



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS  
NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA  
(*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

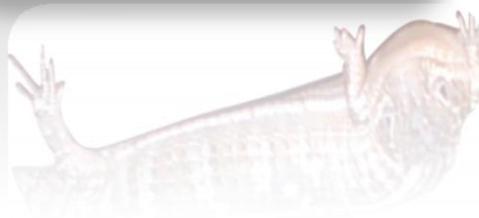
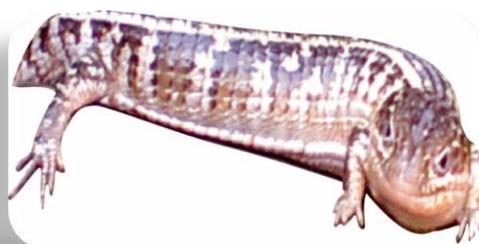
BIÓLOGO

PRESENTA:

DIANA VERA CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. MARTÍN MARTÍNEZ-TORRES



Los Reyes Iztacala, Edo. México. 2015.





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.

# DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada con todo cariño y amor a mis **PADRES** a los cuales les doy las gracias por su apoyo y comprensión para que pudiera lograr mi meta. Por alentarme para seguir adelante y superarme. Y sobre todo por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia, ¡GRACIAS!

A mi director de Tesis Dr. Martín Martínez-Torres por compartirme sus conocimientos y experiencias.

A mis Hermanas que sin su ayuda, apoyo y cariño me hubiera sido más difícil concluir esta etapa.

Gracias a mis amigos que me acompañaron en el camino, que siempre estuvieron para ayudarme y que me hicieron el camino más ameno, les agradezco por impulsarme a seguir adelante y siempre sacarme una sonrisa.

♥ Monse y Jorge

# ÍNDICE

## CONTENIDO:

RESUMEN .....	1
GENERALIDADES DE LOS REPTILES.....	3
DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA.....	6
CICLOS REPRODUCTORES.....	8
ECOLOGÍA REPRODUCTORA.....	12
APARATO REPRODUCTOR.....	14
HORMONAS.....	18
ANTECEDENTES.....	21
HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS.....	21
GONADOTROPINAS.....	22
GONADOTROPINA DE SUERO DE YEGUA PREÑADA.....	24
BIOLOGÍA DE <i>BARISIA IMBRICATA IMBRICATA</i> .....	25
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GENERAL:.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES:.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	32
EFECTO DEL TRATAMIENTO HORMONAL SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR.....	32

EFFECTO DEL GNRH.....	33
EFFECTO DE LA PMSG.....	34
EFFECTO DE LA GNRH SOBRE LOS NIVELES DE ESTRADIOL EN PLASMA.....	37
EFFECTO DE LA PMSG SOBRE LOS NIVELES DE ESTRADIOL EN PLASMA.....	38
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	51
APÉNDICE.....	52
I. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).....	52
II. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	52
REFERENCIAS.....	54

## ABREVIATURAS

<b>AHP</b>	Adenohipófisis
<b>Ce Pe</b>	Células pequeñas
<b>Ce In</b>	Células medianas
<b>Ce Pi</b>	Células piriformes
<b>CL</b>	Cuerpos lúteo
<b>FPV</b>	Folículos previtelogénicos
<b>FV</b>	Folículos vitelogénicos
<b>FA</b>	Folículos atrésicos
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>LH</b>	Hormona luteinizante.
<b>NHP</b>	Neurohipófisis
<b>PMSG</b>	Gonadotropina de suero de yegua preñada
<b>TE</b>	Teca externa
<b>TI</b>	Teca interna





## RESUMEN

Existen abundantes estudios acerca de la ecología reproductora de muchas especies de lagartijas mexicanas. Sin embargo, los trabajos sobre la endocrinología reproductora son sumamente escasos. Diversos campos del conocimiento en los reptiles han quedado rezagados debido a la ausencia de trabajos que permitan obtener ovocitos recién ovulados. Por lo que es necesario desarrollar métodos que faciliten la obtención de ovocitos o cigotos. Un modelo adecuado para llevar a cabo este estudio es la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata*, la cual exhibe un patrón reproductor estacional muy marcado: crecimiento folicular en verano, ovulación en otoño y la preñez a principios de invierno hasta finales de primavera.

En este trabajo se utilizó el Factor Liberador de Gonadotropina (GnRH; por sus siglas en ingles) de humano y la Gonadotropina de Suero de Yegua Preñada (PMSG; por sus siglas en ingles) para estimular la gónada de hembras nuligestas y multigestas de *B. imbricata*. Para cada tratamiento los organismos fueron separados en tres grupos: nuligestas, multigestas y grupo control. En el tratamiento con PMSG se aplicó una dosis de 10 UI a hembras nuligestas y 25 UI a hembras multigestas dos veces por semana durante 16 semanas. En el tratamiento con GnRH se aplicó una dosis de 20  $\mu$ g (nuligestas) y 50  $\mu$ g (multigestas) dos veces por semana durante 11 semanas. Posteriormente, se determinó el diámetro folicular por medio de un ultrasonido, se realizó un ensayo inmunoenzimático para determinar la concentración de FSH en plasma y por medio de un radioinmunoensayo se determinaron los niveles de estradiol en sangre.



Los resultados de la estimulación del desarrollo folicular con GnRH en dosis de 20 y 50  $\mu$ g, mostraron diferencias significativas en el crecimiento folicular en todos los grupos. Con respecto a los niveles de estradiol se encontró que fueron bajos al igual que las concentraciones de FSH. En el tratamiento con PMSG no se observó ningún efecto sobre el tamaño folicular tanto en hembras nuligestas como multigestas con una dosis de 10 y 25 UI, en cambio sí se observó un incremento en el grupo control. Sin embargo, la administración de PMSG sí estimuló la producción de estradiol en hembras nuligestas al final del tratamiento.

Con estos resultados podemos concluir que tanto GnRH de humano como PMSG, que aunque pueden estimular la actividad ovárica en la lagartija vivípara *Barisia imbricata* el desarrollo folicular no fue significativo.

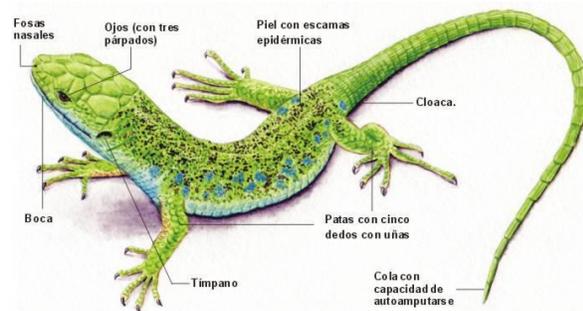


## GENERALIDADES DE LOS REPTILES

Los reptiles son vertebrados que conforman un grupo muy variado de animales que incluyen a las tortugas, cocodrilos, serpientes, lagartijas y tuataras.

Poseen simetría bilateral, un cráneo, un esqueleto interno que encierra una médula espinal, ésta se ensancha en la región de la cabeza para formar el cerebro; ojos, nariz y oídos. Tienen un corazón tricavitario

y sólo en los cocodrilos es tetracavitario, presentan un sistema sanguíneo aislado de las cavidades corporales y un complemento de vísceras típico: sistema digestivo, órganos excretores y reproductores, y normalmente miembros pares y/o sus vestigios (Bellairs y Attridge, 1975). Las extremidades generalmente presentan cinco dedos que terminan en uñas verdaderas (Casas-Andreu y McCoy, 1979).



Respiran por medio de pulmones, y casi todos están cubiertos de escamas o placas, una de las características que los distingue de la mayoría de los anfibios. Además son organismos amniotas y poiquiloterms, lo que significa que carecen de un mecanismo interno efectivo para regular la temperatura corporal en respuesta a los cambios ambientales. Sin embargo, estos vertebrados, emplean otros métodos de control de la temperatura que implica la utilización de fuentes energéticas externas (Bellairs y Attridge, 1975). En la mayoría de los reptiles hay un paladar secundario incompleto (ya que no hay



plena separación entre las cavidades nasal y oral) y sólo en los cocodrilos está completo (Casas-Andreu y McCoy, 1979).

La piel de los reptiles es una envoltura celular que forma el límite entre el animal y el medio ambiente externo, la cual tiene varias funciones. Su principal función es actuar como soporte y protección, mantiene los tejidos y órganos en su lugar, y es suficientemente elástica y flexible para permitir la expansión, movimiento y crecimiento. Actúa como una barrera protectora, y previene la invasión de microbios e inhibe el acceso de parásitos. La piel también participa en la regulación fisiológica (por ejemplo la regulación osmótica), detección sensorial (quimio y mecanorecepción), respiración y coloración (Vitt y Caldwell, 2014).

En la piel de los reptiles la epidermis es notablemente más gruesa, con numerosas capas diferenciales sobre el estrato germinativo. La diferenciación produce una epidermis cada vez más gruesa, la membrana celular queratinosa y la muerte final de cada célula. Este patrón básico está modificado entre los diferentes grupos de reptiles y, ocasionalmente, entre los patrones diferentes del cuerpo y del mismo individuo. Los reptiles únicamente producen  $\beta$ -queratina y  $\alpha$ -queratina la cual también se presenta en otros vertebrados (Vitt y Caldwell, 2014).

En todo o en la mayoría del cuerpo, la piel está cubierta por escamas. Estas se pueden modificar en placas, escudos, laminillas o tubérculos dependiendo del grupo taxonómico, el tamaño y forma de las escamas, así como la localización de éstas en el cuerpo. Todas las escamas de los reptiles son estructuras queratinizadas. Los reptiles tienen una gran variedad de glándulas en la piel, las cuales son pequeñas e inconspicuas y son típicamente multicelulares. Sus secreciones son principalmente lípidos y compuestos a base de cera que sirve impermeabilizante y como agentes feromonales (Vitt y Caldwell, 2014).



## ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



El sistema nervioso de los reptiles está conformado por el cerebro y el cordón espinal. Ambos derivan embriológicamente y evolucionaron a partir del tubo neural. El extremo anterior de este tubo forma el cerebro, que sirve como el mejor centro de coordinación de la actividad neuromuscular, de la integración y respuesta a todos los estímulos sensoriales (Batten e Ingleton, 1987). El cerebro se divide en cuatro regiones: Diencefalo, Mesencefalo y Romboencefalo y Telencefalo. El telencefalo y diencefalo forman el prosencefalo (cerebro anterior), mientras que el mesencefalo y romboencefalo originan el cerebro medio y cerebro posterior respectivamente (Norris, 2007).

El sistema circulatorio es un medio de transporte que lleva nutrientes y oxígeno a todos los tejidos del cuerpo y remueve los productos de desecho y el dióxido de carbono del sistema. Este sistema está compuesto por cuatro componentes: la sangre, el medio de transporte, los vasos linfáticos y vasos sanguíneos, el corazón, el mecanismo de propulsión (Bellairs y Attridge, 1975).

El calor se produce como un derivado de muchos procesos metabólicos. El ritmo metabólico de los reptiles es bajo, por lo que sus cuerpos generan menor cantidad de calor y además dicho calor se pierde con facilidad al no poseer cubiertas aislantes como pelo o plumas. Por lo que dependen de fuentes externas de calor, como los rayos de sol o el substrato sobre el que descansan sus cuerpos. Aunque los reptiles necesitan una temperatura ambiental alta para mantener su estado de actividad, son muy susceptibles al aumento de calor (Bellairs y Attridge, 1975).

Para evitar el calor excesivo, los reptiles se resguardan en lugares protegidos, en el agua o en subsuelo. Los cambios de color es otro método de control de temperatura practicado por ciertos reptiles, ya que la cantidad de calor



absorbido por el objeto depende en algún grado de su coloración (Bellairs y Attridge, 1975).

Los reptiles son más resistentes a las bajas temperaturas extremas. En zonas templadas, la hibernación estacional es siempre un rasgo de vida reptiliana; los animales se refugian de las heladas en el otoño, a menudo bajo tierra, y salen de sus escondites en primavera. Bajo tales condiciones los reptiles podrán moverse, pero frecuentemente rehusarán alimentarse (Bellairs y Attridge, 1975).

Es indudable que las necesidades térmicas y tolerancia de los reptiles han sido un factor determinante de importancia en su distribución geográfica y radiación adaptativa. Los reptiles modernos muestran un impresionante grado de adaptabilidad térmica para resistir condiciones tan diversas como: sobrevivir adecuadamente en ambientes de la selva tropical hasta climas muy fríos como en la faldas de los volcanes (como es el caso de *B. imbricata*).

### **DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA**

Los reptiles se encuentran en una gran variedad de hábitats terrestres, como estos son ectotérmicos su distribución está influenciada por la temperatura del ambiente (Porter, 1972). Existen 9547 especies de reptiles en el mundo, en México se han descrito 864 especies de reptiles y es considerado el segundo país con mayor diversidad de este grupo después de Australia. Los estados con un mayor número de especies son: Oaxaca (262), Chiapas (220) y Veracruz (200), mientras que los estados con una fauna de reptiles menos diversa son: Tlaxcala (36 especies), Distrito Federal (39) y Guanajuato (43) (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014).



## ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



Los Testudines (agrupan a todas las tortugas), actualmente se conocen unas 332 especies y México cuenta con 48 de estas especies (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014). La mayoría de este grupo son acuáticos, marinas o dulceacuícolas y sólo unas pocas son terrestres.

Los Crocodylia, llamados: cocodrilos, aligátors y caimanes son de hábitos acuáticos y de gran tamaño. Estos están limitados a ambientes tropicales (excepto el género *Alligator*), y apenas están representados por 25 especies. De las cuales; tres tienen distribución en México (*Caiman crocodylus*, *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreleti*) (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014).

Los Squamata contienen tres grupos de reptiles: sauria (lagartijas), serpentes (serpientes) y amphisbaenia. Los dos primeros representan alrededor del 95% de los reptiles vivos (Vázquez, 2005). Las lagartijas y serpientes son dos grupos de reptiles con gran éxito; entre sus representantes se incluyen formas trepadoras y planeadoras. Las hay cavadoras, semiacuáticas y hasta completamente marinas y tienen una distribución cosmopolita. Este éxito también se refleja en el número de representantes vivos: 5851 especies de lagartijas, 3442 serpientes. A México le corresponden unas 417 especies de lagartijas y 93 especies de serpientes. Los amphisbaenia, son escasos y poco conocidos, lo conforman reptiles cavadores y de regiones tropicales; se conocen 184 especies, tres están presentes en México (*Bipes* sp.) (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014).

Los Rhynchocephalia, conocidos como tuataras, viven confinados en un archipiélago en la Bahía de Plenty y en estrecho de Cook, al norte de Auckland, Nueva Zelanda. Las dos especies vivas (*Sphenodon punctatus* y *Sphenodon guntheri*) son consideradas fósiles vivos (Vázquez, 2005).



Hay un elevado porcentaje de endemismos entre los reptiles que habitan en México encontrándose unos 493 taxones endémicos para el país. De las 40 familias de reptiles, 15 no poseen especies endémicas de México estas son: las familias de cocodrilos, 5 de tortugas, 5 de lagartijas y sólo 2 de serpientes. Sin considerar a Bipedidae, familia endémica de México, y Dibamidae, cuyo único representante del continente americano es endémico de México, los porcentajes de endemismo más altos a nivel de especie se encuentran en 4 familias de lagartijas: Anguidae (87.7%), Xenosauridae (87.5%), Phyllodactylidae (81.25%) y Xantusiidae (80.7%). En los otros grupos de reptiles, los porcentajes de endemismo no rebasan el 70%. Las 2 familias de serpientes que tienen el mayor porcentaje de endemismo son Natricidae (66.6%) y Dipsadidae (62.5%); la familia de tortugas con el mayor porcentaje de especies endémicas es Emydidae (57.1%) (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014).

Debido a la amplia distribución de los reptiles se presentan diversos tipos de estrategias reproductoras relacionadas con las zonas climáticas.

### **CICLOS REPRODUCTORES**

Existe una amplia diversidad de ciclos de reproducción reptiliana; sin embargo, se pueden observar de manera general los siguientes patrones:

- **Reproducción estacional (Discontinua).** Con periodos de actividad reproductora separada por una etapa de inactividad. Los machos muestran más variación en el tiempo de inicio y duración de la espermatogénesis. Las hembras pueden ser estacionalmente monoestrales (con una sola camada) por ejemplo: la tortuga *Chrysemys picta* (Callard y Kleis, 1987), la serpiente *Naja naja*, la lagartija *Barisia imbricata* (Martínez Torres *et al.*, 2012) y el cocodrilo *Alligator mississippiensis* (Duvall *et al.*, 1982) o poliestrales (múltiples camadas)



## ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



por ejemplo: la tortuga *Sternotherus odoratus* (Callard y Kleis, 1987) y la serpiente *Elaphe radiata* (Saint, 1982). Este patrón se puede encontrar en todas las especies de zonas templadas y en algunas de los trópicos (Callard y Kleis, 1987).

- **Reproducción Continua (Áciclica).** Con una intensidad similar de actividad reproductora todo el año por ejemplo la serpiente *Ptyas korros* (Saint, 1982), la tortuga *Chelonia depressa* y la lagartija *Anolis trinitatus* (Duvall *et al.*, 1982). Las especies con este patrón reproductor tienden a tener una distribución tropical (Callard y Kleis, 1987).

Las hembras de los reptiles muestran un patrón estacional de actividad ovárica y producción de huevos, alternando con la inactividad ovárica. Generalmente los escamosos monoestrales de zonas templadas tienen un crecimiento ovárico estacional explosivo y el ovario se mantiene pequeño entre las fases de crecimiento. Las especies de zonas templadas típicamente ovulan en primavera, pero algunas representantes vivíparas ovulan en otoño o invierno, por ejemplo *Sceloporus cyanogeys*, *S. jarrovi* (Callard y Kleis, 1987) y *Barisia imbricata* (Martínez Torres *et al.*, 2012). En estos, el desarrollo embrionario ocurre durante el invierno y el parto en la primavera (Callard y Kleis, 1987). Por otro lado, las hembras de reproducción continua tienen un intervalo de uno o más meses entre la última maduración y ovulación (por ejemplo *Sternotherus odoratus*, que produce dos o tres camadas al año, otro ejemplo es la serpiente *Elapoides fuscus*, y la lagartija *Anolis trinitatus*) (Saint, 1982).

Las hembras de los escamosos se pueden clasificar en dos tipos básicos con respecto a sus estrategias reproductoras: (Callard y Kleis, 1987).

- **Maduración temprana:** Múltiples camadas: en este caso el tipo de reproducción que predomina es la oviparidad y casi todas las especies



son poliestrales estacionales. Llegan a la madurez con un tamaño de cuerpo más pequeño que las de reproducción tardía y por lo tanto el promedio del tamaño de la camada también es significativamente menor (por ejemplo la serpiente *Chrysopelea ornata*, Saint, 1982) (Callard y Kleis, 1987).

- **Maduración tardía:** En este tipo las hembras tienen una sola camada al año. Llegan a la madurez sexual en un mayor tamaño del cuerpo comparado con los de maduración temprana y por lo tanto tienen camadas más grandes, compensados por una baja fecundidad por estación (por ejemplo *Nerodia sipedon*, la cobra *Naja naja* entre otros) (Callard y Kleis, 1987).

Una vez que un ciclo reproductor ha sido iniciado, las diferencias entre los patrones reproductores pueden ser atribuidas principalmente a la longitud de los intervalos entre las siguientes camadas y al número de folículos que alcanzan la madurez durante cada intervalo reproductor. El control de estas dos variables está dado por una compleja interacción entre el ovario, la pituitaria, y el hipotálamo, el cual se ve reflejado en los cambios temporales de las gonadotropinas del pasma y de los esteroides gonadales. Estos últimos, tienen importancia intraovárica y son esenciales en el desarrollo folicular, ovulación y en la iniciación de una adecuada respuesta en el tracto reproductor (Callard y Kleis, 1987).

Con respecto a los machos los ciclos reproductores se pueden dividir en 4 tipos:

- a. Tipo aestival (verano) y potsnupcial:** Se presenta en regiones templadas y subtropicales en donde la espermatogénesis ocurre en la estación húmeda y los espermatozoides son almacenados durante el invierno ya sea en los vasos deferentes de los machos u ocasionalmente



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



en los oviductos de las hembras. Y el apareamiento ocurre en primavera (por ejemplo en *Austrelaps superbis* y *Thamnophis elegans*) (Saint, 1982) y en la lagartija *Sceloporus jalapae* (Ramírez-Bautista *et al.*, 2005).

- b. Tipo mixto:** se encuentra sólo en regiones templadas y subtropicales. Se caracteriza porque la espermatogénesis comienza al final de la primavera y es completada al siguiente año. Se pueden distinguir dos tipos. En el primero se presentan dos periodos de espermatogénesis y maduración (otoño y primavera), mientras que en el segundo subtipo se presenta sólo un periodo de espermatogénesis y apareamiento (primavera) al año (como en *Micrurus fulvius*, *Vipera aspis*, (Saint, 1982) y las lagartijas *Xantusia vigilis* y *Sceloporus scalaris* Duvall *et al.*, 1982).
- c. Tipo prenupcial:** Se presenta en cualquier zona, excepto en regiones de clima frío. La espermatogénesis es completada hacia el final del periodo de apareamiento y algunas veces ocurre en primavera en regiones templadas y subtropicales (por ejemplo, *Acantophis antarcticus*, *Pseudechis australis* Saint, 1982 y la lagartija *Sceloporus ochoterenae* Bustos-Zagal *et al.*, 2011).
- d. Actividad reproductiva continua:** Se presenta sólo en especies poliestras de regiones intertropicales con una marcada estación de secas (por ejemplo, *Oligodon taeniatus*, *Ptyas korros*, *Anolis Trinitatus*, *Genatodes albogularis* Saint, 1982 y la lagartija *Sceloporus gadoviae* Ramírez-Bautista *et al.*, 2005).



## **ECOLOGÍA REPRODUCTORA**

Los ciclos reproductores de los reptiles están generalmente coordinados por los factores ambientales. Las variables tales como la temperatura el fotoperiodo, humedad, disponibilidad de alimento y ciertos aspectos del comportamiento social, son importantes en la sincronización del ciclo reproductor de los reptiles (Duvall *et al.*, 1982). Sin embargo, se considera que la temperatura es el principal factor ambiental que controla la actividad gonadal y el ciclo reproductor de lagartijas en regiones templadas (Duvall *et al.*, 1982). Además, las diferentes actividades de los reptiles dependen directamente de la temperatura (Saint, 1982). También, hay evidencias de que dichos factores afectan la reproducción reptiliana. Por ejemplo, en *Xantusia vigilis* las temperaturas altas (32° constantes) estimulan un incremento de la espermatogénesis (Bartholomew, 1973 y Licht, 1972). Además, las temperaturas elevadas (27°C) también estimulan el crecimiento folicular en *Uta stansburiana* (Tinkle y Irwin, 1965). Así, estas observaciones demuestran que la temperatura es importante para controlar el ciclo sexual de los reptiles (Duvall *et al.*, 1982).

El fotoperiodo está involucrado en mantener la actividad gonadal (Duvall *et al.*, 1982). Y juega un papel trascendental en la termorregulación. Este fenómeno es muy evidente en elevadas altitudes, donde la longitud del día es compensada por la brevedad de la estación seca (Saint, 1982).

Otros factores involucrados en el control del ciclo reproductor de los reptiles son: la lluvia y la humedad. Por ejemplo, *Anolis carolinensis*, no exhibe comportamiento reproductor a menos que la humedad relativa sea cerca del 60% (Crews y Garrick, 1980). La lluvia y la humedad pueden ser importantes



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



para la reproducción estacional en serpientes y puede afectar de dos formas: una es a través de la reducción de la radiación solar, la cual en verano es un factor favorable en zonas sub e intertropicales, afectando la termorregulación. El otro efecto de la lluvia sobre serpientes, como *Enhydryis enhydryis*, es a través de la influencia sobre la vegetación; ya que sus presas son consumidores primarios y secundarios (Saint, 1982), tortugas como *Chelonida rugosa* depositan sus huevos en la arena durante la estación de lluvias (Kennett *et al.*, 1993). En el cocodrilo de agua salada (*Crocodylus porosus*) la proporción de hembras adultas que se reproduce varía con la estación de lluvias, las cuales ovopositan en montículos construidos de vegetación al comienzo de la estación húmeda (Shine y Brown, 2008).

El efecto de la humedad sobre el ciclo reproductor reptiliano también está relacionado con la producción de alimento. Se sabe que la disponibilidad de alimento es otro factor importante que influye en la actividad reproductora en *Urosaurus ornatus* (Ballinger, 1977). Durante periodos de sequía, asociados a la escasez de alimento, el almacenamiento de lípidos en cuerpos grasos puede ser importante para el mantenimiento general así como para la reproducción. Los reptiles de zonas templadas tienen la característica de almacenar lípidos inmediatamente antes de periodos fríos (Guillette y Casas-Andreu, 1981), y los reptiles tropicales lo hacen durante la estación seca (Derickson, 1976). Por lo tanto, la disponibilidad de alimento así como el almacenamiento de lípidos es crucial para el periodo de recrudescencia gonadal; de otra manera los cuerpos grasos serían agotados para propósitos de mantenimiento general (Duvall *et al.*, 1982). Además, la depauperación de cuerpos grasos está correlacionada con la recrudescencia gonadal en muchas especies de lagartijas (Dessauer, 1955).

Estudios han demostrado que el tamaño de los cuerpos grasos puede ser incrementado por una alimentación complementaria, por lo tanto se ha



establecido una relación directa entre la disponibilidad de alimento y el tamaño del cuerpo graso (Guillette y Casas-Andreu, 1981). Derickson (1976) presentó datos donde indica que el ciclo del cuerpo graso está en función de la disponibilidad de alimento.

Claramente, la falta de disponibilidad de alimento, seguida del inicio de la primavera podría disminuir la posibilidad del éxito reproductor de los reptiles de zonas templadas, posiblemente a través del agotamiento de los cuerpos grasos. Así, cambios en la humedad y en la disponibilidad de alimento parecen afectar el ciclo sexual de algunos reptiles de zonas templadas (Duvall *et al.*, 1982). Por ejemplo, el ciclo ovárico de *Agama agama lionotus* de una región de África está asociado a cambios en la disponibilidad de insectos como alimento (Marshall y Hook, 1960).

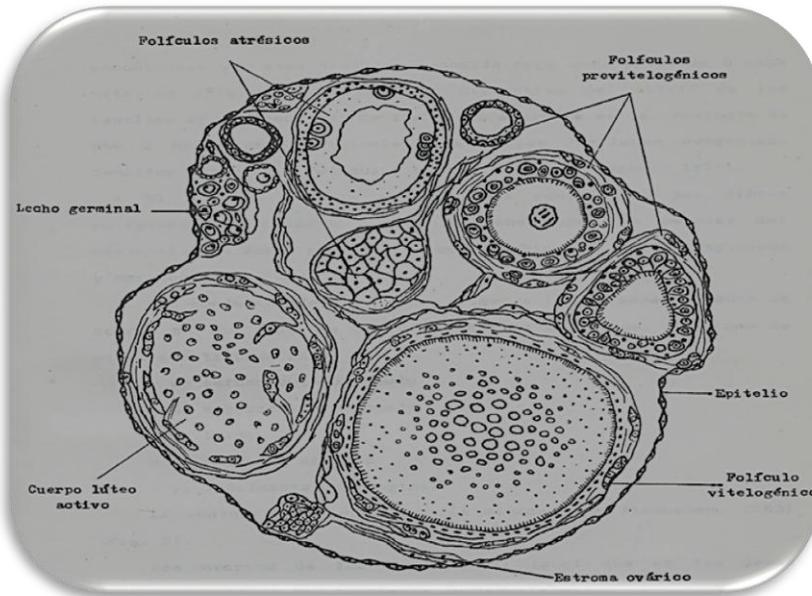
## **APARATO REPRODUCTOR**

Los ovarios de los reptiles 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 se pueden observar folículos previtelogénicos (FPV), folículos vitelogénicos (FV), así como folículos atrésicos (FA) (Fig.1). Durante la estación reproductora el ovario incrementa su tamaño debido a la vitelogénesis folicular.

Mientras que en la fase de gestación es posible observar la presencia de cuerpos lúteos (CL) (Martínez-Torres *et al.*, 2003).



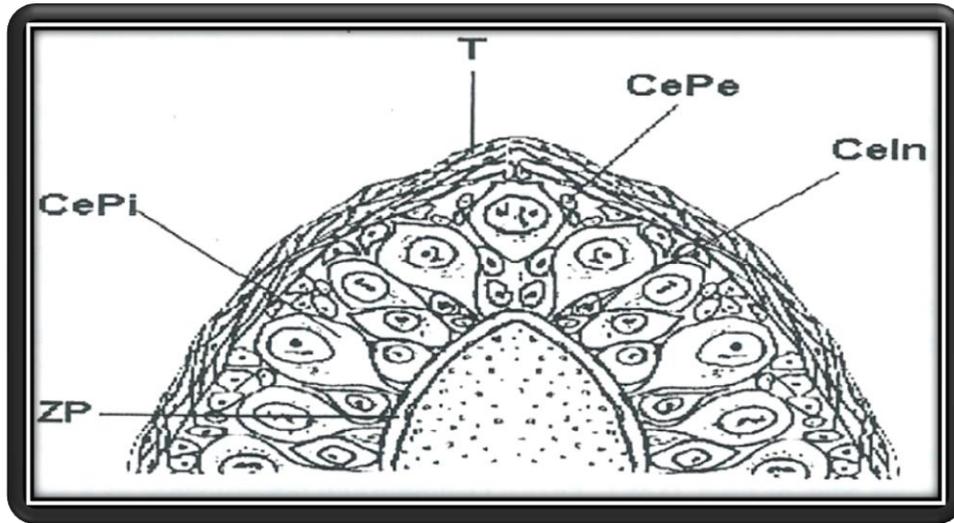
ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



**Figura. 1** Ovario de lacertilio (Corte Histológico). Lecho Germinal (LG), Folículos: Previtelogénicos (FPV), Vitelogénicos (FV), Atrésicos (FA) Cuerpo Lúteo (CL), Estroma Ovárico (Es Ov) y Epitelio Celómico (Ep Ce). (Modificado de Villagrán-Santa Cruz, 1989).

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

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) (Guraya, 1978; Guraya y Varma, 1976). 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) (Dodd, 1977) (Fig. 2).



**Figura 2.** Pared de un folículo previtelogénico de un lacertilio. Compuesto de una capa acelular llamada Zona pelúcida (Z P), epitelio folicular conformado de Células pequeñas (Ce Pe), células intermedias (Ce In), Células piriformes (Ce Pi) y la teca (T). Tomado y Modificado de Dodd, 1977.

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 (Saidapur, 1982).

En los FVs se inicia la formación de plaquetas vitelinas, las cuales se van acumulando en el ovocito al mismo tiempo que las células foliculares se van aplanando cada vez más conformando 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 (Saidapur, 1982).



## ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



No todos los folículos maduran, 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).

El proceso de atresia folicular 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 (Boyscov, 1978). 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 las alteraciones en los niveles hormonales promueve la degeneración folicular (Boyscov, 1978).

El cuerpo lúteo (CL) es un órgano transitorio que se forma a partir de las capas celulares del folículo postovulatorio. Esta glándula se presenta en hembras gestantes de todos los grupos de vertebrados, tanto especies ovíparas como vivíparas. Su función principal es sintetizar y secretar esteroides, primordialmente progesterona, la cuál es requerida para el mantenimiento de la preñez (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 o tres nucléolos dependiendo de la especie, transformándose así en células luteales (Yaron, 1985, Martínez-Torres *et al.*, 2003).

Los huevos de reptiles poseen gran cantidad de vitelo, así mismo tienen membranas extraembrionarias; como es el amnios, el cual sirve para proveer al embrión de un medio acuático en el que pueda desarrollarse. El corion que rodea al amnios y el alantoides están estrechamente conectados a la membrana



de la cáscara, teniendo la función de un órgano respiratorio. La mayoría de los reptiles son ovíparos; sin embargo, existen diversas especies que son vivíparas.

Al momento de nacer los jóvenes reptiles son similares en forma y costumbres a sus padres (Bellairs y Attridge, 1975).

## **HORMONAS**

El sistema endocrino de los reptiles está representado, por el conjunto de glándulas de secreción interna, que actúan a través de sus productos de secreción, las hormonas, que vierten directamente en el torrente circulatorio en respuesta a estímulos específicos. A través de la sangre cada una de las hormonas alcanza a los tejidos que sirven de blanco, en los cuales provoca una respuesta funcional definida (Blanco, 1996).

De acuerdo con la naturaleza química, las hormonas pueden clasificarse en cinco categorías:

- ❁ **Esteroides.** Que derivan del colesterol, a este grupo pertenecen los glucocorticoides, la aldosterona y los andrógenos de la corteza suprarrenal; los estrógenos y la progesterona del ovario y la testosterona del testículo.
- ❁ **Aminas y Aminoácidos.** Derivados de aminoácidos, como la adrenalina y la noradrenalina de la médula suprarrenal, la tiroxina, la melatonina de la glándula pineal.
- ❁ **Derivados de ácidos grasos.** Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos se originan de ácidos grasos poli-insaturados.



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



- ❁ **Péptidos.** Como factores reguladores del hipotálamo, la vasopresina y oxitocina de la neurohipófisis, etc.
- ❁ **Proteínas.** Como la insulina del páncreas, hormona del crecimiento, hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) etc.

La pituitaria está presente en todos los vertebrados, además, es una fuente importante de hormonas que regulan una gran gama de actividades. Está compuesta de dos partes principales, la neurohipófisis (NHP) y la adenohipófisis (AHP). La glándula pituitaria está localizada en el tercer ventrículo del cerebro. La NHP se divide en tres regiones, el lóbulo distal neural (NL), el tallo neural, y la eminencia media proximal (ME), a las últimas dos zonas en conjunto se denominan infundíbulo. Y la AHP está conformada por una parte distal, tuberal y parte intermedia, además de estar formada por células epiteliales y secreta hormonas tróficas (Norris, 2007).

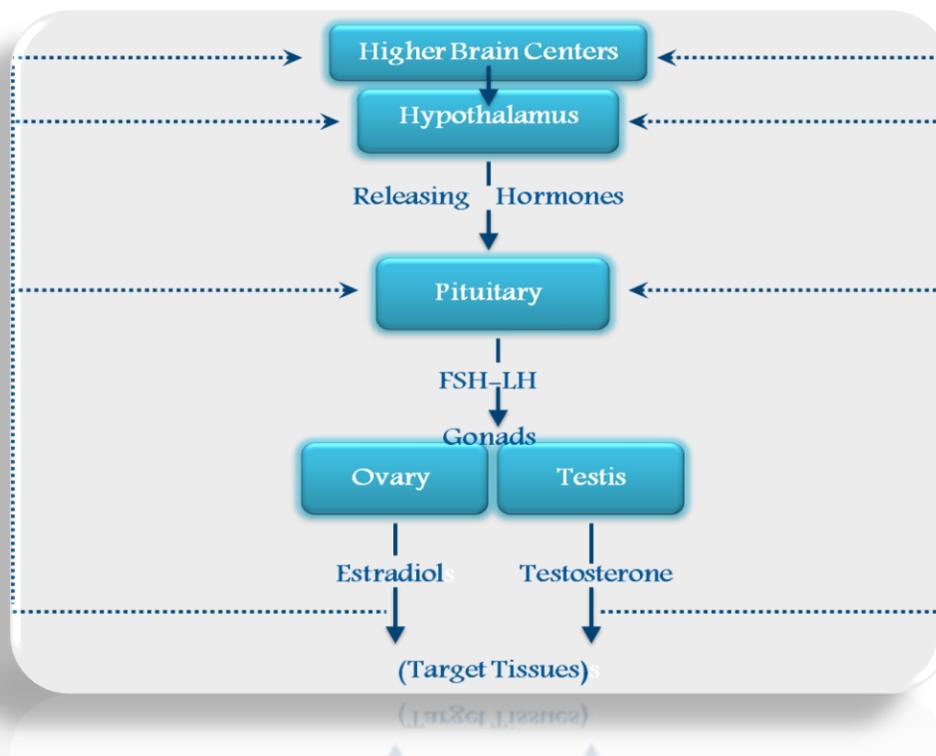
Las hormonas tróficas que secreta la AHP se encuentran dentro de tres categorías (Norris, 2007):

- Ⓢ Categoría I: incluye hormonas glicoproteicas FSH, LH y la tirotrópina (TSH).
- Ⓢ Categoría II: está constituida por la hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL).
- Ⓢ Categoría III: incluye péptidos pequeños como la hormona corticotropina (ACTH), la hormona melanotropina  $\alpha$ -MSH, lipotropina (LPH) y endorfinas.



Las gonadotropinas (GtH) de las cuales existen dos tipos distintos en vertebrados, la FSH y LH, ambas son glicoproteínas las cuales están constituidas por unidades polipeptídicas diferentes, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es idéntica para las dos hormonas, y la  $\beta$  es específica para cada una (Blanco, 1996).

Con respecto a los reptiles, poco se sabe sobre su endocrinología reproductora y es posible que estos tengan un patrón similar al de los mamíferos, es decir, que presentan los dos tipos de gonadotropinas (FSH y LH) (Fig. 3). Las tortugas y cocodrilos parecen presentar ambas. Sin embargo, en escamosos parece ser que sólo una gonadotropina está presente y posee la actividad tanto de la FSH, como LH (Licht, 1979; Licht, *et al.*, 1977).



**Figura 3.** Eje hipotálamo- hipófisis- gónada. Control de la pituitaria sobre la secreción de gonadotropinas. Tomado y modificado de Norris, 2007.



## ANTECEDENTES

### HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) parece estar presente en el cerebro reptiliano, y los niveles de esta hormona pueden variar estacionalmente (Callard y Kleis, 1987). Esta hormona fue originalmente identificada como un decapeptido capaz de estimular la actividad de la pituitaria de mamíferos para sintetizar y liberar gonadotropinas como la FSH y LH (Matsuo *et al.*, 1971; Burgus *et al.*, 1972). También existen evidencias de que está involucrado en la regulación de la estereidogénesis gonadal tanto en anfibios como en varias especies de reptiles (Variale *et al.*, 1986; Ciarcia *et al.*, 1989; Arisawa *et al.*, 1990; Pitzel *et al.*, 1991). Estudios llevados a cabo en *Rana esculenta* (Gobbetti y Zerani, 1991; Gobbetti *et al.*, 1992 a y b) sugieren un papel estimulador de GnRH sobre la estereidogénesis el cual, es mediado por prostaglandinas (Gobbetti *et al.*, 1994). Además, se ha encontrado la presencia del GnRH de salmón (sGnRH) en algunas especies de lagartijas como en *Podarcis sicula* y *Galliota galloti* (Lembeck *et al.*, 1985; Powell *et al.*, 1986 y Bello *et al.*, 1991).

Diversos estudios han demostrado que la GnRH y sus receptores están presentes en el ovario de varios grupos de vertebrados, sugiriendo una función intra-ovárica en adición a esta actividad hipofisiotrópica (Singh *et al.*, 2008). Varias formas de GnRH se han encontrado en el ovario de peces y mamíferos como la rata las cuales tienen un papel regulador en la esteroidogénesis (Habibi *et al.*, 1988, 1989), apoptosis (Billig *et al.*, 1994; Parborell *et al.*, 2002), y maduración meiótica del ovocito (Hillensjo y LeMaire, 1980; Pati y Habibi, 1998; Nabissi *et al.*, 1997).



Se ha encontrado una alta variabilidad en la respuesta a GnRH en dos especies de tortuga *Psuedemyses scripta* y *Chrysemys picta* sugieren que está depende del sexo y de la condición reproductora. Estas diferencias pueden ser en la magnitud, duración y patrón de respuesta a este factor liberador (Licht *et al.*, 1985). Otro estudio realizado en la tortuga *Chrysemys picta*, confirma que el sexo y la condición reproductora (por lo menos en hembras) contribuyen significativamente a la respuesta natural de la pituitaria a GnRH (Licht y Porter, 1985).

En los machos, la administración de GnRH de mamífero induce tanto recrudescencia testicular como la producción de andrógenos en la lagartija ovípara *Calotes versicolor*. Lo cual implica que la secreción y producción de gonadotropinas desde la hipófisis ocurre en seguida del tratamiento con GnRH (Shanblag *et al.*, 2000).

Además de esta función endocrina es probable que tenga un papel neuromodulador en el comportamiento sexual y en señales de transferencia olfatoria en todos los vertebrados (Dubois *et al.*, 2002).

## **GONADOTROPINAS**

En los reptiles, como en otros vertebrados, el crecimiento folicular es promovido por gonadotropinas (tanto endógenas, como exógenas) (Jones *et al.*, 1973). Estas son hormonas de la glándula pituitaria anterior que estimulan el crecimiento folicular y la vitelogénesis en reptiles (Jones, 1969; Licht, 1970; Eyeson, 1971).



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



Diversas investigaciones han demostrado que la gónada de serpientes y lagartijas es sensible a la estimulación con gonadotropinas de mamífero (Licht y Pearson, 1969; Licht, 1970; Callard *et al.*, 1972). La aplicación de gonadotropinas de mamífero a lagartijas adultas (*Anolis carolonensis*, *Uta stansburiana* y *Sceloporus acidentalis*) (Licht, 1970) mostró que tanto la FSH como la LH son capaces de promover el desarrollo ovárico y la espermatogénesis. Sin embargo, parece ser que la FSH de ovino es más eficiente que la LH, ya que se observó que la administración de dosis “bajas” (1-10 µg) de FSH altamente purificada inducen el desarrollo folicular, la ovulación y el incremento en el peso del oviducto (Licht, 1970).

Se ha comprobado que FSH estimula el crecimiento ovárico en lagartija *Lygosoma laterale* (Jones, 1969). Dosis bajas estimulan el crecimiento ovárico y la ovulación en *A. carolinensis* (Licht, 1970), y dosis altas también estimulan el crecimiento ovárico en *Agama agama* (Eyeson, 1971). Por otro lado, hay evidencia que sugiere que el efecto de la FSH en estimular el crecimiento folicular varía con el tamaño folicular inicial. Por ejemplo, en el ovario de *L. laterale* folículos pequeños (alrededor de 0.35mm) no responden al tratamiento con FSH, los folículos alrededor de 0.43 mm responden mejor a dosis de 50 µg FSH, y folículos de 0.48 mm o mayores responden similarmente a dosis de 10 y 50 µg (Jones *et al.*, 1973).

Con respecto a los machos, la FSH puede causar crecimiento testicular y espermatogénesis en animales hipofisectomizados de la lagartija *Hemidacyilus flaviviridis* (Reddy y Prasad, 1970). Se sabe que las células intersticiales y el proceso de espermatogénesis es controlado por LH y FSH, respectivamente, y que estas dos hormonas tienen distintos ciclos estacionales de secreción (Licht, 1972).



En lagartijas y serpientes, ambas gonadotropinas estimulan a las estructuras accesorias andrógeno-dependientes (epidídimo y el segmento sexual renal) y desarrollan células intersticiales; aunque la FSH fue más efectiva que la LH (Licht y Pearson, 1969). En otro estudio que se llevó a cabo en machos de *C. picta* donde se probó que la FSH, (incluyendo la obtenida de rata, humana y ovina) es más potente que las correspondientes a LH (Callard y Ryan, 1977).

### **GONADOTROPINA DE SUERO DE YEGUA PREÑADA**

Se ha demostrado que el tratamiento con análogos de FSH como la gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), pueden promover efectos en la gónada de los reptiles escamosos (Martínez-Torres y Martínez-López, 2004).

En la hembra adulta la PMSG puede estimular la actividad del ovario. Callard y colaboradores (1972) observaron que la administración de esta hormona a hembras de *S. cyanogenys* al inicio del ciclo reproductor acelera el desarrollo de los folículos ováricos. Otros estudios han demostrado que PMSG puede inducir la ovulación en la lagartija *C. versicolor* (Bhagyashri *et al*, 1993). También promueve la formación de FV en hembras con fracaso reproductor de la lagartija *B. imbricata*, tratadas con esta hormona (Martínez-Torres *et al.*, 2009).

En machos jóvenes de *B. imbricata*, la PMSG puede estimular la espermatogénesis (Martínez-Torres *et al.*, 2004), además, de que puede inducir la producción de andrógenos (Callard y Ryan, 1977).



## BIOLOGÍA DE *Barisia imbricata imbricata*

*Barisia imbricata* es una lagartija vivípara con una longitud hocico-cloaca (LHC) de  $108 \pm 3.3$  mm en un rango de 82.4 a 148.8 mm en una lagartija adulta, que habita zonas templadas y se les puede encontrar en altas elevaciones ( $> 2000$  m.s.n.m.) (Guillette y Smith, 1982). Esta lagartija es una especie endémica de México y vive en las montañas transvólcanicas de los estados centrales de la República Mexicana de nuestro país (D.F, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla y Veracruz (Guillette y Casas-Andreu, 1987) (Fig. 5).



Figura 5. Distribución de *Barisia imbricata*

Es una lagartija terrestre y termofílica, con un bajo promedio de temperatura del

cuerpo ( $18-20^{\circ}$  Villamar, 1998) y es una especie insectívora (Guillette y Casas-Andreu, 1987). Las hembras tienen dos lechos germinales por ovario (Jones *et al.*, 1982), son de reproducción estacional anual, la vitelogénesis inicia en el verano (finales de agosto, principios de septiembre), la ovulación ocurre en otoño (noviembre y principios de diciembre), y el apareamiento ocurre previo a la maduración del folículo (Guillette y Casas-Andreu, 1987; Martínez-Torres *et al.*, 2006).

El desarrollo embrionario es largo, dura alrededor de siete meses, (inicia a finales de otoño y termina ya entrada la primavera) (Martínez-Torres *et al.*,



2006). Las hembras activas reproductivamente tienen una LHC que varía entre los 77.5 a 124.7 mm (Guillette y Casas- Andreu, 1987). Los machos exhiben un patrón de recrudescencia testicular en primavera (abril-mayo), con un pico de actividad en verano (julio-agosto) y una rápida regresión en septiembre. Los machos son activos reproductivamente en una LHC de 87.1 a 148.8 mm. El ciclo reproductor de ambos está correlacionado con la precipitación (Guillette y Casas-Andreu, 1987).

## JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años el número de especies de reptiles amenazadas o en peligro de extinción ha ido en aumento, lo cual es causado entre otras cosas por los asentamientos humanos, fragmentación del hábitat, comercio, tráfico, introducción de especies exóticas, realización de obras de infraestructura, cambio de uso de suelo, etc. Debido a esta situación es necesario iniciar no sólo programas de mantenimiento y reproducción en cautiverio de especies amenazadas sino desarrollar proyectos que permitan conocer a fondo los mecanismos que regulan la reproducción de estas especies para montar otras estrategias que permitan, además de ayudar a su conservación, usarlas como modelo de estudio con fines de investigación. Por otro lado, en otros países se han realizado investigaciones en diversas especies de reptiles que han demostrado que la gónada de tortugas, serpientes y lagartijas es sensible a la estimulación con gonadotropinas de mamífero; pero hasta la fecha no se han realizados proyectos para estimular la actividad ovárica en lagartijas



## ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



mexicanas. El desarrollo de este tipo de proyectos permitiría, el progreso de diversos campos del conocimiento en los reptiles que se han quedado rezagados debido a la ausencia de técnicas que permitan manipular la reproducción para obtener gametos y/o embriones en etapas precisas de desarrollo. La lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata*, endémica de México, puede ser un modelo adecuado para llevar a cabo este tipo de estudios, porque exhibe un patrón reproductor estacional muy marcado, puede adaptarse a condiciones de cautiverio y es fácil de manipular.

## OBJETIVOS

### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar el efecto de la administración de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) de mamífero en la actividad ovárica en hembras nuligestas y multigestas de la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata*.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Determinar el efecto de la estimulación del desarrollo folicular con GnRH y PMSG en hembras nuligestas y multigestas de *Barisia imbricata*.
2. Establecer los niveles de hormona folículo estimulante y estradiol en hembras de *Barisia imbricata* (nuligestas y multigestas), tratadas con GnRH y PMSG respectivamente



## MATERIALES Y MÉTODOS

### **ANIMALES**

Se emplearon hembras adultas de *Barisia imbricata imbricata*, colectadas en el municipio de Cuautitlán (19° 38'N, 99°25'O), Estado de México. Las cuales fueron marcadas por escisión falangiana, medidas y pesadas un día después de la captura.

### **DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO FOLICULAR:**

Este proceso fue realizado mediante un escaneo por ultrasonido al inicio y final de cada tratamiento, utilizando un transductor de capacidad variable de 30 MHz, el cual fue realizado en el Hospital Federico Fernández Fierro, en el departamento de Radiología. Las lagartijas fueron colocadas en una posición dorso-lateral, y las extremidades posteriores colocadas hacia atrás. Posteriormente el transductor fue lubricado con gel (Aquasonic 100, gel de transmisión de ultrasonido, Laboratorios Parker, Inc., Orange, New Jersey) fue colocado en el área de tejido suprainguinal, y se tomó imagen del ovario para determinar el diámetro de los folículos. Únicamente se utilizaron hembras que presentaron folículos previtelogénicos menores de 2.0 mm de diámetro.

Posteriormente se ordenaron en dos grupos, con 20 organismos para PMSG y 21 para GnRH.



## DISEÑO EXPERIMENTAL

- **Hembras Nuligestas.** Se consideraron hembras nuligestas a aquellas hembras que presentaron una LHC menor de 10 cm, pues inician su actividad reproductora cuando alcanzan los 8.7 cm. Se formaron 3 grupos; a un grupo (n=6) se le administró una dosis de PMSG (Folligon Lab. INTERVET) de 10 UI, vía intraperitoneal dos veces por semana durante dieciséis semanas. Al segundo grupo experimental (n=5) se le trato con GnRH de humano (Lab. MP Biomedicals) se utilizó una dosis 20 µg dos veces por semana durante once semanas durante los meses de agosto a noviembre. Y al tercer grupo control se subdividió en un grupo (n=7) para PMSG y un grupo (n=11) para GnRH a los cuales solo se le realizó punción cardiaca para analizar el plasma.
- **Hembras Multigestas.** Se consideraron hembras multigestas a aquellas hembras con una LHC de  $12 \pm 2$  cm, pues se consideró que cuando menos se habían reproducido una vez. Se formaron 3 grupos; al primer grupo experimental (n=6) se le aplicó una dosis de PMSG (n= 7) de 25 UI dos veces por semana durante dieciséis semanas. Al segundo grupo experimental (n=5) se le administró una dosis de 50 µg de GnRH dos veces por semana durante once semanas. Finalmente el tercer grupo control fue dividido en dos grupos uno para PMSG (n=7) y uno para GnRH (n=11) realizándoles sólo punción cardiaca. La administración de las hormonas en todos los casos fue vía intraperitoneal.

Las dosis utilizadas fueron de acuerdo a Bhagyashri-1993 para PMSG. Con respecto a GnRH fueron de acuerdo a Licht-1984.



Los organismos fueron mantenidos en terrarios (Fig. 6 y 7) (separados por grupos) de 130.5 cm de largo, 95 cm de ancho y 52 cm de alto, además se les adicionó 15 cm de tierra y plantas para resguardarse del sol y la lluvia. Los terrarios fueron colocados en el invernadero de la Unidad de Morfofisiología (19° 36' N, 98.5°11'W, 2240 m de altitud) con un ciclo de luz-oscuridad natural, temperatura y humedad ambiental.

Se les proporciono agua y alimento *ad libitum* tres veces a la semana. El alimento consistió de grillos domésticos (*Achaeta* sp); y, además, una vez por semana se les proporcionó larvas de palomilla (*Galleria mellonela*) para una mejor nutrición.



Figura 6. Terrarios de *Barisia imbricata*



Figura 7. Terrarios de *Barisia imbricata*



## ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



Unos días previos al inicio y al final del tratamiento se registraron peso y talla de cada organismo.

Se obtuvieron muestras de sangre de cada una de las hembras, al inicio, mitad y al finalizar el tratamiento. Se tomó una alícuota de sangre ( $70 \pm 10 \mu\text{l}$ ) mediante punción cardiaca, misma que se centrifugó a 6000 rpm durante 45 segundos, se decantó el plasma y se almacenó a  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta el momento del ensayo. Se determinaron los niveles de estradiol en el tratamiento con PMSG y FSH en las hembras tratadas con GnRH.

### **DETERMINACIÓN DE HORMONAS**

**Determinación de estradiol:** Se realizó por medio de radioinmunoensayo. El día del ensayo se descongelaron las muestras de sangre a temperatura ambiente para determinar la concentración de estradiol en plasma utilizando un estuche Coat-A-Count Estradiol marcado con  $\text{I}^{125}$  (ver apéndice I). El ensayo se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (MCL), Departamento de Biología de la Reproducción, en el Laboratorio de Hormonas Proteicas.

**Determinación de FSH:** Se determinó por medio de un ensayo inmunoenzimático. El día del ensayo se descongelaron las muestras sanguíneas, a temperatura ambiente, para inmediatamente después determinar la concentración de FSH en plasma (ver apéndice II) utilizando un estuche. El ensayo se desarrolló en el instituto arriba mencionado.



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de la medición del peso y talla de todos los organismos fueron analizados mediante una prueba de T de Student con un nivel de significancia de  $p > 0.05$  seguida de una prueba de Mann-Whitney. Por otro lado la medición de las hormonas se aplicó un análisis de varianza de dos vías ANOVA para el tratamiento con PMSG. En el tratamiento con GnRH se aplicó un análisis de varianzas de dos vías, seguida de una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los tratamientos hormonales tuvieron efecto sobre el desarrollo folicular.

## RESULTADOS

### EFFECTO DEL TRATAMIENTO HORMONAL SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR

Se confirmó que el ovario de todas las hembras de *B. imbricata* presentaran folículos pre-vitelogénicos (FPV) menores de 2 mm de diámetro antes de comenzar cualquier tratamiento (Fig. 8).

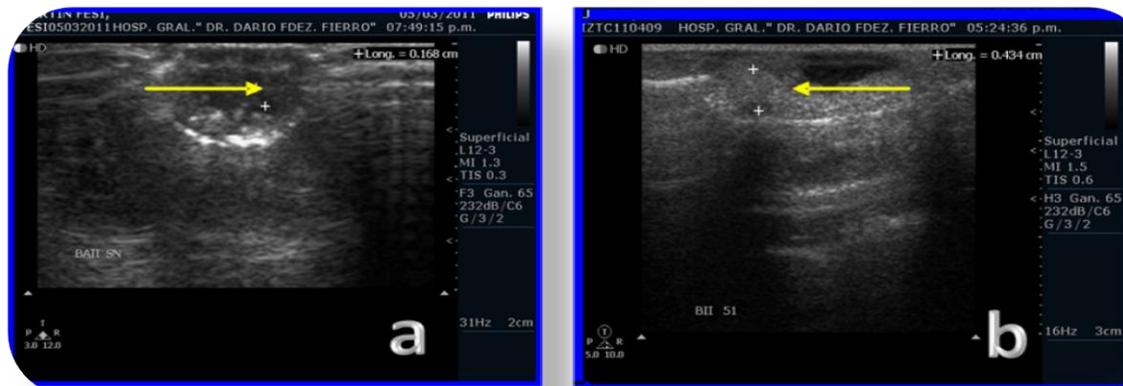


**Figura 8.** Ultrasonido del ovario de *B. Imbricata* antes de iniciar el tratamiento hormonal. a) Folículo pre-vitelogénico de una hembra nuligesta, b) Folículo pre-vitelogénico una hembra multigesta. c) Folículo pre-vitelogénico de una hembra control.

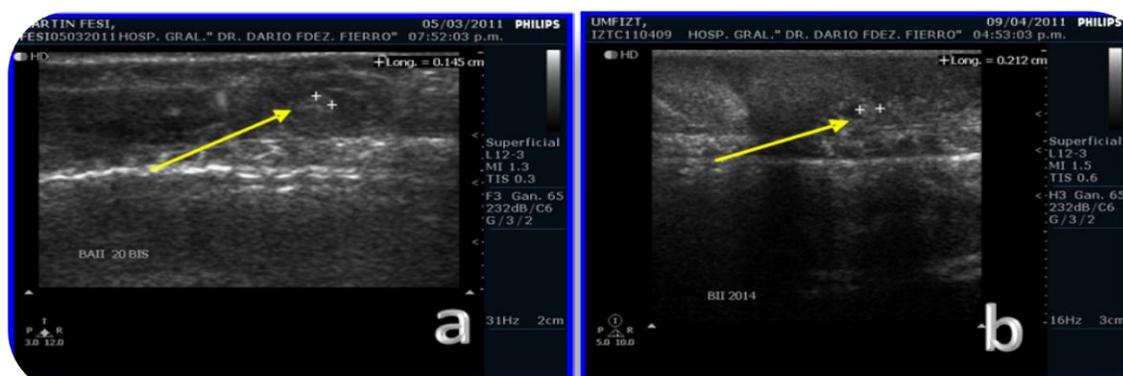


## EFFECTO DE LA GNRH

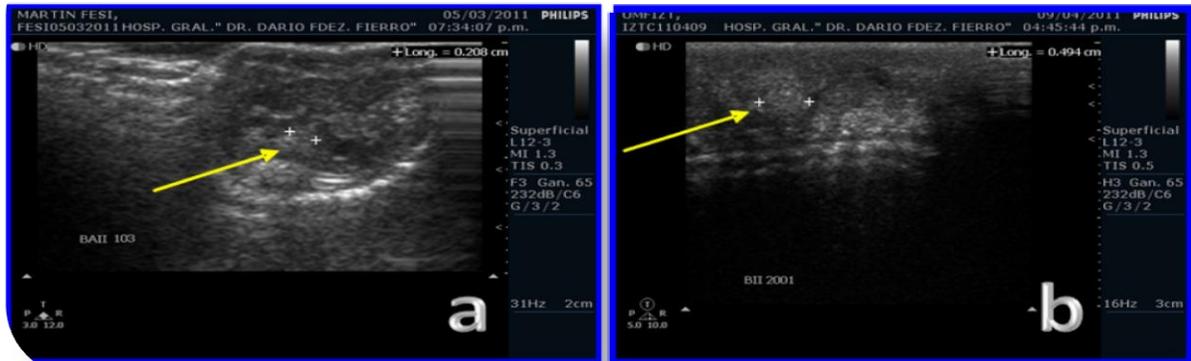
Durante el escaneo realizado al finalizar el tratamiento se observó una diferencia significativa en el tamaño de los folículos con respecto al inicio del tratamiento en los tres grupos (Cuadro 1). El aspecto del ovario durante el monitoreo realizado antes y después del tratamiento se muestra en las siguientes figuras: hembras nuligestas ( $p > 0.014$ ) (Figura 9), hembras multíparas ( $p > 0.008$ ) (Figura 10) y hembras Control ( $p > 0.001$ ) (Figura 11).



**Figura 9.** Ultrasonido del ovario de una hembra nuligesta. a) Folículo pre-vitelogénico antes de comenzar el tratamiento (1.68 mm), b) Folículo vitelogénico después del tratamiento (4.34 mm).



**Figura 10.** Ultrasonido del ovario de una hembra multigesta. a) Folículo pre-vitelogénico antes de comenzar el tratamiento (1.45 mm), b) Folículo vitelogénico después del tratamiento (2.12 mm).



**Figura 11.** Ultrasonido del ovario de una hembra del grupo control. a) Folículo pre-vitelogénico antes de comenzar el tratamiento (2.08 mm), b) Folículo vitelogénico después del tratamiento (4.94 mm).

**CUADRO 1. DIÁMETRO FOLICULAR DE *B. imbricata* TRATADAS CON GnRH**

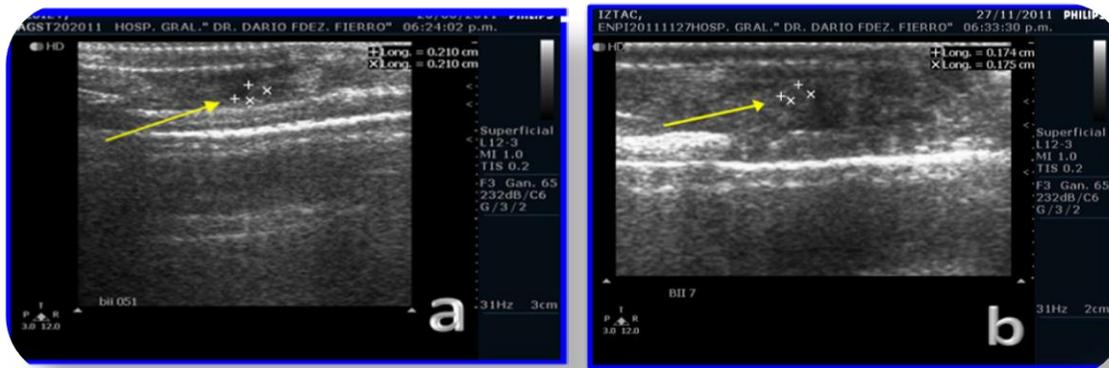
Grupos de trabajo	Promedio del ultrasonido antes del tratamiento (±SD)	Promedio del ultrasonido después del tratamiento (±SD)	Valor de P
Nuligestas	*0.39 ±0.28 (n=5)	*2.45 ±1.43 (n=5)	0.014
Multigestas	*1.00±0.95 (n=5)	*1.89 ±1.72 (n=5)	0.008
Controles	*1.40 ±1.01 (n=11)	*3.92 ±2.80 (n=11)	0.001

\*Valores en milímetros  
n=Número de organismos utilizados  
SD=Desviación Estándar



## EFFECTO DE LA PMSG

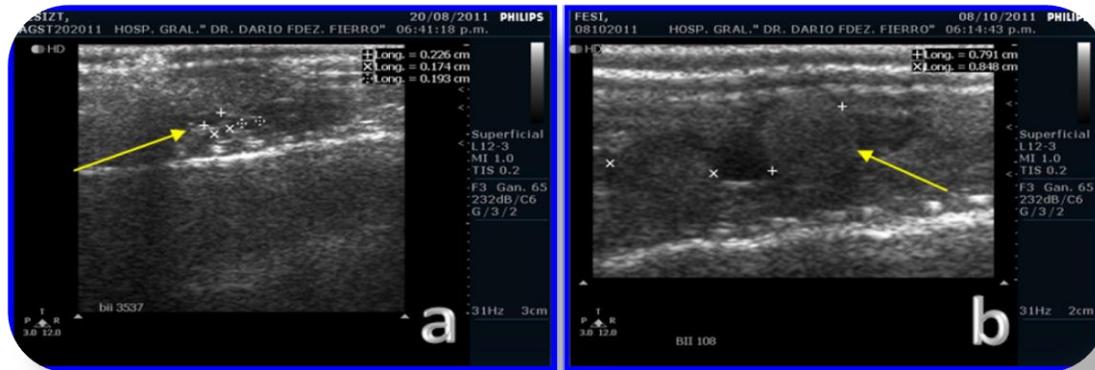
En el ultrasonido realizado al finalizar el tratamiento con PMSG no se observó un incremento significativo en el diámetro folicular de los grupos experimentales nuligestas ( $p > 0.818$ ) (Fig. 12) y multigestas ( $p > 1.000$ ) (Fig. 13). Mientras que en el grupo control ( $p > 0.027$ ) (Fig. 14), se observó un incremento en el volumen folicular (Cuadro 2).



**Figura 12.** Ultrasonido del ovario de una hembra nuligesta. a) Folículo pre-vitelogénico antes de comenzar el tratamiento (2.10 mm), b) Folículo vitelogénico después del tratamiento (1.75 mm).



**Figura 13.** Ultrasonido del ovario de una hembra multigesta. a) Folículo pre-vitelogénico antes de comenzar el tratamiento (1.44 mm), b) Folículo vitelogénico después del tratamiento (2.02 mm).



**Figura 14.** Ultrasonido del ovario de una hembra del grupo control. a) Folículo pre-vitelogénico antes de comenzar el tratamiento (2.26 mm), b) Folículo vitelogénico después del tratamiento (7.91 mm).

**CUADRO 2. DIÁMETRO FOLICULAR DE *B. imbricata* TRATADAS CON PMSG**

Grupos de trabajo	Promedio del ultrasonido antes del tratamiento (±SD)	Promedio del ultrasonido después del tratamiento (±SD)	Valor de P
Nuligestas	*2.00 ± 1.77 (n=6)	*1.95 ± 1.75 (n=6)	0.818
Multigestas	*2.23 ± 1.95 (n=7)	*2.09 ± 1.82 (n=7)	1.000
Controles	*3.00 ± 1.53 (n=7)	*5.30 ± 2.13 (n=7)	0.027

\*Valores en milímetros  
n=Número de organismos utilizados  
SD=Desviación Estándar



### EFFECTO DE LA GNRH SOBRE LOS NIVELES DE ESTRADIOL EN PLASMA

Los niveles de estradiol sólo fueron detectados en dos de los grupos: nuligestas a la mitad del tratamiento y en los controles a la mitad y al finalizar del tratamiento. Mientras que en el grupo de hembras multigestas no se observaron niveles detectables de Estradiol en ninguno de los tiempos (Cuadro 3). Por otro lado, las concentraciones de FSH con este mismo tratamiento solo fueron detectadas en multigestas a la mitad del tratamiento y en el grupo control al inicio y final del tratamiento (Cuadro 4).

CUADRO 3. EFECTO DE GnRH SOBRE LOS NIVELES DE ESTRADIOL\*

Grupos	Inicio del tratamiento (±SD)	Mitad del tratamiento (±SD)	Final del tratamiento (±SD)
Nuligestas	ND (n=5)	*6.35 ± 0.57 (n=5)	ND (n=5)
Multigestas	ND (n=7)	ND (n=7)	ND (n=7)
Controles	ND (n=11)	*0.84 ± 1.44 (n=11)	*2.26 ± 2.9 (n=11)

ND= Niveles no detectables de Estradiol

\*Valores en pg/ml

SD=Desviación Estándar

n=Número de muestras sanguíneas utilizadas



CUADRO 4. EFECTO DE GnRH SOBRE LOS NIVELES DE FSH\*

Grupos	Inicio del tratamiento (±SD)	Mitad del tratamiento (±SD)	Final del tratamiento (±SD)
Nuligestas	ND (n=5)	ND (n=5)	ND (n=5)
Multigestas	ND (n=7)	*0.92 ± 1.19 (n=7)	ND (n=7)
Controles	*0.49 ± 0.58 (n=11)	ND (n=11)	*0.56 ± 0.54 (n=11)

ND= Niveles No Detectables de Estradiol

\*Valores en mUI/L

SD=Desviación Estándar

n=Número de muestras sanguíneas utilizadas

### EFECTO DE LA PMSG SOBRE LOS NIVELES DE ESTRADIOL EN PLASMA

Las concentraciones de estradiol se muestran en el Cuadro 5. Se encontró que existían diferencias significativas en los grupos de nuligestas ( $p > 0.040$ ) y controles ( $p > 0.075$ ) a la mitad y al final del tratamiento. En cambio en el grupo multigestas ( $p > 0.836$ ) no se encontraron diferencias significativas.



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



CUADRO 5. EFECTO DEL PMSG SOBRE LOS NIVELES DE ESTRADIOL\*

Grupos	Inicio del tratamiento (±SD)	Mitad del tratamiento (±SD)	Final del tratamiento (±SD)	Valor de P
Nuligestas	*64.2 ± 20.4 <sup>a</sup> (n=6)	*27.2 ± 5.0 <sup>b</sup> (n=6)	*100.0 ± 23.2 <sup>c</sup> (n=6)	0.040
Multigestas	*32.9 ± 13.8 <sup>d</sup> (n=5)	*23.6 ± 4.1 <sup>e</sup> (n=5)	*27.3 ± 12.4 <sup>f</sup> (n=5)	0.836
Controles	*56.9 ± 15.0 <sup>g</sup> (n=6)	*33.5 ± 11.8 <sup>h</sup> (n=6)	*76.6 ± 9.2 <sup>i</sup> (n=6)	0.075

\*Valores en pg/ml

n=Número de muestras sanguíneas utilizadas

C= Es significativamente mayor con respecto a las concentraciones restantes (dentro del mismo grupo y con respecto a los restantes) con p=0.040

i=Es significativamente mayor que h con p=0.075

SD= Desviación Estándar



## DISCUSIÓN

Los saurios han sido muy utilizados como modelos para el estudio de la biología reproductora de los reptiles (Licht y Pearson, 1969; Licht, 1970; Callard *et al.*, 1972; Jones *et al.*, 1973; Martínez-Torres *et al.*, 2009 y Sosa, 2010). Fundamentalmente se han abordado aspectos de la ecología reproductora (Duvall *et al.*, 1982; Marion, 1982; Saint, 1982; Shine y Brown, 2008) mientras que los factores proximales que regulan el inicio del ciclo reproductor, (vitelogénesis o espermatogénesis) la maduración de los gametos, ovulación, etc., han sido poco estudiados (Jones *et al.*, 1973 y 1988; Ho *et al.*, 1982; Bhagyashry *et al.*, 1993; Jones y Swain, 2000). Además, la mayoría de los autores ha utilizado técnicas destructivas para analizar distintos aspectos del ciclo reproductor. Esto, además de mermar las poblaciones no permite hacer un seguimiento del proceso reproductor en el mismo organismo. Por otro lado, diversas situaciones (como el comercio ilegal de las especies, deterioro de sus hábitats, cambio en el uso de suelo, fenómenos naturales) también han contribuido a que diversas especies endémicas estén en riesgo (Erlich y Erlich, 1981). Por lo que resulta necesario iniciar esfuerzos para lograr su reproducción y crecimiento en cautiverio.

Existen diversas técnicas no-invasivas y no-destructivas que han sido utilizadas en otros países para monitorear los cambios ováricos en los reptiles como: La laparoscopia, la radiografía y más recientemente el ultrasonido (Wood *et al.*, 1983; Schildger *et al.*, 1993; Martínez-Torres *et al.*, 2006).

La laparoscopia se ha utilizado para estudiar la función ovárica de tortugas marinas como *Chelonia mydas* (Wood *et al.*, 1983), lagartijas como *Varanus*



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



*panoptes* (Schildger *et al.*, 1993) y la tuatara *Sphenodon punctatus* (Cree *et al.*, 1991). Sin embargo, no es la más apropiada para lagartijas porque se pondría en riesgo a los organismos, además el estrés causado interferiría con un desarrollo folicular apropiado. La radiografía, permite la observación de ovocitos en lagartijas ovíparas (Schildger *et al.*, 1993). Sin embargo, en los saurios vivíparos, no es útil ya que carecen de cascara. El ultrasonido ha demostrado ser una técnica no-invasiva muy eficiente para evaluar la función reproductora de cocodrilos como *Alligator mississippiensis* (Larsen y Cardeilhac, 1984),

tortugas como *Chelodina oblonga* (Kuchling y Bradshaw, 1989), serpientes como *Epicrates angulifer* (Spörle *et al.*, 1991) y en lagartijas grandes como *Varanus panoptes* (Schildger *et al.*, 1993) e *Iguana*



Figura 15. Especies de reptiles que han sido sometidos a ultrasonido

*iguana* (Orosz *et al.*, 1992) (Fig. 15). Recientemente, esta técnica se aplicó con mucho éxito en *Barisia imbricata* para estudiar el desarrollo folicular (Martínez-Torres, 2006). Además, para evaluar la condición reproductora también se han utilizado muestras sanguíneas para determinar los niveles de diversas hormonas (factores liberadores, gonadotrópicas y esteroides sexuales) (Cree *et al.*, 1991) ya sea por radioinmunoanálisis o mediante el ensayo inmunoenzimático.



En este trabajo se decidió utilizar, en conjunto, el ultrasonido y la determinación de hormonas en suero para evaluar la actividad ovárica después del tratamiento hormonal. El ultrasonido permitió seleccionar adecuadamente a las hembras utilizadas en este estudio. De otra manera no hubiese sido posible distinguir a las hembras con folículos menores a los 2 mm. Esto fue muy importante pues de acuerdo a Guillette y Casas-Andreu (1987) la vitelogenesis en esta lagartija comienza en folículos de ese diámetro.

Por otro lado, los estudios sobre el efecto de factores liberadores o gonadotropinas en reptiles han sido muy limitados, debido a la falta de disponibilidad de preparaciones con GnRH o de gonadotropinas de reptil. Por lo que en su lugar se han utilizado gonadotropinas de mamífero (Jones y Swain, 2000; Shanbhag *et al.*, 2000) o de otros vertebrados (por ejemplo, salmón, Gobbetti *et al.*, 1994) para estimular la gónada de serpientes, lagartijas y tortugas (Licht y Pearson, 1969; Licht, 1970; Callard *et al.*, 1972; Licht *et al.*, 1985). Además, existen pocos trabajos en el que la GnRH haya sido utilizada para estimular la actividad gonadal en comparación a los que se emplean en gonadotropinas. Finalmente, los modelos utilizados en estos trabajos donde se evalúa el efecto de GnRH sobre la actividad gonadal son a corto plazo e *in vitro* (Gobbetti *et al.*, 1994; Licht, *et al.*, 1985). Lo que impide saber si a largo plazo se mantiene el efecto.

Se ha observado que la administración de GnRH de mamífero y otros vertebrados es capaz de estimular la secreción de gonadotropinas hipofisarias y la estereoidogénesis en varias especies de reptiles como en las lagartijas *Podarcis sicula* (Gobbetti *et al.*, 1994), *C. versicolor* (Shanbhag *et al.*, 2000) y en la tortuga *Sternotherus odoratus* (Licht *et al.*, 1985). Por otro lado se ha



## ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



observado que el factor liberador de gonadotropinas de salmón (sGnH) en una dosis de 0.05  $\mu\text{g}$  cada 12 horas por dos días, induce un aumento de testosterona en machos de la lagartija *Podarsis sicula* (Ciarcia *et al.*, 1989) y la administración de un análogo de GnRH influencia la liberación de progesterona por folículos ováricos de esta misma especie, en un modelo *in vitro* (Varriale *et al.*, 1986). En folículos de *P. sicula* que fueron cortados e incubados con 50 ng de sGnRH de 1 a 3 horas, incrementa la producción de progesterona a la mitad de la vitelogénesis y en folículos totalmente crecidos (Gobbetti *et al.*, 1994). Otro estudio en *C. versicolor* mostró que la aplicación de GnRH de mamífero en machos en dosis de 0.5  $\mu\text{g}$ , en días alternados entre las 9000 y 1000 horas por treinta días induce tanto la recrudescencia testicular como la producción de andrógenos (Shanbhag *et al.*, 2000).

En este trabajo se logró la estimulación de la actividad ovárica con GnRH en dosis de 20 y 50  $\mu\text{g}$ . A pesar de que se encontraron diferencias significativas en todos los grupos sobre el crecimiento folicular, sin embargo, bajo estas condiciones se encontró que los folículos presentaron poca vitelogénesis en los grupos experimentales, por lo que el tamaño del folículo fue menor que en el grupo control, ya que en éste se observó una vitelogénesis más avanzada y por lo tanto un tamaño folicular mayor. Sin embargo, a pesar de haber presentado un crecimiento folicular mayor, este no fue el esperado de un ciclo reproductor natural.

Se ha observado que el crecimiento ovárico está asociado con un incremento en los niveles de 17 $\beta$ -estradiol. En *Chrysemys picta* los niveles de estradiol alcanzan 1000 pg/ml en primavera y 100 pg/ml en el otoño (Ho *et al.*, 1982). Las mediciones de estradiol plasmático en *Nerodia* muestran que las serpientes con folículos ováricos grandes tienen niveles altos de estradiol y serpientes con



foliculos en estado de hidratación tienen niveles más bajos (Lance y Callard, 1980). En el *Alligator mississippiensis* la concentración más alta de estradiol (700 pg/ml) coinciden con la presencia de foliculos vitelogénicos (Ho *et al.*, 1982). Además, en hembras de la lagartija *Sceloporus virgatus* los niveles máximos de estradiol se dan durante la vitelogénesis, y disminuyen durante el periodo de gravidez (Weiss *et al.*, 2002). En *P. sicula* la concentración de estradiol en plasma fue alta en foliculos con vitelogénesis temprana (Gobbetti *et al.*, 1994).

Contrario a los estudios anteriores, se observó que los niveles de estradiol fueron bajos en *Barisia*; además solo fue detectado en los grupos nuligestas y controles. En cuanto a los niveles plasmáticos de FSH, también se encontró que la respuesta fue baja y heterogénea. Únicamente se detectó esta hormona a la mitad del tratamiento en multigestas; mientras que en las lagartijas control, se observó al inicio y final del tratamiento. Estos resultados sugieren que el tratamiento con este factor no fue suficiente para promover un adecuado desarrollo folicular en esta lagartija. Los niveles no detectables en los grupos pueden deberse a que la vida media de GnRH es de 5-10 minutos (Conn *et al.*, 1987), por lo tanto, el efecto es poco duradero, por lo que sería necesario que la aplicación de este factor fuera prácticamente de manera constante.

Por otro lado, también existen otros factores que pudieron haber influido en la respuesta al tratamiento con GnRH:

**1.-** Que la vida media de este factor es corta (Conn *et al.*, 1987) y está circunstancia limitó la unión a sus receptores en el hipotálamo. Además, sabe que otros órganos como la gónada del gecko leopardo *Eublepharis macularius* (Ikemoto y Park, 2007), *C. versicolor* (Singh *et al.*, 2007) (Hsueh y



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



Jones, 1981), corteza adrenal (Eidne *et al.*, 1985), y el sistema nervioso central (Reubi and Maurer, 1985) poseen receptores a este péptido. Por lo que existe la posibilidad de que la dosis administrada haya sido insuficiente debido a que se unió previamente a otros tejidos antes que al hipotálamo.

**2.-** Se sabe que en los reptiles existen 2 tipos de receptores (I, como en *C. veriscolor*, II como en la tortuga *Pseudemys scripta*, el cocodrilo *Alligator mississippiensis* y la lagartija *P. sicula*. (Dubois *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta el momento se desconoce qué tipo de receptor se presenta *Barisia* y sí puede ser estimulado adecuadamente con GnRH de mamífero.

**3.-** Otra posible causa del escaso efecto del GnRH sobre el desarrollo folicular puede deberse a la variabilidad que existe en la magnitud, duración y patrón de respuesta a esta hormona. Un estudio realizado en la tortuga *Chrysemys picta*, confirma que el sexo y la condición reproductora (por lo menos en hembras) contribuyen significativamente a la respuesta natural de la pituitaria a GnRH (Licht y Porter, 1985b). Por lo que, se ha sugerido que la variabilidad de los resultados en la administración de GnRH en varios estudios puede deberse a las diferentes formas de GnRH usadas, diferentes dosis y/o duración del tratamiento (Shanbhag *et al.*, 2000).

En general, todas las especies de vertebrados tienen dos o tres formas de GnRH. La forma más conservada es GnRH-II y coexiste en todas las clases de vertebrados desde los *Chondrichthyes* en adelante (Dubois *et al.*, 2002). El receptor de GnRH está localizado en la membrana plasmática. Aunque la pituitaria es claramente el órgano objetivo para el GnRH hipotalámico, receptores de este factor han sido observados en varios tejidos de mamífero, incluyendo la gónada, corteza adrenal, y el sistema nervioso central. También se han encontrado receptores de tipo II en tejidos como placenta, endometrio,



glándulas mamarias, próstata y gónadas, sugiriendo que el tipo de receptor II puede regular la función de estos tejidos (Millar, 2003). Y estos receptores (I y II) son los que se encuentran en anfibios y reptiles (Troskie, 1998).

También se han encontrado receptores de GnRH I en gónadas de dos reptiles, el gecko leopardo *Eublepharis macularius* (Ikemoto y Park, 2007) y *Calotes versicolor* (Singh *et al.*, 2007). Además, en el ovario de *Calotes versicolor* un incremento del receptor GnRH I coincide con el periodo de actividad del desarrollo folicular, principalmente en folículos pre-vitelogénicos y folículos ovulatorios grandes (Singh *et al.*, 2008). Otros estudios han reportado que el número de receptores a GnRH varían con la edad, sexo y estatus endocrino (Marian *et la.*, 1981). Está puede ser la causa por la que GnRH no tuvo un efecto suficiente entre los grupos experimentales sobre los niveles de Estradiol y FSH.

Las gonadotropinas hipofisiarias así como sus análogos han sido utilizadas para estimular la actividad gonadal. En *Niveoscincus metallicus* las concentraciones plasmáticas de Estradiol se elevaron en hembras tratadas con FSH ovina (Sigma) a las cuales se les aplicó 6 inyecciones con una dosis de 10 µg en 25 µl de solución salina, tres veces por semana durante dos semanas al comienzo y la mitad de la vitelogénesis, sugiriendo que está hormona es capaz de estimular la esteroidogénesis ovárica (Jones y Swain, 2000). Jones y colaboradores en 1973, encontraron que en el ovario de *Leiopisma laterale*, el efecto de FSH sobre el crecimiento folicular (medido por diámetro folicular) varía con el tamaño inicial del folículo. En folículos alrededor de 0.35 mm no responden al tratamiento con FSH, mientras que en folículos de alrededor de 0.43 mm responden mejor a una dosis de 50 µg de FSH y folículos de 0.48 mm o mayores responden similarmente a dosis de 10-50 µg.



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



También se ha mostrado que la aplicación de gonadotropinas de mamífero a hembras adultas de *Anolis carolinensis*, en hembras intactas que fueron fisiológicamente hipofisectomizadas se les aplicó una dosis de 10  $\mu\text{g}$  de FSH ovina (Papkoff) cada tercer día, por dos semanas produciendo un agrandamiento del ovario y algunos ovularon. La dosis de 50  $\mu\text{g}$  sola o en combinación con 50  $\mu\text{g}$  de LH por 13 o 29 días, causa un agrandamiento anormal del ovario, pero bloquea la ovulación. En hembras hipofisectomizadas, las acciones de FSH y LH fueron similares a las descritas arriba. También dosis bajas de 0.1  $\mu\text{g}$  de FSH purificada de Papkoff promueve el desarrollo ovárico, agrandamiento del oviducto, y la ovulación en estas lagartijas (Licht, 1970). En *Uta stansburiana* y *Sceloporus occidentalis* 0.5-2  $\mu\text{g}$  de FSH purificada de Papkoff, causan la ovulación en ovarios grandes, LH sola fue ineficiente en promover la ovulación y la FSH también causa un agrandamiento en el oviducto. Así, se demuestra que tanto FSH como LH son capaces de promover el desarrollo ovárico. Pero la FSH se ha considerado más potente (Licht, 1970).

Además de las gonadotropinas hipofisiarias, la PMSG también se ha utilizado para estimular la actividad gonadal. Se ha observado que es efectiva en inducir la ovulación de *Calotes versicolor* (Bhagyashri *et al.*, 1993), promueve la espermatogénesis en jóvenes de *Barisia imbricata* (Martínez-Torres y Martínez-López, 2006), en hembras de *Sceloporus cyanogenys* acelera el desarrollo de folículos ováricos al inicio del ciclo reproductor (Callard *et al.*, 1972) y en hembras de *Barisia* con fracaso reproductor promueve el desarrollo de folículos vitelogénicos (Martínez-Torres *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros resultados son opuestos a los que se han encontrado, ya que no se observó ningún efecto sobre el tamaño folicular tanto en hembras nuligestas como



multigestas con una dosis de 10-25 UI, en cambio sí estímulo la producción de estradiol en hembras nuligestas al final del tratamiento.

Es ampliamente conocido que el estradiol promueve la vitelogénesis en diversas especies de reptiles, por lo que era de esperarse que en las hembras nuligestas hubiera un incremento en el diámetro folicular ya que el patrón de estradiol guarda cierta similitud entre las hembras nuligestas y los controles, sin embargo no se observó crecimiento del folículo.

Diversas causas pudieron interferir en la respuesta adecuada a los tratamientos hormonales tales como:

- Alimentación: se ha observado que la desnutrición interfiere con el desarrollo folicular provocando atresia folicular, además se ha demostrado que la falta de alimento puede disminuir la posibilidad de éxito reproductor en reptiles. Así cambios en la humedad y disponibilidad de alimento parecen afectar el ciclo sexual de algunos reptiles de zonas templadas (Duvall *et al.*, 1982). Con respecto a nuestros organismos otros factores pudieron haber interferido con el crecimiento folicular ya que, se les administró una alimentación adecuada y éstos no se alimentaron debidamente, lo que provocó una disminución del peso y por lo tanto el crecimiento folicular fue mínimo.
  
- Estrés por cautiverio: el cual se ha sugerido que puede interrumpir una función neuroendocrina normal, debido al estrés de la manipulación y



## ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



encierro o debido a la ausencia de un estímulo social y ambiental (Greenberg y Wingfield, 1987; Moore *et al.*, 1991). Específicamente el estrés estimula una rápida disminución en los esteroides sexuales plasmáticos en ambos machos y hembras (Mahmoud *et al.*, 1989). En la tortuga *Chrysemys picta*, muestran una disminución significativa en gonadotropinas, testosterona (T), y en las concentraciones de Tiroxina dentro de las primeras 24 h de su captura (Licht *et al.*, 1985). Lance y Elsey (1986) observaron que la T plasmática disminuye en un 50% dentro de las primeras 4 h de cautiverio en machos de *Alligátor mississippiensis*. En contraste, en un estudio en la lagartija *Sceloporus virgatus* se encontró que el cautiverio en un encierro semi-natural no tiene efecto significativo, sobre los niveles hormonales de las hembras de esta especie durante el desarrollo folicular, ni durante el periodo normal de gravidez (Weiss *et al.*, 2002). Igualmente en hembras de la serpiente *Thamnophis sirtalis* aparentemente no exhiben una respuesta al cautiverio, determinado por cambios en esteroides sexuales plasmáticos (estradiol, testosterona, progesterona) (Whittier *et al.*, 1987). Por lo tanto, se ha encontrado que el estrés parece afectar de manera diferente a machos y hembras en cuanto a la circulación de esteroides sexuales, donde los machos parecen tener una respuesta más negativa que las hembras (Mahmoud *et al.*, 1989).

Con respecto al estrés causado a nuestros organismos consideramos que pudo deberse más a la manipulación y estrés por cautiverio, lo que no le permitió a *Barisia* un adecuado estímulo con las hormonas. Y en un menor grado podría corresponder al ambiente y estrés por cautiverio.



- ➡ Licht y Pearson en 1978, observaron una retroalimentación negativa sobre la respuesta de las células de los gonadotropos en reptiles ( *A. carolinensis*, *Thamnophis radix* y *Agama agama*). Lo mismo pudo haber ocurrido en *Barisia* provocada por la estimulación de GnRH y PMSG. Sin embargo, nuestros resultados muestran un mínimo efecto sobre el crecimiento folicular, estos resultados pueden deberse más a la dosis utilizada que a una respuesta de retroalimentación negativa.

De modo que estas causas pudieron influenciar negativamente el crecimiento folicular y por lo tanto sobre los niveles de estradiol en el ovario de *Barisia imbricata*.



## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir:

- 1.- Tanto la GnRH de humano como la PMSG son capaces de estimular la actividad ovárica en la lagartija vivípara *Barisia imbricata*. Sin embargo, las dosis utilizadas 20 y 50  $\mu\text{g}$  de GnRH y 10 y 25 UI de PMSG fueron insuficientes para lograr un crecimiento adecuado.
- 2.- Los niveles de estradiol y FSH en las hembras estimuladas con PMSG y GnRH, respectivamente, sugieren que los folículos ováricos no respondieron adecuadamente al tratamiento ya que no coinciden con los niveles más altos reportados para otras especies de reptiles, y por lo tanto el crecimiento folicular no fue el esperado.
- 3.- Factores ajenos al tratamiento hormonal pudieron haber interferido con la respuesta folicular.



## APÉNDICE

### I. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Para medir la concentración de  $17\beta$  estradiol en el plasma se utilizó un estuche Coat-A-Count Estradiol y se procedió de la siguiente manera: se necesitan 4 tubos de polipropileno no etiquetados, NBS (unión inespecífica) en duplicado y 14 tubos etiquetados, con Estradiol. Tubo A (máxima unión) y B hasta G en duplicado. Se etiquetan adicionalmente tubos recubiertos con el anticuerpo para  $17\beta$  estradiol, también en duplicado, para determinar la concentración de esta hormona en las muestras controles y en los plasmas de los organismos experimentales. Posteriormente se pipetea 100 $\mu$ l del calibrador 0 A dentro de NSB y Tubos A y 100 $\mu$ l de cada uno de los calibradores de B hasta G dentro de los tubos etiquetados correspondientes. Se utilizan 50 $\mu$ l de cada muestra control y experimental dentro de los tubos preparados, pipeteando directamente del fondo. Se Adiciona un 1ml de Estradiol marcado con I  $^{125}$  a cada tubo. Enseguida se incuban por 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se decantan y finalmente se cuenta en un contador gama.

### II. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Para el ensayo Inmunoenzimático se utiliza para medir FSH en plasma. Se pipetea 100 $\mu$ l de la muestra en tubos de 1-100, enseguida se adiciona 100 $\mu$ l de



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



hFSH EIA bloqueador de reactivo a tubos de 1-100. Posteriormente se añaden 100µl de hFSH EIA Antisuero a tubos de 1-100. Se colocan 100µl de hFSH EIA Reactivo de separación a tubos de 1-100. Posteriormente se cubren los tubos y se agitan en un vortex. Enseguida se incuban los tubos durante la noche en un refrigerador a 4-8 °C. Posteriormente se colocaran los tubos en un separador magnético por 5-10 min en el refrigerador a 4-8 °C hasta que las partículas se sedimenten, a continuación se decanta el sobrenadante de los tubos. Después se hace un lavado que consiste en lavar los tubos con 500µl de solución fría de hFSH EIA buffer, colocados en un separador magnético y seguir el procedimiento antes señalado. Subsiguientemente se pipetea 200µl de hFSH EIA Enzima marcada fría en tubos, después se cubren y se agitan en un vortex, para su posterior incubación a 4-8 °C por dos horas. A continuación se colocan los tubos en un separador magnético por 5-10 min a 4-8 °C y se seguirá el protocolo antes señalado, después se realiza un segundo lavado siguiendo el procedimiento ya señalado. Finalmente para el desarrollo del color se colocan 500µl de solución substrato para los tubos 1-10, se cubren y se agitan en un vortex, después se colocan en un baño de agua a 37°C y se incuban por una hora, posteriormente se les adiciona 1ml de EIA Stop Buffer para los tubos 1-1001, se agitan en un vortex y se colocan en un separador magnético por lo menos 10 minutos, al finalizar se miden en un espectrofotómetro o en un colorímetro con una longitud de onda de 550nm.



## REFERENCIAS

- Arisawa, M; De Palatis, L; Synder Ho, R. Syndre, G. D; Yu, W. H; Pan, G; y McCann, S. M. 1990. Stimulatory role of substance P on gonadotropin release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinol* 51: 523-529.
- Ballinger, R.E. 1977. Reproductive strategies: Food availability as a source of proximal variation in a lizard. *Ecology*. 58: 259-283.
- Batten, T. F.C e Ingleton, P.M. 1987. The Hypothalamus y Pituitary en *Fundamentals of Comparative Endocrinology*. Edited by I. Chester Jones and J. G. Phillips. Part 3. Plenum Press. New York and London. pp: 285-296.
- Bartholomew, G. A. 1953. The modification by temperature of the photoperiodic control of gonadal development in the lizard *Xantusia vigilis*. *Copeia*. 1953: 45-50.
- Bellairs, A. y Attridge, J. 1975. *Los Reptiles*. Ediciones Rosario. Madrid España. Pg: 257.
- Bello, A. R; Marti, E; Lancha, A; Beauvillain, J. C; Tramu, G; y Batista, M. A. P. 1991. Presence of substance P and angiotensin II in corticotropic cells of the lizard *Galliota galloti*: Immunochemical study in the adult and during ontogenesis. *Neuroendocrinol*. 53: 614-622.
- Bhagyashri A. S. y Prasad B. S. K. 1993. Induction of ovulation by serum gonadotropin, fertilization and embryonic development in the lizard *Calotes versicolor*. *J. Herpetol*. 27: 480-481.
- Billing, H; Futura, I y Hsueh, A. J. 1994. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulose cells. *Endocrinol*. 134: 245-252.



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



- Blanco, A. 1996. Química Biológica. Sexta edición. Tercera impresión. Editorial El Ateneo. Buenos Aires. pp: 403-4020.
- Burgus, R; Butcher, M; Amoss, M; Ling, N; Monahan, M; River, J; Fellows, R; Blackwell, R; Vale, W y Guillemin, R. 1972. Primary Structure of the Ovine Hypothalamic Luteinizing Hormone-Releasing Factor (LRF). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69:278-282.
- Bustos-Zagal, M. G; Méndez-de la Cruz, F.R; Castro-Franco, R; y Villagrán-Santa Cruz, M. 2011. Ciclo reproductor de *Sceloporus ochoterenae* en el estado de Morelos, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 82: 589-597.
- Byskov, A.G. 1978. Follicular atresia en the Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution. Plenum Press, New York. Pp. 533-562.
- Callard, I. P; Bayne, C. G; y McConell, W. F. 1972. Hormones and reproduction in the female lizard *Sceloporus cyanogenys*. Gen Comp Endocrinol. 18: 175-194.
- Callard, G. V; y Ryan, K. J. 1977. Gonadotropin action and Androgen synthesis in Enzyme dispersed testicular cells of the turtle (*Chrysemys picta*). Gen. Comp. Endocrinol. 31: 141-421.
- Callard, I. P; Lance, V; Salhanick, A. R; y Barad, D. 1978. The annual ovarian cycle of *Chrysemis picta*: correlated changes in plasma steroids and parameters of vitellogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 35: 245-257.
- Casas A. y McCoy J. 1979. Anfibios y Reptiles de México; Editorial Limusa; México. pp-34.
- Ciarcia, G; Paolucci, M; y Botte, V. 1989. Effects of gonadotrophin-releasing hormone variants on reproductive organs and plasma testosterone in the male lizard, *Podarcis s. siluca*. J. Neuroendocrinol. 1: 205-208.



- ❑ Conn, M. P; McArdle, C. A; Andrews, W. V; y Huckle, W. R. 1987. The molecular basis of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) action in the Pituitary Gonadotrope. *Biol. Reprod.* 36: 17-35.
- ❑ Cree, A; Cockrem, J. E; Brown, M. A; Watson, P. R; Guillette, L. J; Newman, D. G; y Chambers G. K. 1991. Laparoscopy, radiography, and blood analyses as techniques for identifying the reproductive condition of female tuatara. *Herpetologica* 47: 238-2
- ❑ Crews. D y Garrick. L. D. 1980. Methods of inducing reproduction in captive reptiles. En *Reproductive Biology and Diseases of Captive Reptiles*. Society of Amphibians and Reptiles. pp: 49-770.
- ❑ Dressauer, H. C. 1955. Seasonal changes in the gross organ composition of the lizard *Anolis carolinensis*. *Copeia* 446-452.
- ❑ Derickson, W.K. 1976. Lipid storage and utilization. *Amer. Zool.* 16: 711-724.
- ❑ Dodd, J. M. 1977. The structure of the ovary in non mammalian vertebrates. En *the ovary*. Zuckerman, S y Weir, B. J. 2<sup>a</sup> edition. Academy Press, New York. pp: 219-263.
- ❑ Dubois, E. A; Zandbergen, M. A; Peute, J; y Goos, H. J. Th. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Comp. Endocrinol. Brain Research Bulletin.* 57: 413-418.
- ❑ Duvall D; Guillette Jr L. J; y Jones R.E. (1982). Environmental control of reptilian reproductive cycles. En: *Biology of the reptilia Vol 13D*. Ed In C Gans and F H Pough. Academy press New York. Pp201-231.
- ❑ Eidne, K. A; Hendricks, D. T; y Millard, R. P. 1985. Demonstration of a 60K molecular weight luteinizing by hormone-releasing hormone receptor in solubilized adrenal membranes by ligand-immunoblotting technique. *Endocrinol.* 116: 861-867.
- ❑ Erlich, P y Erlich, A. 1981. *Extinction: the causes and consequences of the disappearance of the species*. Random House, New York, USA.



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



- Eyeson, K. N. 1971. Pituitary control of ovarian activity in the lizard, *Agama agama*. J. Zool. London. 165: 367-372.
- Flores-Villela, O y García-Vázquez, U.O. 2014. Biodiversidad de reptiles en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 85: 467-475.
- Gobbetti, A; y Zerani, M. 1991. Gonadotropin-releasing hormone stimulates biosynthesis of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  by the interreginal gland of the water frog, *Rana esculenta*, in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 84: 434-439.
- Gobbetti, A; y Zerani, M. 1992a. A possible involvement of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) in *Rana esculenta* ovulation: Effects of mammalian gonadotropin-releasing hormone on in vitro  $PGF_{2\alpha}$  and  $17\beta$ -estradiol production from ovary and oviduct. Gen. Comp. Endocrinol. 87: 163-170.
- Gobbetti, A; y Zerani, M. 1992b. Mammalian GnRH involvement in prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and sex steroid hormones testicular release in vitro in two amphibian species: The anuran water frog, *Rana esculenta*, and the urodele-crested newt, *Triturus carnifex*. Gen. Comp. Endocrinol. 87: 240-248.
- Gobbetti, A; Zerani, M; y Di Fiore, M. M. 1994. GnRH and Substance P regulate prostaglandins and sex steroids from reptilian (*Podarcis siluca siluca*) ovarian follicles and corpora lutea. Gen. Comp. Endocrinol. 93: 153-162.
- Greenberg, N y Wingfield, J. C. 1987. Stress and reproduction: reciprocal relationships. En: Norris, D. O and Jones, R. E. Hormones and reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles. Plenum Press, New York, pp. 461-503.
- Guillette, Jr L, J. y Casas-Andreu, G. 1981. Seasonal variation in fat body weights of the Mexican high elevation lizard *Sceloporus grammicus microlepidotus*. J. Herpetol. 15: 366-371.
- Guillette, L. J y Smith, H. M. 1982. A review of the Mexican lizard *Barisia imbricate*, and the description of a new subspecies. Trans. Kansas Acad. Sci. 85: 13-33.



- Guillette, Jr L, J. y Casas-Andreu, G. 1987. The reproductive biology of the high elevation Mexican lizard *Barisia imbricata*. *Herpetol.* 43: 29-38.
- Guraya, S. S. 1978. Maturation of the follicular wall of nonmammalian vertebrates. En: *Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution*. Ed. Jones. Plenum Press. pp: 230-261.
- Guraya, S. S y Varma, S. K. 1976. Morphology of the ovarian changes during the reproductive cycle of the house lizard *Hemidactylus flaviviridis*. *Acta Morphol. Nerrl-Scand.* 14: 165-192.
- Habibi, H. R; Van der Kraak, G; Bulanski, E; y Peter, R. E. 1988. Effect of teleost GnRH I on reinitiation of oocyte meiosis in goldfish, in vitro. *American J. Physiol. Regula. Interac and Comp. Physiol.* 255: 268-273.
- Habibi H. R; Der Kraak, G; Faser, R; y Perte, R. E. 1989. Effect of a teleost GnRH I analog on steroidogenesis by the follicle-enclosed goldfish oocytes, in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 95-105.
- Hillensjo, T y LeMaire, W. J. 1980. Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes in vitro. *Nature.* 287: 145-146.
- Ho, S. M; Kleis, S; McPherson, R; Heisermann, G. J; y Callard, I. P. 1982. Regulation of vitellogenesis in reptiles. *Herpetol.* 38: 40-50.
- Hsueh, A. y Jones, P. B. 1981. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrine. Review.* 2: 437-461.
- Ikemoto, T. y Parks, M. K. 2007. Comparative analysis of the pituitary and ovarian GnRH I systems in the leopard gecko: signaling crosstalk between multiple receptor subtypes in ovarian receptor subtypes in ovarian follicles. *Endocrinol.* 38: 289-304.
- Jones. R. E. 1969. Effects of mammalian gonadotropins on the ovaries and oviducts of the lizard, *Lygosoma laterale*. *J. Exp. Zool.* 171: 217-222.



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



- Jones, R. E; Roth J. J; Gerrard, A. M; y Kiely, R. G. 1973. Effects of FSH on ovarian follicular size-gradation in *Leiopisma laterale* and *Anolis carolinensis*. Gen. Comp. Endocrinol. 20: 190-198.
- Jones, R. E; Swain, T; Guillette. J. R; y Fitzgerald, K. T. 1982. The comparative anatomy of lizard ovaries, with emphasis on the number of germinal beds. J. Herpetol. 16: 240-252.
- Jones, M. S y Swain, R. 2000. Effects of exogenous FSH on follicular recruitment in a viviparous lizard *Niveoscincus metallicus* (Scincidae). Comp. Bioquim. Physiol. 127: 487-493.
- Kennett. R; Georges. A y Palmer-Allen. M. 1993 Early developmental arrest during immersion of eggs of a tropical freshwater turtle *Chelodina rugosa* (Testudinata: Chelidae), from northern Australia. Aust. J. Zool. 41: 37-45.
- Kuchling, G. 1989. Assessment of ovarian follicles and oviductal eggs by ultrasound scanning in live freshwater turtles, *Chelodina oblonga*. Herpetologica 45: 89-94
- Lance, V y Callard, I. P. 1980. Phylogenetic trends in the hormonal control of gonadal steroidogenesis. In Evolution of vertebrate Endocrine systems. Texas Tech. Press, Lubbock. Pp. 167-232.
- Lance, V y Elsey, R. M. 1986. Stress-induced suppression of testosterone secretion in male alligators. J. Exp. Zool. 239: 241-246.
- Larsen, R. E. y P. T Cardeilhac. 1984. Artificial insemination, semen handling, and assessment of reproductive status in alligators. Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Zoo Vet. Louisville, Kentucky. P. 159
- Lembeck, F; Bernatzky. G; Gamse, R; y Saria, A. 1985. Characterization of substance P-like immunoreactivity in submammalian species by high performance liquid chromatography. Peptides 6 (Supl. 3): 213-236.
- Licht, P. 1970. Effects of mammalian gonadotropins (Ovine FSH and LH) in female lizards. Gen. Comp. Endocrinol. 14:98-106.



- ❑ Licht, P. 1972. Actions of mammalian pituitary gonadotropins (FSH and LH) in reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 19: 282-289.
- ❑ Licht P. 1979. Reproductive endocrinology of reptiles and amphibians: Gonadotropins. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 337-351.
- ❑ Licht, P; Khorrami-Yaghoobi, P; y Porter. D. A 1985a. Effects of gonadectomy and steroid treatment on plasma gonadotropins and the response of superfused pituitaries to gonadotropin-releasing hormone in the turtle *Sternotherus odoratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60: 441-449.
- ❑ Licht, P; Breitenbach, G. L; y Gongdon, J. D. 1985b. Seasonal cycles in testicular activity, gonadotropin, and thyroxine in the painted turtle, *Chrysemys picta*, under natural conditions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 130-139.
- ❑ Licht, P y Pearson A.K. 1969. Effects of mammalian gonadotropins (FSH and LH) on testes of the lizard *Anolis carolinenses*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13: 367-381.
- ❑ Licht, P y Pearson A. K. 1978. Cytophysiology of the reptilian pituitary. *Intern. Rev. Cytol. Suppl.* 7: 239-286.
- ❑ Licht, P. y Porter, D. A. 1985a. LH secretion in responses to gonadotropin releasing hormone (GnRH) by superfused pituitaries from two species of turtle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 442-449.
- ❑ Licht, P. y Porter, D. A. 1985b. In vivo and in vitro responses to gonadotropin releasing hormone in the turtle, *Chrysemys picta*, in relation to sex and reproductive stage. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60: 75-85.
- ❑ Mahmoud, Y. I; Guillette, J. L; McAsey, M. E; y Cady, C. 1989. Stress-induced changes in serum testosterone, estradiol-17 $\beta$  and progesterone in the turtle, *Chelydra serpentina*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A: 423-427.
- ❑ Marian, J; Cooper, R. L; y Conn, P. M. 1981. Regulation of the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol. Pharmacol.* 19: 399-405.



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



- Marion, K. R. 1970. Temperature as the reproductive cue for the female fence lizard *Sceloporus undulates*. *Copeia*. 1970: 562-564.
- Marshall, A. J y Hook, R. 1960. The breeding biology of equatorial vertebrates: Reproduction of the lizard *Agama agama lionotus* Bouelenger at lat. 0° 01N. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 134: 193-205.
- Martínez-Torres, M. 1997. Placentación y participación del cuerpo lúteo en el mantenimiento de la gestación de *Barisia imbricata imbricata*. Una perspectiva evolutiva. (Reptilia: Anguide). Tesis de Maestría, U.N.A.M.
- Martínez-Torres, M y Martínez-López, F. J. 2006. Efecto de la PMSG y de la hCG sobre la gónada de juveniles de *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae). IX Reunión Nacional de Herpetología. Monterrey, Nuevo León, México.
- Martínez-Torres, M; Guzmán-Rodríguez, M; Cárdenas-León y Brunner-Reynaldo, N. 2006. Follicular development ovulation determined by ultrasound imaging in the viviparous lizard *Barisia imbricate* (Reptilia: Anguidae). *South. Natural.* 51: 41-46.
- Martínez-Torres, M; Salcedo-Álvarez, M; Guzmán-Rodríguez, R; Ortiz-López, G; y Hernández-Esparza, T. 2009. Fracaso reproductor en la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguide). *Mesoamericana.* 13: 61-63.
- Matsuo, H; Baba, Y; Nair, N. M. G; Arimura, A y Schally, A. V. 1971. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1334-1339.
- Millar, R. P. 2003. GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends. Endocrinol. Metabol.* 14: 35-43.
- Nabissi, M; Pati, D; Polzonetti-Magni, A. M; y Habibi, R. H. 1997. Presence and activity of compounds with GnRH-like activity in the ovary of seabream *Sparus aurata*. *American. J. Physiol.* 272: 11-117.
- Norris, D.O. 2007. *Vertebrate Endocrinology*. Cuarta edición. Editorial Academic Press. Amsterdam. pp: 107-191.



- ❑ Orosz, S. E; Toal, L. T; Korenek, N. L; y Teuber, V A. 1992. Follicular aspiration for the treatment of pre-ovulatory egg binding in a green iguana. *J. Small Exotic Anim. Med.* 1: 161-16
- ❑ Parborell, F; Pecci, A; Gonzalez, O; Vitale, A; y Tesone, M. 2002. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol. Repro.* 67: 481-486.
- ❑ Pati, D. y Habibi, H. R. 1998. Presence of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH I) and compounds with GnRH I-like activity in the ovary of goldfish. *Endocrinol.* 139: 2015-2024.
- ❑ Pitzel, L; Jarry, H; y Wuttke, W. 1991. Effects of substance P and neuropeptide Y on in vitro steroid released by porcine granulosa and luteal cells. *Endocrinol.* 129: 1059-1065.
- ❑ Powell, R. C; Ciarcia, G; Lance, V; Millar, R.P; y King, J. A. 1986. Identification of diverse molecular forms of GnRH in reptile brain. *Peptides* 7: 1101-1108.
- ❑ Ramírez-Bautista, A; Ortiz-Cruz, A. L; M. del Coro A. y Campos J. 2005. Reproductive characteristics of two syntopic lizards species *Sceloporus gadoviae* and *Sceloporus jalapae* (Squamata: Phrynosomatidae), from Tehuacán Valley, Puebla, México. *Western North American Naturalist* 65:202-209.
- ❑ Reddy, P.R.R.K y Prasad, M.R.N. 1970. Hormonal control of the maintenance of spermatogenesis and sexual segment in the Indian house lizard *Hemidactylus flaviviridis*. *Gen. Comp. Edocrinol.* 14: 15-24.
- ❑ Reubi, J. C. y Maurer, R. 1985. Visualization of LHRH receptors in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 106 : 453-456.
- ❑ Saidapur, S. K. 1982. Structure and function of postovulatory follicles (corpora lutea) in the ovaries of non mammals vertebrates. *Int. Rev. Cytol. Indian Acad. Sci.* 21: 143-174.



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



- Saint, G. H. 1982. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. *Herpetol.* 38: 5-16.
- Schildger, B. J; Kramer, M; Spörle, H; Gerwing, M; y Wicker, R. 1993. Vergleichende bildgebende Ovardiagnostik bei Echsen am Beispiel des Chuckwallas (*Sauromalus obesus*) und des Arguswarans (*Varanus panoptes*). *Salamandra* 29: 240-247
- Shanbhag, B. A; Radder, R. S; y Saidapur S. K. 2000. GnRH but not warm temperature induces recrudescence of quiescent testes in the tropical lizard *Calotes versicolor* (Daud) during postbreeding phase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119: 232-238.
- Shine, R y Brown, G. 2008. Adapting to the unpredictable: reproductive biology of vertebrates in the Australian wet- dry tropics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 363-373.
- Singh, P; Krishna, A; y Sridaran, R. 2007. Localization of gonadotrophin I, bradykinin and their receptors in the ovaries of non-mammalian vertebrates. *Reprod.* 133: 969-981.
- Singh, P; Krishna, A; Sridaran, R; y Tsutsui K. 2008. Canges in GnRH I, bradykinin and their receptors and GnIH in the ovary of *Calotes versicolor* during reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159: 158-169.
- Sosa-Aguilar, L.R. 2010. Efecto de la gonadotropina coriónica humana sobre la actividad ovárica de hembras preñadas de la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguilde). Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán UNAM.
- Spörle, H; Kramer, M; Göbel, T y Gerwing, M. 1991. Sonographische Graviditäts- und Ovarialdiagnostik bei Schlangen. *Der Praktische Tierarzt* 4: 286-29
- Tinkle, D. e Irwin, L. 1965. Lizard, *Reproduction: Refractory period and response to warmth Uta stansburiana* females. *Science.* 148: 1613-1614.



- ❑ Troske, B. 1998. Identification of three putative GnRH receptor subtypes in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 296-302.
- ❑ Varriale, B; Pierantoni, R; Di Matteo, L; Minucci, S; y Chieffi, G. 1986. In vitro GnRH $\alpha$  (HOE766) effects on ovarian steroid-output in non mammalian vertebrates. *Boll. Zool.* 53: 381-383.
- ❑ Villamar-Duque, T. E. 1998. Contribución al conocimiento de las preferencias térmicas en Anguidos (Reptilia, Sauria). Tesis de Licenciatura. FES Iztacala UNAM. pp 40-47.
- ❑ Vitt, L. J. y Caldwell, J. P. 2014. *Herpetology an introductory biology of amphibians and reptiles.* 4<sup>ta</sup> edition. Ed, Academy Press. USA.
- ❑ Xavier, F. 1987. Functional morphology and regulation of the corpus luteum. *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles.* Ed. D.O. Norris and R.E. Jones. Plenum Press. Pp: 241-82.
- ❑ Weiss, S. L; Jennings, D. H y Moore, M. C. 2002. Effect of captivity in semi-natural enclosures on the reproductive endocrinology of female lizards. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128: 238-246.
- ❑ Whittier, J. M; Mason, R. T; y Crews, D. 1987. Plasma steroid hormone levels of female red-sided garter snakes, *Thamnophis sirtalis parietalis*: relationships to mating and gestation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 67: 33-43.
- ❑ Wood, J. R; Wood F. E; Critchley, K. H; Wildt, D. E; y Bush, M. 1983. Laparoscopy of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Br. J. Herpetol.* 6: 323-327.
- ❑ Yaron, Z. 1985. Reptilian placentation and gestation: structure, function and endocrine control. En *Biology of the reptilian* vol, 15. Ed: Gans and F. Billet. Jhon Wiley and Sons. New York. Pp: 528-603



ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS NULIGESTAS Y MULTIGESTAS DE LA LAGARTIJA VIVÍPARA (*Barisia imbricata imbricata*) CON HORMONAS DE MAMÍFERO



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MEXICO