





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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**BIOLOGÍA**

**EFECTO DE LA LUTECTOMÍA AL INICIO DE LA PREÑEZ  
SOBRE LOS NIVELES DE PROGESTERONA Y EN LA  
RETENCIÓN DE ESPERMA EN  
*SCELOPORUS MUCRONATUS MUCRONATUS*  
(SAURIA: PHRYNOSOMATIDAE)**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:**

**E D I T H V E N E G A S G A Y T Á N  
D I R E C T O R D E T E S I S  
M. e n C. M A R T Í N M A R T Í N E Z  
T O R R E S**

**LOS REYES IZTACALA**

**OCTUBRE 2006**

## AGRADECIMIENTOS

Al M. En C. Martín Martínez Torres director de esta tesis, a quien agradezco infinitamente su apoyo, paciencia y tiempo brindado para la realización de este trabajo, pero sobre todo por haber creído en mi e impulsarme para concluir nuestro proyecto. ¡Muchas Gracias!

A mis revisores de tesis, M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez, Bióloga Mónica Chávez Maldonado, M. en C. Marta Elena Hernández Caballero y a la Bióloga Beatriz Rubio Morales, por las sugerencias aportadas para mejorar y enriquecer este trabajo.

A la Dra. Juanita Alba Luis Díaz por ese curso inolvidable de Manejo de Animales de Laboratorio.

A mis amigos, Alejandra Carolina Yáñez Espinosa de los Monteros, Claudia Rebeca Solís Casas, Jorge Humberto Alvarado Ramírez , Nora Adriana García Guerrero y Rosario Ramírez Ortega, por los años y momentos inolvidables que compartimos.

A Juan Antonio Almeraya Saavedra, por estos casi 5 años juntos, por tu apoyo incondicional. Gracias por estar a mi lado compartiendo este momento de mi vida.

A la Sra. María de la Luz que siempre estuvo animándome para concluir mi tesis. Gracias por su apoyo.

A mis compañeros de Laboratorio Juan Andrade Terrazas y Eduardo Osorio, por brindarme su amistad.

A mis compañeros de trabajo del Subsistema de Preparatoria Abierta, por su amistad y por su interés en la conclusión de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme un espacio en sus aulas desde el bachillerato hasta la licenciatura y por los conocimientos adquiridos.

A todos los Profesores que laboran en esta institución y que contribuyeron con mi formación profesional.

## **DEDICADO A:**

Raquel Gaytán García por su amor incondicional, apoyo y esfuerzo brindado para mi formación personal. ¡Muchas Gracias Mamá! Te amo.

Esperanza Gaytán García, por su ayuda en todo momento para alcanzar este logro en mi vida. Gracias Tía. Te quiero mucho.

Luis Lorenzo Venegas Montero, por haberme dado las bases de mis estudios y por tu apoyo. Te quiero Papá.

Mi hermano Héctor Venegas Gaytán, por su apoyo, amistad, cariño y por el tiempo dedicado a este trabajo.

Mi hermano Horacio Venegas Gaytán, mi cuñada Aída Labra Luna y a mis sobrinos Luis Alberto, Jesús Gonzalo y Aketzalli Venegas Labra por compartir este sueño.

Con todo mi amor a mis niños, chiquita, güero, nieves, manchas, pitufina y a la zorra.

Hay veces que en la vida  
perdemos la esperanza  
naufraga nuestra barca y  
nuestro amor  
y en el andar errante  
de eternos caminantes  
por cada risa, siempre hay un dolor.

En cada despedida  
hay penas escondidas  
en cada adiós hay algo que olvidar,  
también en cada encuentro  
se olvidan sufrimientos  
con una mano amiga  
que estrechar.

Vivir  
a veces es,  
reír,  
también llorar  
vivir es una carta por jugar.

Vivir  
a veces es  
perder,  
también ganar  
vivir es un mañana que esperar.

Por cada invierno frío  
en tu jardín sombrío  
hay una primavera que esperar,  
por cada amor que muere  
hay otro amor que quiere  
nacer con la esperanza  
de llegar.

Ya ves que todo pasa  
que siempre hay un mañana  
que no vale la pena abandonar,  
que siempre hay una puerta abierta a la esperanza,  
que siempre hay un camino  
por andar.

## INDICE GENERAL

	PAG.
Resumen	1
Introducción	3
Tipos de reproducción	3
Reproducción asexual	3
Reproducción sexual	3
Reproducción sexual monogamética	3
Estrategias Reproductivas	4
Fertilización interna	4
Antecedentes	6
Almacén de espermatozoides en reptiles	6
Tortugas	6
Serpientes	7
Lagartijas	8
Tiempo de retención	10
Morfología del ovario	11
Cuerpo Lúteo	13
Hormonas	14
Biología de <i>Sceloporus mucronatus</i>	17
Planteamiento del problema	19
Objetivos	19
Materiales y Métodos	20
Resultados	22
Discusión	26
Conclusión	29
Apéndice	30
Referencias	32

## RESUMEN

El Cuerpo Lúteo (CL) es una glándula endocrina transitoria presente en todas las hembras grávidas de los vertebrados y es la fuente principal de Progesterona ( $P_4$ ) ovárica durante la preñez en los reptiles escamosos. Debido a su capacidad de producir esta hormona, al CL le han asignado un papel importante en los fenómenos relacionados con la preñez, entre los que destacan: almacén de espermatozoides, transporte del huevo y el mantenimiento de la gestación.

La retención de espermatozoides es una estrategia común que utilizan las hembras de diversas clases de vertebrados para resolver algunos de los siguientes problemas reproductores tales como: escasez de machos con respecto a las hembras; ciclos reproductores asincrónicos, varias puestas en una sola temporada reproductiva, etc. Particularmente los reptiles, pueden almacenar espermatozoides viables en un Sistema de Túbulos Especiales (STE) por tiempos prolongados, éstos se encuentran en la vagina, el útero o el infundíbulo. En los lacertilios la vagina es el sitio principal de almacén de espermatozoides. Se ha propuesto que el STE tiene funciones nutritivas y protectoras y que durante el tiempo de retención los espermatozoides maduran; sin embargo se desconocen cuales son los mecanismos endocrinos que permiten el almacén de espermatozoides. Para empezar a esclarecer este último tópico se desarrolló el presente trabajo el cual tuvo como objetivo determinar el efecto de la lutectomía sobre los niveles plasmáticos de  $P_4$  y la retención de espermatozoides en la lagartija vivípara *Sceloporus mucronatus*.

Se colectaron hembras adultas poco tiempo después de la temporada de apareamiento (a fines de Noviembre) y fueron transportadas al Laboratorio de Biología de la Reproducción. Se marcaron por ectomización de falanges, al día siguiente de la captura se realizaron lavados cloacales periódicos (cada 15 días) para confirmar la presencia de espermatozoides. Tres a seis días después de la ovulación fueron extirpados los Folículos Atrésicos Vitelógenicos (FAVs) y los CLs. Los CLs y FAVs se fijaron en Formol amortiguado al 10% y se procesó para la técnica histológica de rutina y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina. Por otro lado se incluyó un FAV y un CL en Tissutek, se congelaron inmediatamente en una mezcla de Co2 sólido-Acetona y se realizó un ensayo histoquímico para determinar la actividad de la enzima  $\Delta^{5-4}$   $3\beta$ -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa ( $\Delta^{5-4}$   $3\beta$ -HSD). Previo a la cirugía se tomó mediante punción cardiaca una alícuota de sangre de 250  $\mu$ l, la cual se centrifugó para obtener el plasma y se congeló a  $-40^\circ\text{C}$  y 15 días después se realizó el mismo procedimiento (2 muestras por cada organismo), hasta el momento del Radioinmunoanálisis para  $P_4$ .



En todas las hembras colectadas se detectaron espermatozoides móviles antes y después de la cirugía (hasta el 4 de Febrero). En los cortes histológicos se observó que el CL estaba en proceso de formación y el ensayo histoquímico demostró que presentan una intensa actividad de la enzima  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD. En relación a los FAV la actividad de esta enzima fue débil. Sin embargo, los niveles de  $P_4$  obtenidos antes y después de la cirugía no difirieron significativamente, por lo que es posible que exista un órgano secundario extraovárico capaz de producir  $P_4$ . Por lo resultados anteriormente expuestos se concluyó que los CLs no son indispensables para la retención de espermatozoides, sin embargo no se descarta la participación de la  $P_4$  en dicho evento.

## INTRODUCCIÓN

Todas las especies que existen en la tierra tienen como característica fundamental la capacidad de procrear nuevos individuos. La reproducción es el medio por el cual un organismo produce descendientes y les transmite una dotación genética en la que se hallan codificadas las directrices para el desarrollo de las características generales, morfológicas y fisiológicas de su especie, las cuales los distinguen como individuos. Así mismo permite la continuidad de la especie y es fuente de variabilidad. (Gardiner, 1978).

El sexo y la reproducción son dos procesos distintos. La reproducción involucra la creación de un nuevo organismo. El sexo involucra la combinación de genes de dos individuos diferentes. La reproducción en ausencia de sexo es característica de organismos que se reproducen asexualmente (Gardiner, 1978). La unión de dos distintos procesos como el sexo y la reproducción es la característica fundamental de la reproducción sexual y con la cual se han llevado a cabo dos importantes avances. El primero es el mecanismo de meiosis, proceso por el cual el complemento diploide del cromosoma es reducido al estado haploide. El segundo, la aparición de un mecanismo mediante el cual las dos diferentes células que participan en la reproducción (los gametos) se pueden reconocer una a otra (Gilbert, 2003).

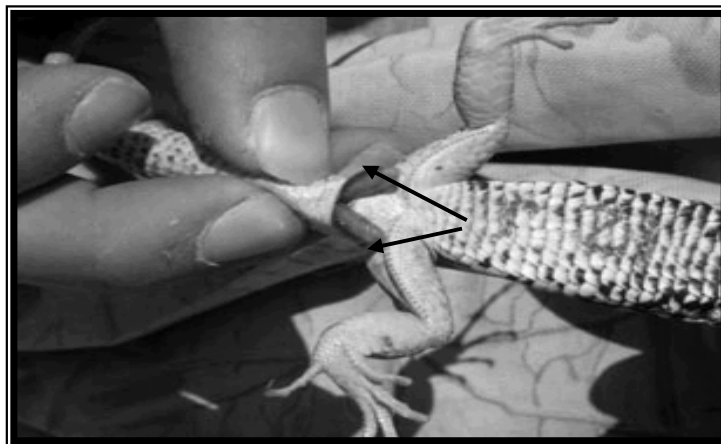
Existe otra modificación dentro de la reproducción, en donde participa una célula especializada (el ovocito) pero sin que ocurra la fecundación (Cuellar, 1970). La Partenogénesis es un tipo especial de reproducción, ya que los gametos pueden participar en esta sin la incorporación de material genético de otro individuo. Por lo que este tipo de reproducción es una variante muy particular de la reproducción asexual, pero también es considerada como sexual monogamética. En este caso el ovocito una vez formado desarrolla un nuevo organismo aunque no haya sido fecundado, los productos son diploides. Este tipo de reproducción se presenta en algunos rotíferos y en insectos como *Apis mellifera* (Gómez-Pompa, 1973). En los vertebrados también existen especies que se reproducen partenogénicamente. Un caso que ha llamado poderosamente la atención es el de la lagartija ovípara *Cnemidophorus uniparens* (Cuellar, 1970).

## Estrategias Reproductivas

Debido a la necesidad de llevar a cabo la reproducción, las diferentes especies diseñaron diversas tácticas que les permitieron superar las barreras que interfieren en el proceso reproductivo y así incrementar la oportunidad de encuentro entre los gametos de machos y hembras. La forma de superar estas barreras permitió que evolucionaran diferentes estrategias.

La fertilización interna es una estrategia reproductora que se ha desarrollado independientemente en diferentes grupos de vertebrados. Generalmente ha sido acompañada por la reducción en el número de ovocitos maduros, los cuales son liberados simultáneamente. Sin embargo, el número de espermatozoides sigue siendo alto (VanTienhoven, 1983). Esta, además es una estrategia muy eficiente que permitió a los organismos invadir nuevos hábitats. Esto implicó cambios en la conducta reproductiva y en el aparato reproductor (Jameson, 1988). Una adaptación importante en el macho para llevar a cabo la fertilización interna es el desarrollo de un órgano intromitente para la copula, cuya función es depositar los espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra. En la mayoría de los anfibios la fertilización es externa, sin embargo en las hembras de algunos urodelos se ha modificado la cloaca; de tal manera que les permite tomar el espermátforo depositado por el macho en el suelo sin que halla contacto entre ambos (Montagna, 1976).

Los reptiles han desarrollado verdaderos órganos copuladores. Las tortugas y cocodrilos, así como algunas aves y todos los mamíferos presentan un solo pene, en cambio las lagartijas, serpientes y anfisbenidos han desarrollado un par de órganos copuladores conocidos como hemipenes (Fig.1). Incluso, algunas especies de lagartijas a su vez han implementado algunas otras adaptaciones. Por ejemplo el camaleón americano (*Anolis carolinensis*) utiliza un sensor que le indica cuando extender el hemipene de forma ipsolateral a los testículos (VanTienhoven, 1983).



**Figura 1.** Hemipenes de un lacertilio,. Tomada de <http://www.gogle.com.mx>.

Algunas especies de serpientes además forman un tapón copulatorio. Este tapón es formado por secreciones del segmento sexual del riñón. Esta estrategia no solo prevé la probable salida de los espermatozoides, sino que previene e impide que otros machos inseminen a la misma hembra (VanTienhoven, 1983).

A pesar de que la fertilización interna asegura el encuentro de los gametos, existen diversas estrategias que han sido implementadas para optimizar el encuentro de ellos. Inicialmente la liberación sincrónica de gametos (sincronía entre la ovulación y la, cópula) resultó ser un mecanismo sumamente eficiente, sin embargo cuando se presentó un desfase entre la liberación del ovocito y la cópula, los organismos diseñaron otras estrategias entre las que destaca el almacenaje de espermatozoides.

En varias especies de teleósteos y anfibios, la fertilización es interna. En estas especies así como también en reptiles, aves y mamíferos los espermatozoides pueden ser almacenados en el tracto reproductor de las hembras por un período determinado de tiempo (Jameson, 1988).

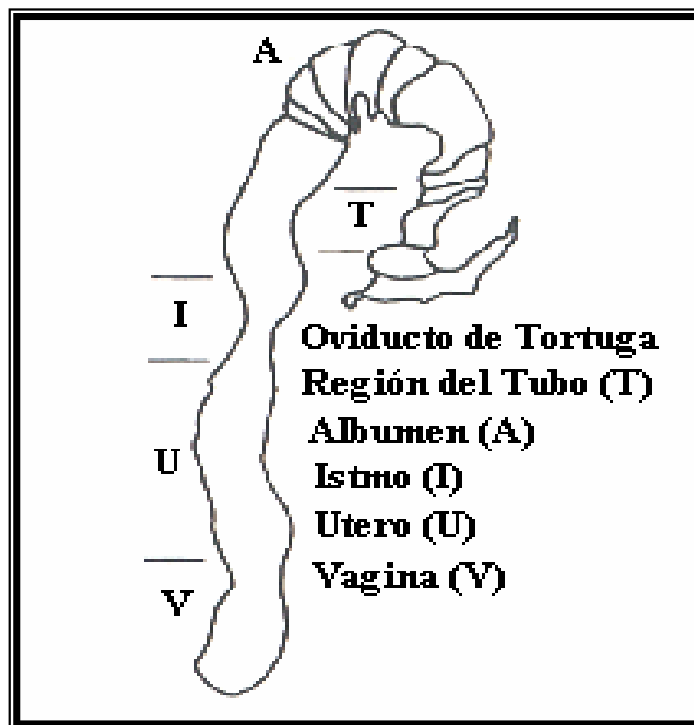
## ANTECEDENTES

La clase Reptilia incluye los Ordenes: Sphenodontida, Testudines, Crocodylia y Squamata. Los Subordenes Amphisbaenia (culebrilla ciega), Serpentes (serpientes) y Sauria (lagartijas) conforman el grupo de los escamosos (Sever, 2002). La mayoría de los reptiles incluyendo todos los cocodrilos y tortugas son ovíparos, pero algunas lagartijas y serpientes son vivíparos (Xavier, 1987).

### Almacén de espermatozoides en reptiles

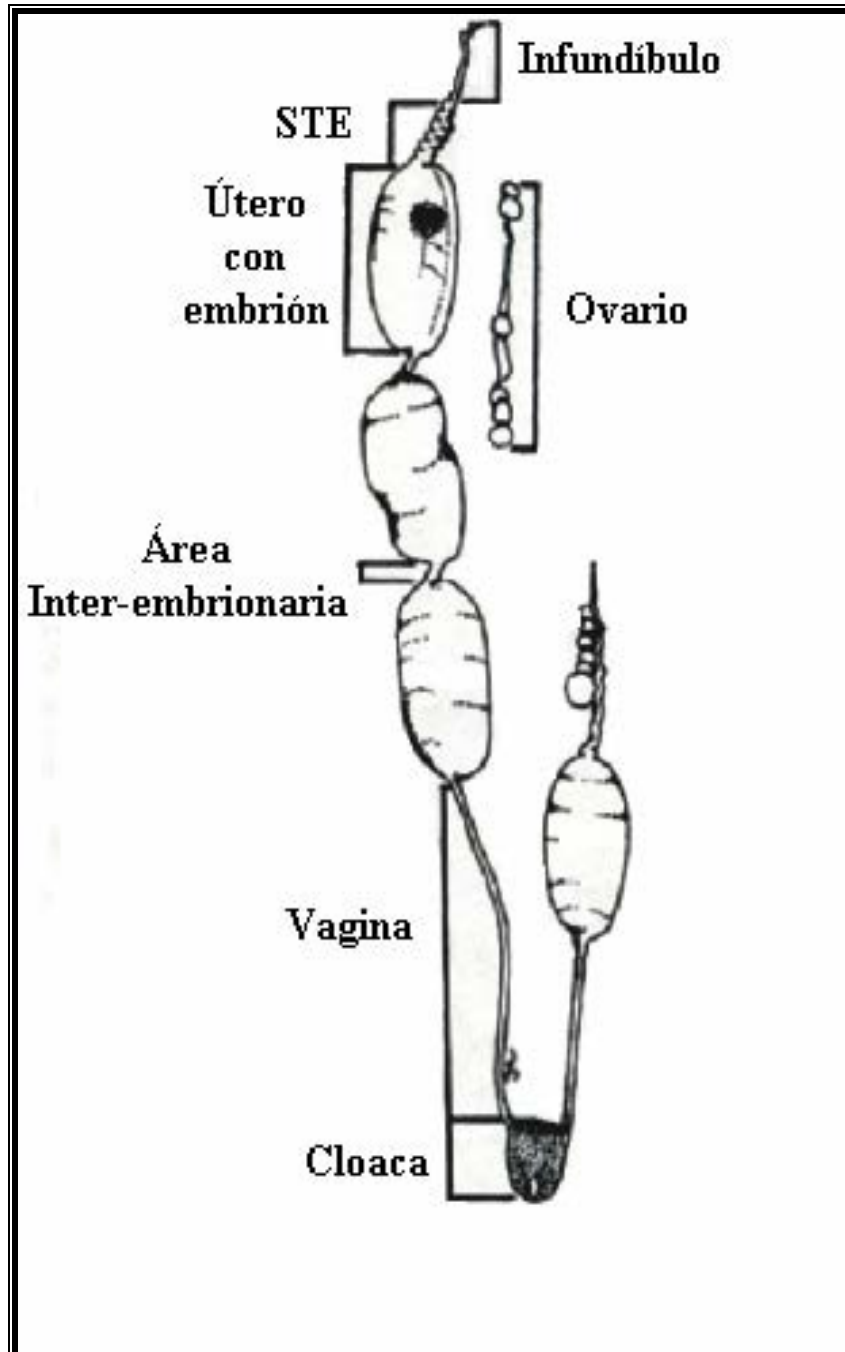
Los reptiles al igual que las hembras de otros vertebrados, almacenan los espermatozoides en alguna región del aparato reproductor (Sever, 1999).

Las tortugas tienen un área extensa en la mitad anterior del oviducto llamado tubo, en la cual se encuentra la glándula secretora del albumen (Fig.2). En la parte final de esta región algunas glándulas son utilizadas también como un sistema de túbulos especiales (STE) para el almacén de espermatozoides. El STE también ha sido reportado en la región uterina cerca a la unión útero vaginal (Sever, 2002).



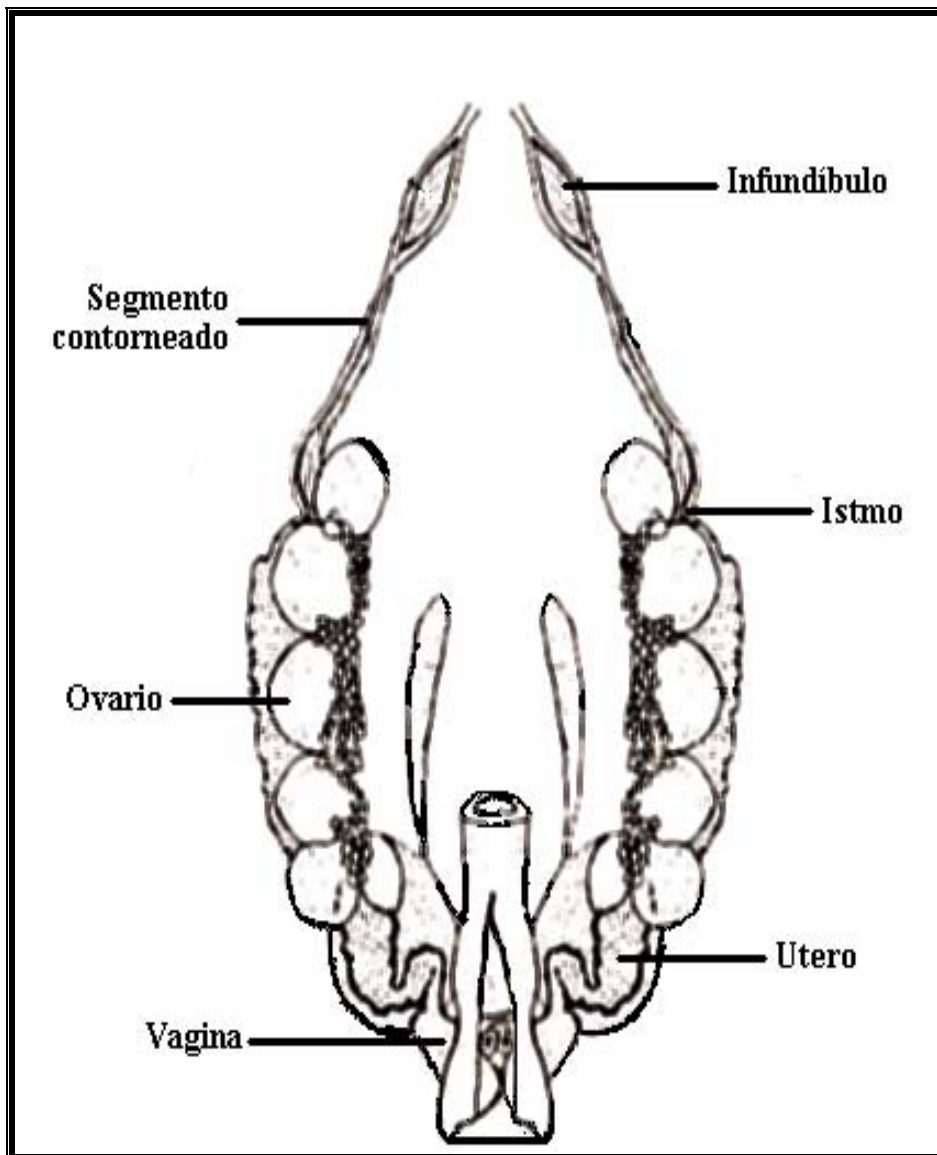
**Figura 2.** Oviducto de tortuga. Tomado y modificado de Gist y Gongdon, 1998.

En serpientes el STE para el almacén de espermatozoides se ubica en una región pequeña entre el infundíbulo y el útero llamado tubo uterino o simplemente infundíbulo anterior (Fig.3). Esta región se distingue porque carece de glándulas (Sever, 2002).



**Figura 3.** Oviducto de serpiente. Tomado y modificado de Sever, 1999.

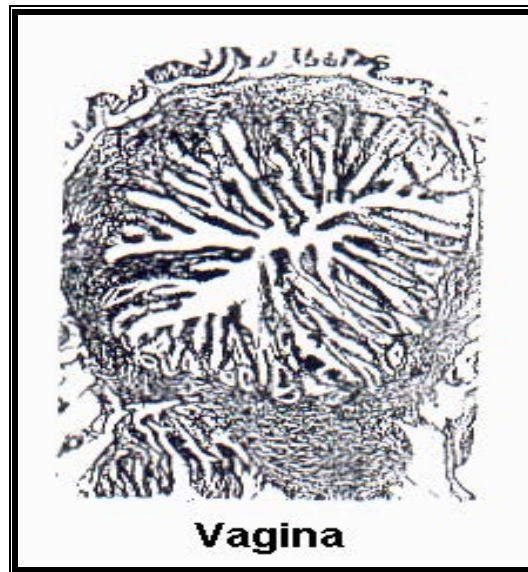
En lagartijas los espermatozoides se almacenan en un STE que se presenta fundamentalmente en la vagina (Fig.4), así como en diferentes regiones del oviducto entre las que destaca el infundíbulo (Cuellar, 1966). La vagina es la cámara principal para el almacén de espermatozoides, que además muy posiblemente podría desempeñar funciones nutritivas y protectoras de estos gametos (Adams y Cooper, 1988).



**Figura 4.** Oviducto de lagartija. Tomado y modificado de Romer, 1970.

Este STE se encuentra entre los surcos de los pliegues vaginales, como se puede observar en la Fig.5. Estos receptáculos seminales consisten de un túbulo simple o ramificado formado por una sola capa de células epiteliales, que a su vez es rodeada por otra capa de células ciliadas (Cuellar, 1966).

Los túbulos especiales para el almacén de espermatozoides no siempre son rectos (Cuellar, 1966). Tienen un rango aproximado de 13 y 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, algunos son relativamente pequeños en longitud pero al parecer alcanzan las 500  $\mu\text{m}$  (Fox, 1963).



**Figura 5.** Corte histológico de oviducto de lagartija. Tomado y modificado de Kumari et al. , 1990.



## TIEMPO DE RETENCION

El período de retención de espermatozoides en los diferentes grupos de vertebrados difiere marcadamente. En aves se observa un periodo de 8 a 117 días y el sitio de almacén es en la unión útero-vaginal. En mamíferos las estructuras especializadas parecen estar ausentes aunque el periodo de retención puede ser menor a 24 horas; sin embargo en algunos murciélagos se ha observado hasta 198 días (Birkhead y Moller 1993). En reptiles el tiempo de retención varía de algunos días a varios años, como se puede observar en la tabla 1 (Gist y Gongdon, 1998; Villagran et al. , 1992).

ESPECIE	TIEMPO DE RETENCION
<b>SERPENTES</b>	
<i>Agkistrodon contortrix</i>	11 días
<i>Leptodeira annulata</i>	6 años
<i>Acrochordas javanicus</i>	7 años
<b>SAURIA</b>	
<i>Eumeces egregius</i>	1 mes
<i>Chamaeleo hoehnelii</i>	273 días
<i>Uta stansburiana</i>	3 meses
<i>Holbrokia propinqua</i>	74 ó 78 días
<i>Sceloporus gramicus</i>	3 meses
<i>Urosaurus ornatus</i>	4 meses

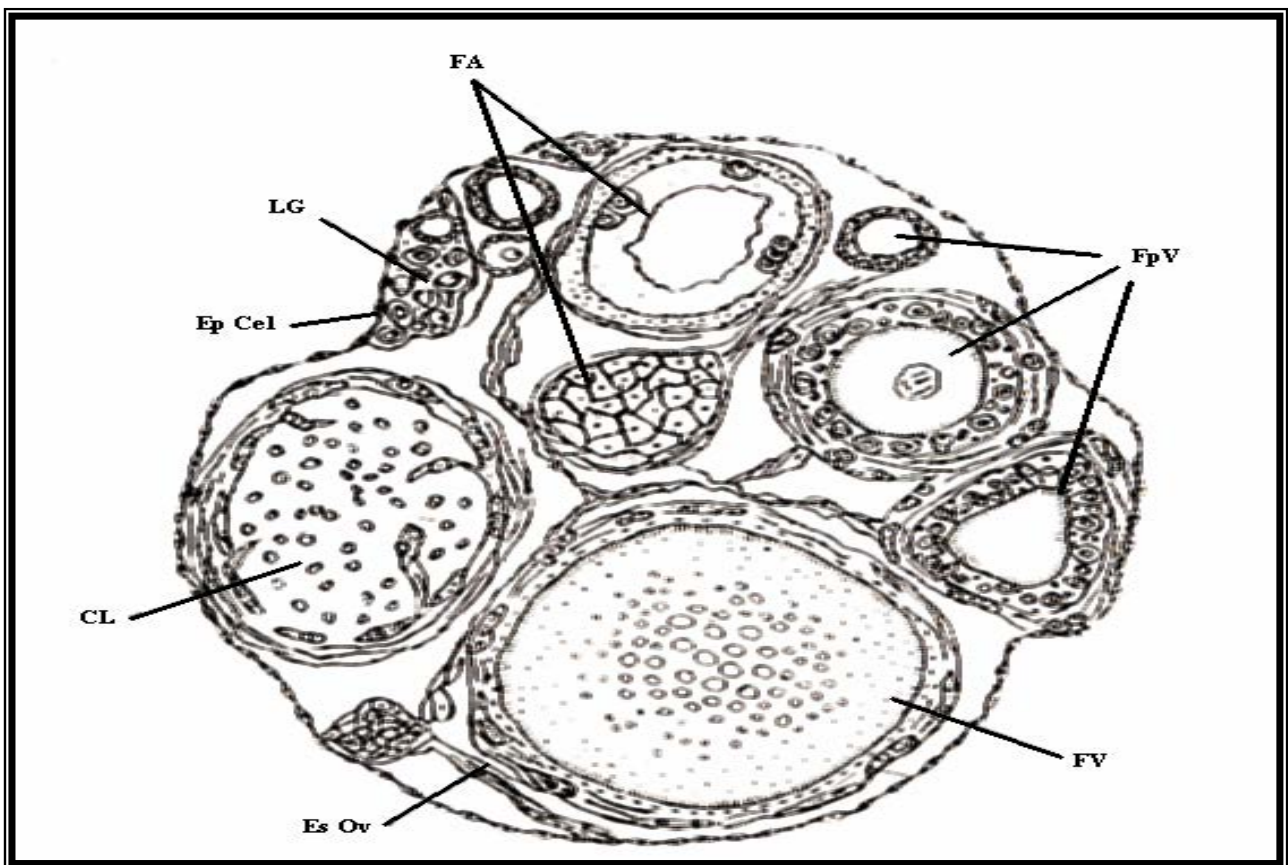
**Tabla 1.** Tiempo de retención de espermatozoides en distintos reptiles. Adams y Cooper, 1998 y Villagrán-Santa Cruz, 1992.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos que están involucrados en la retención de los espermatozoides, sin embargo es muy posible que el control este a cargo del ovario ya que regula la actividad del oviducto, útero y vagina (Martínez-Torres, 2006).

## Morfología del Ovario

Los ovarios son estructuras huecas de forma oval o alargada, están sostenidos a la pared del cuerpo por el mesovario. La cavidad central se encuentra llena de linfa, variando su composición a lo largo del año. En la corteza es posible observar folículos previtelogénicos (FPVs), folículos vitelogénicos (FVs) así como folículos atrésicos (FAs) (Fig.6). En la estación reproductora el ovario incrementa su tamaño debido a la vitelogénesis folicular. Durante la fase de gestación es posible observar la presencia de cuerpos lúteos (CLs) (Martínez-Torres et al., 2003).

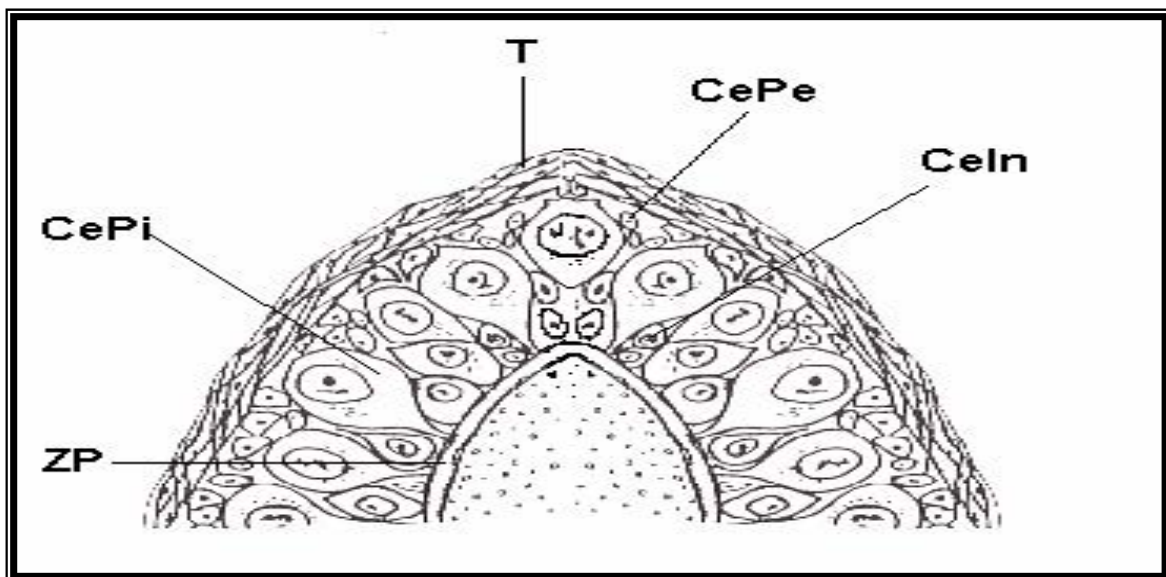
El ovario de los reptiles, al igual que en los demás vertebrados tiene dos funciones fundamentales: producir gametos y hormonas dentro de las que destacan los esteroides sexuales. Un carácter distintivo del ovario de los reptiles con respecto al de los demás amniotas, es la presencia de uno o más lechos germinales los cuales contienen ovogonias, ovocitos y folículos primordiales (Byskov, 1978)



**Figura 6.** Ovario de Lacertilio. El esquema muestra las estructuras que se pueden observar en un corte histológico. Lecho germinal (LG), Folículos Previtelogénicos (FPV), Folículos Vitelogénicos (FV), Folículos Atrésicos (FA), Cuerpo Lúteo activo (CL), Estroma Ovárico (Es Ov) y Epitelio Celómico (Ep Cel). Tomado de Martínez-Torres, 1997.

Debido a esta característica, los ovocitos crecen y maduran dentro del lecho germinal. Las ovogonias se pueden ubicar en pequeños grupos dispersos en el estroma y en la corteza se encuentran los ovocitos rodeados por un epitelio folicular, que consiste de una sola capa de células foliculares aplanadas (granulosa) (Martínez-Torres, 1997). Posteriormente el ovocito deja el lecho germinal y el epitelio folicular se observa como una bicapa que después se multiestratifica, consistiendo de tres tipos celulares: células pequeñas (Ce Pe), medianas (Ce In) y piriformes (Ce Pi) (Fig.7).

Las células piriformes presentan estrechos puentes citoplásmicos que atraviesan la zona pelúcida y se fusionan con la membrana plasmática del ovocito, además el estroma que rodea al epitelio folicular se organiza en una teca fibrosa externa y una interna más celular. Estos folículos se conocen como FPVs (Martínez-Torres, 1997).



**Figura 7.** Pared del Folículo Previtelogénico de un Lacertilio. El cual se compone de una capa acelular llamada zona pelúcida (Z P), epitelio folicular compuesto de células pequeñas (Ce Pe), células intermedias (Ce In), células piriformes (Ce Pi) y la teca (T). Tomado y modificado de Martínez-Torres, 1997.

En los FVs se inicia la formación de las plaquetas vitelinas, las cuales se van acumulando en el ovocito al mismo tiempo que las células foliculares se van aplanando cada vez más constituyendo una capa simple y monomórfica. Las capas teca se diferencian morfológicamente en teca externa (TE) muy vascularizada y teca interna (TI) que se transforma en secretora de esteroides (Martínez-Torres, 1997).

No todos los folículos alcanzan la madurez, algunos entran en un proceso degenerativo y se transforman en atrésicos. La atresia folicular ha sido definida como el conjunto de procesos mediante el cual, el folículo ovárico pierde su integridad y el ovocito no es ovulado (Byskov, 1978).

La naturaleza del proceso atrésico depende de diversos factores y varía en las diferentes especies de acuerdo a las condiciones nutricionales y fisiológicas, así como al tipo de folículo que es afectado por la atresia (Martínez-Torres, 1997). Es decir la atresia folicular se presenta en cualquier tipo de folículo, sin embargo es más frecuente en folículos con algún grado de vitelogénesis. Aunque la naturaleza de este fenómeno no se conoce con certeza, es ampliamente aceptado que la alteración en los niveles hormonales promueven la degeneración folicular (Martínez-Torres et al., 2003).

### **Cuerpo Lúteo**

El CL es un órgano endocrino transitorio que se forma a partir de las capas celulares del folículo postovulatorio. Esta glándula se presenta en las hembras gestantes de todos los grupos de vertebrados, tanto en especies ovíparas como vivíparas (Xavier, 1987).

Después de la ovulación, las células de la granulosa se hipertrofian y proliferan, el núcleo incrementa su volumen, es basófilo y presenta uno a tres nucleolos dependiendo de la especie, transformándose así en células luteales (Yaron, 1985, Martínez-Torres et al., 2003).

Al igual que en otros vertebrados, el CL de los reptiles presenta una variabilidad en cuanto a su organización morfológica (Xavier, 1987). Esto se debe fundamentalmente a la contribución de las células de la teca en la formación de células luteales, al grado de invasión de tejido conectivo tecal y a la penetración de vasos sanguíneos dentro de la masa de células luteas (Xavier, 1987; Jones, 1991).

En la mayoría de las especies las células del CL se originan únicamente de la granulosa y poseen un sistema vascular más o menos bien definido (Xavier, 1987). Sin embargo, en otras especies como *Barisia imbricata*, tanto las células de la teca interna como de la granulosa se transforman en células luteas (Martínez-Torres et al., 2003).

El tejido luteal de reptiles al igual que en otros vertebrados es esteroideogénico (Jones, 1991) y es la estructura dominante en el ovario de los vertebrados después de la ovulación (Stauffer y Duffy, 1995). Generalmente constituye el sitio principal de síntesis de P<sub>4</sub> en hembras preñadas (Guillette, 1987), este es un evento cíclico que está controlado por el eje hipotálamo-pituitaria-ovario. Su función fundamental es la de

promover la diferenciación del tracto reproductivo requerido para la gestación intrauterina (Stauffer y Duffy, 1995).

Existen fuertes semejanzas anatómicas entre el CL de reptiles y mamíferos; se ha observado en reptiles vivíparos que el CL permanece durante la preñez, de tal manera que se acepta que el CL tiene un papel endocrino en la gestación de los reptiles (Yaron, 1972), por lo que se considera que la gestación es controlada por la actividad del CL. Se ha observado que existe una correlación positiva entre la actividad luteal durante la gestación en escamosos ovíparos, mientras que es menos evidente en especies vivíparas. La desluteinización induce oviposición prematura en lagartijas ovíparas, como en *Sceloporus undulatus*, *Cnemidophorus uniparens* y *Anolis Carolinensis* (Gillette, 1990).

De igual manera estudios *in-vitro*, histoquímicos y bioquímicos han demostrado una relación positiva entre la concentración de  $P_4$  plasmática y la actividad histoquímica del CL (Gillette, 1987). Por lo que se acepta que cuando el CL presenta células grandes (12 a 18  $\mu\text{m}$ ) de citoplasma acidófilo con núcleo redondo esta secretando activamente hormonas esteroides, particularmente  $P_4$ . Cuando el tejido lúteal muestra la presencia de vacuolas en el citoplasma y el núcleo picnótico es un indicador claro que ha iniciado el proceso regresivo (luteólisis). Este evento está relacionado directamente con la disminución gradual de la producción de  $P_4$  que ocurre de acuerdo al avance del fenómeno degenerativo (Martínez-Torres, 1997).

## **Hormonas**

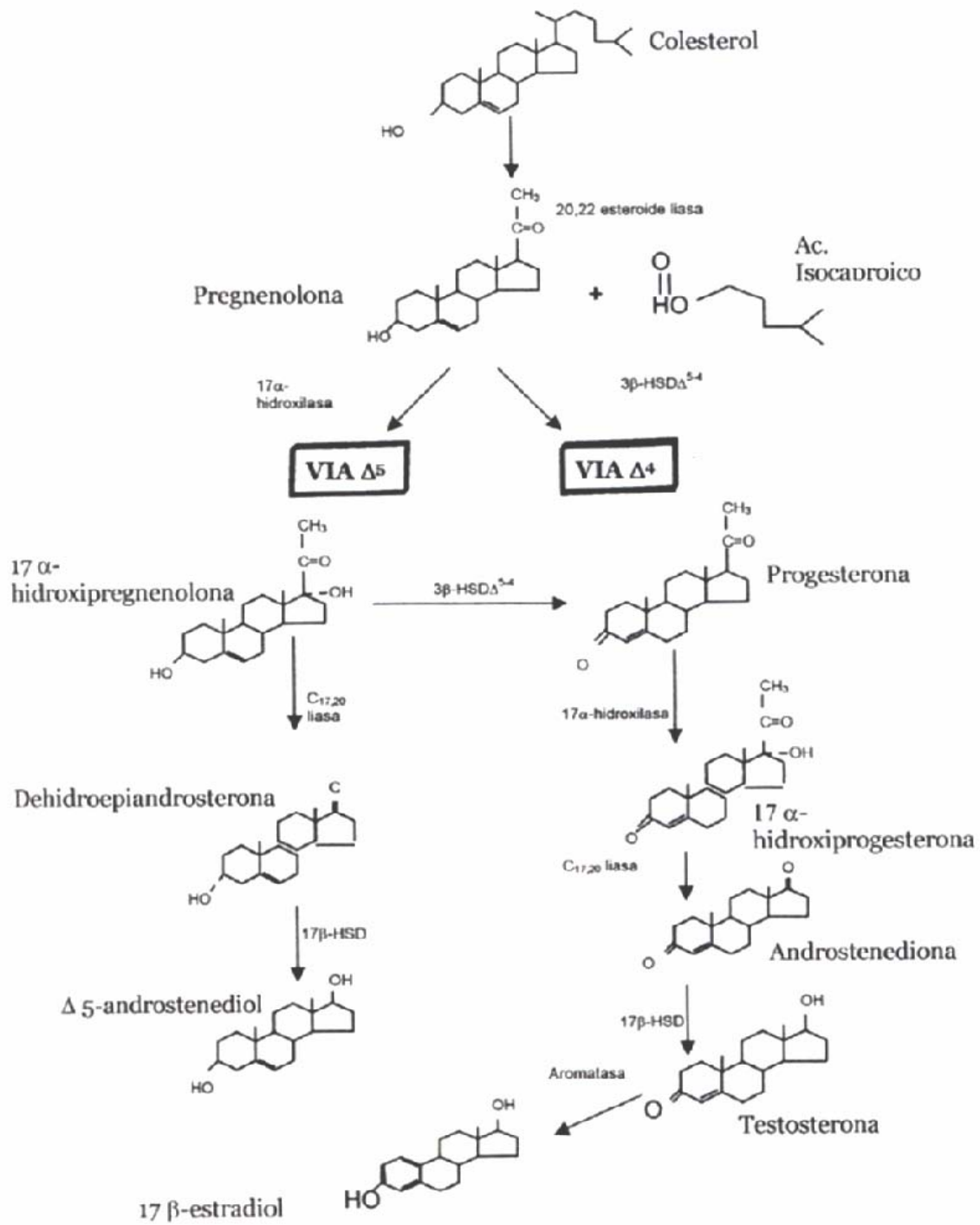
Las hormonas esteroides son reguladoras de procesos fisiológicos. Se conocen 5 grupos de estas hormonas como: A) las mineralcorticoides, las cuales retienen sodio en los túbulos renales; B) glucocorticoides, llamadas así por que movilizan carbohidratos; C) estrógenos, que inducen los caracteres sexuales secundarios de las hembras, D) progestinas, que son esenciales para la reproducción y E) andrógenos, que inducen los caracteres sexuales secundarios de los machos. Esta clase de hormonas son estructuralmente similares y se originan de forma común a partir del colesterol. Ellas se distinguen por su acción sobre uno ó más receptores específicos de hormonas esteroides (Miller, 1988).

Se sabe que la  $P_4$  es la progestina requerida para el establecimiento de la preñez (Xavier, 1987). En distintos reptiles tanto ovíparos como vivíparos han sido evaluados los niveles circulantes de  $P_4$  y se ha observado que existen diferencias notables en cuanto a la cantidad y duración de esta hormona en ambos grupos (Jones, 1991).

Es ampliamente aceptado que el incremento de  $P_4$  plasmática durante la preñez, se debe al incremento en la producción de  $P_4$  del CL. La actividad de la enzima  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -hidoxisteroide deshidrogenasa ( $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD) esta directamente relacionada con los niveles de  $P_4$  circulante (Martínez-Torres et al., 2003). La  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD convierte pregnenolona en  $P_4$  ó dehidroepiandrostenediona en androstenediona (Fig. 8) (Martínez-Torres et al., 2003).

En algunas especies vivíparas se ha reportado niveles altos de  $P_4$  después de la ovulación (Guillette, 1987). En algunas especies ocurre fundamentalmente en el primer tercio de la preñez como en *Barisia imbricata* (Martínez-Torres et al., 2003); y *Bradypodium pumilus* (Jones, 1991).

En otras especies se ha reportado que es en el segundo tercio de la gestación cuando la  $P_4$  alcanza sus niveles máximos como en *Sceloporus cyanogenys*, *Tiliqua rugosa* y *Thamnophis elegans*. Sin embargo, en otras especies como *Lacerta vivipara* los niveles más altos de esta hormona se han observado al final de la preñez (Jones, 1991).



**Figura 8.** Biosíntesis de Esteroides sexuales. Tomada de Van Tienhoven, 1983.

### Biología de *Sceloporus mucronatus*

Los reptiles de zonas templadas presentan distintos patrones de su actividad reproductora, el cual es un importante indicador en las especies como una estrategia reproductiva. Es muy común que en lagartijas ovíparas de estas regiones, en los machos y las hembras ocurra la gametogénesis durante la primavera; con el subsecuente cortejo, apareamiento y oviposición. Este patrón es dominante en especies que son ovíparas (Méndez de la Cruz, 1988).

En contraste con muchas lagartijas vivíparas (*Sceloporus jarrovi*, *S. cyanogenys*, *S. grammicus*, *S. poinsetti*, *Eumeces copei*, *Barisia imbricata*) que presentan actividad reproductiva otoñal. En estas especies la gametogénesis, cortejo y apareamiento ocurre en el otoño, la preñez durante los meses invernales y el parto en la primavera. Sin embargo, otras especies vivíparas (*Lacerta vivípara*, *Gerrhonotus coeruleus*, *Phrynosoma douglassi*, *Xantusia vigilis*) presentan actividad reproductiva en la primavera. Por otro lado también se puede observar que la actividad reproductora del macho y la hembra es asincrónica (*Sceloporus grammicus microlepidotus*, *S. formosus*), dónde la máxima actividad testicular se presenta en la primavera y la vitelogénesis y ovulación ocurre en el otoño (Méndez de la Cruz, 1988).

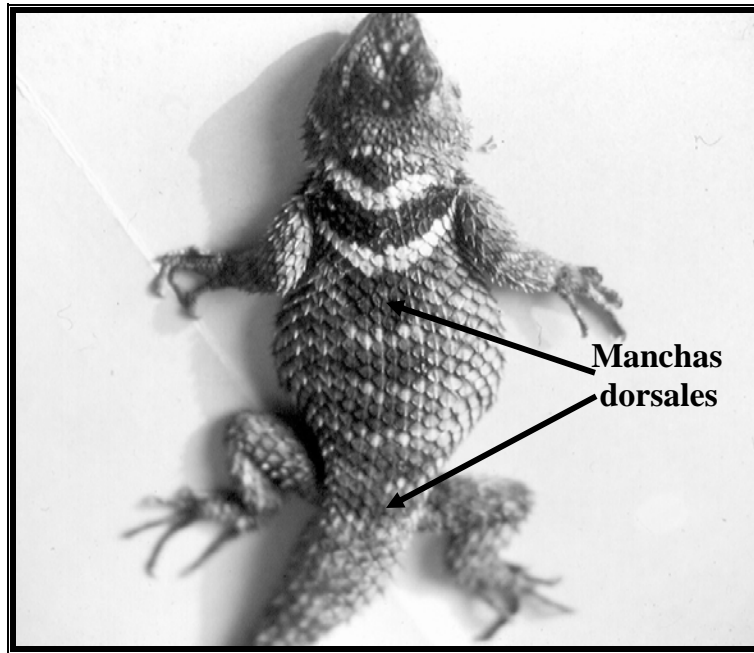
*Sceloporus mucronatus* es una lagartija vivípara de altitudes elevadas, pertenece a la familia Phrynosomatidae del suborden Lacertidae. Es nativa de regiones templadas por lo que su distribución ocurre a lo largo del eje Neovolcánico transversal, en los estados de Veracruz, Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala y Norte de Puebla (Alvarez, 1973).

Los machos inician la recrudescencia testicular en el verano, la máxima actividad gonádica se observa en el otoño y durante el invierno ocurre la regresión. Las hembras inician su actividad gonadal de Agosto a Septiembre y la máxima actividad folicular se presenta de Octubre a Noviembre. La ovulación ocurre a fines de Noviembre y principios de Diciembre (Martínez-Torres et.al, 2006). El desarrollo embrionario dura 7 meses (Méndez de la Cruz, 1983). En los embriones que se encuentran en el último estadio (40) se puede observar la coloración típica de la especie (Alvarez, 1973).

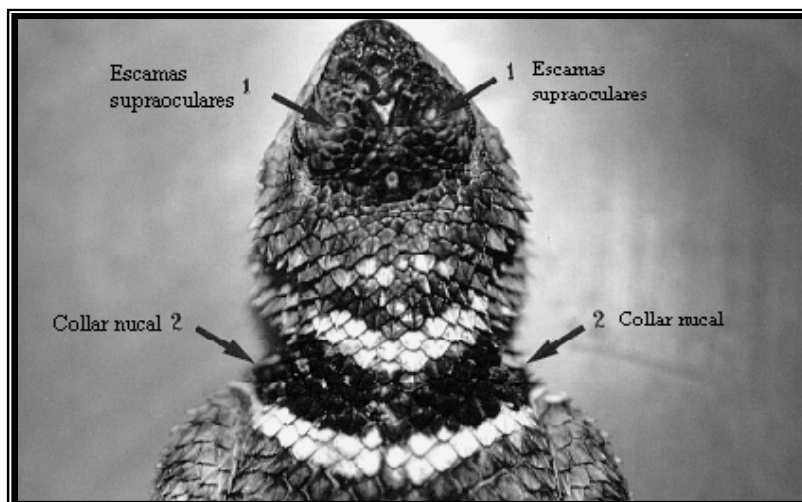
Entre sus características más importantes podemos mencionar que el número de escamas que rodea el cuerpo va de 34 a 38. Estas son quilladas y mucronadas. En el dorso se observan 5 manchas separadas unas de otras (Fig.9). Las escamas de la cabeza son lisas sin embargo, el rasgo distintivo de esta especie son las escamas supraoculares las cuales están alineadas en dos series (Fig.10).



Además de la presencia de un collar nual negro de cuatro escamas de ancho (Fig.10), que es continuo alrededor de la garganta. El collar está bordeado a cada lado por una banda clara de dos escamas de ancho (Smith, 1939). Los machos adultos, presentan coloración azul cobalto en el abdomen y en la parte anterior del pliegue gular (Smith, 1939).



**Figura 9.** En la imagen se puede observar una de sus características más relevantes como son las 5 manchas dorsales separadas cada una por una banda clara.



**Figura 10.** Ejemplar de *Sceloporus mucronatus* en el cual se pueden observar las escamas supraoculares (1) y el collar nual negro (2).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CL es la mayor fuente de  $P_4$  durante la preñez (Jones, 1982). Los niveles de esta hormona se elevan durante la gestación, lo que sugiere que tiene un papel muy importante en los eventos relacionados con la reproducción.

Por otro lado se ha observado que hembras de muchas especies de vertebrados poseen la capacidad de almacenar espermatozoides. Sin embargo, se desconocen él o los mecanismos endocrinos que permiten a los espermatozoides ser retenidos.

Martínez-Torres (2006) ha observado que en *Sceloporus mucronatus* el CL es la fuente más importante de  $P_4$ . Sin embargo, Villagrán-Santa Cruz (1989) sugiere que los FAV son capaces de secretar esta hormona. Por lo que es importante determinar si estas estructuras participan en los eventos relacionados con la preñez.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la Lutectomía y la extirpación de los Folículos Atrésicos Vitelogénicos al inicio de la preñez sobre los niveles de Progesterona plasmática y sobre la retención de espermatozoides.

### Objetivos Particulares

1. Determinar los niveles de progesterona en plasma, antes y después de la lutectomía y de la extirpación de los folículos atrésicos vitelogénicos.
2. Detectar la actividad histoquímica de la  $\Delta^{5-4}$   $3\beta$ -HSD en cuerpo lúteo y en folículos atrésicos vitelogénicos.
3. Determinar el efecto de la lutectomía sobre el almacenaje de espermatozoides.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I) Trabajo de campo

Se colectaron 6 hembras adultas de *Sceloporus mucronatus* poco tiempo después de la temporada de apareamiento. La colecta se realizó en Noviembre de 1998, en el poblado de San Miguel de Allende Municipio de Tepeapulco del Estado de Hidalgo (19° 52' Norte, 98° 24' Oeste).

### II) Trabajo de Laboratorio

Los organismos fueron transportados ese mismo día al Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Unidad de Morfofisiología (UMF) de la FES Iztacala, se marcaron mediante ectomización de falanges, se registró la longitud hocico-cloaca (LHC) ( $78.42 \pm 9.23$  mm) y el peso corporal ( $21.54 \pm 7.49$  g).

- Detección de espermatozoides

Al día siguiente de la colecta se realizaron lavados cloacales de todos los organismos para determinar la presencia de espermatozoides en la vagina. Se utilizó una pipeta pasteur con solución salina al 7% (Guillette, 1982), la punta de la pipeta fue introducida por la cloaca aproximadamente 5mm y se dirigió hacia la vagina bombeando de 3 a 4 ocasiones 0.5 ml de la solución. Se recuperó el líquido y se colocó en un portaobjetos. Para determinar la presencia de espermatozoides se hicieron observaciones en el microscopio óptico con objetivos de 10x y 40x. A partir de ese día los lavados cloacales fueron periódicos (cada 15 días). La ovulación se detectó por medio de la palpación abdominal. También se realizaron cortes histológicos de vagina para confirmar la presencia de espermatozoides en caso de que el organismo muriera.

- Trabajo experimental

Los organismos fueron sometidos a lutectomía bilateral la cual fue practicada de 3 a 6 días después de la detección de la ovulación. Los organismos fueron anestesiados por vía intracardiaca con pentobarbital sódico (6.3 mg/ml, 10  $\mu$ l/ 25 g. de peso) (Martínez-Torres et.al, 2006).

Se realizó una pequeña incisión en el lado derecho del abdomen para extirpar todos los CLs y FAVs de cada ovario. Los CLs y FAVs obtenidos se fijaron en formol amortiguado al 10% para posteriormente procesarlos según la técnica histológica de rutina cuyos cortes fueron de 7 $\mu$ m (Luna, 1968) excepto un CL y un FAV que fueron incluidos de manera independiente en Tissue-tek (Sakura Finetechnical Co.,Ltd, Tokio 103 Japan) y se congelaron inmediatamente en una mezcla de acetona-CO<sup>2</sup> sólido y se almacenaron a -40° C para posteriormente realizar el ensayo histoquímico (cortes de 10  $\mu$ m) y determinar la actividad de la  $\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ -HSD (Levy et al., 1959).

Antes de la cirugía se tomó una alícuota de sangre de aproximadamente 250  $\mu$ l mediante punción cardíaca con jeringa insulínica. La muestra se depositó en un tubo eppendorf con anticoagulante (EDTA disódico, 10  $\mu$ l) y se centrifugó durante 30 segundos a 10, 000 rpm para obtener el plasma el cual se decantó y se almaceno a -40° C. Ocho días después de la cirugía se obtuvo una alícuota adicional del mismo volumen. Una vez recuperado el organismo de la anestesia fue depositado en un terrario y alimentado con larvas de tenebrios y agua *ad libitum*, aproximadamente una o dos veces por semana durante todo el trabajo experimental. Este procedimiento se realizó a cada uno de los organismos.

Los plasmas obtenidos fueron empleados para determinar la concentración de P<sub>4</sub> mediante la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA) por el método de fase sólida.

- Análisis Estadístico

Los datos de los niveles de P<sub>4</sub> fueron analizados mediante una prueba de T pareada, utilizando un nivel de significancia de 0.05.

## RESULTADOS

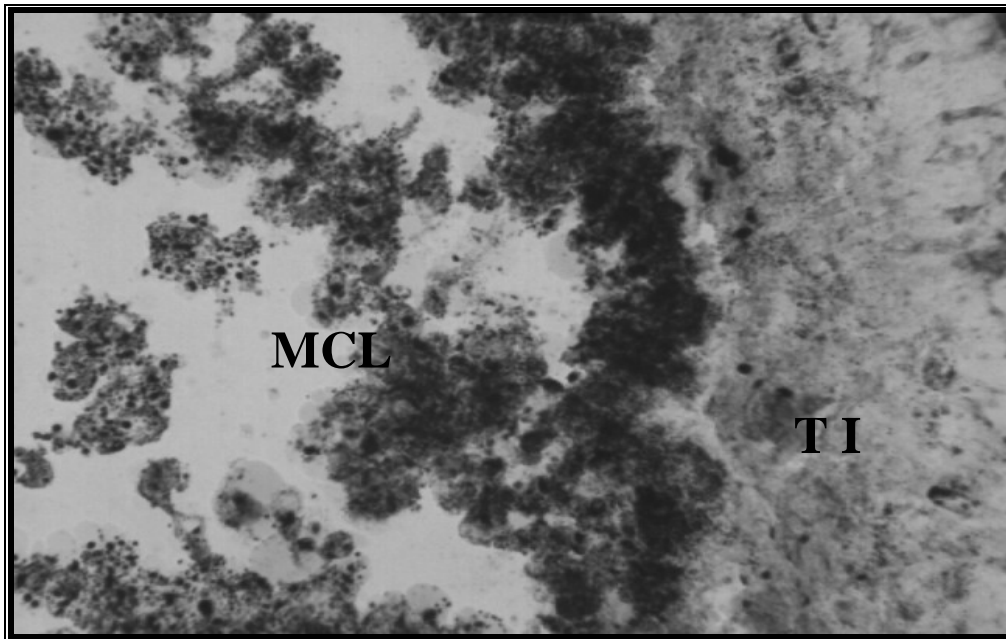
Las hembras de *Sceloporus mucronatus* inician su preñez a principios de Diciembre, la lutectomía se practicó durante el inicio de la gestación. No se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de  $P_4$  antes y después del tratamiento. Estos datos indican que la extirpación de CLs y FAVs no afectan los niveles circulantes de dicha hormona, como se puede observar en la siguiente tabla .

### Prueba de t Pareada

N	NIVELES PLASMÁTICOS DE $P_4$ ANTES DE LA LUTECTOMÍA	NIVELES PLASMÁTICOS DE $P_4$ DESPUÉS DE LA LUTECTOMÍA	VALOR DE T EXPERIMENTAL
6	0.38±0.21	0.44±0.26	-0.877, P >0.05

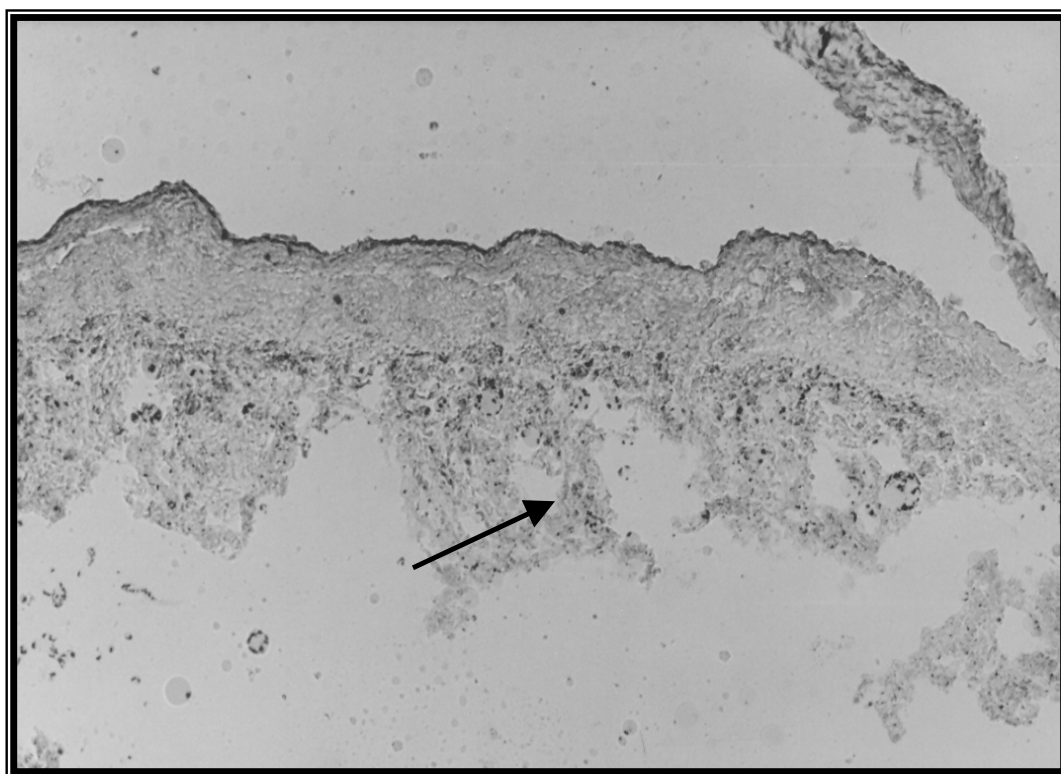
**Tabla 2.** Niveles de Progesterona en *Sceloporus mucronatus*.

La actividad de la  $\Delta^{5-4}$   $3\beta$ -HSD en los CLs obtenidos fue positiva y se presentó fundamentalmente en la MCL. También se observó precipitación de gránulos de formazán en algunas áreas de la TI Como se puede observar en la siguiente imagen (Fig. 11).



**Figura 11.** Corte en crióstato (10  $\mu$ m de grosor) de un CL, observada al microscopio con objetivo de 40x donde se muestra la actividad de la  $\Delta^{5-4}$   $3\beta$ -HSD en la Masa de Células Luteas (MCL) y la Teca Interna (TI).

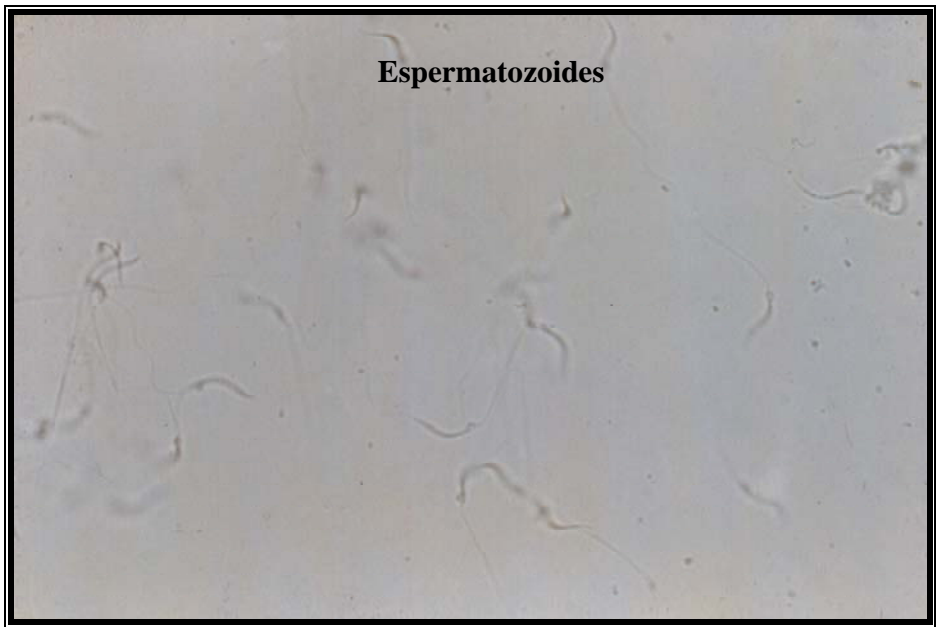
Para los FAVs, la actividad de la  $\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ -HSD fue débil ya que solo se observaron puntos dispersos de gránulos de formazán. Como se puede observar en el siguiente corte de un FAV (Fig. 12).



**Figura 12.** Corte en crióstato (10  $\mu$ m) de un FAV donde se muestra la actividad de la  $\Delta^{5-4}$  3 $\beta$ -HSD. (objetivo de 40x)

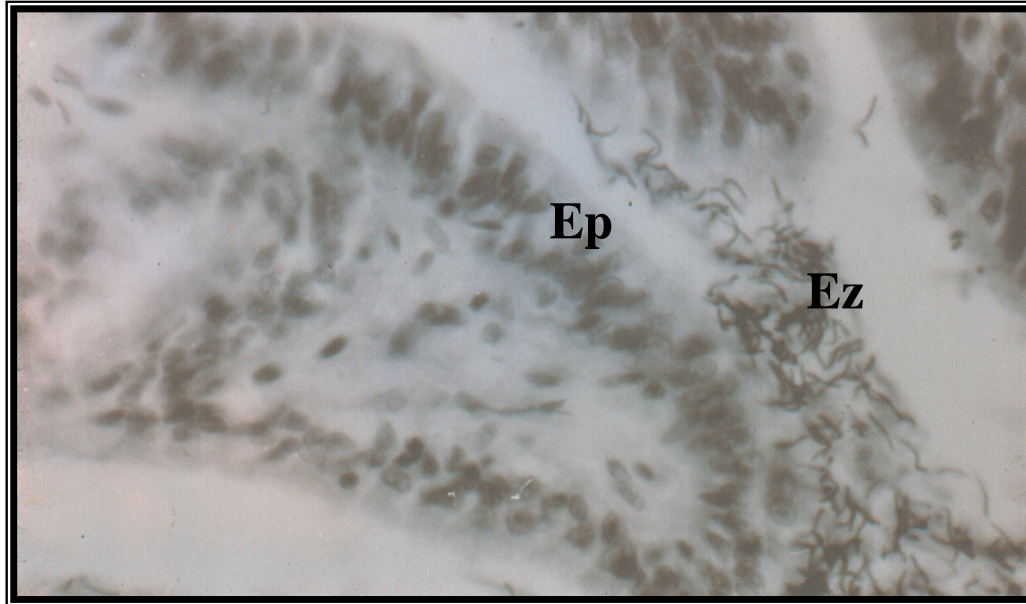
Se encontró que las hembras de *Sceloporus mucronatus* pueden almacenar espermatozoides, los cuales se observaron al realizar los lavados vaginales desde un día después de la colecta en los organismos y durante 3 meses, hasta el último lavado vaginal que se realizó (Tabla 3).

Los espermatozoides de *Sceloporus mucronatus* son largos, la cabeza tiene forma de jabalina. En los primeros lavados vaginales se observó que los espermatozoides eran abundantes y presentaban movilidad (Fig.13). Sin embargo, su abundancia fue disminuyendo gradualmente con el transcurso de la realización de los lavados y al mismo tiempo se detectaron espermatozoides inmóviles e incluso algunos incompletos, pues solo se observaron cabezas.



**Figura 13.** Fotografía de lavado vaginal (objetivo de 40x.)

De igual forma en los cortes histológicos de la vagina, se observó la presencia de espermatozoides en los túbulos especiales, los cuales están formados por los pliegues vaginales que presentan un epitelio simple columnar con células ciliadas y no ciliadas (Fig.14). Se observó que los espermatozoides se organizan en grupos, además de que tienen la característica de dirigir la cabeza hacia el epitelio de los túbulos.



**Figura 14.** Corte histológico de vagina (7  $\mu$ m) donde se observan, el epitelio (Ep) y la presencia de espermatozoides (Ez) en los túbulos especiales para su almacén. (objetivo de 100x)

Se determinó que las hembras lutectomizadas presentan espermatozoides por un período de 69 días como se puede observar en la tabla 3.

COLECTA	PRIMER LAVADO CLOACAL CON PRESENCIA DE ESPERMA	ULTIMO LAVADO CLOACAL CON PRESENCIA DE ESPERMA	TIEMPO DE ALMACEN DE ESPERMA (DÍAS)
26/Nov/98	Noviembre 27	Febrero 4	69

**Tabla 3.** Tiempo de retención de espermatozoides en hembras lutectomizadas de *Sceloporus mucronatus*.



## DISCUSIÓN

Numerosos estudios en reptiles, revelan que el CL tiene capacidad esteroideogénica y que es el principal productor de  $P_4$  durante la preñez. También se ha encontrado que existe una estrecha relación entre el aspecto histológico de CL y la actividad de la enzima  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD y los niveles de  $P_4$  en plasma (Xavier, 1987).

Se ha observado que en algunas especies de lagartijas y serpientes vivíparas, la  $P_4$  plasmática empieza a incrementarse durante la vitelogénesis sin embargo, los mayores niveles de esta hormona se presentan después de la ovulación, como en *Chamaeleo pumilis* (Xavier, 1987), *Bradypodion pumilum* (Jones, 1991). En cambio, en otros organismos se puede ver una mayor concentración de esta hormona durante la mitad de la gestación, como en *Sceloporus cyanogenys*, *Nerodia sipedon*, *Tamnophis elegans* (Xavier, 1987) y *Tiliqua rugosa* (Jones, 1991).

Es importante hacer notar que la extirpación de los CLs provoca efectos diferentes de acuerdo a la especie y al momento de la gestación en que se aplique el tratamiento. En *Mabuya carinata* y *Chalcides ocellatus* la lutectomía no causa efecto alguno durante la gestación (Guillette, 1987). En cambio en *Thamnophis elegans* la desluteinización al inicio de la gestación, no interfiere con el desarrollo embrionario pero se ha observado que retrasa el parto. Adicionalmente, la lutectomía en esta especie también deprime la concentración de  $P_4$  en el plasma a niveles no detectables, cuando se mide 8 días después del tratamiento (Highfill y Mead, 1975). Un tratamiento similar en *Sceloporus cyanogenys* causa reabsorción embrionaria, demora en el parto y parto retardado (expulsión de embriones a término que nacen muertos), así como también una disminución de los niveles de  $P_4$  (Jones, 1982 y Guillette, 1987). Sin embargo, en *Tiliqua rugosa* la desluteinización no causa efecto sobre los niveles de  $P_4$  plasmática (Guillette y Fox, 1985). Los resultados que se obtuvieron en *Sceloporus mucronatus* muestran que la lutectomía al inicio de la preñez, no interrumpe el desarrollo embrionario y tampoco altera los niveles de  $P_4$ , ya que no se observaron diferencias significativas en la concentración plasmática de esta hormona antes y después del tratamiento. Estos datos sugieren que existe una fuente extraovárica de  $P_4$ , capaz de suplir al CL. Algunos autores han especulado que la placenta corioalantoidea, la glándula adrenal o los FAVs, pueden ser una fuente extraluteal de  $P_4$  durante la preñez (Jones, 1991).

En *Sceloporus jarrovi*, los niveles de  $P_4$  son muy bajos al inicio de la gestación, cuando el CL se encuentra activo. Sin embargo, los niveles de esta hormona se incrementan cuando ya se ha formado la placenta corioalantoidea y el CL ha sufrido su regresión (Jones, 1982, 1991). Estos datos sugieren que la placenta corioalantoidea puede ser una fuente importante de  $P_4$  una vez que el CL ha iniciado su regresión. Sin embargo, en *Sceloporus mucronatus* la participación de la placenta corioalantoidea en la

producción de  $P_4$  queda descartada porque ésta se forma después de la etapa 30 de desarrollo embrionario (2ª mitad de la gestación) y este trabajo se realizó en la primera etapa de la gestación. De acuerdo a Villagrán-Santa Cruz (1989), en esta etapa los embriones se encuentran por debajo del estadio 28 de desarrollo.

Otros autores (revisar Jones, 1991) sugieren que la glándula adrenal produce  $P_4$  y que podría suplir la ausencia del CL. En *Tiliqua rugosa* se ha observado que la desluteinización tiene un pequeño efecto en la concentración de  $P_4$  plasmática. En esta especie la glándula adrenal es capaz de producir cantidades significativas de  $P_4$  y puede ser la principal fuente de ésta hormona, debido a que la síntesis de corticosterona (principal corticoesteroide adrenal en reptiles) requiere de la síntesis de  $P_4$  (Guillette y Fox, 1985). Para *Anolis carolinensis* se han observado evidencias indirectas de que existen fuentes extraováricas de  $P_4$  como la glándula adrenal. En esta especie la desluteinización no provoca ninguna alteración en los niveles de  $P_4$  durante los primeros 2 días, sin embargo a las 48 horas hay una caída significativa en los niveles de ésta hormona. Para explicar este fenómeno se ha sugerido que el estrés quirúrgico provoca hiperactividad de la glándula adrenal y que durante los primeros 2 días está liberando grandes cantidades de  $P_4$ .

En éste trabajo observamos que la presencia del CL no es indispensable para mantener los niveles de  $P_4$ , en *Sceloporus mucronatus*. De acuerdo a Martínez-Torres (2006) y Villagrán-Santa Cruz (1989), el CL de ésta especie se encuentra activo durante el primer tercio de la gestación, lo que implica que en los siguientes dos tercios el CL se encuentra en franca luteólisis. Villagrán-Santa Cruz sugiere que en éste tiempo los FAVs podrían jugar un papel importante en la gestación y participar en la producción de  $P_4$ . Sin embargo, Martínez-Torres y col. (2006) observaron que los FAVs no presentan el aspecto típico de una glándula secretora de esteroides (citoplasma acidófilo, núcleo vesicular con nucleolos). En éste estudio se observó que los FAVs de *Sceloporus mucronatus* presentan escasa actividad de la  $\Delta^{5-4}3\beta$ -HSD comparada con la de los CLs.

Además, Martínez-Torres et al. (2006) establecieron que la actividad de la  $\Delta^{5-4}3\beta$ -HSD en los FAVs de *Sceloporus mucronatus*, es casi nula y no varía a lo largo de la preñez. Este conjunto de observaciones sugieren que en *Sceloporus mucronatus* la glándula adrenal puede aportar la cantidad de  $P_4$  necesaria para mantener la preñez.

Por otro lado se ha sugerido que la  $P_4$  luteal, puede tener algunos posibles funciones endócrinas, entre los que se incluye la estimulación de la región posterior del oviducto para la retención de espermatozoides (Villagrán-Santa Cruz, 1989). Los sitios de almacén de espermatozoides presentan un arreglo similar reportado en diversas especies (*Hobrokia propinqua*, Adams y Cooper, 1988); esto sugiere la existencia de un mecanismo común. Es posible que exista la liberación de algún mensajero y/o la secreción de algún nutriente que induzca la orientación de los espermatozoides para ser

alimentados, o bien como refugio fisiológico que implique la reducción de la actividad de los mismos (Adams y Cooper, 1988). También, el permitir la sobrevivencia por tiempos largos sugiere que el período de almacenaje sea indispensable para la maduración de los espermatozoides (Villagrán-Santa Cruz, 1989).

En *Anolis carolinensis* se ha reportado que las cabezas de los espermatozoides están orientados hacia el epitelio de los túbulos, sin embargo no tienen contacto directo con las células epiteliales (Adams y Cooper, 1988). Los espermatozoides de *Eumeces egregius* presentan un arreglo hacia los pliegues vaginales y de vez en cuando penetran las células epiteliales. En *Tamnophis sirtalis parietalis* sus espermatozoides están ordenados de manera paralela y las cabezas se encuentran entre los surcos vaginales, las cuales tienen contacto con las células epiteliales (Adams y Cooper, 1988). En este trabajo se observó que los espermatozoides de *S. mucronatus* presentan un arreglo similar al de *Anolis carolinensis*, *Eumeces egregius* y *Tamnophis sirtalis parietalis*, cuyas cabezas están orientadas hacia el epitelio vaginal y en grupos. Estas observaciones respaldan la idea de que el epitelio de los túbulos especiales liberan sustancias que participan en la orientación de los espermatozoides, ya sea para nutrirlos o para que adquieran una organización que les permita sobrevivir mientras están en estos sitios. A pesar de que el almacén de espermatozoides es una estrategia ampliamente utilizada por los reptiles escamosos con ciclos reproductores asincrónicos a la fecha no existen trabajos encaminados a esclarecer el mecanismo que permita la retención de espermatozoides en este grupo de vertebrados ; únicamente existen investigaciones que reportan el tiempo en que los espermatozoides son retenidos, así como la morfología de los STE en dónde es almacenado. Es muy posible que las hormonas provenientes del ovario regulen esta función, sin embargo al extirpar los CLs, se detectó que los espermatozoides de *Sceloporus mucronatus* permanecían almacenados en la vagina. Esto descarta la participación de el CL en dicho evento, pero no se anula la posibilidad de que  $P_4$  pueda estar relacionada con la retención de espermatozoides, debido ha que los niveles de  $P_4$  no disminuyeron después de la lutectomía.

Es necesario llevar a cabo más investigaciones que permitan entender como se lleva a cabo este fenómeno.

## CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos concluimos que la lutectomia no afecta los niveles de  $P_4$  plasmática, así como también consideramos que la participación del CL en la retención de espermatozoides no es importante. Sin embargo, no descartamos el papel de la  $P_4$  para este evento, debido a que los niveles de ésta hormona permanecieron estables después de la extirpación de los CLs y los FAVs. Esta última observación sugiere que en *Sceloporus mucronatus* existe una fuente extraovárica de  $P_4$  y que muy probablemente es la glándula adrenal.

## APÉNDICE

### **TÉCNICA HISTOLÓGICA DE RUTINA Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (Luna, 1968).**

Después de la obtención del tejido y previamente fijado en formol amortiguado, se colocó en un baño de agua corriente durante 24 hrs. para eliminar el exceso de formol. Posteriormente se procedió con la deshidratación del tejido en un gradiente de alcohol, desde etanol al 70% hasta alcohol absoluto (2 hrs. en cada uno, haciendo cambios de alcohol absoluto). Se prosiguió con el aclaramiento de las muestras, pasándolas inicialmente por una mezcla de xilol-alcohol (durante 30 min) y dos cambios de xilol absoluto (20 min. c/u). En seguida el tejido se impregnó en parafina, iniciando con una mezcla de xilol-parafina (15 min) y dos baños de parafina absoluta (2 hrs c/u con punto de fusión de 58-60° C), finalmente se incluyó. Se realizaron cortes de 7µm de grosor en un microtomo rotario 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 desde absoluto hasta etanol al 70% y finalmente en agua destilada. Se colocaron en Hematoxilina de Harris por 7 min. y se lavaron en un baño rápido de agua corriente. Se dieron 2 baños rápidos en agua amoniacal, se diferenciaron en alcohol ácido y se colocaron en Eosina alcohólica durante 1 min. Posteriormente se deshidrataron en alcoholes graduales, desde alcohol al 90% hasta alcohol absoluto y finalmente se montaron con resina sintética.

### **TÉCNICA DE RADIOINMUNOANÁLISIS 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 fijos en la pared de polipropileno de los tubos suministrados en el propio estuche. Con lo cual nos permite medir la cantidad de P<sub>4</sub> de la muestra por medio de un contador de partículas gama.

Para realizar el procedimiento se tomaron 50 µl de la muestra y 50 µl 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 vórtex y se incubó a 37° C durante 1 hr. El sobrenadante se decantó y se midió en un contador de partículas gama.

Con los primeros 7 tubos se estableció la curva de calibración, ya que el estuche proporciona muestras estándares con concentraciones conocidas. Cabe destacar que se intercalaron muestras 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.

### **TÉCNICA HISTOQUÍMICA PARA DETECTAR LA ACTIVIDAD DE LA $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD**

Esta técnica se realizó de acuerdo a Levy y col. (1959), la cual consiste en preparar el medio de incubación disolviendo 40 mg de NAD (Nicotin Adenin Dinucleótido) en 20 ml. de amortiguador de fosfatos con pH de 7.4. Se disuelven aparte 20 mg de NBT (Azul Nitro de Tetrazolio) en 20 ml del mismo amortiguador. Ambas soluciones se mezclan, 20 ml se utilizan como control y a los otros 20 ml se les agrega 2 mg de DHEA (Dehidroepiandrotenediona) previamente disueltos en 0.5 ml de Dimetil Formamida, como sustrato para detectar la actividad de la  $\Delta^{5-4} 3\beta$ -HSD.

Los cortes obtenidos del criostato son incubados en el medio a 37° C por 1 h, posteriormente se lavan en agua destilada y se fijan en formol amortiguado al 10% durante 15 min; finalmente se montan en gelatina glicerinada.

## REFERENCIAS

- ❖ Adams, C. S.; y Cooper Jr. (1988). Oviductal morphology and sperm storage in the keeled earless lizard, *Holbrookia propinqua*. *Herpetologica* 44(2):190-197.
- ❖ Alvarez, T.; y Huerta, P. (1973). Notas sobre *Sceloporus mucronatus* (Reptilia: Iguanidae) en México. *Anuario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México* 20:177-184.
- ❖ Birkhead, T.R.; y Moller, A.P. (1993). Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:295-311.
- ❖ Byskov, A.G. (1978). Follicular atresia, pp. 533-562 , en *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution*. R.E. Jones (Ed.).Plenum Press, New York.
- ❖ Cuellar, O. (1966). Oviducal anatomy and sperm storage structures in lizards. *Journal Morphology* 130:129-136.
- ❖ Cuellar, O. (1970). Egg transport in lizards. *Journal Morphology* 130:129-136.
- ❖ Fox, W. (1963). Special tubules for sperm storage in female lizards. *Nature* 4897 (198):500-501.
- ❖ Gilbert, S.F. (2003). *Developmental Biology*. 7<sup>a</sup> ed. . Sinauer Associates, Inc., Publishers sunderland, Massachusetts pp. 32-33.
- ❖ Gist, D.H.; y Gongdon, J.D. (1998). Oviductal sperm storage as a reproductive tactic of turtles. *The Journal of Experimental Zoology* 282:526-534.
- ❖ Gómez-Pompa, A.; A. Barrera; J.M. Gutiérrez; y G. Halffter. (1973). *Biología: unidad , diversidad y continuidad de los seres vivos*. 2<sup>a</sup> ed. . C.E.C.S.A. pp. 620.
- ❖ Guillette, L.J. (1982). A Physiological (Ringer's) solution for anoline lizard. *Herpetologica Review* 13:37-38.
- ❖ Guillette, L.J. y Fox, S.L. (1985). Effect of deluteinization on plasma progesterone concentration and gestation in the lizard, *Anolis carolinensis*. *General Comparative Biochemical Physiology* 80 (3) 303-306.

- ❖ Guillette, L.J. (1987). The evolution of viviparity in Fishes, Amphibians and Reptiles: and endocrine approach; pp. 523-562, in: *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. D.d. Norris and R., E. Jones Eds., Plenum Publishing Corporation.
- ❖ Gullette, L.J. : De Marco, V. y Palmer, B. D. (1990). Exogenous progesterone or indomethacin delays parturition in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. *General and Comparative Endocrinology* 81, 105-112.
- ❖ Highfill, D.R. y Mead, R.A. (1975). Function of Corpora Lutea of pregnancy in the viviparous garter snake, *Thamnophis elegans*. *General and Comparative Endocrinology* 27, 401-407.
- ❖ Jameson, E.W. (1988). *Vertebrate Reproduction*. John Wiley and Sons pp. 114-119.
- ❖ Jones, R.E.; y Guillette Jr. (1982). Hormonal control of oviposition and parturition in lizards. *Herpetologica* 38 (1):80-93.
- ❖ Jones, R.E.; y Baxter, D.C. (1991). Gestation, with emphasis en corpus luteum biology, placentation, and parturition., 4 (A):205-301, en: *Vertebrate Endocrinology. Fundamentals and Biomedical Implications*.
- ❖ Kumari, T.R.S.; H.B.S. Devaraj; y T. Shivanandappa. (1990). Histology and histochemistry of the oviductal sperm storage pockets of the agamid lizard *Calotes versicolor*. *Journal of Morphology* 203:97-106.
- ❖ Levy, H.; H.W. Deane; y B.L. Rubin. (1959). Visualization of steroid-3-OL-Deshydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Journal Histochemistry and Cytochem* 65:932-943.
- ❖ Luna, G.L. (1968). *Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Book Co.
- ❖ 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). Tesis de Maestría, U.N.A.M. .
- ❖ Martínez-Torres, M.; M.E. Hernández; C. Alvarez; J.A. Luis; y G.. (2003). Luteal development and progesterone levels during pregnancy of the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae). *General and Comparative Endocrinology* 132:55-65.



- ❖ Martínez-Torres, M.; E.M. Pérez; A.C. Yáñez; J.A. Luis; y G. Ortiz. (2006). Histochemical activity of  $\Delta^{5-4}$  isomerase 3 $\beta$ -Hidroxyteroid deshydrogenase in the corpus luteum and atresic vitellogenic follicles and interrelationship with progesterone levels during pregnancy of the viviparous mexican lizard *Sceloporus mucronatus* (Reptilia: Phrynosomatidae). Acta Zoologica Mexicana.
- ❖ Méndez-de la Cruz, F.R.; y Villagrán, S.C.M. (1983). Contribución al conocimiento de la ecología y ciclo reproductor de la lagartija vivípara *Sceloporus mucronatus mucronatus*. Tesis Profesional., E.N.E.P. Iztacala. U.N.A.M. .
- ❖ Méndez-de la Cruz, F.R.; L.J.Guillette Jr.; M. Villagrán; y G. Casas. (1988). Reproductive and fat body cycles of the viviparous lizard, *Sceloporus mucronatus* (Sauria: Iguanidae). Journal of Herpetology 22(1): 1-12.
- ❖ Miller, W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocrine Review 9 (3):295-318.
- ❖ Montagna, W. (1976). Anatomía Comparada. 4<sup>a</sup> ed. . Ediciones Omega pp.272.
- ❖ Romer, A.S.; y Parsons, T.S. (1981). Anatomía Comparada. 3<sup>a</sup> ed..Nueva Editorial Interamericana pp. 259.
- ❖ Sever, D.M.; y Ryan, T.J. (1999). Ultraestructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*): Part 1. Evidence for oviducal sperm storage. Journal of Morphology 241:1-18.
- ❖ Sever, D.M.; y Hamlett, W.C. (2002). Female sperm storage in reptiles. Journal of Experimental Zoology 292: 187-199.
- ❖ Smith, H.M. (1939). The Mexican and central American lizards of the genus *Sceloporus*. Field Museum of Natural History. Publ. Zoology 26:218-220.
- ❖ Stouffer, R.L. y Duffy, D. M. (1995). Receptors for sex steroids in the primate corpus luteum. Brief Reviews 6 (3) 83-89.
- ❖ Van-Tienhoven, A. (1983). Reproductive physiology of vertebrates. 2<sup>a</sup> ed. Cornell University Press London., pp. 250-261.
- ❖ Villagrán, S.C.M. (1989). Desarrollo embrionario y su relación con el cuerpo lúteo y la atresía folicular en *Sceloporus mucronatus* y *Sceloporus grammicus* (Sauria: Iguanidae). Tesis Doctoral. U.N.A.M. .

- ❖ Villagrán, S.C.M.; F.R. Méndez ; y O. Cuellar. (1992). Obligatory sperm storage in the lizard. *Acta Zoológica Mexicana* 49:23-31.
- ❖ Xavier, F. (1987). Functional morphology and regulation of the corpus luteum, pp. 241-282. En: *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. D.O. Norris and R.E. Jones (eds.). Plenum Press.
- ❖ Yaron, Z. (1972). Endocrine aspects of gestation in viviparous reptiles. *General Comparative Endocrinology Supplement* 3, 663-674.
- ❖ Yaron, Z. (1985). Reptilian placentation and gestation: structure, function and endocrine control, pp. 528-603., En *Biology of the reptilia* vol,156. Gans and F. Billett (eds.). Jhon Wiley and Sons. New York.