



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

CAMPUS IZTACALA

“EFECTO DE LA LUTEOTOMIA, EN EL ÚLTIMO  
TERCIO DE LA PREÑEZ, SOBRE EL PARTO Y LOS  
NIVELES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA EN  
*Barisia imbricata imbricata* (REPTILIA-ANGUIDAE)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE LUIS LOPEZ ARENAS



ASESOR: M. en C. MARTÍN MARTÍNEZ TORRES

IZTACALA LOS REYES IZTACALA, MÉXICO

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

A LA MEMORIA DE MI TIO.

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de la  
Reproducción de la Escuela Nacional de Estudios  
Profesionales Iztacala  
bajo la dirección del M. en C. Martín Martínez Torres.**

A Dios

y a Cristo

**Prefiero seguir tus pasos**

**Dedicada con el corazón en las manos  
a mis padres Rene y Graciela.**

**Los amo mucho,  
ojala y esto les permita sentirse orgullosos de mi.  
Ustedes que han sido siempre ejemplo de esfuerzo, coraje y  
dignidad  
"No hay nada mejor que casa."**

**A Rene , carnal del alma,  
Si la vida fuera como en Guanajuato.**

**A mi hermano Jorge, esto te lo dedico con tanto cariño, por tu  
esfuerzo...**

A mis abuelas Carmen e Isabel, ejemplos de sacrificio y entrega, tambien quiero dedicar este esfuerzo a mis abuelos José (q.e.p.d.) y Luis (q.e.p.d.) a todos ellos  
**GRACIAS.**

A Alfonso (va para ti, con todo respeto), a mi tia Carmen que me vio desde pequeño, a mi tio Ramón, con cariño, a mi tio Cesar "la carne es como hierba ..." y mi tia Rosa que estan peleando a la contra, a Cesar "totoy" solo pude quedarme sentado aquí, viendo como probaste la hiel y el vinagre con valor, que Dios te tenga en su gloria.

A mis tios Samuel y Martha, Luis y Juana, Ma.de Jesus y Enrique, a mi tia Santa, Laura y Benito, mi tia Isabel, mi tia Sara, mi tio Victor y Maru, a mi tio Ignacio y Filiberto. A todos ellos les dedico este esfuerzo y gracias por todas las cosas que me han brindado.

Tambien una dedicatoria muy, pero muy especial que me deja sin palabras... a Carolina "que hablar de amor es bueno cuando se es sincero", esta tarde vi llover, vi la gente correr...

A mi ahijado Ramón y a Monserrat, los quiero mucho, a todos mis primos sin ninguna excepción, a todos mis sobrinos sin ninguna excepción, a Mario, Paty y la pequeña Olinka, a mis viejos amigos del CCH Vallejo (Hugo, Omar, Marcos, Vanessa, Mireya, Lorena, Cesar ) como los recuerdo con cariño, a Fernando "chino" que pasa por la calle?, a la *banda iztacalera* de Biología, siempre los voy a recordar, al *Iztacala val*, al *Bajita la mano*, a Isabel y el comando Temgesic (Carlos, Maria, Lourdes y Lilly), a la familia Ponce del Bosque, a Poncho alias Poncho, a Lola alias Dolores, a mis hijos Jaqueline, Edgar, Giovanni, a Daniel.

Por último a mis lagartijas: juanita, panchita, jeniffer, la reina, etc.

## **AGRADECIMIENTOS.**

**A la Biol. Carolina Ponce del Bosque por su valiosa ayuda en la realización del presente trabajo.**

**Al M. en C. Martín Martínez Torres por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo de tesis.**

**Al M. en C. Tizoc Altamirano por su apoyo y amistad.**

**A todo el Laboratorio de Biología de la Reproducción, ya que sin su ayuda, este trabajo no se hubiera podido haber realizado.**

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Ciclos reproductivos	2
Estrategias reproductivas	2
Desarrollo foliular	3
Desarrollo e involucion del CL	6
Fases de desarrollo de CL	6
Involución del CL	6
Clasificación del CL	7
Progesterona	10
Esteroidogénesis ovárica	10
ANTECEDENTES	12
<i>Barisia imbricata imbricata</i>	12
Viviparidad	13
Parto	14
Arginina vasotocina	14
Prostaglandinas	15
Participación del CL	15
Justificación y planteamiento del problema	18
Hipótesis	18
Objetivos	18
METODOLOGÍA	19
Luteotomía	19
Laparotomía	20
Control Intacto	20
<i>Post-partum</i>	20
RESULTADOS	21
Efecto de la lutectomía en el parto	21
Efecto de la lutectomía sobre los niveles plasmáticos en el último tercio de la preñez	21
Desarrollo embrionario en el último tercio de la preñez	22
Características del CL	24
En el último tercio de la preñez	24
Después del parto	25

Histoquímica del CL	26
En el último tercio de la preñez	26
<i>Post partum</i>	27
DISCUSIÓN	28
Efecto de la lutectomía en el último tercio de la preñez sobre los niveles plasmáticos de P <sub>4</sub>	28
Parto	29
Histofisiología del CL durante el último tercio de la preñez.	30
CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS	32
APENDICE	37

## RESUMEN.

El proceso de parto está influenciado por diversos mecanismos hormonales, en los reptiles ovíparos se ha demostrado que el cuerpo lúteo (CL); glándula endocrina transitoria, es importante en el mantenimiento de la gravidez por su capacidad de secretar progesterona ( $P_4$ ). El grado de desarrollo histológico del CL exhibe una correlación positiva con los niveles plasmáticos de  $P_4$ , además de que se ha observado que su remoción provoca oviposición prematura. En el caso de los reptiles la participación del CL en el mantenimiento de la gestación no es muy clara debido a que la respuesta a la remoción luteal difiere de acuerdo a la especie y a la etapa en que se realice la cirugía. Además de la  $P_4$ , hormonas como la arginina vasotocina (AVT) y la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) están implicadas también en el proceso del parto. Jones y Guillette sugieren que los cambios en la secreción lútea regulan los procesos neuroendocrinos que desencadenan el parto. En este trabajo hemos utilizado hembras de *Barisia imbricata imbricata* en el último tercio de la preñez, para estudiar el control endocrino de la preñez y el parto. Algunas hembras se asignaron a tratamiento quirúrgico (lutectomía o laparotomía) y a otras no se les aplicó ningún tratamiento (NT). A las hembras lutectomizadas, el CL obtenido se dividió en dos, una mitad se incluyó en "tissue-tek" y se congeló para determinar la actividad de la  $\Delta^{5-4},3\beta$ -hidroxi esteroide deshidrogenasa (HSD) y la  $17\beta$  HSD. La otra mitad del CL se procesó mediante la técnica histológica de rutina y se observó al microscopio. A las hembras de laparotomía sólo se les realizó incisión ventral y cuantificación de CLs. Previo a la cirugía, así como seis horas después se tomó una alícuota de sangre de 220  $\mu$ l, se centrifugó, se decantó el plasma y se congeló a  $-40^\circ\text{C}$  para la medición de  $P_4$  mediante radioinmunoanálisis. A las hembras NT se les tomó dos alícuotas (0 a 6 hrs.) de sangre y el plasma se procesó también para medir  $P_4$ . Todas las hembras se mantuvieron en cautiverio con agua y alimento hasta el nacimiento de las crías. Se observó que todas las hembras sometidas a lutectomía presentaron complicaciones en el parto (parto prematuro, parto disociado y parto retardado) y elevación en los niveles de  $P_4$  circulante. La actividad de la  $\Delta^{5-4},3\beta$ -HSD y la  $17\beta$  HSD en los CLs, se observó durante el último tercio de la preñez y también en el *post-partum*, aunque en menor grado. Esto se puede explicar debido a que la sensibilidad del oviducto a la AVT está regulada por la  $P_4$ , niveles altos impiden la sensibilidad del oviducto a la AVT; que induce la contracción del oviducto a través de las  $PGF_{2\alpha}$  que causan las contracciones oviductales que desembocan en el parto. Por lo tanto los cambios en los niveles de  $P_4$  plasmática provocados por la remoción del CL pueden alterar la liberación de AVT y traer como consecuencia anomalías en el parto.

## INTRODUCCIÓN.

Los organismos del planeta a pesar de su gran diversidad sólo presentan dos tipos de reproducción: la asexual y la sexual. La reproducción asexual se da cuando los progenitores pueden dividirse o fragmentarse para así formar dos o más descendientes; ésto ocurre principalmente en las bacterias, los hongos, los protozoos y algunos tunicados. La reproducción sexual requiere generalmente de dos progenitores donde cada uno contribuye con un tipo de gameto para la procreación (Odum, 1972).

### *Ciclos reproductivos.*

Y debido a que la reproducción está influenciada por factores ambientales, los ciclos reproductivos han evolucionado. Méndez y col. (1998) opinan que los ciclos reproductivos sincrónicos, que se observan en los escamosos vivíparos, evolucionaron a partir de los ciclos asincrónicos que presentan las especies ovíparas. Vial en 1985 establece para el caso de lacertilios tropicales, los siguientes ciclos reproductivos: i) continuo, sin variación en la actividad reproductiva, ii) continuo, con variación estacional en la actividad reproductiva y iii) discontinuo, con distintos periodos de inactividad reproductiva.

### *Estrategias reproductivas.*

Por otra parte, muchos vertebrados expulsan el gameto virgen y la fecundación se lleva fuera del cuerpo. A esta estrategia se denomina ovuliparidad (Angelini y Ghiara, 1984).

En el resto de los vertebrados, la fertilización se lleva a cabo en el interior del aparato reproductor femenino; sin embargo el huevo fertilizado puede ser expulsado sin que haya concluido el desarrollo embrionario y además con alguna cubierta ovular intacta, a este tipo de estrategia se le denomina oviparidad y es posible encontrarla en muchos reptiles, en todas las aves y en algunos mamíferos como los protiterios (Blackburn, 1993). Finalmente, en diversos peces, en muchos reptiles y mamíferos el embrión termina el desarrollo en el interior de la hembra y además desarrolla un anexo embrionario "la placenta" y es expulsado vivo del cuerpo y con la capacidad de llevar una vida independiente de la madre, a este tipo de estrategia se le denomina viviparidad (Blackburn, 1993).

En los organismos ovulíparos el ovocito liberado transita rápidamente a través del oviducto y la ovulación es seguida inmediatamente por la oviposición. En estos organismos, se sugiere que los folículos post-ovulatorios no forman cuerpos lúteos (CL) verdaderos, por el contrario los organismos ovíparos y vivíparos, los folículos post-ovulatorios si los forman (Martínez-Torres, 1997).

Los reptiles son un grupo versátil de vertebrados que presentan entre otras características dos estrategias de reproducción: la oviparidad y la viviparidad y son modelos adecuados para el estudio de las mismas.

### **Aparato reproductor.**

El aparato reproductor de las hembras de los reptiles esta constituido por órganos sexuales primarios (como el ovario) y secundarios (como las glándulas y los conductos). Los ovarios como en la mayoría de los vertebrados son estructuras huecas de forma oval y alargada. Y están suspendidos por el mesovario sobre la pared posterior del cuerpo (van Tienhoven, 1968).

#### *El ovario.*

En el caso de los reptiles como en todos los vertebrados, el ovario tiene dos funciones primordiales: la producción de gametos y hormonas. El parénquima ovárico (fig.1) presenta folículos previtelogénicos (FPV) poco aparentes, folículos vitelogénicos (FV) y folículos atrésicos (FA) y en la fase de gravidez se observan CLs (Hernández-Caballero, 1997). El ovario sintetiza y secreta hormonas como la progesterona, estrógenos y testosterona. Los estrógenos son secretados fundamentalmente en las etapas pre-ovulatorias donde los ovarios están bajo el control de las gonadotropinas pituitarias; tienen la función de estimular la maduración del tracto genital (Yaron, 1985).

El ovario de los reptiles produce ovocitos a partir de ovogonias; estos ovocitos poseen cromosomas en la profase meiótica, las hebras de cromatina son fáciles de ver y en general los ovocitos son más grandes en diámetro que las ovogonias. Se localizan en los lechos germinales que se encuentran en la pared dorsal del ovario (Uribe y col. 1995). Dentro del lecho germinal, los ovocitos crecen y maduran para posteriormente abandonarlo (Martínez-Torres, 1997).

### **Desarrollo folicular.**

El desarrollo folicular consta de varias etapas en las cuales se da lugar a la formación de los FPV, FV y FA.

*Folículos pre-vitelogénicos.* Su formación inicia cuando los ovocitos abandonan el lecho germinal; y constan de un epitelio estratificado constituido por tres capas celulares: a) las células pequeñas, b) células intermedias y c) células piriformes o nutritivas, estas últimas están en comunicación con el ovocito mediante proyecciones (Zuckerman, 1977).

*Folículos vitelogénicos.* Al iniciar la síntesis y el depósito del vitelo, los folículos vitelogénicos presentan la zona pelúcida más gruesa, la teca externa aumenta en su grosor y se vuelve más vascularizada y fibrosa. La teca interna presenta células hipertrofiadas de citoplasma claro y núcleo vesicular que secretan esteroides (Martínez-Torres, 1997).

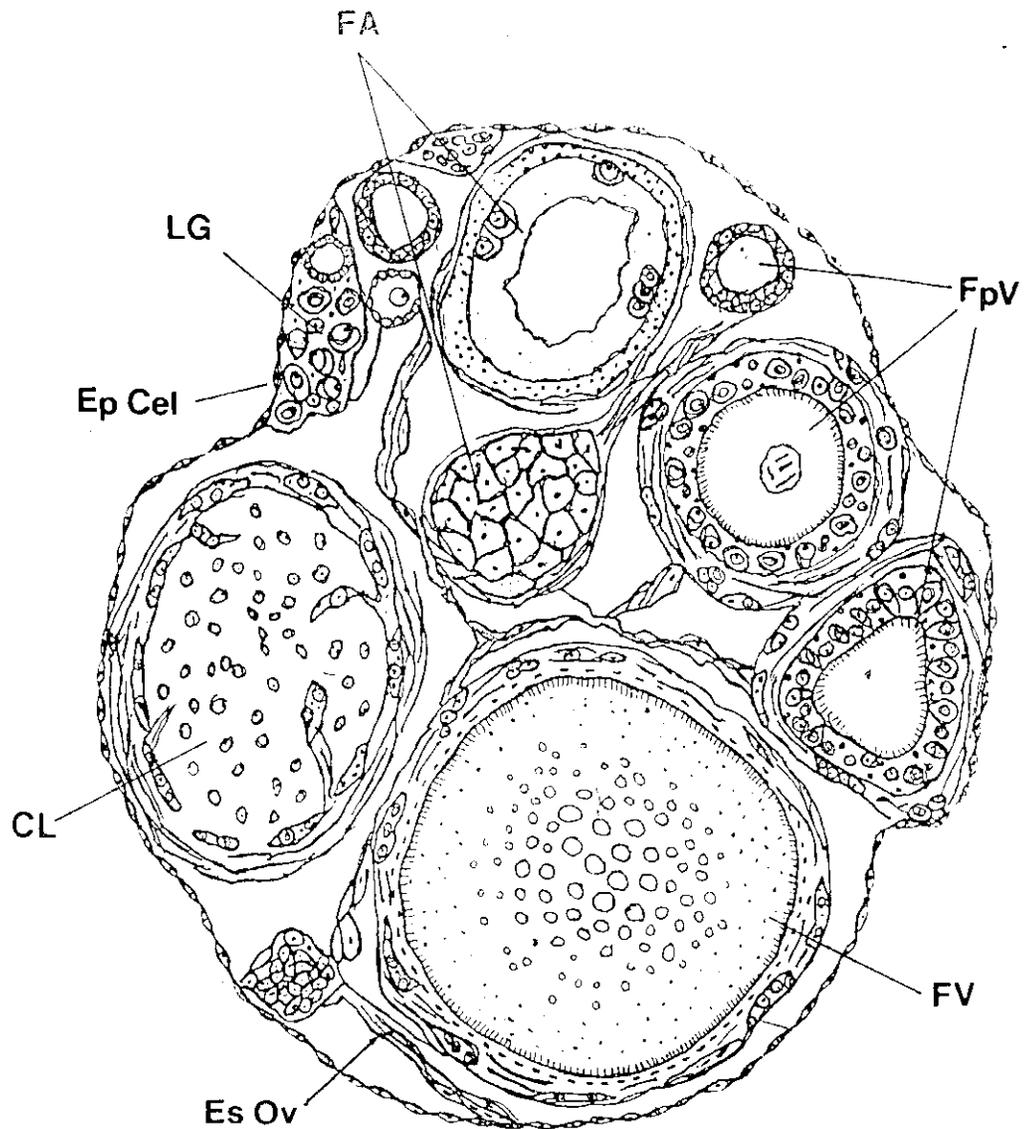


Fig.1 Ovario de *B. Imbricata imbricata*, donde se muestran las estructuras más comunes que se pudieran presentar a lo largo del ciclo reproductivo: LG=lecho germinal, FpV=folículo previtelogénico, Fv=folículo vitelogénico, EsOv=estroma ovarico, CL=cuerpo lúteo y EpCel=epitelio celómico (Tomado de Hernández-Caballero,1997).

*Atresia folicular.* Al hablar de la atresia folicular se hace referencia a aquellos folículos que independientemente del grado de vitelogénesis, presentan cambios degenerativos; el crecimiento del ovocito se detiene, se fracciona el núcleo, la zona pelúcida se rompe y permite el acceso de las células de la granulosa que invaden al ovocito y fagocitan al vitelo. Además se ha observado que los FA presentan actividad de la  $\Delta^{5-4}$   $3\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa ( $\Delta^{5-4}$   $3\beta$  HSD) por lo que se sugiere que pudieran representar una fuente de progesterona ( $P_4$ ) (Méndez, 1994).

*Cuerpos lúteos.* Después de la ovulación se forman los folículos post-ovulatorios que se transforman en CLs; que son glándulas endocrinas transitorias y una fuente importante de  $P_4$  ovárica. En los reptiles después de la liberación del ovocito, los folículos presentan una apariencia de saco colapsado y está compuesto por tejido epitelial y conjuntivo (fig.2).



**Fig.2** Corte histológico de un CL de *B. Imbricata imbricata*, presenta la apariencia de saco colapsado, se observa la teca externa=TE, la teca interna=TI, la masa de células luteas=MCL y la cavidad folicular=CV.

## Desarrollo e involución del CL.

El desarrollo y la involución del CL. ha sido dividido en etapas para facilitar su estudio; el desarrollo del CL. de *B. imbricata imbricata* abarca aproximadamente diciembre y enero (Martínez-Torres, 1997). Al final de la fase IV de desarrollo, el CL. es una estructura compacta, que inicia una etapa de involución donde se observan características degenerativas en los cuatro meses restantes de la preñez (Guraya y Varma, 1976). Al respecto Hernández-Caballero (1997) observó las siguientes características en dicho proceso de desarrollo e involución del CL.

### *Fases de Desarrollo del CL.*

#### **Fase I**

En ésta fase el CL. presenta su máximo volumen, en la pared dorsal se observa la apertura dejada por el ovocito al salir, además se inicia la transformación de las células de la granulosa en células lúteas que poseen un núcleo grande, claro, con dos o tres nucleolos con citoplasma acidófilo. La teca externa presenta una mayor estratificación con vasos sanguíneos y abundantes fibroblastos mientras que la teca interna tiene menor grosor y presenta una capa de células unidas con núcleos basófilos y adipocitos.

#### **Fase II**

Se observa hipertrofia de las células de la granulosa a partir de la región central hacia la periferia y debido a esto se comienza a llenar la cavidad folicular disminuyendo su tamaño. Se hace evidente el arreglo de tipo cordonal de las células con citoplasma acidófilo y esto les da un aspecto espumoso.

#### **Fase III**

La cavidad folicular se cierra debido a la hipertrofia de las células de la granulosa, que se transformaran en esta fase en células lúteas; mientras que el arreglo cordonal y la apariencia espumosa del citoplasma se mantiene.

#### **Fase IV**

En esta fase se observa que los sinusoides de la teca externa pierden tamaño debido a la disminución en el grosor de las tecas y es evidente la infiltración de tejido conectivo de la teca interna hacia la masa de células lúteas.

### *Involución del CL.*

#### **Fase I**

La disminución del grosor de las tecas continúa, además de la invasión de tejido conectivo en forma de septos con algunos vasos sanguíneos hacia la masa de células lúteas. En el caso de las células lúteas, el citoplasma presenta vacuolas, el núcleo se desplaza a la periferia, debido a ésto las células adquieren una forma anillada y se inicia el proceso de apoptosis de las células lúteas.

#### **Fase II**

En esta fase el interior de la masa de células lúteas presentán algunos macrófagos y eosinófilos, además de la infiltración masiva de tejido conectivo. Por otra parte la degeneración de la masa de células lúteas ocasiona que el CL. tenga una disminución en su tamaño.

### Fase III

En esta fase la división entre ambas tecas se pierde totalmente y adquiere una característica fibrosa y se presentan cavidades pequeñas en el interior de la masa de células lúteas, además de una infiltración abundante de eosinófilos.

### *Órganos sexuales secundarios.*

El oviducto de los reptiles es muy similar al de los mamíferos. Está constituido por cuatro regiones: i) el infundíbulo, que se ubica en la región anterior de los oviductos, ii) un tubo o segmento contorneado, iii) segmento uterino y iv) una vagina que se comunica con la cloaca (Fox, 1977). En la región posterior del oviducto, se encuentra un delgado rubo denominado istmo, el cual se hace evidente en hembras preñadas (Jones y Guillette, 1982). El oviducto está constituido por tres capas: i) el periméterio o capa serosa exterior, compuesta por mesotelio y tejido conjuntivo laxo, ii) miométrio o capa media, constituida por dos capas de músculo liso (una circular y otra longitudinal) responsable del transporte de los ovocitos y embriones, iii) endométrio o capa mucosa, la cual está compuesta por una capa de tejido epitelial y conjuntivo. Las capas del oviducto pueden variar de acuerdo a cada región; del mismo modo que las glándulas y la capa epitelial de revestimiento (Uribe y col. 1988).

### **Clasificación del CL.**

El CL puede ser clasificado de acuerdo a diferentes criterios: por su morfología, su origen y por sus factores luteotrópicos y luteolíticos.

De acuerdo a su aspecto morfológico y la participación de la teca en la formación de masas de células lúteas, se puede clasificar en dos tipos: el Tipo 1, donde no hay participación de la teca, como en *Sceloporus jarrovi*, *Sphenomorphus quoyii* y *Egernia whitii*. (Xavier, 1987). Y el Tipo 2, donde sí hay participación de la teca, este último presenta dos subtipos: el subtipo A donde las células no participan en la esteroidogénesis y se dividen en: i) donde la penetración de los fibroblastos es en forma de septos, por ejemplo en las serpientes ovíparas *Naja naja* y *Lycodon aulicus*, en la serpiente vivípara *Natrix rhombifera* y en las lagartijas *Calotes versicolor* y *Uromastix hardwicki* (Xavier, 1987). y ii) donde la penetración de los fibroblastos se da por células aisladas, por ejemplo en la lagartija vivípara *Lacerta vivipara* y la serpiente vivípara *Hydrophis cyanocinctus* (Xavier, 1987).

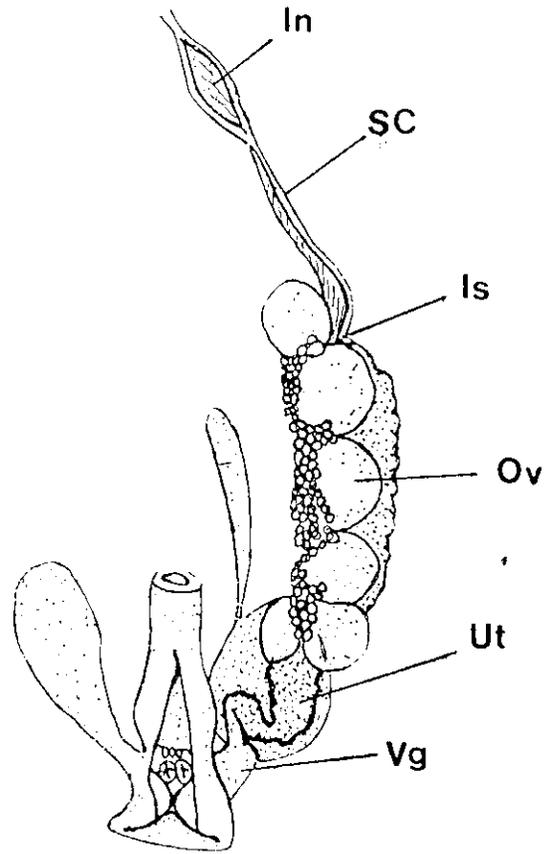


Fig. 3. Aparato reproductor femenino de *B. Imbricata imbricata*. Esquema donde se presentan las siguientes estructuras: Vg=Vagina, Ut=Útero, Ov=Ovario, Is=Istmo, SC=Segmento contorneado, In=Infundíbulo (Mendez, 1994).

En el subtipo B las células participan en la esteroidogénesis y se dividen en: i) células que permanecen aisladas de las células foliculares lúteas por una membrana, por ejemplo *Naja naja* (Xavier, 1987) ii) células que se entremezclan y forman parte de las células lúteas como en *Uromastix hardwicki* y iii) células que forman agrupamientos pequeños como en *Lacerta vivipara* (Panigel, 1956) y *Barisia imbricata* (Martínez-Torres, 1997).

De acuerdo a su origen (Browning, 1973) el CL puede clasificarse en: i) cuerpo lúteo de atresia (CLA) o ii) cuerpo lúteo de ovulación (CLO). El CLA se origina a partir de los folículos atrésicos y puede aparecer en cualquier momento del ciclo reproductivo del organismo; en especies vivíparas puede estar implicada en la reducción del número de ovocitos ovulados (Browning, 1973).

EL CLO se origina a partir de las capas del folículo vacío después de la liberación del ovocito, es importante para la reproducción de las especies ovíparas y vivíparas debido a su capacidad esteroidogénica; en la lagartija ovípara *Amphibolurus muricatus*, los CLO permanecen activos durante tres semanas de gestación, a diferencia de las especies vivíparas donde la actividad del CLO persiste en alguna o en todas las etapas de la gestación (Browning, 1973).

También el CL ha sido clasificado en consideración a los factores que regulan su actividad (Jones y Baxter, 1991).

En el Tipo I, poco antes de la ovulación ocurre la luteinización de la granulosa debido al aumento de la secreción de gonadotropinas pituitarias (LH, FSH o ambas) y degenera cuando el aporte de gonadotropinas desaparece, debido a que esta disminución lleva a la producción de prostaglandinas luteolíticas. La vida media del CL es de algunas horas o días y se presenta en organismos con fertilización externa como teleostelos y anuros ovulíparas y en aves.

El CL de Tipo II se encuentra controlado por luteotropinas de la pituitaria, Jones y Baxter, (1991) proponen que este CL se presenta en elasmobranquios ovíparas y vivíparas, teleostelos ovíparas y vivíparas, urodolos ovíparas, anuros, reptiles y en mamíferos euterios. El CL se forma después de la ovulación manteniéndose algunos días más en respuesta al alargamiento de la secreción de gonadotropinas. Por lo tanto el CL produce por más tiempo progesterona retrasando la oviposición y deteniendo la producción de prostaglandinas, además de suprimir el rechazo inmunológico del embrión.

El CL de Tipo III se presenta en euterios con placenta epiteliocorial, donde la secreción uterina de  $PGF_{2\alpha}$  provoca luteólisis. El CL se encuentra bajo el control de luteotropinas de la pituitaria y luteolisinas extrínsecas como la oxitocina producida por el hipotálamo y la prolactina, cuya acción es mediada por prostaglandinas.

En el Tipo IV, el CL se caracteriza por estar bajo el control de luteotropinas extrínsecas de origen embrionario. Se presenta en el anfibio vivíparo *Nectophrynoides occidentalis* y en la lagartija vivípara *Lacerta vivipara* donde el alargamiento de la vida luteal se ve influenciada por las luteotropinas secretadas por el embrión; también se puede presentar este tipo de CL en otros anfibios o reptiles vivíparas y mamíferos que tengan placenta con capacidad de secretar gonadotropinas (Jones y Baxter, 1991).

Por último el CL de Tipo V está controlado por factores luteostáticos extrínsecos, la vida del CL es alrededor de dos semanas; se presenta en muchos marsupiales donde la quiescencia del CL se debe a la secreción de prolactina y al succionamiento de la cría. La secreción de progesterona en este CL está bajo el control de los factores luteostáticos extrínsecos.

### **Progesterona.**

En todo organismo el sistema nervioso y las hormonas tienen una estrecha e importante interrelación en el funcionamiento y respuesta de las glándulas endocrinas. Las hormonas son transportadas por la sangre desde la glándula hasta el sitio en que actúan; tiene un alto grado de especificidad ya que desencadenan en forma característica una respuesta que sólo puede observarse en ciertas células del cuerpo. Otro aspecto importante de sus funciones es su elevado porcentaje de recambio, es decir, si sólo se necesita un pequeño cambio metabólico, puede actuar una pequeña cantidad de hormona y las moléculas se liberan o inactivan con rapidez. Pero cuando se necesita un cambio metabólico continuo, se sintetiza constantemente una hormona particular para mantener dicha acción (Schottellius, 1982).

La  $P_4$  es una hormona importante durante la gestación de los organismos vivíparos. Los niveles de  $P_4$  en la circulación durante la fase folicular son bajos, incrementándose durante la fase luteal y disminuye gradualmente al final de la preñez. En los reptiles vivíparos que están gestando, la  $P_4$  tiene la función de preparar al oviducto para la preñez, previene los ciclos ovulatorios durante la gravidez, también evita la síntesis y liberación de prostaglandinas (PGs) previniendo así las contracciones uterinas (Yaron, 1982).

### *Esteroidogénesis ovárica*

La  $P_4$  como los demás esteroides posee un núcleo con una estructura principal de anillo ciclopentanoperhidrofenantreno de 17 carbonos, es sintetizada a partir del colesterol (molécula de 27 carbonos) incorporado a través del alimento o sintetizado a partir del acetato en el retículo endoplásmico. El colesterol (fig.4) mediante la enzima 20, 22 esteroide liasa se transforma en pregnenolona, debido a la pérdida de seis átomos de carbono (C) de la cadena lateral en el C17, si sigue por la vía  $\Delta^4$ , la oxidación del grupo alcohol y el desplazamiento de la doble ligadura del anillo B al anillo A mediado por la  $\Delta^{5,4}\beta$ HSD, la pregnenolona se transforma en  $P_4$ . En el caso de la vía  $\Delta^5$  mediante la P450c17 (que tiene la capacidad de actuar como una hidrolasa o una liasa) se forma  $17\alpha$  hidroxipregnenolona, por la adición de un grupo OH en el C17 en posición  $\alpha$ . A partir de la  $17\alpha$  hidroxipregnenolona mediante la acción de la  $\Delta^{5,4}\beta$ HSD se forma  $P_4$  (Callard y Kleis, 1987). La  $P_4$  mediante la P450c17 se transforma en androstenediona debido a la incisión de 2 C en la posición 17-20 y la formación en este carbono de un grupo ceto. Para que se forme testosterona a partir de androstenediona debe haber una hidroxilación mediante la acción de una 17- ceto reductasa. La testosterona mediante el complejo P450c17aromatasa se transforma en estradiol debido a la aromatización del anillo A (Miller, 1988).

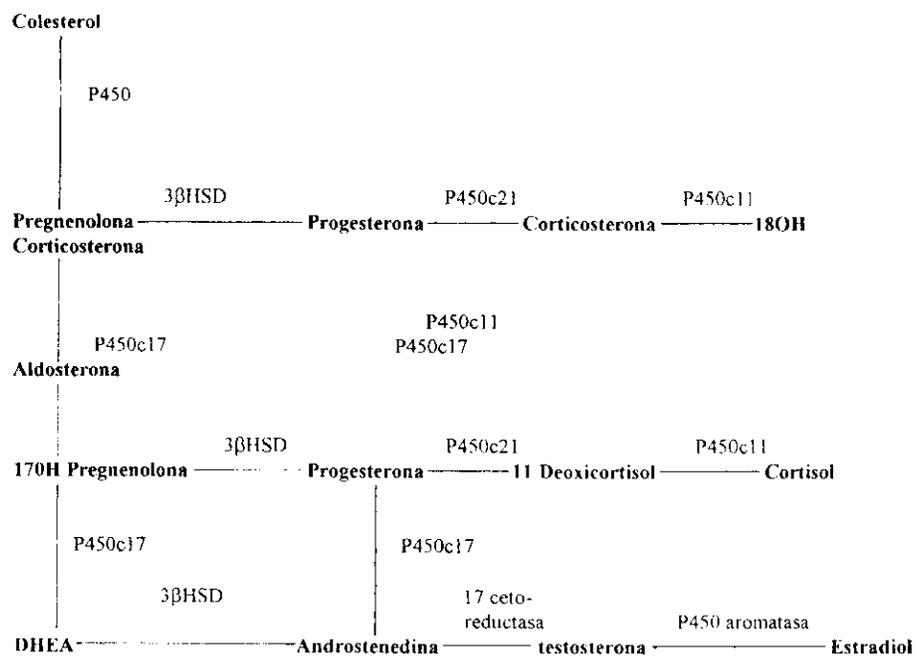


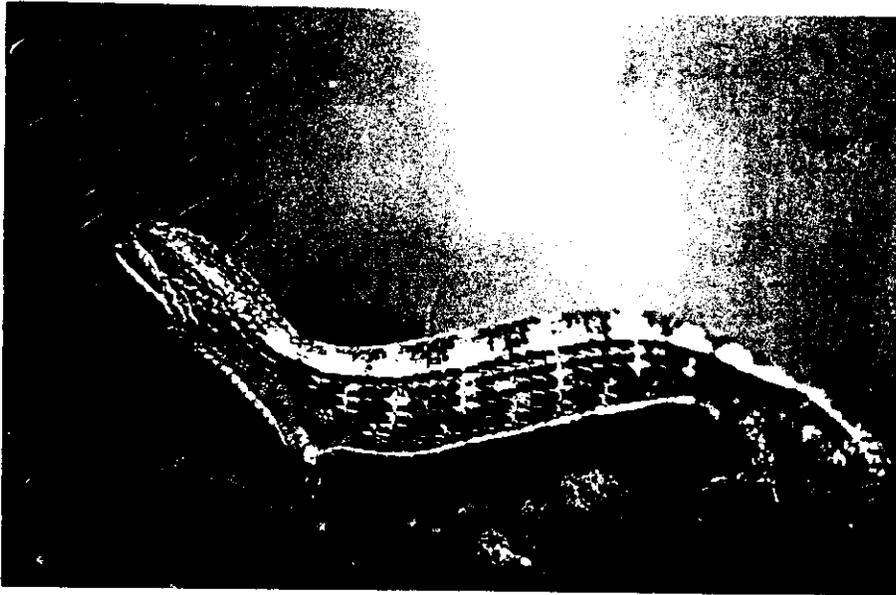
Fig.4 Esquema de la síntesis de hormonas esteroides sexuales producidas en el folículo ovárico mostrando la vía  $\Delta^5$  y vía  $\Delta^4$ , así como las enzimas involucradas (Miller, 1988).

## ANTECEDENTES.

### *Barisia imbricata imbricata.*

Son organismos que pertenecen a la Familia Anguidae, que es un grupo monofilético conformado por seis géneros. En el caso de México hay cinco de éstos, de los cuales el género *Barisia* es endémico del país. Son miembros de la subfamilia Gerrhonotidae y pertenecen al suborden Lacertidae (Good, 1987).

Son lagartijas vivíparas que habitan las zonas templadas, con vegetación de pastizal asociado a pino; estos organismos (fig.5) se encuentran a altitudes elevadas a partir de los 2100 y los 4000 m.s.n.m., su distribución se encuentra sobre el eje neotranversal. Son terrestres y se alimentan principalmente de insectos (Guillette y Casas-Andreu, 1987).



**Fig.5 *B. imbricata imbricata*, lagartija vivípara perteneciente a la familia Anguidae, que habita las zonas templadas, con actividad sexual verano-otoño.**

El aparato reproductor femenino de *B. imbricata imbricata* consta de órganos pareados, como ovario, útero y vagina. Los ovarios están suspendidos de la pared dorsal del cuerpo por el mesovario, son huecos y están limitados por un epitelio escamoso. el parénquima del ovario contiene folículos descritos anteriormente para otras especies (Hernández-Caballero, 1997). En cuanto a su actividad reproductiva, las hembras exhiben actividad sexual verano-otoño, con crecimiento folicular en verano, la ovulación en otoño y el estado de preñez en invierno; el desarrollo embrionario dura seis meses (Guillette, 1987). Se ha relacionado positivamente el crecimiento folicular con el comienzo del periodo de lluvias, pero no con el aumento de la temperatura y el fotoperíodo (Guillette y Casas-Andreu, 1987). Se ha observado que en el invierno el desarrollo embrionario es lento y alcanza el estadio 31-32 para febrero (Hernández-Caballero, 1997). Los machos presentan actividad sexual a partir de la primavera con recrudescencia testicular, mostrando actividad máxima en verano y decreciendo en la temporada de otoño (Guillette, 1987).

### **Viviparidad.**

En los reptiles existen alrededor de 6000 especies que presentan esta modalidad y todas pertenecen al Orden Squamata (Shine, 1995).

Existen diversas hipótesis acerca de las condiciones ecológicas que promovieron la evolución de la viviparidad. La hipótesis del clima frío es la más aceptada y propone que las hembras grávidas retienen el huevo como una respuesta termorreguladora a estas condiciones climáticas (Shine, 1995). Además, existen reportes de diversos autores que apoyan este punto de vista; por ejemplo Braña y col. (1991) estudiaron distintas poblaciones de especies de lagartijas europeas y encontraron que a mayor altitud, el tiempo de retención del huevo es más prolongado. En México Camarillo (1981) observó que en poblaciones de lagartijas de zonas templadas a elevadas altitudes, hay un mayor número de especies vivíparas que ovíparas.

Existen otras hipótesis en las cuales se indica que la viviparidad no sólo surgió como una adaptación a climas fríos; ya que se han encontrado especies vivíparas en climas tropicales y que además, no provienen de ancestros que habitaran en climas templados (Blackburn y col, 1984). Sin embargo la evolución de la viviparidad también puede surgir como respuesta a otros factores tales como la depredación, humedad, sequedad, etc.

La idea de que el CL y la P<sub>1</sub> estuvieran involucrados en la retención del huevo, fue propuesta inicialmente por Hisaw (1959). La viviparidad radica en que el huevo sea retenido en el útero hasta que el desarrollo embrionario se complete; en los reptiles ovíparos hay evidencias muy claras de la participación del CL en el control de la puesta del huevo, pero en los escamosos vivíparos no es muy clara, de acuerdo a la especie y al tiempo en que se haga la ovariectomía o la remoción del CL. (Martínez-Torres, 1997).

Es conocido que la  $P_4$  es un producto del CI. y que especies vivíparas y ovíparas tienen la capacidad de sintetizar esta hormona, aunque difieran de la cantidad y duración de la secreción. En especies ovíparas como *Chelonia mydas* exhiben un incremento en la producción de la  $P_4$  antes de la ovulación y esta decae en la fase luteal de una forma marcada. A diferencia de las especies vivíparas como *Trachydosaurus rugosus* (Bourne, 1972), *Sceloporus jarrovi* (Guillette y col., 1992) y *Basiliscus imbricatus* (Martínez, 1997) que exhiben una producción abundante de esta hormona en el periodo post-ovulatorio.

#### Parto.

El parto es un proceso fisiológico muy estudiado en mamíferos, con el cual se da fin a la etapa de embarazo. Sin embargo ha sido muy poco estudiado en los reptiles (Martínez-Torres, 1997). La neurohipófisis de estos organismos secreta hormonas que influyen en el proceso de oviposición o parto (Jones y Guillette, 1982). En la lagartija vivípara *Lacerta vivipara* (Panigel, 1956) se observó que la administración de extractos neurohipofisiarios de mamífero, induce el parto (Tabla 1).

#### *Arginine vasotocina (AVT).*

Se ha observado que la administración de la hormona peptídica AVT (Tabla 1) promueve las contracciones en el oviducto que derivan en la oviposición y el parto (Jones y Guillette, 1982). Por ejemplo, mediante una inyección intraperitoneal se puede inducir la oviposición en *Hemidactylus frenatus*, *Lepidodactylus lugubris* y en *Sceloporus aeneus aeneus* (Guillette y Jones, 1982). En *Sceloporus jarrovi* también mediante la aplicación de una inyección intraperitoneal la AVT también estimula el parto (Guillette y Jones, 1982).

**Tabla 1. Efecto de la administración de hormonas neurohipofisiarias sobre la oviposición y el parto.**

Especie	Estrategia reproductiva	Hormona administrada	Efecto
<i>Lacerta vivipara</i>	vivípara	oxitocina, extractos pituitarios	parto
<i>Sceloporus aeneus</i>	ovípara	AVT	oviposición
<i>Anolis carolinensis</i>	ovípara	AVT	ninguno
<i>Sceloporus jarrovi</i>	vivípara	AVT	parto

#### *Prostaglandinas (PGs).*

Hay evidencias de que las PGs son un potente estimulador de las contracciones en el útero en aves y mamíferos (Guillette y col., 1991). Diversos estudios indican que las PGs juegan un papel importante en el proceso de parto en los reptiles, por ejemplo se ha observado que la  $PGF_{2\alpha}$  induce el parto en la lagartija vivípara *Hoplodactylus maculatus* (Cree y Guillette, 1991). En *Sceloporus jarrovi* se encontró que el bloqueo de la síntesis de PGs mediante indometacina exógena alargó el tiempo de la gestación (Guillette y col. 1991). Debido a esto se piensa que la estimulación de las contracciones oviductales asociadas con la oviposición y el parto en reptiles, esta controlada por las interacciones de diversas hormonas incluyendo a la AVT y a las PGs (Guillette y col. 1990). Guillette y col. (1991), propusieron un modelo donde muestran la interacción del sistema nervioso central (SNC), la AVT y las PGs. El SNC coordina las actividades durante la ovulación y la oviposición. Durante la ovulación el tracto reproductivo, específicamente el "cervix" está bajo el control de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, que no permiten la respuesta a la AVT ni a las PGs. Pero durante la oviposición la concentración de AVT plasmática aumenta, inhibiendo la estimulación  $\beta$ -adrenérgica y promoviendo la síntesis de PGs en el oviducto y posiblemente en el folículo; lo que provoca las contracciones en el oviducto para que ocurra la oviposición.

#### *Participación del CL.*

Se ha observado que el CL influye en el periodo de gravidez en reptiles ovíparos; por ejemplo en muchas tortugas *Pseudemys scripta* (Moll y Legler, 1971), *Chelydra serpentina*, *Chelonia mydas* (Xavier, 1987) y algunos escamosos, por ejemplo *Cnemidophorus uniparens* (Cuellar, 1979), se ha encontrado que el CL inicia su regresión poco antes de la oviposición, o bien inicia inmediatamente después de la puesta como en el caso de la lagartija *Calotes versicolor* (Varma, 1970). Se ha demostrado también que la desluteinización quirúrgica en *Anolis carolinensis* está relacionada directamente con la oviposición (Guillette y Fox, 1984). Sin embargo en serpientes y lagartijas vivíparas (Tabla 2) la participación del CL en la retención del huevo hasta que el desarrollo embrionario se complete no es muy clara, debido a que la atrofia del CL puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo embrionario dependiendo de la especie (Martínez-Torres, 1997).

Hay evidencias experimentales que han demostrado que la remoción del CL tiene diferentes efectos de acuerdo a la especie y al tiempo en que se practique.

Por ejemplo, Highfill y Mead (1975b) observaron que al practicar luteotomía al inicio de la gestación en *Thamnophis elegans*, el desarrollo de la preñez no se vio alterado, pero hubo retraso en el parto. En *Storeria dekayi* (Clausen, 1940), se realizó ovariectomía a la mitad de la preñez encontrando reabsorción de los embriones o aborto. En *Thamnophis sirtalis* se practicó la remoción de los ovarios al final de la preñez, observando parto normal (Clausen, 1940).

En algunas lagartijas vivíparas, la luteotomía practicada al inicio de la preñez no provoca anomalías en el desarrollo de la preñez, ni en el parto (*Chalcides ocellatus*, Badir, 1968; *Mabuya carinata*, Sekarappa y Devaraj-Sarkar, 1978); sin embargo en otros organismos la desluteinización quirúrgica al inicio de la preñez provoca reabsorción embrionaria, nacimiento de fetos muertos, aborto y complicaciones en el parto como parto prematuro, parto disociado o parto retardado (*Lacerta vivipara*, Panigel, 1956; *S. cyanogenys*, Callard, 1972; *Trachydosaurus rugosus*, *Sceloporus jarrovi*, Guillette, 1987; *Barisia imbricata*, Martínez-Torres, 1997).

A la mitad de la gestación la luteotomía causó aborto como en (*Sceloporus jarrovi*, Guillette, 1987; *Xantusia vigilis*, Yaron, 1972) y/o reabsorción de los embriones como en (*Sceloporus jarrovi*, Guillette, 1987; y *Brapodium pumilis*, Veith, 1974), o desarrollo normal de la gestación pero anomalías en el parto (*Lacerta vivipara*, Panigel, 1956; *Barisia imbricata*, Martínez-Torres, 1997; *Sceloporus mucronatus*, Méndez, 1994 y *Thamnophis elegans*, Highfill y Mead, 1975b).

**Tabla 2. Efecto de los tratamientos quirúrgicos durante la preñez y el parto en especies vivíparas.**

Especie	estructura removida	Etapa de la preñez	Efecto
<i>Chalcides ocellatus</i>	CL Laparotomía	Todos los estadios Todos los estadios	Desarrollo normal y parto normal.
<i>Thamnophis elegans</i>	CL	Al inicio	Desarrollo normal de la preñez pero retraso en el parto.
<i>B. imbricata</i>	CL y foliculos atrésicos	Al inicio	desarrollo normal, pero anomalías en el parto.
<i>Lacerta vivipara</i>	ovarios y CLs unilaterales ovarios cuerpos lúteos	todos los estadios todos los estadios todos los estadios	desarrollo normal y parto. parto retardado. parto retardado en dos de tres hembras.
<i>M. carinata</i>	cuerpo lúteo	al inicio	desarrollo y parto normal
<i>B. pumilis</i>	CL  ovarios	A la mitad y al final  Al inicio y a la mitad	a la mitad causa reabsorción de embriones, al final embriones normales la mayoría de los embriones abortados o reabsorbidos

A continuación se da la clasificación del parto, mediante lo observado en trabajos anteriores realizados en *B. Imbricata imbricata* (Martínez-Torres, 1997).

**Parto normal**

se presenta cuando los recién nacidos hayan alcanzado su desarrollo y sean expulsados vivos y dentro de un período no mayor de 48 horas dentro de la fecha límite del parto de las hembras intactas mantenidas en las mismas condiciones de cautiverio a la serie que corresponda.

**Parto prematuro**

si el parto tiene lugar antes de una semana del primer dato límite, ó si el feto expulsado no ha alcanzado el desarrollo y/o madurez de un recién nacido normal.

**Parto retardado**

cuando el parto tenga lugar veintiún o más días después de los datos límite de los partos normales de la serie considerada, ó si ocurre expulsión de recién nacidos muertos habiendo alcanzado el término del desarrollo embrionario.

**Parto total**

ocurre cuando todos los huevos son expulsados el mismo día .

**Parto disociado.**

El parto será disociado cuando la expulsión de la totalidad de los huevos se extienda por un período de más de 48 horas, aun cuando en la autopsia o revisión quirúrgica se constate una retención ovular en el útero.

**Aborto.**

a) se presenta si ocurre expulsión de embriones o fetos en un lapso no mayor de 48 horas después del tratamiento quirúrgico

b) cuando en el desarrollo normal, el huevo contenga un embrión o un feto muerto que sea expulsado antes de completar el segundo tercio de gestación.

### **Justificación y planteamiento del problema.**

Es ampliamente aceptado que el cuerpo lúteo es la principal fuente de progesterona ovárica, sin embargo su participación en el mantenimiento de la gestación en los reptiles vivíparos aún no ha sido del todo aclarada. Además se sabe que el efecto de la remoción del cuerpo lúteo es diferente si se realiza al inicio de la preñez que al final de ésta. Por lo que en este trabajo se dará continuidad al estudio de la participación del cuerpo lúteo en el mantenimiento de la preñez y el parto y sus implicaciones en la evolución de la viviparidad.

### **Hipótesis.**

Si el cuerpo lúteo participa en el proceso de parto, entonces su remoción inducirá anomalías en el parto.

### **Objetivo General.**

-Determinar el efecto de la luteotomía en el último tercio de la preñez sobre el parto y los niveles plasmáticos de progesterona.

### **Objetivos específicos.**

- Determinar los niveles de  $P_4$  antes y 6 horas después de la luteotomía.
- Determinar la actividad de la  $\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ HSD y de la 17 $\beta$ HSD en el CL antes y después del parto.
- Determinar las características histológicas del CL en el último tercio de la preñez y en el *post partum* inmediato.
- Determinar el efecto de la remoción luteal, en el último tercio de la preñez sobre el parto.

## METODOLOGÍA.

Se colectaron en el Municipio de Cahuacan, Edo. de México, hembras preñadas de *Barisia imbricata* en el último tercio de la preñez, después de la colecta fueron marcadas por el método de ectomización de falanges, se registro su peso y su longitud hocico-cloaca (LHC). De veintiséis hembras totales, nueve fueron asignadas al tratamiento de lutectomía, nueve más a laparotomía y a ocho hembras no se les aplicó ningún tratamiento (NT).

### *Lutectomía*

Se obtuvieron y cuantificaron los CLs de hembras en el último tercio de la preñez bajo condiciones de anestesia profunda inducida con éter. Los CLs obtenidos se fijaron en formol amortiguado al 10% a excepción de uno, el cual fue dividido en dos, una mitad fue incluida en "tissue-tek" y congelada inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  y la otra mitad se fijó en formol al 10% amortiguado. Se suturaron a las hembras y después de recuperarse de la anestesia se les aplicó 2000 UI de bencilpenicilina. La mitad del CL congelado se utilizó para realizar cortes seriados en un microtomo de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las secciones de tejido fueron adheridas al portaobjeto utilizando albúmina. Se realizaron en el último tercio de la preñez ensayos histoquímicos para registrar la actividad de la  $\Delta^{5-4},3\beta\text{-HSD}$  (Levy y col, 1959, ver apéndice) y la actividad de la  $17\beta\text{-HSD}$ ; se utilizó como control, riñón y el testículo de ratón.

Las secciones del tejido se dejaron incubar en sustrato de dehidroepiandrosterodiona para la  $\Delta^{5-4},3\beta\text{-HSD}$  y estradiol para la  $17\beta\text{-HSD}$  por 60 minutos a  $36^{\circ}\text{C}$ ; después de la incubación se montaron con gelatina glicerizada y fueron observados en microscopio de luz.

La mitad de CL fijada en formol al 10% se procesó y se monto en parafina para la técnica histológica de rutina (Luna, 1968, ver apéndice). Se realizaron cortes seriados y se tiñeron con hematoxilina y eosina (ver apéndice). Posteriormente se observaron las características histológicas de los CLs determinándose la fase degenerativa en que se encontraban mediante el criterio establecido para *B. imbricata imbricata* por Martínez-Torres (1997) y Hernández-Caballero (1997) y para otros reptiles vivíparos por Varma y Guraya (1970).

Previo a la cirugía, así como 6 horas después, mediante punción cardiaca se tomó una alícuota de sangre de 220-250  $\mu\text{l}$  con una jeringa heparinizada, se centrifugó a 3000 r.p.m. por 3 minutos se decantó el plasma y se congelo a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del radioinmunoanálisis (RIA) para medir progesterona ( $P_4$ ). Las hembras de este tratamiento fueron separadas y mantenidas en terrarios individuales para su observación, con agua y alimento (larvas de tenebrio), hasta el nacimiento de las crías.

#### *Laparotomía*

A las hembras de laparotomía sólo se les practicó una incisión medio ventral, en condiciones de anestesia profunda y se registro el número de CLs. Después de suturarles se les aplicó 2000 UI de bencilpenicilina. Al igual que las hembras del primer tratamiento, se obtuvo mediante punción cardiaca, previo a la cirugía, así como 6 horas después, una alícuota de sangre de 220-250  $\mu$ l, para la obtención del plasma y medir la concentración de  $P_4$ . Las hembras fueron separadas en terrarios bajo las mismas condiciones que el grupo de lutectomía

#### *Control Intacto (NI).*

A las hembras sin ningún tratamiento se les tomo, mediante punción cardiaca, en los mismos tiempos de preñez que los grupos de lutectomía y laparotomía, una alícuota de sangre de 220-250  $\mu$ l mediante una jeringa heparinizada y el plasma se proceso también para medir  $P_4$ .

#### *Postpartum.*

Ocho días después de que las hembras tuvieron alumbramiento se efectuó cirugía para la obtención del CL, la mitad del órgano se fijó en formol al 10% amortiguado, se procesó y se monto en parafina para la técnica histológica de rutina y se observó al microscopio. La otra mitad se incluyó en "tissue-tek" y se realizó el ensayo histoquímico para medir la actividad de la  $\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ -HSD y la 17 $\beta$ HSD ( ver apéndice).

#### *Estadística.*

Para saber el efecto de la lutectomía en el último tercio de la preñez sobre los niveles plasmáticos de  $P_4$ , se aplicó una prueba de T de Student (Spiegel, 1970).

## RESULTADOS.

Las hembras utilizadas en este trabajo tuvieron un peso de  $32.08 \pm 6.18$  mg y una talla L-H-C de  $11.25 \pm 1.02$  cm.

### *Efecto de la luteotomía en el parto.*

Las hembras sometidas a cirugía no presentaron aborto; sin embargo en el grupo de luteotomía se observó anomalías en el parto: parto disociado en tres hembras, parto prematuro en dos y las restantes presentaron parto retardado (Tabla 3). En el bloque de laparotomía, cuatro hembras presentaron parto disociado y las restantes parto normal (Tabla 3); es de hacer notar que una hembra del grupo de luteotomía después de revisión quirúrgica a mediados de agosto presentó retraso en la gestación. En el grupo control no hubo ninguna alteración (Tabla 3).

**Tabla 3.- Efecto de la luteotomía en el último tercio de la preñez, sobre el parto.**

Tratamiento	n	Aborto	Parto normal	Parto anormal
Luteotomía	9	0	0	3⊖ 2⊙ 4⊗
Laparotomía	9	0	5	4⊖
Control	8	0	9	0

⊖ parto disociado

⊙ parto prematuro

⊗ parto retardado

### *Efecto de la luteotomía sobre los niveles plasmáticos de $P_4$ en el último tercio de la preñez.*

Los resultados obtenidos de los niveles plasmáticos de  $P_4$  antes y 6 horas después de la luteotomía, fueron comparados mediante una prueba de t de students pareada. Se observó que las hembras del tratamiento de luteotomía tuvieron un incremento significativo de  $P_4$  plasmática en comparación con las hembras de laparotomía y control intacto (Tabla 4).

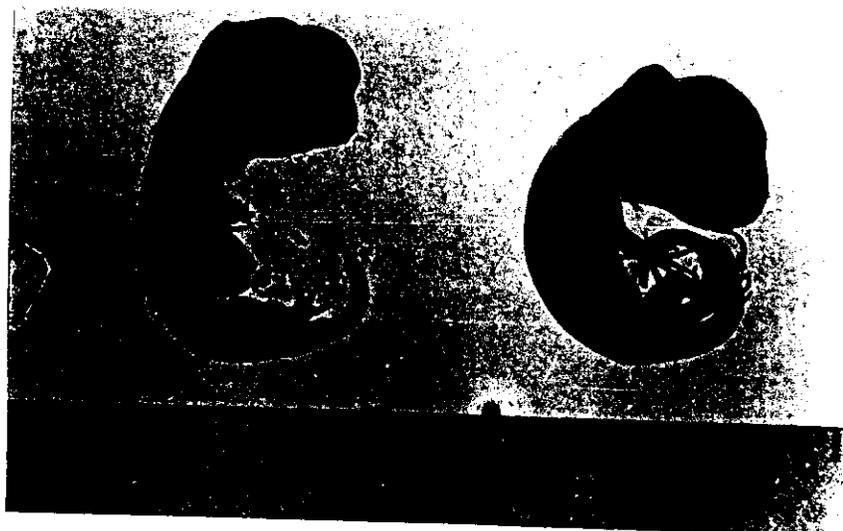
**Tabla 4.-Efecto de la luteotomía sobre los niveles plasmáticos de P<sub>4</sub> en el último tercio de la preñez.**

N	Tratamiento	Antes ng/ml x± d.e.	Después ng/ml x± d.e.	p≥0.1
4	Luteotomía	1.98±1.41	6.35±2.22	-5.51*
4	Laparotomía	2.12±0.94	3.58±1.94	-4.56
4	Control	2.21±1.50	3.24±1.63	-1.08

*Desarrollo embrionario en el último tercio de la preñez.*

Las hembras de los tratamientos quirúrgicos presentaron embriones en el estadio 37 y 40 de desarrollo de acuerdo a lo descrito por Dufaure y Hubert (1961) para *Lacerta vivipara*; los C.I.s se encontraron en la fase II de involución.

Los embriones de las hembras trabajadas en abril se encuentran en el estadio 37; se caracterizan por la separación completa de los dedos y están carentes de la membrana interdigital, las uñas ya se diferenciaron totalmente, los miembros anteriores miden 6 mm y los posteriores 8 mm; los globos oculares son más prominentes y el borde interno del párpado es oval. La longitud hocico-cloaca es de 24 mm (fig 6).



**Fig. 6.** Embrión en estadio 37, donde se observan las uñas bien diferenciadas, la prominencia de los globos oculares y la separación completa de los dedos.

Las hembras de mayo presentaron embriones en estadio 40, el embrión se encuentra formado totalmente, la pigmentación que presenta será la misma al nacer, los miembros anteriores miden 9 mm y los posteriores 11 mm; la longitud hocico-cloaca es de 31 mm. a partir de aquí solo habrá aumento de tamaño, ya que al alcanzar este estadio los embriones se encuentran totalmente formados, sin embargo aún son inmaduros (fig. 7).



**Fig. 7. Embrión en estadio 40, donde se observa totalmente formado, sin embargo aún es inmaduro.**

### Características del CL.

#### *El último tercio de la preñez.*

Los CLs de mayo, se encuentran en la fase II de involución, tienen forma oval, son de color amarillo pálido, la teca externa ya no se diferencia claramente de la interna debido a la disminución en su grosor; se observan capilares de tipo sinusoide en la periferia. Además se observa infiltración masiva de tejido conjuntivo (fig 8) y capilares hacia la masa de células luteas (mcl). En la periferia de la mcl se observan células en forma de anillo que miden 12  $\mu$ m y presentan una vacuola en el citoplasma y desplazamiento del núcleo hacia la periferia, las células luteas presentan núcleos picnóticos y fragmentados (fig 8) además se observan macrófagos y eosinófilos, el arreglo cordonal de las células se pierde gradualmente.

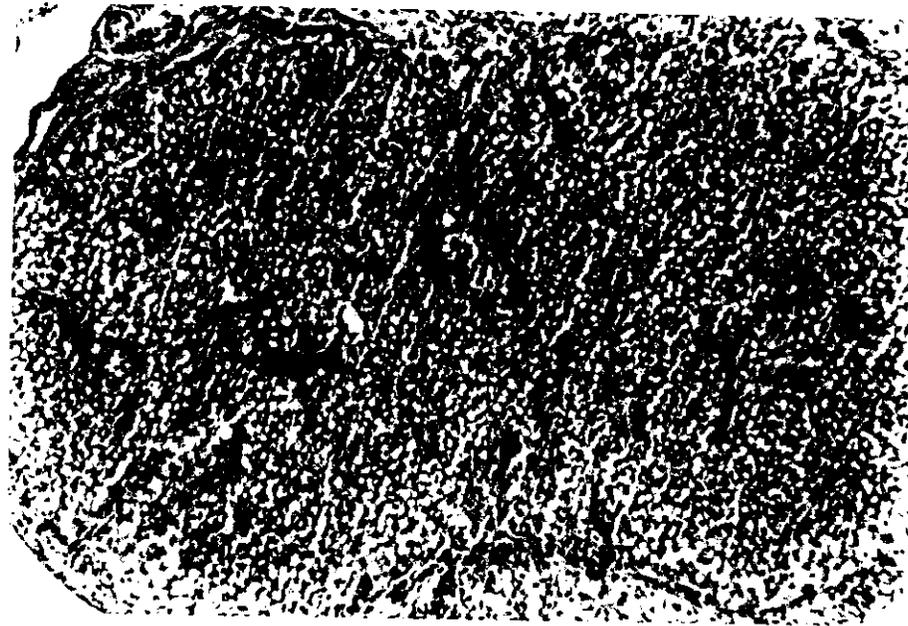
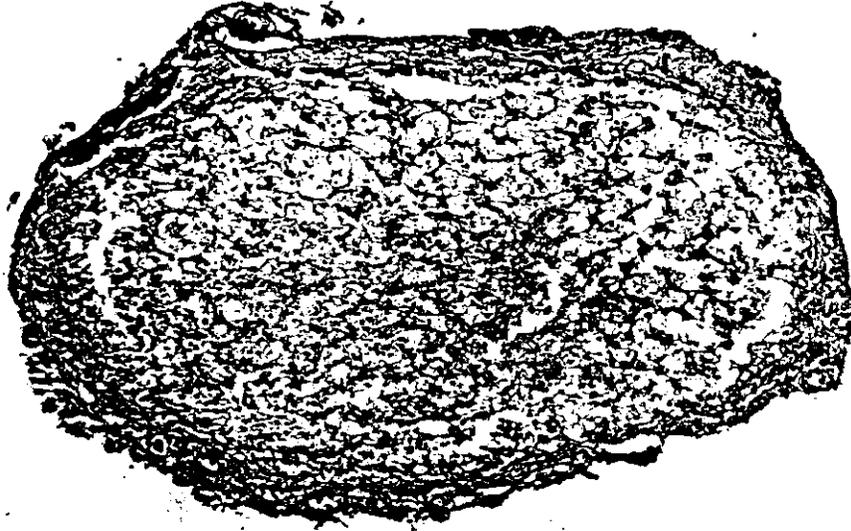


Fig. 8. CL en fase II de involución. Se observa infiltración de tejido conectivo y capilares de tipo sinusoide hacia la masa de células luteas (200 X).

*Después del parto.*

Los CLs obtenidos ocho días después del parto, presentan signos degenerativos evidentes, como la reducción de algunos sinusoides en la periferia, la infiltración de tejido conectivo y vasos sanguíneos en forma de red en la mcl (fig 9). La presencia de macrófagos y eosinófilos, además de núcleos picnóticos y núcleos fragmentados en la mcl.

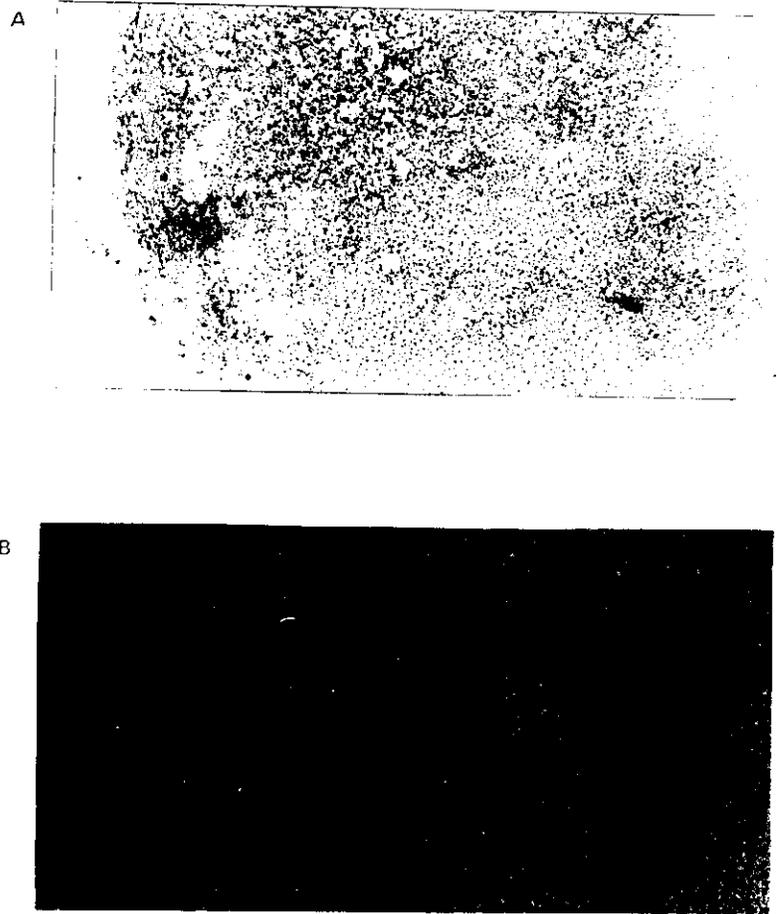


**Fig. 9. CL de postpartum, se observa una red de tejido conectivo y vasos sanguíneos en la masa de células luteas, además de la presencia de eosinófilos (125 X).**

## Histoquímica del CL.

*En el último tercio de la preñez.*

Las secciones de tejido luteal que se obtuvieron antes del parto, son positivas a la  $\Delta^5,4,3\beta$  HSD y a la  $17\beta$ HSD, se observan abundantes depósitos de formazan únicamente en la mcl (fig. 10).



**Fig. 10.** CL en fase II de involución. Se observan los gránulos de formazán en la masa de células luteas, mostrándose positivo a la A)  $\Delta^{5,4,3\beta}$ HSD y B)  $17\beta$ HSD (125 X).

*Post-partum.*

Los CLs obtenidos ocho días después del parto, también fueron positivos a la  $\Delta^{5,4}$  3 $\beta$ HSD y a la 17 $\beta$  HSD, aunque comparados con los tejidos obtenidos antes del parto, muestran una cantidad menor de gránulos de formazán, además son más pequeños y no se observa su distribución tan uniforme.

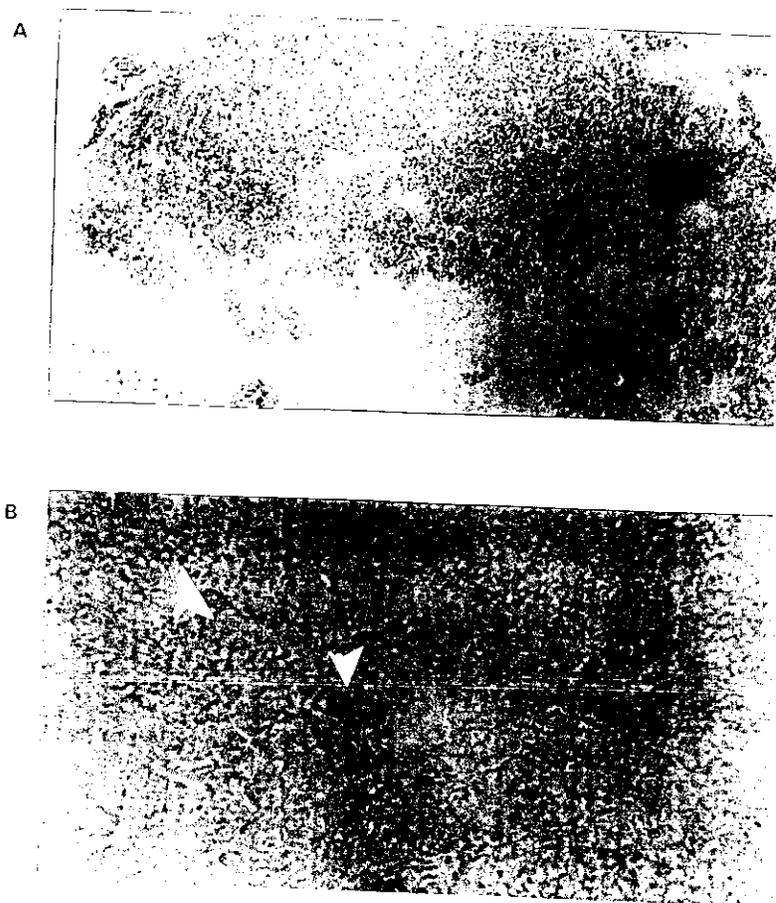


Fig. 11. CLs de *post partum*. Obtenidos ocho días después del parto donde se muestran positivos a la  $\Delta^{5,4}$  3 $\beta$ HSD en A y en B se observa la actividad de la 17 $\beta$  HSD, se muestran los gránulos de formazán (puntas de flecha) (125 X).

## DISCUSIÓN.

*Efecto de la luteotomía en el último tercio de la preñez sobre los niveles plasmáticos de progesterona.*

Hay una serie de evidencias que muestran que el CL de los escamosos vivíparos tienen capacidad esteroideogénica y son la fuente principal de  $P_4$  durante la preñez sin embargo su importancia en el mantenimiento de la gestación y su participación en el parto difiere de acuerdo a la especie (Martínez-Torres, 1997).

Experimentos en los cuales se ha removido el CL u el ovario completo al inicio de la gestación han demostrado que en algunas especies no es importante para que la preñez y el parto ocurran normalmente como en (*Chalcides ocellatus*, Badir, 1967 y *Mabuya carinata*, Sekarappa y Sarkar, 1978). Sin embargo en otras especies la luteotomía al inicio y a la mitad de la preñez causó aborto como en (*Sceloporus jarrovi*, Guillette, 1987; *Xantusia vigilis*, Yaron, 1972) y/o reabsorción de los embriones como en (*Sceloporus jarrovi*, Guillette, 1987; y *Brapodium pumilis*, Veith, 1974), o anomalías en el parto (*Lacerta vivipara*, Panigel, 1956; *Barisia imbricata*, Martínez-Torres, 1997; *Sceloporus mucronatus*, Méndez, 1994 y *Thamnophis elegans*, Highfill y Mead, 1975b).

En nuestro trabajo se observó que la remoción del CL en el último tercio de la preñez no promueve el aborto, pero causa anomalías en el parto y elevación de los niveles plasmáticos de  $P_4$ , seis horas después, del tratamiento quirúrgico.

Diversos autores han observado que la preñez puede proseguir en ausencia del CL y han encontrado que la luteotomía no elimina completamente la  $P_4$  del plasma (Highfill y Mead, 1975b; Bourne, 1986 y Martínez-Torres, 1997). Por otro lado Xavier y col. (1989) han demostrado que la glándula adrenal es capaz de sintetizar  $P_4$  *in vitro*; por lo que Bourne y col. (1986) sugieren que las glándulas adrenales son una fuente importante de  $P_4$  extraovárica capaz de sostener la gestación. Es posible que en *B. Imbricata imbricata* la glándula adrenal sea la fuente de  $P_4$  que sostiene la gestación en las hembras luteotomizadas, descartando a los FAV ya que en algunas hembras de este grupo no se presentaron este tipo de estructuras.

Hasta el momento se desconoce en los reptiles cual es el mecanismo que regula la producción de  $P_4$ . Recientemente Martínez-Torres (2000) ha mostrado evidencias de que el embrión podría participar en la modulación de la luteólisis y sugiere; además, que también podría estar involucrado en la regulación de la producción de  $P_4$ . Sin embargo, es necesario realizar estudios para determinar cual es el mecanismo que regula, no sólo el desarrollo luteal sino también la producción de  $P_4$  y otros esteroides durante la preñez de *B. imbricata imbricata*.

### Parto

Durante el primer tercio de la preñez el CL es esteroideogénicamente activo y se ha demostrado que es la principal fuente de  $P_4$  (Highfill y Mead, 1975; Martínez-Torres, 1997; Hernández-Caballero, 1997) Durante la gestación los cambios en la actividad secretora del CL pueden influir en el tiempo de oviposición o parto (Jones y Guillette, 1982) ya que promueven cambios en la sensibilidad de la musculatura uterina a la AVT. Además de la  $P_4$ , en el útero actúan inervaciones  $\beta$ -adrenérgicas debido a que se ha encontrado que su estimulación inhibe la respuesta del útero a la AVT y a las PGs (*Hoplodactylus maculatus*, Cree y Guillette, 1991).

Durante el segundo tercio de la preñez el CL comienza a atrofiarse, Martínez-Torres (1997) y Hernández-Caballero (1997) han observado una correlación positiva entre el desarrollo histológico del CL y los niveles de  $P_4$  plasmática. El proceso degenerativo del CL se acentuará conforme avance la gestación y continuará durante el parto (Martínez-Torres, 1997). Al final de la preñez los niveles plasmáticos  $P_4$  decaen debido a la degeneración del CL. (*Sceloporus jarrovi*, Jones y Guillette, 1982).

Se ha descubierto que el incremento en los niveles plasmáticos de  $P_4$  pueden afectar el parto normal y causar la retención del embrión debido a la inhibición de las contracciones uterinas (Guillette y col. 1991). En reptiles se ha observado que la aplicación de  $P_4$  exógena revierte algunos o todos los efectos de la remoción de los ovarios. (*Lacerta vivipara*, Panigel, 1956). Además en *Sceloporus jarrovi* Guillette y col. (1991) observaron que al implantar cápsulas subcutáneas con  $P_4$ , las hembras exhibieron retraso en el parto. En nuestro trabajo se encontró elevación de  $P_4$  plasmática asociada al parto anormal.

En todos los escamosos vivíparos hasta ahora estudiados se ha observado disminución gradual de  $P_4$ , en el último tercio de la preñez. En *B. imbricata imbricata* ocurre esta misma situación pero particularmente en el último tercio de la preñez los niveles se encuentran en 1.19 ng/ml en promedio (Martínez, 1997). En nuestro trabajo encontramos que la  $P_4$  se eleva significativamente después de la remoción del CL, por lo que la elevación de  $P_4$  plasmática sería la responsable de la retención de los fetos causando el parto retardado. Estos resultados son similares a los obtenidos por Highfill y Mead (1975b) donde la extirpación del CL en *Thamnophis elegans* provocó también parto anormal. Es posible que el parto prematuro sea causado por una disminución repentina de  $P_4$ . Sin embargo es necesario realizar más estudios en este sentido para aclarar la situación.

Se desconoce de que manera la elevación en la concentración plasmática de  $P_4$  perjudica el parto (Guillette y col., 1991). La  $P_4$  es un modulador importante de la contractilidad uterina a través de i) cambiar la sensibilidad de la musculatura lisa a la AVT, ii) inducir la liberación de un pulso de AVT de la neurohipófisis (Jones Y Guillette, 1982); o a través de la regulación de la síntesis de factores uterotónicos como las PGs (Guillette y col. 1991).

Por otro lado se ha demostrado que la AVT estimula la síntesis de PGs en el útero al final de la preñez. También se ha demostrado que las  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y las  $\text{PGE}_2$  estimulan las contracciones sincronizadas del miometrio para que ocurra la oviposición y el parto (*Sphenodon punctatus*, Guillette y col., 1989; *Sceloporus jarrovi*, Guillette y col., 1990; *Hoplodactylus maculatus*, Cree y Guillette, 1991; *Sceloporus jarrovi*, Guillette y col., 1992).

De acuerdo a los datos anteriores sugerimos que la elevación de los niveles de  $\text{P}_4$  plástica puede alterar el parto en *B. imbricata imbricata* inhibiendo la sensibilidad de la musculatura del oviducto a la AVT a través de la disminución del número de receptores o bloqueando estos. Trayendo como consecuencia la inhibición de la síntesis de PGs que estimulan las contracciones sincronizadas del miometrio; provocando de esta manera parto anormal como se observó en los resultados. No descartamos la participación de otros factores, entre ellos los estrógenos debido a que detectamos en nuestros ensayos actividad de la  $17\beta\text{HSD}$  implicada en la síntesis de estrógenos. Por lo que proponemos realizar más estudios sobre este aspecto.

#### *Histofisiología del CL durante el último tercio de la preñez.*

Los CLs de *B. imbricata imbricata* presentan características externas muy parecidas a los observados por Highfill y Mead (1975a) en *Thamnophis elegans*. En el primer tercio de la preñez son esteroideogénicamente activos y a partir del segundo tercio degeneran gradualmente.

En el presente trabajo la extirpación del CL se realizó en abril y mayo, y se observó que los CLs presentaban las características de la Fase II de involución, que coinciden con observaciones previas reportadas por Martínez-Torres (1997). De acuerdo a nuestras observaciones, los CLs de *B. imbricata imbricata* son estructuras que aun tienen la capacidad de sintetizar  $\text{P}_4$  y otros esteroides como testosterona y estrógenos ya que se observó que son positivos  $\Delta^5-4\beta\text{HSD}$  y a la  $17\beta\text{HSD}$ , enzimas involucradas en la síntesis de los esteroides anteriormente señalados. Esta actividad es baja si se compara con la observada por Martínez-Torres (1997) en los CLs obtenidos al inicio de la preñez, pero están de acuerdo con lo señalado por Hernández-Caballero (1997) acerca de la disminución de los niveles de  $\text{P}_4$  en el último tercio de la preñez sugiriendo que el CL es la fuente de esta hormona.

Durante el *post partum* inmediato el CL sigue sintetizando  $\text{P}_4$  y posiblemente testosterona y estrógenos, ya que se observa actividad de la  $\Delta^5-4\beta\text{HSD}$  y a la  $17\beta\text{HSD}$ . Estas observaciones sugieren que el CL a través de la síntesis y secreción de  $\text{P}_4$  y otros esteroides podría participar en la modulación de la actividad del útero para que se lleve a cabo el parto normal.

## CONCLUSIONES.

-El CL. no es indispensable para el mantenimiento de la preñez, sin embargo es importante para que el parto ocurra normalmente.

-El CL. es un órgano esteroideogénico aun cuando este en etapas degenerativas.

-La elevación de los niveles plasmáticos de  $P_4$  alteran el parto en *Barisia imbricata imbricata*

## REFERENCIAS.

- Angelini, F. y G. Ghiara (1984). Reproductive modes and strategies in vertebrate evolution. **Bull. Zool.** **51**: 121-203.
- Badir, N. (1968). Structure and function of corpus luteum during gestation in the viviparous lizard *Chalcides ocellatus*. **Anat Anz. Bd.** **22** S. 1-10.
- Blackburn, D.G. (1993) Standardized criteria for the recognition of the reproductive modes in squamate reptiles. **Herpetologica** **49**: 118-132.
- Blackburn, D.G., L.J. Vitt y C. A. Beuchat (1984). Eutherian like-reproductive specializations in viviparous reptiles. **Proc. Nac. Acad. Sci. USA**, **118**-430.
- Bourne, A.R. (1981). Progesterone like activity in the plasma of the viviparous skink, *Trachidosaurus rugosus* (stump-tailed lizard) **Proc. Melbourne Herp. Symp.**, **17**:24-27
- Bourne, A.R.; B.J. Stewart y T.G. Watson (1986). Changes in blood progesterone concentration during pregnancy in the lizard *Tiliqua rugosa*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **84A**: 81-83.
- Braña, F.; A. Bea y M.J. Arrayago (1991). Egg retention in the lizard lacertids: relationship with reproductive ecology and the evolution of viviparity **Herpetologica**, **47**:218-226
- Browning, H. (1973). The evolutionary history of the corpus luteum. **Biol. Reprod.**, **8**:128-157.
- Callard, I.P. y S. M. Kleis (1987). Reproduction in reptiles, pp. 187-206; en: *Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology*. I. Chester Jones, P.M. Inleton y J.G. Phillips (eds.) Plenum Press. New York y London.
- Callard, I.P., L.A. Fileti, L. E. Pérez, L.A. Sorbera, G. Giannoukos, L.L. Klosterman, P. Tsang y J.A. McCracken (1992). Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. **Amer. Zool.** **32**:264-275
- Clausen, H.J. (1940). Studies on the effect of ovariectomy and hypophysectomy on parturition in snakes. **Anat. Rec.**, **64**; suppl. **88**.

- Cree, A. y J.L. Guillette (1991). Effect of  $\beta$ -adrenergic stimulation on uterine contraction in response to arginine vasotocin and prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  in the gecko *Hoplodactylus maculatus*. **Biol. Reprod.**, **44**: 499-510
- Cuellar, H.S. (1979). Disruption of gestation and egg shelling in the deluteinized oviparous whiptail lizard *Cnemidophorus uniparens* (Reptilia: Teiidae). **Gen. Comp. Endocrinol.**, **9**: 150-157
- Camarillo, J.L. (1981). Distribución altitudinal de la herpetofauna en el transecto Huitzilac, Morelos, La Ladrillera, Edo de México, Tesis de Licenciatura. E.N.E.P. Iztacala. UNAM.
- Dufaure, J.P. y J. Hubert. (1961). Table de development du lézard vivipare: *Lacerta* (*Zootoca*) *vivipara*. **Jacquin. Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp.** **50**: 309-328.
- Fox, H. (1977). The urogenital system of reptiles, pp. 1-158, en *Biology of the Reptilia* Vol. 6. C. Gans y T. S. Parson (eds.). Academic Press, New York.
- Good, D.A. (1987). An alloenzyme analysis of Anguid Subfamilial relationships, (Lacertidae-Anguidae) **Herpetological**. **37**: 11-15
- Guillette, L. J. Jr, S. Spielvogel y F. L. Moore (1981). Luteal development, placentation and plasma progesterone concentration in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. **Gen. Comp. Endocrinol.** **43**: 20-29.
- Guillette, L.J. Jr. y S.I. Fox (1985). Effect of deluteinization on plasma progesterone concentration and gestation in the lizard *Anolis carolinensis*. **Comp. Biochem. Physiol.** **80**:303-306.
- Guillette, L.J. (1987). The evolution of viviparity in fishes, amphibians and reptiles: and endocrine approach; pp. 523-562, en: *Hormones and Reproduction in fishes, Amphibians and Reptiles*. D.O. Norris y R. E. Jones EDS., Plenum Publishing Corporation.
- Guillette, L.J. Jr y G. Casas-Andreu (1987). The reproductive biology of the high elevation mexican lizard *Barisia imbricata*. **Herpetologica**, **43**(1), 29-38.
- Guillette, L.J. ; C.A. Herman y D.A. Dickey (1988). Synthesis of prostaglandins by tissues of the viviparous lizard, *Sceloporus jarrovi*. **J. Herp.**, **22**:180-185.
- Guillette, L.J. (1989). The evolution of vertebrate viviparity: Morphological modifications and endocrine control, pp. 219-233, en *Complex Organismal Functions: Integration and Evolution in Vertebrates*. J. Willey & Sons, New York.

Guillette, L. J., T.S. Gross, J.H. Matter y B.D. Palmer (1990). Arginine vasotocin-induced prostaglandin synthesis *in vitro* by the reproductive tract of the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. **Prostaglandins**, **39**: 39-51.

Guillette, J.L. Jr., V. DeMarco y B. D. Palmer (1991). Exogenous progesterone or indomethacin delays parturition in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. **Gen. Comp. Endocrinol.** **81**: 105-112

Hernández-Caballero, M. (1997). Características histológicas del cuerpo lúteo y su relación con los niveles plasmáticos de progesterona y con el desarrollo embrionario en la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata* ( Reptilia:Anguidae ) 53 pp. Tesis Profesional, E.N.E.P. Iztacala, UNAM.

Highfill, D.R. y R.A. Mead (1975a). Sources and levels of progesterone during pregnancy in the garter snake, *Thamnophis elegans*. **Gen. & Comp. Endocrinol.**, **27**:389-400.

Highfill, D.R. y R.A. Mead (1975b). Function of corpora lutea of the pregnancy in the garter snake, *Thamnophis elegans*. **Gen. & Comp. Endocrinol.**, **27**:401-407.

Hisaw, F.L. (1959). Endocrine adaptations of the mammalian oestrus cycle and gestation, pp. 533-552, en: Comparative Endocrinology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Jones, R.E. y Guillette, Jr. L.J. (1982). Hormonal control of oviposition and parturition in lizard. **Herpetologica**, **38**: 80-93

Jones, R.E. y C.D. Baxter (1991). Gestation, with emphasis on corpus luteum biology, placentation and parturition, pp. 205-301, en: Vertebrate Endocrinology: Fundamental and Biomedical Implications. P.K.T. Pang, M.A. Schreiber y R. Jones (Eds) AP Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers.

Luna, G.L. (1968). Manual of histological staining methods of The Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Co., 3a Ed.

Martínez-Torres, M. (1997). Placentación y participación del cuerpo lúteo en el mantenimiento de la gestación de *Barisia imbricata imbricata* -Una perspectiva evolutiva- (Reptilia-Anguidae). 130 pp. Tesis de Maestría, E.N.E.P. Iztacala, UNAM.

Martínez-Torres, M. (2000). ¿El embrión participa en la regulación del desarrollo luteal?. VI Reunión Nacional de Herpetología, Chiapas, México.

Méndez, A.M. (1994). Efecto de la lutectomía y de la extirpación de los folículos atrésicos en la manutención de la gestación de *Sceloporus mucronatus* ( Sauria-Phrynosomatidae) 70 pp. Tesis Profesional. E.N.E.P. Iztacala, UNAM.

Méndez de la Cruz, F., Santacruz, M.V. y Andrews R.M. (1998). Evolution of viviparity in the lizard Genus *Sceloporus*. **Herpetologica** **54**:521-532.

- Miller, W.D. (1988). Molecular biology of steroids hormone synthesis. **Endocr. Rev.**, **9:295-318**.
- Moll, E. O. y Legler, J.M. (1971). The life story a neotropical slider turtle, *Pseudemys scripta* ( Schepff ) in Panama. **Bull. Los Angeles Mus. Nat. Hist. Sci.** **11; 1-102**
- Odum, E. (1972). Ecología. 3ra edición, Nueva editorial Interamericana SA de CV, México, pp.639.
- Panigel, M. (1956). Contribution a l'etude de l'ovoviviparité chez les reptiles: gestation et parturition chez le lézard vivipare *Lacerta vivipara*. **Ann, Sci. Nat. Zool. Bio. Anim.**, **18:569-668**.
- Sekharappa, B.M. and H.B. Devarajaj-Sarkar (1978). Role of corpora lutea in the skink *Mabuya carinata*. **Indian J. Exp. Biol.**, **16: 1097-1098**.
- Shine, R. (1988). Parental care in reptiles, en *Biology of the Reptilia*, Vol.16, Ecology B. Defense and Life History, pp. 275-329. C. Gans and R.B. Huey (Eds.), Alan R. Liss, Inc., New York.
- Schottellius, B. (1982). Fisiología. Nueva Editorial Interamericana SA de CV, México, pp.587.
- Spiegel, M. (1970). Teoría y Problemas de Estadística. Editorial Mc Graw-Hill, México, pp.357.
- Thomas, E.O., Licht, P., Thane, W. y Crews D. (1992). Hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with sexual differentiation in embryos of the turtle *Trachemys scripta*. **Biol. of Reprod.** **46,140-145**
- Uribe, M.C., Mendez, M.E., Gonzalez, J.E. y Guillette, Jr., L.J. (1995). Seasonal variation in ovarian histology of the viviparous lizard *Sceloporus torquatus*. **J. Morphol.**, **226:103-119**
- van Tienhoven, A. (1968). Reproductive physiology of the vertebrates. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 441
- Varma, S. K. y S.S. Guraya (1970). Morphology of ovarian changes in the garden lizard, *Calotes versicolor*. **J. Morphol.**, **131: 195-210**.
- Veith, W.J. (1974) Reproductive biology of *Chamaleo pumilis* with special reference to the corpus luteum and progesterone. **Zool. Afric.**, **9:161-183**.
- Vial, J.L. y J.R. Stewart (1985). The reproductive cycle of *Barisia monticola*: a unique variation among viviparous lizards. **Herpetologica** **41:51-57**

Xavier, F. (1987) Functional morphology and regulation of the corpus luteum, pp.241-181; en: Hormones and Reproduction in fishes, amphibians and reptiles. D.O. Norris and R.E. Jones (Eds.) Plenum press.

Xavier F.; A. Yvorra y E. Burzawa-Gerar. (1989). Does concept influence corpus luteum life span during early pregnancy viviparous reptiles? **Gen. & Comp. Endocrin.**, **74**: 264.

Yaron, Z. (1972). Effects of ovariectomy and steroid replacement on the genital tract of the viviparous lizard **Xantusia vigilis**. *J. Morph.*, **136**: 313-326.

Yaron, Z. (1985). Reptilian placentation and gestation: structure, function and endocrine control, pp. 528-603; en: *Biology of the Reptilia* Vol. 15. C. Gans and F. Billet (eds.) John Wiley & Sons, New York.

Zuckerman, L. y B. J. Weir (1977). *The ovary*. Vol. 1, Academy Press. 2da Edición. New York, pp.517.

## APENDICE

### I TÉCNICA HISTOLÓGICA DE RUTINA PARA EL PROCESAMIENTO DE TEJIDOS DE ACUERDO A LUNA (1968).

- i) Después de la fijación, se procede a lavar el exceso de formol, colocando los tejidos en agua corriente de acuerdo al tiempo de fijación que fueron sometidos estos.
- ii) A continuación se deshidratan los tejidos mediante un baño cada dos horas de alcoholes graduados a partir de etanol al 70% hasta etanol absoluto.
- iii) Se procede despues mediante xileno a aclarar el tejido (con dos baños cada 20 minutos).
- iv) Para la impregnación de parafina, está tiene que estar entre 56-58°C, y los tejidos seran sometidos a 2 baños de 2 horas cada uno.
- v) Por ultimo los tejidos son incluidos en parafina para elaborar cortes de 6µm de grosor y montarlos en sol. ruyter para la tinción.

### II TECNICA CON HEMATOXILINA Y EOSINA DE ACUERDO A LUNA (1968).

- i) Los segmentos de tejidos se someten a xileno para quitar el exceso de parafina.
- ii) Despues se hidratan los tejidos con alcoholes graduados a partir de etanol al 70% hasta etanol absoluto, con un baño rapido de agua destilada.
- iii) Los tejidos son colocados en hematoxilina de Harris por un lapso de 12 min.
- iv) Se procede a bañar los tejidos en agua corriente, un solo baño rapido en agua amoniacal y un baño en alcohol acido.
- v) Son colocados los tejidos en eosina alcohólica durante un min.
- vi) Se prosigue con la deshidratación de tejidos a partir de etanol al 80% hasta etanol absoluto.
- vii) Por ultimo se someten los tejidos en un baño de xilol y se montan en resina sintetica para observarse al microscopio.

**III TÉCNICA DE RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)  
PARA MEDIR PROGESTERONA (P<sub>4</sub>)  
(Bourne, 1986).**

Todos los componentes deben estar a una temperatura entre los 15°C y los 28°C antes de ser usados.

Se etiquetan dos tubos planos de polipropileno T (cuentas totales) y dos tubos NBS (uniones no específicas). Además se etiquetan 14 tubos con anticuerpo desde la A hasta la G para obtener la curva patrón. Al tubo A se le denomina de máxima unión.

<b>Calibrador.</b>	<b>ng/mL.</b>	<b>nmol/L.</b>
A (MU)	0	0
B	0.1	0.3
C	0.5	1.6
D	2	6.4
E	10	31.8
F	20	63.6
G	40	127.2

En cada tubo se pipetea 100 µl de progesterona (P<sub>4</sub>) y 1.0 mL de progesterona marcada (<sup>125</sup>I P<sub>4</sub>) y se agitan en un vortex. Se incuban los tubos durante 3 horas a temperatura de 15-28°C. Posteriormente se decantan cuidadosamente y los tubos son colocados en un contador gama. Las cuentas obtenidas fueron procesadas con el programa WHO (Organización Mundial de la Salud) para transformarlas a nanogramos/ml.

**IV HISTOQUIMICA PARA  $\Delta^{5,4}$ -3 $\beta$ HSD Y 17 $\beta$ HSD.  
DE ACUERDO A LEVY Y COL.(1959).**

Los cortes obtenidos, se montan mediante albúmina y se dejan incubar durante 1 hora a 37°C, para el caso de la  $\Delta^{5,4}$ -3 $\beta$ HSD el medio de incubación contiene dehidroepiandrostenediona y para detectar la actividad de la 17 $\beta$ HSD el medio de incubación incluye estradiol. Pasado el período de incubación los cortes se lavan en H<sub>2</sub>O destilada (dos cambios) y se montan en gelatina glicerizada para su observación al microscopio.

**SOLUCIONES.**

**Alcohol yodado.**

2.0 g. de yodo resublimado  
2.4 g. de yoduro de potasio  
100 ml. de etanol al 50%

**Agua Amoniaca.**

Mezclar 1000 ml de agua corriente con 1.5 ml de hidróxido de amonio al 28%

**Solucion Ruyter.**

A) 10 ml. de acetona  
10 gotas de benzoato de metilo  
B) 20 gotas de albúmina glicerizada (albúmina + glicerina 1:1)  
80 ml. de H<sub>2</sub>O destilada  
Mezclar la solución A y B.

**Formol Amortiguado.**

100 ml. de formol al 37 ó 40%  
900 ml. de H<sub>2</sub>O destilada  
4 g. de fosfato de sodio monobásico  
6.5 g. de fosfato de sodio dibásico

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y DE LA SALUD  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Alcohol ácido.**

Mezclar 100 ml. de alcohol al 70% con 10 ml. de ácido hidrociorhídrico concentrado.

**Eosina.**

1 g. de eosina soluble en H<sub>2</sub>O

20 ml. de H<sub>2</sub>O destilada

80 ml. de alcohol al 95%

**Medio de incubación para  $\Delta^{5,4}$ -3 $\beta$ HSD Y 17 $\beta$ HSD**

40 mg. de  $\beta$  nicotinamida adenina dinucleotida (NAD)

20 mg. de azul de nitrotetrazolio (NBT)

0.2 mg. de dehidroepiandrostenediona (DHIA) para  $\Delta^{5,4}$ -3 $\beta$ HSD

0.2 mg. de  $\beta$ -estradiol para la 17 $\beta$ HSD

40 ml. de amortiguador TRIS a pH de 7.4

Disolver NAD en 20 ml. de amortiguador TRIS y disolver NBT en 20 ml. de amortiguador de amortiguador TRIS, mezclar las soluciones y separar 20 ml. para control.