



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

---

---

**Análisis hormonal y citológico de la  
espermatogénesis mediante biopsia  
testicular en *Sceloporus torquatus* (Sauria:  
Phrynosomatidae).**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de:  
Médico Veterinario Zootecnista**

**P R E S E N T A:**

**Uriel Ángel Sánchez Rivera**

**Director de Tesis:  
Dr. Martín Martínez Torres**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México  
2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
**Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales**  
**de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Análisis hormonal y citológico de la espermatogénesis mediante biopsia testicular en Sceloporus torquatus (Sauria: Phrynosomatidae).

Que presenta el pasante: URIEL ÁNGEL SÁNCHEZ RIVERA

Con número de cuenta: 30932143-3 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de abril de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Martín Martínez Torres	
<b>VOCAL</b>	Dr. José Alfredo Medrano Hernández	
<b>SECRETARIO</b>	M.V.Z. Carlos Raúl Romero Basurto	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en M.V.Z. Gerardo López Islas	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Tiziano Santos Morán	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **Agradecimientos.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por las herramientas que me ha brindado en mi formación profesional.

Al Dr. Martin Martínez Torres, mi asesor de Tesis: por el apoyo en las colectas, por compartir su conocimiento y experiencia. Por las revisiones, las charlas y por el gusto de buscar generar conocimiento para la conservación de nuestras lagartijas. Que nunca se termine esa curiosidad e ingenio de buscar otras formas de aprender por y para el bien de ellas.

Al Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por recibirme como parte de ustedes, a pesar de provenir de otra escuela.

A la M en C. Carmen Álvarez por su apoyo y paciencia en el montaje y realización de las técnicas, por su conocimiento de Histología. A mis amigos, los Biólogos Berenice Cruz por su apoyo en las cirugías, colectas, por su conocimiento y comentarios que me apoyaron en la realización de mi escrito; y Yabín Castro, por todo el apoyo y consejos durante toda mi estancia en el laboratorio.

Al Parque Estatal Sierra de Guadalupe por el permiso de colecta y especialmente al MVZ Miguel Vázquez Arellano por su apoyo durante los recorridos.

Al M en C Mario Cárdenas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su apoyo en la capacitación y procesamiento de muestras para la concentración de Testosterona por medio de ELISA.

A la M en C Marta Martínez de la Facultad de Medicina de la UNAM por el aprendizaje y montaje de la técnica de Feulgen para la tinción de las muestras de biopsia testicular.

A mis revisores de Tesis, el Dr. José Alfredo Medrano Hernández, el MVZ Carlos Raúl Romero Basurto, el M en MVZ Gerardo López Islas y el M en C. Tiziano Santos Morín por sus observaciones y comentarios sobre el presente trabajo.

Al MVZ Eduardo Cid Méndez por sus enseñanzas de manejo y medicina, por sus comentarios que me permitieron elegir trabajar con Réptiles en mi Tesis.

A mis lagartijas, por permitirme aprender de ellas, todo esto es por ustedes.

## **Dedicatoria.**

A mis padres, Sonia y Hugo por darme la vida, por sus enseñanzas, consejos, e historias. Son tesoros que guardo junto a mi corazón y que sin ellos, su apoyo, motivación y paciencia la culminación de esta etapa de mi vida no hubiera sido posible. Por brindármelo todo, por ser un ejemplo para mí de lo que es ser alguien de bien, todo esto es principalmente para ustedes, espero se sientan orgullosos.

A mi hermano Hugo Eder, con el que no solo comparto sangre sino porque desde pequeño es mi amigo, crecimos juntos, por ser alguien en quien puedo confiar, por las anécdotas que compartimos, por su apoyo y compañía en cada momento. Espero sepas que siempre puedes contar conmigo.

A mi familia que me dejan muchos recuerdos de la infancia y juventud que me motivaron en todo momento. A mi abuela Florencia (como quisiera que hubieras estado conmigo en esta etapa), a mis tíos que menciono en orden alfabético para no agraviar a ninguno Carlos, Fernando, Leticia, Maribel, Rodolfo, Sofía, Tulia y a mis primos Alejandro, Dalia, Daniel, Javier, Luis, Luis Ángel y Roseya.

A mis amigos de Biología de la Reproducción: Berenice Cruz, Yabín Castro, Alejandro Cadena, Eduardo Loya, Emilia Colio, José Juan Piña, María Muciño.

A mis amigos de la FESC y de la vida: Raquel Gutiérrez, Abigail Cahuantzi, Carlos Contreras, Yazmin Sánchez, Claudia Rocha, Karen Flores, Karina Martínez, Carlos Corona, Cyntia Ibarra, Marilu Soto, Tania Salazar, Ángel Reyes, Suleyma Esquivel, Elizabeth Hernández, Daniela Garduño, Itzel Aguilar, Eduardo Hernández, Clarissa Rodríguez, Daysi Martínez, Miriam Villegas, Tanya Ortega.

A mis amigos del Vivario Eduardo Cid Méndez, Estefanny Lima, Luis Gutiérrez, Carol Galindo, Gabriela Vázquez, Jorge Torres, Jorge Toledo, Ángeles Hernández, Víctor Zedillo, Alberto Aguayo, Gerardo Salgado, Ángel Tovar, Iván Maya, Manuel Casas, Juan Ortiz, Fernanda López.

A mis animales, a los que mediante el cuidado e interacción me han permitido formarme Médico Veterinario. A los perros, gatos, borregos, vacas, cerdos, cabras, aves, peces, conejos, roedores, anfibios, reptiles (especialmente a mis lagartijas por permitirme realizar este trabajo).

*Mon rêve forme ses ailles profondes...*

# Índice

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
Taxonomía de reptiles.....	2
Suborden Lacertilia o Sauria. ....	3
Ciclos reproductivos en saurios.....	4
Anatomía del aparato reproductor de saurios machos. ....	4
Estructura testicular.....	7
Espermatogénesis.....	15
Control hormonal y ambiental de los ciclos reproductivos de saurios machos.....	16
Descripción de la especie .....	20
ANTECEDENTES .....	23
Investigación de los ciclos reproductivos de saurios machos. ....	23
Ciclo reproductivo de <i>Sceloporus torquatus</i> .....	23
Evaluación histológica del testículo en saurios. ....	24
La biopsia en la evaluación morfofuncional del testículo.....	25
Perfil de la concentración de andrógenos en saurios.....	25
JUSTIFICACIÓN .....	27
OBJETIVO GENERAL. ....	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
Área de estudio y colecta .....	30
Obtención de muestra de sangre. ....	31
Mantenimiento de los individuos. ....	32
Perfil de testosterona. ....	32

Biopsia testicular.....	32
Evaluación del daño testicular.....	33
Análisis estadístico.....	34
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
Registro de individuos.....	35
Citología testicular.....	36
Volumen testicular (VT) e Índice Somático-Gonadal (ISG).....	41
Testosterona.....	44
Correlación del Índice Somático-Gonadal con la Testosterona.....	46
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
Biopsia testicular.....	48
Celularidad durante el ciclo reproductivo.....	48
Volumen testicular e Índice Somático-Gonadal.....	50
Testosterona.....	51
Daño testicular.....	52
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>56</b>
ANEXO 1. Sistema de identificación de organismos.....	57
ANEXO 2. ELISA para la cuantificación de testosterona.....	58
ANEXO 3. Técnica quirúrgica.....	60
ANEXO 4. Técnica de Feulgen.....	62
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>63</b>

## Índice de figuras.

Figura 1. Sistemática cladística de los reptiles. ....	3
Figura 2. Aparato reproductor de saurios machos. ....	6
Figura 3. Espermatogonia en reposo. ....	7
Figura 4. Espermatogonia A.....	8
Figura 5. Espermatogonia B. ....	8
Figura 6. Espermatocito primario. ....	9
Figura 7. Espermatocito secundario.....	10
Figura 8. Espermátida redondeada. ....	10
Figura 9. Espermátida alargada. ....	11
Figura 10. Evolución de las fases de espermátidas. ....	11
Figura 11. Espermatozoide y sus partes principales.....	12
Figura 12. Célula de Sertoli. ....	12
Figura 13. Células Mioides (MY) y células parecidas a fibroblastos (F).....	13
Figura 14. Células de Leydig en fase espermatogénica activa e inactiva. ....	14
Figura 15. Macrófago testicular.....	14
Figura 16. Control ambiental y hormonal de la espermatogénesis en saurios. ....	19
Figura 17. Vista dorsal y ventral de un macho <i>Sceloporus torquatus</i> .....	20
Figura 18. Vista de la cabeza y cuerpo de un macho de <i>Sceloporus torquatus</i> .....	21
Figura 19. Distribución de la especie <i>Sceloporus torquatus</i> .....	21
Figura 20. Temperatura (°C) y Precipitación pluvial (mm) por meses en la Sierra de Guadalupe..	30
Figura 21. Coloración azul intensa, poros femorales bien marcados y un par escamas postclocuales redondeadas de un macho de <i>Sceloporus torquatus</i> . ....	31
Figura 22. Punción intracardiaca para la obtención de sangre inmediato a la captura de un individuo de <i>Sceloporus torquatus</i> . ....	31
Figura 23. Localización y exteriorización de testículo de uno de los individuos de <i>Sceloporus torquatus</i> . ....	33
Figura 24. Punción del testículo izquierdo de individuo de <i>Sceloporus torquatus</i> .....	33
Figura 25. Registro de tipos celulares observados en testículos de <i>Sceloporus torquatus</i> colectados por mes en el periodo de junio a diciembre de 2016.....	36
Figura 26. Clona de espermatogonias (Sg).....	37
Figura 27. Espermatogonia (Sg) ....	37
Figura 28. Célula de Sertoli (CS).....	38
Figura 29. Espermatogonias A (SgA).....	38
Figura 30. Espermatocitos primario (Sc1) y secundario (Sc2). ....	39
Figura 31. Espermatocito primario (Sc1) y espermátidas redondeadas (Sdr). ....	39
Figura 32. Espermátida alargada (Sda) y espermatozoide (Sz).....	40

Figura 33. Célula mioide (MY).....	40
Figura 34. Volumen testicular promedio (cm <sup>3</sup> ) por mes de individuos de <i>Sceloporus torquatus</i> de junio a diciembre de 2016. ....	43
Figura 35. Índice Somático-Gonadal (ISG) por mes de individuos de <i>Sceloporus torquatus</i> de junio a diciembre de 2016.....	43
Figura 36. Concentración promedio de Testosterona en machos de <i>Sceloporus torquatus</i> en el periodo de junio a diciembre de 2016. ....	44
Figura 37. Comportamiento del índice somático-gonadal y la concentración promedio de Testosterona en machos de <i>Sceloporus torquatus</i> en el periodo de junio a diciembre de 2016.....	46
Figura 38. Espermatozoides de <i>Sceloporus torquatus</i> sometido a punción testicular.....	54
Figura 39. Sistema de ectomización de falanges para identificación de lagartijas utilizado durante la experimentación.....	57
Figura 40. Muestras de plasma con el conjugado de testosterona-peroxidasa.....	58
Figura 41. Cambio en la coloración de la reacción al adicionar la solución sustrato.....	59
Figura 42. Lectura de las muestras en el espectrofotómetro.....	59

## Índice de cuadros.

Cuadro 1. Concentraciones de testosterona (T) en diferentes saurios. ....	25
Cuadro 2. Registro de peso (g), longitud hocico-cloaca (LHC) y longitud cloaca-cola (LCCo) de machos de <i>Sceloporus torquatus</i> colectados por mes. ....	35
Cuadro 3. Volúmenes testiculares e Índices Somático-Gonadales de machos de <i>Sceloporus torquatus</i> por mes. ....	42
Cuadro 4. Concentración de T plasmática [ng/ml] en los diferentes meses de individuos machos de <i>Sceloporus torquatus</i> . ....	45
Cuadro 5. Revisión distintos tipos celulares reportados en diferentes especies de lagartijas. ....	49

## Resumen

En el presente trabajo se evaluó la biopsia testicular unilateral como método invasivo pero no destructivo en *Sceloporus torquatus* (lagartija de collar) para la evaluación del ciclo reproductivo. Además, se determinaron las concentraciones de testosterona (T) plasmática de muestras obtenidas por punción cardiaca a lo largo de este periodo y se relacionaron con los cambios en la citología observados en este saurio. Por medio de celiotomía paramediana derecha se realizó la punción de uno de los testículos. Los resultados obtenidos en la citología para *S. torquatus* son confiables en la evaluación de la espermatogénesis ya que permiten caracterizar las formas celulares típicas de este proceso. En junio se encontraron espermatogonias A y B, espermátocitos primarios y espermátidas redondas (inicio de la recrudescencia). Para julio se encontraron las mismas poblaciones celulares junto con espermátidas alargadas. En agosto y septiembre se encuentran todos los tipos celulares (periodo de mayor actividad testicular). Para octubre únicamente se observan formas espermiogénicas. En noviembre y diciembre se observan escasas espermátidas alargadas y abundantes espermatozoides. Se relacionó también el volumen testicular y el perfil de concentración de T (principal andrógeno implicado en el proceso espermatogénico). Existe relación directamente proporcional entre el volumen testicular y la T plasmática a lo largo del ciclo reproductivo de *S. torquatus*, excepto para la época de apareamiento, ya que las concentraciones de T permanecen elevadas (necesario para regular las conductas de cortejo) mientras que el volumen testicular disminuye. La evaluación del daño testicular (fibrosis leve, sin incidir en la motilidad, concentración o morfología espermática) a corto plazo indica que este método no altera la capacidad reproductiva de los individuos. Este método implica poco riesgo y con los cuidados pre, trans y postquirúrgicos adecuados la recuperación de todos los individuos fue completa. Sin embargo se requiere la evaluación de la fertilidad del macho a largo plazo para asegurar que esta técnica es viable.

## Introducción

Definiendo a los reptiles, son cordados vertebrados ectotermos, de temperatura variable, superior a la del ambiente. Su fecundación es interna, son amniotas y desarrollan tres membranas extra embrionarias (alantoides, corión y saco vitelino). Presentan respiración pulmonar y el corazón con ventrículo incompletamente dividido, salvo en cocodrilos. La piel es escamosa y queratinizada, resistente a la pérdida de agua, se renueva mediante mudas y en general carecen de glándulas cutáneas (algunas familias presentan glándulas femorales). Su desarrollo es continuo, no sufren metamorfosis (Fontanillas *et al.*, 2000; Vitt y Caldwell, 2014).

Su aspecto corporal es muy variable, presentando frecuentemente un cuerpo y cola alargados. La cabeza está bien desarrollada, con formas diversas. El cuello puede ser corto e inmóvil o largo y flexible. Los ojos suelen ser pequeños y poco móviles. El oído está poco desarrollado, consta solamente de una parte interna y el orificio auditivo está recubierto. Presentan una dentición homodonta, numerosa y son con mayor frecuencia mandibulares y prensiles para retener el alimento durante la deglución (Fontanillas *et al.*, 2000; Dixon y Lemos-Espinal, 2010).

### Taxonomía de reptiles.

La sistemática cladística, divide a los amniotas por la apertura en el hueso temporal del cráneo en sinápsidos y saurópsidos; los primeros presentan una apertura (mamíferos y formas fósiles conocidas como reptiles mamiferoides), y los segundos con ausencia o presencia de una doble apertura temporal, categorizan a los reptiles del mundo actual y las aves (Vitt y Caldwell, 2014).

Sauropsida se divide a su vez en Anapsida y Diapsida. En los anápsidos se encuentra ausente la apertura del hueso temporal y están representados por los testudines o tortugas. Los diápsidos presentan una doble apertura temporal. El Diapsida incluye a Lepidosauria (que contemplan al orden Squamata -lagartos,

serpientes y anfisbénidos-, a Rynchocephalia -tuataras-. Archosauria incluye a Crocodylomorpha -cocodrilos- y Ornithodira (que culmina en Therapoda; es decir, las aves) (Figura 1) (Vitt y Caldwell, 2014).

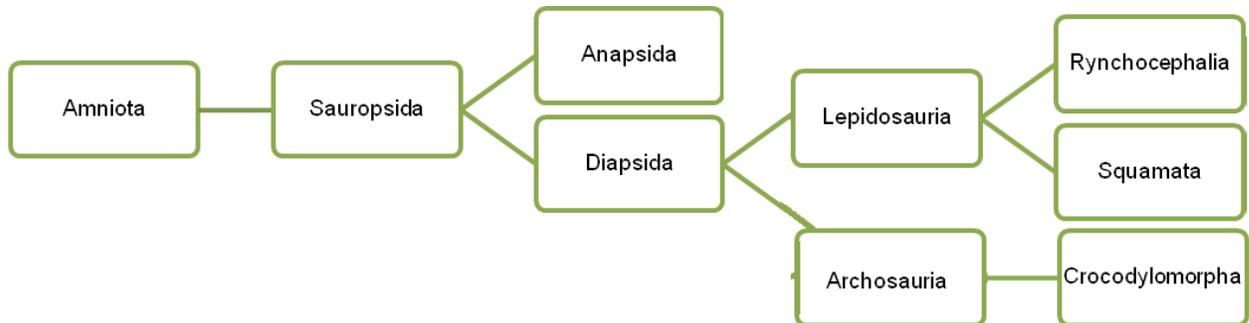


Figura 1. Sistemática cladística de los reptiles. Modificada de Vitt y Caldwell, 2014.

### Suborden Lacertilia o Sauria.

Existen cerca de 10078 especies de escamosos conformando el clado más diverso y, dentro de este, más de 6263 especies de lagartos (Lacertilia o Sauria) (Reptile-Database, 2016). El término lagarto delimita un grupo monofilético del orden Squamata que excluye a las serpientes. Los lagartos se pueden encontrar en todos los continentes excepto en la Antártida y en la mayoría de las islas oceánicas tropicales y subtropicales. Esta extensión y amplia distribución demuestra su nivel de adaptación ecológica, fisiológica y de comportamiento en distintas altitudes y hábitats (desde terrestres hasta marinos) (Vitt y Caldwell, 2014).

Algunas características distintivas de un lagarto incluyen un hueso premaxilar y parietal simple y fusionado, una nariz reducida con dientes no vomerianos, articulación ulnoulnar y radio radial especializadas que forman la muñeca, una articulación del tobillo especializada y un quinto metatarso con forma de gancho. El órgano de Jacobson se separa de la cápsula nasal con un ducto que conduce al conducto lagrimal. Entre las estructuras anatómicas distintivas de un lagarto destacan la presencia de un par de órganos copulatorios bien desarrollados: los

hemipenes para machos y los ovarios saculares en las hembras. Externamente contienen glándulas femorales y preanales (Vitt y Caldwell, 2014).

### Ciclos reproductivos en saurios.

Dependiendo de la duración y continuidad de la actividad reproductiva, los ciclos reproductivos pueden ser clasificados como continuos o acíclicos y discontinuos o estacionales. Los primeros se refieren a cuando la producción de gametos ocurre en todos los meses del año con niveles variables en la intensidad de la actividad reproductiva y los segundos cuando los períodos de actividad gonadal están alternados con períodos de quiescencia o inactividad (Norris y López; 2013). Se sabe que en lagartos del género *Anolis*, los ciclos continuos se presentan en individuos de clima tropical como *Anolis trinitatus* y los ciclos estacionales aquellos que son de clima templado como *A. aeneus* (Sanz, 2000).

### Anatomía del aparato reproductor de saurios machos.

Consiste de un par de testículos, ductos testiculares (red testis, ductos eferentes, epidídimo, ductos deferentes) y en algunas especies papila urogenital – como en especies de la familia Crotaphytidae, Phrynosomatidae y Scincidae–, segmentos sexuales del riñón, hemipenes y poros femorales (Figura 2) (Rheubert *et al.*, 2014).

- a) Testículos: Los machos de lagartos poseen un par de testículos que se ubican en la región dorsomedial de la cavidad celómica. Son masas ovoides que contienen dos compartimentos; el tubular y el intersticial, ambos envueltos en una capa de tejido conectivo. El testículo derecho se localiza más craneal que el izquierdo (Mader, 1996).
- b) Ductos eferentes y epidídimo: Los ductos eferentes emergen de cada testículo dentro de los cuales transita el contenido del epitelio seminífero

hacia la porción proximal del epidídimo. El epidídimo presenta funciones de secreción, absorción de materia líquida y partículas, participa en la remodelación del espermatozoide y espermiófagia. Es el órgano primario para el almacenamiento y maduración de los espermatozoides (Rheubert *et al.*, 2014). Al final de la espermatogénesis el epidídimo alcanza su máximo diámetro, contiene a los espermatozoides y puede exceder al testículo en tamaño (Ferreira *et al.*, 2009; Norris y López, 2013).

Durante el tiempo de reposo testicular los espermatozoides no transferidos a las hembras se concentran en la cauda del epidídimo y permanecen durante todo el año en algunas especies como *Cordyleus giganteus* (Van, 1995) o *Tropidurus itambere* (Ferreira *et al.*, 2009); mientras que en otras como *Tropidurus torquatus* (Vieira *et al.*, 2001) o *Sceloporus mucronatus* (Villagrán-Santa Cruz *et al.*, 2009), donde en algunas épocas están desprovistos de espermatozoides (Rheubert *et al.*, 2014).

- c) Ductos deferentes: La transición del epidídimo al ducto deferente en los escamosos se produce posterior a la cola del epidídimo, cuando el conducto se endereza. En fases activas de la reproducción, el tejido es altamente secretorio y en el lumen residen algunos espermatozoides maduros (Rheubert *et al.*, 2014).
- d) Segmento sexual renal: Es un órgano sexual accesorio exclusivo de escamosos. Es una región hipertrofiada de la nefrona que se somete a cambios asociados con el ciclo testicular siendo apenas visible en la fase quiescente; en la época de cortejo está ampliamente desarrollado y con grandes gránulos secretorios que descienden medialmente hacia las papilas urogenitales. Las secreciones de esta estructura se liberan y mezclan con los productos del testículo y representan el mayor componente del semen (Rheubert *et al.*, 2014).

- e) Papila urogenital: Posterior al ducto deferente, el epitelio se vuelve fluctuante con pliegues irregulares que sirven para el almacenamiento de esperma. A medida que el extremo craneal de la cloaca se aproxima, las papilas se estrechan (Norris y López, 2013).
- f) Hemipenes: Son un par de estructuras parecidas a sacos de tejido eréctil vascular, fibro-elástico y muscular. No están involucrados con el sistema urinario. Están dispuestos en una posición invertida a partir de la base de la cola y pueden producir notables protuberancias en la parte proximal ventral de la cola (Norris y López, 2013).
- g) Glándulas femorales. Son estructuras epidermales presentes en la superficie ventral de los miembros posteriores presentes en ambos sexos, pero más evidentes y largos en machos de algunas familias como Phrynosomatidae, Iguanidae y Gekkonidae. Secretan proteínas y lípidos que pueden impregnar la vegetación o el sustrato. Estas tienen función de feromonas en la identificación del sexo y condición reproductora (hembras grávidas o no grávidas).

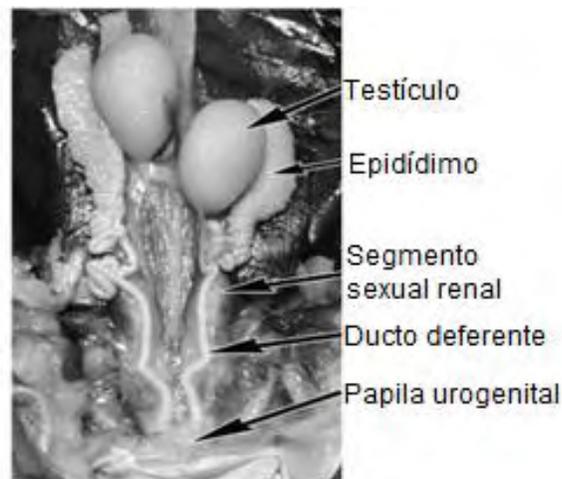


Figura 2. Aparato reproductor de saurios machos. Modificada de Rheubert *et al.*, 2014.

## Estructura testicular.

Compartimento tubular: Es el sitio constituido por los túbulos seminíferos y es donde ocurre la espermatogénesis. Cada túbulo está alineado con una base membranosa. Está constituido por las células germinales, las células de Sertoli, y las células mioides.

A. Células germinales: Los testículos de los reptiles muestran un arreglo histológico regular con distintas generaciones de células germinales por todo el epitelio seminífero. Estas obedecen a diferentes patrones estacionales para su establecimiento durante las distintas fases de la espermatogénesis.

- i. Espermatogonia en reposo: Son células con núcleo de cromatina condensada de coloración oscura, nucléolo escasamente visible. Contiene escasos orgánulos presentes en el citoplasma, excepto mitocondrias. Rara vez, estas células son vistas en división (Figura 3).

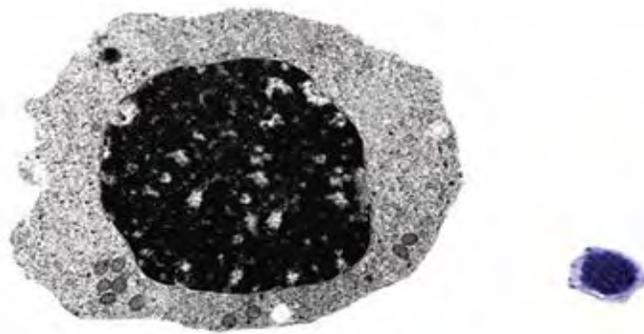


Figura 3. Espermatogonia en reposo. Modificada de Gribbins, 2011.

- ii. Espermatogonia A: Son células de forma ovoide con cromatina difusa excepto junto a la hoja interna de la envoltura nuclear. El nucléolo está presente. Los orgánulos responsables de la producción de proteínas; retículo endoplásmico rugoso y ribosomas, están

presentes en el citoplasma (anabólicamente activas) (Figura 4). Son las espermatogonias más abundantes, encontrándose que algunas de las regiones de su membrana están en contacto con la membrana basal del epitelio seminífero.

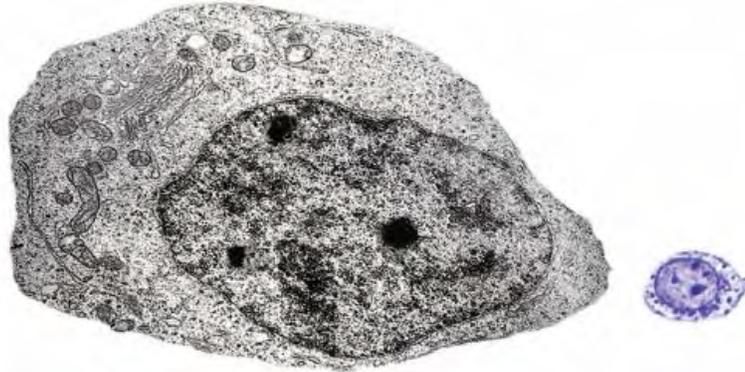


Figura 4. Espermatogonia A. Modificada de Gribbins, 2011.

- iii. Espermatogonia B: Son células redondeadas que en comparación con las espermatogonias A, tienen más heterocromatina en el nucleoplasma asociada a la envoltura interna nuclear. Estas aun poseen nucléolo y orgánulos para la producción de proteína y son anabólicamente activas. En algunos casos tienen mucho más retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi con respecto de los otros tipos de espermatogonia (Figura 5).

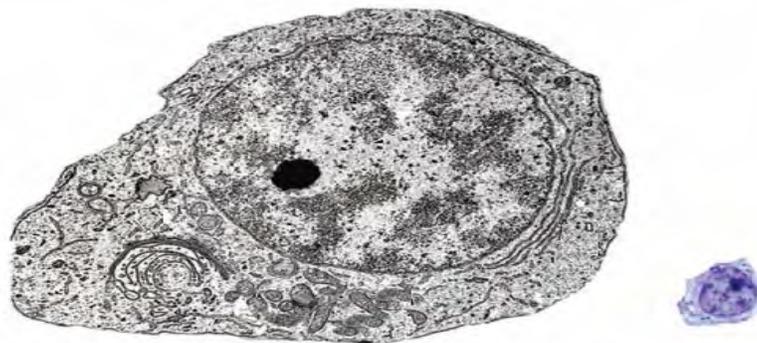


Figura 5. Espermatogonia B. Modificada de Gribbins, 2011.

- iv. Espermatocito primario: Son células que se originan por mitosis a partir de la espermatogonia tipo B, van aumentando de tamaño

conforme avanza la meiosis (etapa muy larga en reptiles). La forma que se identifica más fácilmente es la profase I. Existe una recombinación de cromosomas antes de que ocurra la primera división de la meiosis (Figura 6). Tienen menos heterocromatina, son aproximadamente 30% más pequeñas que las espermatogonias B y se encuentran más alejadas de la membrana basal.



Figura 6. Espermatocito primario. Modificada de Gribbins, 2011

- v. Espermatocito secundario: Son células de vida corta en reptiles. Son 30 a 40% más grandes que las espermátidas y más pequeñas que los espermatocitos primarios, contienen más heterocromatina que las espermátidas y aproximadamente la mitad con respecto de los espermatocitos primarios. El nucléolo es prominente. Contiene un característico cuerpo cromatoide en forma de nube (inclusión prominente en el citoplasma). No debe confundirse con porciones de orgánulos deterioradas. Las mitocondrias se observan vacuoladas. (Figura 7).



Figura 7. Espermatocono secundario. La flecha negra señaala el cuerpo cromatoide en forma de nube, mientras que la blanca señaala el nucleolo. Modificada de Gribbins, 2011

- vi. Espermátidas: Son células que se ubican en la región apical del túbulo seminífero, En reptiles existen de 7 a 8 pasos de transición durante la espermiogénesis para formar el espermatozoide maduro. Esta inicia con la espermátida redondeada la cual es más pequeña que el espermatocono secundario y contienen un aparato de Golgi alargado y típicamente se establece como una pequeña vesícula acrosomal que no contacta con el núcleo (Figura 8).

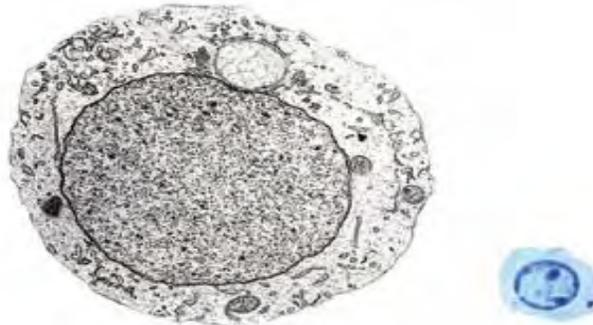


Figura 8. Espermátida redondeada. Modificada de Gribbins, 2011.

Conforme avanza la espermatogénesis va ocurriendo una elongación de la espermátida redondeada, incluyendo sus orgánulos (vesícula acrosomal, retículo endoplásmico liso y rugoso, mitocondrias y aparato de Golgi). El núcleo comienza a ubicarse excéntricamente

tomando una forma cilíndrica, el citoplasma comienza a reducirse y va formándose el flagelo (Figuras 9 y 10).

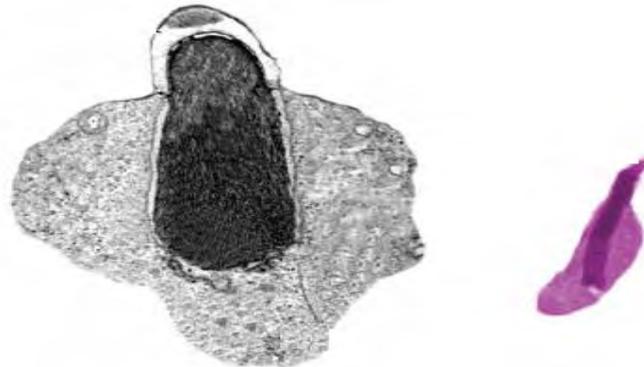


Figura 9. Espermátida alargada. Modificada de Gribbins, 2011.

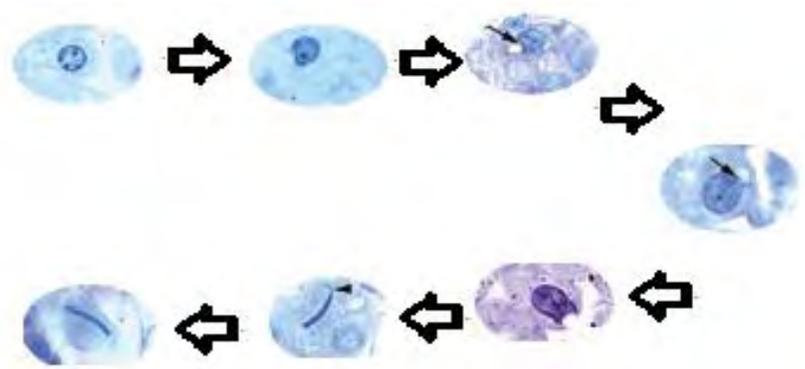


Figura 10. Evolución de las fases de espermátidas. Modificada de Gribbins, 2011.

vii. Espermatozoide: Los espermatozoides maduros son vermiformes con cabezas muy largas (hasta  $30\mu\text{m}$ ). Las partes principales de los espermatozoides en los reptiles y otros amniotas incluyen el complejo acrosomal o acrosoma, el cuerpo nuclear, y el flagelo, que incluye la pieza media y la pieza principal (Figura 11) (Gribbins, 2011).

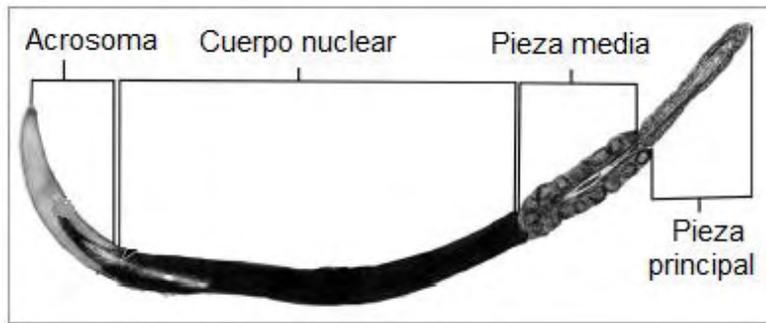


Figura 11. Espermatozoide y sus partes principales. Modificada de Gribbins, 2011.

B. Células de Sertoli: Son irregulares en forma, su núcleo es de forma irregular y ocupa la posición basal. Su presencia obedece a la participación activa en la biosíntesis de proteínas y esteroides, que proporcionan un soporte físico al desarrollo de las células germinales (Khan y Rai, 2007). Los reptiles tienen una población permanente de células de Sertoli. Se extienden desde la base hasta el lumen del túbulo y están asociadas a las células germinales y formando una barrera hematotesticular estable (Figura 12) (Gribbins, 2011).

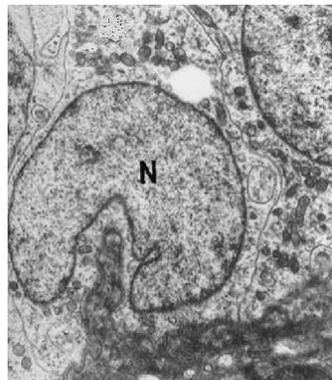


Figura 12. Célula de Sertoli. Modificada de Norris y López, 2013.

La barrera hematotesticular demarca los túbulos seminíferos en dos subcompartimentos distintos. El basal, que enfrenta el espacio intersticial, alberga las espermatogonias y el adluminal que incluye espermatocitos primarios, secundarios y espermátidas. Las células germinales degeneradas y cuerpos de citoplasma residuales del proceso de

espermatogénesis, son eventualmente dispuestas y fagocitadas por las células de Sertoli (Norris y López; 2013).

C. Células Mioides: Durante la fase espermatogénica activa estas células cambian en apariencia, lo que sugiere que están implicadas en la contracción de los túbulos seminíferos para el transporte espermático y además se asocia con el incremento de la actividad esteroideogénica. En la fase inactiva su forma es parecida a la de un fibroblasto y en la fase activa asemeja una célula muscular (Figura 13) (Norris y López, 2013).

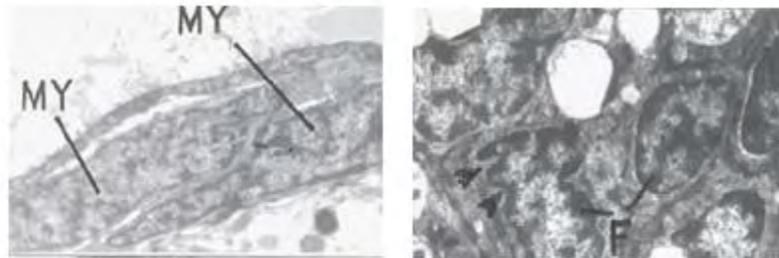


Figura 13. Células Mioides (MY) y células parecidas a fibroblastos (F) Modificada de Norris y López, 2013.

Compartimiento intersticial: Es el espacio entre los túbulos seminíferos que consiste de vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas, una gran población de células de Leydig y células inmunitarias (macrófagos y algunos mastocitos).

a) Células de Leydig: Son células secretoras de esteroides que en saurios, por su reproducción estacional, presentan variaciones en su estructura durante fases del ciclo reproductivo (Khan y Rai, 2007). Durante la fase de regresión el citoplasma contiene numerosas gotas lipídicas, núcleos irregulares, retículo endoplásmico rugoso (RER) escasamente distribuido y mitocondrias tubulares. Durante la recrudescencia, reanudan su actividad esteroideogénica con una marcada disminución en el tamaño y el número de gotas lipídicas. En la fase espermatogénica activa se caracterizan por la abundancia de RER y un gran número de mitocondrias tubulares (Figura

14) (Norris y López; 2013). El incremento en la actividad de estas de estas células coincide con las concentraciones de testosterona en el ciclo reproductivo como se ha observado en la lagartija *Phymaturus antofagensis* (Boretto *et al.*, 2010).

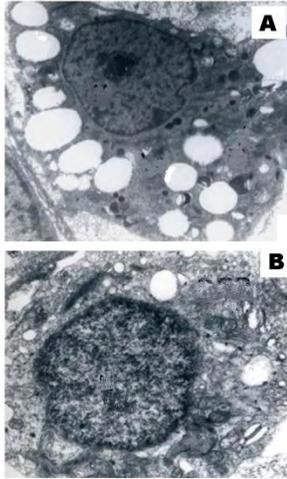


Figura 14. Células de Leydig en fase espermatoogénica activa (A) e inactiva (B). Modificada de Norris y López, 2013.

b) Macrófagos testiculares: Son células de membrana rugosa, núcleo mellado con abundantes fagolisosomas (Figura 15). Su presencia varía en las diferentes fases del ciclo reproductivo. Con el inicio de la recrudescencia, los macrófagos aumentan en número y alcanzan un máximo en la fase de reproducción. La relación de los macrófagos con las células de Leydig se mantiene constante durante todo el ciclo reproductivo.

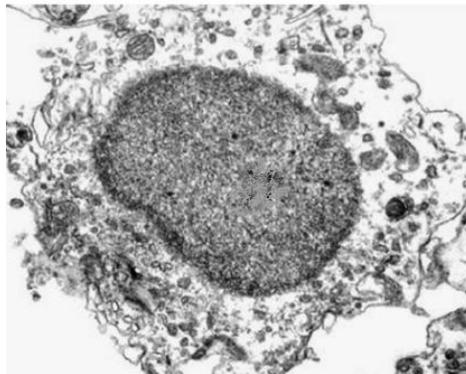


Figura 15. Macrófago testicular. Modificada de Norris y López, 2013.

- c) Mastocitos testiculares: La existencia de este tipo celular sólo se ha logrado evidenciar en microscopía electrónica en *Podarcis sicula* (Minucci *et al.*, 1995). Su presencia tiene una relación inversa con el número de células de Leydig. Producen histamina, importante regulador de la respuesta inmune (Norris y López; 2013).

## Espermatogénesis

Es un proceso citológico complejo mediante el cual las espermatogonias dan lugar, como producto final, a los espermatozoides. Los reptiles de ciclos estacionales presentan una fase de espermatogénesis activa o recrudesciente y una inactiva o quiescente. Cuando es activa, las células del epitelio germinal se encuentran sincronizadas en la misma etapa y progresan gradualmente a las siguientes fases de manera simultánea (Norris y López, 2013).

Existe una fase proliferativa que involucra a las espermatogonias que llevan a cabo múltiples divisiones mitóticas incompletas (citoplásmicamente), que dan origen a una gran población clonal de células germinales que permitirán la producción de un gran número de espermatozoides. Se observan tres tipos de espermatogonias: en reposo, A y B. Las que se ubican en reposo, se encuentran hacia la base de los túbulos, son de tamaño pequeño y no sufren mitosis. Las espermatogonias A llevan a cabo la mitosis para formar a las de tipo B. Con el inicio de la meiosis, se forman los espermatoцитos primarios (Gribbins, 2011).

La meiosis involucra a los espermatoцитos que se someten a divisiones donde se recombina, segrega y reduce el material genético. Los espermatoцитos dan lugar a espermátidas luego de la finalización de la segunda división meiótica. Es en la espermiogénesis donde estas células germinales haploides se transforman en espermatozoides, ocurre la formación del acrosoma, su elongación y maduración. En esta fase, el epitelio seminífero se separa en columnas divididas que contienen espermátidas de diferentes generaciones; pueden observarse de cinco a seis apicalmente. Cuando se completa el desarrollo de espermatozoides, estos son

liberados en un evento único conocido como espermiación. Durante la espermatogénesis inactiva o quiescente, la meiosis disminuye o cesa, se reduce el epitelio y únicamente se encuentran espermatogonias y células de Sertoli (Gribbins, 2011).

## Control hormonal y ambiental de los ciclos reproductivos de saurios machos.

Así como ocurre en otros vertebrados, en los reptiles la participación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en la regulación de la reproducción en machos y hembras es fundamental. La Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) es secretada en el hipotálamo, estimula la liberación de gonadotropinas (GTHs) de la adenohipófisis a través de las venas portahipofisiarias. En los reptiles existen variantes de la GnRH como la GnRH-I, GnRH-II, cGnRH-I, cGnRH-II, mGnRH-I, mGnRH-II y otras que aún no han sido estudiadas. Se ha observado que la GnRH-I es la que más participa en la liberación de GTHs en los saurios. Además, la presencia de la Hormona Inhibidora de Gonadotropina (GnIH) ha sido identificada en el hipotálamo los reptiles; actúa en la hipófisis y en las neuronas GnRH del hipotálamo disminuyendo la síntesis y liberación de GTHs e inhibiendo el desarrollo y el mantenimiento gonadal. La expresión y liberación de GnIH es un mecanismo de regulación mediado por la secreción de melatonina (Tsutsui *et al.*, 2010; Norris y López, 2013).

En los mamíferos existen dos gonadotropinas encargadas de regular la actividad testicular, la hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante (LH y FSH respectivamente, por sus siglas en inglés). El papel de la LH es la de regular la actividad de las células Leydig y de la FSH de estimular la espermatogénesis. Sin embargo, la participación de estas hormonas puede ser distinta en las diferentes taxas (Norris y López, 2013). En el orden de los escamosos (como en las lagartijas *Takydromus tachydromoides*, Aizawa e Ishii, 2003; y en *Podarcis sicula*, Dsantis, Labarta y Corriero, 1998), se han encontrado únicamente gonadotropinas tipo-

FSH, que pueden ser las que regulan ambas funciones testiculares (Gribbins, 2011).

Las células de Leydig, son las encargadas de realizar la síntesis de esteroides, que en el túbulo seminífero participan en la regulación de la espermatogénesis. Además, entran a la circulación periférica y controlan el desarrollo de órganos accesorios y el comportamiento sexual. Esta síntesis comienza con la movilización del colesterol a la membrana mitocondrial donde es convertida en pregnenolona por la enzima 20-22 desmolasa (citocromo P450 -CYP11A1-). La pregnolona puede tomar dos rutas ( $\Delta^4$  y la  $\Delta^5$ ) para la síntesis de andrógenos. En la ruta  $\Delta^5$  es transformada a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona por la enzima P450c17 (CYP17A1). Esta misma enzima la convierte en dehidroepiandrosterona, la que posteriormente será transformada a androstenediona por la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD). En la ruta  $\Delta^4$  la síntesis de androstenediona empieza a partir de la conversión de la pregnenolona a P<sub>4</sub> por la 3 $\beta$ HSD, después se transforma en 17  $\alpha$ -hidroxiprogesteroona por la P450c17 y finalmente en androstenediona por la misma enzima. Por último la androstenediona es convertida en testosterona por la 17  $\beta$ HSD. La T estimula la espermatogénesis y muestra una pronunciada variación durante el ciclo reproductivo. Los machos de la lagartija *Cordylus giganteus*, tienen concentraciones altas de T en plasma en la época de apareamiento, en comparación con otras épocas del año (Van, 1995). Consistentemente con el papel de la T en el mantenimiento de la conducta reproductora, la castración disminuye los comportamientos relacionados con la territorialidad y el cortejo (Norris y López; 2013).

Los estrógenos se derivan mediante la aromatización de los andrógenos por acción de la enzima P450 aromatasa (P450 arom): la testosterona a E<sub>2</sub>, androstenediona a estriol y finalmente la estrona resulta por una hidroxilación del E<sub>2</sub>. El papel de los estrógenos en la espermatogénesis es de proliferación, control de apoptosis, supervivencia, maduración de las células espermatogénicas y disminuyendo la actividad de las células de Sertoli (Carreau, *et al.*, 2012).

Los estudios sobre el papel de los factores ambientales en el control de las funciones testiculares son pocos y dispersos. La temperatura actúa como la señal principal para la reactivación o recrudescencia testicular en *A. carolinensis*, donde se ha observado que los meses que presentan las temperaturas más elevadas (hasta 32 °C) estimulan la espermatogénesis y la espermiación, además de elevar la secreción de gonadotropinas y andrógenos en el macho (Licht, 1971). Las variaciones del fotoperiodo implican variaciones en la temperatura ambiental, las cuales se reflejan en la temperatura corporal de los reptiles (mismos que tienen determinadas y sofisticadas conductas termorreguladoras). Por lo tanto, los cambios estacionales en el fotoperiodo modifican la temperatura corporal y el ciclo reproductivo (Sanz, 2000). Esto muestra que el fotoperiodo es un regulador importante de las funciones testiculares (Figura 16) (Norris y López, 2013).

Además, se ha observado que en *Xantusia vigilis* (Bartholomew 1953) cuanto mayor es la exposición a la luz solar, la recrudescencia testicular ocurre más rápidamente al igual que la espermatogénesis activa (Underwood y Hall, 1982). La melatonina está implicada en la mediación de los efectos del fotoperiodo sobre el peso testicular y de los órganos sexuales accesorios. Actúa a nivel de hipotálamo, regulando la producción de la GnRH y la secreción de gonadotropinas con función de LH (Figura 16), como se ha observado en *Anolis carolinensis* (Licht, 1975) y *Tiliqua rugosa* (Bourne, Raylor y Watson, 1986).

Se ha observado que la precipitación pluvial tiene una relación positiva con el ciclo reproductivo de hembras ovíparas de *A. limnifrons*, donde a mayor humedad incrementa la producción de huevos. En machos, la recrudescencia y regresión no se correlaciona con los cambios de las lluvias (Licht, 1975) y puede ser coincidente en algunos casos porque el patrón lluvioso se superpone a los cambios estacionales en la temperatura y fotoperiodo (Sanz, 2000).

La disponibilidad de alimento también tiene relación directa con el ciclo testicular. Cuando hay mayor consumo de alimento, se observa el aumento en el peso del hígado y de los cuerpos grasos, mismos que tienen relación directa con la espermatogénesis y la masa testicular. El hígado tiene dos incrementos notables, uno antes del inicio de la actividad reproductiva y el otro al final de este mismo período. Los valores bajos observados en el peso del hígado y del cuerpo graso de machos y hembras después de la reproducción, revelan la cantidad de energía y actividad metabólica que se invierte en este proceso como se presenta en *Sceloporus horridus horridus* (Valencia-Limón *et al.*, 2014).

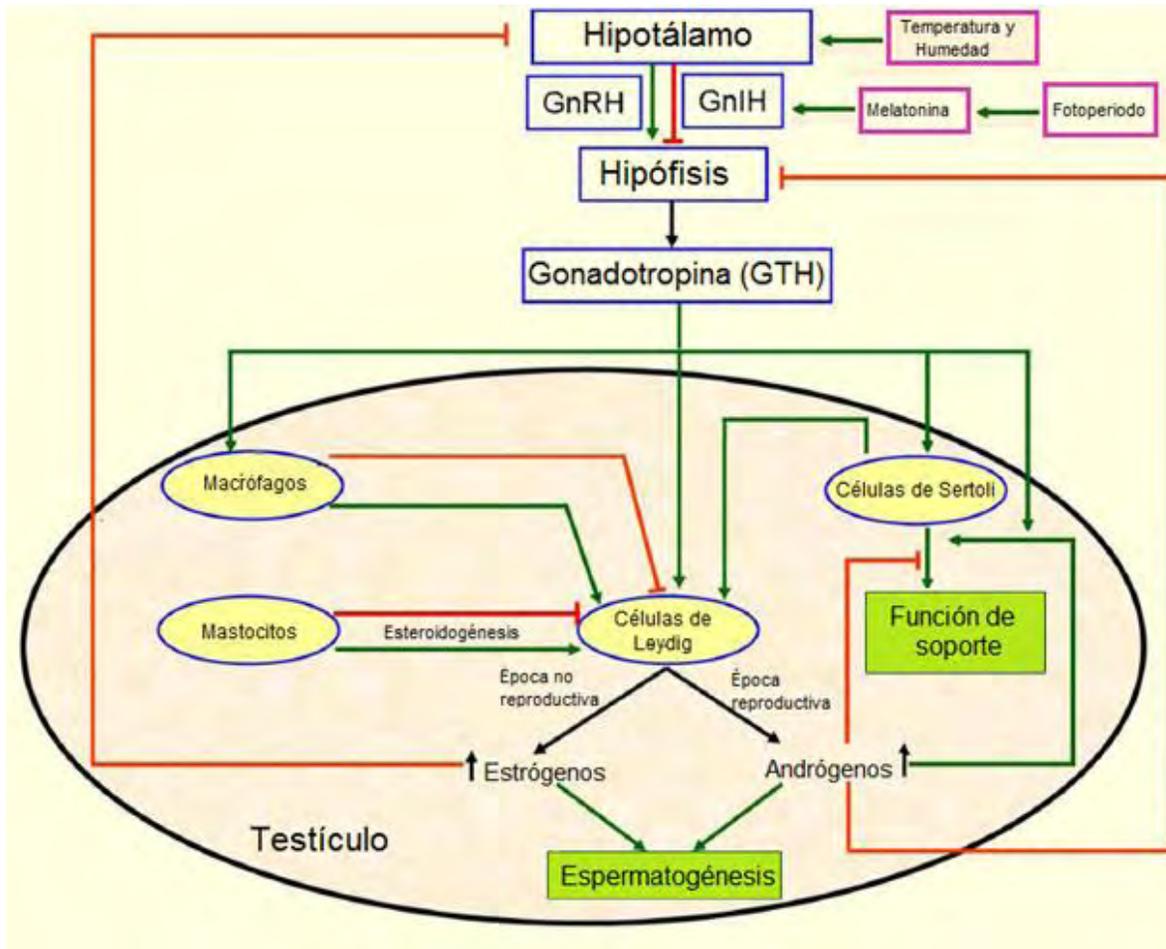


Figura 16. Control ambiental y hormonal de la espermatogénesis en saurios. Modificado de Norris y López, 2013.

## Descripción de la especie.

*Sceloporus torquatus* o lagartija espinosa de collar, es una especie endémica de México, grande, robusta, con una longitud promedio hocico cloaca (LH-C) de los adultos de 87.3 mm y con una longitud total máxima de 180 mm (Vázquez, 2008). Presentan un collar nucal negro de 3 a 5 escamas con orillas blancas de 1-6 escamas. El dorso es de colores pardos, ocasionalmente azul a casi amarillo (Figura 17a). Los juveniles y las hembras cuentan con hileras irregulares o pareadas de puntos oscuros sobre el dorso y grisáceos o azules en barbilla y garganta (Dixon y Lemos-Espinal, 2004). El macho tiene generalmente, desde la garganta hasta la superficie ventral anterior de los muslos colores azul iridiscente a azul celeste (Figura 17b) y las hembras son completamente grises. La cola tiene bandas café oscuras con interespacios pálidos que se vuelven más brillantes cerca de la cola. La madurez sexual para ambos sexos se alcanza regularmente después de los 74 mm (Vázquez, 2008). Se reconocen cinco subespecies: *torquatus*, *melanogaster*, *mikeprestoni*, *binocularis* y *madrensis* (Dixon y Lemos-Espinal, 2004).

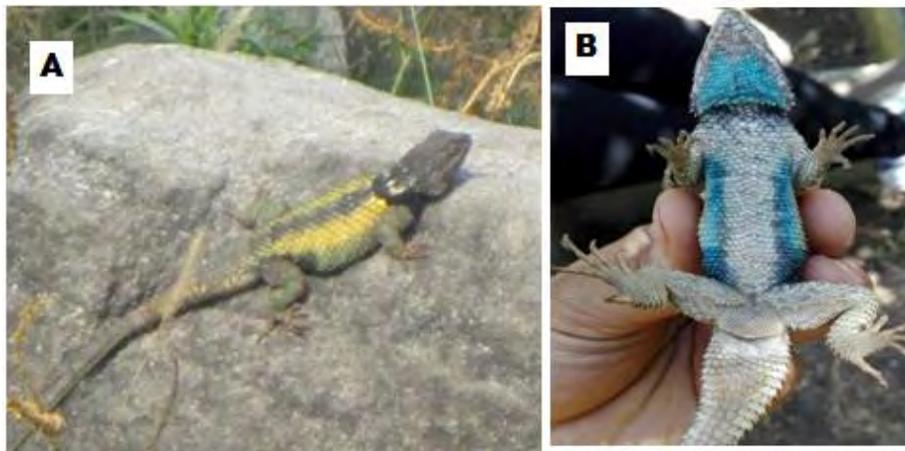


Figura 17. (A) Vista dorsal y (B) vista ventral de un macho *Sceloporus torquatus*.

Morfología: Las escamas de la cabeza pueden ser desde lisas hasta rugosas, y las supraoculares normalmente están en una hilera, separadas con 2-3 hileras de escamas superciliares (Figura 18a). Las escamas dorsales del cuerpo son redondeadas o ligeramente mucronadas, lisas o débilmente quilladas. Las escamas laterales del cuerpo son similares pero ligeramente más grandes y

fuertemente quilladas (Figura 18b). Las escamas ventrales son lisas y con muescas. El número de escamas dorsales desde el occipucio hasta la base de la cola, es de 26-33. Las escamas alrededor del cuerpo varían de 41-56. En machos el número de poros femorales varía de 28-40 (Dixon y Lemos- Espinal, 2004).



Figura 18. (A) Vista de la cabeza y (B) cuerpo de un macho de *Sceloporus torquatus*.

Distribución. La mayor parte de la distribución de esta especie comprende la porción central del Altiplano Mexicano desde el este de Durango hasta Jalisco y a lo largo del Eje Transvolcánico a través de Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Distrito Federal, Estado de México, Morelos, Puebla y Veracruz (Figura 19). Hay subespecies aisladas en Nuevo León y Tamaulipas.



Figura 19. Distribución de la especie *Sceloporus torquatus*. Tomada de CONABIO, 2006.

Hábitat y conducta: Esta especie es principalmente trepadora, vive en rocas grandes de superficies lisas, dentro de grietas y ocasionalmente sobre troncos caídos. Su distribución altitudinal va de 1600 a 3000 msnm. La mayoría de sus actividades como la parición, refugio de depredadores y cortejo ocurre en grietas (Dixon y Lemos-Espinal, 2014).

Dieta: Como modo de forrajeo esperan y acechan a sus presas las cuales son principalmente insectos (escarabajos, mariposas, larvas), arácnidos, isópodos terrestres, anélidos (lombrices de tierra), materia vegetal y en ocasiones son caníbales, depredando neonatos.

Estatus de protección: Sin protección especial (NOM-059-ECOL-2001-SEMARNAT). Es una especie de Preocupación Menor para la lista roja de la UICN.

## Antecedentes

### Investigación de los ciclos reproductivos de saurios machos.

La mayor parte de la investigación que se ha desarrollado en el estudio de los ciclos reproductivos de saurios machos describe los cambios anatómicos e histológicos de los testículos (Bourne, Taylor y Watson; 1985) y en algunos también incluyen las concentraciones hormonales, principalmente andrógenos (testosterona), a lo largo del año. Dentro de estos, se ha estudiado ampliamente a especies pertenecientes a los géneros *Anolis* y *Sceloporus* (Norris y López, 2013). El género *Sceloporus* se compone de especies ovíparas (como *S. aeneus*, *S. horridus*, *S. occidentalis*, *S. spinosus* y *S. undulatus*) y vivíparas (como *S. bicanthalis*, *S. grammicus*, *S. jarrovi*, *S. minor* y *S. torquatus*). Las especies vivíparas del Altiplano Mexicano inician el ciclo reproductivo generalmente en otoño (Vázquez, 2008), después de lo cual las gónadas sufren regresión en ambos sexos. Es de resaltar que, a pesar de esto, existe una asincronía en la maduración y liberación de los gametos entre hembras y machos (Martínez-Torres, 2009).

### Ciclo reproductivo de *Sceloporus torquatus*.

Esta especie es vivípara con copula en otoño. Las hembras gestan durante el invierno y primavera, aunque pueden retener espermatozoides en la vagina alrededor de 5 meses (Martínez-Torres, 2009). Esta especie pare a principios de verano. La vitelogénesis comienza a finales del verano (agosto-principios de septiembre) y se asocia con un aumento del peso ovárico y del diámetro folicular. La ovulación ocurre durante noviembre o diciembre (Guillete y Méndez-De la Cruz, 1993). En los machos se ha observado que existe una relación directa entre el tamaño testicular y la presentación de las conductas reproductoras de cortejo, donde incrementa su actividad locomotora, conductual y sugieren que también

aumenta la concentración de esteroides sexuales. De diciembre a mayo los testículos se observan pequeños, mostrando su tamaño y masa mínima en febrero, el crecimiento de este órgano es más evidente de junio a septiembre. En julio y agosto, la masa testicular aumenta significativamente alcanzando su tamaño máximo en septiembre. En octubre y noviembre, al concluir la espermatogénesis, exponen la conducta reproductora y sufren la regresión testicular inmediata (Feria y Nieto-Montes de Oca, 2011; Dixon y Lemos-Espinal, 2014).

Recientemente, Gribbins *et al.* (2011) informaron que los saurios de ciclo estacional muestran una estrategia de desarrollo de células germinales, similar a los anfibios, donde las células germinales progresan a través de la espermatogénesis como una sola población hasta la formación de espermatozoides. El aumento de la masa testicular va de la mano con la presentación de las mitosis y meiosis de las células germinales una vez que entran en el ciclo espermatogénico, aumenta el tamaño del epitelio seminífero como se ha observado en *Sceloporus bicanthalis* (Gribbins *et al.*, 2003).

### Evaluación histológica del testículo en saurios.

En poblaciones de *Sceloporus aeneus*, por medio de cortes histológicos del testículo, se encontró un patrón estacional de espermatogénesis con 4 fases sucesivas: 1) la quiescencia, que contenía únicamente espermatogonias y células de Sertoli; 2) la recrudescencia testicular, con espermatogonias mitóticas, donde los espermatocitos comenzaron la meiosis y las primeras etapas de la espermiogénesis con espermátidas; 3) la actividad testicular máxima, donde fueron dominados por las espermátidas y las células espermiogénicas; y 4) la regresión testicular donde todas las células germinales disminuyen y las espermatogonias dominaron en el epitelio seminífero (Hernández-Gallegos, 2014).

## La biopsia en la evaluación morfofuncional del testículo.

Se han realizado estudios de la espermatogénesis por medio de biopsia testicular en algunas especies domésticas (como en el perro *Canis lupus familiaris*; Attia *et al.*, 1999; Santos *et al.*; 2009; el caballo, *Equus ferus caballus*, Pereira y Ozanam, 2010; la oveja, *Ovis orientalis aries*, Sartori *et al.*, 1998) y de fauna silvestre (como el jaguar, *Panthera onca*, Rodríguez da Paz, 2003; el periquito migrador, *Lathamus discolor*, Gartrell, 2002; la cacatúa ninfa *Nymphicus hollandicus* y la cotorra de Kramer *Psittacula krameri*, Hänse, *et al.*, 2013). En los reptiles no se ha aplicado este método para la evaluación citológica del testículo y mucho menos para su función espermatogénica durante el ciclo reproductivo.

## Perfil de la concentración de andrógenos en saurios.

Se ha estudiado la producción de andrógenos durante el ciclo reproductivo de algunos saurios. La T es el principal andrógeno presente en el plasma de los machos. Durante el ciclo reproductivo existe una pronunciada elevación en la época de apareamiento con respecto de otras épocas del año (Cuadro 1). Siguen un patrón similar al del ciclo espermatogénico, lo que sugiere la posible implicación de estos en el control de la espermatogénesis y el tamaño testicular (Bourne, Taylor y Watson, 1985).

Cuadro 1. Concentraciones de testosterona en diferentes saurios en época de cortejo y otras épocas del ciclo.

Especie	Concentraciones		Autor
	Cortejo	Otra época	
<i>Tiliqua rugosa</i>	150 ng/ml	15 ng/ml	Bourne, Taylor y Watson, 1985
<i>Cordylus giganteus</i>	10- 70 ng/ml	2 ng/ml	Van, 1995
<i>Pogona barbata</i>	27.5 ng/ml	2.9 ng/ml	Amey y Whittier, 2000
<i>Anolis carolinensis</i>	20–25 ng/ml	< 10 ng/ml	Lovern <i>et al.</i> , 2001
<i>Phrynosoma cornutum</i>	115 ng/ml	30 ng/ml	Wack <i>et al.</i> , 2007

Dentro de los 17  $\beta$  hidroxio-esteroides, se han encontrado metabolitos de la T en plasma como la dihidrotestosterona, la 3 $\alpha$  y la 3 $\beta$  androstenediona (Dufaure *et al.*, 1985); sin embargo, la T es el andrógeno biológicamente más activo (Bourne y Seamark 1975). Se han cuantificado las concentraciones de epitestosterona, epímero de la T, en *Tiliqua rugosa* (Bourne, Taylor y Watson, 1986), encontrándose concentraciones dos o tres veces mayores de estos andrógenos con respecto de la T, sin embargo, esto se realizó en testículos incubados.

En *Sceloporus virgatus* también se determinaron las concentraciones de androstenediona y estradiol, se observó que alcanzan la concentración máxima durante la época de apareamiento. En cambio, la progesterona en los machos no mostró una diferencia significativa en la época activa e inactiva de apareamiento (Abell, 1998).

## Justificación

Los factores ambientales actúan en la regulación del ritmo de los ciclos reproductivos y en su sincronización. Las modificaciones o pérdida de hábitat, la invasión de especies no nativas, y el calentamiento global inciden directamente en la declinación de las poblaciones. El calentamiento climático global ha ocasionado un incremento de 0.1 a 2.8°C en el registro de temperatura media global esperados en la última década (Rahmstorf y Coumou, 2011). Se considera que estos incrementos pueden estar afectando la reproducción de saurios (Wapstra *et al.*, 2009). Esta situación hace necesario conocer el impacto que este tipo de cambios ejerce en las poblaciones de lagartijas (Norris y López; 2013).

Los lagartos son un grupo taxonómicamente rico para estudios integrativos y comparativos. Son especies relativamente fáciles de observar en campo, abundantes y a causa de su comportamiento y relativa docilidad es posible capturarlas y mantenerlas en condiciones de semicautiverio posibilitando así su estudio. Todo esto hace factible y atractivo trabajar diversos aspectos de su biología reproductora (Norris y López, 2013). Sin embargo, la mayoría de la investigación que utiliza lagartijas como modelos biológicos ha recurrido a la eutanasia para estudiar las características fisiológicas o histológicas (Van, 1995; Feria *et al.*, 2001; Gribbins *et al.*, 2013; Gautam *et al.*, 2013; Valencia-Limón *et al.*, 2014; entre otros). Esto se vuelve riesgoso, sobre todo sí se aplica en poblaciones amenazadas, ya que a pesar de que se contribuye al conocimiento para la conservación, contradictoriamente se está coadyuvando en la disminución de estas poblaciones. Por lo que la implementación de técnicas que no involucren el sacrificio de organismos es relevante para obtener conocimiento acerca de la actividad reproductiva (cambios citológicos, hormonales, conductuales, etc.) de estas poblaciones, lo cual permite que los individuos puedan ser restituidos a su hábitat una vez concluida la investigación, sin disminuir el potencial reproductivo de las poblaciones (Martínez-Torres, 2006).

En el estudio de la biología reproductora de diversas especies de reptiles se han utilizado técnicas no destructivas para el apoyo en la generación de conocimiento, tales como la celiotomía (Martínez-Torres, 1997), la celioscopia (Schildger *et al.*, 1993), análisis hormonales (Bourne y Seamark, 1972, Martínez-Torres *et al.*, 2003, 2010, 2012, 2014), radiografías (Schildger *et al.*, 1993), la ultrasonografía (Schildger *et al.*, 1996, Martínez-Torres *et al.*, 2006) y la ginecoobstetricia (salpingoclasia, Martínez-Torres, 2014; histerectomía, Martínez-Torres *et al.*, 1997, 2015; lavados vaginales para comprobar almacenaje de esperma (Martínez-Torres, 2009). Sin embargo, en México son escasos los investigadores que han empleado estos recursos. En este trabajo se propone el método de biopsia testicular y el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) de sangre periférica para el estudio de la biología reproductora del saurio vivíparo endémico de México *Sceloporus torquatus*.

## Objetivo general.

Determinar sí la técnica de biopsia testicular es eficaz para establecer las etapas del ciclo reproductivo en la lagartija vivípara *Sceloporus torquatus*, además de relacionar la actividad con el volumen testicular y las concentraciones de testosterona.

## Objetivos particulares.

- Realizar un perfil citológico del testículo durante el ciclo reproductivo en una población natural de *S. torquatus*.
- Cuantificar las concentraciones de testosterona y correlacionar su actividad con el índice somático-gonadal durante este periodo.
- Evaluar el posible daño testicular inmediato por medio de la evaluación de las características morfológicas de los espermatozoides del semen de los organismos sometidos a la biopsia.

## Material y métodos

### Área de estudio y colecta.

El Parque Estatal Sierra de Guadalupe es un Área Natural Protegida (ANP) localizada geográficamente entre los 19°37' y 19°29' de latitud norte y a los 99°12' y 99° 02' de longitud oeste con una altitud entre los 2200 y 3000 msnm. El clima de la zona es templado subhúmedo con lluvias en verano. La precipitación media anual alcanza los 627 mm, siendo enero el mes más seco, con 30 mm y julio el más húmedo. La temperatura media anual es de 16.7°C, siendo enero el mes más frío con 13.1°C y junio el más cálido con 18.8°C (Figura 20) (Cedillo *et al.*, 2007).

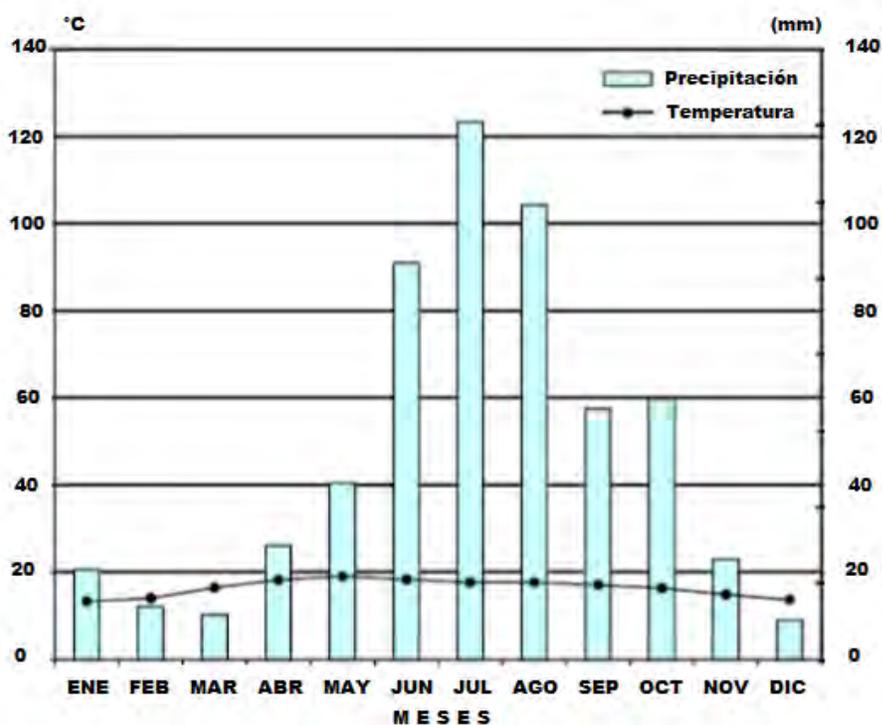


Figura 20. Temperatura (°C) y Precipitación pluvial (mm) por meses en la Sierra de Guadalupe. Tomado de Cedillo *et al.*, 2007.

Se capturaron mensualmente de 3 a 5 machos adultos de *Sceloporus torquatus* en el Parque Estatal Sierra de Guadalupe (únicamente en los municipios de Tultitlán y Coacalco, Estado de México) durante junio a diciembre de 2016 con el permiso

SGPA/DGVS/00579/17. Se localizaron a los individuos en sus refugios o asoleándose en las rocas y fueron colectados por captura manual. Los machos se diferenciaban de las hembras debido a la coloración ventral azul más intensa, la presencia de poros femorales y el par de escamas post cloacales redondeadas, presentes únicamente en los machos (Fig.21).

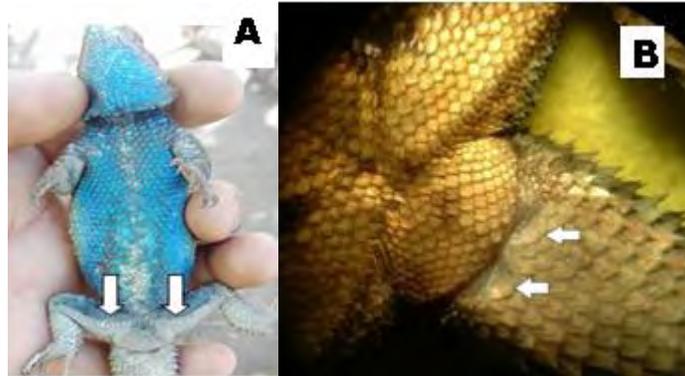


Figura 21. Coloración azul intensa, poros femorales bien marcados (A) y un par escamas postcloacales redondeadas (B) de un macho de *Sceloporus torquatus*.

### Obtención de muestra de sangre.

Se realizó la punción intracardiaca inmediatamente después de la captura con una jeringa heparinizada de 1 ml y aguja de 30G y 13 mm de longitud (U-100, BD Ultra-Fine) para obtener una muestra de sangre de 70 a 100 microlitros (Figura 22). Durante el trayecto al laboratorio se conservaron a 4°C en un termo que contenía refrigerantes y se centrifugaron a 6000 rpm durante un minuto para obtener el plasma, mismo que se conservó a una temperatura de -40°C para determinar posteriormente la concentración de T.



Figura 22. Punción intracardiaca para la obtención de sangre inmediato a la captura de un individuo de *Sceloporus torquatus*.

## Mantenimiento de los individuos.

El mismo día de la colecta se transportaron en costales de manta al laboratorio de Biología de la Reproducción de la Unidad de Morfología y Función (Facultad de Estudios Superiores Iztacala), donde se realizó el registro de parámetros morfométricos como peso corporal, longitud hocico a cloaca (LH-C) y longitud cloaca a cola (LC-Co). Fueron identificados por el método de ectomización de falanges (Ver Anexo 1) y mantenidos en un encierro de 3 X 5 X 2 m. Se alimentaban 3 veces por semana con grillos domésticos (*Acheta domesticus*) y con polillas de cera (*Galleria mellonella*) suplementados con calcio y vitaminas.

## Perfil de testosterona.

De los plasmas conservados se realizó la determinación de la concentración de T mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Ver Anexo 2).

## Biopsia testicular.

Tres a cinco días después de la captura, cada individuo (previamente anestesiado con pentobarbital sódico a dosis de 26 mg/kg vía intracelómica), mediante un abordaje de celiotomía paramediana derecha (exploración de cavidad celómica), se localizó y exteriorizó uno de los testículos para medir el diámetro testicular (largo y ancho) con un vernier (Figura 23). Se obtuvieron los volúmenes testiculares y el índice somático gonadal de acuerdo a Bradshaw *et al.* (1991) (volumen testicular dividido entre el peso de los organismos). Más especificaciones de la técnica se muestran el Anexo 3.



Figura 23. Localización y exteriorización de testículo de uno de los individuos de *Sceloporus torquatus*.

Se realizó la punción con jeringas de insulina (U-100, BD Ultra-Fine) de 0.5 ml y aguja de 31G y 13 mm de longitud para la obtención de una muestra aleatoria de células testiculares (germinales y somáticas) (Figura 24). La jeringa estaba cargada con 20  $\mu$ l de agua destilada estéril. Una vez realizado el aspirado de células, se fijó con formol-acético glacial-agua (FAA), se puso en impronta y fue secada al aire. Se procedió a teñirlas por el método de Feulgen (Anexo 4) para observar al microscopio óptico a 100 aumentos e identificar la composición celular.



Figura 24. Punción del testículo izquierdo de individuo de *Sceloporus torquatus*

## Evaluación del daño testicular.

La evaluación del daño testicular “inmediato” fue mediante: a) el análisis de los espermatozoides del semen de los individuos, b) cambios en la morfología testicular y c) comparación de estas mismas características con individuos de

campo mediante la obtención de semen. Una vez obtenido el semen, se reincorporó la mitad de los organismos (diciembre del 2016) a su ecosistema de procedencia. El resto permanece en el encierro para la evaluación posterior del daño a “largo plazo” (dicho estudio, por motivos de tiempo, no se contempla en este trabajo).

## Análisis estadístico

Los volúmenes testiculares, ISG y T fueron analizados estadísticamente mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor para muestras independientes y para determinar las diferencias significativas entre los promedios por mes de los individuos a una  $P < 0.05$  se utilizó una prueba *pos-hoc* (Tukey o Holm-Sidak). Asimismo se realizó una prueba de Spearman para establecer la correlación entre el volumen testicular (utilizando el ISG) y la T por medio del programa Sigma Plot 12.0 para Windows y Kaleidagraph para iOS.

## Resultados

### Registro de individuos.

A continuación, se presentan los individuos que colectados en este estudio y algunas de sus parámetros morfométricos.

Cuadro 2. Registro de peso (g), longitud hocico-cloaca (LHC) y longitud cloaca-cola (LCCo) de machos de *Sceloporus torquatus* colectados por mes en el periodo de junio a diciembre de 2016.

	<b>Id</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>LH-C (mm)</b>	<b>LC-Co (mm)</b>
<b>Junio</b>	1	22.18	105.0	90.0
	2	18.67	114.0	83.0
	3	34.17	125.0	111.0
<b>Julio</b>	4	25.49	85.0	75.0
	5	21.18	83.0	107.0
	6	27.62	9.1	11.9
<b>Agosto</b>	7	49.16	106.0	112.0
	8	30.61	187.0	119.0
	9	21.90	85.1	23.0
	10	25.08	83.0	92.5
	11	39.34	105.8	99.3
	12	32.44	10.5	12.2
<b>Septiembre</b>	13	25.90	89.0	35.0
	14	21.10	79.0	64.0
	15	31.45	123.7	91.5
	16	51.02	99.6	113.4
	17	38.50	125.0	91.5
<b>Octubre</b>	18	42.80	102.0	125.0
	19	20.60	110.0	80.0
	20	50.08	103.0	45.0
	21	15.80	97.0	76.0
	22	12.30	65.0	84.0
	23	13.09	68.0	96.0
<b>Noviembre</b>	24	46.90	103.0	96.4
	25	15.10	103.0	74.0
	26	11.60	68.0	49.0
	27	16.50	70.0	51.0
	28	43.60	101.0	89.0
<b>Diciembre</b>	29	10.35	65.1	86.1
	30	15.88	89.0	104.0
	31	13.40	70.0	24.0

## Citología testicular.

Se observaron los diferentes tipos de células testiculares a lo largo del ciclo espermatogénico por medio de biopsia testicular (Figura 25).

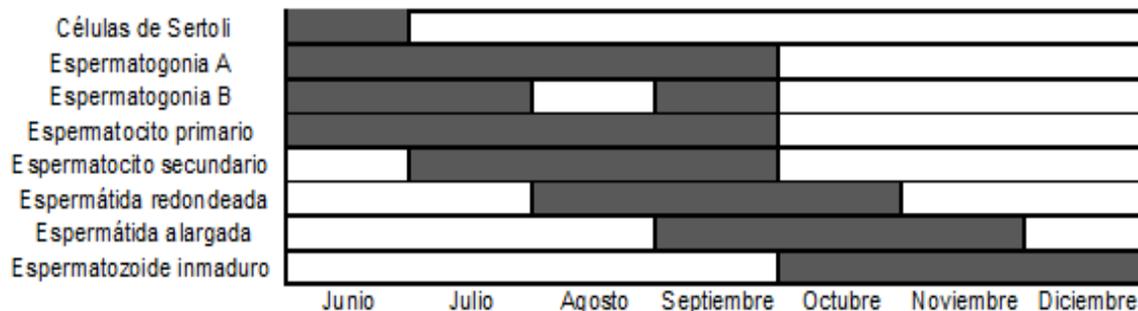


Figura 25. Registro de tipos celulares observados en testículos de *Sceloporus torquatus* colectados por mes en el periodo de junio a diciembre de 2016.

La población celular observada en *Sceloporus torquatus* mostró formas de células de Sertoli, espermatogonias (Sg) A y B, espermatocitos primarios (Sc1) e incluso espermatocitos secundarios (Sc2) en junio. Para julio se podían apreciar Sg A y B, Sc1, espermatocitos secundarios (Sc2). En agosto y septiembre se encontraron Sg en menor número, Sc1, Sc2, espermatocitos secundarios (Sc2), espermatocitos secundarios (Sc2), espermatocitos secundarios (Sc2) y redondeadas (Sdr) y alargadas (Sda). Para octubre la población de formas mitóticas y meióticas decrece para comenzar a observarse formas espermiogénicas (Sdr, Sda) y espermatozoides únicamente. En noviembre y diciembre se observan abundantes espermatozoides y escasas espermatocitos secundarios (Sc2) y espermatocitos secundarios (Sc2) (Figuras 26 a 33).

A continuación se muestran imágenes representativas de las células del epitelio germinal presentes en el túbulo seminífero de *S. torquatus*.

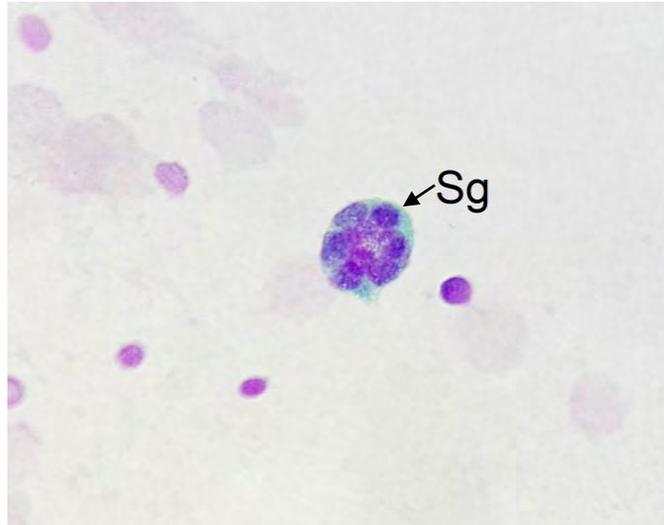


Figura 26. Clona de espermatogonias (Sg).

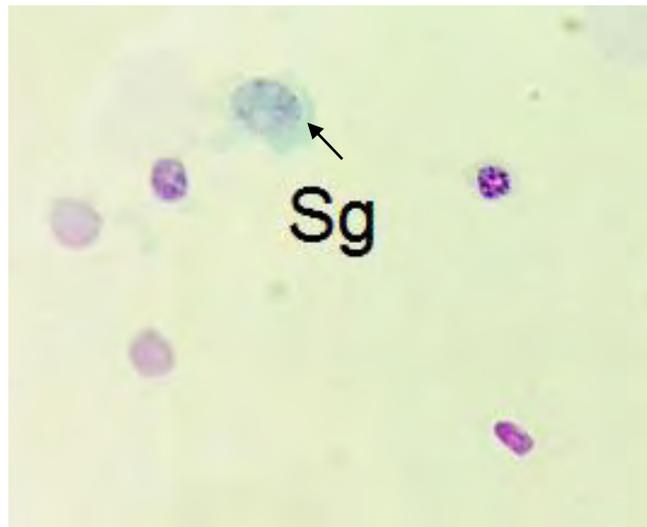


Figura 27. Espermatogonia (Sg)



Figura 28. Célula de Sertoli (CS)

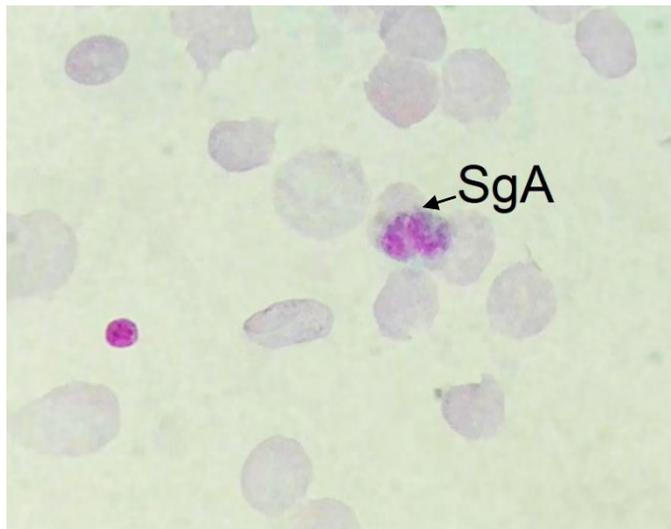


Figura 29. Espermatogonias A (SgA).

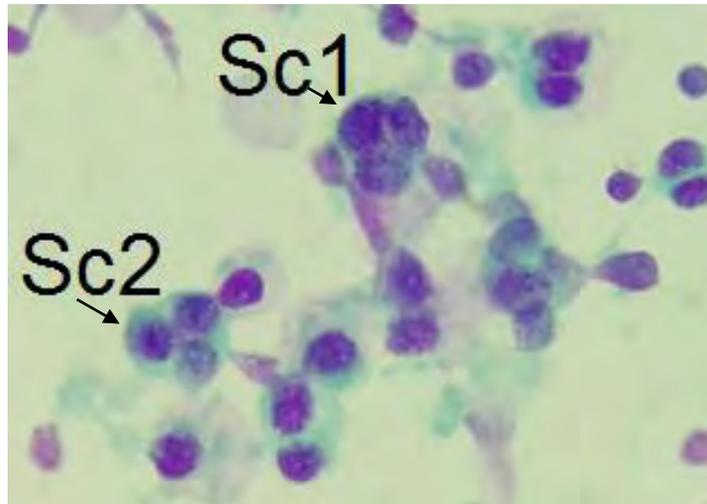


Figura 30. Espermatocitos primario (Sc1) y secundario (Sc2).

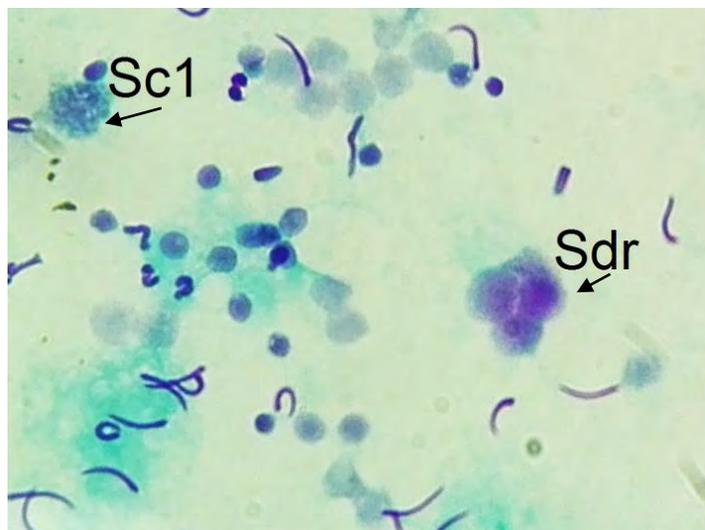


Figura 31. Espermatocito primario (Sc1) y espermátidas redondeadas (Sdr).

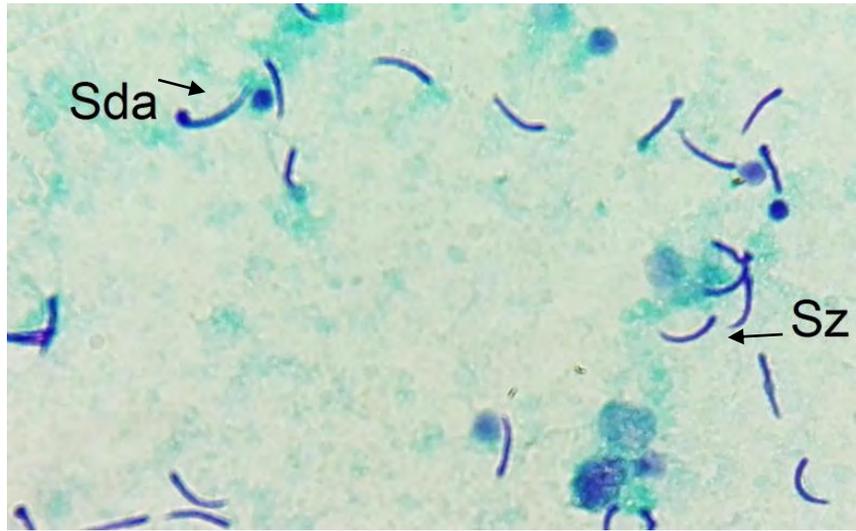


Figura 32. Espermátida alargada (Sda) y espermatozoide (Sz).

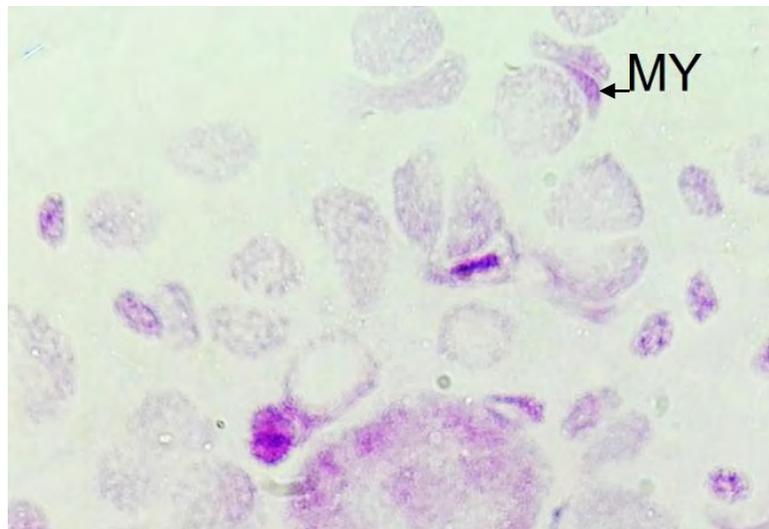


Figura 33. Célula mioide (MY).

## Volumen testicular (VT) e Índice Somático-Gonadal (ISG).

Para los volúmenes testiculares promedio por mes, existen diferencias significativas ( $P = 0.0150$ ). En junio se observa un VT de  $0.18 \text{ cm}^3 \pm 0.13$ . A partir del siguiente mes incrementan alcanzando su tamaño máximo en agosto ( $0.57 \text{ cm}^3 \pm 0.36$ ). En septiembre se inicia la disminución gradual (aunque sin diferencias significativas con respecto a agosto), misma que continúa hasta diciembre donde se observa el menor diámetro testicular (Figura 34). Un hallazgo importante de resaltar es que, contrario a como ocurre para el volumen testicular, a partir de octubre se observa un marcado crecimiento del epidídimo (que corresponde a la época de apareamiento de la especie).

El tamaño de los organismos colectados se relaciona con en el VT, es por ello que se obtuvo el índice somático-gonadal (ISG) para eliminar una posible interferencia por esta característica. De la misma manera, el ISG presenta diferencias significativas ( $P = 0.00641$ ). Se encontró el mismo comportamiento descrito para volúmenes testiculares, con la diferencia que al alcanzar el mayor índice en agosto, se mantiene una meseta en septiembre y ocurre una disminución en el ISG en el momento de apareamiento (noviembre), que continúa en diciembre (Figura 35).

Cuadro 3. Volúmenes testiculares e Índices Somático-Gonadales de machos de *Sceloporus torquatus* por mes en el periodo de junio a diciembre de 2016.

	Biopsia Testicular			Volumen (cm <sup>3</sup> )	Volumen (cm <sup>3</sup> )	ISG	ISG
	Organismos	Ancho (cm)	Largo (cm)	$4/3 \pi a^2 b$	Promedio		Promedio
<b>Junio</b>	1	0.33	0.67	0.04	0.18 ± 0.13 <sup>1</sup>	0.0018	0.0073± 0.0049
	2	0.71	0.81	0.21		0.0112	
	3	0.80	0.90	0.30		0.0088	
<b>Julio</b>	4	0.60	0.82	0.15	0.24 ± 0.08 <sup>2</sup>	0.0059	0.0098± 0.0034
	5	0.72	0.92	0.25		0.0118	
	6	0.82	0.91	0.32		0.0116	
<b>Agosto</b>	7	1.20	1.30	0.98	0.57 ± 0.36	0.0199	0.0158± 0.0040 <sup>1,2</sup>
	8	0.91	1.10	0.48		0.0157	
	9	0.72	0.95	0.26		0.0119	
<b>Septiembre</b>	13	0.75	0.86	0.25	0.44 ± 0.17	0.0097	0.0161± 0.0071 <sup>3,4</sup>
	14	0.92	1.12	0.50		0.0237	
	17	1.00	1.10	0.58		0.0151	
<b>Octubre</b>	18	0.60	1.00	0.19	0.23 ± 0.03	0.0044	0.0106± 0.0058
	19	0.70	0.92	0.24		0.0117	
	21	0.75	0.85	0.25		0.0158	
<b>Noviembre</b>	24	0.34	0.61	0.04	0.06 ± 0.02	0.0009	0.0022± 0.0016 <sup>1,3</sup>
	25	0.40	0.71	0.06		0.004	
	28	0.51	0.61	0.08		0.0018	
<b>Diciembre</b>	29	0.34	0.42	0.03	0.03 ± 0.00 <sup>1,2</sup>	0.0029	0.0023± 0.0005 <sup>2,4</sup>
	30	0.31	0.52	0.03		0.0019	
	31	0.34	0.42	0.03		0.0022	

Nota: **a** = mitad del ancho y **b**= mitad del largo para la fórmula del volumen testicular. Los superíndices indican los meses entre los que se observan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey tanto para volúmenes testiculares como para ISG.

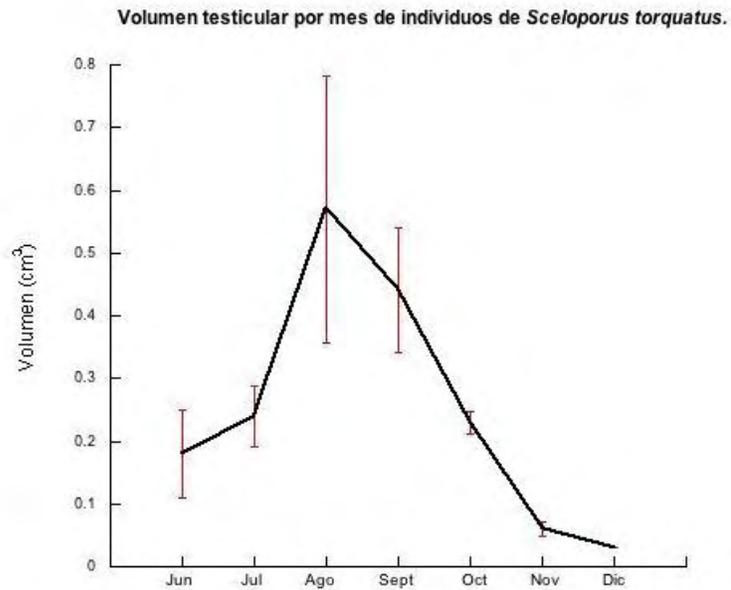


Figura 34. Volumen testicular promedio (cm<sup>3</sup>) por mes de individuos de *Sceloporus torquatus* de junio a diciembre de 2016.

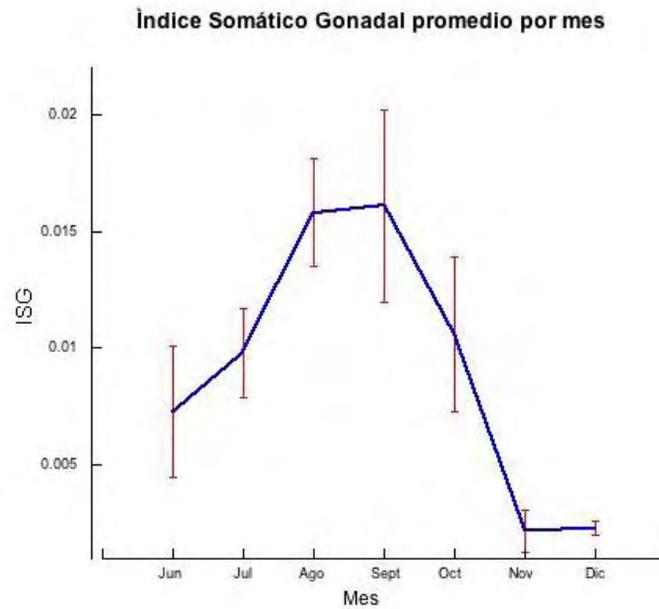


Figura 35. Índice Somático-Gonadal (ISG) por mes de individuos de *Sceloporus torquatus* de junio a diciembre de 2016.

## Testosterona.

Las concentraciones de T en el plasma se incrementaron progresivamente hasta el mes de octubre donde ocurre la reducción y decrece gradualmente en diciembre. Cabe destacar que en octubre se mantienen concentraciones elevadas de este andrógeno, contrario al volumen testicular, que decrece en este mes. Existen diferencias significativas para los valores de T ( $P < 0.001$ ) (Figura 36).



Figura 36. Concentración promedio de Testosterona en machos de *Sceloporus torquatus* en el periodo de junio a diciembre de 2016.

Cuadro 4. Concentración de testosterona plasmática [ng/ml] en los diferentes meses de individuos machos de *Sceloporus torquatus* en el periodo de junio a diciembre de 2016.

Mes	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Concentración [ng/ml]	1.599	11.07	15.365	14.98	15.212	11.792	4.694
	3.112	2.434	15.409	15.746	16.228	14.612	3.364
	14.209	10.72	13.071	15.194	15.225	1.284	1.497
			16.048	16.175	15.514	6.854	
			13.194	16.096	15.549	11.722	
			16.232		15.742		
<b>Promedio</b>	6.307 <sup>1,2,3</sup>	8.075	14.887 <sup>1,4</sup>	15.638 <sup>2,5</sup>	15.578 <sup>3,6</sup>	9.253	3.185 <sup>4,5,6</sup>
Desviación Estándar	6.885	4.888	1.402	0.534	0.378	5.256	1.606

Notas: Las concentraciones se presentan de acuerdo al orden en que fueron obtenidas las muestras que es el mismo que se reporta en el Cuadro 2. Los subíndices indican los meses entre los cuales se observaron diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Holm-Sidak a un nivel de significancia de 0,05.

## Correlación del Índice Somático-Gonadal con la Testosterona.

De acuerdo a la prueba de Spearman, el coeficiente obtenido ( $R = 0.750$ ) es positivo y el valor de  $P$  ( $0.0384$ ) está por debajo de  $0.050$ ; esto indica que el par de variables (ISG y T) presentan una correlación (Fig 37). Se observa que de junio a septiembre el ISG y la T, sí incrementa una, lo hace de la misma manera la otra (existe una relación directamente proporcional). Hay un desfase en el comportamiento de la curva de T, ya que en octubre se mantienen concentraciones elevadas de este esteroide cuando el índice somático gonadal ya ha disminuido. Finalmente, en diciembre ambos alcanzan las concentraciones más bajas; es decir, en la época de quiescencia testicular.

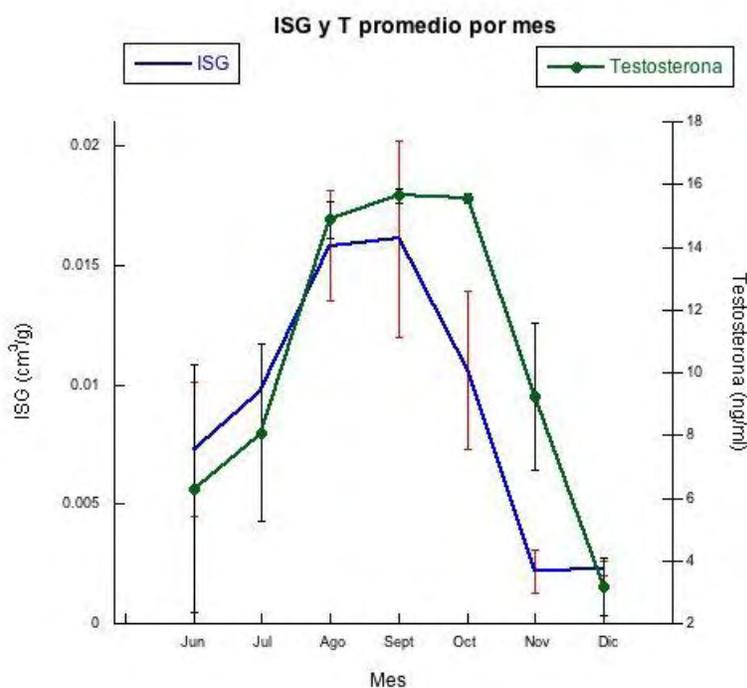


Figura 37. Comportamiento del índice somático-gonadal y la concentración promedio de Testosterona en machos de *Sceloporus torquatus* en el periodo de junio a diciembre de 2016.

## Discusión

En la actualidad existen una serie de factores que influyen en la disminución de las poblaciones de saurios. Para hacer frente a esta problemática se debe avanzar en los conocimientos por medio de estudios integrales de la biología reproductora de las especies, sin la eutanasia que afecta sensiblemente a dichas poblaciones. En este sentido, la aplicación de métodos no destructivos se ha trabajado únicamente con hembras de lagartijas (Martínez-Torres, 1997, 2009; Martínez-Torres *et al.*, 2003, 2006, 2010). Estos procedimientos, aplicados de manera eficiente, han generado conocimiento sin comprometer su capacidad reproductora.

Algunos de estos estudios se han apoyado en métodos como la ultrasonografía como el caso de Martínez-Torres *et al.* que en el 2006 estudiaron el desarrollo folicular de *Barisia imbricata*. Martínez-Torres en 2009 utiliza únicamente la anestesia en *Sceloporus torquatus* para, por medio de lavados vaginales, revisar el almacenaje de esperma en vagina. Otros estudios requirieron la intervención quirúrgica como el caso de la celiotomía, abordaje utilizado para realizar histerectomía para el estudio de la placenta de *Barisia imbricata* (Martínez-Torres, 1997). Martínez-Torres *et al.* en 2003 obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca para la cuantificación de progesterona plasmática en el desarrollo luteal durante la gestación de *Barisia imbricata*, y en 2010 la relacionaron con los efectos de la luteotomía. Este método, a pesar de ser delicado, sí se realiza adecuadamente permite la sobrevivencia del organismo sin daños a la salud, excepto disminución transitoria en el hematocrito.

En este trabajo se realizó el abordaje de celiotomía paramediana en machos de la lagartija vivípara *S. torquatus*, se obtuvieron volúmenes testiculares y se practicó la biopsia testicular unilateral derecha, como técnica para evaluar la actividad testicular. Además, se relacionó con las concentraciones de T plasmática.

## Biopsia testicular

La biopsia testicular es un método importante en la detección de cambios testiculares y se puede utilizar de rutina en la investigación del tracto reproductivo del macho, por ser menos invasivo que otros métodos (histología de testículos de animales eutanasiados o orquiectomizados). La biopsia testicular, junto con otras técnicas, proporciona una herramienta útil para conocer el ciclo reproductivo o en el diagnóstico de infertilidad de los machos, sobre todo cuando se refieren a especies en peligro de extinción (Gartrell, 2002), donde no es conveniente hacer el sacrificio de los animales o provocar problemas en su fertilidad (Paz *et al.*, 2003). En el presente estudio se pudo constatar que, con las precauciones debidas durante el proceso quirúrgico y los cuidados postoperatorios, la recuperación de los individuos sometidos a biopsia es completa y no compromete su estado de salud.

Este procedimiento puede ser validado por la comparación de los tipos celulares obtenidos por el aspirado con los de un corte histológico, como lo hace Gartrell (2002) en un estudio con el periquillo migrador (*Lathamus discolor*). Él encuentra que no existe una diferencia importante entre la población celular observada entre los dos métodos. Hänse (2013) logra clasificar las fases de la actividad testicular en aves psitaciformes y la única diferencia importante con el método histológico que encontró es que éste preserva la arquitectura testicular.

### Celularidad durante el ciclo reproductivo.

La observación en la población celular de *S. torquatus* coincide con la de *S. mucronatus* (Villagrán-Santa Cruz *et al.*, 2009), especie vivípara de reproducción otoñal, donde se determinó mediante cortes histológicos que la recrudescencia testicular ocurre en junio, en septiembre ocurre la máxima actividad testicular y en octubre se localizan espermatozoides. Posteriormente ocurre la quiescencia. Esta observación coincide, además, con otras especies (cuadro 5) con diferencias únicamente en los meses en que las poblaciones presentan cada etapa del ciclo reproductivo.

Cuadro 5. Revisión de los distintos tipos celulares reportados en diferentes especies de lagartijas.

	Células Sertoli	Espermatogonia en reposo	Espermatogonia A y B	Espermatocito primario	Espermatocito secundario	Espermátida redondeada	Espermátida alargada	Espermatozoide maduro?	Apareamiento
<i>S. mucronatus</i> (Villagrán-Santa Cruz <i>et al.</i> , 2009)		Dic-Oct		Jun	Jun			Sep	No reportado
<i>Scincella lateralis</i> (Rheubert <i>et al.</i> , 2009)	Mar-Oct	Mar-Oct	Mar-Oct	Mar-Oct	Jun	Oct-Jun	Oct-Jun	Oct-Jun	Mar-Ago
<i>S. bicanthalis</i> (Gribbins <i>et al.</i> , 2011)	Todo el año	Todo el año	Todo el año	Todo el año	Todo el año	Todo el año	Todo el año	Todo el año (excepto Marzo)	Reproducción continua
<i>S. spinosus</i> (Mendez-de la Cruz, 2013)	Jul-Sep	Jul-Sep	Sep	Sep-Ene	Nov-Ene	Ene-Feb	Feb	Feb-May	Mar-Abr
<i>Hemidactylus flaviviridis</i> (Gautam, <i>et al.</i> , 2014).	May-Ago (Retraída) Sep-Abr (Normal)	May-Ago	Sep-Oct	Sep-Oct	Sep-Oct	Sep-Oct	Sep-Oct	Nov-Abr	Mar-Abr
<i>S. aeneus</i> (Hernández-Gallegos <i>et al.</i> , 2014.)	Ago-Abr	Ago-May	Sep	Mar-Oct	Mar-Oct	Mar-Jul	Mar-Jul	May-Jul	Mar-May
<i>S. consobrinus</i> (Rheubert <i>et al.</i> , 2014)	Ago	Mar-Nov	Sep	Mar-Oct	Mar-Oct	Mar-Jul	Mar-Jul	May-Jul	No reportado
<i>S. grammicus</i> (Lozano <i>et al.</i> , 2015).	Ene, Oct, Dic <sup>a</sup>	Nov-Ene <sup>a</sup> Feb <sup>b</sup>	Mar-Abr <sup>a</sup> Sep-Nov <sup>b</sup>	Sep <sup>a</sup> Ene/Feb Abr/May Jul/Ago Oct/Nov <sup>b</sup>	Abr-Sep <sup>a</sup> Todo el año excepto Feb/Ago <sup>b</sup>	Mar-Abr <sup>a</sup> Sep-Nov <sup>b</sup>	Sep <sup>a</sup> Ene/Feb Abr/May Jul/Ago Oct/Nov <sup>b</sup>	Sep <sup>a</sup> Feb, May, Jun, Ago, Oct <sup>b</sup>	Sep <sup>a</sup> Todo el año <sup>b</sup>
<i>S. torquatus</i> (presente estudio)	Junio		Jun-Sep	Jun-Sep	Jul-Sep	Jun-Oct	Jun-Nov	Oct-Dic (aún sin madurar)	Oct-Nov

Nota: Población de Zacualtipán <sup>a</sup> y Tizayuca <sup>b</sup>

Estas evidencias demuestran que los cambios celulares que ocurren durante el ciclo reproductivo de saurios se pueden observar mediante la punción del testículo. Los autores del cuadro 5 reportan la presencia de espermatozoides “maduros” en testículo. En este caso se difiere de dichos reportes ya que los espermatozoides continúan su trayecto por el tracto reproductor hacia el epidídimo para su maduración fisiológica (Ferreira y Dodler, 2003), por ello se encuentran aún inmaduros en testículo.

Gautam *et al.* (2013) afirma que la espermatogénesis en saurios es un proceso que inicia en la madurez reproductiva. Es por ello que para la evaluación de los machos de saurios se requiere que hayan alcanzado esta etapa. En *S. torquatus* se ha reportado que los machos son sexualmente maduros a los 74 mm de LH-C (Vázquez, 2008). Los resultados obtenidos en este estudio difieren de esta afirmación, ya que en un individuo de diciembre cuya LH-C fue de 65 mm, se encontró la presencia de espermatozoides en el testículo, lo que sugiere que ya ha alcanzado dicha madurez sexual.

### Volumen testicular e Índice Somático-Gonadal.

Existen diversos estudios que evaluaron los cambios que se presentan en el volumen testicular de lagartijas a través de su ciclo reproductivo. En éstos coinciden en que, luego de la quiescencia, existe un aumento progresivo del volumen testicular y que, previo a la época de apareamiento, sufren una disminución muy marcada (*S. horridus*, Valencia-Limón *et al.*, 2014; *S. mucronatus*, Villagrán-Santa Cruz *et al.*, 2009; *S. consobrinus*, Rheubert *et al.*, 2014). El epidídimo aumenta su tamaño durante este suceso (no evaluado en este estudio), lo que implica su papel en la maduración espermática previa a la época de cortejo (Ferreira *et al.*, 2009). Sin embargo, estos investigadores no realizan la comparación entre el volumen del testículo y la citología a lo largo del ciclo reproductivo, por lo que queda desconocido los cambios celulares que ocurren durante esta etapa.

Feria-Ortiz (1986) estudió el ciclo testicular de *S. torquatus* encontrando, para una población del Pedregal de San Ángel, que en los meses de diciembre a mayo se presenta el menor tamaño de los testículos sin diferencias significativas, mientras que de junio a septiembre ocurre el crecimiento testicular con diferencias significativas entre los meses y con un volumen máximo en septiembre. En el presente trabajo con poblaciones de Sierra de Guadalupe, se encuentra similitud con este comportamiento, con excepción de que el volumen testicular máximo se alcanza en el mes de agosto y que es menor al que reportó Feria-Ortiz (1.0 cm<sup>3</sup>). Estas diferencias se atribuyen al tamaño de los individuos colectados, lo cual no pudo ser cotejado con este estudio ya que no incluye datos como la LH-C o el peso de los organismos. Además, él utiliza un método distinto; obtiene el peso del testículo ya que utilizó animales eutanasiados, lo cual difiere de este estudio, donde se obtiene únicamente el largo y ancho del órgano sin ser extraído. En su estudio también reporta el incremento en el ISG a partir de junio y que existe una disminución muy marcada en la época de apareamiento (octubre-noviembre). Para el caso de esta investigación se coincide con esta observación, sin embargo se difiere en que, contrario a lo que él indica, el mayor índice se encuentra en septiembre y no en diciembre.

## Testosterona.

Las concentraciones de T cuantificadas para *S. torquatus*, muestran un comportamiento similar al del volumen testicular con excepción de que la T se mantuvo con concentraciones elevadas durante la época de apareamiento. Esta observación es similar a la registrada en *Tiliqua rugosa* (Bourne, Taylor y Watson, 1986), *Cordylus giganteus* (Van, 1995), *Pogona barbata* (Amey y Whittier, 2000), *Anolis carolinensis* (Lovern *et al.*, 2007) y *Phrynosoma cornutum* (Amey y Wack, 2007) como se evidencia en el Cuadro 1.

Bourne, Taylor y Watson (1986) en *T. rugosa* relacionaron la concentración plasmática de T con la morfología e histología del testículo, encontrando que el pico anual de T y el máximo peso testicular, coinciden con la época donde se encontraron más espermatozoides contenidos en el túbulo seminífero. Esta observación es similar a la mostrada por *S. torquatus* a partir de septiembre donde se considera la época de mayor actividad del testículo. Abell (1998) encontró que en *S. virgatus*, los niveles de T en la época de apareamiento estaban relacionados con la coloración ventral (tamaño y el brillo) de los individuos. Bourne y Seamark (1975) sugieren que el aumento en la concentración de este esteroide puede estar implicado en el inicio del comportamiento de apareamiento. Se observaron, durante la colecta de octubre, individuos con coloraciones más llamativas, además de conductas de cortejo en los machos (búsqueda, persecución de hembras y flexiones (comúnmente conocidos como “push-ups”). Por esto se atribuye que el mantenimiento de T en concentraciones elevadas durante este periodo regula el comportamiento de cortejo en *S. torquatus*. Aunque disminuyó el volumen testicular, la actividad esteroidogénica de las células de Leydig se mantuvo elevada. Además, se sabe que parte de la T circulante puede ser de fuentes extratesticulares (por ejemplo, la glándula adrenal). Para aclarar esta situación sería necesario estudiar la actividad esteroidogénica de ambas glándulas.

### Daño testicular.

Lopate *et al.* (1989) observaron las lesiones provocadas por la biopsia testicular en perros adultos, pudiendo encontrar hemorragias en el sitio de la lesión, necrosis coagulativa, adhesiones fibrosas en túnica vaginal y albugínea, inflamación neutrofílica y linfocítica, degeneración y atrofia tubular, hipoespermatogénia en el sitio de punción, arresto en la maduración y seminomas. Este tipo de lesiones sin embargo se desconoce si limitan o inhabilitan al animal para la reproducción, por ello es recomendable evaluar la funcionalidad de los testículos después del procedimiento. No se pudieron observar lesiones graves evidentes en el testículo de las lagartijas (como más adelante se menciona). Estas

diferencias pueden deberse al material que se utilizó en la punción de los perros, sin embargo, se desconoce si el calibre de esta aguja (25G) causa un traumatismo importante en la gónada.

Hänse *et al.* (2008) encontraron que una única biopsia no causó daño permanente a los testículos y no afectó el estado general del periquito australiano *Melopsittacus undulatus* examinadas con este procedimiento. El examen endoscópico repetido dio como resultado cicatrización testicular o adherencias con los sacos aéreos. La biopsia unilateral practicada repetidamente durante el período de 1 año no tuvo ningún impacto en la producción o calidad del espermatozoide. Este estudio no fue realizado en otros individuos por lo que no se descarta el daño que la repetición de la punción puede provocar en el testículo. En *S. torquatus* se utilizó el testículo puncionado de un individuo, que falleció (por causas ajenas a la cirugía) a las tres semanas de la intervención quirúrgica, para realizar cortes histológicos en los cuales se pudo observar únicamente, como lesión, una fibrosis leve en el sitio de la punción; sin embargo, no existía necrosis o alguna otra alteración aparente.

En un estudio de Attia *et al.* (1999) realizado en perros con hemicastración previa a la biopsia testicular (para prevenir interferencia o confusión de los efectos del procedimiento en la producción de espermatozoides por la actividad del testículo contralateral), muestra que dos de los tres perros sometidos a la aspiración presentan una producción transitoria de anticuerpos antiespermatozoides (ASA) en la citometría de flujo del semen obtenido 25 días posteriores a la punción. En la evaluación de las características seminales, uno de los individuos tuvo un incremento en la producción de espermatozoides así como en la motilidad. Para el caso de la morfología espermática, dos de los perros presentaron una reducción significativa del porcentaje normal de espermatozoides (anomalías del acrosoma, gotas proximales y distales, colas dobladas, colas en espiral, cabezas desprendidas y formas anormales de la cabeza). En el caso de la experimentación con *S. torquatus*, se evaluó el semen de individuos intactos de campo con

individuos sometidos a la biopsia, se observó que no hubo cambios aparentes en el volumen seminal (2 a 10  $\mu$ l) ni la concentración espermática (120-130 X 10<sup>6</sup> espermatozoides) (Figura 38). En la arquitectura tisular no hay cambios citológicos aparentes de daño testicular, ni cambios en el porcentaje de motilidad comparado con individuos intactos. Esto no pudo ser comparado en la literatura debido a que no hay valores de referencias para semen de ningún saurio, excepto los presentados por Martínez-Torres *et al.*, 2016 (6<sup>o</sup> Congreso Internacional de Medicina Veterinaria Aplicada a Reptiles y Anfibios), donde se observan valores similares.

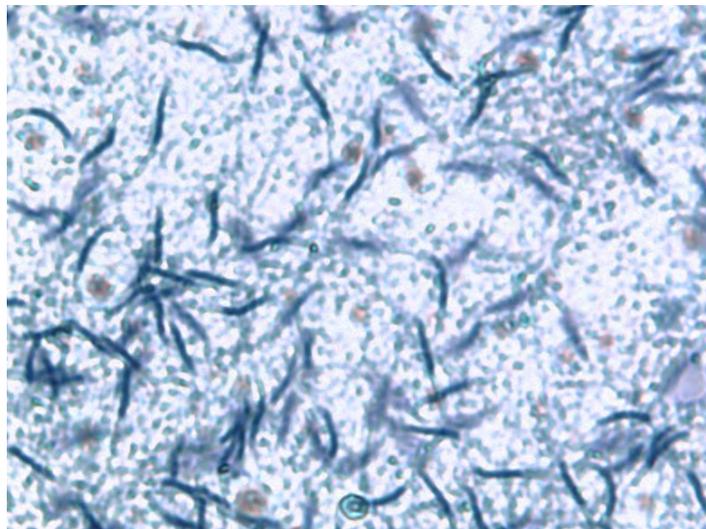


Figura 38. Espermatozoides de *Sceloporus torquatus* sometido a punción testicular. La morfología sin cambios aparentes de daño testicular. Tinción Hematoxilina-Verde brillante.

En este estudio no se consideró la fertilidad como otro parámetro para evaluar el daño testicular, ya que para poder realizar esta estimación se requieren hembras de las que se tenga certeza que no tuvieron contacto con machos en al menos un ciclo reproductivo ya que como Martínez-Torres (2009) reportó, los espermatozoides son retenidos hasta 167 días en un sistema de túbulos especiales en la vagina de las hembras de *S. torquatus*.

## Conclusiones

1. La biopsia testicular es una técnica eficiente y rápida en la evaluación inmediata de la actividad testicular de saurios que implica poco riesgo y con los cuidados pre, trans y postquirúrgicos adecuados la recuperación de los individuos es completa.
2. La citología es confiable en la evaluación de la espermatogénesis, pues se pueden caracterizar las formas celulares típicas de este proceso.
3. En combinación con otras técnicas puede hacerse una evaluación integral de la actividad gonadal.
4. Existe una correlación positiva del volumen testicular con la testosterona plasmática a lo largo del ciclo reproductivo excepto para la época de apareamiento donde los niveles de T permanecen altos.
5. La evaluación del daño testicular a corto plazo sugiere que no hay alteración en la función testicular.
6. Se requiere la evaluación de la fertilidad del macho a largo plazo para determinar si no hay alteración de la capacidad reproductiva de individuos sometidos a la biopsia testicular.

## Perspectivas

- El uso de métodos no destructivos, como la biopsia testicular entre otros.
- Realizar estudios integrativos de la reproducción de saurios con técnicas que mantengan con vida a los animales.
- Evaluar el daño testicular que puede existir si son puncionados ambos testículos
- Generar información de referencia para la comparación de características morfofuncionales del semen de distintas lagartijas en casos donde se requiera comparar con individuos sometidos a procedimientos como la biopsia testicular.
- Evaluar la fertilidad en los individuos en el siguiente ciclo reproductivo para conocer si la biopsia testicular afecta su capacidad reproductiva.

## Anexo 1. Sistema de identificación de organismos.

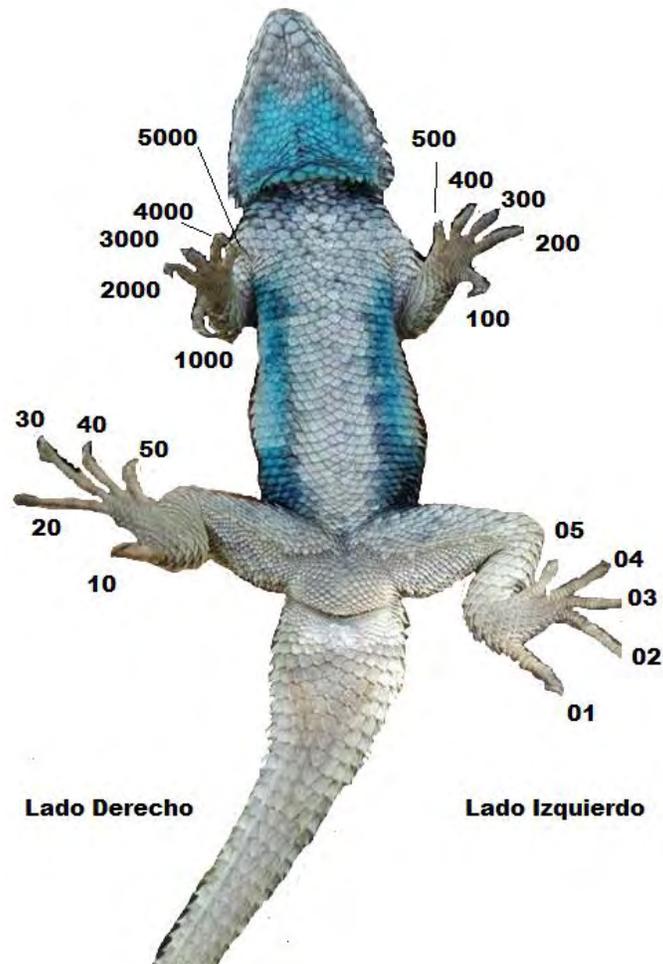


Figura 39. Sistema de ectomización de falanges para identificación de lagartijas utilizado durante la experimentación. Fuente propia.

El sistema de ectomización de falanges asigna las unidades al miembro posterior izquierdo, decenas al miembro posterior derecho, centenas al miembro anterior izquierdo y millares para el miembro anterior derecho del organismo comenzando la numeración con la falange más lateral para terminar con la más medial. Se pueden amputar dos dedos de cada miembro para así tener la posibilidad de identificar a los animales con 9999 combinaciones distintas.

## Anexo 2. ELISA para la cuantificación de Testosterona.

La cuantificación de Testosterona se realizó utilizando el kit DRG Testosterona ELISA (EIA-1559), que se basa en un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas basado en el principio de unión competitiva.

Método:

1. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un foci antigénico de la molécula de Testosterona (T).
2. Se deposita en cada pocillo las muestras estándar con concentraciones crecientes de T (0, 0.2, 0.5, 1, 2, 6, 16 ng/ml), la muestra control de concentración conocida y el plasma de las diferentes lagartijas (0.25  $\mu$ l).
3. La T contenida compite en un lapso de 60 minutos con un conjugado Testosterona-peroxidasa de rábano (200  $\mu$ l) en la unión al anticuerpo inmovilizado.

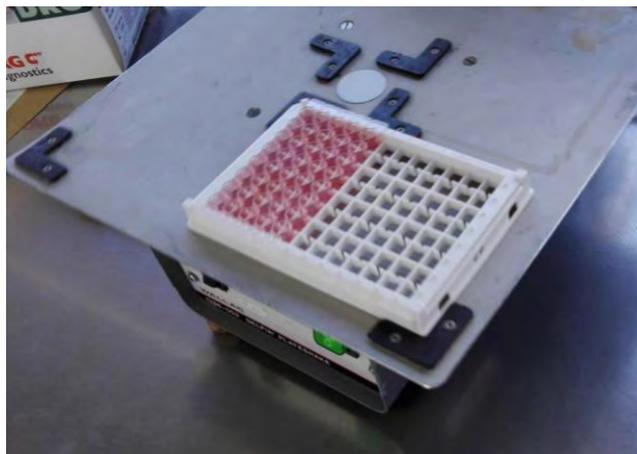


Figura 40. Muestras de plasma con el conjugado de testosterona-peroxidasa.

4. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.
5. Después de la adición de la solución sustrato (tetrametilbencidina) por 15 minutos, se detiene la reacción con (ácido sulfúrico 0.5M).

6. La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de T de las muestras; es decir, la intensidad de color.



Figura 41. Cambio en la coloración de la reacción al adicionar la solución sustrato.

7. Se da la lectura en el espectrofotómetro, se obtiene la curva estándar con la que se interpolan los nm del espectro de luz detectados para cada muestra para así asignar dentro de la curva, la concentración de T de las muestras problema (ng/ml).



Figura 42. Lectura de las muestras en el espectrofotómetro.

## Anexo 3. Técnica quirúrgica.

### Cuidados prequirúrgicos.

Los individuos capturados se mantienen tres días en transportadoras individuales con agua *ad libitum*, alimentación con grillo doméstico, sustrato limpio hasta el día de la intervención; cuando se suspende la alimentación doce horas previas y se retira el agua dos horas previas. Se realiza el baño de cada uno de los individuos con agua y jabón.

### Cuidados transquirúrgicos y procedimiento.

Se aplica el anestésico (pentobarbital sódico a dosis de 26 mg /kg por vía intracelómica hasta 30-45 minutos cuando se observa el efecto del fármaco) y posterior a ello se coloca en decúbito dorsal al individuo sobre un campo quirúrgico estéril. Todo el instrumental quirúrgico es esterilizado por calor seco y el procedimiento se realiza con el uso de guantes estériles. Se efectúa el lavado de la zona de incisión con jabón quirúrgico y el embrocado con cloruro de benzalconio. Se realiza una incisión en la piel (entre las escamas) del lado derecho tomando como referencia el conteo de tres a cuatro escamas a partir de la línea media a la altura del punto donde contacta la parte más craneal del miembro pelviano en flexión.

Se profundiza la incisión sobre el plano muscular y el peritoneo hasta observar cavidad celómica. En caso de existir hemorragia, se realiza la hemostasia por compresión y para la exploración se utilizan ganchos para evitar el manejo brusco de tejidos adyacentes. Se localiza y exterioriza el testículo derecho para medir el largo y ancho con un vernier. El órgano se mantiene hidratado con una solución salina al 0.7%. La punción se realiza con jeringas de insulina (U-100, BD Ultra-Fine) de 0.5 ml, aguja de 31G y 13 mm de longitud en el área de menor

vascularización. La jeringa está cargada con 20 µl de agua destilada estéril. Una vez realizado el aspirado de células, se revisa al microscopio óptico para constatar la presencia de células. Se fija con 20 µl de formol-acético glacial-agua (FAA), se coloca una gota en portaobjetos y se seca al aire. El testículo se devuelve a cavidad.

Se realiza la sutura en dos planos; la primera con un patón de sutura simple discontinuo con material absorbible monofilamento de ácido poliglicólico de 6-0 en musculo y la segunda con material no absorbible monofilamento de nylon de 6-0. Durante todo el procedimiento se revisa la actividad respiratoria del animal. Posterior a la intervención, se mantiene al animal en observación hasta la recuperación en un área a temperatura mayor a 20°C aproximadamente y se le ofrece agua.

### Cuidados postquirúrgicos.

Se mantiene a los individuos en transportadoras individuales con cambio de sustrato constante para mantener condiciones higiénicas, se ofrece agua a libre acceso y alimento al día siguiente. Se aplica por cinco días enrofloxacin como antibiótico parenteral a dosis de 10 mg/kg y meloxicam como analgésico a dosis de 0.02 mg/kg durante tres días; ambos cada 24 horas. Se realiza por tres días la limpieza de la herida con agua oxigenada y un cicatrizante.

Al finalizar el tratamiento y curación de las heridas, una vez que se comprueba el estado de salud de los animales, se colocan parches de cinta de microporo y se liberan en los encierros al aire libre. Tres a cuatro semanas posteriores se retiran los parches. Los puntos de sutura no se retiran ya que estos caen por si solos en las posteriores mudas.

## Anexo 4. Técnica de Feulgen.

### Reactivos:

- Ácido Clorhídrico (HCl) 1N.
- Reactivo de Schiff
- Verde Rápido

### Procedimiento:

1. Hidratar las muestras de biopsias testiculares por 10 minutos en agua corriente.
2. Hidrolizar las muestras durante 8 minutos en HCl 1N (precalentado a 60°C por al menos una hora).
3. Sumergir el portaobjetos en reactivo de Schiff por dos horas a temperatura ambiente en un recipiente oscuro,
4. Lavar en agua corriente durante 10 minutos.
5. Contrastar con unas gotas sobre la muestra de verde rápido durante 10 segundos.
6. Lavar por dos a tres sumergimientos rápidos.
7. Deshidratar y montar para poder observarlas en el microscopio.

### Resultados:

- Rojo violeta: Marcador de ADN
- Verde: Otros elementos del tejido.

## Referencias.

1. Abell, A. J. (1998). Reproductive and post-reproductive hormone levels in the lizard *Sceloporus virgatus*. *Acta Zoologica Mexicana* 74: 43–57.
2. Aizawa, Y. e Ishii, S. (2003). Cloning of complimentary deoxyribonucleic acid encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone beta subunit precursor molecules in Reeves's turtle (*Geoclemys reevesii*) and Japanese grass lizard (*Takydromus tachydromoides*). *General and Comparative Endocrinology* 132: 465-473.
3. Amey, A. P. y Whittier, J. M. (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.
4. Attia, K. A., Zaki, A. A., Eilts, B. E., Paccamonti, D. L., Hosgood, G., Dietrich, M. A., Horohov, D. W. y Blouin, D. C. (1999). Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. *Theriogenology* 53: 1355-1363.
5. Bartholomew, G. A. (1953). The Modification by Temperature of the Photoperiodic Control of Gonadal Development in the Lizard *Xantusia vigilis*. *Copeia* 1: 45.
6. Bradshaw, S. D., Saint-Girons, H. y Bradshaw, F. J. (1991). Patterns of Breeding in Two Species of Agamid Lizards in the Arid Subtropical Pilbara Region of Western Australia. *General and Comparative Endocrinology* 82 : 407-427.
7. Boretto, J. M., Ibarquengoitia, N. R., Jahn, G. A., Acosta, J. C., Vincenti, A. E. y Fornes, M. W. (2010). Asynchronic steroid activity of Leydig and Sertoli cells related to spermatogenesis and testosterone cycle in *Phymaturus antofagensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 166: 556-564.

8. Bourne, A. R., Taylor, J. L. y Watson, T. G. (1986). Effect of temperature on the seasonal production of testicular androgens, in vitro, by the lizard *Tiliqua rugosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85: 527-530.
9. Bourne, A. R. y Seamark, R. F. (1975). Seasonal changes in 17 $\beta$ hydroxysteroids in the plasma of a male lizard *Tiliqua rugosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 50: 535-536.
10. Carreau, S., Bouraima- Lelong, H. y Delalande, C. (2012). Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Advances in Medical Sciences* · 57: 31-36.
11. Cedillo, A. O., Rivas, S. M. y Rodríguez, C. F. (2007). El área natural protegida sujeta a protección ecológica Sierra de Guadalupe. *Revista Sistemas Ambientales* 1: 1-14.
12. CONABIO (2006). Consultado en línea el 21 de Enero de 2017. [http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/scel\\_torqgw.xml?\\_http\\_cache=yes&\\_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc\\_html.xsl&\\_indent=no](http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/scel_torqgw.xml?_http_cache=yes&_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc_html.xsl&_indent=no).
13. Desantis, S., Labate, M. y Corriero, A. (1998). Immunohistochemical localization of FSH and LH in the pituitary of male ruin lizards (*Podarcis sicula*) campestris de Betta. *Journal of Histochemistry* 42: 77-84.
14. Dixon, J. R. y Lemos-Espinal, J. A. (2010). Anfibios y reptiles del Estado de Querétaro, México. Universidad de Texas y Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico, pp 65-79.
15. Dufaure, J. P., Courty, Y., Depeige, A., Mesure, M. y Chevalier, M. (1986). Evolution and Testosterone Content of the Epididymis during the annual cycle of the lizard *Lacerta vivipara*. *Biology of Reproduction* 35: 667-675.
16. Feria-Ortiz, M. (1986). Contribución al conocimiento del ciclo de vida de *Sceloporus torquatus torquatus* (Lacertilia, Iguanidae) al sur del Valle de Mexico. UNAM Tesis de Licenciatura pp 15-18.
17. Feria-Ortiz, M., Nieto-Montes de Oca, A. y Salgado, U. I. (2001). Diet and Reproductive Biology of the Viviparous Lizard *Sceloporus torquatus*

- torquatus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Journal of Herpetology* 33:101-112.
18. Ferreira, A. y Dolder, H. (2003). Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochemica* 105: 339-352.
19. Ferreira, A., Silva, D. N., Van, S. M. y Dolder, H. (2009). Seasonal changes in testicular and epididymal histology of the tropical lizard, *Tropidurus itambere* (Rodrigues, 1987) during its reproductive cycle. *Brazilian Journal of Biology* 69: 429-435.
20. Fontanillas, P. J., García, A. C., De Gaspar, S. I., García, C. I. y De Vicente, R. M. (2000). Los Reptiles: Biología, comportamiento y patología, Ediciones Mundi-Prensa, España, pp 46-48 y 74-78.
21. Gartrell, B. D. (2002). Assesment of the Reproductive state in male Swift parrots (*Lathamus discolor*) by testicular aspiration and Cytology. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 16: 211-217.
22. Gautam, M., Mathur, A., Meraj, A. K., Subeer, S. M. y Umesh, R. (2013). Transcriptome Analysis of Spermatogenically Regressed, Recrudescent and Active Phase Testis of Seasonally breeding Wall Lizards *Hemidactylus flaviviridis*. *PLOS ONE* 8: 1-16.
23. Gribbins, M. K., Anzalone, M., Collier, M., Granados-González, G., Villagrán-Santa Cruz, M. y Hernández-Gallegos, O. (2011). Temporal germ cell development strategy during continuous spermatogenesis within the montane lizard, *Sceloporus bicanthalis* (Squamata; Phrynosomatidae). *Theriogenology* 76: 1090-1099.
24. Gribbins, M. K. (2011). Reptilian spermatogenesis: A histological and ultrastructural perspective. *Spermatogenesis* 1: 250-269.
25. Guillete, L. J. y Méndez de la Cruz, F. R. (1993). The Reproductive Cycle of the Viviparous Mexican Lizard *Sceloporus torquatus*. *Journal of Herpetology* 27:169-174.

26. Guillete, L. J. y Casas-Andreu, G. (1987). The reproductive biology of the high elevation mexican lizard *Barisia imbricata*. *Herpetologia* 43 : 29-38.
27. Hänse, M., Schmidt, V., Schneider, S., Della Volpe, A., Krautwald-Junghanns, M. E. (2008). Comparative Examination of Testicular Biopsy Samples and Influence on Semen Characteristics in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 22: 300-309.
28. Hänse, M., Krautwald-Junghanns, M. E., Reitemeier, S., Einspanier, A. y Schmidt, V. (2013). Testicular biopsy in Psittacine Birds (Psittaciformes): Comparative Evaluation of Testicular Reproductive Status by Endoscopic, Histologic, and Cytologic Examination. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 27: 247-257.
29. Hernández-Gallegos, O., Méndez-de la Cruz, F. R., Villagran-Santa Cruz, M., Rheubert, J. L., Granados-Gonzalez, G. y Gribbins, K. M. (2014). Seasonal spermatogenesis in the Mexican endemic oviparous lizard, *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Spermatogenesis* 4:3.
30. Khan, U. W. y Rai, U. (2004). In vitro effect of FSH and testosterone on Sertoli cell nursing function in wall lizard *Hemidactylus flaviviridis* (Rüppell). *General and Comparative Endocrinology* 136: 225-231.
31. Khan, U. W. y Rai, U. (2008). Role of gonadotropin and Leydig cell-secreted factors in the control of testicular macrophage activities in the wall lizard *Hemidactylus flaviviridis*. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 348-355.
32. Licht, P. (1971). Regulation of the Annual Testis Cycle by Photoperiod and Temperature in the Lizard *Anolis carolinensis*. *Ecological Society of America* 52: 240-252.
33. Licht, P. (1973). Environmental influences on the testis cycles of the lizards *Dipsosaurus dorsalis* and *Xantusia vigilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 45: 7-20.

34. Licht, P. (1973). Influence of Temperature and Photoperiod on the Annual Ovarian Cycle in the Lizard *Anolis carolinensis*. *Journal of Herpetology* 1: 465-472.
35. Lopate, C., Threlfall, W. R. y Rosol, T. J. (1989). Histopathologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. *Theriogenology*, 32: 585-602.
36. Lovern, M. B., McNabb, F. M. y Jenssen, T. A. (2001). Developmental Effects of Testosterone on Behavior in Male and Female Green Anoles (*Anolis carolinensis*). *Hormones and Behavior* 39: 131-143.
37. Mader, D. R. (1996). Reptile Medicine and Surgery. Saunders Company. United States of America, pp 47-61 y 212- 224.
38. Martínez-Torres, M. (1997). Placentación y participación del cuerpo lúteo en el mantenimiento de la gestación de *Barisia imbricata imbricata*- una perspectiva evolutiva. (Reptilia: Anguidae). Tesis de Maestría Universidad Nacional Autónoma de México.
39. Martínez-Torres, M., Hernández-Caballero, M. E., Álvarez-Rodríguez, C., Luis-Díaz, J. A. y Ortiz-López, G. (2003). Luteal development and progesterone levels during pregnancy of the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae). *General and Comparative Endocrinology* 132 : 55–65.
40. Martínez-Torres M. (2009). Almacenamiento de espermatozoides en la vagina de la lagartija vivípara *Sceloporus torquatus* (Sauria: Phrynosomatidae). *Acta Zoológica Mexicana* 25: 497-506.
41. Martínez-Torres, M., Hernández-Caballero, M. E., Luis-Díaz, J. A., Ortiz-López, G., Cárdenas-León, M. y Moreno-Fierros, L. (2010). Effects of lutectomy in early pregnancy on the maintenance of gestation and plasma progesterone concentrations in the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8:19-27.
42. Martínez-Torres M., Pérez-Armendariz, M., Hernández-Caballero, M. E., Luis-Díaz, J. A., Ortiz-López G. (2012). Histochemical activity of 5-4-

isomerase-3-B hydroxy steroid dehydrogenase in the ovary of the viviparous mexican lizard *Sceloporus mucronatus* (Reptilia: Phrynosomatidae) and interrelationship with progesterone levels during pregnancy. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 1:1-5.

43. Martínez-Torres, M., Salcedo-Álvarez, M., Álvarez-Rodríguez, C., Cárdenas-León, M., Luis-Díaz, J. A. y Moreno-Fierros, L. (2014). Does the conceptus of the viviparous lizard *Barisia imbricata imbricata* participates in the regulation of progesterone production and the control of luteolysis? *Animal Reproduction Science* 148: 212-220.
44. Martínez-Torres, M., Rubio-Morales, B., Piña Amado, J. J. y Luis-Díaz, A. J. (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.
45. Martínez-Torres, M. y Sánchez-Cruz, S. Colección y evaluación de las características básicas del semen de *Sceloporus torquatus* (SQUAMATA: PRHYNOSOMATIDAE). 6° Congreso Internacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia Aplicada a Reptiles y Anfibios. Puebla, México, 28 de septiembre al 1 de octubre del 2017.
46. Minucci, S., Vitiello, Il., Marmorino, C., Di Matteo, L. y Chieffi, B. (1995). Mast cell-Leydig cell relationships in the testis of the lizard *Podarcis s. sicula* Raf: thermal manipulation, ethane 1, 2-dimethane sulphonate (EDS) and sex hormone treatment. *Zygote* 3: 259-264.
47. Norris, D. O. y Lopez, K. H. (2013). Hormones and reproduction of vertebrates. Volume 3: Reptiles. Academic Press. Elsevier. United States of America 63-85 y 321-344.
48. Paz, R. C., Leme, D. P., Zuge, R. M., Pessuti, C., Santos, E. F. y Barnabe, R. C. (2003). Testicular fine needle aspiration cytology as a diagnostic tool in jaguar (*Panthera onca*) infertility. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 40: 100-107.

49. Pereira, D. y Ozanam, F. (2010). How to perform and interpret testicular fine needle aspiration in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* 30: 590-596.
50. Rahmstorf, S., y Coumou, D. (2011). Increase of extreme events in a warming world. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 17905-17909.
51. Reptile-database (2016). Consultado en línea el 21 de Enero de 2017. <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>.
52. Rheubert, J. L., McHugh, H. H., Collier, M. H., Sever, D. M., y Gribbins, K. M. (2009). Temporal germ cell development strategy during spermatogenesis within the testis of the Ground Skink, *Scincella lateralis* (Sauria: Scincidae). *Theriology* 72: 54-61.
53. Rheubert, J. L., Siegel, D. S. y Trauth, SE (2014). *Reproductive Biology and Phylogeny of Lizards and Tuatara*. CRC Press. United States of America, pp 254-298.
54. Rheubert, J. L., Touzinsky, K., Sever, D. M., Aldridge, R. D., Wilmes, A. J., Siegel, D. S. y Gribbins, K. M. (2014). Reproductive biology of *Sceloporus consobrinus* (Phrynosomatidae): Male Germ cell development and Reproductive cycle comparisons within spiny lizards. *Journal of Herpetology* 48: 162-171.
55. Sanz, A. O. (2000). Ciclos reproductivos en Reptiles (Genero *Anolis*). *Revista de Biología* 14: 98-107.
56. Santos, M., Marcos, R. y Caniatti, M. (2009). Cytologic study of normal canine testis. *Theriogenology* 73: 208- 214.
57. Sartori, R., Prestes, N. C., Canavessi, A. M., Kempinas, W. G. y Rosa, G. J. (2002). Avaliações ultra-sonográfica, macroscópica e histológica da biopsia testicular em ovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 54: 233-241

58. Schildger, B. J., Kramer, M., Spörle, H., Gerwing, M. y Wicker, R. (1993). Vergleichende bildgebende Ovardiagnostik bei Echsen am Beispiel des Chuckwallas (*Sauromalus obesus*) und des Arguswarans (*Varanus Panoptes*). *Bonn* 25: 240-247.
59. Sun, B. J., Du, W. G., Shu, L., Chen, Y. y Wang, Y. (2011). The influence of thermal environment and food availability on testosterone and gonadal recrudescence in male Chinese skinks [*Plestiodon (Eumeces) chinensis*] *General and Comparative Endocrinology* 170: 449-454.
60. Tsutsui, K., Bentley, J. E., Bedecarrats, G., Osugi, T., Ubuka, T. y Kriegsfeld, L. J. (2010). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31: 284-295.
61. Underwood, H. y Hall, D. (1982). Photoperiodic control of reproduction in the male lizard *Anolis carolinensis*. *Journal of Comparative Physiology* 1: 146-148.
62. Valencia, L. E., Castro, F. R. y Bustos, Z. M. (2014). Dimorfismo sexual y ciclo reproductor de *Sceloporus horridus horridus* (Wiegmann 1939) (Sauria: Phrynosomatidae). *Acta Zoológica Mexicana* 30: 91-105.
63. Van, W. J. (1995). The male reproductive cycle of the lizard *Cordylus giganteus* (Sauria: Cordylidae). *Journal of Herpetology* 29: 522-535.
64. Vázquez, G. S. (2008). Algunas características ecológicas y reproductivas de la lagartija de collar *Sceloporus torquatus torquatus* Weigmann 1828 (Squamata: Phrynosomatidae) en la Sierra de Tepetzotlán, Estado de México. Tesis de Licenciatura FES Iztacala UNAM, México.
65. Vieira, G. H., Wiederhecker, H. C., Colli, G. R. y Bão, S. N. (2001). Spermogenesis and testicular cycle of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae) in the Cerrado of central Brazil. *Amphibia-Reptilia* 22: 217-233.

66. Villagrán-Santa Cruz, M., Hernández-Gallegos, O. y Méndez-de la Cruz, F. R. (2009). Reproductive cycle of the lizard *Sceloporus mucronatus* with comments on intraspecific geographic variation. *Western North American Naturalist* 69: 437-446.
67. Vitt, I. J. y Cadwell, J. P. (2014). *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 4th Edition, Elsevier, United Kingdom, pp 3-81.
68. Wapstra, E., Uller, T., Sinn, D. L., Olsson, M., Mazurek, K., Joss, J. y Shine, R. (2009). Climate effects on offspring sex ratio in a viviparous lizard. *Journal of Animal Ecology* 78: 84-90.