



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA EN LA LAGARTIJA VIVÍPARA *Barisia imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE) MEDIANTE EL MANEJO DE LA TEMPERATURA Y ADMINISTRACIÓN DE PMSG”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NORMA BERENICE CRUZ CANO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARTÍN MARTÍNEZ TORRES
UNAM, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMITÉ TUTOR: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS
UNAM, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DRA. MARÍA DEL CARMEN URIBE ARANZÁBAL
UNAM, FACULTAD DE CIENCIAS

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA EN LA LAGARTIJA VIVÍPARA *Barisia imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE) MEDIANTE EL MANEJO DE LA TEMPERATURA Y ADMINISTRACIÓN DE PMSG”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NORMA BERENICE CRUZ CANO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARTÍN MARTÍNEZ TORRES

UNAM, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS

UNAM, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DRA. MARÍA DEL CARMEN URIBE ARANZÁBAL

UNAM, FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2017.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de febrero de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **NORMA BERENICE CRUZ CANO**, con número de cuenta 307691202, con la tesis titulada "Inducción de la actividad ovárica en la lagartija vivípara *Barisia imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE) mediante el manejo de la temperatura y administración de PMSG", realizada bajo la dirección del **DR. MARTÍN MARTÍNEZ TORRES**:

Presidente: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
Vocal: DR. MANUEL FERIA ORTÍZ
Secretario: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS
Suplente: M. en C. MARIO CÁRDENAS LEÓN
Suplente: DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRÁN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de marzo de 2017.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARÍZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM** (Biología experimental) por permitir realizar mis estudios de maestría y permitirme adquirir nuevos conocimientos para mejorar en el ámbito profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca proporcionada para dedicarme de tiempo completo a mis estudios de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM. No. CVU. 621940.

A mi tutor principal:

Dr. Martín Martínez Torres.

A mi Comité Tutorial:

Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas y Dra. María del Carmen Uribe Aránzabal.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Mario Cárdenas León de Instituto Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por el apoyo y paciencia en las técnicas de ELISA y RIA.

A la Dra. María Maricela Campos Solórzano por el apoyo con los ultrasonidos.

A los miembros del jurado: Dra. Leticia Ledesma Morales, Dr. Manuel Feria Ortiz, Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, M. en C. Mario Cárdenas León y Dra. María Esther Cruz Beltrán por el tiempo y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mi tutor el Dr. Martín Martínez Torres por haber aceptado el proyecto y todas sus enseñanzas.

Al personal (especialmente a la maestra Gina Irene Cano Vargas), padres de familia y alumnos de la Escuela Primaria Justo Sierra Méndez del municipio de Melchor Ocampo, Tenopalco por su ayuda e interés en el proyecto.

A Fernando Jovany Miguel Cano por su apoyo en todo, desde las colectas hasta la compra de la hormona.

A mis amigos de laboratorio que me apoyaron en las colectas y las operaciones (Francisco, Uriel, Yabín, Alejandro y J.J.). Mención especial para Uriel y Yabín por sus comentarios de la tesis ☺.

A la M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez por el apoyo en el laboratorio.

A mi familia por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado

A *B. imbricata* por que sin ella este proyecto no existiría.

DEDICATORIA

A mi familia, que son el mejor regalo que me ha dado la vida. Nunca olviden que los amo demasiado y son todo para mí. Siempre haré lo posible y hasta lo imposible por ustedes. Mami por ser la mujer ideal y mi ejemplo a seguir. Papá por todo el cariño que siempre has mostrado. A mis hermanos, que son los mejores amigos que tengo, que siempre me han protegido y me motivan a seguir adelante.

Al Dr. Martín por impulsarme a siempre dar lo mejor de mí y a tener confianza de mis conocimientos, por confiar siempre en mí, incluso más de lo que yo lo hacía. Por reafirmar en mí que lo importante no es cumplir con un requisito, si no estar feliz con el trabajo que estás haciendo aunque pueda ser difícil y lleve tiempo. Principalmente por ser un tutor que considera que también puede aprender de los alumnos y esas largas discusiones que me permitieron desarrollar un mejor pensamiento crítico.

A mis amigos de la carrera y laboratorio: Fer, Isa, Mary, Uriel, Yabín, Francisco, Alejandro, Luis, Lalo, J. J., Ariel y Brenda, por esas salidas y los momentos divertidos en el laboratorio. Especialmente al grupo de los ectotermos, con los que he compartido muchos momentos desde las colectas, operaciones y congresos, los quiero mucho. Recuerden que lo mejor está aún por venir.

A la Dra. Juanita y la maestra Carmen por los consejos y el apoyo.

Y a todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo.

“It's the questions we can't answer that teach us the most. They teach us how to think. If you give a man an answer, all he gains is a little fact. But give him a question and he'll look for his own answers.”

— Patrick Rothfuss, *The Wise Man's Fear*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	35
JUSTIFICACIÓN	42
OBJETIVO GENERAL	43
HIPÓTESIS	44
MATERIAL Y MÉTODOS	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	69
LITERATURA CITADA	70
ANEXOS	91

Índice de figuras.

Figura 1. Aparato reproductor de hembra de <i>B. imbricata</i> ..	8
Figura 2. Representación esquemática de la distribución de neuronas inmunoreactivas a GnRH en el cerebro de la lagartija <i>Podarcis sicula</i> .	10
Figura 3. Rutas Δ^4 y Δ^5 para la esteroidogénesis de andrógenos a partir de la pregnenolona.	13
Figura 4. Síntesis de los estrógenos a partir de los andrógenos	14
Figura 5. Estructura química del 17- β estradiol, estrona y estriol	15
Figura 6. Estructura química de la testosterona	16
Figura 7. Estructura química de la progesterona	17
Figura 9. Esquema del patrón general del estradiol y progesterona en la lagartija <i>Calotes versicolor</i> .	21
Figura 10. Proceso de ingreso de la vitelogenina al ovocito durante la vitelogénesis.	22
Figura 11. Cuerpo lúteo de <i>B. imbricata</i>	24
Figura 12. Efecto de la temperatura sobre el eje HHG.	27
Figura 13. Efecto del fotoperiodo sobre el eje HHG.	29
Figura 14. Efecto del alimento sobre el eje HHG.	31
Figura 15. Efecto del estrés sobre el eje HHG.	34
Figura 16. a) Macho de <i>B. imbricata</i> . b) Hembra de <i>B. imbricata</i> .	39
Figura 17. Área de distribución potencial de <i>B. imbricata</i>	40
Figura 18. Diámetros foliculares y volumen testicular en los distintos meses de año del ciclo reproductor en <i>B. imbricata</i> .	41
Figura 19. Mapa del sitio de colecta.	45
Figura 20. Relación de las concentraciones de estradiol con la talla del organismo	53
Figura 21. Folículos de <i>B. imbricata</i> con diámetros heterogéneos	55
Figura 22. Folículos de <i>B. imbricata</i> inducidos	57
Figura 23. a) Folículo a punto de ovular de <i>B. imbricata</i> . b) Organismo con huevos en el oviducto. c) Cuerpo lúteo <i>in vivo</i> (*). d) Cuerpo lúteo teñido con hematoxilina- eosina.	58
Figura 24. Folículos observados en las laparotomías durante el período natural de ovogénesis en hembras de <i>Barisia imbricata</i> .	61
Figura 25. Media y EEM de los diámetros foliculares y concentraciones de estradiol de los organismos colectados en campo colectados mensualmente a lo largo de un año	65
Figura 26. Media y EEM de las concentraciones de a) estradiol en las distintas etapas de la vitelogénesis	66
Figura 27. Encierros donde se mantuvo a los organismos.	93
Figura 28. Terrarios donde se mantuvo a los organismos sometidos a tratamiento de temperatura.	93
Figura 29. Lugar del sitio de colecta en temporada húmeda.	94
Figura 30. Lugar del sitio de colecta en temporada seca.	94
Figura 31. Folículos de <i>B. imbricata</i> observados en el ultrasonido.	95
Figura 32. Folículos de <i>B. imbricata</i> observados en el ultrasonido.	95

Figura 33. Embriones de <i>B. imbricata</i> observados en el ultrasonido.....	96
Figura 34. Laparotomía de <i>B. imbricata</i>	96
Figura 35. Medición de folículos de <i>B. imbricata</i>	97
Figura 36. Punción intracardiaca para toma de muestras de sangre.	97
Figura 37. Huevos en oviducto de <i>B. imbricata</i>	98
Figura 38. Huevos en oviducto de <i>B. imbricata</i>	98
Figura 39. Cuerpos Lúteos de <i>B. imbricata</i>	99
Figura 40. Gástrula de <i>B. imbricata</i>	99
Figura 41. Placas ensayo ELISA.	100
Figura 42. Espectrofotómetro para ELISA.	100
Figura 43. Lector de rayos gamma.	101

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Concentraciones de Estradiol [pg/ml] en saurios.	36
Cuadro 2. Concentraciones de Estradiol [pg/ml] en saurios.	37
Cuadro 3. Concentraciones de estradiol [pg/ml] de organismos control y sometidos a tratamiento de temperatura.	52
Cuadro 4. Porcentaje de diámetros foliculares.	56
Cuadro 5. Concentraciones de E ₂ [pg/ml] en el plasma de <i>B. Imbricata</i> de organsimos sometidos a tratamiento hormonal.	59
Cuadro 6. Diámetros y características de los folículos de <i>Barisia imbricata</i> durante los meses de Junio a Noviembre.	63
Cuadro 7. Desarrollo embrionario en <i>B. imbricata</i> . Establecido de acuerdo a Dufaure y Hubert (1961).	64

RESUMEN

Hasta agosto del 2015 se tenían registradas 6145 especies de saurios, actualmente su abundancia y diversidad se está viendo afectada por diversos factores como: la sobreexplotación de recursos, la alteración de su hábitat, introducción de especies exóticas, la contaminación y el cambio climático. Por lo anterior, el conocimiento de la regulación de los ciclos reproductores, tanto ambiental como hormonal, que inciden sobre la actividad ovárica de los saurios permitirá implementar otro tipo de planes de manejo, no sólo para la reproducción de las especies, si no también para usarlos como modelos experimentales para estudiar tópicos que aún no han sido investigados implementando estrategias que limiten el sacrificio de organismos. El objetivo de este trabajo fue Inducir la actividad ovárica en la lagartija vivípara *B. imbricata* mediante la manipulación de la temperatura y la administración de gonadotropinas de suero de yegua preñada (PMSG). El desarrollo folicular fue evaluado mediante palpación de los organismos, ultrasonidos y laparotomías. También se realizó la cuantificación de las concentraciones de estradiol mediante ELISA y LH por RIA en los grupos experimentales y en organismos silvestres colectados a lo largo de un año. Trece hembras fueron sometidas a temperaturas de 30 a 32°C en el día (10 horas) y 23 a 25°C en la noche (14 horas) con una humedad relativa de 50-60%, durante 12 semanas, para inducir la recrudescencia gonadal y el desarrollo folicular, sin embargo, no se observó desarrollo de folículos vitelogénicos, lo cual podría deberse a que la temperatura constante provocó un estrés que interfirió en la liberación de gonadotropinas. Los organismos no mostraron una concentración de estradiol significativamente mayor que el grupo control; al realizar una correlación entre las concentraciones de estradiol y el tamaño de los organismos se puede observar que a menor talla de los organismos las concentraciones de esta hormona eran mayores. Esto probablemente se deba a que requieran de concentraciones elevadas de estrógenos para poder involucionar los hemipenes (las hembras de esta especie presentan estas estructuras en etapas juveniles y desaparecen en la fase preadulta). Estas observaciones sugieren que aún no alcanzaban la madurez sexual necesaria para responder a un estímulo térmico.

Se realizaron dos experimentos para la estimulación del desarrollo folicular con PMSG : En el primero se administró una dosis de (2UI/g) vía intraperitoneal de PMSG cada tercer día durante 20 semanas a 13 hembras preadultas y un grupo control (n=10) a las que se les administró solo el diluyente. Cada hembra desarrolló en promedio un número mayor de folículos (22 ± 4.22) a los que se observan en un ciclo natural (n = 10-16) con diámetros heterogéneos y sin llegar al volumen preovulatorio. Estas observaciones sugieren que la dosis utilizada indujo más de un reclutamiento (aproximadamente uno cada tres semanas) y crecimiento de estos folículos y que a pesar de que en el medio intraovárico pudo haber inhibina y hormona antimülleriana (hormonas que impiden el desarrollo de nuevos folículos), el efecto de estas pudo haber sido impedido debido a la administración constante del análogo de FSH. Esto ocasionó que el vitelo fuera repartido entre los folículos de los múltiples reclutamientos, superando la cantidad de folículos que se esperarían con el tiempo de tratamiento y en consecuencia no todos alcanzaron los diámetros foliculares preovulatorios. Lo anterior llevó a un segundo experimento con 13 hembras nuligestas a las cuales se les administró una dosis de “reclutamiento” de 2UI/g de peso corporal de PMSG durante tres semanas y una de “soporte” de 0.5UI/g de peso corporal durante 13 semanas. Al finalizar el tratamiento se observó que el número de folículos y las concentraciones de estradiol fueron similares a las que se registran durante un ciclo ovogénico natural y que los diámetros foliculares eran más homogéneos. En 3 organismos se observaron huevos en el útero y cuerpos lúteos en fase 1 de regresión, indicativos de que hubo la ovulación.

Se comprobó que la actividad ovogénica puede ser inducida fuera de la temporada gametogénica mediante la administración de hormonas, lo cual sugiere que la fase de quiescencia en esta especie se debe a la falta de estimulación por gonadotropinas. Finalmente se logró inducir un ciclo completo semejante al que se da en poblaciones naturales desde el desarrollo folicular hasta la ovulación, evento que no había sido logrado antes de acuerdo a la literatura revisada.

ABSTRACT

Until august 2015, there were reported 6145 saurians species, nowadays their abundance and diversity is being affected by many factors including: resource overexploitation, habitat change, introduction of exotic species, pollution and global climate change. Therefore the knowledge of the mechanisms underlying the hormonal and environmental regulation of the ovaric activity in saurians, will allow to improve the management, not only for species reproduction but to use them as models to study other topics that have not been studied limiting the sacrifice of individuals. The aim of this study was to induce the ovaric activity by two means: manipulating the temperature and administrating Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG). Follicular development was evaluated through all the experiments by palpation, ultrasounds and laparotomies. During one year, mensual concentrations of plasma E_2 and LH were measured by ELISA and RIA, respectively, in all experimental groups and a natural population. Thirteen females were kept at 30-32°C during day (10hrs) and 23-25°C in the night (14 hrs) with a relative humidity of 50-60% during 12 weeks, to induce gonadal recrudescence and follicular development. Vitelogenic follicles were not observed, it could have been a consequence on the secretion of gonadotropins caused by the stress to the increase of temperature. Although this group didn't show significative higher estradiol concentrations than the control, a correlation reveals an inverse relationship between the size and this hormone concentration. Since the females of this lizard need to regress the hemipenis (these structures are present in the juveniles and regress in mature females) they could need a high concentration of estradiol for this process. These observations suggests that the females did not reach the sexual maturity to respond to a termal stimulus.

Two experiments with PMSG were performed: In the first one 13 lizards received, by intraperitoneal injection, a 2IU/gr for 20 weeks, the control group (n = 10) received only the diluent. Each experimental females developed a higher number of follicles (22 ± 4.22) than the registered on a natural population (n = 10-

16) which had heterogeneous diameters and did not reach a preovulatory volume. This suggested that the dosage used was promoting more than one follicular recruitment (approximately one each three weeks) and growth of these even though in the intraovarian environment there could be inhibin and anti müllerian hormone (hormones that limit the development of new follicles), the effect of these factors may have been diminished by the constant administration of an analogous of FSH. This situation may lead that the follicles did not reach the preovulatory volume because the yolk was distributed in the follicles of different recruitments, surpassing the number of follicles expected with the treatment. Previous results led to a second experiment where 13 females received a "recruitment" dosage of 2 IU/gr of PMSG for 3 weeks and a "support" dosage of 0.5 IU/gr for 13 weeks. At the end of the treatment, estradiol concentrations, number and diameters of the follicles were similar to the registered on a natural population. Three females showed eggs in the oviduct and corpus luteum in phase 1 of regression, evidence of ovulation.

We confirmed that the ovarian recrudescence can be induced in the non reproductive season with administration of hormones; therefore the quiescent phase in this lizard can be attributed to the lack of stimulation by gonadotropins. Finally, we induced the development of a complete cycle; similar to the one observed in natural populations, event that wasn't reached before according to the literature revised.

INTRODUCCIÓN

Hasta agosto del 2015 (Reptile database, 2016) se tenían registradas 6145 especies de saurios. Estos reptiles son un modelo ideal para estudiar diferentes aspectos de la biología reproductora ya que exhiben una gran variación en el comportamiento para el apareamiento al emitir señales visuales (coloraciones) (como los observados en especies como *Urosaurus ornatus* (Thompson *et al.*, 1993) y *Tiliqua rugosa* (Leu *et al.*, 2016), en las cuales se distinguen distintos morfos, químicas (como en la lagartija *Urosaurus ornatus* (Thompson y Moore, 1993) y el gecko *Eublepharis macularius* (LaDage y Ferkin, 2006), que a través de las glándulas femorales emiten feromonas) y cortejos (movimientos de cola, vibraciones, push ups “lagartijas”) (La Dage *et al.*, 2016). También presentan distintas formas de paridad (ovípara como en *Paroedura picta* (Weiser *et al.*, 2012) y vivípara como en *Tiliqua nigrolutea* (Edwards y Jones, 2001)), de nutrición embrionaria: lecitotrófica (en la cual el embrión cumple las demandas nutricionales con el vitelo) como en *Elamprus quoyii* (Murphy *et al.*, 2011) y placentotrófica-matrotrófica (además del vitelo existe intercambio de nutrientes de origen extravitelino durante el desarrollo embrionario) como en los géneros *Mabuya* (Ramírez-Pinilla, 2014). Asimismo varios tipos de placenta alantoplacenta, onfaloplacenta y placenta corioalantoidea (3 tipos) (Blackburn, 1993; Thompson *et al.*, 2011 y Johnson y Wade, 2011). Además de diversas estrategias para regular la ocurrencia de los ciclos reproductores, los cuales pueden ser clasificados de acuerdo a su duración en estacionales como *Barisia imbricata* (Guillette y Casas-Andreu, 1987) o continuos como *Cnemidophorus natio* (Menezes *et al.*, 2004). Por la relación entre el apareamiento, secreción de hormonas esteroideas y gametogénesis en: prenupciales o post nupciales (Lovern, 2011).

En la mayoría de los ciclos, los eventos como el apareamiento y la gametogénesis están relacionados con un incremento en las concentraciones de hormonas esteroideas (Moore y Crews, 1986; Edwards y Jones, 2001; Radder *et*

al., 2001; Weiss *et al.*, 2002; Wack *et al.*, 2008; Kummrow *et al.*, 2010). Los ciclos continuos se presentan generalmente en ambientes de latitudes bajas en donde los factores ambientales son más constantes (zonas tropicales), en estas especies se pueden observar organismos reproductores en distintas etapas del año (Cruz-Elizalde y Ramírez-Bautista, 2016). A diferencia de los ciclos continuos, la reproducción estacional se observa en lagartijas de zonas en donde los cambios entre estaciones son muy marcados. Particularmente en climas templados, se observa un ciclo en el que el apareamiento y la gametogénesis se pueden dar en otoño y el parto o eclosión de las crías en el verano siguiente (Méndez *et al.*, 1988; Pianka y Vitt, 2003).

Se ha detectado variación en las características de historia de vida como: talla a la que pueden reproducirse, fecundidad, tamaño del huevo o folículo, tamaño de la camada en especies como *Zootoca vivipara* (Roitberg *et al.*, 2013; Horváthova *et al.*, 2013), *Lacerta agilis* (Roitberg *et al.*, 2015), *Sceloporus grammicus* (Ramírez Bautista *et al.*, 2012), *Sceloporus variabilis* (Cruz-Elizalde y Ramírez Bautista, 2016), *Anolis nebulosus* (Hernández-Salinas y Ramírez-Bautista, 2015) y *Takydromus septentrionalis* (Wei-Guo *et al.*, 2005), mismas que son atribuidas a las distintas condiciones ambientales (temperatura, humedad, fotoperiodo, disponibilidad de alimento) a las que se encuentran sometidas las poblaciones (Duvall *et al.*, 1982; Lovern, 2011; Jones, 2015). La variación que se observa en las historias de vida se puede originar ya sea por diferencias genéticas o ambientales entre las poblaciones, sin embargo, es difícil determinar si estas diferencias son sólo una respuesta fenotípica (plasticidad o una respuesta a la selección local o adaptación) (Roitberg *et al.*, 2013).

Existen diferencias marcadas en cuanto al inicio del recrudesimiento gonadal entre las especies e incluso entre poblaciones de especies como *B. imbricata* (Guillette y Casas-Andreu, 1987), *S. grammicus* (Jiménez-Cruz *et al.*, 2005; Zuñiga-Vega *et al.*, 2008 y Lozano *et al.*, 2014), *S. variabilis* (Cruz-Elizalde y Ramírez-Bautista, 2016). También la respuesta a los factores ambientales puede ser distinta dependiendo del sexo en especies como *B. imbricata* (Guillette y Casas-Andreu, 1987) y *Phyllodactylus lanei* (Ramírez-Sandoval *et al.*, 2006). Dado

lo anterior, es de suma importancia comparar los ciclos espermátogénicos y ovogénicos de distintas poblaciones para poder tener un punto de referencia cuando se estén comparando ciclos reproductores.

Aparato reproductor de las hembras de los saurios.

El ovario tiene dos funciones principales: la producción de gametos y la secreción de hormonas (Jones, 2011). Las hembras de los saurios presentan ovarios pareados, que se encuentran sujetos a la pared dorsal del cuerpo mediante el mesovario (Ramírez-Pinilla *et al.*, 2014); estos son huecos y consisten de una corteza cubierta de epitelio ovárico y la túnica albúginea (Guraya, 1989) además de oviductos pareados, los cuales están formados por segmentos morfológicamente distintos: infundíbulo (receptor del huevo recién ovulado), tubo uterino (secreción de sustancias y almacenamiento de espermatozoides), istmo (región de transición), útero y vagina (almacenamiento de espermatozoides y actúa como un esfínter en la gravidez o gestación) (Figura 1) (Girling *et al.*, 1995; y Girling, 2002).

Cada ovario está cubierto por un epitelio y contiene folículos y cuerpos lúteos dentro de un estroma de tejido conectivo. El lecho germinal (lugar donde ocurre la multiplicación de la ovogonias y la formación de folículos primordiales) está constituido por pequeñas regiones ubicadas en la superficie dorsal del ovario, las cuales contienen ovogonias dividiéndose, ovocitos y folículos primordiales (Guraya, 1989).

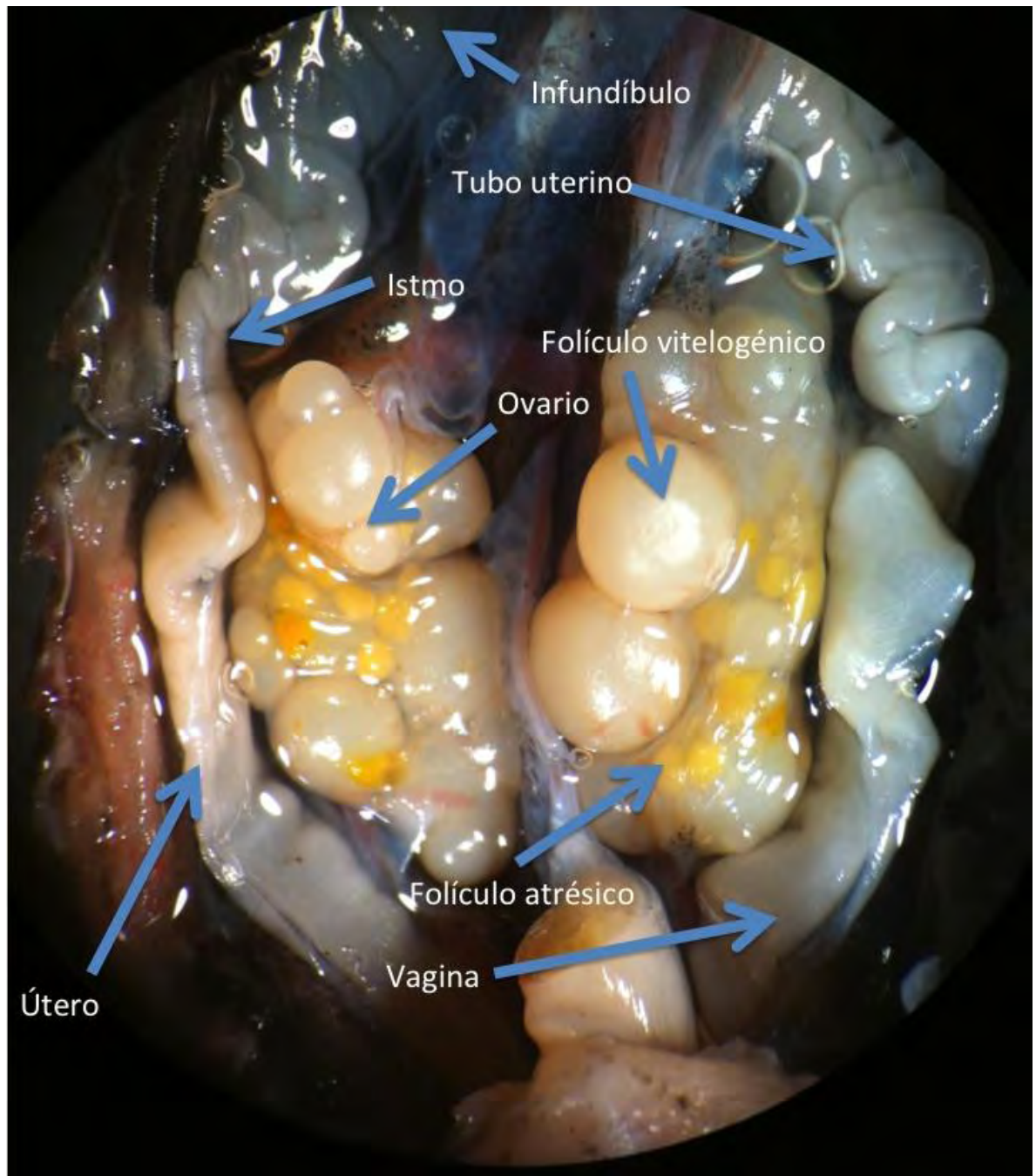


Figura 1. Aparato reproductor de hembra de *B. imbricata*. En el ovario se aprecian múltiples folículos con distinto grado de desarrollo (Fotografía tomada en el laboratorio de Biología de la reproducción UNAM-FES Iztacala).

Eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

El hipotálamo es una región del cerebro que controla funciones básicas vitales en aspectos del metabolismo, el gasto energético, el balance hídrico, la termoregulación, los ciclos circadianos y reproductivos (Saper y Lowell, 2014). Estos elementos tienen interacción con múltiples factores, muchos de ellos son endocrinos, pero también hay un gran número de factores autocrinos, paracrinos, intracrinos y neurales (Unniappan, 2010).

En el caso de los tetrápodos, dichos factores ejercen su efecto sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG). En el hipotálamo, específicamente en la región medio basal (MBH) y el área preóptica (POA), donde se sintetiza y secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), deca péptido que es expulsado por exocitosis a través de las terminales nerviosas en la eminencia media (ME) (McArdle y Roberson, 2015). En algunas especies de reptiles se han identificado dos isoformas de esta hormona: la de pollo I (cGnRH-I) y de pollo II (cGnRH-II) como ejemplo podemos referir en el cerebro de tortugas (como *Pseudemys scripta*, Sherwood y Whittier, 1988; *Trachemys scripta*, Tsai y Licht, 1993), de cocodrilos (como *Alligator mississippiensis* (Lovejoy *et al.*, 1991 y *Tupinambis teguixin*, Montaner *et al.*, 2000) y de saurios como *E. macularius* (Ikemoto y Park, 2003). En la lagartija *P. sicula* también se ha identificado la isoforma GnRH de salmón (D'Aniello *et al.*, 1994). En el caso de los reptiles sólo se han identificado los sistemas GnRHI, el cual se originan a partir de la placoda olfatoria y forma proyecciones a partir del prosencéfalo ventral hasta las células gonadotropas de la hipófisis; mientras que el sistema GnRHII se localiza en el cerebro medio (Massucci *et al.*, 1992; Dubois *et al.*, 2002) (Figura 2)

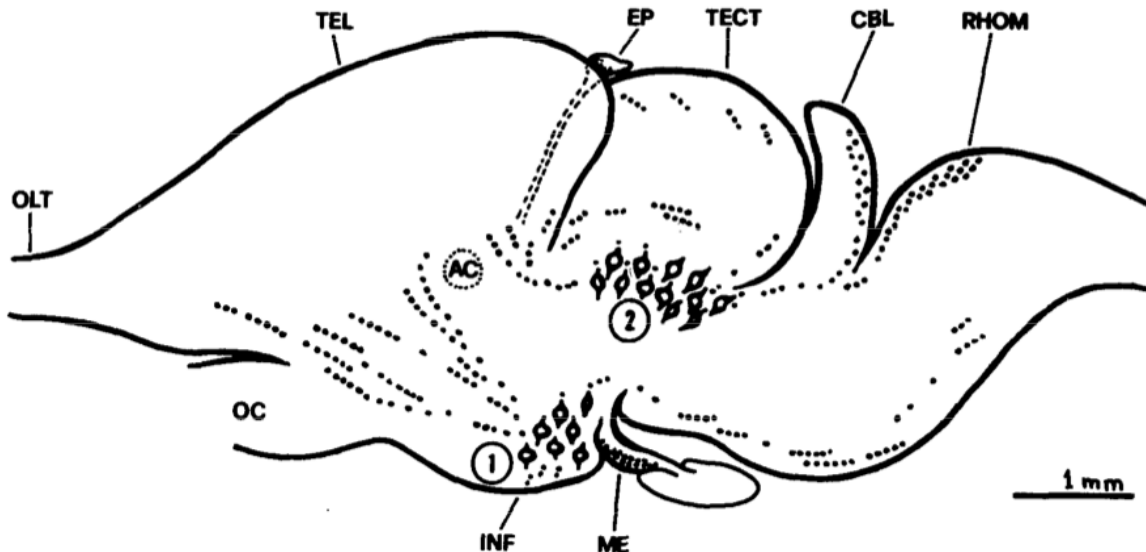


Figura 2. Representación esquemática de la distribución de neuronas inmunoreactivas a GnRH en el cerebro de la lagartija *Podarcis sicula*. AC, comisura anterior; CBL, cerebelo; EP, epíflsis; INF, infundíbulo; ME, eminencia media; OC, quiasma óptico; OLT, tracto olfatorio; RHOM, rombencéfalo; TECT, tectum; TEL, telencéfalo. Los números 1 y 2 representan los pericaria de las neuronas inmunoreactivas a GnRH del infundíbulo y mesencéfalo (Tomado de Massucci *et al.*, 1992).

Se ha observado que en los reptiles, al igual que en los mamíferos, la GnRH estimula la secreción de las gonadotropinas, como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) de las células gonadotropas. La FSH estimula la espermatogénesis en machos y en las hembras la formación de folículos ováricos, así como la secreción de $17\text{-}\beta$ estradiol (E_2) (Jones, 2011). La LH estimula la producción de testosterona (T) tanto en machos como en hembras, además, en estas últimas el desarrollo y maduración folicular, la ovulación y formación del cuerpo lúteo (CL) (McArdle y Roberson, 2015; Unniapan, 2010). Estas hormonas ejercen su efecto principalmente en las células foliculares y de la teca. Tanto el E_2 como la T son producidos por las gónadas, en donde tendrán un efecto modulador sobre el hipotálamo e hipófisis, regulando diversos aspectos de la fisiología reproductora y del comportamiento reproductor (Jones, 2011). Sin

embargo, en el caso de los escamosos es posible que sólo sea una gonadotropina la que ejerce la función de la FSH y LH encontradas en los mamíferos, marcando una divergencia del patrón típico en los tetrápodos (Jones, 2011; Jones, 2015).

También existe evidencia de que otras neuronas, como las kisspeptinérgicas pueden estar regulando de forma positiva el eje HHG de los reptiles (Tena-Sempere *et al.*, 2012), ya que se ha demostrado la expresión del gen *kiss2* en la lagartija *Anolis carolinensis* (Tena-Sempere *et al.*, 2012) y células inmunoreactivas en la región rostral de la POA e hipotálamo dorsal (Dunham *et al.*, 2009). En machos de *U. stansburiana* la administración de kisspeptina incrementa las concentraciones de testosterona y aumenta la agresividad (Neuman-Lee *et al.*, 2017).

La actividad de las células gonadotropas también está regulada por la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH). Este neuropéptido y sus ortólogos tienen en común, en el carbono terminal, la secuencia Leu-Pro-Xaa-Arg-Phe-NH₂ (Xaa=Leu o Gln) (Ukena *et al.*, 2016). Este factor inhibe no sólo la secreción, sino también la producción de GnRH. Además, impide la síntesis de la subunidad alfa y beta que conforman a las gonadotropinas (Tsutsui *et al.*, 2000; Tsutsui y Ukena, 2006 y Osugi *et al.*, 2014) al actuar directamente sobre la hipófisis uniéndose a su receptor acoplado a proteína G (Singh *et al.*, 2008). La GnIH está presente en el cerebro de reptiles como *Takydromus tachydromoides* (Kawano *et al.*, 2006), *Trachemys scripta elegans* (Ukena *et al.*, 2016) y en el ovario de *Calotes versicolor* (Singh *et al.*, 2008).

En *T. tachydromoides* existen células inmunoreactivas a GnIH en el núcleo *accumbens*, médula superior y paraventricular, las fibras de esta última región tienen contacto con neuronas inmunoreactivas a serotonina del órgano paraventricular (Kawano *et al.*, 2006) por lo que pueden ejercer un efecto de retroalimentación en la regulación de transformación de serotonina a melatonina.

Esteroidogénesis ovárica y función de las hormonas esteroideas.

La actividad ovárica de los reptiles está asociada a cambios con las concentraciones de esteroides sexuales como E_2 , T y progesterona (P_4) (Andrew y Whittier, 2000; Rhen *et al.*, 2000; Edwards y Jones, 2001; Radder *et al.*, 2001; Herbst *et al.*, 2003; Wack *et al.*, 2008; Kummrow *et al.*, 2010 y Jones, 2011). Estas hormonas son sintetizadas y secretadas por el ovario y llevadas por el torrente sanguíneo hacia distintos órganos en donde ejercen sus efectos vía receptores. Se originan a partir del colesterol, el cual es convertido por la enzima 20-22 desmolasa (citocromo P450 -CYP11A1-) a pregnenolona: esta puede tomar dos rutas (Δ^4 y la Δ^5) para la síntesis de andrógenos. En la ruta Δ^5 es transformada a 17α -hidroxipregnenolona por la enzima P450c17 (CYP17A1), esta misma enzima la convierte en dehidroepiandrosterona, la que posteriormente será transformada a androstenediona por la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β HSD). En la ruta Δ^4 la síntesis de androstenediona empieza a partir de la conversión de la pregnenolona a P_4 por la 3β HSD, después se transforma en 17α -hidroxiprogesterona por la P450c17 y finalmente en androstenediona por la misma enzima (Figura 3). La ruta que se sigue preferentemente puede variar entre sexos y la etapa reproductora (Jones, 2011). Finalmente, los estrógenos se derivan mediante la aromatización de los andrógenos por acción de la enzima P450 aromatasa (P450 arom): la testosterona a E_2 , androstenediona a estriol y finalmente la estrona resulta por una hidroxilación del E_2 (Figura 4). Algunas de las enzimas como la 3β -HSD pueden ser sensibles a un incremento de la temperatura, lo cual sugiere un mecanismo en el que la temperatura ambiental puede tener efecto en el inicio de la temporada reproductora (Rhen *et al.*, 2000).

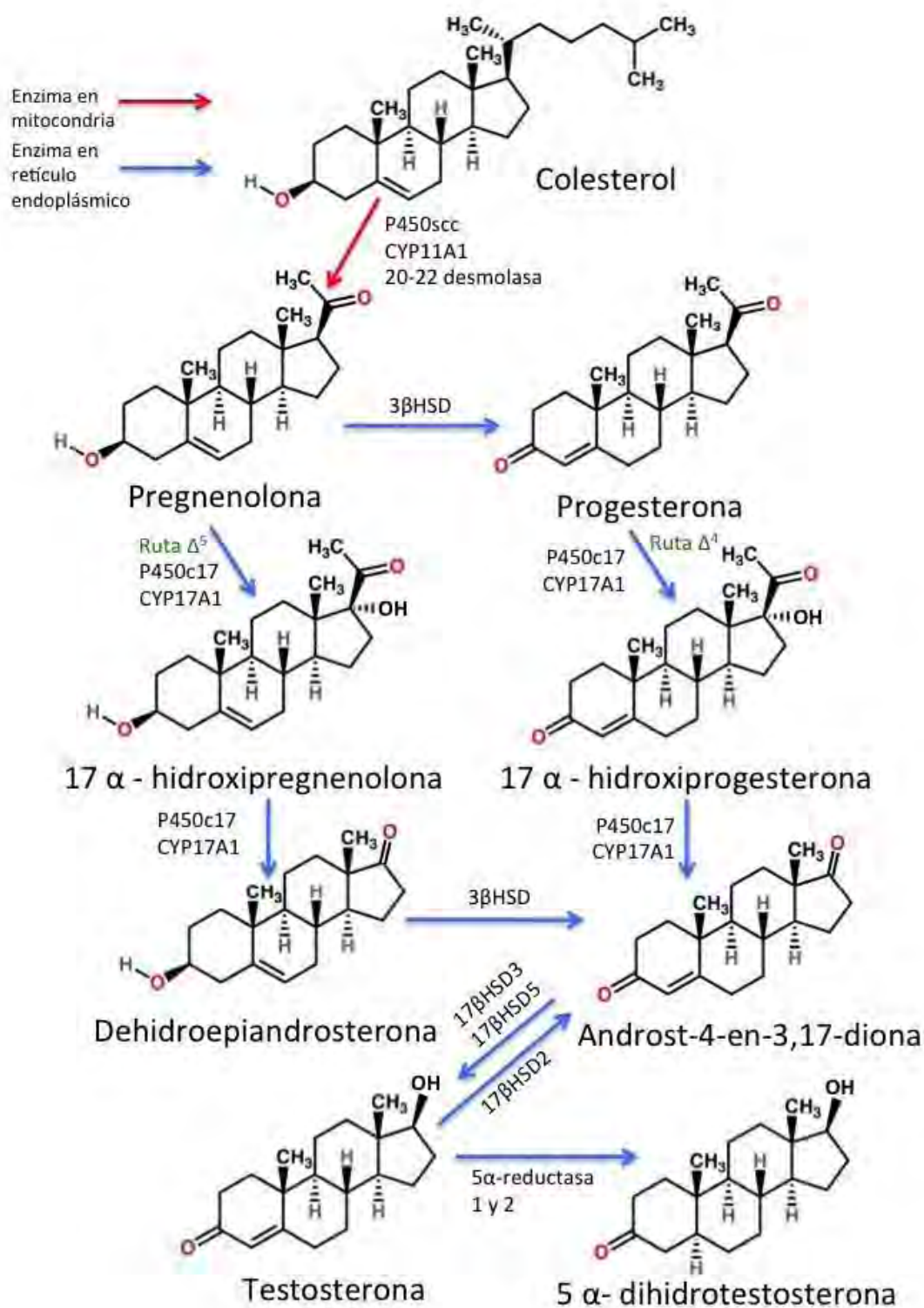


Figura 3. Rutas Δ^4 y Δ^5 para la esteroidogénesis de andrógenos a partir de la pregnenolona (Modificado de Norris, 2007).

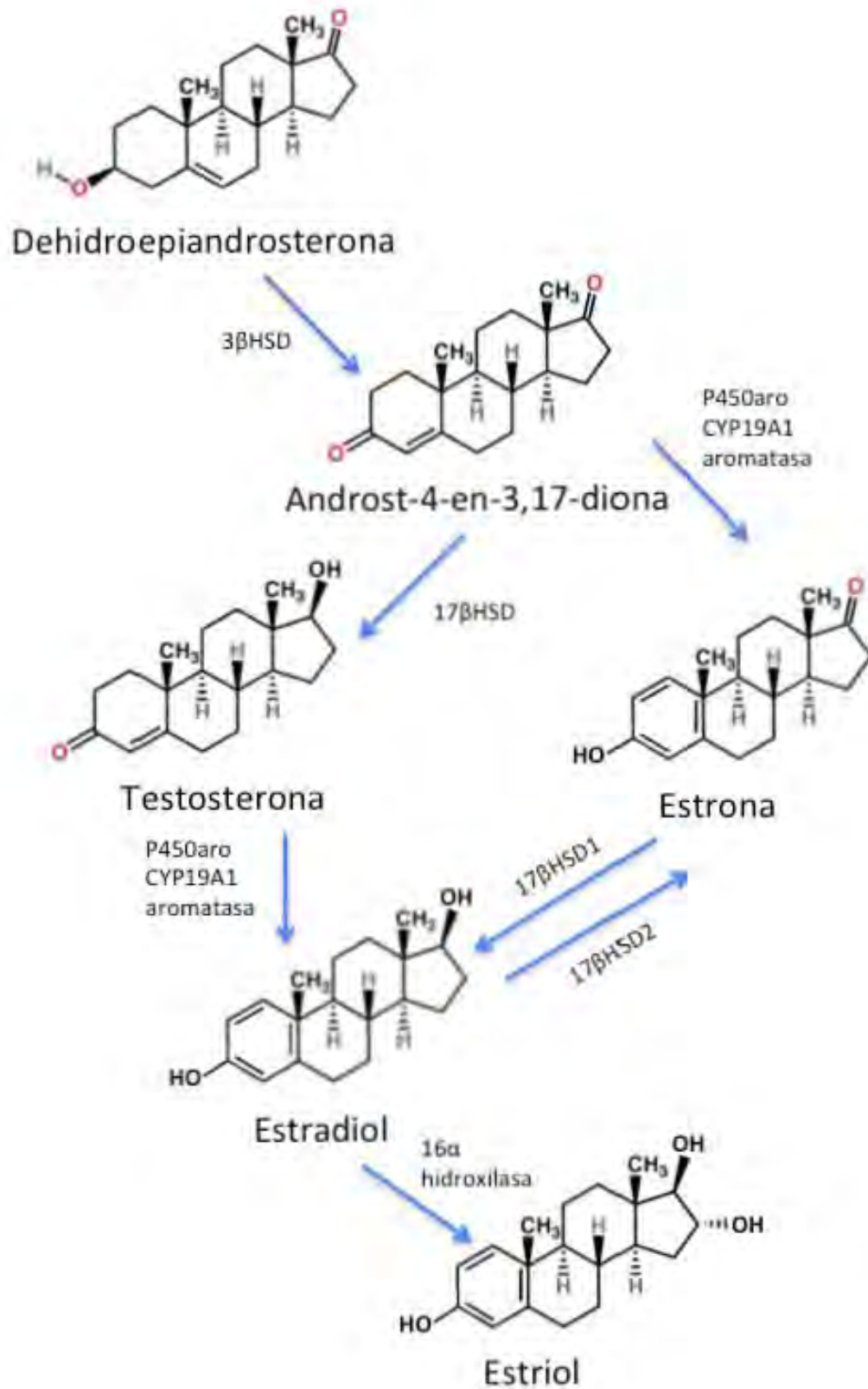


Figura 4. Síntesis de los estrógenos a partir de los andrógenos (Modificado de Norris, 2007).

Estrógenos.

Entre los estrógenos involucrados en la regulación de la actividad ovárica se encuentran el estradiol, que es una molécula de 18 carbonos con un grupo hidroxilo en las posición 3 y un ceto 17; el estriol (E_3) tiene 3 en las posiciones 3, 17 y 16 y la estrona (E_1), la cual tiene el grupo hidroxilo en la posición 3 (Figura 5) Son producidos por las células de la granulosa en hembras y en las células de Leydig y de Sertoli en machos (Gist *et al.*, 2007)

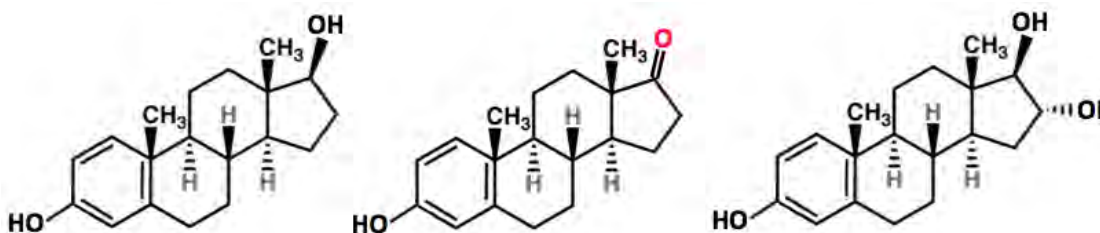


Figura 5. Estructura química del 17-β estradiol, estrona y estriol (Modificado de Rhen *et al.*, 2000).

El estradiol tiene 10 veces más actividad biológica que la estrona y 80 veces más que el estriol, por lo que es el estrógeno que más influye sobre la actividad ovárica (Edwards *et al.* 2002). Además, se ha observado que es el esteroide que presenta los cambios más significativos en sus concentraciones a lo largo del ciclo reproductor (Jones, 2011). La fase vitelogénica está asociada con el incremento en las concentraciones de esta hormona, por su efecto en la estimulación de la síntesis de vitelogenina en el hígado, así como la inducción de la endocitosis de esta lipoproteína en el folículo ovárico. Además, este esteroide forma parte del mecanismo de retroalimentación tanto positiva como negativa sobre el eje HHG (Edwards y Jones, 2001).

Los cambios en las concentraciones de los estrógenos han sido determinados a lo largo del ciclo reproductor en varias especies de saurios (*Cnemidophorus inornatus*, Moore y Crews, 1986; *E. macularius*, Rhen *et al.*, 2000; *C. versicolor*, Radder *et al.*, 2001; *Phrynosoma cornutum*, Wack *et al.*, 2007; *Chamaeleo calyptratus*, Kummrow *et al.*, 2010). Se ha observado que las

hembras de estas especies presentan concentraciones bajas de E_2 en la etapa de quiescencia, posteriormente se incrementan durante la vitelogénesis y alcanzan sus valores máximos antes de la ovulación, declinando después de la ruptura del folículo. Sin embargo, este patrón no se cumple en especies como *Pogona barbata* (Andrew y Whittier, 2000), *Uromastix hardwicki* (Arslan *et al.*, 1978), *Paroedura picta* (Weisser *et al.*, 2012), *Niveoscincus metallicus* (Jones, 2000) y *T. nigrolutea* (Edwards y Jones, 2001, 2002 y 2015). Esto abre la posibilidad de que sean otros estrógenos los que estén involucrados en la regulación de la actividad ovárica.

Testosterona.

Es una hormona de 19 carbonos que es sintetizada en el ovario y en el testículo de los vertebrados, tiene un doble enlace entre los carbonos 4 y 5, un átomo de oxígeno en el carbono 3 y un radical hidroxilo en el 12 (Jones, 2011) (Figura 6). Ejerce efectos de retroalimentación tanto positiva como negativa sobre el eje HHG. Además de ser precursora de los estrógenos, se ha observado que cambios en sus concentraciones pueden iniciar la vitelogénesis en especies como *Thamnophis sirtalis parietalis* (Whittier *et al.*, 1987) y *Naja naja* (Bona-Gallo *et al.*, 1980). También promueve la hipertrofia del oviducto en especies de lagartijas como *A. carolinensis* (Jones y Guillette, 1992) *Hemidactylus flaviviridis* (Prasad y Sanyal, 1969) y *T. nigrolutea* (Edwards y Jones, 2015), debido a que las concentraciones de los estrógenos permanecen constantes o disminuyen en los ciclos de estas especies.

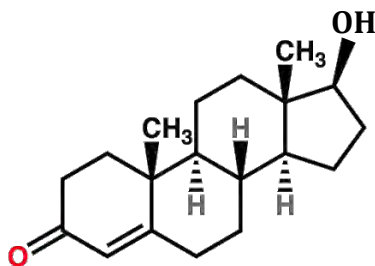


Figura 6. Estructura química de la testosterona (Modificado de Rhen *et al.*, 2000).

Progesterona.

Es una hormona de 21 carbonos con un grupo ceto en los carbonos 3 y 17 (Figura 7), está involucrada en el ciclo ovárico y preñez. Es producida en los ovarios, glándulas adrenales, placenta y cuerpo lúteo. En los reptiles vivíparos participa en el mantenimiento de la gestación por su capacidad para impedir el crecimiento folicular e inhibición de la contractilidad del oviducto (Callard *et al.*, 1992; Jones, 2000 y Edwards y Jones, 2001).

Se ha observado que en la mayoría de las hembras de los escamosos las concentraciones en plasma de P_4 y E_2 fluctúan a lo largo del año, lo cual sugiere la participación de estas hormonas en la regulación de las distintas etapas del ciclo reproductor (Edwards y Jones, 2001).

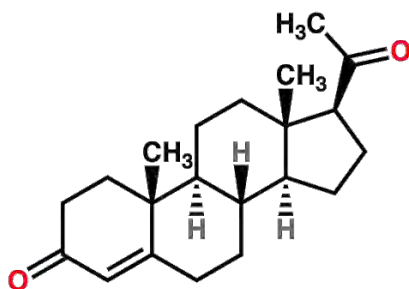


Figura 7. Estructura química de la progesterona (Modificado de Rhen *et al.*, 2000).

Desarrollo folicular.

El folículo ovárico de los reptiles está conformado por un ovocito rodeado por una membrana acelular, la zona pelúcida (ZP). Esta membrana está rodeada por una capa de células foliculares denominada granulosa (Lozano *et al.*, 2014) y por fuera de éstas la teca (Figura 8).

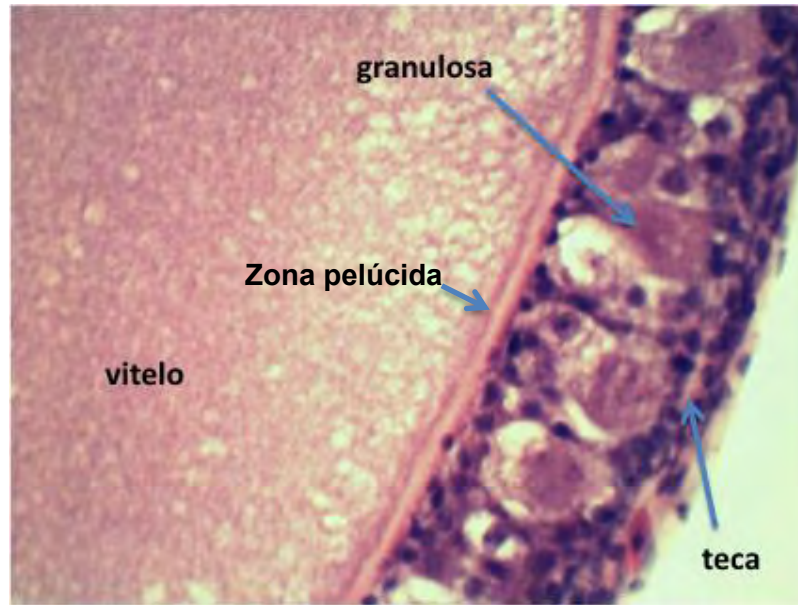


Figura 8. Folículo de la lagartija *B. imbricata*, donde se aprecia la pared folicular y gránulos de vitelo (Cortesía del Dr. Martín Martínez-Torres).

La proliferación y diferenciación de las ovogonias comienza en los lechos germinales (regiones en la superficie dorsal del ovario que contienen ovogonias en división, ovocitos y folículos primordiales) durante toda la vida reproductora, al inicio de cada ciclo reproductor (Guraya, 1989; Jones, 2011). El reclutamiento de estos folículos suele darse de forma estacional en especies de zonas templadas, como en la lagartija *Sceloporus torquatus torquatus* (Uribe *et al.*, 1995).

Los mecanismos que regulan el reclutamiento y dominancia folicular son poco conocidos en los reptiles, sin embargo, hay evidencias que factores endocrinos, parácrinos y autócrinos están involucrados en la interacción entre las células foliculares y el ovocito (Limatola *et al.*, 2002). Éstos participan en la regulación de la transcripción de los genes que codifican para la síntesis de proteínas antiapoptóticas, las rutas de adenilil ciclasa y AMP cíclico, inositol trifosfato, proliferación celular, regulación de receptores a FSH y LH, entre otros (Zielak *et al.*, 2008). En los mamíferos como el humano, las vacas y los caballos, se ha observado que el reclutamiento es dependiente de FSH, además de que esta hormona es uno de los principales factores que controlan el desarrollo

folicular (Messinis *et al.*, 2010). En etapas más avanzadas de la ovogénesis, esta hormona promueve la secreción de inhibina y folistatina (Medan *et al.*, 2007). Entre los factores que van cambiando en el microambiente del folículo y que regulan tanto el reclutamiento como la dominancia folicular se encuentran la activina, la inhibina y la hormona anti Mülleriana (AMH) y (Limatola *et al.*, 2002; Fortune *et al.*, 2004 y Visser *et al.*, 2006).

Activina: Hormona protéica dimérica que es sintetizada en los folículos en crecimiento por las células de la granulosa y también en la hipófisis; en la cual estimula la secreción de FSH, mientras que en el ovario contribuye en la proliferación de las células de la granulosa, expresión del receptor a FSH y la actividad de la aromatasa, producción de estrógenos, inhibición de la producción de andrógenos en las células de la teca estimulada por LH y la maduración del ovocito. Son reguladas negativamente cuando se unen a las folistatinas (Knight y Glister, 2001).

Inhibina: Es una hormona protéica dimérica secretada por las células de la granulosa, que tiene como función principal disminuir la secreción de FSH de la hipófisis (Limatola *et al.*, 2002; Medan *et al.*, 2007), lo que limita la disponibilidad de esta hormona a los folículos subordinados llevándolos a la atresia, al ir disminuyendo su capacidad de producir E₂ (Gupta *et al.*, 2014). También incrementa la expresión de ARNm para el receptor de LH y la enzima 3 β -HSD en las células de la granulosa de los folículos dominantes (Hampton *et al.*, 2004). Los estudios de estos tópicos en lagartijas son escasos, en *Podarcis sicula* el reclutamiento está controlado por la liberación de un factor difusible secretado por las células foliculares, que tiene un peso cercano a 21 kDa. Este factor es dependiente de la etapa del ciclo pero no de las concentraciones circulantes de FSH (Sica *et al.*, 2001). Por otro lado, se determinó que las células piriformes de los folículos previtelogénicos secretan una sustancia semejante a la inhibina, la cual podría controlar la dominancia folicular, además de ser un indicativo de reclutamiento (Limatola *et al.*, 2002).

Hormona Anti mülleriana: Es una hormona protéica dimérica producida por las células de la granulosa después de que los folículos han sido reclutados.

Este factor inhibe la atresia folicular intraovárica, mediante la activación de la transcripción de CYP19, (enzima que transforma la T a E₂). Además, disminuye la sensibilidad de los folículos a la FSH, y de esta manera su crecimiento (Hayes *et al.*, 2016).

Angiotensina: Hormona protéica secretada por células de la granulosa, se encuentra involucrada en el proceso de ovulación y maduración del ovocito. Se ha observado que en los bovinos promueve el desarrollo del folículo dominante, en contraste con el efecto inhibitorio sobre otros folículos que se observa en ratas (Ferreira *et al.*, 2011)

Hormona del crecimiento (GH): Hormona protéica que puede regular indirectamente vía IGF-I (Insulin Growth Factor I), la cantidad de folículos primordiales, además en ratones disminuye el número de folículos reclutados en ratones y previene la atresia folicular (Slot *et al.*, 2006).

Los factores de crecimiento. Estos incrementan la supervivencia de las células de la granulosa al promover la expresión de factores de transcripción como el Forkhead (FKHR-1), factor de crecimiento transformante beta, que regula los receptores a FSH en la granulosa (Zielak *et al.*, 2008).

Vitelogénesis.

La mayoría de los ovocitos de los reptiles están asociados a una vitelogénesis larga al ser telolecitos (Jones, 2011). Este proceso puede ser desencadenado por factores ambientales como la temperatura (Tinkle e Irwin, 1965; Marion, 1970; Licht, 1972; Licht, 1973; Roth, 1974; Moore *et al.*, 1984; Whittier *et al.*, 1986; Borelli *et al.*, 2000 y Jones, 2011), el fotoperiodo (Haldar Missra y Thapliyal, 1981) y la alimentación (Niewiarowski *et al.*, 2000 Muruzábal *et al.*, 2002; Barreiro y Tena-Sempere, 2004; Sciarrillo *et al.*, 2005 y Paloucci *et al.*, 2006;). Uribe *et al.*, (1995) establecieron cuatro etapas para la previtelogénesis y cinco para la vitelogénesis en la lagartija *Sceloporus torquatus torquatus* utilizando criterios histológicos.

Este proceso involucra el ingreso al folículo de lipoproteínas de baja densidad y de la vitelogenina (Vtg). Estas moléculas son sintetizadas y secretadas

por el hígado (Brown *et al.*, 1997; Herbst *et al.*, 2003) como respuesta al incremento de estrógenos (principalmente E_2) (Ho *et al.*, 1982; Uribe *et al.*, 1995) (Figura 9) originado por el aumento de las gonadotropinas. La Vtg es una fosfoglicoproteína de alto peso molecular que está involucrada en el transporte de calcio, zinc, hormonas tiroideas y carotenoides al ovocito (Brown *et al.*, 1997).

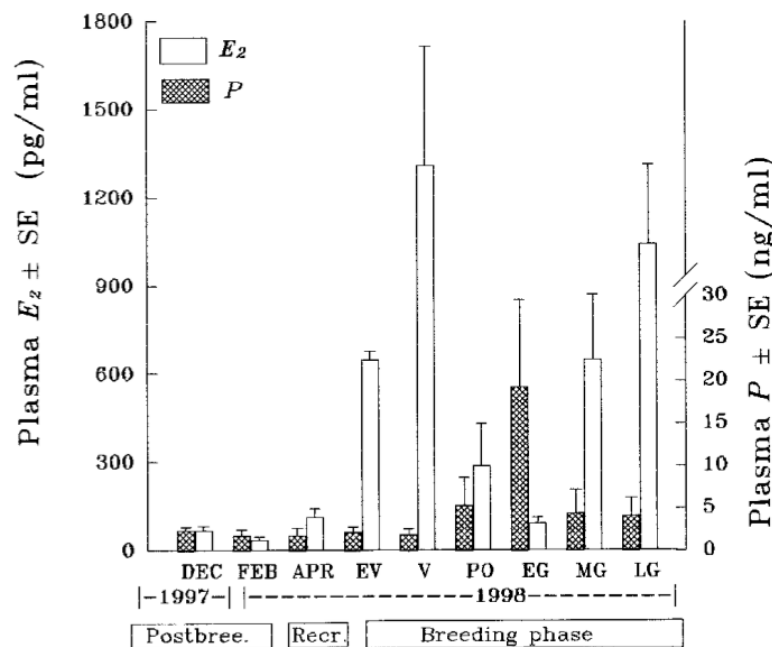


Figura 9. Esquema del patrón general del estradiol y progesterona en la lagartija *Calotes versicolor*. EV: Vitelogénesis temprana, V: Vitelogénico, PO: Postovulatorio, EG: gestación temprana, MG: gestación media, LG: gestación tardía o antes de la ovoposición (Tomado de Radder *et al.*, 2001).

La Vtg es transportada por el torrente sanguíneo hacia los ovocitos en crecimiento y es absorbida por micropinocitosis, que es un mecanismo de endocitosis mediada por receptores, caracterizado por la formación de vesículas que contienen hidrolasas (Brown, *et al.*, 1997; Romano y Limatola, 2000) (Figura 10). Es secuestrada por el ovocito y es rota mediante proteólisis por catepsina D en moléculas más pequeñas (fosvitina y lipovitelina) que van a formar una matriz insoluble que será empacada en cristales (Polzonetti-Magni *et al.*, 2004). Su concentración en la sangre puede ser usada como un indicador del inicio de la vitelogénesis en hembras cercanas a la madurez sexual y en adultas (Herbst *et al.*, 2003). Durante este proceso también se transporta calcio hacia el oviducto, el

cual se une a la molécula de Vtg, por lo que la concentración en plasma de este ión también ha sido empleado como indicador de vitelogénesis (Jones, 2011). Los hepatocitos muestran una hipertrofia durante este proceso, la cual se debe a la proliferación de ribosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Callard y Ho, 1987, Van y Beaupre, 2011).

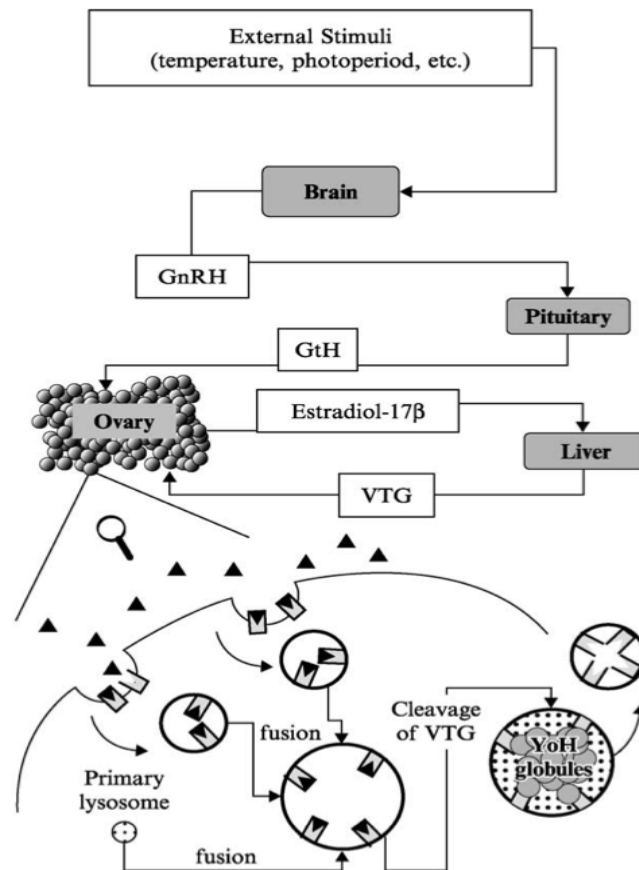


Figura 10. Proceso de ingreso de la vitelogenina al ovocito durante la vitelogénesis. Al recibir los estímulos de ambiente en el hipotálamo se incrementa la secreción de GnRH, misma que promoverá la liberación de gonadotropinas que tendrán efecto en la síntesis de estradiol por parte del ovario. Posteriormente el E₂ estimula la producción de vitelogenina (triángulos) en el hígado, la cual va a ser transportada a los ovocitos e ingresará mediante endocitosis mediada por receptores. Posteriormente será hidrolizada mediante la catepsina D en moléculas de menor peso para su posterior depósito en gránulos (Tomado de Polzonetti-Magni *et al.*, 2004).

Ovulación

Es el momento en que se da la liberación del ovocito, este evento marca la transición de la etapa de desarrollo folicular, dominada por estrógenos, a la fase luteal, dominada por P_4 (Jones, 2011). Generalmente, la FSH es la que induce la ruptura del folículo y la formación de los cuerpos lúteos (Figura 11); que son estructuras endocrinas transitorias que están formadas de células de la granulosa rodeadas por células tecales que experimentan el proceso de luteinización (Guraya, 1989). Las concentraciones de E_2 en la sangre, llegan a su concentración máxima antes de la ovulación y disminuyen en el periodo postovulatorio (Edwards y Jones, 2001; Edwards *et al.*, 2002). Este patrón es el que se considera el más ancestral en las especies de escamosos (Weiser *et al.*, 2012). Sin embargo, existen grandes diferencias en la concentraciones en plasma de esta hormona entre grupos e incluso dentro de una misma especie (Eikeenar *et al.*, 2012, Edwards y Jones, 2015), lo cual hace necesario más estudios para tener una mejor comprensión acerca de la fisiología reproductora de las distintas especies de saurios. La duración del cuerpo lúteo de acuerdo a Saidapur, 1982, Fox y Guillette, 1987 y Xavier, 1987 (en Jones, 2011) se divide en :

Luteogénesis: Se da la luteinización de las células de la granulosa e hipertrofia. Se observa un abundante retículo endoplásmico y un núcleo grande.

Madurez: Se diferencian tres capas bien definidas, las tecas interna y externa, y las células luteales al interior.

Regresión: Se caracteriza por la presencia de núcleos picnóticos y aparición de vacuolas en el citoplasma, se da la invasión por parte de tejido conectivo.

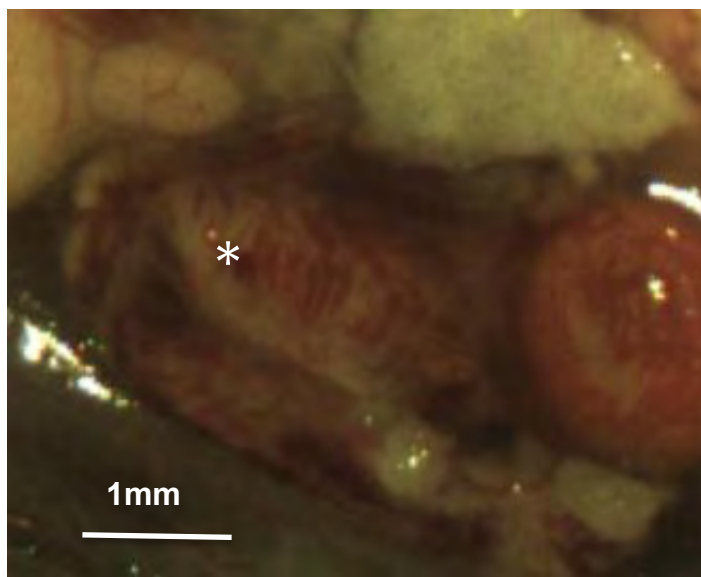


Figura 11. Cuerpo lúteo de *B. imbricata*. (Fotografía tomada en el laboratorio de Biología de la reproducción UNAM-FES Iztacala).

Regulación ambiental y hormonal de los ciclos reproductores de reptiles.

Los escamosos de zonas templadas exhiben distintos patrones de reproducción estacional cíclica, el más común en las especies ovíparas es en el que tanto hembras como machos presentan la gametogénesis en primavera, posteriormente el cortejo, apareamiento y ovoposición en otoño (Duvall *et al.*, 1982), eclosión en la primavera o verano siguiente. En cambio las vivíparas muestran actividad reproductora (gametogénesis y cortejo) en el otoño, preñez en el invierno y parto en la siguiente primavera (Méndez *et al.*, 1988).

Estos patrones restringen los periodos de crianza a las temporadas en las que se incrementa la posibilidad de supervivencia de las crías (Borelli *et al.*, 2000). Los ciclos reproductores se encuentran regulados por diversos factores ambientales como la temperatura, humedad, fotoperiodo y disponibilidad de alimento (Duvall *et al.*, 1982). Esto se debe a que modulan los niveles de gonadotropinas y esteroides sexuales (Jones y Swain, 2000; Girling y Gones, 2006 y Rhen *et al.*, 2000) al ser integrados en la POA (Krohmer *et al.*, 2010).

Temperatura.

Diversos autores están de acuerdo que en la mayoría de las especies la temperatura es el factor primario que regula la ciclicidad de la reproducción (Borelli *et al.*, 2000; Whittier *et al.*, 1986; Jones, 2011; Tinkle e Irwin, 1965; Licht, 1972; Licht, 1973; Marion, 1970; Moore *et al.*, 1984 y Roth, 1974). Este factor afecta la velocidad de los procesos fisiológicos (Lutterschmidt *et al.*, 2002). Incrementa la sensibilidad de las gónadas a las enzimas involucradas en la esteroidogénesis, como la adenilato de ciclasa (Borelli *et al.*, 2000) y la 3 β -HSD (Rhen *et al.*, 2000 y Girling y Jones, 2006). Se ha documentado la necesidad de un periodo de menor temperatura para que puedan iniciar un nuevo ciclo reproductor en especies como *Sceloporus undulatus* (Marion, 1970) y *A. carolinensis* (Roth, 1974). Además, se ha reportado que pueden existir diferencias en la temperatura preferida de los organismos al estar en temporada reproductora, como es el caso de la lagartija *Salvator merianae*, en la cual incrementa hasta 10 °C más de la que tienen en otras temporadas (Tattersall *et al.*, 2016). Sin embargo, no se puede descartar que los efectos observados se deban a la interacción de este factor con la humedad y el fotoperiodo.

El hecho de que los reptiles sean ectotermos, involucra la necesidad de termoregular. La termoregulación es un proceso complejo que integra las sensaciones del ambiente, el procesamiento a nivel central y la coordinación de respuestas que afectaran la temperatura del cuerpo (Seebacher y Shine, 2004).

Se sabe que glándula pineal puede actuar como un sensor de la temperatura en reptiles (Seebacher y Franklin, 2005). Entre las hormonas involucradas en el proceso de termorregulación se encuentran: la arginina-vasotocina, que tiene efecto en la respuesta a la deshidratación; las prostaglandinas, que regulan la presión y ritmos cardiacos; la estimulante de melanóforo alfa, que al hacer la piel más oscura permite una mejor absorción del calor; la melatonina, que disminuye la temperatura preferencial. Sin embargo, aún hacen falta más estudios para comprender los mecanismos que regulan a este comportamiento (Liu *et al.*, 2006; Cooper, 2015). Las principales sustancias involucradas en la señalización desencadenada por la temperatura son:

Serotonina: Neurotransmisor con un peso molecular de 40 kDa, también se ha encontrado en adrenales de reptiles como *Podarcis sicula*, ejerce efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) al incrementar la secreción de glucocorticoides y mineralocorticoides (Capaldo *et al.*, 2003), en aves y mamíferos está involucrada en la regulación del apetito, funciones del sistema circulatorio, respiración, reproducción y termorregulación (Kirsz y Zieba, 2012). Este neurotransmisor es transformado a melatonina a través de la metilación de un grupo hidroxilo por una transferasa. Es una de las hormonas más estudiadas en la regulación negativa de la GnRH.

Melatonina: Es una molécula de .232 kDa involucrada en la regulación de los ritmos circadianos, tiene efectos antioxidante y antiinflamatorio (Hardeland *et al.*, 2011). Tiene una relación directa con la actividad de las neuronas GnIH, las cuáles regulan la secreción de gonadotropinas al inhibir la expresión de las neuronas GnRH. Además tiene efecto directo en la disminución de la secreción de la tiroxina, hormona que es transformada a triyodotironina (T_3) por una desiodinasa tipo 2 e incrementa la actividad de las células gonadotropas de la hipófisis (Figura 12) .

Se ha encontrado que el incremento de melatonina contribuye a disminuir la temperatura del cuerpo (Lutterschmidt *et al.*, 2002). Este comportamiento se ha observado en especies diurnas como la serpiente *Pitouphis melanoleucus* (Lutterschmidt *et al.*, 1997), la tortuga *Terrapena carolina triunguis* (Erskine y Hutchinson, 1981), las lagartijas *Lacerta viridis* (Rismiller y Heldmaier, 1987) e *Iguana iguana* (Tosini y Menaker, 1996). Sin embargo, sus efectos son diferentes en especies nocturnas como *Lamprophis fuliginosus* (Lutterschmidt *et al.*, 2002).

Por otro lado se ha propuesto que la T_3 y la tiroxina (T_4) pueden tener efectos sobre la termorregulación en especies como *L. fuliginosus* (Lutterschmidt y Hutchinson, 2003) y *Sceloporus occidentalis* (Sinervo y Dunlap, 1995), ya que disminuyen la temperatura que prefieren los organismos al inyectarles estas hormonas, sin embargo aún hace falta hacer más estudios para saber el mecanismo por el que se da este proceso.

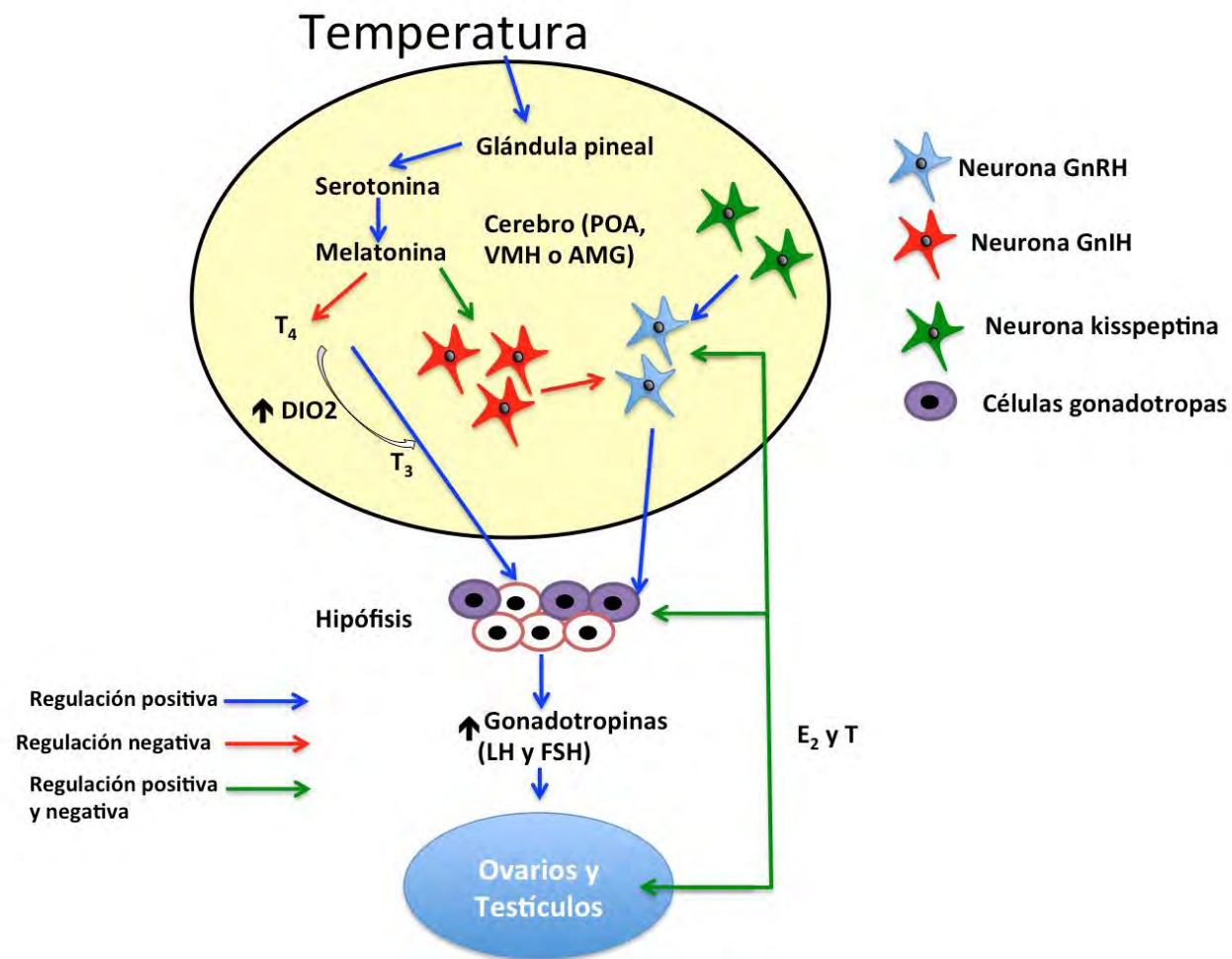


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre el eje HHG. POA, área preóptica; VMH, hipotálamo ventromedial; AMG, amígdala, LH, hormona luteinizante, FSH, hormona folículo estimulante; E₂, estradiol; T, testosterona; T₄ tiroxina; T₃, triyodotironina; DIO2, desiodinasa tipo 2. (Basado en Lutterschmidt *et al.*, 2002; Lutterschmidt *et al.*, 2003; Seebacher y Franklin, 2005; Grieves *et al.*, 2008 y Yasuo y Yoshimura, 2009).

Fotoperiodo.

A los animales con reproducción estacional los cambios en el fotoperiodo conforman la señal que permite detectar las condiciones ambientales favorables para la reproducción (Greives *et al.*, 2007). Esta información es codificada en una señal bioquímica a través de la melatonina (Figura 13) (Kirz y Zieba, 2012). Esta hormona es liberada por la glándula pineal principalmente durante el periodo de oscuridad (Tsutsui *et al.*, 2000; Osugi *et al.*, 2014), de tal manera que su secreción sirve como una señal fisiológica para poder determinar la duración del día. Durante el periodo de oscuridad se incrementa la concentración del GnIH, mientras que en la fase luminosa se expresan más las neuronas kisspetinérgicas, influyendo de manera positiva en la secreción de gonadotropinas (Grieves *et al.*, 2008). También en la fase luminosa se induce la expresión de la desiodinasa tipo 2, que convierte a la T_4 en su forma más bioactiva: T_3 . Estas hormonas están involucradas en la inducción del estro en ovejas (Yasuo y Yoshimura, 2009), y se ha observado que promueven el crecimiento gonadal en reptiles como el saurio *C. versicolor* (Haldar Missra y Thapliyal, 1981). La señal hormonal que se activa mediante los cambios en el fotoperiodo es semejante a la observada con los cambios de temperatura, a diferencia de que en esta el incremento en la cantidad de luz facilita la expresión de la desiodinasa tipo 2.

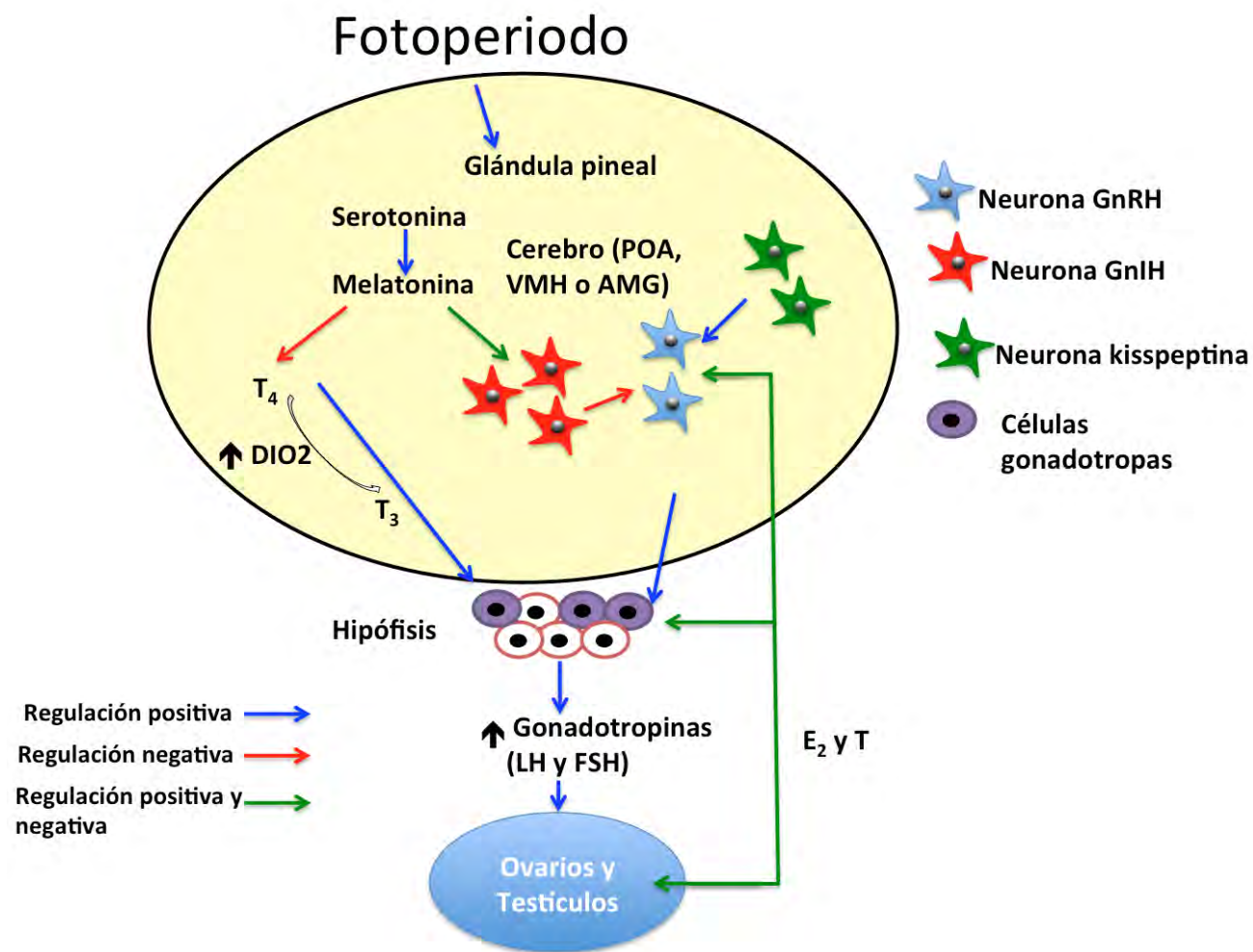


Figura 13. Efecto del fotoperiodo sobre el eje HHG. POA, área preóptica; VMH, hipotálamo ventromedial; AMG, amígdala, LH, hormona luteinizante, FSH, hormona folículo estimulante ; E_2 , estradiol; T, testosterona; T_4 tiroxina; T_3 , triyodotironina; DIO2, desiodinasa tipo 2. (Basado en Lutterschmidt *et al.*, 2002; Lutterschmidt *et al.*, 2003; Seebacher y Franklin, 2005; Grieves *et al.*, 2008 y Yasuo y Yoshimura, 2009).

Alimento.

Para que se pueda dar el proceso reproductivo es indispensable que existan las condiciones nutricionales adecuadas (Sirotkin y Grossman, 2015). La disposición de alimento es importante debido a que la proliferación de organelos metabólicamente activos en el hígado y el transporte e inclusión de sustancias a los folículos vitelogénicos implican un gran gasto energético (Nison y Raeberg, 2001 en Van y Beaupre, 2011). Entre los factores involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos identificados en los reptiles se encuentran:

Leptina: Es una hormona peptídica de 16 kDa secretada principalmente por el tejido adiposo (Fernández-Formoso *et al.*, 2015). Está involucrada en la ingesta de alimento, al regular la cantidad de grasas almacenadas inhibiendo el apetito mediante la sensación de saciedad a nivel del hipotálamo, dando una señal del estado nutricional del organismo (Ferrandino *et al.*, 2015) (Figura 14). Se han propuesto tres mecanismos de ingreso de la leptina al sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica: 1) transporte por saturación mediado por receptores, 2) difusión de la leptina a neuronas del núcleo arcuato por difusión pasiva y 3) transporte mediado por tanacitos (Münzberg y Morrison, 2015). En las especies que forman cuerpos grasos, como *P. sicula* (Ferrandino *et al.*, 2015), la leptina actúa como un mediador entre los adipocitos y el hipotálamo para inducir la secreción de gonadotropinas al unirse a sus receptores en las neuronas kisspeptinérgicas (Pralong, 2010). También se ha reportado la presencia de esta hormona y su receptor en el cerebro de la lagartija *S. undulatus* (Niewiarowski *et al.*, 2000), en el estómago de *Podarcis hispanica* y *Natrix naura* (Muruzábal *et al.*, 2002) y en la tiroides y el páncreas de *P. sicula* (Sciarrillo *et al.*, 2005 y Paloucci *et al.*, 2006).

Ghrelin: Hormona peptídica de 13 kDa secretada principalmente en el estómago, se considera que este factor actúa como un indicador de la insuficiencia energética (Forbes *et al.*, 2009), está implicada en la secreción de la hormona del crecimiento, y modulación de los ejes lactotrópico, corticotrópico y

gonadotrópico (Barreiro y Tena-Sempere, 2004). Se ha encontrado en otros tejidos como intestino, páncreas, placenta, hígado, pulmón, hipófisis y cerebro (Barreiro y Tena-Sempere, 2004; Unniappan, 2010). Ejerce sus efectos mediante la unión a su receptor (GHS-R), su expresión está asociada con la disminución de la secreción de gonadotropinas, prolactina y de la actividad ovárica (Barreiro y Tena-Sempere, 2004). Actúa en el eje HHG a través del neuropéptido Y, que en presencia de gonadotropinas incrementa su secreción, pero que en ausencia de esteroides sexuales la disminuye (Pralong, 2010).

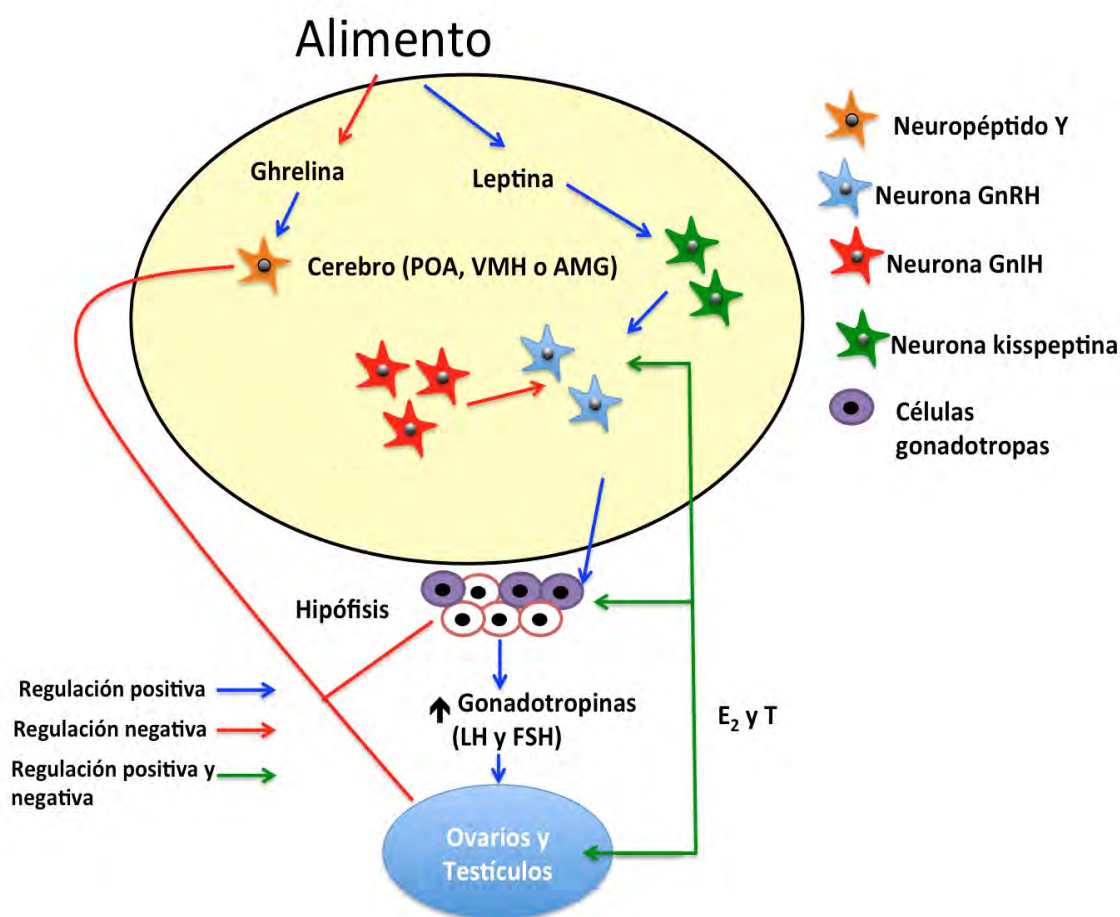


Figura 14. Efecto del alimento sobre el eje HHG. POA, área preóptica; VMH, hipotálamo ventromedial; AMG, amígdala, LH, hormona luteinizante, FSH, hormona folículo estimulante; E₂, estradiol; T, testosterona (Basado en: Barreiro y Tena-Sempere, 2004; Pralong, 2010; Ferrandino *et al.*, 2015).

Estrés.

El estrés puede ser definido como el conjunto de cambios que ocurren en el estado interno de un individuo cuando es expuesto a un estresor (como condiciones externas que son capaces de desestabilizar la homeostasis del organismo)(Tokarz y Summers, 2011). El estrés agudo está determinado por la ocurrencia de respuestas neurales y fisiológicas que dan origen a un comportamiento, el cual tiene una duración máxima de una hora, mientras que el estrés crónico puede durar de más de una hora a semanas (Tokarz y Summers, 2011). Estos cambios pueden darse en la fisiología o comportamiento para recuperar la homeostasis (Pottinger, 1997 en Tokarz y Summers, 2011). El estresor ejerce su efecto a través del eje hipotálamo-hipósis-adrenal (HHA), éste, en conjunto con el eje HHG actúan de manera recíproca y complementaria en la regulación de la reproducción (Carsia y John-Alder, 2003). El estrés es un fenómeno presente de manera natural al haber interacciones entre el individuo y el ambiente, sin embargo, cuando es crónico, el efecto sobre distintos aspectos de la fisiología es más evidente. Esta modalidad de estrés también influye de manera directa en aspectos de la reproducción como la recrudescencia en hembras de *Mabuya carinata* (Ganesh y Yajurvedi, 2003) y disminución de comportamientos necesarios para un apareamiento exitoso (Tokarz y Summers, 2011).

La corticosterona es el principal corticosteroide que es secretado por las adrenales de los reptiles en respuesta al estrés e influye en las concentraciones de esteroides gonadales (Girling y Cree, 1995; Tokarz y Summers, 2011). Se ha observado que en la lagartija *Sceloporus jarrovi* la restricción de comida incrementa la producción de esteroides como la aldosterona sin alterar la sensibilidad de las células adrenocorticales a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Carsia *et al.*, 2012). La presencia crónica de estrés tiene efectos negativos en el funcionamiento del sistema inmune, al incrementar la secreción de serotonina en la amígdala (Mo *et al.*, 2008), esto a su vez aumenta la producción de corticosteroides (Capaldo *et al.*, 2003), por lo que puede tener efecto en la activación de la GnIH (Figura 15).

Sin embargo, una elevación en las concentraciones de corticosterona, puede ayudar a mover las reservas energéticas para ser usadas en el desarrollo de la descendencia, en lugar de ser usadas para funciones del sistema inmune en la lagartija *U. ornatus* (French *et al.*, 2007). Además, se ha observado que la sensibilidad al estrés es diferente en las etapas del ciclo reproductor en especies como *S. undulatus*, ésta es mayor en la temporada reproductora (apareamiento y vitelogénesis, al ser un periodo de mayor demanda energética) por un incremento en la actividad esteroidogénica de las células adrenales (Carsia y John-Alder, 2003). La sensibilidad de las células adrenales al estrés es regulada de manera negativa por el péptido natriurético (involucrados en la descarga de sodio a través de la orina), ya que disminuye la secreción de aldosterona (Carsia y John-Alder, 2003). En hembras de *Egernia whitii* la sensibilidad a este factor es mayor en hembras quiescentes, posteriormente en gestantes y tiene el menor efecto en las etapas post-ovulatorias (Cartledge y Jones, 2007). Otra respuesta es la que se observa en *Hoplodactylus maculatus*, ya que en las hembras de estos geckos las concentraciones de corticosterona (CORT) no presentan cambios significativos a lo largo de su ciclo reproductor (Girling y Cree, 1995).

El efecto del estrés sobre el eje reproductor (específicamente en la secreción de GnRH) está regulado por el posible efecto de la CORT en la secreción de serotonina, misma que es transformada a melatonina y que tiene efectos de retroalimentación positiva sobre neuronas GnIH. La CORT también actúa directamente sobre las neuronas GnIH e inhibe la actividad de las neuronas kisspeptinérgicas, encargadas de retroalimentar positivamente a las neuronas GnRH.

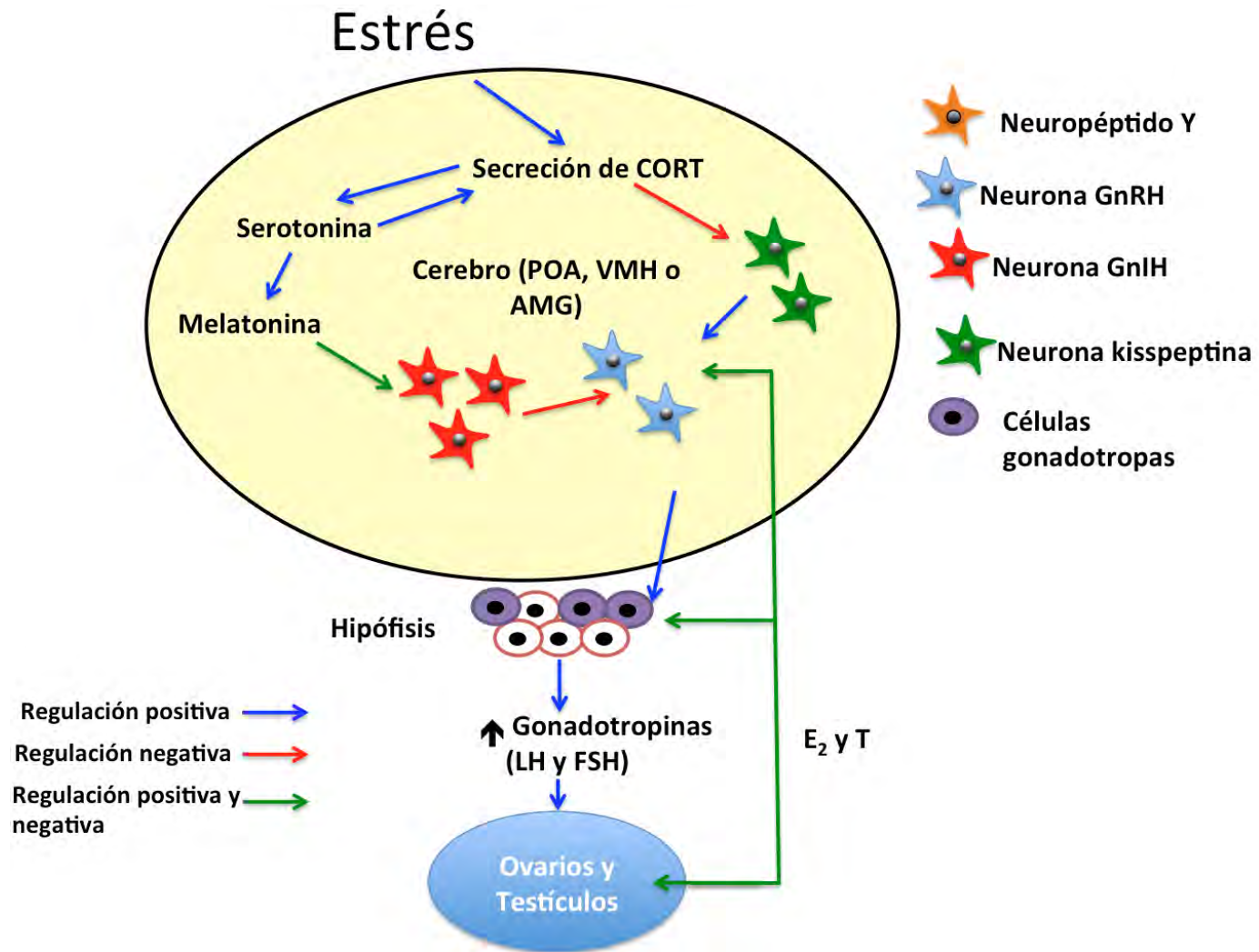


Figura 15. Efecto del estrés sobre el eje HHG. POA, área preóptica; VMH, hipotálamo ventromedial; AMG, amígdala, LH, hormona luteinizante, FSH, hormona folículo estimulante; E_2 , estradiol; T, testosterona (Basado en: Capaldo *et al.*, 2003; Carsia y Alder, 2003; Mo *et al.*, 2008; Tokarz y Summers, 2011 y Carsia *et al.*, 2012).

ANTECEDENTES

Temperatura como el factor principal involucrado en la regulación de la actividad ovárica.

A pesar de que el fotoperiodo ha sido considerado como un factor ambiental importante para mantener la ciclicidad en la reproducción de los reptiles, se acepta que la temperatura es el factor primario que regula este proceso (Borelli *et al.*, 2000). En los reptiles que habitan en ambientes que cambian con las estaciones, la temperatura puede actuar como un estímulo exógeno que incide fuertemente sobre el ritmo endógeno que regula el ciclo ovárico, en términos de crecimiento folicular y comportamiento reproductor (Whittier *et al.*, 1987 y Clarke y Zani, 2012). Por ejemplo, en la lagartija *P. Sicula*, al incrementar la temperatura, también lo hace el volumen folicular, esto se debe a que la sensibilidad de la adenilato ciclasa activada por las señales de transducción de los receptores a las gonadotropinas, aumenta con la temperatura (Borelli *et al.*, 2000). Entre las especies en que se ha observado un efecto similar se encuentran *U. stansburiana* (Tinkle e Irwin, 1965), *A. carolinensis* (Licht, 1973) y *S. undulatus* (Marion, 1970). Sin embargo, en hembras de *S. undulatus* (Marion, 1970) y *A. carolinensis* al alternar temperaturas altas y bajas (32 °C durante el día y 20 °C en la noche) la vitelogénesis y el crecimiento folicular incrementan más que en una temperatura constante (32°C) (Roth, 1974).

Endocrinología reproductora en saurios.

Actualmente se han intentado implementar nuevas estrategias para evaluar los ciclos reproductores y la fisiología de los mismos en saurios, con técnicas que no involucren el sacrificio de animales como la palpación (Bonnet *et al.*, 2008; Van Dyke y Baupre, 2011), el ultrasonido (Martínez-Torres *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2008; Hotchleiner y Holland, 2014), la resonancia magnética nuclear (Bonnet *et al.*, 2008; Kummrow *et al.*, 2010) y ensayos en los que el marcador es un isótopo radiactivo (RIA) (Amey y Whittier, 2000; Bonnet *et al.*, 2001; Wack *et al.*, 2008; Martínez-Torres *et al.*, 2010) o bien una enzima como el ELISA (Kummrow *et al.*,

2010; Pimm *et al.*, 2015). A pesar de esto, son métodos que no han sido implementados en el estudio de la reproducción de saurios mexicanos. Entre las especies que cuentan con un perfil hormonal a lo largo de un ciclo reproductor o en las etapas que se consideran más relevantes se encuentran:

C. versicolor (Radder *et al.*, 2001), *S. virgatus* (Weiss *et al.*, 2002), *P. cornutum* (Wack *et al.*, 2007), *E. macularius* (Rhen *et al.*, 2000), *C. inornatus* (Moore y Crews, 1986), *C. calyptratus* (Kummrow *et al.*, 2010) en las cuales, las hembras presentan concentraciones bajas de E₂ en la etapa de quiescencia; posteriormente se incrementan durante la vitelogénesis y alcanzan los valores máximos antes de la ovulación. Finalmente declinan después de la liberación del ovocito (Cuadro 1).

Aunque se han logrado avances en la endocrinología reproductora de saurios, aún hacen falta más estudios que permitan relacionar los efectos del ambiente con las concentraciones hormonales, además de trabajar con especies vivíparas.

Cuadro 1. Concentraciones de Estradiol [pg/ml] en saurios.

Espece	PV	V	POV	OV	GRAV
<i>Calotes versicolor</i> (Raddar <i>et al.</i> , 2001) ○			1306 ±407.01	285.60 ±143	32.80 ±12.91
<i>Phrynosoma cornutum</i> (Wack <i>et al.</i> , 2007) V		600		190	100
<i>Eublepharis macularius</i> (Rhen <i>et al.</i> , 2000) ○	1400	2300-3300			1000
<i>Cnemidophorus inornatus</i> (Moore y Crews, 1986) ○	300	500			1000
<i>Chamaeleo calyptatus</i> (Kummrow <i>et al.</i> , 2010) ○	250000	2131900			869400

PV= Previtelogénico, V= Vitelogénico, POV= Preovulatorio, OV= Ovulación, GRAV= Gravidéz. (O)= Especie ovípara (V)= Especie vivípara.

Se ha observado que en otras especies de lagartijas no hay correlación entre las concentraciones de estradiol y la vitelogénesis. Como *U. hardwicki* (Arslan *et al.*, 1978), en la cual, las concentraciones de E₂ incrementan durante el

periodo de gravidez al igual que en *P. picta* (Weiser *et al.*, 2012). En *P. barbata* (Andrew y Whittier, 2000) las concentraciones de E₂ permanecen constantes a lo largo del ciclo. Mientras que, en *T. nigrolutea*, aunque estas aumentan en el periodo ovulatorio, no presentan diferencias significativas como en la testosterona (Edwards y Jones, 2001; Edwards y Jones, 2015) (Cuadro 2). De acuerdo a Jones (2015), lo anterior, podría sugerir que en estas especies es otro estrógeno el que está regulando este proceso o incluso algún andrógeno, que permitiría desacoplar los eventos reproductivos de otros aspectos en la fisiología de estas especies.

Cuadro 2. Concentraciones de Estradiol [pg/ml] en saurios.

Especie	PV	V	POV	OV	GRAV
<i>Uromastix hardwicki</i> (Arslan <i>et al.</i> , 1978) ○			180 ± 10		460 ± 60
<i>Pogona barbata</i> (Andrew y Whittiers, 2000) ○	1300 ± 900	1300 ± 900	1300 ± 900	1300 ± 900	1300 ± 900
<i>Tiliqua nigrolutea</i> (Edwards y Jones, 2001) ▼		500000		710000	400000
<i>Paroedura picta</i> (Weiser <i>et al.</i> , 2012) ○		200 - 400			100 - 1600

PV = Previtelogénico, V = Vitelogénico, POV = Preovulatorio, OV = Ovulación, GRAV = Gravidez. (O) = Especie ovípara, (V) = Especie vivípara.

Estimulación de la actividad ovárica mediante la administración de gonadotropinas.

Existen diversas evidencias de que la gónada de los reptiles puede ser estimulada con gonadotropinas hipofisiarias de mamífero (FSH o LH) o con sus análogos (Jones *et al.*, 1975; Roth y Jones, 1992). Por lo que varios investigadores han intentado, en algunas especies de saurios, inducir hormonalmente la recrudescencia gonadal, el desarrollo folicular y la ovulación. Se ha observado que en los saurios la FSH tiene un efecto mayor en la estimulación ovárica (Licht y Pearson, 1969; Licht, 1972; Jones *et al.*, 1975 y Nijagal y Yajurvedi, 1999). No obstante, la inducción completa de un ciclo no ha sido

lograda, ya que en estos trabajos la administración de hormonas se ha hecho en distintas fases del ciclo o al final. En *N. metallicus* la administración de FSH se ha hecho en etapas de previtelogénesis, vitelogénesis media y tardía. Con estos experimentos se comprobó que el tamaño de la camada esta determinado antes de la vitelogénesis y no es alterado por la atresia folicular o muerte embrionaria (Jones y Swain, 2000).

La etapa de vitelogénesis tardía se ha trabajado en especies como: *A. carolinensis* (Licht, 1970); *P. Sicula*, (Borelli *et al.*, 2000) y *P. Cornutum* (Burns y Richards, 1974) en la cuales se promueve el crecimiento folicular. En especies como *U. stanburiana* (Licht, 1970), *Sceloporus occidentalis* (Licht, 1970), *A. carolinensis* (Jones *et al.*, 1988), *C. versicolor* (Shanbagh y Prasad, 1993) y *N. metallicus* (Jones y Swain, 2000) *P. Sicula* (Borelli *et al.*, 2000) se logró inducir la ovulación. Incluso, se ha provocado la ruptura folicular, un mes antes de lo que se esperaría naturalmente (Jones y Swain, 2000), aunque no se determinó si estos ovocitos eran viables

Otra fase que ha sido investigada es la de quiescencia; donde la administración de FSH en *P. Cornutum* (Burns y Richards, 1974) *P. sicula* (Limatola y Filosa, 1989), *M. carinata* (Ganesh y Yajurvedi, 2003) y *A. carolinensis*, se estimuló el desarrollo folicular, en la última, fue mayor en el ovario con menor cantidad de folículos (Jones *et al.*, 1976 y Roth y Jones, 1992).

También se administró FSH en lagartijas preadultas como *A. carolinensis*, promoviendo el crecimiento de los folículos, así como la formación de nuevos folículos (Jones *et al.*, 1975).

Especie de estudio.

Barisia imbricata (Figura 16) es una lagartija vivípara endémica de México, que habita zonas templadas y de elevadas altitudes (2200-3800 m. s. n. m.), su área de distribución está principalmente en la zona centro del país, en el eje neovolcánico transversal (Distrito Federal y los estados de Hidalgo, Jalisco,

Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala y Veracruz)
(Figura 17) (Guillete y Casas-Andreu, 1987, CONABIO, 2006).



Figura 16. a) Macho de *B. imbricata*. b) Hembra de *B. imbricata*.

Este saurio presenta reproducción estacional anual otoñal, la vitelogénesis inicia en el verano, la ovulación en noviembre y diciembre (Martínez Torres *et al.*, 2009) y el apareamiento ocurre antes de la maduración del folículo (Guillete y Casas-Andreu, 1987), la gestación ocurre durante los meses de invierno y gran parte de la primavera (finales de noviembre o principios de diciembre a finales de mayo o principios de junio) y el nacimiento ocurre a principios de Junio (Martínez Torres *et al.*, 2003) (Figura 18).



Figura 17. Área de distribución potencial de *B. imbricata* (tomado de CONABIO, 2006).

Durante la gestación el embrión desarrolla 3 tipos de placenta y se ha demostrado que la onfaloplacenta es positiva a la $\Delta 5-4$ 3β HSD, por lo que podría participar en los procesos de síntesis de esteroides, metabolismo de vitelo y la depuración de las hormonas sintetizadas por la hembra gestante (Martínez-Torres *et al.*, 2006).

Son organismos tigmotérmicos que presentan un intervalo de temperatura preferencial que va de 22 a 31°C, con hábitos predominantemente terrestre-fosoriales. Pueden ser mantenidos adecuadamente en cautiverio ya sea en encierros o terrarios alimentándolos con grillos (*Acheta domesticus*) y larvas de gusanos de cera (*Galleria melonella*) (Villamar, 1998).

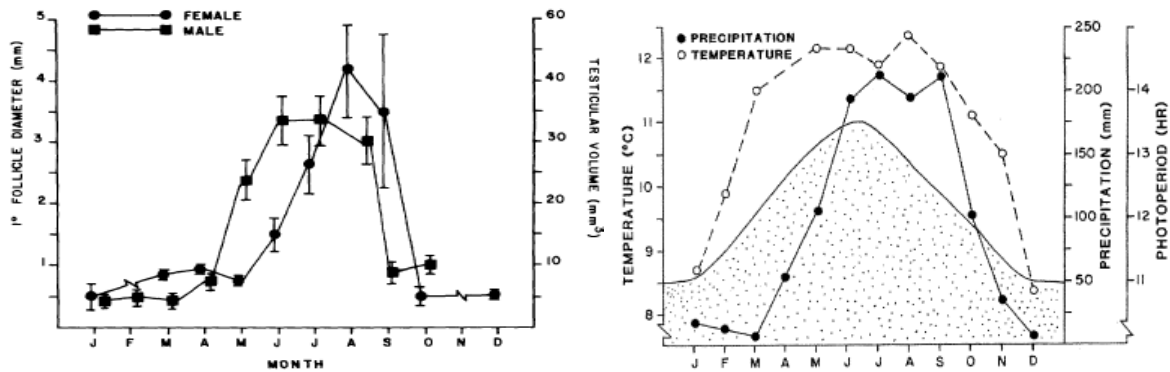


Figura 18. Diámetros foliculares y volumen testicular en los distintos meses de año del ciclo reproductor en *B. imbricata*. Factores ambientales (temperatura, humedad y fotoperiodo) a lo largo del ciclo anual (Tomado de Guillette y Casas-Andreu, 1987).

En esta lagartija se ha demostrado que la ovogénesis, en hembras con fracaso reproductor, puede ser inducida fuera del periodo de recrudescencia natural, mediante la administración intraperitoneal (IP) de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) (Martínez-Torres *et al.*, 2009), a pesar de que se ha logrado inducir la ovulación, esta técnica no se ha logrado estandarizar.

Además, tanto los machos como las hembras pueden responder a distintos factores ambientales para iniciar la actividad reproductora, como es el caso de *B. imbricata*. En los machos de esta especie, particularmente en la población de Zoquiapan, la actividad testicular esta relacionada con la precipitación y el fotoperiodo, mientras que en las hembras la reactivación ovárica está relacionada con el primer factor (Guillette y Casas-Andreu, 1987). Otra especie que muestra estas diferencias es el gecko *P. lanei* en el que los machos responden al fotoperiodo y las hembras sólo a la temperatura; esto permite que los ciclos coincidan pero que no tengan la misma duración (Ramírez-Sandoval *et al.*, 2006). Cabe destacar que el hecho de que una población responda a ciertos factores ambientales, no implica que toda la especie deba de hacerlo, ya que esto va a estar determinado por las historias de vida de cada población al ser sometidas a diferentes condiciones.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente la abundancia y diversidad de reptiles en el mundo se está viendo afectada por diversos factores como: la sobreexplotación de recursos, la alteración de su hábitat, la introducción de especies exóticas, la contaminación y el cambio climático (Gardner *et al.*, 2007). Esta situación limita la posibilidad de realizar estudios necesarios acerca de los fenómenos relacionados con la reproducción y desarrollo, los cuales son importantes para la conservación de diversas especies en riesgo. Por lo anterior, el conocimiento de la regulación de los ciclos reproductores, tanto ambiental como hormonal, que participan en el control de la actividad ovárica en los reptiles permitirá implementar otro tipo de planes de manejo, además de los tradicionales, no sólo para la reproducción de las especies, sino también para usarlos como modelo para estudiar tópicos que aún no han sido investigados (por ejemplo fecundación) y otros que han quedado rezagados, como el de mecanismos de determinación del sexo. Paralelamente, es de suma importancia la implementación de estrategias que limiten el sacrificio de organismos para el conocimiento de la fisiología de la reproducción. *Barisia imbricata* es un modelo ideal, debido a que es una especie endémica, además de que es fácil de manejar y mantenerla en cautiverio. Aunado a lo anterior su tipo de reproducción es vivípara, el cual no ha sido estudiado en muchas especies debido a la dificultad de estudiar su ciclo reproductor.

OBJETIVO GENERAL

Inducir la actividad ovárica en la lagartija vivípara *B. imbricata* mediante la manipulación de la temperatura y la administración de PMSG.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar el perfil hormonal y determinar el diámetro de los folículos en una población natural a lo largo de un año.
- Inducir el ciclo ovogénico, fuera de la temporada reproductora, mediante el manejo de la temperatura en hembras nuligestas.
- Inducir el ciclo ovogénico, fuera de la temporada reproductora, mediante la aplicación de PMSG.
- Inducir la ovulación con gonadotropinas de mamífero.

HIPÓTESIS

- Si en *B. imbricata* el aumento de la temperatura es el factor más importante para iniciar el recrudesimiento ovárico, entonces el incremento significativo de este factor fuera de la temporada gametogénica podría inducir el ciclo ovogénico.
- Si las gónadas de *Barisia imbricata* son sensibles a la estimulación por gonadotropinas de mamíferos, entonces la aplicación de PMSG induciría la recrudescencia ovárica, el crecimiento folicular y la ovulación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Trabajo de Campo (2015)

Se colectaron manualmente 32 hembras de *B. imbricata* con una longitud hocico cloaca mayor a 75 mm en los meses de Julio a Noviembre en el municipio de Melchor Ocampo (Figura 19) ($19^{\circ} 41'$ y $19^{\circ} 45'$ latitud norte; $99^{\circ} 06'$ y $99^{\circ} 10'$ longitud oeste), el cual presenta una temperatura media anual de 14°C y una precipitación media anual de 650 mm. El sitio de colecta se localiza en las coordenadas $19^{\circ} 42' 26.09''$ latitud norte y $99^{\circ} 07' 09.24''$ longitud oeste y tiene una elevación de 2288 msnm. Inmediatamente después de ser capturadas se les extrajo 200 μl de sangre mediante punción cardiaca, a cada una de las hembras con jeringas heparinizadas. Las muestras y las hembras se transportaron el mismo día al laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI-UNAM). Durante el lapso de tiempo de la colecta y transporte las muestras se mantuvieron en refrigerantes a una temperatura promedio de 4°C . Por la tarde, de ese mismo día, fueron centrifugadas a 6000 rpm durante un minuto para separar el plasma, mismo que fue almacenado a -40°C hasta que fueron procesadas para las mediciones de estradiol por ELISA y LH por RIA.



Figura 19. Mapa del sitio de colecta. Tomado de Google Earth.

Trabajo Experimental 2014 y 2015.

Los organismos se mantuvieron en cautiverio en terrarios (1.37 m x 95 cm) con fotoperiodo natural en el invernadero de la FESI-UNAM (19° 36'N, 98.5° 11' Longitud Oeste, 2240 msnm) (Anexo fotográfico). Los terrarios se equiparon con ventiladores y termostatos para mantener las temperaturas deseadas así como aspersores de agua. Se colocó un sensor para temperatura y humedad (EXTECH 42260) a lo largo del tiempo que duró el experimento para obtener cada los registros de estos parámetros. Otro grupo se mantuvo en encierros (3mx4m). Se registraron mensualmente sus medidas morfométricas (longitud hocico-cloaca (H-CL), cloaca-cola (CL-C), longitud total (LT) y pesos. Los organismos fueron sometidos a una dieta gusanos de cera, zoofobas (*Zophoba morio*) y grillos domésticos enriquecidos con vitaminas (REPTIVITE) y agua *ad libitum*.

Establecimiento de la etapa reproductora y desarrollo folicular.

Durante la primera semana posterior a su captura se realizaron laparotomías para determinar en qué etapa del ciclo ovárico se encontraban, además se contaron y midieron los folículos con un Vernier. Los organismos fueron anestesiados con éter y posteriormente se les dieron los cuidados postoperatorios (curaciones con agua oxigenada y alcohol yodado).

Los folículos se clasificaron en previtelogénicos (menores a 3mm y transparentes), vitelogénicos tempranos (mayores a 2 mm y con depósito de vitelo), vitelogénicos tardíos (mayores a 5 mm) y preovulatorios (mayores a 8 mm), también se tomaron muestras de sangre en el periodo postovulatorio inmediato.

Estimulación del desarrollo folicular.

Los organismos se dividieron en tres grupos, dos experimentales (n=26) (uno para manipulación de la temperatura [n=13] y otro para manipulación hormonal [n=13]) y uno control (n=6) para el programa de desarrollo folicular.

Manejo de temperatura: Durante 12 semanas, 13 hembras fueron sometidas a temperaturas de 30 a 32°C en el día (10 horas) y 23 a 25°C en la noche (14 horas) con una humedad relativa de 50-60%, , para inducir la recrudescencia gonadal y el desarrollo folicular.

Manipulación hormonal: El grupo constó de 13 hembras que se mantuvieron a temperatura ambiental en el invernadero de la FESI-UNAM. Se les administraron 2 UI/g de peso de PMSG (Folligon, gonadotropina sérica, Intervet, International, Boxmer Holland) vía IP tres veces por semana durante 16 semanas (Martínez-Torres *et al.*, 2009). Tomando como base los resultados obtenidos en el primer ensayo (2015), en el experimento del 2016 se administró a 13 hembras preadultas una dosis de “reclutamiento” de 2 UI/g durante tres semanas y a partir de la 4ª semana una dosis de “soporte” de 0.5/UI/g por 13 semanas

Control: Constó de 6 hembras a las que se les administró sólo el diluyente de la hormona.

Evaluación del desarrollo folicular

Ultrasonidos

El desarrollo folicular se evaluó cada 4 semanas a partir de la fecha de inicio de los tratamientos inicialmente por palpación y, posteriormente, mediante ultrasonido (utilizando un transductor lineal Philips de capacidad variable de 7.5-35 MHz (Martínez-Torres *et al.*, 2006). Se registró el diámetro de los folículos observados.

Ensayo de 17- β estradiol

Las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm durante un minuto para separar el plasma, mismo que fue almacenado a -40°C hasta que fueron procesadas las muestras.

La concentración de E₂ en suero se midió por ELISA usando un kit comercial (DRG Diagnostics, DRG Instruments, GmBH, Germany EIA-2693). El anticuerpo es altamente específico para estradiol y presenta baja reacción cruzada con otras hormonas esteroideas (estrón: 0.2%, estriol: 0.5% y con otras relacionadas: 0%). Los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron de 6.6 y 6.7 respectivamente.

RIA de rLH y rFSH

Consistió en un RIA que emplea reactivos para medir LH y FSH, de rata (rLH, rFSH), después de evaluar los porcentajes de reacción cruzada con los correspondientes anticuerpos, así como la linealidad de los resultados obtenidos de varias diluciones de una muestra de suero. Consta de un doble anticuerpo en fase líquida, con reactivos proporcionados por The National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). Los resultados se expresaron en términos de los estándares de referencia internacional correspondientes, LH-RP-3 y FSH-RP-2. Se emplearon hormonas marcadas con I-125 (rLH-I-10 y rFSH-I-9). El primer anticuerpo se utilizó a dilución inicial 1:252,000 y 1:62,500, para rLH-S-11 y rFSH-S-11, respectivamente. Se agregaron 50-25 μ l de estándar, muestra, primer anticuerpo y hormona marcada (~ 10,000 cpm), en los tubos correspondientes. Se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Para separar la fracción unida se pipetearon 25-50 μ l del segundo anticuerpo, suero de borrego antigamma globulina de conejo con dilución inicial 1:10 con 8% Polietilenglicol, se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se centrifugaron por 40 min a 3000 rpm. Los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron 5.1% y 6.5% para rLH y 4.0% y 7.9% para rFSH.

Histología del cuerpo lúteo.

Al ser extraídos los cuerpos lúteos fueron fijados en formol al 4%, lavados en agua y deshidratados en alcoholes graduales, aclarados en xileno e incluidos en parafina. Se hicieron cortes de 5 μ m y fueron teñidos en hematoxilina-eosina.

Perfil hormonal en organismos de campo.

Se colectaron mensualmente de 3 a 5 organismos para realizar un perfil hormonal que incluyera información del E₂, LH y la condición del ovario a lo largo de un año. Se siguió la misma metodología que en los organismos experimentales para la extracción de sangre, evaluación del estado del ovario, y cuantificación de hormonas. Después de las operaciones y un periodo de recuperación de 3 meses los organismos fueron liberados en el sitio de colecta.

Análisis estadístico.

Se realizó un ANOVA de un factor para comparar las concentraciones de estradiol a lo largo del tiempo de los organismos sometidos a tratamiento experimental (temperatura y hormonal) y los controles; uno para comparar las concentraciones a lo largo del ciclo anual (además de una comparación múltiple de medias por el método Holm-Sidak) y otro para comparar las distintas etapas del ciclo (además de una comparación múltiple de medias por el método Holm-Sidak). También se efectuó un ANOVA de dos factores para determinar si existían diferencias significativas entre el grupo experimental y control.

Para determinar diferencias entre los diámetros foliculares a lo largo del tiempo en una población natural también se realizó un ANOVA de un factor (además de una comparación múltiple de medias por el método Holm-Sidak).

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa Sigma Stat (Versión 12 para Windows) y Kaleida Graph versión 4. 1. 3 para iOS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La necesidad de estudiar distintos aspectos de la biología reproductora en reptiles sin el sacrificio del organismo ha impulsado el uso de técnicas no invasivas como la palpación (Bonnet *et al.*, 2008; Van Dyke y Baupre, 2011), el ultrasonido (Martínez-Torres *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2008; Hotchleiner y Holland, 2014), la resonancia magnética nuclear (Bonnet *et al.*, 2008; Kummrow *et al.*, 2010) y RIA (Amey y Whittier, 2000; Bonnet *et al.*, 2001; Wack *et al.*, 2008; Martínez-Torres *et al.*, 2010) y ligados a enzimas (ELISA) (Kummrow *et al.*, 2010; Pimm *et al.*, 2015). Sin embargo, en nuestro país el conocimiento de la biología reproductora de saurios se ha generado principalmente mediante estudios que involucran técnicas con el sacrificio de una gran cantidad de organismos (Manríquez-Morán *et al.*, 2005; Zaldívar-Rae *et al.*, 2008; Gribbins *et al.*, 2011, Lopez-Moreno *et al.*, 2016).

Estimulación de la actividad ovárica mediante el manejo de la temperatura.

Aunque se ha reportado que el incremento de la temperatura puede estimular la recrudescencia gonadal como en *U. stansburiana* (Tinkle e Irwin, 1965), *P. sicula* (Borelli *et al.*, 2000), *A. carolinensis* (Licht, 1973), *S. undulatus* (Marion, 1970), en el grupo sometido a manipulación térmica no se dio el desarrollo folicular. En un estudio, realizado en machos de *C. versicolor*, se observó que la GnRH y no la temperatura era la que permitía la recrudescencia, debido a que la primera estimulaba la secreción de gonadotropinas, además de que el efecto de la temperatura se observa más en especies que se encuentran en lugares donde los cambios de estación son muy marcados (Shanbhag *et al.*, 2000). La falta de desarrollo folicular en *B. imbricata* pudo deberse a que las concentraciones de gonadotropinas no fueron suficientes para que estimular la actividad gonadal que permitiera alcanzar un umbral de estradiol para que este sea convertido a otro metabolito involucrado en promover la síntesis de vitelo

(Arslan *et al.*, 1978 y Jones, 2015;), ya que una mayor concentración de estradiol no involucró un mayor desarrollo folicular. El origen de este estradiol puede ser de otra fuente como la glándula adrenal (Jones, 2011)

Otro factor que pudo impedir el desarrollo folicular, a pesar de las elevadas concentraciones de estradiol registradas, es que los organismos sometidos a temperatura mayor (25-32°C) estaban sometidos a un estrés constante (pudiendo llegar a crónico), aunado al provocado por el cautiverio. Este factor tiene efectos negativos en la reproducción al hacer que se liberen corticoesteroides (Weiss *et al.*, 2002) y β -endorfinas. Estos compuestos ocasionan la disminución en la liberación de gonadotropinas en distintas especies como *A. carolinensis* (Greenberg *et al.*, 1987), *M. carinata* (Ganesh y Yajurvedi, 2003) y *A. mississippiensis* (Lance y Elsey, 1986).

Estas observaciones y los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el incremento de la temperatura no logró inducir la recrudescencia gonadal.

Concentraciones de estradiol en organismos sometidos a tratamiento de temperatura.

Aunque no existieron diferencias significativas entre los grupos control y el sometido a tratamiento hormonal probablemente debido al tamaño de la muestra, el grupo sometido a tratamiento de temperatura mostró concentraciones más altas respecto al grupo control (Cuadro 3). Esto muestra que el aumento de la temperatura no indujo un incremento en las concentraciones de estradiol.

Cuadro 3. Media y error estándar de la media de las concentraciones de estradiol [pg/ml] de organismos control y sometidos a tratamiento de temperatura. $p < 0.05$ (ANOVA).

Mes	Concentraciones de estradiol [pg/ml] en los grupos de trabajo	
	Control	Temperatura
Enero	178.445 $\pm$ 39.03	211.14 $\pm$ 35.72
Febrero	175.303 $\pm$ 37.57	210.59 $\pm$ 32.18
Marzo		288.352 $\pm$ 79.70
Abril		295.62 $\pm$ 81.31

Sin embargo las concentraciones de E₂ cuantificadas en *B. imbricata* no concuerdan con el patrón general que señala que se elevan y están estrechamente relacionadas con el avance de la vitelogénesis. Este patrón se presenta en especies como *C. versicolor* (Radder *et al.*, 2001), *S. virgatus* (Weiss *et al.*, 2002), *P. cornutum* (Wack *et al.*, 2007), *E. macularius* (Rhen *et al.*, 2000), *C. inornatus* (Moore y Crews, 1986), *C. calypttratus* (Kummrow *et al.*, 2010) en las cuales, las hembras presentan concentraciones bajas de E₂ en la etapa de quiescencia; posteriormente se incrementan durante la vitelogénesis y alcanzan los valores máximos antes de la ovulación. Finalmente declinan después de la liberación del ovocito.

Otro aspecto que se consideró que pudo haber influido en las concentraciones de E₂ y la ausencia de desarrollo folicular fue el tamaño de los organismos (las hembras sometidas a tratamiento de temperatura eran más pequeñas (20 mm $\pm$ 0.5mm) que las del grupo control, aunque cumplieron con la talla reportada por Guillette y Casa-Andreu (1987) para la madurez sexual de esta especie), por lo que se procedió a hacer la cuantificación de esta hormona en organismos sin ningún tratamiento. Este análisis mostró que existe una relación inversamente proporcional entre las concentraciones de estradiol y la longitud hocico cloaca, lo cual no había sido reportado para ninguna especie de saurio (Figura 20).

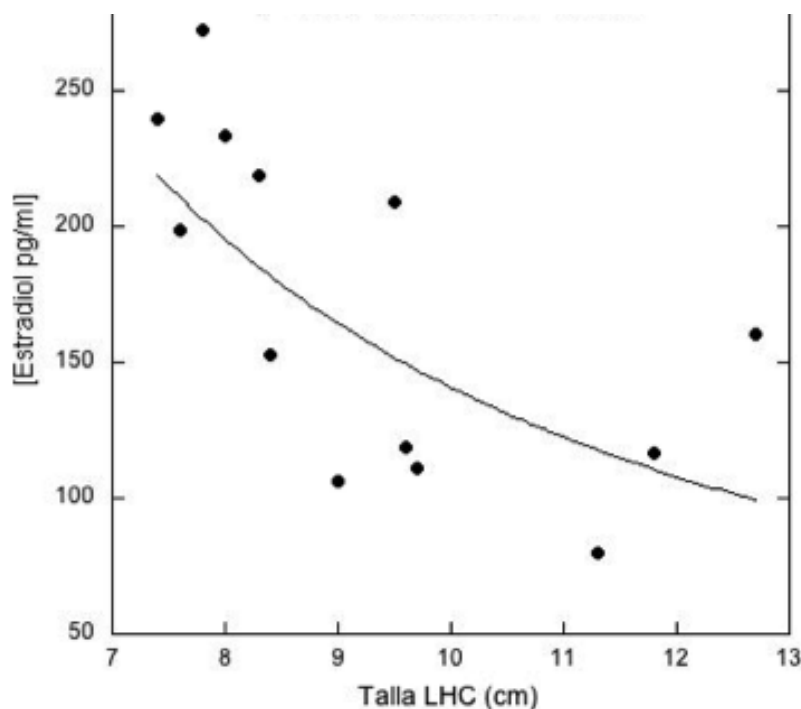


Figura 20. Relación de las concentraciones de estradiol con la talla del organismo (Las muestras se tomaron de organismos sin ningún tratamiento).

Esta relación poco común puede deberse al hecho de que las crías de esta lagartija (tanto machos como hembras) nacen con hemipenes (Martínez-Torres *et al.*, 2015). Esta observación sugiere que las hembras de esta talla necesitan concentraciones elevadas de estrógenos para poder involucionar completamente estas estructuras y el hecho de que no respondieran al incremento de la temperatura se debiera también a que aún no tenían la madurez sexual. También es necesario disminuir la variación en las tallas de los organismos ya que se observa que esta influye considerablemente. Se sugiere realizar más estudios para tener una mejor comprensión del papel que juega el estradiol en el desarrollo ontogénico y actividad reproductora de esta lagartija.

Estimulación de la actividad ovárica mediante la administración de PMSG.

Reclutamiento

Las investigaciones experimentales dirigidas a estudiar la regulación hormonal de la actividad gonadal en las hembras de los saurios son escasas. Se han basado en la administración de gonadotropinas de mamífero para estimular el recrudecimiento ovárico, el desarrollo folicular y la ovulación en distintas especies como *A. carolinensis* (Licht, 1970; Jones *et al.*, 1988); *S. occidentalis* (Licht, 1970), *U. stansburiana* (Licht, 1970), *P. cornutum* (Burns y Richards, 1974), *C. versicolor* (Shanbagh y Prasad, 1993), *P. sicula*, (Borelli *et al.*, 2000) y *N. metallicus* (Jones y Swain, 2000). Dichos trabajos no han logrado inducir un ciclo ovogénico completo, por lo que el presente estudio es el primero en lograrlo.

Anteriormente en *B. imbricata* se había logrado inducir la recrudescencia con PMSG pero en hembras que presentaron fracaso reproductor, éstas alcanzaron diámetros foliculares entre 5.2 y 6.0 mm (Martínez- Torres *et al.*, 2009). Lo anterior indicaría que los ovarios de *B. imbricata* no pierden sensibilidad a la estimulación por gonadotropinas en la fase de quiescencia. Estudios experimentales han demostrado que esta respuesta se encuentra regulada principalmente por los receptores a estrógenos alfa (ER α), los cuales se expresan más en la temporada reproductora y son dependientes de las concentraciones de E₂, a diferencia de los receptores a estrógenos beta (ER β) que se expresan más en la fase de quiescencia (Verderame y Limatola, 2010). En *B. imbricata* el desarrollo folicular, observado en hembras sometidas a tratamiento hormonal con dosis de 2 UI no fue homogéneo, ya que se observaron folículos de distintos diámetros (Figura 21). Además de que el número de folículos vitelogénicos registrados por hembra (22 ± 4.22) fue mayor a los reportados por Guillette y Casas-Andreu, (1987) y Dashevsky y col. (2013) que fueron de 10 y 16 respectivamente. Esto podría deberse a que la aplicación continua de PMSG estimuló varios reclutamientos (Figura 21) en diferentes momentos a lo largo del tratamiento hormonal. Una situación similar se observó en *Niveoscincus metallicus* (Jones y Swain, 2000), ya que esta hormona tiene una acción tanto de FSH como de LH (Veterindustria, 2003 y Tennant, 2008). Aunque los primeros folículos

reclutados pudieron haber producido inhibina y hormona antimülleriana (hormonas que impiden el desarrollo de nuevos folículos), su efecto pudo verse impedido debido a la administración constante de PMSG (Sica *et al.*, 2001; Limatola *et al.*, 2002; Hampton *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2016). En consecuencia, hubo otros reclutamientos a lo largo del tratamiento y el vitelo se repartió entre los nuevos folículos de los múltiples reclutamientos. Esta sería la razón por la que estas hembras superan la cantidad de folículos que se esperarían con el tiempo de tratamiento y que sólo algunos alcanzaran los diámetros foliculares preovulatorios.

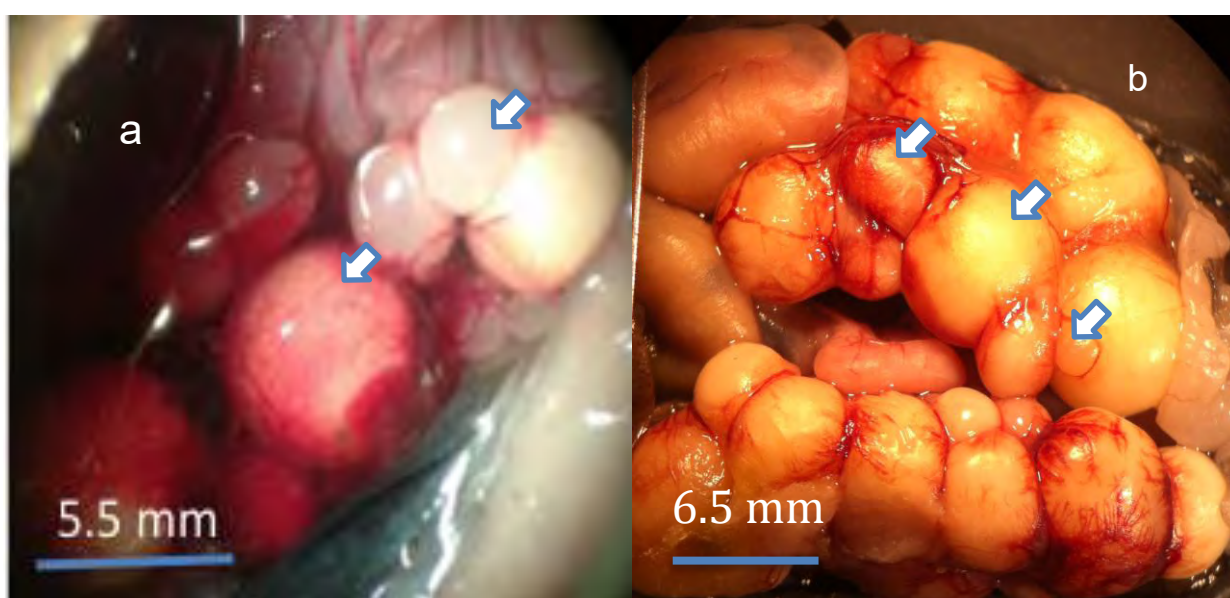


Figura 21. Folículos con diámetros heterogéneos de *B. imbricata*. a) In vivo. b) organismo fijado en formol.

Desarrollo folicular

Al observar que los folículos presentaron diámetros heterogéneos, se contabilizaron en las 13 hembras un total de 99 folículos que sobrepasaban los 3 mm. Se observaron 3 rangos de diámetros foliculares (Cuadro 4). Dado lo anterior, se consideró que el tiempo aproximado para que se diera un nuevo reclutamiento era de 3 semanas. En el grupo control y el sometido a tratamiento de temperatura no se registró el desarrollo de folículos

Cuadro 4. Porcentaje de diámetros foliculares en el primer experimento (n = 99).

Diámetro	Porcentaje
De 3 a 4mm	44%
De 5- 7.4mm	34%
≥7.5mm	22%

Para reducir la cantidad de reclutamientos que se estaban dando a solamente uno, se aumentó la dosis inicial a 2UI/g y la de mantenimiento de 0.5 UI/g. Sin embargo, sólo las hembras de mayor tamaño desarrollaron folículos, con lo cual se confirmó que para que pueda ser estimulado este proceso se necesita de cierto grado de madurez sexual. Aunque se utilizaron lagartijas que sobrepasaban la talla mínima (77.5 mm) para poder reproducirse (Guillette y Casas- Andreu, 1987) se ha registrado que puede existir una gran plasticidad de caracteres de historia de vida (duración de la temporada reproductora, talla y edad para alcanzar la madurez sexual, fecundidad, supervivencia, tamaño de la camada y longitud hocico cloaca al nacimiento o eclosión) entre las poblaciones; los factores ambientales que originan estas variaciones son la temperatura, precipitación, disponibilidad de alimento y densidad poblacional (Horváthova *et al.*, 2013; Roitberg *et al.*, 2015 y Cruz-Elizalde *et al.*, 2016). Por lo que en las hembras sometidas a tratamiento experimental se pudo ver reflejada la variación geográfica, misma que está asociada a cambios en la talla mínima para poder reproducirse (Wei-Guo *et al.*, 2005). A pesar de esto, los diámetros foliculares observados así como la cantidad de folículos desarrollados por algunas hembras (4) son muy semejantes a los registrados en las poblaciones naturales (Guillette y Casas-Andreu, 1987; Martínez-Torres *et al.*, 2009) (Figura 22). Lo cual sugiere que los mecanismos que regulan el reclutamiento y la dominancia folicular bajo este régimen hormonal no fueron suprimidos, ya que se indujo un sólo reclutamiento. En *P. sicula* se ha observado que en las primeras etapas del ciclo ovogénico, la FSH modula indirectamente la cantidad de ovocitos que se van a reclutar al estimular la proliferación de ovogonias, incrementando así el lote de

células germinales de las cuales los folículos son reclutados. Mientras que los folículos regulan directamente el reclutamiento de los ovocitos por un factor difusible (21 kDa) secretado por las células piriformes, que no es dependiente de la cantidad de gonadotropinas (Sica *et al.*, 2001 y Limatola *et al.*, 2002). A diferencia de *P. sicula*, en *B. imbricata* se puede considerar que los mecanismos que regulan el reclutamiento sí son dependientes de las gonadotropinas plasmáticas circulando en el medio.



Figura 22. Folículos inducidos de *B. imbricata* con el segundo régimen hormonal con una dosis de reclutamiento (2UI/g durante 3 semanas) y una de mantenimiento (0.5 UI/g) durante 16 semanas. Se observan diámetros foliculares similares y menor cantidad de folículos.

En tres organismos de cuatro que alcanzaban la talla reproductora se observaron huevos en el útero (Figura 23 b) y cuerpos lúteos (Figura 23 c y d) (*), indicativos de que hubo ovulación. Para asegurara que se trataba de un CL se disectó y se procesó con la técnica histológica de rutina. El CL estaba en fase uno de regresión, por lo que no se pudo determinar el momento en que ocurrió la ovulación. Además de que los folículos presentaban diámetros de 6.5 a 7.5 mm, los cuales son menores a los reportados como preovulatorios, lo cual indicaría que estos maduraron precozmente con el tratamiento. Las características de la etapa

de regresión son la aparición de vacuolas en el citoplasma, núcleos picnóticos en las células luteales, y disminución del diámetro (Martínez-Torres *et al.*, 2003) esto se observa naturalmente en los meses de enero, febrero y marzo. Sin embargo al ser inducidos fuera de la temporada ovogénica natural es normal que se recorriera el tiempo en el que fueron encontrados

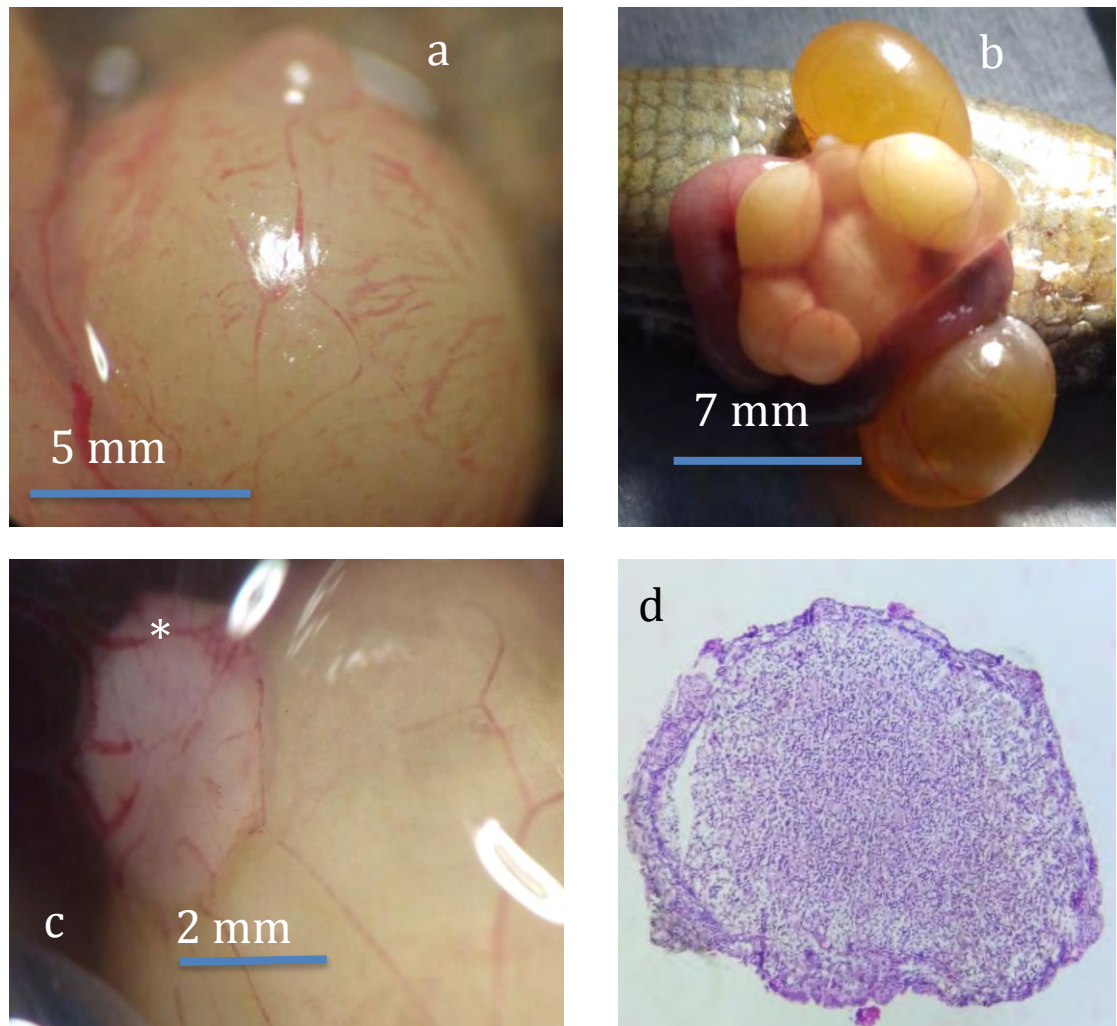


Figura 23. a) Folículo a punto de ovular de *B. imbricata*. b) Organismo con huevos en el oviducto. c) Cuerpo lúteo *in vivo* (*). d) Cuerpo lúteo teñido con hematoxilina-eosina.

En otras especies sólo se ha logrado inducir la ovulación con la administración de FSH solamente en organismos que ya tenían folículos grandes (como *A. carolinensis*, Jones *et al.*, 1988; *C. versicolor*, Bhagyashri *et al.*, 1993), por lo que se tuvo un gran avance en cuanto a la inducción del ciclo ovogénico completo en saurios.

Concentraciones de estradiol de organismos sometidos a tratamiento hormonal.

Las concentraciones de E₂ en el plasma de *B. imbricata* de los grupos sometidos a tratamiento hormonal se muestran en el cuadro 5. El ANOVA de un factor para el grupo control (p = 0.902) y el grupo hormonal (p = 0.365) del primer experimento mostró que no existen diferencias significativas a lo largo del tiempo, aunque en el sometido a tratamiento hormonal hubo presencia de folículos. En el segundo experimento tampoco se detectaron diferencias significativas entre el grupo control y el sometido a tratamiento hormonal.

Cuadro 5. Media y error estándar de la media de las concentraciones de E₂ [pg/ml] en el plasma de *B. imbricata* de organismos sometidos a tratamiento hormonal. En los meses de marzo y abril no hay controles por causas ajenas al estudio.

MES	4UI/g		2UI/g y 0.5UI/g	
	Control	Hormonal	Control	Hormonal
Enero	178.445 ± 39.03	107.911 ± 29.73	54.653 ± 19.438	36.74 ± 9.63
Febrero	175.303 ± 37.57	107.65 ± 55.92	38.083 ± 9.97	46.202 ± 9.82
Marzo		110.18 ± 182.74	24.51 ± 21.273	38-99 ± 8.83
Abril		140.08 ± 36.567	55.55 ± 12.138	20.678 ± 1.66

Para el caso de ensayos como el RIA para gonadotropinas como la LH y FSH, la dificultad que presentan es que suelen ser específicas para la especie y no se ha logrado identificar, en el caso de saurios, estas gonadotropinas por separado (Jones, 2001). Los ensayos realizados muestran que en *B. imbricata* la gonadotropina circulante es similar a la LH de los mamíferos. Sin embargo esta hormona sólo se pudo detectar, en la mayoría de los casos, en organismos que estaban siendo sometidos a tratamiento con PMSG. Dado lo anterior, no se puede descartar la posibilidad de que este ensayo cuantificara la hormona que estaba

siendo administrada, ya que ésta tiene una vida media de 26 horas (Veterindustria, 2003 y Tennant, 2008). Es necesario señalar que también se detectó en organismos que no estaban siendo sometidos a tratamiento, principalmente en los meses de febrero y marzo. Además, la cantidad mínima detectable de LH en RIA es de 0.05 ng/ml, por lo que la mayoría de las concentraciones pudieron estar por debajo de este valor y por esta razón no fue detectada. Para realizar ensayos más certeros es necesario generar anticuerpos que sean más específicos para la gonadotropina propia de estos saurios.

Se ha reportado que la sensibilidad a estas hormonas varía con la temporada a lo largo del ciclo anual (Jones *et al.*, 2015) debido a la presencia de receptores a estrógenos ER α y β lo anterior hizo evidente la necesidad de conocer las concentraciones hormonales de un ciclo ovogénico en condiciones naturales para poder tener valores de referencia que permitieran comparar el efecto del tratamiento con PMSG.

Desarrollo folicular en una población natural.

Para tener una mejor comprensión del fenómeno que se estaba estudiando, se procedió a hacer un perfil de los diámetros foliculares y del patrón de E₂ y LH en organismos de una población natural. El análisis de los folículos mediante laparotomía permitió establecer tres etapas en el desarrollo folicular a lo largo de la temporada gametogénica, una etapa postovulatoria y la de preñez. Los folículos observados fueron organizados por tamaño, debido a que se presentaban distintas etapas en un mismo mes de colecta. El primer grupo estuvo constituido por folículos previtelogénicos (PV), que se caracterizan por tener diámetros menores a 2 mm y carecen de vitelo (Figura 24a). El segundo por folículos vitelogénicos que tuvieron un diámetro mayor a 2 mm y menores a 6.5 (Figura 24b). El tercer grupo por aquellos que presentaban diámetros mayores a 6.5 mm y fueron considerados como preovulatorios (Figura 24 c).

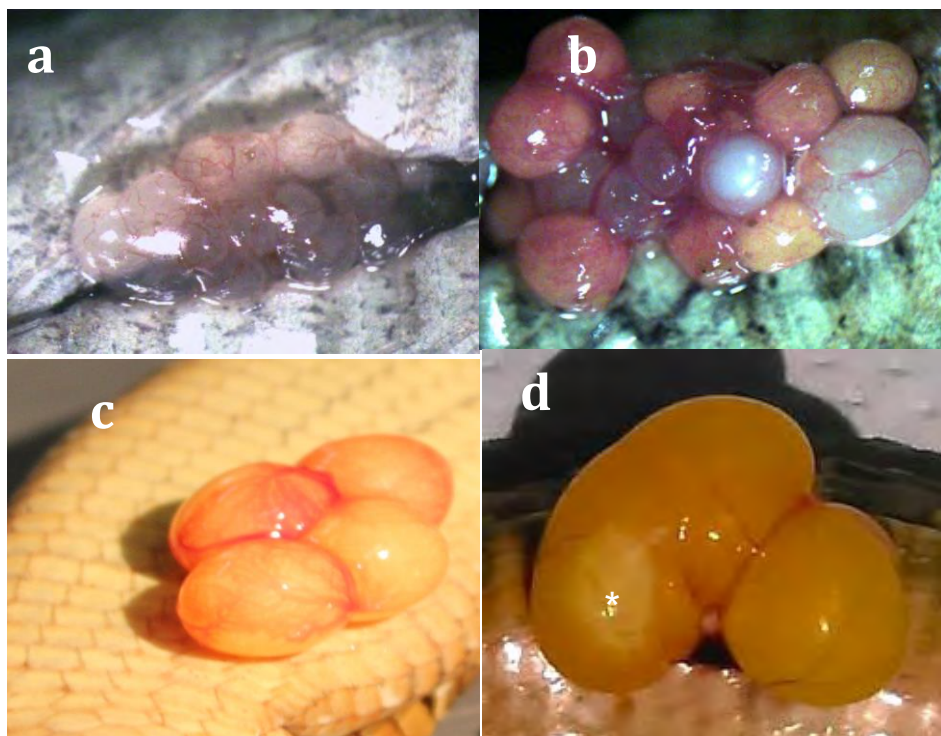


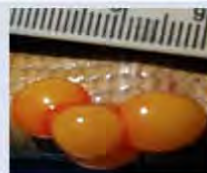
Figura 24. Folículos observados en las laparotomías durante el período natural de ovogénesis en hembras de *Barisia imbricata*. a) Folículo previtelogénico con diámetro menor a 2 mm sin vitelo. b) Folículo vitelogénico mayor a 2 mm con depósito de vitelo. c) Folículos preovulatorios, con diámetros mayores a 6.5 mm los cuales ya comienzan a mostrar una zona avascular. d) Huevos en oviducto en donde se logra apreciar la cicatrizcula indicador que ya ocurrió fecundación (*).

En la población estudiada, en los meses de noviembre a mayo, las hembras se encuentran preñadas (Figuras 25 y 26). Esto muestra que hay desfaseamiento de un mes con respecto a la población de Zoquiapan estudiada por Guillelte y Casas-Andreu (1987), pero coincide con lo reportado por Martínez-Torres *et al.*, (2003). Los diámetros foliculares encontrados a lo largo de los meses también difieren con lo reportado por Guillelte y Casas-Andreu (1987), ya que en los meses de Septiembre se encontraron diámetros de 5.06 cm a diferencia de ellos que reportan de 3.7 cm, y en Octubre de 8.14 cm a diferencia de los 0.6 mm medidos por ellos. Estas diferencias podrían deberse principalmente a que muchos de los organismos que utilizados en ese estudio pertenecían a distintas poblaciones almacenadas en una colección. Esas divergencias también se han reportado en otras especies de lagartijas del género *Egernia* (Chappel, 2003), *Xenosaurus* (Zamora-Abrego *et al.*, 2007), en *T. septentrionalis* (Du *et al.*, 2005), *S. grammicus* (Ramírez-Bautista *et al.*, 2012 y Lozano *et al.*, 2015), *Zootoca vivipara* (Roirberg *et*

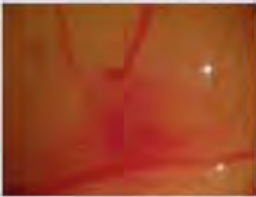
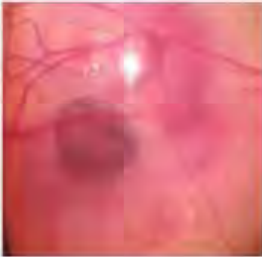
al., 2013), *A. nebulosus* (Hernández-Salinas y Ramírez-Bautista, 2015), *S. variabilis* (Cruz-Elizalde y Ramírez-Bautista, 2016). Estas diferencias radican en los diversos aspectos de las historias de vida de cada población e individuo (como hábitat, tamaño al alcanzar la madurez sexual, tamaño de la camada, talla al nacimiento entre otros). En una escala de tiempo evolutivo, las diferentes especies o poblaciones de una misma especie pueden haberse adaptado a diferentes ambientes térmicos, por cambios en las funciones enzimáticas, para permanecer en ambientes a distintas latitudes o altitudes (Seebacher, 2005; Yan Sun, 2012). Además, esto también puede representar diferencias genéticas causadas por adaptaciones locales, ya que el clima en el que se realizó este estudio es más seco, permitiendo que se desarrollaran en hábitats con diferentes temperaturas (Zamora-Abrego *et al.*, 2007). Otro factor involucrado en estos cambios es la altitud. Se ha visto que esta tiene incidencia en la temperatura, lo cual explicaría los patrones de variación en los eventos reproductivos de estos saurios (Niewiarowski, 2001 y Seebacher, 2005).

Estas observaciones sugieren que es necesario explorar la participación de otros factores ecológicos (disponibilidad de alimento, fotoperiodo y estrés) que pueden estar participando en la regulación de este fenómeno.

Cuadro 6. Diámetros y características de los folículos de *Barisia imbricata* durante los meses de Junio a Noviembre.

Mes	Características de los folículos	Imagen
Junio	Folículos menores a tres milímetros, previtelogénicos. Carecen de vitelo y son de color transparente	
Julio	Folículos entre 2-4 y 2.8 mm. Se empieza a observar el depósito de vitelo	
Agosto		
Septiembre	Los folículos que se observan tienen diámetros de 6.5-7.5 mm. Existe cierta vascularización y se empieza a ver una zona isquémica por la cual se dará la ovulación	
Octubre	Diámetros foliculares son cercanos a los 8 mm. La vascularización se ve más reducida.	
Noviembre	Los diámetros del huevo son cercanos a los 8.5 mm. Ya se encuentran en oviducto (signo de ovulación) se observa la zona en donde se dio la fecundación.	

Cuadro 7. Desarrollo embrionario en *B. imbricata*. Establecido de acuerdo a Dufaure y Hubert (1961).

Mes	Características del desarrollo embrionario	Imagen
Enero	Organismos con embrión en etapa de desarrollo 23-25. Se observa la vesícula óptica	
Febrero	Organismos con embrión en etapa de desarrollo 22 a -32 . Se observa la vesícula óptica	
Marzo		
Abril	Organismos desde etapa 29 a 37. La coloración de las escamas aún no es evidente.	
Mayo	Organismos en etapa de desarrollo 40. Ya se aprecia la coloración de las escamas.	

Los diámetros foliculares de los organismos colectados en campo incrementan a que avanza la vitelogénesis (Figura 27). El mes en el que inicia la vitelogénesis en la población utilizada es Julio, el diámetro folicular máximo alcanzado fue de 8.3 mm, y esta se presentó en noviembre. Este es el diámetro de un folículo considerado como preovulatorio. En la fase de preñez, que se inicia en los últimos días de Noviembre hasta Mayo-Junio del siguiente año, presentaron folículos previtelogénicos que no sobrepasaban el milímetro en diámetro.

Diámetros foliculares y concentraciones de estradiol mensuales en *B. imbricata*.

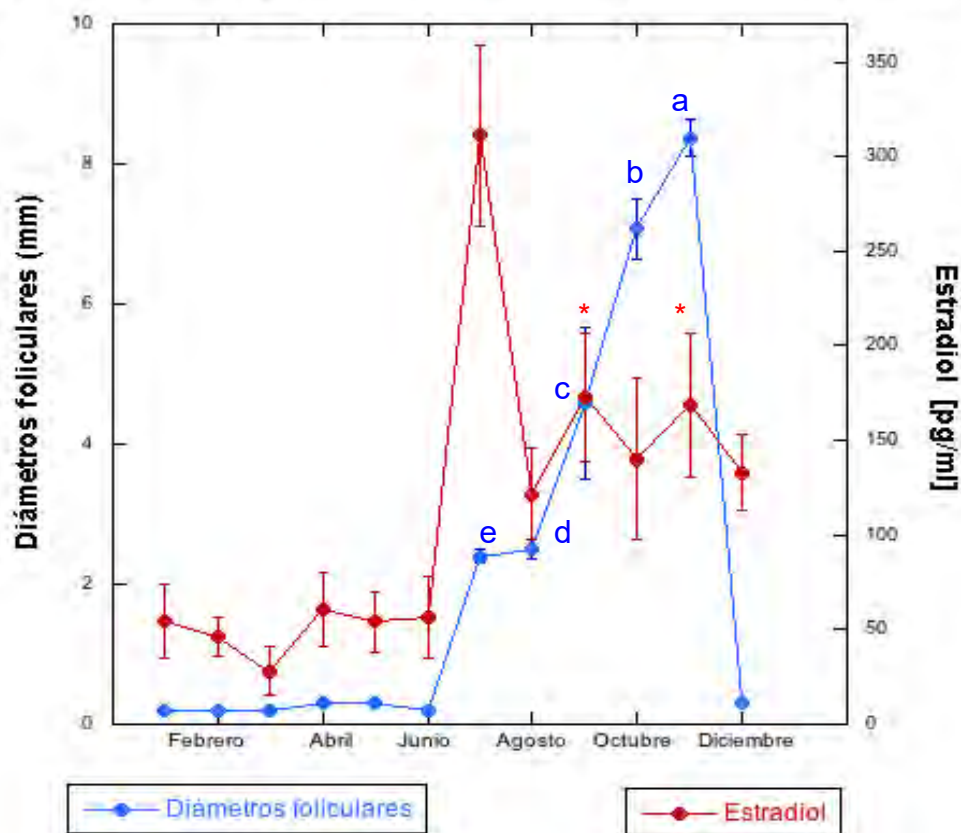


Figura 25. Media y EEM de los diámetros foliculares (a tuvo diferencias significativas con la mayoría excepto con Octubre; b tuvo diferencias significativas con la mayoría excepto con Noviembre; c tuvo diferencias significativas con todos los meses; d tuvo diferencias significativas con la mayoría excepto con julio; e tuvo diferencias significativas excepto con agosto $P < 0.001$) y concentraciones de estradiol de los organismos colectados en campo colectados mensualmente a lo largo de un año (el mes de julio tuvo diferencias significativas con todos los meses, * diferencias significativas con el mes de marzo $p < 0.001$)

Mediante una prueba de dilución de suero de *B. imbricata* se evaluó la linealidad o exactitud del método, siendo el porcentaje de recuperación de 108% con $r^2 = 1$. Las concentraciones de estradiol a lo largo del ciclo ovárico no son semejantes al patrón más común en otros saurios. La etapa en la que se registra la mayor concentración (300 pg/ml) coincide con los meses en donde se inicia la vitelogénesis y esta va disminuyendo gradualmente. En los meses de preñez, las concentraciones caen por debajo de los 100 pg/ml, esta etapa fue la única que mostró diferencias significativas con respecto a las otras. Esto no concuerda con el patrón reportado para muchas especies de saurios como *C. versicolor* (Radder *et al.*, 2001), *S. virgatus* (Weiss *et al.*, 2002), *P. cornutum* (Wack *et al.*, 2007), *E. macularius* (Rhen *et al.*, 2000), *C. inornatus* (Moore y Crews, 1986) y *C. calyptratus* (Kummrow *et al.*, 2010).

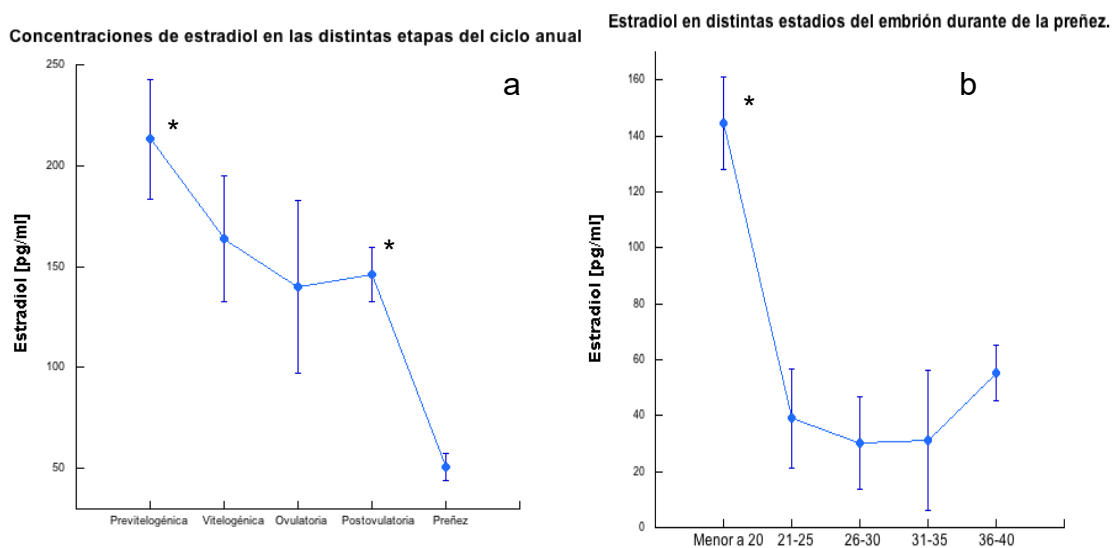


Figura 26. Media y EEM de las concentraciones de a) estradiol en las distintas etapas de la vitelogénesis (* diferencias significativas con respecto al desarrollo folicular, no se consideró la preñez $p < 0.001$) y b) estadios de la preñez (* diferencias significativas con respecto a los otros estadios $p < 0.001$)

La concentración promedio de estradiol que presentó *B. imbricata* durante el periodo previtelogénico fue de 213.14 ± 84.31 pg/ml (Figura 28), las cuales son más cercanas a las reportadas en *P. barbata*, *U. hardwicki* y *P. Picta* además de que no presentan el patrón común en otras especies (tanto ovíparas como vivíparas) que se han estudiado. El patrón más antiguo, y más frecuentemente

reportado, asume que se da un incremento gradual del estradiol a medida que va incrementando el desarrollo folicular y llega a su punto máximo antes de la ovulación (Cuadro 1). Sin embargo, en *Sphenodon punctatus* las concentraciones de estradiol no mostraban una correlación con la síntesis de vitelogenina (Brown *et al.*, 1997). Estas observaciones sugieren que se necesitan concentraciones altas de estradiol para poder reiniciar la actividad ovárica y que el mantenimiento de la misma requiere de concentraciones más bajas. Por lo que el desarrollo folicular con una dosis alta de PMSG, seguida de una menor generó un ciclo más semejante al que se observa en condiciones naturales.

Además, existen evidencias que otros esteroides, como la estrona pueden estar regulando la vitelogenesis. Este es el caso de la lagartija vivípara *L. sicula*, donde se ha observado que las concentraciones de esta hormona son mayores que las de E₂ en los ovarios (Lupo Di Prisco *et al.*, 1968). Por lo que se ha sugerido que otros estrógenos pueden estar actuando de una manera más directa (Amey y Whittier, 2000; Edwards *et al.*, 2002). Las diferencias en la ruta esteroidogénica que es utilizada, preferentemente en cada especie para sus procesos reproductores, podría explicar el por qué un metabolito sea considerado más activo que otro, y que, en el caso de *B. imbricata* probablemente el estradiol sea transformado a estrona por la 17-β hidroxí esteroide deshidrogenasa de tipo 2, 4 ó 14 (Luu-The, 2013) y que sea el directamente responsable de la vitelogénesis.

Otros compuestos que se sugiere que podrían estar implicados en la regulación del ciclo ovárico son estrógenos de naturaleza desconocida, como los derivados hidroxilados del E₂ (Edwards *et al.*, 2002). Además, se ha observado que hay otras hormonas (como los andrógenos) que presentan cambios más considerables en la vitelogénesis, como es el caso de *T. nigrulotea* y la testosterona. Edwards y Jones (2015), sugieren que podría servir como una estrategia para desacoplar a la vitelogénesis de otros aspectos de la fisiología reproductora o el comportamiento. También se ha observado que las glándulas adrenales son capaces de sintetizar esteroides sexuales, por lo que podrían ser otra fuente de estrógenos (Jones, 2011).

En el análisis estadístico de las concentraciones de E_2 en las diferentes etapas de la preñez de los organismos colectados (Fig. 27) se observa que son significativamente mayores en los estadios tempranos del desarrollo embrionario (menores a la etapa 20 de Dufaure y Hubert, 1961). Estas concentraciones van disminuyendo y están por debajo de 50 pg/ml entre los estadios 21 al 35 y finalmente vuelven a aumentar a concentraciones cercanas a 60 pg/ml en las últimas fases de la etapa embrionaria. Esto es debido a que en los primeros estadios de la preñez la secreción de P_4 apenas empieza debido a la formación del CL (Martínez-Torres *et al.*, 2003), conforme avanza la gestación aumentan las concentraciones de esta hormona, para disminuir al final de la gestación. Lo cual, disminuye las concentraciones de estrógenos a mitad de la gestación y se incrementan al final para coadyuvar al desencadenamiento del parto (Martínez-Torres *et al.*, 2003, 2010, 2014).

CONCLUSIONES

Es posible inducir un nuevo ciclo ovogénico fuera de la temporada gametogénica mediante gonadotropinas de mamífero en hembras maduras sexualmente, lo cual sugiere que la fase de quiescencia en esta especie se debe a la falta de estimulación por gonadotropinas.

Las concentraciones de E_2 en las lagartijas tratadas con PMSG no mostraron diferencias significativas a las que se sometieron a tratamiento de temperatura controlada, esto sugiere que puede ser otro estrógeno el involucrado en promover la síntesis de vitelo.

Se logró establecer la dosis de reclutamiento y de soporte, para promover el desarrollo de un ciclo ovogénico semejante al que se observa en poblaciones naturales, sin embargo aún falta establecer la dosis y el tiempo adecuado para inducir la ovulación.

Las concentraciones de estradiol observadas en la temporada gametogénica de poblaciones naturales de *Barisia imbricata* no obedece al patrón reportado para otros vertebrados.

Existe una correlación inversamente proporcional entre las concentraciones de estradiol y la talla de los organismos.

LITERATURA CITADA

- Amey, A.P. y J. M. Whittier. 2000. Seasonal patterns of plasma steroid hormones in males and females of the bearded dragon lizard, *Pogona barbata*. *General and Comparative Endocrinology* 117: 335-342.
- Andrew, P. A. y J. M. Whittier. 2000. Seasonal Patterns of Plasma Steroid Hormones in Males and females of the Bearded Dragon Lizard, *Pogona barbata*. *General and Comparative Endocrinology* 117: 335-342.
- Arslan, M., P. Zaidi, J. Lobo, A. A. Zaidi y M. H. Qazi. 1978. Steroid Levels in Preovulatory and Gravid Lizards (*Uromastix hardwicki*). *General and Comparative Endocrinology* 34: 300-303.
- Bao-Jun, S., D. Wei-Guo, L. Shu, Y. Chen y Y. Wang. 2011. The influence of thermal environment and gonadal recrudescence in male Chinese skinks [*Plestiodon (Eumieces) chinensis*]. *General and Comparative Endocrinology*. 170: 449-454.
- Barreiro, M. L. y M. Tena-Sempere. 2004. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility?. *Molecular and Cellular Endocrinology* 226: 1-9.
- Bhagyashri A., A. Shanbhag y B. S. K. Prasad. 1993. Induction of Ovulation by Serum Gonadotropin, Fertilization, and Embryonic Development in the Lizard *Calotes versicolor*. *Journal of Herpetology* 27 (4): 480-481.
- Blackburn, D. G. 1993. Corioallantoic Placentation in Squamate Reptiles: Structure, Function, Development and Evolution. *The Journal of Experimental Zoology* 266: 414-430.
- Blanco, G. S., S. J. Morreale, E. Vélez, R. Piedra, W. M. Montes, F. V. Paladino y J. S. Spotila. 2011. Reproductive Output and Ultrasonography of an Endangered Population of East Pacific Green Turtles. *The Journal of Wildlife Management*.
- Bona-Gallo, A., P. Licht, D. S. Mackenzie y B. Lofts. 1980. Annual cycles in levels of pituitary and plasma gonadotropin, gonadal steroids, and thyroid activity in the chinese cobra (*Naja naja*). *General and Comparative Endocrinology* 42: 477-493.

- Bonnet, X., G. Naulleau, D. Bradshaw y R. Shine. 2001. Changes in Plasma Progesterone in Relation to Vitellogenesis and Gestation in the Viviparous Snake *Vipera aspis*. *General and Comparative Endocrinology* 121: 84-94.
- Bonnet, X., S. Akoka, R. Shine y L. Pourcelot. 2008. Disappearance of eggs during gestation in a viviparous snake (*Vipera aspis*) detected using non-invasive techniques. *Acta Herpetologica* 3: 129-137.
- Borrelli, L., R. De Stasio, V. Bovenzi, E. Parisi y S. Filosa. 2000. Seasonal-dependent effect of temperature on the response of adenilate ciclase to FSH stimulation of the oviparous lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Endocrinology* 167: 275-280.
- Brann, D. W., M. F. Wade, K. M. Dhandapani, V. B. Mahesh y C. D. Buchanan. 2002. Leptin and reproduction. *Steroids* 67: 95-104.
- Brown, M. A., A. Carne y G. K. Chambers. 1997. Purification, Partial Characterization and Peptide Sequences of Vitellogenin from a Reptile, the Tuatara (*Sphenodon punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 117B: 159–168.
- Burns, J. M. y J. S. Richards. 1974. Effects on mammalian and host gonadotropines on the ovaries and oviducts of female Texas horned lizards. *Phrynosoma cornutum*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 47A: 655-661.
- Callard, I. P., L. A. Fileti, L. E. Sorbera, G. Giannoukos, L. L. Klosterman, P. Tsang y J. A. Mc Cracken. 1992. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. *American Zoologist* 32:264-275.
- Callard, I.P. y S.M. Ho, 1987. Vitellogenesis and viviparity. En: Chester-Jones, I., Ingleton, P.M., Philips, J.G. (Eds.), *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology*. Plenum Press, New York, NY, pp. 257–281.
- Capaldo, A., V. Laforgia, R. Sciarrillo, S. Valiante, F. Gay y L. Varano. 2003. Localization and role of serotonin in the adrenal gland of *Podarcis sicula* (Reptilia, Lacertidae). *General and Comparative Endocrinology* 132: 66-76.
- Carsia, R. V. y H. John-Adler. 2003. Seasonal alterations in adrenocortical cell function associated with stress-responsiveness and sex in the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*). *Hormones and Behavior* 43: 408-420.
- Carsia, R. V., P. J. McIlroy, R. M. Cox, M. Barrett y H. B. John-Adler. 2012. Effects of food restriction on steroidogenesis in dispersed adrenocortical cells from Yarrow's Spiny

- Lizard (*Sceloporus jarrovi*). *General and Comparative Endocrinology* 178: 306-313.
- Cartledge, V. A. y S. M. Jones. 2007. Does adrenal responsiveness vary with sex and reproductive status in *Egernia whitii*, a viviparous skink?. *General and Comparative Endocrinology* 150: 132-139.
- Chapple, D. G. 2003. Ecology, life-history and behavior in the Australian scincid genus *Egernia*, with comments on the evolution of complex sociality in lizards. *Herpetological Monographs* 17:145-180.
- Clarke, D. N. y P. A. Zani. 2012. Effects of night-time warming on temperature ectotherm reproduction: potential fitness benefits of climate change for side-blotched lizards. *The Journal of Experimental Biology* 215: 1117-1127.
- Cooper, C. E. 2015. Endocrinology of osmoregulation and thermoregulation of Australian desert tetrapods: A historical perspective. *General and comparative Endocrinology* En prensa.
- Cruz-Elizalde, R. y A. Ramírez Bautista. 2016. Reproductive cycles and reproductive strategies among populations of the Rose-bellied Lizard *Sceloporus variabilis* (Squamata: Phrynosomatidae) from central Mexico. *Ecology and Evolution* 6: 1753-1758.
- D'Aniello, B., C. Pinelli, J. A. King y R. K. Rastogi. 1994. Neuroanatomical organization of GnRH neuronal systems in the lizard (*Podarcis s. sicula*) brain during development. *Brain Research* 657: 221-226.
- Dashevsky, D., J. M. Meik, E. Mociño-Deloya, K. Setser y S. Schaak. 2013. Patterns of sexual dimorphism in Mexican alligator lizards, *Barisia imbricata*. *Ecology and Evolution* 3: 255-261.
- Du, W.G., X. Ji, Y. P. Zhang, X. F. XU y R. Shine. 2005. Identifying sources of variation in reproductive and life history traits among five populations of a Chinese lizard. (*Takydromus septentrionalis*, Lacertidae). *Biological Journal of Linnean Society*. 85:443-453.
- Dubois, E. A., M. A. Zanbergen, J. Peute y H. J. Th. Goos. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Research Bulletin* 57: 413-428.

- Dufaure J. P. y J. Hubert. 1961. Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* jacquin. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale* 50:309–328.
- Dunham, L. A., D. I. Lutterschmidt y W. Wilczynski. 2009. Kisspeptin-Like Immunoreactive Neuron Distribution in the Green Anole (*Anolis carolinensis*). *Brain, Behavior and Evolution* 73:129-137.
- Duvall, D. L., J. Guillette Jr. y R. E. Jones. 1982. Environmental control of reptilian reproductive cycles. En: *Biology of the Reptilia*. C. Gans y F. H. (eds.). Academic Press. New York. 201-231.
- Edwards A. y S.M . Jones. 2001. Changes in Plasma Progesterone, Estrogen and Testosterone Concentrations Throughout the Reproductive Cycle in Female Viviparous Blue-Tongued Skinks, *Tiliqua nigrulotea* (Scincidae) in Tasmania. *General and Comparative Endocrinology* 122: 260-269.
- Edwards A., S.M . Jones y N. W Davies. 2002. A possible alternative to 17 β - estradiol in a viviparous lizard *Tiliqua nigrulotea*. *General and Comparative Endocrinology* 129: 114-121.
- Edwards, A. y S. M. Jones. 2001. Changes in Plasma Progesterone, Estrogen, and Testosterone Concentrations throughout the Reproductive Cycle in Female Viviparous Blue-Tongued Skinks, *Tiliqua nigrulotea* (Scincidae), in Tasmania. *General and Comparative Endocrinology* 122: 260-269.
- Edwards, A. y S. M. Jones. 2015. Response to gonadotropin-releasing hormone challenge: seasonal variation in steroid production in a viviparous lizard, *Tiliqua nigrulotea*. *General and Comparative Endocrinology* En prensa.
- Edwards, A., S. M. Jones y N. W. Davies. 2003. Sex and season influence gonadal steroid biosynthetic pathways, end-product production and steroid conjugation in blotched blue-tongued lizards (*Tiliqua nigrulotea*). *General and Comparative Endocrinology* 134: 131-138.
- Eikenaar, C., J. Husak, C. Escallón e I. T. Moore. 2012. Variation in Testosterone and Corticosterone in Amphibians and Reptiles: Relationships with Latitude, Elevation, and Breeding Season Length. *The American Naturalist* 180: 642-654.

- Erskine, D. J. y Hutchison, V. H. 1981. Melatonin and behavioral thermoregulation in the turtle, *Terrapene carolina triunguis*. *Physiology and Behavior* 26, 991–994.
- Fernández-Formoso, G., S. Pérez-Sieira, D. González-Touceda, C. Dieguez y S. Tovar. 2015. Leptin, 20 years of searching for glucose homeostasis. *Life Sciences* 140: 4-9.
- Ferrandino, I., A. Monaco y M. C. Grimaldi. 2015. Effects of leptin on FSH cells in the pituitary gland of *Podarcis sicula*. *C. R. Biologies* 338: 180-184.
- Ferreira R, B. Gasperin ,M. Rovani, J. Santos, M. Barreta, R. Bohrer, C. Price y P. B. Goncalves. 2011. Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. *Endocrinology* 152: 4957–4965.
- Ferreira, A., D. N. Silva, M. Van Sluys y H. Dolder. 2009. Seasonal changes in testicular and epididimal histology of the tropical lizard, *Tropidurus itambere* (Rodrigues, 1987) during its reproductive cycle. *Brazilian Journal of Biology* 69: 429-435.
- Ferreira, R., B. Gasperin, M. Rovani, J. Santos, M. Barreta, R. Bohrer, C. Price y P. B. D. Gonçalves. *Endocrinology* 152:4957-4965.
- Forbes, S., X. Feng Li, J. Kinsey-Jones y Kevin O'Byrne. 2009. Effects of ghrelin on *Kisspeptin* mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neuroscience Letters* 460: 143-147.
- Fortune, J. E., G. M. Rivera y M. Y. Yang. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science* 82-83:109-126.
- French, S. S., R. McLemore, B. Vernon, G. I, H. Johnston y M. C. Moore. 2007. Corticosterone modulation of reproductive and immune systems trade-offs in female tree lizards: long-term corticosterone manipulations via injectable gelling material. *The Journal of Experimental Biology* 210: 2859-2865.
- Ganesh, C. B. y H. N. Yajurvedi. 2003. β - Endorphin disrupts seasonal and FSH- induced ovarian recrudescence in the lizard *Mabuya carinata*. *General and Comparative Endocrinology* 133:305-313.

- Gardner, T. A., J. Barlow y J. A. Peres. 2007. Paradox, presumption and pitfalls in conservation biology: The importance of habitat change for amphibians and reptiles. *Biological Conservation* 138: 166-179.
- Girling, J. E. 2002. The Reptilian Oviduct: A Review of Structure and Function and Directions for Future Research. *Journal of experimental Zoology* 293:141-170.
- Girling, J. E. y A. Cree. 1995. Plasma Corticosterona Levels Are Not Significantly Related to Reproductive Stage in Female Common Geckos (*Hoplodactylus maculatus*). *General and Comparative Endocrinology* 100: 273-281.
- Girling, J.E. y S. M. Jones. 2006. In vitro steroid production by adrenals and kidney–gonads from embryonic southern snow skinks (*Niveoscincus microlepidotus*): implications for the control of the timing of parturition? *General and Comparative Endocrinology* 145: 169–176.
- Gist, D. H., S. Bradshaw, C. M. K. Morrow, J. D. Congdon y R. A. Hess. 2007. Estrogen response system in the reproductive tract of the male turtle: An immunocytochemical study. *General and Comparative Endocrinology* 151: 27–33.
- Greenberg, N. y J. Wingfield . 1987. Stress and reproduction: Reciprocal relationships. *En: "Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles"* .D. O. Norris and R. E. Jones (Eds.), Plenum, New York. 461–503.
- Greives, T.J., A.O. Mason, M.A. Scotti, J. Levine, E.D. Ketterson, L.J. Kriegsfeld y G.E. Demas. 2007. Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology* 148: 1158–1166.
- Gribbins. K., M. Anzalone, M. Collier, G. Granados-González, M. Villagrán-Santa Cruz y O. Hernández-Gallegos. 2011. Temporal germ cell development strategy during continuous spermatogenesis within the montane lizard, *Sceloporus bicanthalis* (Squamata; Phrynosomatidae). *Theriogenology* 76: 1090-1099.
- Guillete, L. J. Jr., y G. Casas-Andreu. 1987. The reproductive biology of high elevation Mexican lizard *Barisia imbricata*. *Herpetologica* 43: 29-38.
- Guillette, L. J. Jr. 1993. The evolution of viviparity in lizards. *Bioscience*. 43: 742-751.
- Gupta, P. S. P., J. K. Folger, S. K. Rajput, L. Lv, J. Yao, J. J. Ireland y G. W. Smith. 2014. Regulation and Regulatory Role of WNT Signaling in Potentiating FSH Action during Bovine Dominant Follicle Selection. *Plos One* 9. 9p

- Guraya, S. S. 1989. Ovarian Follicles in Reptiles and Birds. *Zoophysiology*. 24:6-21.
- Haldar-Misra, C. y J. P. Thapliyal. 1981. Thyroid in Reproduction of Reptiles. *General and Comparative Endocrinology*. 43: 537-542.
- Hampton, J.H., J. F. Bader, W. R. Lamberson, M. F. Smith, R. S. Youngquist y H. A. Gaverick. 2004. Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. *Reproduction* 127: 695-703.
- Hardeland, R., D.P. Cardinali, V. Srinivasan, D. W. Spence, G. M. Brown y S. R. Pandi-Perumal. 2011. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology* 93: 350-384.
- Hayes, E., V. Kushnir, X. Ma, A. Biswas, H. Prizant, N. Gleicher y A. Sen. 2016. Intracellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development. *Molecular and Cellular Endocrinology* En prensa.
- Herbst, L.H., L. Siconolfi-Baez, J. H. Torelli, P. A. Klein, M. J. Kerben e I. M Schumacher. 2003. Induction of vitellogenesis by estradiol-17b and development of enzyme-linked immunosorbant assays to quantify plasma vitellogenin levels in green turtles (*Chelonia mydas*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 135 B: 551-563.
- Hernández-Franyutti A., M. C. U. Aranzabal y L. J. Guillette, Jr. 2005. Oogenesis in the Viviparous Matrotrophic Lizard *Mabuya brachypoda*. *Journal of Morphology* 265: 152-164.
- Hernández-Salinas U. y A. Ramírez Bautista. 2015. Variation in morphological and reproductive characteristics of females of *Anolis nebulosus* (Squamata: Dactyloidae) from island and mainland populations near the Pacific Coast of Mexico. *Acta Zoologica* 96: 428-435.
- Ho, S. M. S. Kleis, R. McPherson, G. J. Heisermann e I. P. Callard. 1982. Regulation of vitellogenesis in reptiles. *Herpetologica* 38: 40-50.
- Horváthova, T., C. R. Cooney, P. S. Fitze, T. A. Oksanen, D. Jelic. I. Ghira, T. Uller y D. Jandzik. 2013. Length of activity season drives geographic variation in body size of a widely distributed lizard. *Ecology and Evolution*. 3: 2424-2442.
- Hotchleiner, C. y M. Holland. 2014. Chapter 10: Ultrasonography en Current Therapy in reptile Medicine and Surgery. D. R. Mader y S. J. Divers eds. *Elsevier Saunders*. 107-127.

- Ikemoto, T. y M. K. Park. 2007. Comparative analysis of the pituitary and ovarian GnRH systems in the leopard gecko: signaling crosstalk between multiple receptor subtypes in ovarian follicles. *Journal of Molecular Endocrinology* 38: 289-304.
- Jiménez-Cruz, E., A. Ramírez-Bautista, J. C. Marshall, M. Lizana-Avia y A. Nieto-Montes de Oca. 2005. Reproductive cycle of *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) from Teotihuacán, México. *Southwestern Naturalist* 50: 178-187.
- Johnson, M. A. y J. Wade. 2011. Neuroendocrinology of Reptilian Reproductive Behavior. Volume 3: Reptiles. D. O. Norris y L. H. Lopez (Eds.). Academic Press. 39-61.
- Jones, R. E. J. y L. J. Guillette. 1992. Hormonal control of oviposition and parturition in lizards. *Herpetologica* 38, 80–93.
- Jones, R. E., H. B. Austin, K. H. Lopez, M. S. Rand y CL H. Summers. 1988. Gonadotropin-Induced Ovulation in a Reptile (*Anolis carolinensis*) Histological Observations. *General and Comparative Endocrinology* 72: 312-322.
- Jones, R. E., R. E Tokarz , F. T. La Greek y K. T. Fitzgerald. 1976. Endocrine Control of Clutch Size in Reptiles. VI. Patterns of FSH-Induced Ovarian Stimulation in Adult *Anolis carolinensis*. *General and Comparative Endocrinology* 30: 101-116.
- Jones, R. E., R. E Tokarz y F. T. La Greek. 1975. Endocrine Control of Clutch Size in Reptiles. V. FSH-Induced Follicular Formation and Growth in Immature Ovaries of *Anolis carolinensis*. *General and Comparative Endocrinology* 26: 354-367.
- Jones, S. M. y R. Swain. 2000. Effects of exogenous FSH on follicular recruitment in a viviparous lizard *Niveoscincus metallicus* (Scincidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 127: 487-493.
- Jones, S. M. 2011. Hormonal regulation of ovarian function in reptiles. En: hormones and reproduction of vertebrates. Volume 3: Reptiles. D. O. Norris y L. H. Lopez (eds.). Academic Press. 89-115.
- Jones, S. M. 2015. Variations upon a theme: Australian lizards provide insights into the endocrine control of vertebrate reproductive cycles. *General and Comparative Endocrinology* En prensa.
- Kawano, E., Y. Takahata, T. Oishi, K. Ukena, K. Tsutsui y S. Tamotsu. 2006. Neural Interaction of Gonadotropin-regulating Hormone Immunoreactive Neurons and the

- Suprachiasmatic Nucleus with Paraventricular Organ in the Japanese Grass Lizard (*Takydromus tachydromoides*). *Zoological Science* 23: 277-287.
- Kirsz, K. y D. A. Zieba. 2012. A review on the effect of the photoperiod and melatonin on interactions between ghrelin and serotonin. *General and Comparative Endocrinology* 179: 248-253.
- Knight, P. G. y C. Glister. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121: 503-512.
- Krohmer, R. W., M. H. Boyle, D. I. Lutterschmidt y R. T. Mason. 2010. Seasonal aromatase activity in the brain of the male red-sided garter snake. *Hormones and Behavior* 58: 485-492.
- Kummrow, M. S., D.A. Smith, G. Crawshaw y G. F. Mastromonaco. 2010. Characterization of fecal hormone patterns associated with the reproductive cycle in female veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*). *General and Comparative Endocrinology* 168: 340-348.
- La Dage, L. D. y M. H. Ferkin. 2006. Male leopard geckos (*Eublepharis macularius*) can discriminate between two familiar females. *Behavior* 143: 1033-1049.
- LaDage, L. D., T. C. Roth II, B. Sinervo y V. V. Pravosudov. 2016. Environmental experiences influence cortical volume in territorial and nonterritorial side-blotched lizards, *Uta stansburiana*. *Animal Behavior* 115:11-18.
- Lance, V. A. y R. M. Elsey. 1986. Stress induced suppression of testosterone secretion in male alligators. *Journal of Experimental Zoology* 239: 241-246.
- Lance, V. A., D. C. Rostal, R. M. Elsey y P. L. Trosclair III. 2009. Ultrasonography of reproductive structures and hormonal correlates of follicular development in female American alligator, *Alligator mississippiensis* in southeast Louisiana. *General and Comparative Endocrinology* 162: 251-256.
- Leu, S. T., D. R. Farine, T. W. Wey, A. Sih y C. M. Bull. 2016. Environment modulates population social structure: experimental evidence from replicated social networks of wild lizards. *Animal Behavior* 111: 23-31.
- Licht, P. 1970. Effects of Mammalian Gonadotropins (Ovine FSH and LH) in female Lizards. *General and comparative Endocrinology* 14: 98-106.

- Licht, P. 1972. Actions of Mammalian Pituitary Gonadotropins (FSH and LH) in Reptiles. *General and Comparative Endocrinology* 19: 273-281.
- Licht, P. 1973. Influence of temperature and photoperiod on the annual ovarian cycle in the lizard *Anolis carolinensis*. *Copeia* 1973: 465-472
- Licht, P. 1972. Environmental Physiology of Reptilian breeding Cycles: Role of Temperature. *General and Comparative Endocrinology Suppl* 3:477-488.
- Licht, P. y K. A. Pearson. 1969. Effects of mammalian gonadotropins (FSH and LH) on the testes of the lizard *Anolis carolinensis*. *General and Comparative Endocrinology* 13: 367-381.
- Limatola, E. C. Manzo, S. Manzo, M. G. Monti, P. Rosanova y M. Romano. 2002. Oocyte Growth and Follicular Hierarchy May Be Locally Controlled by an Inhibin-Like Protein in the Lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Zoology* 292:96-102.
- Limatola, E. y S. Filosa. 1989. Exogenous Vitellogenesis and Micropinocytosis in the Lizard, *Podarcis sicula*, Treated with Follicle-Stimulating Hormone. *General and Comparative Endocrinology* 75: 165-176.
- Limatola, E., C. Manzo, S. Manzo, M. G. Monti, P. Rosanova y M. Romano. 2002. Oocyte Growth and Follicular Hierarchy May Be Locally Controlled by an Inhibin-Like Protein in the Lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Zoology* 292: 96-102.
- Liu, C., R. Li, Z. Liu, S. Yin y Z. Wang. 2006. The role of prostaglandins and the hypothalamus in thermoregulation in the lizard, *Phrynocephalus przewalskii* (Agamidae). *Journal of Comparative Physiology B* 176: 321-328.
- López-Moreno, A. E., J. L. Rheubert, C. Pérez-Almazán, G. Granados-González, L. E. Hernández-Hernández, K. M. Gribbins y O. Hernández-Gallegos. 2016. Female reproductive cycle and clutch size of *Aspidoscelis costata costata* (Squamata: Teiidae) from Tonatico, Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* En prensa.
- Lovejoy, D. A., W. H. Fischer, D. B. Parker, J. E. McRory, M. Park, V. Lance, P. Swamson,

- Lovern, M.B. 2011. Hormone and reproductive cycles in lizards. En: hormones and reproduction of vertebrates. Volume 3: Reptiles. D. O. Norris y L. H. Lopez (eds.). Academic Press. 89-115.
- Lozano, A., A. Ramírez Bautista y M. C. Uribe. 2014. Oogenesis and Ovarian Histology in Two Populations of the Viviparous Lizard *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) From the Central Mexican Plateau. *Journal of Morphology* 275:949-960.
- Lupo Di Prisco, C., G. Delrio y G. Chieffi. 1968. Sex Hormones in the ovaries of the lizard *Lacerta sicula*. *General and Comparative Endocrinology* 10: 292-295.
- Lutterschmidt D. I. y V. H. Hutchinson. 2003. Influence of thyroid hormones on the thermal selection of African house snakes (*Lamprophis fuliginosus*). *Journal of Thermal Biology* 28:167-173.
- Lutterschmidt D. I., W. I. Lutterschmidt y V. H. Hutchison. 1997 Melatonin and chlorpromazine: thermal selection and metabolic rate in the bullsnake, *Pituophis melanoleucus*. *Comparative and Biochemical Physiology C* 118:271–277.
- Lutterschmidt D.I. , W. I. Lutterschmidt, N. B. Ford y V. H. Hutchison. 2002. Behavioral thermoregulation and the role of melatonin in a nocturnal snake. *Hormones and Behavior* 41:41–50.
- Luu-The, V. 2013. Assesment of steroidogenesis and steroidogenesis enzyme functions. *Journal of Steroid biochemistry & Molecular Biology* 137: 176-182.
- Manríquez-Morán, N. L., M. Villagrán-Santa Cruz y F. R. Méndez de la Cruz. 2005. Reproductive biology of the parthenogenetic lizard, *Aspidoscelis cozumela*. *Herpetologica* 61: 435-439.
- Marion, K. R. 1970. Temperature as the reproductive cue for the female fence lizard *Sceloporus undulatus*. *Copeia* 1970: 562.
- Martínez- Torres, M. y F.J. Martínez-López. 2006. Efecto de la PMSG y de la hCG sobre la gónada de críos de *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae). IX Reunión Nacional de Herpetología, Monterrey, Nuevo León, México.
- Martínez- Torres, M., B. Rubio-Morales, Piña-Amado, J. J. y J. Luis. 2015. Hemipenes in females of the mexican viviparous lizard *Barisia imbricata* (Squamata: Anguidae):

an example of heterochrony in sexual development *Evolution and Development*. 17: 270-277.

Martínez-Torres, M., C, Álvarez Rodríguez y J. Andrade-Terrazas. 2009. Características de las membranas extraembrionarias desalojadas por los críos de *Barisia imbricata imbricata* (REPTILIA:ANGUIDAE) después del nacimiento. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 14 : 38-42.

Martínez-Torres, M., M- E. Hernández-Caballero, J. A. Luis-Díaz, G. Ortiz-López, M. Cárdenas-León y L. Moreno-Fierros. 2010. Effects of luteectomy in early pregnancy on the maintenance of gestation and plasma progesterone concentrations in the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8:19

Martínez-Torres, M., M. E. Hernández-Caballero, C. Álvarez-Rodríguez, J. A. Luis-Díaz y G. Ortiz López. 2003. Luteal development and progesterone levels during pregnancy of the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae). *General and Comparative Endocrinology* 132: 55-65.

Martínez-Torres, M., M. Salcedo-Álvarez, R. Guzmán-Rodríguez, G. Ortiz-López y T. Hernández-Esparza. 2009. Fracaso reproductor en la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE). *Mesoamericana* 13: 61-64.

Martínez-Torres, M., R. Guzmán-Rodríguez, M. Cárdenas León y N. Brunner-Reynaldo. 2006. Follicular development and ovulation determined by ultrasound imaging in the viviparous lizard *Barisia imbricata* (Reptilia: Anguidae). *Southwestern Naturalist* 51: 401-406.

Massucci, B., Iela, D. L., G. Ciarcia y R. K. Rastogi. 1992. Immunohistochemical Demonstration of the Presence and Localization of Diverse Molecular Forms of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Lizard (*Podarcis s. sicula*) Brain. *General and Comparative Endocrinology* 86: 81-89.

Mc Ardle C. A. y M. S. Robenson. 2015. Gonadotropes and Gonadotropin-Releasing Hormona Signaling. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction VI. Jimmy D. Neill (ed.) Academic Press.

- Medan, M. S., K. Y. Arai, G. Watanabe y K. Taya. 2007. Inhibin: Regulation of reproductive function and practical use in females. *Animal Science Journal* 78: 16-27.
- Méndez, D. F. R., L. J. Guillete Jr., M. V. Santa Cruz, y G. Casas-Andreu. 1988. Reproductive and fat body cycles of the viviparous lizard: *Sceloporus mucronatus* (Sauria:Iguanidae). *Journal of Herpetology*. 22: 1-12.
- Menezes, V. A., C. F. D. Rocha y G. F. Detra. 2004. Reproductive ecology of parthenogenetic whiptail lizard *Cnemidophorus natterii* in a Brazilian resting habitat. *Journal of Herpetology* 38:280-282.
- Messinis, I. E., C. I. Messini y K. Dafopoulos. 2010. The role of gonadotropins in the follicular phase. *Annals of the New York Academic Sciences* 1205: 5-11.
- Mo, B., N. Feng, K. Renner y G. Forster. 2008. Restraint stress increases serotonin release in the central nucleus of the amygdala via activation of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Research Bulletin* 76: 493-498.
- Montaner, A. D., O. González, D. A. Paz, J. M. Affani y G. M. Somoza. 2000. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Variants in a Lizard Brain: Is Mammalian GnRH Being Expressed?. *General and Comparative Endocrinology* 119: 121-131.
- Moore, M. C., J. M. Whittier y D. Crews. 1984. Environmental Control of Seasonal Reproduction in a Parthenogenetic Lizard *Cnemidophorus uniparens*. *Physiological Zoological* 57 (5): 544-549.
- Moore, M. C., y D. Crews. 1986. Sex Steroid Hormones in Natural Populations of a Sexual Whiptail Lizards, *Cnemidophorus inornatus*, a Direct Evolutionary Ancestor of a Unisexual Parthenogen. *General and Comparative Endocrinology* 62: 424-430.
- Münzberg, H. y C. D. Morrison. 2015. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism clinical and experimental* 64:13-23.
- Murphy, B. F., S. L. Parker, C. R. Murphy y M. B. Thompson. 2011. Placentation in the Eastern water skink (*Elamprus quoyii*): a placental-like structure in a lecithotrophic lizard. *Journal of Anatomy* 218: 678-689.

- Muruzábal, F.J. G. Frühbeck, J. Gómez-Ambrosi, M. Archanco y M. A. Burell. 2002. Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *General and Comparative Endocrinology* 128: 149-152.
- Neuman-Lee, L., T. Greives, G. R. Hopkins y S. S. French. 2017. The role of the kisspeptin system in regulation of the reproductive endocrine axis and territorial behavior in male side-blotched lizards (*Uta stansburiana*). *Hormones and Behavior* 89: 48-54.
- Niewiarowski, P.H. 2001. Energy budgets, growth rates, and thermal constraints: toward an integrative approach to the study of life-history variation. *American Naturalist* 157: 421-433.
- Niewiarowski, P.H., M.L. Balk y R.L. Londrville. 2000. Phenotypic effects of leptin in an ectotherm: a new tool to study the evolution of life histories and endothermy? *Journal of Experimental. Biology* 203 : 295–300.
- Nijagal, B. S. y H. N. Yajurvedi. 1999. Influence of Corticosterone on FSH-Induced Ovarian Recrudescence in the lizard *Mabuya carinata*. *General and Comparative Endocrinology* 115: 364-369.
- Ochoa-Ochoa, L., M. Correa-Cano, O. Flores-Villela, U. García-Vázquez, L. Canseco-Márquez. 2006. *Barisia imbricata* (Lagarto alicante del Popocatepetl). Área de de distribución potencial. En CONABIO. Consultado en línea el 7 de Abril del 2016. (http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/bari_imbrgw.xml?_httpcache=yes&_xsl=/db/metadatos/xsl/fqdc_html.xsl&_indent=no)
- Osugi, T., T. Ubuka, K. Tsutsui. 2014. Review: Evolution of GnIH and related peptides structure and function in the chordates. *Frontiers in Neuroscience* 8:255.
- Paolucci, M., S. Buono, R. Sciarrillo y R. Putti. 2006. Effects of leptin administration on the endocrine pancreas and liver in the Lizard *Podarcis sicula*, *Journal of Experimental. Zoology A Comparative Experimental Biology* 305A:383–395.
- Pianka, E.R. y L. Vitt. 2003. Lizards. Windows to the evolution of diversity. Berkeley University. California Press
- Pimm, R. H., C. Dutton, S. O'Handley y G. F. Mastromonaco. 2015. Assessment of the Reproductive Status of Female Veiled Chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) Using Hormonal, Behavioural and Physical Traits. *Zoobiology* 34: 20-32.

- Polzonetti-Magni, A.M., G. Mosconi, L. Soverchia, S. Kikuyama y O. Carnevali. 2004. Multihormonal Control of Vitellogenesis in Lower Vertebrates. *International Review of Cytology* 239. 46p.
- Pralong, F. P. 2010. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Molecular and Cellular Endocrinology* 324: 82-86.
- Prasad, M. R. N. y M. K. Sanyal. 1969. Effect of sex hormones on the sexual segment of kidney and other accessory reproductive organs of the Indian house lizard *Hemidactylus flaviviridis* Rüppell. *General and Comparative Endocrinology* 12: 110–118.
- Radder, R. S., B. A. Shanbhag y S. K. Saidapur. 2001. Pattern of Plasma Sex Steroid Hormone Levels during Reproductive Cycles of Male and Female Tropical Lizard *Calotes versicolor*. *General and Comparative Endocrinology* 124: 285-292
- Rajkovic, A., S. A. Pangas y M. M. Matzuk. Follicular development: Mouse, Sheep and Human Models. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction VI. Jimmy D. Neill (ed.). Academic Press.
- Ramírez-Bautista, A., B. P. Stephenson, A. Lozano, H. Uribe-Rodríguez y A. Leyte M. 2012. Atypical reproductive cycles in a population of *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) from the Mexican Plateau. *Ecology and Evolution* 2: 1903-1913.
- Ramírez-Pinilla, M. P., G. de Pérez y C. Alvarado-Ramírez. 2014. Oogenesis and the Ovarian Cycle en Reproductive Biology and Phylogeny. Volume 10: Reproductive Biology and Phylogeny of lizards and tuatara. J. L.Rheubert, D. S. Siegel y S. E. Trauth Eds. CRC Press. University of Queensland.
- Ramírez-Pinilla, M.P. 2014. Biología reproductiva y placentotrofia en lagartijas del género *Mabuya*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. 38 (Supl): 106-117.
- Ramírez-Sandoval, E., A. Ramírez-Bautista y L.J. Vitt. 2006. Reproduction in the lizard *Phyllodactylus lanei* (Squamata:Gekkonidae) from the Pacific coast of Mexico. *Copeia* 1-9.
- Reptile database. 2016. <http://www.reptile-database.org/>. (En línea, consultado el 29 de Marzo del 2016)

- Rhen, T., J. T. Sakata, M. Zeller y D. Crews. 2000. Sex Steroid Levels across the Reproductive Cycle of Female Leopard Geckos, *Eublepharis macularius*, from Different Incubation Temperatures. *General and Comparative Endocrinology* 118: 322-331.
- Rismiller, P. D. y G. Heldmaier. 1987. Melatonin and photoperiod affect body temperature selection in the lizard *Lacerta viridis*. *Journal of Thermal biology* 12: 131-134.
- Rivier J. E. y N. M. Sherwood. 1991. Primary structure of two forms of gonadotropin-releasing hormone from brains of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Regulatory Peptides* 33: 105–116.
- Roitberg, E. S., G. V. Eplanova, T. I. Kotenko, F. Amat, M. A. Carretero, V. N. Kuranova, N. A. Bulakhova, O. I. Zinenko y V.A. Yakovlev. 2015. Geographic variation of life-history traits in the sand lizard, *Lacerta agilis*: testing Darwin's fecundity-advantage hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology* 28: 613-629.
- Roitberg, E. S., V. N. Kuranova, N. A. Bulakhova, V. F. Orlova, G. V. Eplanova, O. I. Zinenko, R. R. Shamguova, S. Hoffman y V. A. Yakovlev. 2013. Variation of Reproductive Traits and Female Body Size in the Most Widely-Ranging Terrestrial Reptile: Testing the Effects of Reproductive Mode, Lineage, and Climate. *Journal of Evolutionary Biology*. 40: 420-438.
- Romano, M. y E. Limatola. 2000. Oocyte Plasma Membrane Proteins and the Appearance of Vitellogenin Binding Protein during Oocyte Growth in the Lizard *Podarcis sicula*. *General and Comparative Endocrinology*. 118: 383-392.
- Roth, J. J. 1974. The effects of Temperature upon Follicle Stimulating Hormone Influenced Ovarian Recrudescence and Maintenance in the lizard *Anolis carolinensis*. Doctoral diss. University of Colorado.
- Roth, J. J. y R. E. Jones. 1992. A Single Ovary of *Anolis carolinensis* Responds More to Exogenous Gonadotropin if the Contralateral Ovary Is Absent. *General and Comparative Endocrinology* 85: 486-492.
- Sapper, C. B. y B. B. Lowell. 2014. The hypothalamus. *Current Biology* 24: 23. 2749. R1111-R1116.
- Sciarrillo, R., F. Virgilio, M. De Falco, V. Laforgia, L. Varano y M. Paolucci. 2005. Localization and role of leptin in the thyroid gland of the lizard *Podarcis sicula*

- (Reptilia, Lacertidae), *Journal of Experimental. Zoology. A Comparative Experimental Biology*. Exp. Biol. 303: 628–634.
- Seebacher, F. y R. Shine. 2004. Evaluating thermoregulation in reptiles: the fallacy of the inappropriately applied method. *Physiological and Biochemical Zoology* 77:688–695.
- Seebacher, F. 2005. A review of thermoregulation and physiological performance in reptiles: what is the role of phenotypic flexibility?. *Journal of Comparative Physiology B* 175:453-461.
- Seebacher, F. y C. E. Franklin. 2005. Physiological mechanisms of thermoregulation in reptiles: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 175:533-541.
- Shanbhag, B. A. y B.S. K. Prasad. 1993. Induction of Ovulation by Serum Gonadotropin, Fertilization and Embryonic Development in the Lizard *Calotes versicolor*. *Journal of Herpetology* 27: 481-484
- Shanbhag, B. A., R. S. Radder y S. K. Saidapur. 2000. GnRH but Not Warm temperature Induces Recrudescence of Quiescent Testes in the Tropical Lizard *Calotes versicolor* (Daud.) during Postbreeding Phase. *General and Comparative Endocrinology* 119: 232-238.
- Sherwood N., y J. M. Whittier. 1988. Gonadotropin-releasing hormone from brains of reptiles: Turtles (*Pseudemys scripta*) and snakes (*Tamnophis sirtalis parietalis*). *General and Comparative Endocrinology* 69: 319-327.
- Sica, S., D. Fierro, C. Iodice, R. Muoio, S. Filosa y C. M. Motta. 2001. Control of Oocyte Recruitment: Regulative Role of Follicle Cells Through the Release of a Diffusible Factor. *Molecular Reproduction and Development* 58:444-450.
- Sinervo, B. y K. D. Dunlap. 1995. Thyroxine affects behavioral thermoregulation but not growth rate among populations of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). *Journal of Comparative Physiology B* 164: 509-517.
- Singh, P., A. Krishna, R. Sridaran y K. Tsutsui. 2008. Changes in GnRH I, bradykinin and their receptors and GnIH in the ovary of *Calotes versicolor* during reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 159: 158-169.
- Sirotkin, A. V. y R. Grossman. 2015. Interrelationship between feeding level and the metabolic hormones leptin, ghrelin and obestatin in control of chicken egg laying

and release of ovarian hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 1-5.

- Slot, K. A., J. Kastelijn, A. Bachelot, P. A. Kelly, N. Binart y K. J. Teerds. 2006. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reproduction* 131: 525-532.
- Tattersall, G. J., C. A. C. Leite, C. E. Sanders, V. Cadena, D. V. Andrade, A. S. Abe y W. K. Milson. 2016. Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards. *Science Advances* 7 p
- Taylor, E. N., D. F. DeNardo y D. H. Jennings. 2004. Seasonal steroid hormone levels and their relation to reproduction in the Western Diamond-backed Rattlesnake, *Crotalus atrox* (Serpentes:Viperidae). *General and Comparative Endocrinology* 136: 328-337.
- Taylor, E.M. y DeNardo D. F. 2005. Reproductive Ecology of Western Diamond- Backed Rattlesnakes (*Crotalus atrox*) in the Sonoran Desert. *Copeia* 2005: 152-158.
- Tena-Sempere, M., A. Felip, A. Gómez, S. Zanuy y M. Carrillo. 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: Lessons from non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 175: 234-243.
- Tennant, B. 2008. Vademécum Farmacológico de Pequeños Animales y Exóticos. Manual de Formulación. Ediciones S. 5a Ed. Pág. 209.
- Thompson, C. W. y M. C. Moore. 1991. Synoptic occurrence of multiple dewlap color morphs in male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Copeia* 1991: 493-503.
- Thompson, C. W., I. T. Moore y M. C. Moore. 1993. Social, environmental and genetic factors in the ontogeny of phenotypic differentiation in a lizard with alternative male strategies. Behavioral. *Ecology and Sociobiology* 33: 137-146.
- Thompson, M. B., J. R. Stewart y B. K. Speake. 2011. Comparison of nutrient transport across the placenta of lizards differing in placental complexity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127: 469-479.
- Tinkle, D. W. y L. N. Irwin. 1965. Lizard reproduction: Refractory period and response to warmth in *Uta stansburiana* females. *Science*. N. Y. 148: 1613-1614.
- Tokarz, R. R. y C. H. Summers. 2011. Stress and Reproduction in Reptiles. Volume 3: Reptiles. D. O. Norris y L. H. Lopez (Eds.). Academic Press. 39-61.

- Tosini, G. y M. Menaker. 1996. The pineal complex and melatonin affect the expression of the daily rhythm of behavioral thermoregulation in the green iguana. *Journal of Comparative Physiology A* 179:135-142.
- Tsai, P. S. y P. Licht. 1993 . Differential distribution of chicken-I and chicken-II GnRH in the turtle brain. *Peptides* 14: 221–226.
- Tsutsui, K. y K.Ukena. 2006. Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides* 27: 1121–1129.
- Tsutsui, K., E. Saigoh, K. Ukena, H. Teranishi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, S. Ishii, P. J. Sharp. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275, 661–667.
- Ukena, K., E. Iwakoshi-Ukena, T. Osugi, K. Tsutsui. 2016. Identification and localization of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) orthologs in the hypothalamus of the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *General and Comparative Endocrinology* 227: 69-76.
- Unniappan, S. 2010. Ghrelin: An emerging player in the regulation of reproduction in non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 167: 340-343.
- Uribe, M. C. A., M. E. O. Méndez, J. E. Q. Quintero y L. J. Guillette Jr. 1995. Seasonal Variation in ovarian Histology of the Viviparous Lizard *Sceloporus torquatus torquatus*. *Journal of Morphology* 226: 103-119.
- Van, D. J. U. y S. J. Beaupre. 2011. Bioenergetic components of reproductive effort in viviparous snakes: Costs of vitellogenesis exceed costs of pregnancy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 160 A: 504-515.
- Verderame M. y E. Limatola. 2010. Molecular identification of estrogen receptors (ERa and ERb) and their differential expression during VTG synthesis in the liver of lizard *Podarcis sicula*. *General and Comparative Endocrinology* 168: 231-238.
- Veterindustria. 2003. Guía de productos zoonosanitarios. Pulso Ediciones. 8va Ed. Págs. 791-792.
- Villamar, T. D. E. 1998. Contribución al conocimiento de las preferencias térmicas en ánguidos (Reptilia, Sauria). Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Visser, J. A., F. H. De Jong, J. S. E. Laven y A. P. N. Themmen. 2006. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131: 1-9.

- Wack, C. L., S. F. Fox, E. C. Hellgren y M. B. Lovern. 2008. Effects of sex, age and season on plasma esterooids in free ranging Texas horned lizards (*Phrynosoma cornutum*). *General and Comparative Endocrinology* 155: 589-596.
- Wei-Guo D., X. Ji, Y. Pu-Zhang, X-Feng-Xu y R. Shine. 2005. Identifying sources of variation in reproductive and life- history traits among five populations of a Chinese lizard (*Takydromus septentrionalis*, Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 85:443-453.
- Weiser, H., Z. Strarostóva, L. Kubi.ka, y L. Kratochvíl. 2012. Overlap of Female Reproductive Cycles Explains Shortened Interclutch Interval in a Lizard with Variant Clutch Size (Squamata: Gekkonidae: *Paroedura picta*). *Physiological and Biochem Zool* 85: 491-498.
- Weiss, S. L., D.H. Jennings y M. C. Moore. 2002. Effect of captivity in semi-natural enclosures on the reproductive endocrinology of female lizards. *General and Comparative Endocrinology* 128: 238-246.
- Whittier, J. M., R. T. Mason y D. Crews. 1987. Plasma steroid hormone levels of female red-sided garter snakes, *Thamnophis sirtalis parietalis*: Relationship to mating and gestation. *General and Comparative Endocrinology* 67, 33–43.
- Whittier, J. M., T. T. Mason, D. Crews y P. Licht. 1986. Role of light and temperature in the regulation of reproduction in the red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. *Canadian Journal of Zoology* 65:2090-2096.
- Yan Sun, Y., Y. Du, J. Yang, C. Xian Lin y X. Ji. 2012. Climatic correlates of female and male reproductive cycles and plasma steroid hormone levels in the many-lined sun skink *Eutropis multifasciata*. *General and Comparative Endocrinology* 178: 363-371.
- Yasuo, S. y T. Yoshimura. 2009. Comparative Analysis of the Molecular Basis of Photoperiodic Signal Transduction in Vertebrates. *Integrative and Comparative Biology* 49: 507-518.
- Zaldívar-Rae, J., H. Drummond, S. Ancona-Martínez, N. L. Manríquez-Morán y F. R. Méndez de la Cruz. 2008. Seasonal breeding un the western mexican whiptail lizard *Aspidoscelis costata* on Isla Isabel, Nayarit, Mexico. *The Southwestern Naturalist* 53:175-184.

- Zamora-Abrego, J. A., J. J. Zúñiga Vega y A. Nieto-Montes de Oca. 2007. Variation in Reproductive Traits within the Lizard Genus *Xenosaurus*. *Journal of Herpetology* 41: 630-637.
- Zielak, A. E., M. J. Canty, N. Forde, P. M. Coussens, G. W. Smith, P. Lonergan, J. J. Ireland y A. C. O. Evans. 2008. Differential Expression of Genes for Transcription Factors in Theca and Granulosa Cells Following Selection of a Dominant Follicle in Cattle. *Molecular Reproduction and Development* 75:904-914.
- Zuñiga-Vega, J. J., F. R. Méndez-De la Cruz y O. Cuéllar. 2008. Demography of the lizard *Sceloporus grammicus*: exploring temporal variation in population dynamics. *Canadian Journal of Zoology* 86: 1397-409.

ANEXOS

ANEXO 1

Lista de abreviaturas

3 β-HSD	3 β hidroxí-esteroide deshidrogenasa
AMH	Hormona Anti Mülleriana
CL	Cuerpo lúteo
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E₁	Estrona
E₂	17 β estradiol
E₃	Estriol
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona del crecimiento
GnIH	Hormona inhibidora de gonadotropinas
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HHG	Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
IP	Intraperitoneal
LH	Hormona luteinizante
MBH	Hipotálamo medio basal
ME	Eminencia media
P₄	Progesterona
PMSG	Gonadotropina de suero de yegua preñada
POA	Área preóptica
RIA	Radio inmuno análisis
T	Testosterona
T₃	Triyodotironina
T₄	Tiroxina
Vtg	Vitelogenina

ANEXO 2. RESULTADOS ENSAYO rLH.

Mes	Grupo experimental	Campo	Mes	Grupo experimental	Campo
Enero	81.3	ND	Mayo		ND
	5.4	0.031			ND
	ND	ND			ND
	mayor a 100	ND			ND
	12.16	ND			ND
	72.8	ND	Junio		ND
Febrero	mayor a 100	ND			ND
	mayor a 100	ND			ND
	16.72	0.97			ND
	36.28	31			ND
Marzo	mayor a 100	0.37	Julio		ND
	24.66	ND			ND
	7	0.35			ND
	mayor a 100	ND	Agosto		0.14
	mayor a 100	ND			ND
		0.07			ND
		ND			ND
		ND			ND
Abril	23.188	ND	Septiembre		ND
	3.57	0.22			ND
	24.914	1.52			ND
	mayor a 100	ND	Octubre		ND
		ND			ND
		ND			ND
		0.07			ND
		ND			
		ND			
		ND			

ANEXO FOTOGRÁFICO.

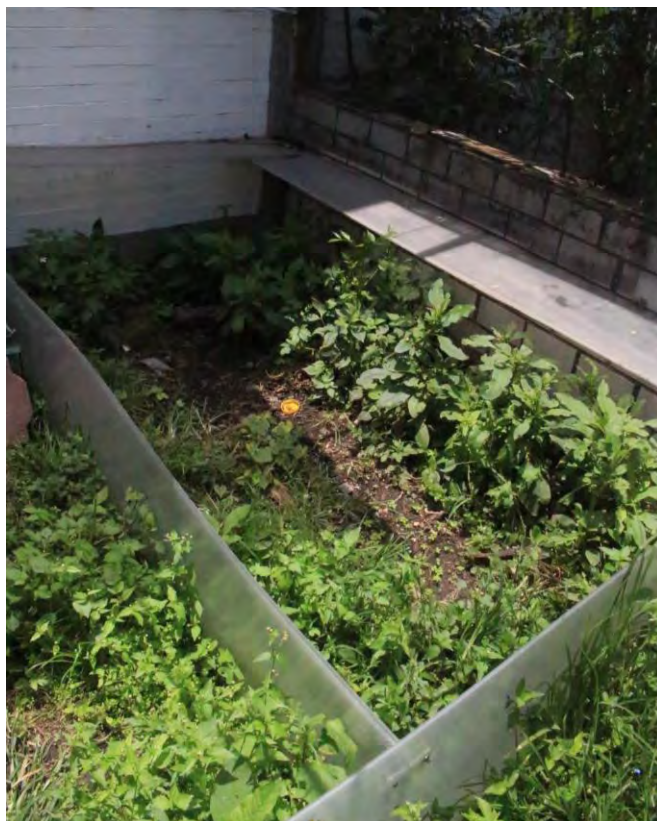


Figura 27. Encierros donde se mantuvo a los organismos.



Figura 28. Terrarios donde se mantuvo a los organismos sometidos a tratamiento de temperatura.



Figura 29. Lugar del sitio de colecta en temporada húmeda.



Figura 30. Lugar del sitio de colecta en temporada seca.



Figura 31. Folículos de *B. imbricata* observados en el ultrasonido.



Figura 32. Folículos de *B. imbricata* observados en el ultrasonido.

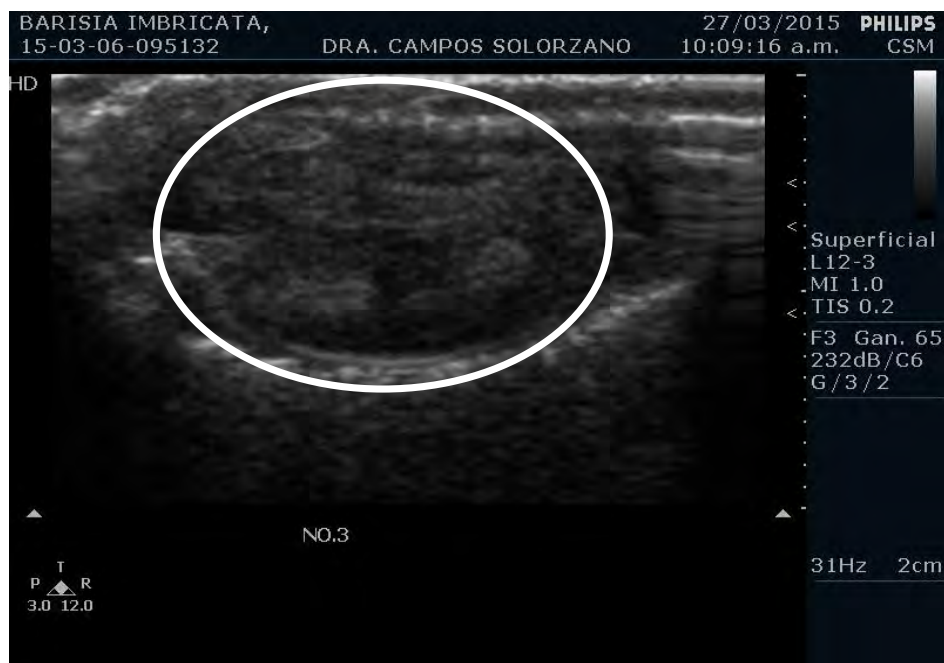


Figura 33. Embriones de *B. imbricata* observados en el ultrasonido.



Figura 34. Laparotomía de *B. imbricata*.

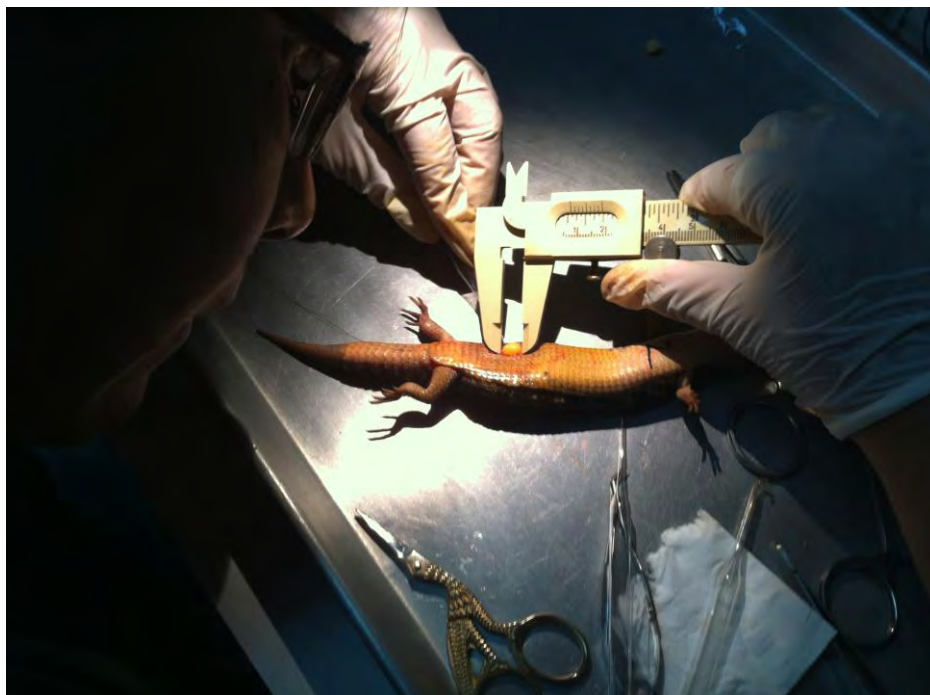


Figura 35. Medición de folículos de *B. imbricata*.



Figura 36. Punción intracardiaca para toma de muestras de sangre.



Figura 37. Huevos en oviducto de *B. imbricata*.

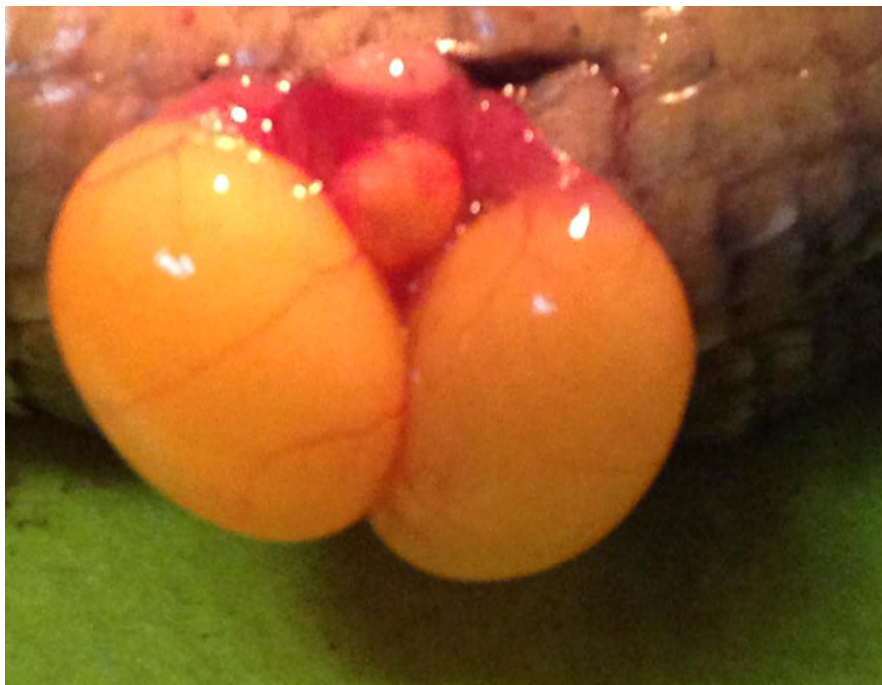


Figura 38. Huevos en oviducto de *B. imbricata*.

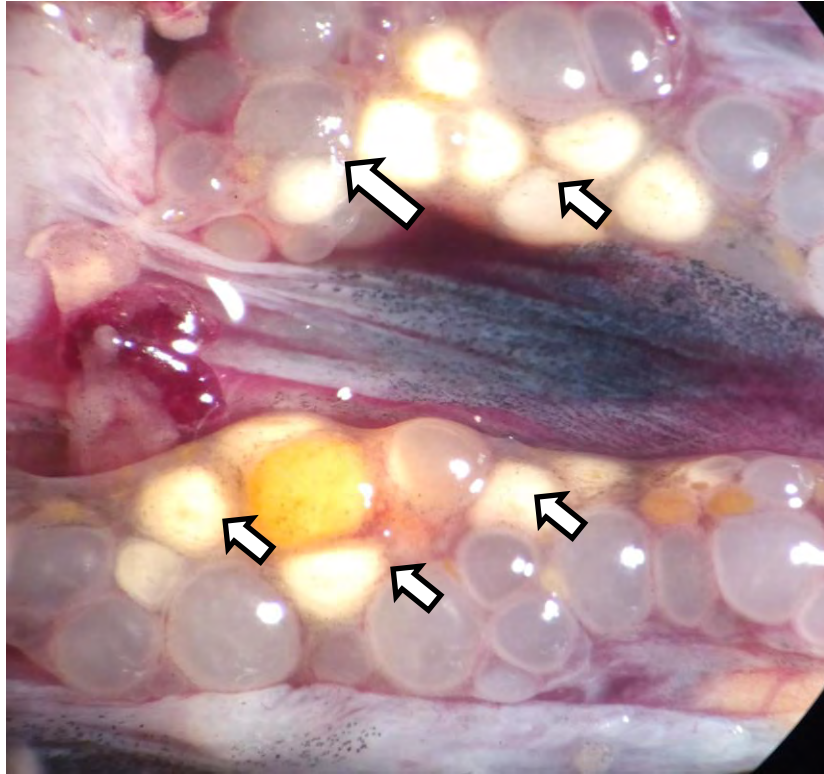


Figura 39. Cuerpos Lúteos de *B. imbricata*

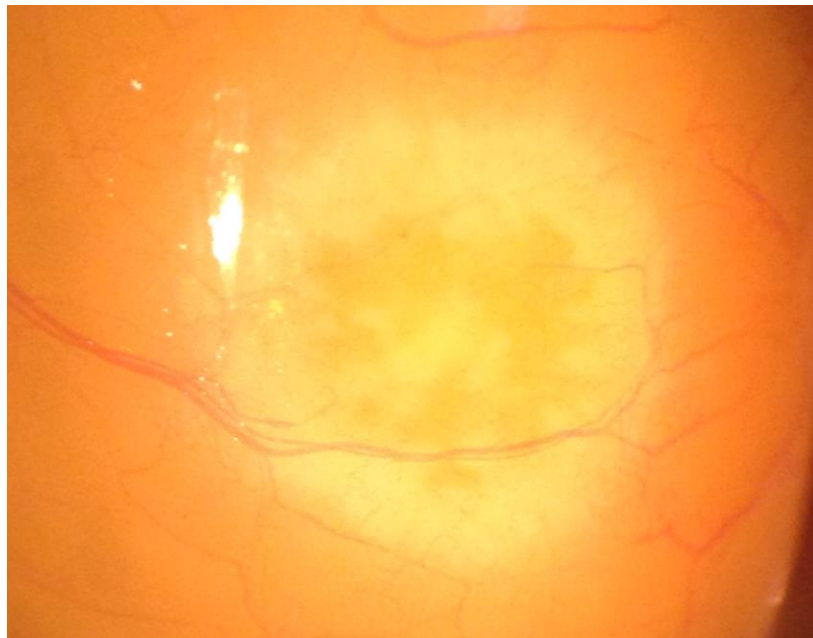


Figura 40. Gástrula de *B. imbricata*.

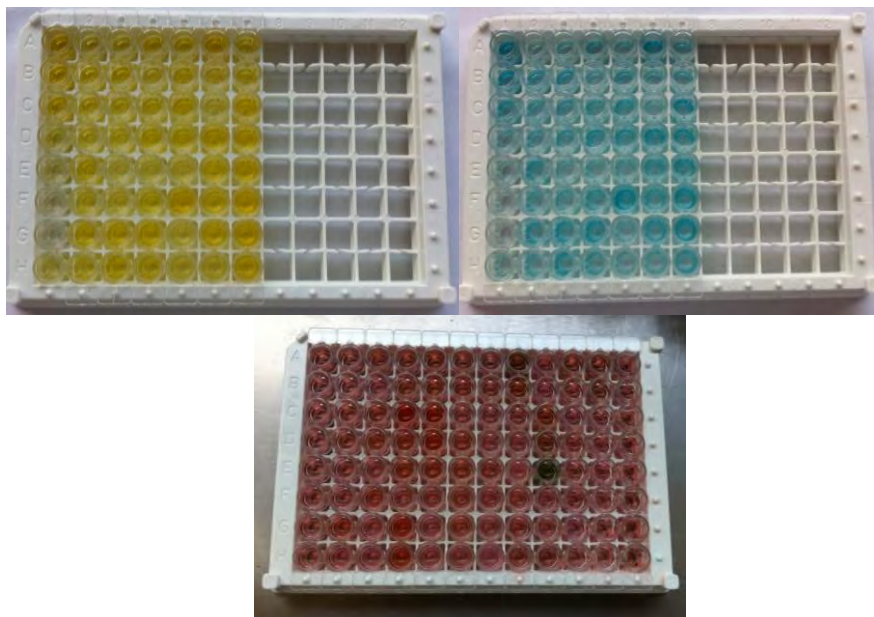


Figura 41. Placas ensayo ELISA.



Figura 42. Espectrofotómetro para ELISA.



Figura 43. Lector de rayos gamma.