



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS  
DEL CUERPO LÚTEO Y DEL ÚTERO  
EN UN MODELO DE PSEUDOPREÑEZ  
DE LA LAGARTIJA**

***Barisia imbricata imbricata.***

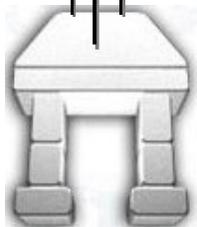
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G O

P R E S E N T A

ALEJANDRA CAROLINA YÁÑEZ  
ESPINOSA DE LOS MONTEROS

DIRIGIDA POR: M. EN C. MARTÍN MARTÍNEZ



**Dedicado a:**

Los Reyes Iztacala, Edo. de México

2005

Mis padres: Carolina Espinosa de los Monteros  
O. y A. Rubén Yáñez L. por el cariño  
y apoyo que me han brindado.  
GRACIAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Mis hermanos: Adriana, Rubén y Ricardo con  
los que siempre e podido contar,  
Adri, Gracias por el apoyo que  
siempre me has dado.

Mi tía Margarita: Por alentarme siempre a seguir  
y terminar mi trabajo.

## **Agradecimientos**

Al M. en C. Martín Martínez Torres director de mi tesis por todo el tiempo invertido en la realización de este proyecto, así por los apoyos brindados para la conclusión del mismo.

A la Sra. Ma. de la Luz por mantenernos siempre en orden el laboratorio y por animarme a continuar.

A los biólogos José del Carmen Benítez, Carmen Álvarez, Mónica Chávez, y a la M. en C. Elena Hernández revisores de este trabajo por las críticas y aportaciones para enriquecer y mejorar el mismo.

A la Maestra Juana Alba y a todos los miembros del Laboratorio de Biología de la Reproducción por su apoyo y compañía.

A la Dra. Guadalupe Ortiz del Hospital Juárez por su apoyo y facilidades brindadas para la realización de la técnica de radioinmunoanálisis.

A la Dra. Martha Pérez Armendáriz de la Facultad de Medicina del Hospital General de México por el apoyo brindado mediante el proyecto PAPIT IN-219702-3 para la culminación del trabajo.

Al técnico José de Jesús Espinosa del laboratorio de Neuromorfología de la UIICSSE por facilitarnos el uso del criostato para realizar los cortes para la técnica histoquímica.

A mis amigos Edith, Rebeca, Luis, Alejandro e Israel que estuvieron conmigo durante la carrera, gracias por su apoyo, siempre los recordaré con alegría, y a todos mis compañeros de grupo.

# INDICE GENERAL

	Pág.
ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Aparato reproductor.....	3
Ovario.....	4
Oviducto.....	4
Infundíbulo.....	5
Útero.....	6
Vagina.....	7
Importancia de los reptiles en la investigación.....	7
ANTECEDENTES.....	9
Origen y formación del cuerpo lúteo.....	9
Esteroidogénesis.....	10
Función del cuerpo lúteo.....	12
Biología de <i>Barisia imbricata imbricata</i> .....	12
Desarrollo del cuerpo lúteo.....	13
Involución del cuerpo lúteo.....	15
Regulación de la actividad de cuerpo lúteo.....	16
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
OBJETIVOS.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	30

APENDICE..... 34

REFERENCIAS..... 37

## RESUMEN

Diversos autores han asignando al CL un papel central en la retención del huevo durante la evolución de la viviparidad reptiliana y en el mantenimiento de la gestación debido a su capacidad de producir P<sub>4</sub>, sin embargo, se desconoce el mecanismo que regula la actividad de esta glándula.

En nuestro laboratorio se ha utilizado a la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata* para estudiar el control endocrino de la gestación y sus implicaciones en la evolución de la viviparidad. Para este trabajo se experimentó con un modelo de pseudopreñez en el cual se pretendió evaluar la participación del embrión en la regulación de la producción de P<sub>4</sub> y la actividad del CL. Particularmente se determinó si el desalojo de los embriones en la preñez temprana modifica la actividad del CL. Para cumplir con este objetivo se colectaron hembras adultas en Cuautitlán, Edo. de México después de la etapa de apareamiento. Una vez ocurrida la ovulación, los organismos se asignaron a tres grupos de trabajo (2 controles, 1 experimental). Cada uno se dividió en dos lotes para su trabajo en dos tiempos de gestación (8 y 16 semanas posteriores a la ovulación).

Los resultados muestran que las hembras pseudopreñadas presentaron cambios degenerativos atípicos durante la etapa regresiva del CL, disminución significativa en los niveles de P<sub>4</sub> plasmática y reducción de la actividad de la enzima  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD. Estas observaciones sugieren que en los reptiles el embrión participa en la regulación de la vida media del CL modulando la luteolisis, así como la producción de P<sub>4</sub>. Además, permite proponer que existe interacción entre el embrión y el útero para regular los eventos tempranos de la preñez.

## INTRODUCCIÓN

Los reptiles se distinguen de cualquier otro vertebrado debido fundamentalmente a que su cuerpo esta cubierto de escamas. Además, son organismos de sangre fría o poiquilotermos (no tienen control endógeno de su temperatura corporal), con capacidad para respirar aire atmosférico por medio de pulmones, y al nacimiento los jóvenes son similares en forma y costumbres a sus padres (Bellairs y Attridge, 1978). Muestran una gran variación en su tamaño, van desde unos centímetros como en el caso de la mayoría de las lagartijas hasta algunos metros como en el caso de las serpientes y los cocodrilos (Bellairs y Attridge, 1978).

Los reptiles están adaptados a infinidad de *hábitats* y evolutivamente han producido diversos modelos de estructura y comportamiento. El mayor número de géneros y especies se distribuye en los trópicos, descendiendo rápidamente hacia las zonas templadas (Bellairs y Attridge, 1978; Goin y col., 1978).

Muchos reptiles son terrestres, caminan, corren o reptan sobre la superficie de la tierra y podemos encontrarlos bajo las piedras, entre las raíces, trepados a los árboles, o bajo la tierra; no obstante, podemos encontrar algunas especies con un grado de adaptación acuática sorprendente (Bellairs y Attridge, 1978; Goin y col., 1978).

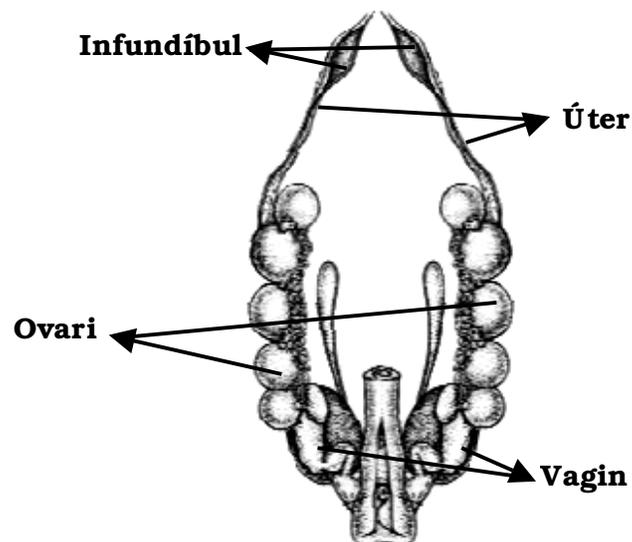
Todas las tortugas, cocodrilos y diversos escamosos son ovíparos<sup>1</sup>, sin embargo, encontramos que el 20% de las 6000 especies de escamosos (lagartijas y serpientes) son vivíparos<sup>2</sup> (Xavier, 1987; Martínez-Torres, 1997), lo que implica no sólo la retención del embrión en el tracto reproductor materno, sino también el intercambio de material entre el embrión y el torrente sanguíneo de la madre (Goin y col., 1978; Hildebrand, 1982).

---

<sup>1</sup>animales cuyo producto reproductivo es un huevo embrionado depositado con cáscara o alguna cubierta secundaria.

<sup>2</sup> la hembra da origen a una larva o neonato libre de cubiertas ovulares.

La anatomía macroscópica del tracto reproductor femenino en reptiles ha sido descrita en trabajos publicados desde mediados del siglo XIX. Así mismo, la información disponible ha permitido el reconocimiento de un patrón reptiliano básico (Fig. 1), en donde observamos un par de ovarios ovales o alargados ubicados en la cavidad abdominal y sostenidos a la pared dorsal del cuerpo por el mesovario (Blackburn, 1998; van Tienhoven, 1983, Goin y col., 1978). Están seguidos por dos tubos pareados divididos en tres regiones: la anterior denominada infundíbulo, la media llamada útero y finalmente la vagina (Cuellar, 1966).



**Figura 1.** Esquema de una vista ventral del aparato reproductor femenino de reptil (modificado de Romer, 1970)

Como en muchos otros vertebrados, los órganos reproductores presentan patrones cíclicos, es decir, se observan periodos de actividad reproductiva, seguido por periodos de quiescencia (Guillette y Casas-Andreu, 1987). Estos cambios están determinados por la actividad de glándulas endócrinas como la hipófisis y también influenciados por factores ambientales como temperatura, luz, humedad y el suministro de alimento (Bellairs y Attridge, 1978).

Es una estructura pareada y son los órganos sexuales femeninos primarios (Álvarez del Villar, 1988) y varían según la especie. Pueden ser largos o cortos, compactos o huecos, lisos o con ondulaciones y su tamaño fluctúa de acuerdo a la condición de reproducción (Hildebrand, 1982, Goin y col., 1978).

Comúnmente las serpientes, lagartijas y anfisbaenidos poseen ovarios huecos denominados alveolares. Las tortugas y cocodrilos están dotados de ovarios compactos, y su forma corresponde a la morfología del animal: son alargados en ofidios y lacertilios y menos prolongados en los demás (Álvarez del Villar, 1988).

Los ovarios de los reptiles al igual que todos los vertebrados tienen dos funciones fundamentales: 1) producir gametos, denominados ovocitos y 2) producir hormonas entre las que destacan los esteroides sexuales (Xavier, 1987; van Tienhoven, 1983).

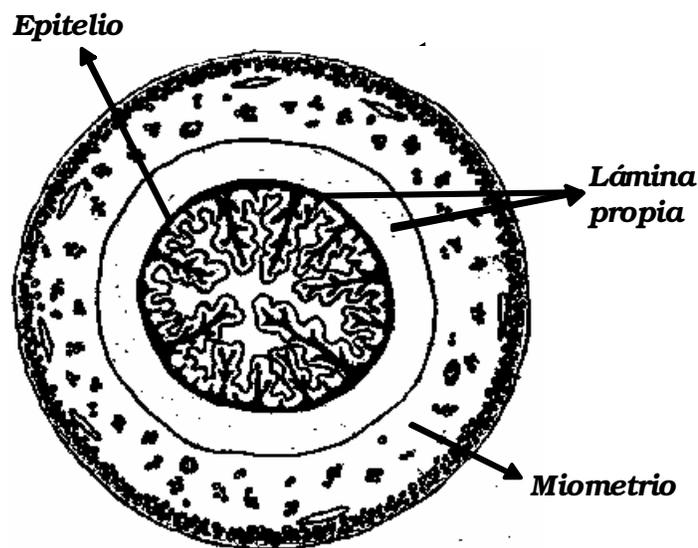
### **Oviducto**

Es un derivado de los conductos de Müller. Estos conductos son pareados y se observan como tubos de pared delgada que se extienden a lo largo de la cavidad torácica (Blackburn, 1998; van Tienhoven, 1983). Estas estructuras participan en la fertilización, en el almacenamiento de esperma, el transporte de huevos, el mantenimiento del embrión y la expulsión del huevo o feto. (Blackburn, 1998).

De acuerdo a Blackburn (1998), histológicamente el oviducto consta de tres capas generales: el epitelio, la capa intermedia o lámina propia y la capa muscular externa o miometrio (Fig. 2). La mucosa oviductal comprende las dos primeras capas. El epitelio que reviste el lumen consiste de una sola capa de células de aspecto escamoso, cúbico o columnar dependiendo de la región y estado reproductivo. Algunas células presentan cilios o proyecciones plasmáticas, sólo visibles en el microscopio electrónico.

La lámina propia consiste de tejido conectivo irregular laxo o denso con abundantes fibras de colágena y fibroblastos, glándulas y ocasionalmente macrófagos. También encontramos vasos sanguíneos así como glándulas multicelulares.

El miometrio del oviducto consiste de una bicapa de músculo liso, la capa interna es circular y la capa externa longitudinal. Externamente el oviducto esta recubierto por una membrana serosa.



**Figura 2.** Esquema de un corte transversal de oviducto de reptil (tomado de Martínez-Torres, 1997)

### **Infundíbulo**

Es la primer región del oviducto y es responsable de captar al ovocito recién expulsado del ovario, es de forma estrellada, flácido y translúcido, y se caracteriza por presentar pliegues prominentes (Blackburn, 1998).

En los lacertilios los oviductos se encuentran siempre separados por lo que cada conducto forma de manera independiente un útero y una vagina (Bellairs y Attridge, 1978).

### **Útero**

En reptiles ovíparos (tortugas, cocodrilos algunas serpientes y lagartijas), el útero aloja a los embriones en desarrollo y deposita las cubiertas ovulares como la membrana de la cáscara y la capa de calcio que forman la cáscara del huevo (Blackburn, 1998, Goin y col., 1978). En las especies vivíparas contribuye junto con la placenta, al intercambio de gases y al suministro de nutrientes al feto. Durante la preñez el útero se presenta distendido por los embriones y cuando más de un huevo se aloja en él se forman cámaras de incubación que se alternan con regiones interembriónicas constreñidas. En las especies vivíparas el útero post-grávido comúnmente aparece distendido, evidencia de la reciente presencia de huevos (Blackburn, 1998).

Durante el ciclo reproductivo el útero no grávido está cubierto por epitelio simple columnar o cúbico de células ciliadas y no ciliadas. La lámina propia es vascularizada y comúnmente contiene glándulas. En las formas vivíparas, el desarrollo fetal se completa en el útero, que contribuye junto con la placenta a sustentar al feto. La mucosa uterina carece de pliegues y la capa muscular es delgada (Blackburn, 1998).

El útero presenta cambios estacionales dramáticos en la altura del epitelio, así como en el tamaño y estado de actividad de las glándulas uterinas. También se registran cambios estacionales en el espesor de la lámina propia y del miometrio, sin embargo, en algunas especies, los cambios en la altura del epitelio son pequeños o inexistentes (Blackburn, 1998).

Como resultado de la adaptación a la viviparidad, el útero se modifica en las formas vivíparas a través de un aumento en la vascularidad, así como la disminución en el tamaño de las glándulas de la cáscara y en la altura del epitelio (Blackburn, 1998).

## **Vagina**

Es la última región derivada del conducto de Müller. Es una zona corta en tamaño con relación al útero y se comunica con la cloaca. La principal diferencia con el útero es la ausencia de glándulas ya que todo el desarrollo embrionario se realiza en el útero.

La pared de la vagina consta de epitelio, lámina propia (mucosa), dos capas de tejido muscular (una circular interna y otra longitudinal externa) y una capa serosa. En la región posterior de la vagina solo se presenta la capa circular formando un alargamiento debido a su delgadez en esta zona. La capa longitudinal forma una extensión lisa en la región media y posterior de la vagina, mientras que la anterior esta arreglada en pliegues longitudinales que son mas altos en la transición útero-vagina y disminuyen en el útero (Cuellar, 1966).

La mucosa está arreglada en pliegues longitudinales que se extienden a lo largo de la vagina y disminuyen en altura de la región posterior hacia la anterior. El lumen de la vagina se reduce en la región posterior a una estrecha abertura debido a los altos pliegues, mientras que en la región anterior se ensancha gradualmente por la disminución de la altura de los pliegues. El epitelio vaginal en la región posterior y media es ciliado uniformemente, pero en la región anterior los cilios comienzan a interrumpirse (Cuellar, 1966).

## **IMPORTANCIA DE LOS REPTILES EN INVESTIGACIÓN**

Estos organismos presentan diversas características morfofisiológicas y evolutivas que los hacen atractivos para ser estudiados como: 1) son organismos poiquilotermos, 2) son los primeros vertebrados en desarrollar el huevo cleidoico, 3) este grupo da origen a los vertebrados superiores, 4) son los primeros organismos en desarrollar membranas extraembrionarias (corion, amnios y alantoides) y 5) son los primeros vertebrados amniotas que evolucionaron a la viviparidad y que desarrollaron la placenta (Goin y col., 1978).

Por lo anterior, los reptiles han servido como modelo de investigación en diversos campos como son: la fisiología comparada, inmunología, evolución, endocrinología, biología comparada, así como en biología reproductiva.

## ANTECEDENTES

Evidencias taxonómicas y embriológicas de los reptiles y otros vertebrados indican que la estrategia de reproducción ancestral en los vertebrados es la oviparidad. No obstante, en diferentes especies de todos los grupos de vertebrados con excepción de las aves, la viviparidad ha evolucionado en respuesta a variaciones ambientales diversas (Callard y col., 1992).

La viviparidad no sólo se presenta en las formas vivientes, algunos especímenes fosilizados de *Ichthyosaurus* (un reptil marino extinto del Mesozoico) contienen esqueletos de jóvenes *no-natos* en su cavidad abdominal (van Tienhoven, 1983).

Entre los reptiles, sólo los del orden *squamata* (lacertilios, anfisbaenidos y ofidios) exhiben dos estrategias de reproducción: la oviparidad y la viviparidad; esta última se presenta con menor frecuencia (Guarino y col., 1998).

En todos los reptiles cada FPO da origen a un CL. En las especies ovíparas, el periodo de vida del tejido luteal está íntimamente relacionado con la retención de huevos o crías en el tracto genital de la madre, sin embargo, en las especies vivíparas esta relación no es tan clara (Xavier, 1987).

### ORIGEN Y FORMACIÓN DEL CUERPO LÚTEO

El CL es una glándula endocrina efímera presente en todas las hembras grávidas de los vertebrados, se desarrolla en los ovarios después de la ovulación a partir de las membranas de los FPO. Su función principal es sintetizar y secretar esteroides, primordialmente P<sub>4</sub>, la cual es requerida para el establecimiento de la preñez (Xavier, 1987).

La formación del CL en los reptiles se inicia por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos en las células de la granulosa y de la TI del FPO. Después del estímulo

ovulatorio pero antes de la ovulación hay una hipertrofia de las células de la granulosa y activación nuclear (Gordon y col., 1988; Xavier, 1987).

Las células lúteas se caracterizan por la presencia de abundante REL y éste está estrechamente asociado a gotitas de lípidos y mitocondrias (Xavier, 1987). La presencia de REL es necesaria para la biosíntesis de esteroides y es el sitio de localización de las enzimas asociadas con la esteroidogénesis como es la  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD (Gordon y col., 1988).

### ESTEROIDOGENESIS

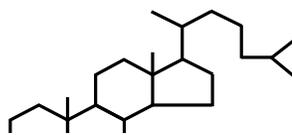
El ovario, al igual que otras glándulas secretoras de esteroides, forma sus hormonas a partir del colesterol incorporado de la dieta o a partir de acetato en el retículo endoplásmico (van Tienhoven, 1983).

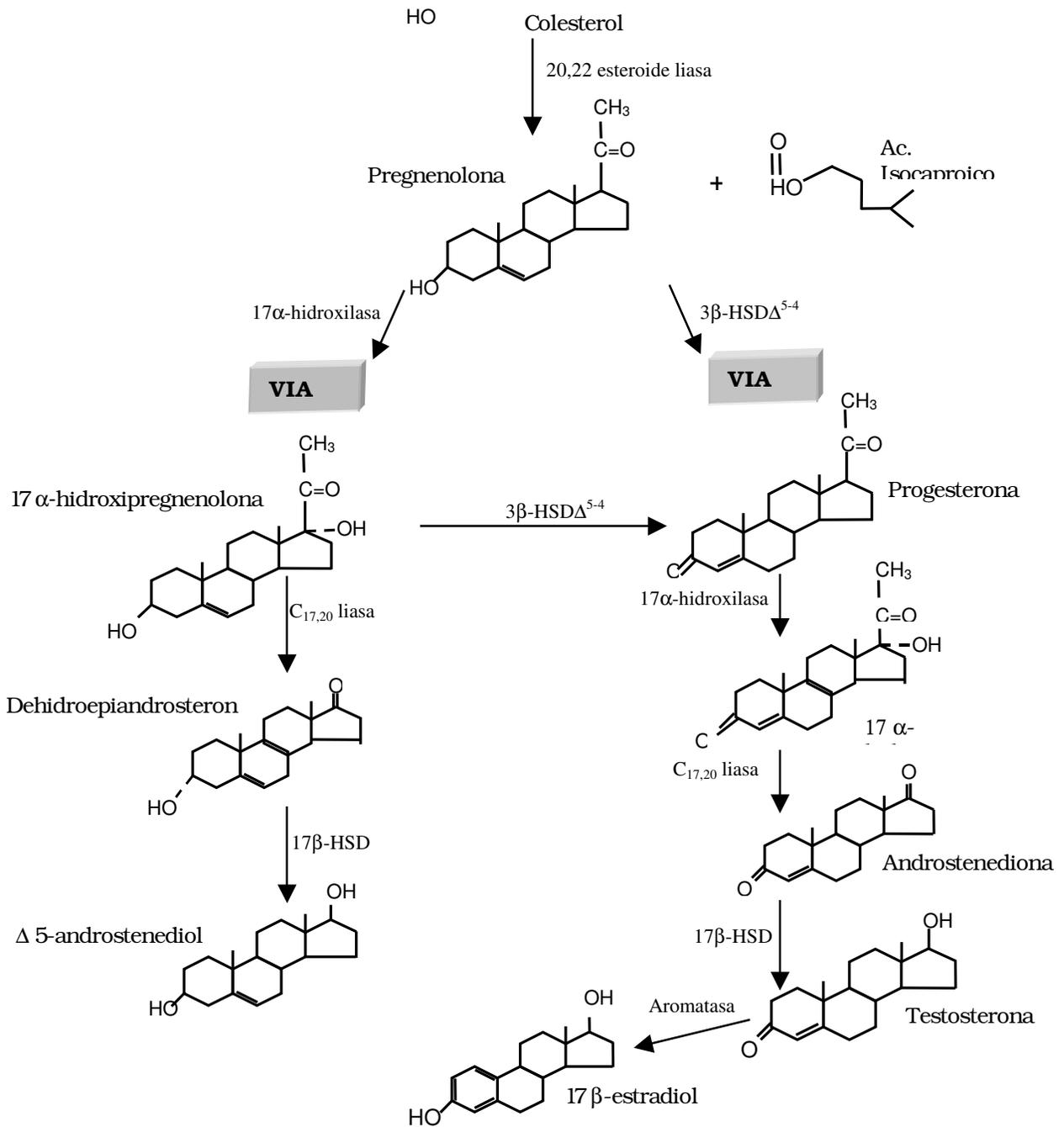
La conversión de colesterol a  $P_4$  implica cambios estructurales de la molécula: la pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el carbono C-17 que ocurre en las mitocondrias por acción de la enzima citocromo P-450 que da lugar a la  $P_3$ . Posteriormente la oxidación del grupo alcohol en el C-3 y la migración de la doble ligadura del anillo B al A por acción de la enzima  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD isomerasa que lleva a la formación de  $P_4$  en el REL. (van Tienhoven, 1983; Miller, 1988)

Una vez formada la  $P_4$ , la conversión a testosterona requiere la participación de tres enzimas más: la  $17\alpha$ -hidroxilasa, la  $C_{17-20}$  liasa y la  $17\beta$ -HSD, secuencia referida como la vía delta 4 de la  $P_4$ . (van Tienhoven, 1983; Miller, 1988)

Los estrógenos se forman por aromatización de los andrógenos en un proceso con tres hidroxilaciones, los cuales requieren de oxígeno y DNAPH. El complejo enzimático aromatasa incluye una oxidasa P-450 de función mixta. Si el sustrato es testosterona, se forma estradiol; mientras que la aromatización de la androstenediona forma estrona (van Tienhoven, 1983;

Miller, 1988) (Fig. 3).





**Figura 3.** Biosíntesis de esteroides sexuales (tomado de van Tienhoven, 1983)

## FUNCIÓN DEL CUERPO LÚTEO

Existen evidencias histoquímicas y bioquímicas que muestran que la principal función del CL de los reptiles, tanto ovíparos como vivíparos, es la de producir P<sub>4</sub>. Estudios *in vitro* mostraron una fuerte actividad de la  $\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ -HSD en el tejido luteal de especies ovíparas y vivíparas (Xavier, 1987). Estos trabajos demuestran que el CL es capaz de convertir P<sub>3</sub> a P<sub>4</sub> y DHEA a androstenediona. Además, se ha observado que hay una correlación positiva entre la concentración de P<sub>4</sub> en plasma y la actividad histoquímica de la  $\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ -HSD en el CL en la mayoría de las especies hasta ahora estudiadas como *Lacerta vivípara*, *Chamaeleo p. pumilis*, *Sceloporus cyanogenys*, *Nerodea sipedon*, *Thamnophis elegans* (Xavier, 1987) y *B. i. imbricata* (Martínez-Torres y col., 2003)

La P<sub>4</sub> es una hormona esteroide clave en la regulación de la función reproductiva en hembras y tiene efecto sobre tejidos específicos (como el útero) que lo preparan para mantener la preñez. No sólo facilita la implantación, sino también mantiene la preñez estimulando el crecimiento uterino e inhibiendo la contracción del miometrio (Gordon y col, 1988; Graham y Clarke, 1997).

Además de la P<sub>4</sub>, se ha demostrado que en los reptiles el CL también secreta otras hormonas como estrógenos, andrógenos y relaxina (Xavier, 1987). En las especies vivíparas la P<sub>4</sub> en el plasma empieza a incrementarse durante la fase vitelogénica y alcanza su máximo nivel justo después de la ovulación, a la mitad o en el segundo tercio de la gestación e incluso en la preñez tardía (Xavier, 1987).

#### BIOLOGÍA DE *Barisia imbricata imbricata*

*B. i. imbricata* (Fig. 4) es una lagartija vivípara que habita entre los 3000 y 5000 m.s.n.m. en las montañas transvolcanicas de México (Guillete y Casas-Andreu, 1987). Es una lagartija de reproducción otoñal, su crecimiento folicular inicia en junio (Guillete, Casas-Andreu, 1987; Martínez-Torres, 1997), el apareamiento lo realizan en octubre y noviembre, en los últimos días de este mes o los primeros de diciembre ocurre la ovulación

(Martínez-Torres y col., 2003). El desarrollo embrionario dura en promedio seis meses y el nacimiento de las crías sucede a fines de mayo o principios de junio del año siguiente. El CL se forma inmediatamente después de la ovulación alcanzando su desarrollo máximo al final del primer tercio de la gestación. La luteolisis se inicia en el segundo tercio y concluye alrededor del parto (Martínez-Torres, 1997).



**Figura 4.** Ejemplar de *B. i. imbricata*

#### DESARROLLO DEL CUERPO LÚTEO

Existen varios estudios sobre los cambios histológicos que suceden durante la formación y degeneración del CL (Saidapur, 1982). Recientemente Martínez-Torres y col. (2003) han descrito los cambios histológicos del CL de *B. i. imbricata* durante todo el período de gestación. Además han observado que durante el periodo de gestación el CL presenta un patrón de cambios característicos: cuatro estadios secuenciales durante el tiempo de desarrollo (que ocurre en los dos primeros meses de la preñez) y tres estadios durante el proceso de regresión (que ocurre en los cuatro meses restantes). De acuerdo a Martínez-Torres y col. (2003) estos estadios presentan las siguientes características:

Estadio I

Esta representado por un folículo recién ovulado consistente en una gran cavidad con una ancha abertura de un lado, a través del cual el huevo ha escapado. Después, el FPO disminuye en tamaño por contracción de sus capas ocasionando un adelgazamiento y plegamiento de sus paredes. La capa granulosa es multiestratificada y sus células se vuelven esféricas e incrementan su tamaño por hipertrofia. Las células de la granulosa tienen núcleo central redondo u oval con uno a tres nucleolos y con abundante citoplasma eosinófilo. La TE es más delgada que la TI o iguales en algunas partes. Las dos capas pueden estar separadas por espacios que contienen células sanguíneas y macrófagos. La TI es relativamente más celular que la fibrosa externa y consiste principalmente de células hipertrofiadas y fibroblastos.

#### Estadio II

La masa celular granulosa llega a ser multiestratificada e hipertrofiada.

#### Estadio III

La abertura se estrecha considerablemente y su margen interno se curva y proyecta dentro del tejido luteal. El FPO esta más reducido en tamaño, y más hipertrofiado en las células lúteas granulosas que se esparcen hacia la luz y la obstruyen.

#### Estadio IV

El CL es una estructura compacta que presenta tres zonas distintivas: la TE, la TI y la MCL.

La TE es de consistencia holgada contiene colágeno, células hipertrofiadas con citoplasma claro y fibroblastos. La TI es el doble de grueso que la TE; es mas celular, contiene gran número de

fibroblastos y algunas fibras de colágeno, su núcleo se tiñe profundamente. La MCL de arreglo

compacto que forman una estructura sólida.

El CL en los reptiles perdura de varios días a meses según la especie y el tipo de reproducción. En algunas especies ovíparas el CL empieza su regresión antes de la oviposición y en otras es justo después de ésta. En vivíparos, puede iniciar la regresión durante la gestación o cercano al tiempo de parto; pero su periodo de vida es usualmente más largo que en ovíparos (Martínez-Torres y col., 2003).

#### INVOLUCIÓN DEL CUERPO LÚTEO

La regresión del CL en los reptiles (luteolisis) de acuerdo a Xavier (1987) ocurre en dos etapas. Empieza por el rápido descenso de la capacidad funcional del tejido (decremento de la producción de  $P_4$ , pérdida de receptores gonadotrópicos), seguido por la degeneración del propio tejido. En reptiles, el primer signo de degeneración es el incremento del tejido conectivo en la MCL; durante la etapa final las células lúteas se desintegran y son remplazadas por tejido conectivo que llegará a ser parte del tejido del ovario.

Martínez-Torres y colaboradores (2003) observaron que, particularmente en *B. i. imbricata* la involución del CL se puede dividir en tres estadios determinados con características bien definidas que son:

##### Estadio I

Las células lúteas inician un proceso picnótico, sus núcleos que inicialmente eran grandes y esféricos u ovals se contraen o rompen. Las capas tecales se adelgazan y el número y diámetro de los vasos sanguíneos disminuye. Las células lúteas periféricas muestran vacuolas lipídicas en su citoplasma.

##### Estadio II

La totalidad de las células lúteas presentan vacuolas lipídicas en su citoplasma, los procesos

picnóticos se generalizan en las células; el cambio más significativo es la infiltración de septos de tejido conectivo hacia la MCL provenientes de la TI. La reducción significativa en el ancho de las tecas ocurre en este estadio y el tamaño del CL empieza a reducirse.

### Estadio III

Muestra cavidades en la región central de la MCL, así como mayor infiltración de tejido conectivo y las regiones centrales están completamente llenas de una masa vacuolada de células lúteas con un núcleo de menor tamaño que en los estadios anteriores. El CL también ha disminuido de tamaño.

### REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CUERPO LUTEO

La información existente sobre los mecanismos de regulación del CL en los reptiles es muy escasa; sin embargo, basados en los datos generados en los mamíferos los mecanismos de control de la actividad lutea pueden clasificarse en luteotrópicos y luteolíticos (Zelenik y Benyo, 1994).

Los agentes luteotrópicos estimulan la actividad del CL y entre ellos encontramos las gonadotropinas hipofisarias y placentarias. En el caso del humano la placenta llega a asumir el control endocrino de la gestación en su totalidad (Zelenik y Benyo, 1994).

Los agentes luteolíticos promueven la degeneración del CL. En los mamíferos el útero juega un papel importante en la regresión lutea mediante la secreción de PG particularmente la F-2 $\alpha$ , en primates también puede producirse estradiol y en el caso de *Macaca mulata* la hipófisis puede producir oxitocina que provoca luteolisis (Zelenik y Benyo, 1994). Para los reptiles Guillette y col. (1988) demostraron que el útero es capaz de sintetizar la PGF-2 $\alpha$  *in*

*vitro* durante la preñez tardía de *S. jarrovi*, sin embargo la participación de las PG uterinas en la regresión lutea no ha sido demostrada.

## **JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se acepta que el factor principal que permite la retención del huevo en el tracto reproductor de las hembras es la habilidad del CL de continuar secretando P<sub>4</sub> después de la ovulación. En contraste, la pérdida de esta capacidad lleva, en muchas especies, a una rápida oviposición (Guarino y col., 1998). A pesar de la importancia que tiene esta glándula en el mantenimiento de la gestación de los reptiles vivíparos y en la evolución de la viviparidad, se desconoce el mecanismo que regula su actividad.

Por ello, es necesario iniciar estudios encaminados a esclarecer los mecanismos que modulan la función del tejido luteal en especies de reptiles vivíparos, ya que ésto nos permitirá inferir el mecanismo fisiológico que permitió la evolución de la viviparidad.

En nuestro laboratorio se ha utilizado a *B. i. imbricata* para estudiar el control endocrino de la gestación y sus implicaciones en la evolución de la viviparidad. Recientemente se diseñó un modelo de pseudopreñez para iniciar el estudio de los mecanismos que regulan la actividad del CL en los reptiles, por lo que se propusieron los siguientes objetivos:

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la ausencia del embrión altera la morfofisiología del cuerpo lúteo de *B. i. imbricata*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer las características histológicas del cuerpo lúteo y del útero en hembras preñadas y pseudopreñadas a las 8 y 16 semanas posteriores a la ovulación de la lagartija *B. i. imbricata*.
2. Determinar los niveles de progesterona plasmática en hembras preñadas y pseudopreñadas a las 8 y 16 semanas posteriores a la ovulación.

3. Determinar la actividad histoquímica de la enzima  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD en cuerpo lúteo de 8 y 16 semanas posteriores a la ovulación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se colectaron hembras adultas en Cuautitlán, Estado de México (19° 37' N, 99° 11' W; 2253 m.s.n.m.) de *B. i. imbricata* después de su período de apareamiento y se trasladaron al laboratorio de Biología de la Reproducción de la UMF ubicada en la FES Iztacala. Se pesaron (gr), midieron longitud hocico-cloaca (mm) y marcaron por ectomización de falanges. Posteriormente se determinó la ovulación mediante la palpación abdominal (Cuellar, 1972) y ultrasonido. Una vez ocurrida la ovulación, los organismos se asignaron al azar en 3 grupos de trabajo: A) grupo experimental (hembras pseudopreñadas, n=13), B) grupo control con laparotomía (n=11) y C) grupo testigo (hembras preñadas intactas, n=14).

### A) Hembras pseudopreñadas

Las hembras del grupo experimental fueron sometidas a cirugía para desalojar los huevos del útero de la siguiente manera: durante la primera y segunda semanas después de la detección de la ovulación se anestesió a los organismos con éter y se practicó una incisión ventrolateral. Inmediatamente después se procedió a retirar los huevos del útero regresándolos manualmente a través del oviducto para finalmente ser extraídos por el ostium.

### B) Grupo control con laparotomía

Durante la primera y segunda semanas después de la ovulación las lagartijas de este grupo fueron sometidas al mismo tratamiento quirúrgico que las hembras del grupo experimental, excepto que los huevos no fueron desalojados.

### C) Grupo testigo

Éste grupo estuvo constituido por hembras preñadas a las que no se sometió a ningún tratamiento quirúrgico.

Una vez recuperadas de la anestesia, las hembras sometidas a cirugía (pseudopreñadas y hembras control) fueron depositadas en terrarios individuales con agua y alimento (larvas de coleópteros, larvas de lepidópteros -palomillas-, grillos y chapulines) *ad libitum* durante tres días para su recuperación. El día de la cirugía y al día siguiente, se administró a cada lagartija 5000 U. I. de penicilina G procaínica i. m.

Posteriormente todas las lagartijas se mantuvieron en condiciones de semicautiverio en un encierro ubicado en el invernadero de la UMF, con agua y alimento *ad libitum*, con un ciclo de luz-oscuridad natural y condiciones ambientales naturales durante todo el experimento.

Tanto las hembras pseudopreñadas, como las hembras con laparotomía e intactas se dividieron en dos lotes. El primer lote se trabajó a las 8 semanas post-ovulación y el segundo lote se trabajó a las 16 semanas post-ovulación.

A las 8 semanas posteriores a la detección de la ovulación se realizó la luteotomía total a todas las hembras del primer lote. De los CL obtenidos uno se incluyó en "Tissuetech" y se congeló inmediatamente en una mezcla de acetona-CO<sub>2</sub> sólido para posteriormente realizar cortes en criostato de 12 µm de grosor y poder realizar el ensayo histoquímico y determinar la actividad de la enzima  $\Delta^{5-4}3\beta$ -HSD (ver apéndice). El otro CL se fijó con paraformaldehído al 4% para realizar la técnica histológica de rutina (Luna, 1968, ver apéndice). Previo a la cirugía mediante punción cardiaca se obtuvo de cada organismo una muestra de sangre de aproximadamente 220µl la cual se depositó en un tubo eppendorf que contenía 10 µl de anticoagulante. Inmediatamente después la muestra fué centrifugada a 10 000 r.p.m. durante 30 segundos, se decantó el plasma y se congeló a -40°C hasta el momento del RIA para medir el nivel de P<sub>4</sub> en plasma (Martínez-Torres y col., 2003, ver apéndice).

El mismo procedimiento se siguió con los organismos del segundo lote, a las 16 semanas posteriores a la ovulación.

La estructura histológica del útero se evaluó para determinar si el desalojo mecánico de los embriones pudo haber dañado el tracto reproductivo y esto pudiera generar alteraciones en la función del tejido luteal. Así, un pequeño segmento uterino de cada lagartija pseudopreñada fue removido quirúrgicamente al mismo tiempo que se obtuvieron los CL (8 y 16 semanas posteriores a la ovulación) y se fijaron en formol al 10% amortiguado.

### **Análisis estadístico**

Los datos de los niveles de P<sub>4</sub> fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (de dos factores) y las diferencias fueron determinadas a través de la prueba de Student-Newman-Keuls utilizando un nivel de significancia de 0.05. Éstos análisis se hicieron con el programa **Sigma Stat para Windows**.

## RESULTADOS

### **Histología del cuerpo lúteo de hembras a las 8 semanas post-ovulación**

#### *Hembras control (n=7)*

Cuatro hembras presentaron CL con características de estadio IV de desarrollo (Fig. 5A, Cuadro 1). El CL es una estructura compacta que presenta tres zonas distintivas. La TE, de consistencia holgada contiene colágeno, células hipertrofiadas con citoplasma claro y fibroblastos. La TI, del doble de grueso que la TE; es mas celular, contiene gran número de fibroblastos y algunas fibras de colágeno, su núcleo se tiñe profundamente. Y finalmente la masa celular interna compuesta por una MCL sólida de arreglo compacto. Los CL de las tres lagartijas restantes estaban en el estadio I de regresión (Fig. 5B, Cuadro 1). Las células lúteas presentaron un aspecto picnótico. Los núcleos se observan rotos o disminuidos y mostrando células en anillo con núcleos periféricos. Hay adelgazamiento de las capas tecales, disminución en el número y diámetro de los vasos sanguíneos. Las células lúteas periféricas muestran el aspecto de adipocitos.

#### *Hembras con laparotomía (n=6)*

Los CL de cuatro lagartijas se encontraban en el estadio IV de desarrollo luteal (Fig. 5C), y el tejido luteal de dos lagartijas presentó signos de haber iniciado la regresión. El aspecto histológico del tejido es similar al observado en las hembras intactas en los estadios respectivos.

#### *Hembras pseudopreñadas (n=7)*

En todos los organismos se observó que los CL presentaban cambios regresivos, sin embargo solamente el tejido luteal de dos hembras presentó el patrón regular para el estadio I de luteólisis y el CL de las cinco hembras restantes (Cuadro 1) mostró cambios degenerativos no observados en las hembras control (intactas y laparatomizadas) (Fig. 5D, E). Esos cambios luteolíticos son: cavidades<sup>22</sup> de diámetros y contornos irregulares en la

MCL (Fig. 5D), adelgazamiento de la TE e infiltración de la TI hacia el macizo celular (Fig. 5E). En la MCL de los CL que presentaron cavidades, se observaron células con uno o dos nucleolos, células con cromatina condensada y células en anillo. Sin embargo, la TI y la TE de estos CL es similar a la observada en la etapa IV de desarrollo luteal. Por otro lado, en los CL que presentaron infiltración y engrosamiento de la TI se observaron cúmulos de células tipo adipocitos. Todas las células de la MCL presentan el núcleo aplanado en la periferia y una vacuola central.

### **Histología del cuerpo lúteo de hembras a las 16 semanas post-ovulación**

#### *Hembras control (n=7)*

De acuerdo con Martínez-Torres y col. (2003), los CL de las lagartijas intactas presentaron estadio II de regresión lútea (Fig. 6A). En éste estadio la totalidad de las células lúteas presentan vacuolas en su citoplasma, además, el proceso picnótico se generaliza en las células de la MCL y los núcleos en su mayoría son periféricos e irregulares. El cambio más significativo es la infiltración de septos de tejido conectivo hacia la MCL provenientes de la TI, pudiéndose observar capilares sanguíneos en algunos septos. Además, se observa una disminución significativa en el grosor de las tecas y en el diámetro del CL.

#### *Hembras con laparotomía (n=5)*

En todas las hembras con laparotomía los CL estuvieron en el estadio II de degeneración y presentaron características similares a los controles intactos (Fig. 6B).

#### *Hembras pseudopreñadas (n=6)*

Todas presentaron CL con características similares al estadio II de regresión (Fig. 6C). Sin embargo, el tejido luteal de cinco lagartijas presentaron características no observadas en el tejido luteal de las hembras control, tales como infiltración y engrosamiento de la TI y/o infiltración celular. La mayoría de las células de la MCL tienen

la apariencia de células en anillo, sin embargo, también se observan células con núcleo elíptico o redondeado y células con grumos de cromatina. La infiltración de tejido conectivo hacia la MCL es escasa en relación con la observada en las hembras preñadas.

### **Actividad histoquímica de la $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD**

La actividad histoquímica de los CL de las hembras de control intacto y laparotomía es homogénea en la MCL a las 8 y 16 semanas (Fig. 7A). La abundancia de los gránulos de formazan en las hembras preñadas es mayor que el observado en las hembras pseudopreñadas en los tiempos estudiados. Además, en las cavidades de los CL de 8 semanas post-ovulación no hay actividad de la  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD (Fig. 7B). En las lagartijas pseudopreñadas la actividad de la  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD disminuyó drásticamente o estuvo ausente en los lugares donde la MCL fue invadida por el tejido tecal y donde la MCL estaba en un avanzado proceso regresivo.

### **Progesterona**

Se observó una reducción significativa de los niveles de  $P_4$  en hembras pseudopreñadas en relación con las intactas y las de laparotomía en los 2 tiempos de estudio.

A las 8 semanas, se observó una disminución significativa en los niveles plasmáticos de  $P_4$  de las hembras pseudopreñadas con respecto a las concentraciones observadas en las hembras intactas y con las de laparotomía. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las intactas y las de laparotomía.

A las 16 semanas se observó una diferencia significativa entre hembras pseudopreñadas e intactas (Cuadro 1), pero no encontramos diferencias entre los grupos de laparotomía y pseudopreñez (Cuadro 1). Además, observamos que los niveles de  $P_4$  en plasma fueron significativamente mayores en todos los tratamientos a las 8 semanas en relación con sus respectivos tratamientos a las 16 semanas.

## **Histología uterina**

El útero de hembras pseudopreñadas de 8 y 16 semanas post-ovulación tiene la apariencia de un tubo homogéneo. La pared uterina de todas las hembras es gruesa y está constituida por tres capas: a) el epitelio, b) la lámina propia y c) el miometrio. La lámina propia de las hembras de 8 semanas post-ovulación es gruesa y está compuesta por tejido conectivo denso irregular, también presentó algunas glándulas atróficas así como capilares en la región profunda. Además, la lámina propia tiene pliegues, los cuales están limitados por epitelio columnar o cúbico simple con algunas células cilidas. También se presentaron abundantes capilares sanguíneos en la región subepitelial. El miometrio tiene dos capas musculares: una circular interna y una longitudinal externa. Se observaron residuos de vitelo en la cavidad uterina de tres hembras. En el vitelo se observó la presencia de eosinófilos en diferentes etapas de la degranulación (Fig. 8A).

**Cuadro 1.** Características histológicas e histoquímicas del cuerpo lúteo y niveles de progesterona en lagartijas preñadas y pseudopreñadas de *B. i. imbricata*.

TRATAMIENTO	TIEMPO DESPUÉS DE LA OVULACIÓN	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DEL CUERPO LÚTEO		NIVELES DE PROGESTERONA EN EL PLASMA* MEDIA ± D.M**.
		Fase de desarrollo	Fase de regresión	
Lagartijas preñadas intactas	8 semanas	IV (4) ++++	I (3) +++	2.46 ± 0.21 <sup>c, f</sup>
	16 semanas	-	II (7) ++	1.44 ± 0.18 <sup>e, f</sup>
Lagartijas con laparotomía	8 semanas	IV (4) ++++	I (2) +++	2.3 ± 0.28 <sup>d, g</sup>
	16 semanas	-	II (5) ++	1.17 ± 0.12 <sup>g</sup>
Lagartijas pseudopreñadas	8 semanas	-	I (2 normal <sup>a</sup> 5 atípicas <sup>b</sup> ) +++	1.58 ± 0.33 <sup>c, d, h</sup>
	16 semanas	-	II (1 normal <sup>a</sup> 5 atípicas <sup>b</sup> ) ++	0.57 ± 0.11 <sup>e, h</sup>

+ intensidad de la actividad de la  $\Delta^5-4\beta$ -HSD de + a +++++ (menor a mayor indica el incremento de actividad enzimática)

\*concentración en ng/ml

\*\*desviación estandar

() Número de lagartijas cuyo CL se encontró en ese estadio.

<sup>a</sup> apariencia similar al CL de hembras preñadas.

<sup>b</sup> presencia de cambios histológicos no encontrados en el CL de hembras preñadas.

<sup>c</sup> diferencias significativas, P < 0.020 (comparación para el factor tratamiento).

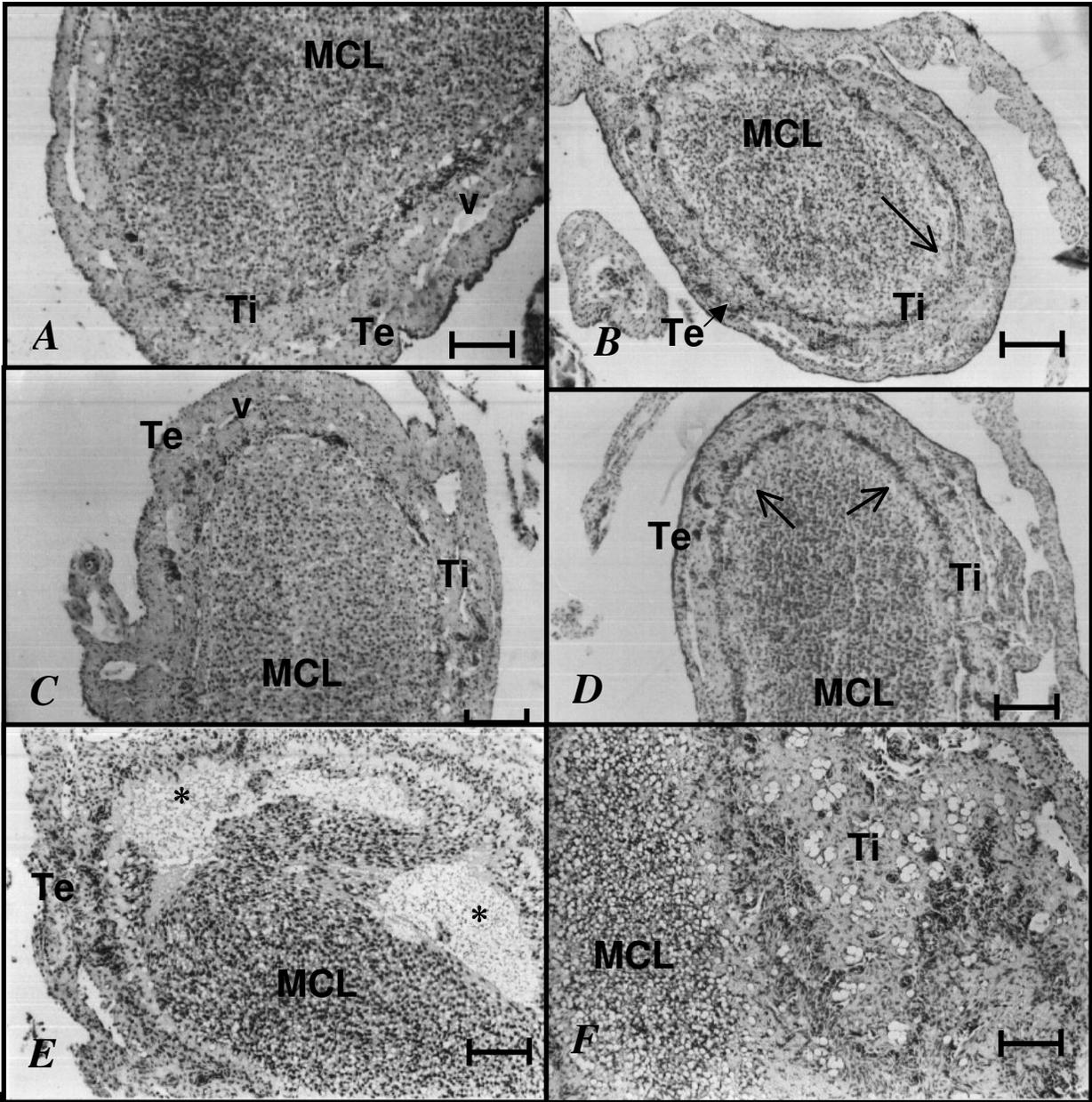
<sup>d</sup> diferencias significativas, P < 0.029 (comparación para el factor tratamiento).

<sup>e</sup> diferencias significativas, P < 0.024 (comparación para el factor tratamiento).

<sup>f</sup> diferencias significativas, P < 0.003 (comparación para el factor tiempo entre lagartijas preñadas intactas).

<sup>g</sup> diferencias significativas, P < 0.002 (comparación para el factor tiempo entre lagartijas con laparotomía).

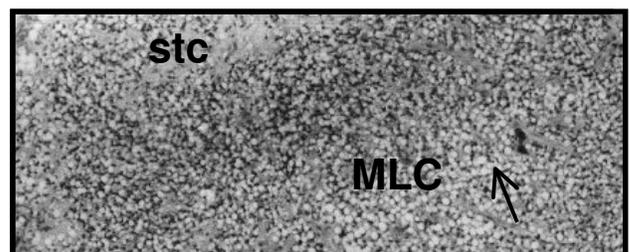
<sup>h</sup> diferencias significativas, P < 0.004 (comparación para el factor tiempo entre lagartijas pseudopreñadas).



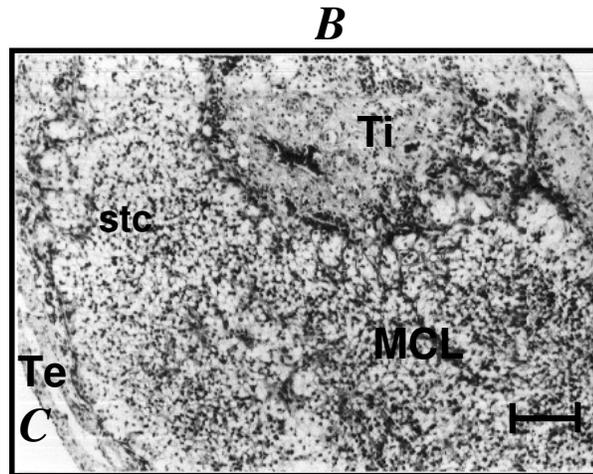
**Fig.** **A)** preñada en el estadio IV de desarrollo luteal. La MCL forma una estructura compacta y las capas tecales están bien definidas y separadas por amplios vasos sanguíneos. **B)** Cuerpo lúteo de una hembra preñada en estadio I de la luteolisis. Los núcleos de la MCL son aplanados y están situados en la periferia (células en anillo) y las tecas se han adelgazado con respecto al estadio IV de desarrollo. **C)** Cuerpo lúteo de una lagartija control con laparotomía en estadio IV de desarrollo. **D)** Cuerpo lúteo de una hembra pseudopreñada. Las células en anillo están situadas en la periferia de la MCL y hay adelgazamiento de las tecas. **E)** Cuerpo lúteo de una hembra pseudopreñada. Note la presencia de cavidades en la MCL. La TI y TE se observan bien definidas y presentan un aspecto similar al del estadio IV de desarrollo. **F)** Cuerpo lúteo de una hembra pseudopreñada. Observe que el engrosamiento de la TI invade la MCL. La barra en las ilustraciones indica 100  $\mu$ m.  
 \*: cavidad; **v**: vasos sanguíneos;  $\Rightarrow$  células en anillo.

MCL

Ti



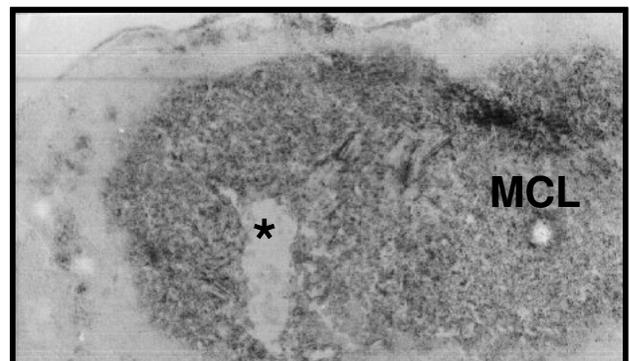
27



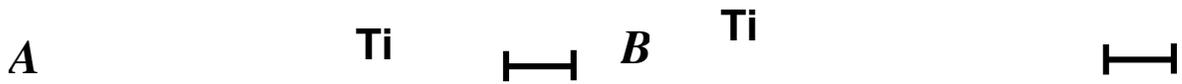
**Figura 6.** Cuerpos lúteos de 16 semanas post-ovulación. **A)** Cuerpo lúteo de una hembra preñada intacta en el estadio II de la luteolisis. Observe que todas las células de la MCL tienen la apariencia de células en anillo y la infiltración de septos de tejido conectivo a partir de la TI, además dentro de los septos se encuentran vasos sanguíneos. Hay adelgazamiento de las tecas con respecto al estadio I de luteolisis. La separación de la TI de la TE no es tan evidente. **B)** Cuerpo lúteo de una lagartija control con laparotomía. La apariencia histológica corresponde a la etapa II de la luteolisis. Observe que todas las células de la MCL tienen el aspecto de células en anillo y la infiltración de septos de tejido conectivo. **C)** Cuerpo lúteo de una hembra pseudopreñada. Observe el engrosamiento e infiltración de la TI hacia la MCL. La barra en las ilustraciones indica 100  $\mu$ m. **stc:** septo de tejido conectivo;  $\rightarrow$  células en anillo.

MCL

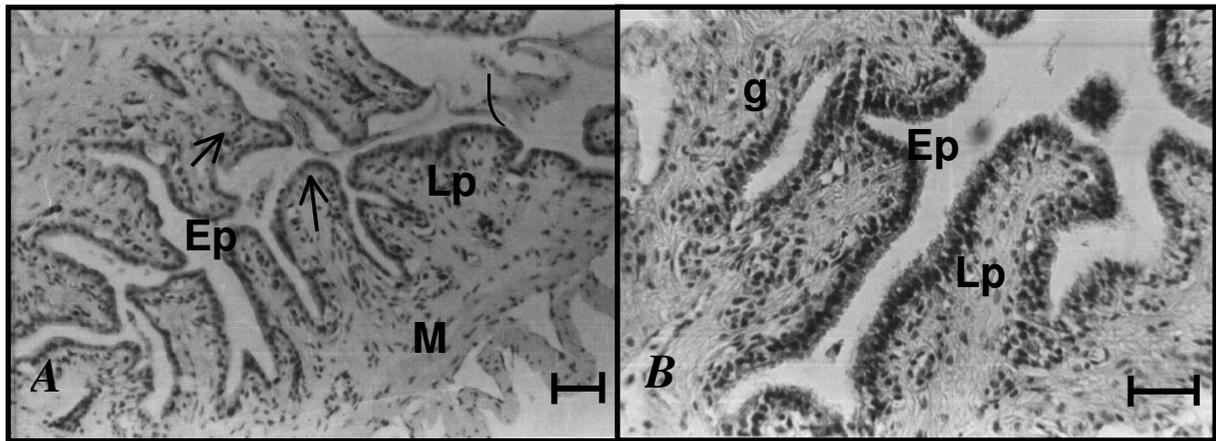
2



MCL



**Figura 7.** Actividad histoquímica de la  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD en el cuerpo lúteo. *A)* Cuerpo lúteo de 8 semanas post-ovulación de una hembra preñada intacta. Observe que los gránulos de formazan están distribuidos homogéneamente en toda MCL. *B)* Cuerpo lúteo de una hembra pseudopreñada de 8 semanas post-ovulación. Note la ausencia de gránulos de formazan en la cavidad. La barra indica 100  $\mu$ m.  
\*: cavidad.



**Figura 8.** Cortes transversales de útero de hembras pseudopreñadas. *A)* Útero de 8 semanas post-ovulación. La pared uterina esta compuesta de 3 capas histológicas: epitelio, lámina propia y miometrio. El epitelio es cúbico simple, algunas células presentan cilios. Observe que en la región subepitelial la presencia de capilares sanguíneos es más abundante que en la región profunda. En la luz uterina se observa vitelo residual infiltrado por células basófilas esféricas ( ). La barra indica 50  $\mu$ m. *B)* Útero de 16 semanas post-ovulación. La lámina propia presenta algunas glándulas y los pliegues están cubiertos por epitelio columnar simple ciliado. La barra indica 40  $\mu$ m.

**Ep:** epitelio; **Lp:** lámina propia; **M:** miometrio; **g:** glándula ➡ capilares.

## DISCUSIÓN

Se ha asignado un papel central al CL en la retención del embrión en el tracto reproductor de la hembra, debido a la capacidad de seguir secretando  $P_4$  después de la ovulación (Callard y col., 1992). En contraste, la pérdida de esta capacidad lleva, en muchas especies, a una rápida oviposición (Guarino y col., 1998).

La regulación de la actividad del CL y el control endocrino de la preñez está ampliamente documentado en diversas especies de mamíferos (Wake, 1977; Xavier y col., 1989). Se ha demostrado en los mamíferos que el embrión estimula la actividad del CL y alarga su vida media (Gordon y col., 2000; Hodgen e Itskovits, 1988; Zeleznik y Benyo, 1994). También está claramente establecido que en la etapa de blastocisto (o posterior a ésta) es la fase en la cual el embrión libera los factores que rescatan al CL de la luteolisis (Gordon y col., 2000).

En reptiles sólo existe un trabajo realizado por Xavier y col. en 1989 en donde retiraron los embriones del útero al inicio de la preñez, pero sin especificar la etapa de desarrollo en que se encontraba el embrión. En *B. i. imbricata* se retiró al *conceptus* del útero cuando el embrión estaba en los primeros días de la gestación, se observaba claramente la cicatrícula, por lo que muy probablemente el embrión se encontraba en etapa de segmentación. En la mayoría de los casos ya se habían formado las cámaras de incubación, ya que al desalojar los huevos éstos perdieron su integridad y los sitios donde se alojaban mostraron, después del desalojo, un aspecto edematoso y dilatado que permitieron distinguirlos de los intersitios, ya que éstos conservaron el aspecto de un esfínter. Además, se observó que el tejido luteal de las hembras pseudopreñadas presentó cambios lutelíticos atípicos, los cuales pertenecen a hembras que aún no habían formado las cámaras de incubación. En cambio, en las hembras que ya habían formado estas cámaras la luteolisis mostró un patrón singular al de las hembras control. Estos datos

demuestran que el desarrollo del CL hasta su etapa madura es independiente de la presencia del embrión. Además, también sugieren que el curso normal de la luteolisis depende de que el embrión se encuentre presente durante las primeras dos semanas de la preñez, ya que si son desalojados antes de este tiempo la luteolisis presenta características atípicas. En cambio, si son desalojados tardíamente (después de las dos semanas de ovulación), el desarrollo y degeneración luteal siguen un patrón normal. Xavier y col. (1989) reportaron previamente en *Lacerta vivipara* que en la preñez temprana el embrión juega un papel antiluteolítico, ya que si se remueve tardíamente (p.e. después de 10 días de gestación) la producción de P<sub>4</sub> no se ve afectada. Algo similar podría estar ocurriendo en *B. i. imbricata* (Guillette, 1993; Xavier y col., 1989). Además de esas alteraciones en la luteolisis nosotros observamos disminución significativa en los niveles de P<sub>4</sub> circulante. Estos resultados apoyan la idea de que el embrión participa en el establecimiento de la vida media del CL, así como en el control de la producción de P<sub>4</sub>.

En los mamíferos es muy claro que la interacción entre el embrión y el útero es necesaria para la migración y el espaciamento de los embriones, para la secreción de histiotrofo, la implantación, la placentación y eventos relacionados (Bazer y Roberts, 1983). El oviducto y el útero de los reptiles tienen diversas funciones como transporte del ovocito, espaciamento de los embriones, el depósito de la albúmina y membranas de la cáscara (Blackburn, 1998; Girling, 2002). Sin embargo, se desconoce si el embrión participa en los eventos tempranos de la preñez, como por ejemplo la implantación. En los mamíferos la implantación es un evento indispensable previo a la iniciación de la placentación (Psychoyos, 1986). Particularmente en el ratón, el incremento en la permeabilidad vascular es el cambio más precoz que ocurre al inicio de la implantación. Este cambio coincide con la reacción de adhesión del embrión al epitelio uterino. En *B. i. imbricata* se observó que inmediatamente después de que el embrión es desalojado, el útero presentó una distensión,

las cámaras de incubación, en el sitio que alojaba a cada uno de los embriones desalojados tardíamente. Además, cada una de las cámaras de incubación están separadas por un segmento inter-embriionario que tiene un diámetro más pequeño y el aspecto de un esfínter. En contraste, las cámaras de incubación no se presentaron en las hembras pseudopreñadas, cuyos embriones fueron desalojados tempranamente (antes de las dos semanas post-ovulación). La formación de las cámaras de incubación sugiere que la presencia del embrión ha sido reconocida. Además, los cambios observados en el útero de las hembras pseudopreñadas (incremento en la abundancia de capilar en la región subepitelial) sugieren que el embrión participa en algunos eventos tempranos de la preñez como transporte y espaciamiento de los embriones. La implantación embrionaria en los reptiles no ha sido aceptada (Birkhead y Moller, 1993); sin embargo, es ampliamente conocido que los reptiles desarrollan diversos tipos de placentas (Stewart y Blackburn, 1988), por lo que la posibilidad de que ocurra la implantación en los reptiles vivíparos no puede ser descartada. Particularmente *B. i. imbricata* desarrolla tres tipos de placenta (Martínez-Torres, 1997).

Browning (1973) sugirió que una de las funciones de la P<sub>4</sub> es preparar al útero para la preñez estimulando la hipervascularidad. Éste es el cambio más precoz que ocurre en la lámina propia durante la preñez temprana (Blackburn, 2000; Guillette y Jones, 1985). La estructura histológica del útero de las hembras de 8 y 16 semanas post-ovulación es similar a la descrita por Blackburn y col. (1998) para los sitios post-abortivos uterinos de la lagartija vivípara *Chalcides chalcides*. También se observó abundancia de capilares en la región subepitelial de la lámina propia del útero de las hembras pseudopreñadas. Masson y Guillette (1987) encontraron incremento en la cantidad de vasos sanguíneos en la lámina propia del útero durante el período de gravidez en *S. obsoletus*; *S. undulatus* and *Crotaphytus collares*. Además, también encontraron que hay una correlación positiva entre

la densidad capilar y la concentración de  $P_4$ . Estos datos sugieren que en el útero de las hembras pseudopreñadas los cambios observados en la lámina propia son promovidos por la  $P_4$ .

En conclusión, éstos resultados aportan evidencias de que en los reptiles el embrión podría estar participando en el establecimiento de la vida media del cuerpo lúteo, particularmente en el control de la luteolisis, así como en la producción de  $P_4$ . Estos datos también sugieren que existe una interacción entre el embrión y el útero para regular los eventos tempranos de la preñez.

## **ABREVIATURAS**

**CL:** Cuerpo lúteo.

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona.

**FPO:** Folículo post-ovulatorio.

**MCL:** Masa de células luteas.

**NADPH:** Nicotin adenin dinucleótido reducido de fosfato.

**P<sub>3</sub>:** Pregnenolona.

**P<sub>4</sub>:** Progesterona.

**PG:** Prostaglandinas.

**REL:** Retículo endoplásmico liso.

**RIA:** Radioinmunoanálisis.

**TE:** Teca externa.

**TI:** Teca interna.

**UMF:** Unidad de Morfología y Función.

**$\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ -HSD:**  $\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ -hidroxiesterol deshidrogenasa.

## APENDICE

### *Técnica histoquímica para detectar la actividad de la $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD*

Se realizó de acuerdo a Levy y col. (1959) y consiste en lo siguiente: preparar el medio de incubación disolviendo 40 mg de Nicotin Adenin Dinucleótido en 20 ml de amortiguador de fosfatos con pH de 7.4. Aparte se disuelven 20 mg de Azul Nitro de Tetrazolio en 20 ml del mismo amortiguador. Se mezclan ambas soluciones; 20 ml se utilizan como control y a los otros 20 ml se le agrega 2 mg de dehidroepiandrostediona (previamente disueltos en 0.5 ml de dimetilformamida) como sustrato para detectar la actividad de  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD.

Se incuban los cortes obtenidos del criostato en el medio a 37°C por 1 h, se lavan en agua destilada y se fijan en formol amortiguado al 10% durante 15 min para enseguida montarse en gelatina glicerinada.

Nota: Se realizaron controles positivos con ovario y negativos con hígado de rata.

### *Técnica histológica de rutina*

#### *Técnica de tinción con hematoxilina y eosina (Luna, 1968)*

Después de fijar el CL, se colocó en un baño de agua corriente por 24 hrs, para después proceder a deshidratarlo en un gradiente de alcohol, desde etanol al 70% hasta alcohol absoluto (2 hrs. en cada uno, haciendo dos cambios de alcohol absoluto). Posteriormente se aclararon las muestras pasandolas inicialmente por una mezcla de (xilol-alcohol, durante 30 min) y posteriormente dos cambios de xilol absoluto (20 min c/u). La infiltración se realizó con parafina en una mezcla de xilol-parafina (15 min), y se continuó con baños de parafina absoluta (2 hrs c/u con punto de fusión de 58-60°C) y finalmente, se

incluyeron. Se realizaron cortes de 7 $\mu$ m de grosor en un micrótomo rotatorio y se adhirieron las muestras a un portaobjetos con solución Ruyter para su tinción.

Los cortes ya montados se desparafinaron en xileno (2 baños por 3 min c/u), después los tejidos se rehidrataron en gradientes de alcohol, iniciando en absoluto hasta etanol al 70% y posteriormente en agua destilada. Se colocaron en hematoxilina de Harris por 7 min y se lavaron en un baño rápido de agua corriente. Se dieron dos baños rápidos en agua amoniacal, se diferenciaron en alcohol ácido y se colocaron en eosina alcohólica durante 1 min. Se deshidrataron en alcoholes graduales, desde alcohol al 90% hasta alcohol absoluto y se montaron con resina sintética.

#### *Técnica de RIA para progesterona*

*(Martínez-Torres, et al., 2003)*

Para medir los niveles de P<sub>4</sub> en plasma mediante esta técnica se utilizó un estuche comercial de los laboratorios DPC Coat-A-Count Progesterone (DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION CA. 90045) de fase sólida que emplea como trazador I<sup>125</sup> diseñado para medir de manera directa y cuantitativa los niveles de P<sub>4</sub> en suero o plasma. Basado en el principio de que la P<sub>4</sub> marcada con I<sup>125</sup> compite con la P<sub>4</sub> de la muestra para adherirse en los sitios de los anticuerpos que se encuentran fijados en la pared de polipropileno de los tubos suministrados en el propio estuche. Lo que nos permite medir la cantidad de P<sub>4</sub> de la muestra mediante el empleo de un contador de partículas gama.

Para realizar el procedimiento se requiere que todos los componentes se encuentren a temperatura ambiente antes de utilizarse.

Para el procedimiento se tomaron 50 $\mu$ l de la muestra y 50 $\mu$ l de amortiguador de fosfatos y se adicionó 1.0 ml de P<sub>4</sub> marcado con I<sup>125</sup>, se agitó en un vortex y se incubó a 37°C durante 1h. Se decantó el sobrenadante y se midieron en un contador de partículas gama.

Con los siete primeros tubos se estableció la curva de calibración, ya que el estuche provee muestras estándares con concentraciones conocidas.

Cabe mencionar que se intercalaron estándares junto con las muestras a analizar para realizar el control de calidad de la prueba. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Para determinar la concentración de  $P_4$  se utilizó el contador GAMBYT, el cual tiene un programa que transforma las cuentas por minuto en nanogramos por mililitro.

## REFERENCIAS

- \*Álvarez del Villar, J. (1988). Anatomía comparada básica. 2ª Edición. México. pp. 437-438, 442.
- \*Bazer, F. W., Roberts, R. M. (1983). Biochemical aspects of conceptus-endometrial interactions. *J. Exp. Zool.* 228: 373-383.
- \*Bellairs, A. y Attridge, J. (1978). Los reptiles. Editorial Industrias Gráficas. España. España.
- \*Birckhead, T. R., Moller, A. P. (1993). Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biol. J. Linn. Soc.* 50: 295-311.
- \*Blackburn, D. G. (1998). Structure, function and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. *J. Exp. Zool.* 282: 560-617
- \*Blackburn, D. G., Kleis-San Francisco, S., Callard, I. P. (1998). Histology of abortive egg sites in the uterus of a viviparous, placentotrophic lizard, the skink *Chalcides chalcides*. *J. Morphol.* 235: 97-108.
- \*Blackburn, D. G. (2000). Reptilian viviparity. Past research, future directions, and appropriate models. *Com. Bioch. Physiol. Part A* 127: 391-409.
- \*Browning, H. C. (1973). The evolutionary history of the corpus luteum. *Biol. Reprod.* 8: 128-157.
- \*Callard, I. P., Filete, L. A., Pérez, L. E., Sorbera, L. A., Giannoukos, G., Klosterman, L. L., Tsang, P., y McCracken, J. A. (1992). Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. *Amer. Zool.* 32: 264-275.
- \*Cuellar, O. (1966). Oviductal anatomy and sperm storage structures in lizards. *J. Morphol.* 119: 7-20.

- \*Cuellar, O. (1972). Reproduction and restitution mechanism of meiotic restitution in the partenogenetic lizard *Cnemidophorus uniparens*. *J. Morphol.* 133: 139-166.
- \*Girling, J. E. (2002). The reptilian oviduct: A review of structure and function and directions for future research. *J. Exp. Zool.* 293: 141-170.
- \*Goin, C. J., Goin, O. B., Zug, G. R. (1978). Introduction to herpetology. 3 ed. WH Freeman and Company. pp. 2-4, 39-41, 47-49, 118.
- \*Gordon, D. N., Net, T. N. (1988). The corpus luteum and its control. In: Knobil E., Neil J. D. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raben Press, Ltd., New York © , pp. 489-525.
- \*Gordon, D. N., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80: 1-29.
- \*Graham, J. D. and Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews* 18: 502-514.
- \*Guarino, F. M., Paulesu, L., Cardone, A., Bellini, L., Ghiara, G., Angelini, F. (1998). Endocrine activity of the corpus luteum and placenta during pregnancy in *Chalcides chalcides* (Reptilia, Squamata) *Gen. Com. Endocrinol.* 111: 261-270.
- \*Guillette Jr., L. J. (1993). The evolution of viviparity in lizard: ecological, anatomical, and physiological correlates lead to new hypotheses. *Bioscience.* 43: 742-751.
- \*Guillette Jr., L. J., Herman, C. A., Dickey, D. A. (1988). Synthesis of prostaglandins by tissues of the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. *J. Herpetol.*, 22: 180-185
- \*Guillette Jr., L. J., Casas-Andreu, G. (1987). The reproductive biology of the high elevation Mexican lizard *Barisia imbricata*. *Herpetologica* 43: 29-38.
- \*Guillette Jr., L. J., Jones, R. E. (1985). Ovarian, oviductal and placental morphology of the reproductively bimodal lizard, *Sceloporus aneus*. *J. Morphol.* 184: 85-98.

\*Hildebrand, M. (1982). Anatomía y embriología de los vertebrados. Edit. Limusa. México. pp. 390-393.

\*Hodgen, G., Itskovits, J. (1988). Recognition of pregnancy. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.). The Physiology of Reproduction. Raben Press, Ltd., New York © , pp. 1995-2021.

\*Levy, H., Deane, H. W., Rubin, B. L. (1959). Visualization of steroid  $\Delta^5$ ,  $3\beta$ -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocrinology 65: 932-943. modif. por Merchant y col. 1989.

\*Luna, G. L. (1968). Manual of histological staining methods of the armed forces. Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Co., 3<sup>a</sup> ed. USA. pp. 32-40.

\*Martínez-Torres, M. (1997). Placentación y participación del cuerpo lúteo en el mantenimiento de la gestación de *Barisia imbricata imbricata* -Una perspectiva evolutiva-. Tesis de maestría. UNAM.

\*Martínez-Torres, M., Hernández-Caballero, M. E., Álvarez-Rodríguez, C., Luis-Díaz, J. A., Ortíz-López, G. (2003). Luteal development and progesterone levels during pregnancy of the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE). Gen. Comp. Endocrinol. 132: 55-65.

\*Masson, G. R., Guillete L. J. Jr. (1987). Changes in oviductal vascularity during reproductive cycle on three oviparous lizards (*Eumeces obsoletus*, *Sceloporus undulatus* and *Crothaphytus callaris*). J. Reprod. Fertil. 80: 361-371.

\*Miller, W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone síntesis. Endoc. Rev. 9: 295-318.

\*Psychoyos, A. (1986). Uterine receptivity for nidation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 476: 36-42.

\*Romer, A. Sh. (1973). Anatomía comparada (vertebrados). 4a ed. Nueva editorial Interamericana. pp. 270.

- \*Saidapur, S. K. (1982). Structure and function of postovulatory follicles (corpora lutea) in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *Intern. Rev. Cytol.* 75: 258-262.
- \*Stewart, J. R., Blackburn, D. G. (1988). Reptilian placentation: Structural diversity and terminology. *Copeia* 1988. 839-852.
- \*van Tienhoven, A. (1983). *Reproductive physiology of vertebrates*. 2a. ed. Cornell University Press, London. pp. 126, 170, 275-276.
- \*Wake, M. (1977). Fetal maintenance and its evolutionary significance in the Amphibia: *Gymnophiona*. *J. Herpetol.* 11: 379-386
- \*Xavier, F. (1987). Funcional morfology and regulation of the corpus luteum. pp. 241-282 in: *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. ed by D. O. Norris and Jones, R. E. Plenum Press.
- \*Xavier, F., Yborra, A., Burzawa-Gerar, E. (1989). Does the concept influence corpus luteum life span during early pregnancy viviparous reptiles? *Gen. Comp. Endocrinol.* 74: 264.
- \*Zelevnik, A. J., Benyo, D. F. (1994). Control of follicular development, corpus luteum function and the recognition of pregnancy in higher primates. In: *The Physiology of Reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.) edited by E. Knobil and J. D. Neill. New York, Raven pp. 751-782.