullariidae). Tesis doctoral, Programa de Postgrado en Biología, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.
- ALBRECHT EA, CARRENO NB, CASTRO-VAZQUEZ A (1996). A quantitative study of copulation and spawning in the South American apple-snail, *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger* 39: 142-147.
- ALBRECHT EA, KOCH E, CARRENO NB, CASTRO-VAZQUEZ A (2005). Control of the seasonal arrest of copulation and spawning in the apple-snail *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae): differential effects of food availability, water temperature and day length. *Veliger* 47: 147-152.
- AMERO SA, KRETSINGER RH, MONCRIEF ND, YAMAMOTO KR, PEARSON WR (1992). The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors. *Mol Endo* 6: 3-7.
- ANDREWS EB (1964). The functional anatomy and histology of the reproductive system of some pilid gastropod molluscs. *Proceedings of the Malacological Society of London* 36: 121-140.
- BELT WD, CAVAZOS LF (2005). Fine structure of the interstitial cells of Leydig in the squirrel monkey during seasonal regression. *Anatomical Record* 169: 115-127.
- BERTHOLD T (1989). Comparative conchology and functional morphology of the copulatory organ of the Ampullariidae (Gastropoda, Monotocardia) and their bearing upon phylogeny and palaeontology. *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)* 28: 141-164.
- BERTHOLD T (1991). Vergleichende anatomie, phylogenie and historische biogeographie der Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda). *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)* 28: 141-164.
- BETTIN C, OEHLMAN J, STROBEN E (1996). TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 50: 299-317.
- BIELER R (1993). Ampullariid phylogeny – Book review and cladistic re-analysis. *Veliger*, 36: 291-299.
- BURKY AJ (1974). Growth and biomass production of an amphibious snail, *Pomacea urceus* (Müller), from the Venezuelan Savannah. *Biol Bull* 143: 304-316.

- BUZZIO OL (2001). El ratón maicero, *Calomys musculinus*, y un nuevo paradigma de control de la función luteal en roedores sigmodontinos neotropicales. Tesis doctoral. PROBIOL, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina, 140 pp.
- BUZZIO OL, CASTRO-VAZQUEZ A (2002). Reproductive biology of the corn mouse (*Calomys musculinus*): A Neotropical sigmodontine. *Mastozoología Neotropical* 9: 135-158.
- CASTRO-VAZQUEZ A, ALBRECHT EA, VEGA IA, KOCH E, GAMARRA-LUQUES C (2002). Pigmented corpuscles in the midgut gland of *Pomacea canaliculata* and other Neotropical apple-snails (Prosobranchia, Ampullariidae): a possible symbiotic association. *Biocell* 26: 101-109.
- CASTRO-VAZQUEZ A, CARREÑO NB (1981). A study of the sensory requirements for eliciting the pseudopregnancy response. *Brain Research* 230: 205-220.
- CATALAN NMY, FERNANDEZ SN, WINIK BC (2002). Oviductal structure and provision of egg envelopes in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Prosobranchia, Ampullariidae). *Biocell* 26: 91-100.
- CAZZANIGA NJ (1990). Sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Veliger* 33: 384-388.
- CAZZANIGA NJ (2002). Old species and new concepts in the taxonomy of *Pomacea* (Gastropoda: Ampullariidae). *Biocell* 26: 71-81.
- CHEESMAN DF (1958). Ovorubin, a chromoprotein from the eggs of the gastropod mollusc *Pomacea canaliculata*. *Proc R Soc Lond (Biol)* 149: 571-587.
- CLARK G (1981) Staining Procedures. Williams & Wilkins, Baltimore. 512p.
- COWIE RH (2002). Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management. En: *Molluscs as Crop Pests*. G.M. Barker, Ed., CABI Publishing, Wallingford, pp. 145-192.
- CUETO JA, Vega IA, Koch E, Castro-Vazquez A. (2006). Poliploidía en células que contienen a un endocianobionte de la glándula digestiva de *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Genética, San Luis, Argentina.
- D'ANIELLO A, DI COSMO A, DI CRISTO C, ASSISI L, BOTTE V, DI FIORE MM (1996). Occurrence of sex steroid hormones and their binding proteins in *Octopus vulgaris* Lam. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 782-788.
- DE MENDONCA RL, ESCRIVA H, VANACKER JM, BOUTON D, DELANNOY S, PIERCE R, LAUDET V (1999). Nuclear hormone receptors and evolution. *Amer Zool* 39: 704-713.

- DEMIAN ES, YOUSIF F (1973a). Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda, Ampullariidae). 1. General outlines of development. *Malacologia* 12: 123-150.
- DEMIAN ES, YOUSIF F (1973b). Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda, Ampullariidae). 2. Development of the alimentary system. *Malacologia* 12: 151-174.
- DEMIAN ES, YOUSIF F (1973c). Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda, Ampullariidae). 3. Development of the circulatory and renal system. *Malacologia* 12: 175-194.
- DEMIAN ES, YOUSIF F (1973d). Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). IV. Development of the shell gland, mantle and respiratory organs. *Malacologia* 12:195-211.
- DEMIAN ES, YOUSIF F (1975). Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda, Ampullariidae). 5. Development of the nervous system. *Malacologia* 15: 29-42.
- DI COSMO A, PAOLUCCI M, DI CRISTO C, BOTTE V, CIARCIA G (1998). Progesterone receptor in the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris*: Characterization and immunolocalization. *Mol Reprod Dev* 50: 451-460.
- DREON MS, HERAS H, POLLERO RJ (2006). Biochemical composition, tissue origin and functional properties of egg perivitellins from *Pomacea canaliculata*. *Biocell*, in press.
- ESCRIVA H, DELAUNAY F, LAUDET V (2000). Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays* 22:717-727.
- ESTEBENET AL, CAZZANIGA NJ (1992). Growth and demography of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) under laboratory conditions. *Malacological Review* 25:1-12.
- ESTEBENET AL, CAZZANIGA NJ (1998). Sex-related differential growth in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *J Molluscan Stud* 64, 119-123.
- FIORONI P, OEHLMANN J, STROBEN E, VEB G (1991). The pseudohermafroditism of prosobranch; Morphological aspects. *Zoologischer Anzeiger* 226: 1-26.
- GAMARRA-LUQUES C, KOCH E, VEGA IA, ALBRECHT EA, CASTRO-VAZQUEZ A (2003). Possible paracrine epithelioid tissues in the penial sheath and the prostate gland of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biocell* 27: 71, abstract.

- GAMARRA-LUQUES C, WINIK BC, VEGA IA, ALBRECHT EA, CATALAN N, CASTRO-VAZQUEZ A. (2006). An integrative view to structure, function, ontogeny and phylogenetical significance of the male genital system in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biocell* 30: 345-357.
- GOODING MP, LEBLANC GA (2001). Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Gen Comp Endocrinol* 122:172-80.
- GREEP RO (1974) History of research on anterior hypophysial hormones. En: *Handbook of Physiology - Endocrinology IV, Part 2*. S. Geiger, Washington, American Physiological Society, pp 1-27.
- HAYES TB (1998). Sex Differentiation in Amphibians, Reptiles, and Birds, Hormonal Regulation. En: *Encyclopedia of Reproduction*. E. Knobil, J.D Neill, eds. Academic Press, 4: 414-421.
- HERAS H, POLLERO RJ (2002). Lipoproteins from plasma and perivitelline fluid of the apple-snail *Pomacea canaliculata*. *Biocell* 26: 111-118.
- HYLTON-SCOTT MI (1958). Estudio morfológico y taxonómico de los ampulláridos de la República Argentina. *Rev Mus Arg Ciencias Nat "B Rivadavia"* 3: 233-333.
- HYMAN LH (1967) The Invertebrates. Vol. VI. Mollusca I. McGraw-Hill Book Company, New York, 792 pp.
- JEFFERY P (2006) Gastropod classification. World Wide Web electronic publication. <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/gastroclass/> [accessed 19 July 2006].
- JOST A (1947). Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Roles des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch. Anat. Micr Morph Expérim* 36: 271-318.
- JOST A (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypohyseal hormones. *Recent Progress in Hormone Research* 8: 379-418.
- JOST A, MAGRE S (1993). Sexual differentiation. En: *Reproduction in Mammals and Man*, C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. eds. Elipses, Paris, 197-212.
- KEAWJAM RS (1987). The apple snails of Thailand: aspects of comparative anatomy. *Malacological Review* 20: 69-89.
- KEAWJAM RS, UPATHAM ES (1990). Shell morphology, reproductive anatomy and genetic patterns of three species of apple snails of the genus *Pomacea* in Thailand. *Journal of Medical and Applied Malacology* 2: 49-62.

- KOCH E, VEGA IA, ALBRECHT EA, ORTEGA HH, CASTRO-VAZQUEZ A (2006). A light and electron microscopic study of pigmented corpuscles in the midgut gland and feces of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Veliger* 48: 17-25.
- KUSHLAN JA (1978). Predation of apple snail eggs (*Pomacea*). *Nautilus* 92: 57-58.
- LUM-KONG A, KENNY JS (1989). The reproductive biology of the ampullariid snail *Pomacea urceus* (Müller). *J Molluscan Stud* 55: 53-65.
- MAGALHAES MC (1972). A new crystal-containing cell in human adrenal cortex. *Journal of Cell Biology* 55: 126-133.
- MARTÍN SM (1980). Contribución al estudio histológico del complejo peniano de algunas ampularias argentinas (Mollusca, Ampullariidae). *Neotropica* 26: 47-52.
- MARWOTO RM (1988). The occurrence of a freshwater snail *Pomacea* sp in Indonesia. *Treubia* 29: 275-276.
- MATTHIESSEN P, GIBBS PE (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in molluscs. *Environ Toxicol Chem* 17: 37-43.
- McKENNA NJ, O'MALLEY BW (2000). From ligand to response: Generating diversity in nuclear receptor coregulator function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 351-356.
- MICHELSON EH (1961). On the generic limits in the family Pilidae (Prosobranchia Mollusca). *Breviora* 133: 1-10.
- NAGANO T, OHTSUKI I (1971). Reinvestigation of the fine structure of Reinke's crystal in the human testicular interstitial cell. *Journal of Cell Biology* 51: 148-161.
- NAGL S, FREEMAN J, SMITH TF (1999). Evolutionary constraint networks in ligand-binding domains: An information-theoretic approach. *Pacific symposium on biocomputing* 4: 90-101.
- NISHIKAWA J (2006). Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor. *Marine Biology* 149: 117-124.
- NISHIKAWA J, MAMIYA S, KANAYAMA T, NISHIKAWA T, SHIRAISHI F, Horiguchi T (2004). Involvement of retinoic X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environmental Sciences & Technology* 38: 6271-6276.
- NOVILLO A, WON S, LI C, CALLARD IP (2005). Changes in the nuclear receptor and vitellogenin gene expression in response to steroids and heavy metals in *Caenorhabditis elegans*. *Integr Comp Biol* 45: 61-71.

- OBERDÖRSTER E, MCCLELLAN-GREEN P (2000). The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21: 1323-1330.
- OBERDÖRSTER E, MCCLELLAN-GREEN P (2002). Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar Environ Res* 54: 715-718.
- OBERDÖRSTER E, RITTSCHOF D, MCCLELLAN-GREEN P (1998). Testosterone metabolism in imposex and normal *Ilyanassa obsoleta*: Comparison of field and TBTA CI-induced imposex. *Mar Pollut Bull* 36: 144-151.
- OBERDÖRSTER E, ROMANO J, MCCLELLAN-GREEN P (2005). The neuropeptide APGWamide as a penis morphogenic factor (PMF) in gastropod mollusks. *Integr Comp Biol* 45: 28-32.
- OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, BACHMANN J, OETKEN M, LUTZ I, KLOAS W, TERNES TA (2006). Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives* 114: 127-133.
- OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, TILLMANN M, MARKERT B (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xenoestrogens. *Ecotoxicology* 9: 383-97.
- OEHLMANN J, STROBEN E, BETTIN C, FIORINI E (1992). Hormonal disorders and tributyltin-induced imposex in marine snails. Quantified phenotype responses in morphology and physiology. *Proceedings of the 27th European Marine Biology Symposium*, Dublin, Ireland. J. C. Aldrick (ed.), pp 301-305.
- OETKEN M, BACHMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, OEHLMANN J (2004). Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *Int Rev Cytol* 236: 1-44.
- PAIN T (1960). *Pomacea* (Ampullariidae) of the Amazon River System. *Journal of Conchology* 24: 421-432.
- PERERA G, WALLS JG (1996). *Apple Snails in the Aquarium*. T.F.H. Publications, Inc., Neptune City, New Jersey, 121 pp.
- PRASHAD B (1925). Anatomy of the common Indian apple-snail *Pila globosa*. *Memoirs of the Indian Museum* 8: 91-154.
- PRINCE FP, FRASER HM, MANN DR (1999). A Reinke-like inclusion within Leydig cells of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Journal of Anatomy* 195: 311-313.

- RANJAH AR (1942). The embryology of the Indian apple-snail *Pila globosa* (Swainson) [Mollusca, Gastropoda]. *Records of the Indian Museum* 44: 217-322.
- ROBINS CH (1971). Ecology of the introduced snail, *Marisa cornuarietis* (Ampullariidae) in Dade County, Florida. *The Biologist* 53: 136-152.
- ROSENFELD MG, GLASS CK (2001). Co-regulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276: 36865-36868.
- SACHWATKIN VA (1920). Das urogenitalsystem von *Ampullaria gigax* Spix. *Acta Zool Stockh* 1: 67-130.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER FSN, COULSON AR (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463.
- SCHULTE-OEHLMANN U, TILLMANN M, MARKERT B, OEHLMANN J (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology* 9: 399-412.
- SCHULTE-OEHLMANN U, OETKEN M, BACHMANN J, OEHLMANN J (2004). Effects of ethinyloestradiol and methyltestosterone in prosobranch snails. Pharmaceuticals in the Environment. Sources, fate, effects and risks. Chapter 19. Kümmerer, K (ed.), Berlin, 233-247 pp.
- SIMONE LRL (2004). Comparative morphology and phylogeny of representatives of the superfamilies of Architaenioglossans and the Annulariidae (Mollusca, Caenogastropoda). *Arq. Mus. Nac., Rio de Janeiro* 62: 387-504.
- SMITH CL, O'MALLEY BW (2004). Coregulator function: A key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25: 45-71.
- SNYDER NFR, SNYDER HA (1971). Defenses of the Florida apple-snail *Pomacea paludosa*. *Behaviour* 40: 175-215.
- TAKEDA N (2000a). Development of a penis from the vestigial penis in the female apple snail, *Pomacea canaliculata*. *Biol Bull (Woods Hole)* 199: 316-20.
- TAKEDA N (2000b). Mollusca: Endocrine disruption of reproduction by organotins. pp. 259-285. En: *Reproductive Biology of Invertebrates*, Vol. 10. Part A, Progress in Developmental Endocrinology. A. Dorn, ed. John Wiley, New York.
- THIENGO SC, BORDA CE, BARROS ARAUJO JL (1993). On *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Mollusca; Pilidae: Ampullariidae) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 67-71.

- THORNTON JW (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *PNAS* 98: 5671-5676.
- THORNTON JW, NEED E, CREWS D (2003). Resurrecting the ancestral steroid receptor: Ancient origin of estrogen signaling. *Science* 301: 1714-1717.
- TILLMANN M, SCHULTE-OEHLMANN U, DUFT M, MARKERT B, OEHLMANN J (2001). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10: 373-388.
- VEGA IA, GAMARRA-LUQUES C, KOCH E, BUSSMANN L, CASTRO-VAZQUEZ A (2005). A study of corpuscular DNA and midgut gland occupancy by putative symbiotic elements in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Symbiosis* 39: 37-45.
- VOLTZOW J (1994). Microscopic anatomy of invertebrates. En: Mollusca vol. 5. Wiley-Liss Inc. pp. 111-252.
- WADA T (1997). Introduction of the apple snail *Pomacea canaliculata* and its impact on rice agriculture. In: *Proceedings. International workshop on biological invasions of ecosystems by pests and beneficial organisms*. National Institute of Agro-Environmental Sciences, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, pp. 170-180.
- WINIK, BC (1982). Histomorfología y contenidos celulares del aparato genital masculino de *Ampullaria canaliculata* Lamarck (hierro y mucopolisacáridos). Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Tucumán.
- WINIK BC, CATALÁN NMY, MORENO AR (1989). Histomorphological and histochemical study of male gonad of *Ampullaria canaliculata* Lamarck. *Comunicaciones Biológicas* 8: 161.
- WINIK BC, CATALAN NMY, SCHLICK OC (2001). Genesis of the apyrene parasperm in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): An ultrastructural study. *J Molluscan Stud* 67: 81-93.
- WINIK BC, SANTOLAYA C DE, CATALAN NMY (1994). Fine structure of Sertoli cells in the pilid snail *Ampullaria canaliculata* (Gastropoda, Prosobranchia). *Biocell* 18: 59-73.
- YUSA Y (2004). Brood sex ratio in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) is determined genetically and not by environmental factors. *J Moll Stud* 70: 269-275.

- YUSA Y (2006). Genetics of sex-ratio variation inferred from parent–offspring regressions and sib correlations in the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Heredity* 96: 100–105.
- YUSA Y, SUZUKI Y (2003). A snail with unbiased population sex ratios but highly biased brood sex ratios. *Proc R Soc Lond B* 270: 283-288.
- ZAITSEVA OV (1998). Structure of sensory organs and skin innervation in the mollusc *Pomacea paludosa* (Prosobranchia). *J Evol Biochem Physiol* 34: 233-242.