



Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**RECEPTORES A ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN
ESPERMATOZOIDES SOMETIDOS A CAPACITACIÓN DE
Sceloporus torquatus y *Sceloporus aeneus* (REPTILIA:
PHRYNOSOMATIDAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

YOLE AMATISTA ADORNI QUINTANA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARTÍN MARTÍNEZ TORRES



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

En otra línea temporal, en un mundo menos antropocéntrico, todos llegaremos a caber

Dedicatoria

Dedico esta tesis con todo mi corazón a mi madre, Carmen, por haber sido y siempre ser mi ejemplo a seguir. Por apoyarme, incentivar y guiarme con todo el amor y cariño que siempre me ha profesado. Te amo, admiro y respeto, mami. Mis logros eternamente serán tuyos.

A mi padre, por vivir en mi memoria y dejarme las enseñanzas y bases necesarias para ser la persona que soy hoy.

A Milena, por su cariño, compañía, apoyo, confidencialidad y eterna disposición para escucharme.

A Juan José, por su profundo amor, cariño, paciencia, respeto e interés en mi profesión. Por su constante apoyo emocional y por tantos cafés y snacks que preparó y cuidadosamente posicionó cerca de mí durante la redacción de este escrito.

Finalmente, ellos no lo sabrán, pero dedico esta tesis a mis eternos bebés, Sherlock, Don Luis y Sor Juana, por su incomparable fidelidad, comprensión y sacrificio. Por acompañarme desde la comodidad de mis piernas y por regalarme un acuerdo tácito de lealtad e indescriptible amor.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi asesor de tesis y mentor, el Dr. Martín Martínez Torres, por su guía y apoyo durante todo el proceso de investigación. Su amplio conocimiento y experiencia en biología de la reproducción fueron fundamentales para la realización de este trabajo. Lo admiro mucho a usted y a la línea de investigación de quien es pionero.

A la M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez, por su infinita paciencia. La disposición y cariño con que enseña es absolutamente admirable. Por los chismes, risas y acompañamiento durante los experimentos. Por su compañía y apoyo en las prácticas y congresos. No tengo forma de retribuir tanto.

Al M. en C. Yabín Castro Camacho, por el cálido acogimiento que me brindó desde que llegué al laboratorio. Por su nobleza para ayudarme y asesorarme siempre que se lo pedí. Gracias por tantas pláticas tan amenas y la confianza depositada en mí.

Al Dr. Uriel Ángel Sánchez Rivera y a la Dra. Norma Berenice Cruz Cano, por su disposición, asesoría y por hacer que el ambiente de trabajo fuera tan amigable y enriquecedor. Por forjar, junto con todos en el laboratorio, un camino a seguir.

A todos mis asesores de tesis y al M. en C. Felipe Correa Sánchez, por aportar su invaluable conocimiento a mi tema de investigación.

Al proyecto UNAM-PAPIIT: IN217722 por la financiación de este proyecto.

A Alexandra Elbakyan porque “el conocimiento es un derecho humano”.

A mi segunda casa, la UNAM, por brindarme la oportunidad de estudiar Biología y por ofrecer los recursos necesarios para la realización de esta investigación. Estoy agradecida por los conocimientos y habilidades que adquirí durante mi carrera.

A los saurios utilizados en este estudio por su contribución a la ciencia. Espero que este trabajo ayude a comprender mejor la reproducción en estas especies y a promover su conservación.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco con cada célula de mi cuerpo a mi poderosísima Biología por regalarme ojos. Por tomar mis metafóricos ocelos y modificarlos lo suficiente para permitirme un ínfimo pero trascendental entendimiento del mundo.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
1. Reproducción	2
2. Reproducción en reptiles	3
2.1 Reproducción en ovíparos	3
2.2 Reproducción en vivíparos	4
3. Reproducción en saurios	5
3.1 Ciclos reproductivos	6
3.1.1 Ciclos continuos y estacionales	6
3.1.2 Ciclos reproductivos sincrónicos y asincrónicos	6
3.2 Morfología espermática en saurios	7
3.3 Calidad espermática	9
3.4 Almacenamiento de espermatozoides	10
4. Capacitación espermática	10
5. Factores de regulación espermática en el plasma seminal	11
6. Factores de regulación espermática en el tracto reproductor femenino	12
7. Esteroides sexuales	13
7.1 Estradiol	14
7.2 Progesterona	15
8. Receptores a esteroides	15
8.1 Receptor a estradiol	16
8.2 Receptor a progesterona	18
9. Mecanismos de acción genómicos y no genómicos de las hormonas esteroides	18
10. Esteroides sexuales y su participación en la capacitación espermática	20
10.1 Estradiol	20
10.2 Progesterona	21
11. Características generales de <i>S. torquatus</i> y <i>S. aeneus</i> y biología reproductiva	22
Antecedentes	24
1. Receptores a estradiol y progesterona en los espermatozoides	24
2. Capacitación en reptiles	25

Justificación	26
Objetivos	27
1. General	27
2. Particulares	27
Materiales y métodos	27
1. Áreas de colecta.....	27
1.1 Parque Estatal Sierra de Guadalupe.....	27
1.2 Tlazala de Fabela, Estado de México	28
2. Colecta y mantenimiento de organismos	29
3. Manejo de muestras.....	30
3.1 Obtención del semen	30
3.2 Tratamiento del semen	32
4. Determinación de la presencia de R α E y RP ₄	33
5. Análisis estadístico.....	34
Resultados	35
1. Características morfométricas de los organismos.....	35
2. Características del semen	35
3. Receptores en espermatozoides de <i>S. torquatus</i>	36
3.1 Presencia y ubicación de R α -E ₂ y R-P ₄	36
3.2 Espermatozoides con R α -E ₂ y R-P ₄ en función del medio de incubación	38
4. Receptores en espermatozoides de <i>S. aeneus</i>	40
4.1 Presencia y ubicación de R α -E ₂ y R-P ₄	40
4.2 Espermatozoides con R α -E ₂ y R-P ₄ en función del medio de incubación	41
Discusión	44
1. Características del semen	44
2. Localización de R α -E ₂ y R-P ₄	45
3. Regulación de la actividad espermática.....	46
4. R α -E ₂ y R-P ₄ en función del medio de incubación	48
Conclusiones	50
Referencias	50

Resumen

En los mamíferos, el estradiol (E_2) y la progesterona (P_4) regulan la hiperactividad y la reacción acrosomal del espermatozoide durante la capacitación. En los reptiles, esta regulación hormonal no ha sido estudiada, sin embargo, recientemente se observó que los espermatozoides de *Sceloporus torquatus* y *S. aeneus* presentan patrones similares a los que se encuentran en los mamíferos en el ensayo de clortetraciclina, sugiriendo que en saurios hay capacitación. En este estudio se muestra la presencia de receptores alfa a estradiol ($R\alpha-E_2$) y receptores a progesterona ($R-P_4$) en espermatozoides frescos e incubados en un medio capacitante de las especies *S. torquatus* y *S. aeneus*. Se obtuvo el eyaculado de cuatro machos de cada especie por opresión de la papila genital. De la muestra de semen obtenida de cada macho se elaboró una solución madre de espermatozoides (SME), donde el eyaculado fue disuelto en 100 μ l de PBS (28°C, pH 7.4). De la SME se tomó una alícuota de 30 μ l para ser utilizado como control antes de la incubación (CT-0). Dos alícuotas del mismo volumen se incubaron a 30°C durante tres horas, una en medio capacitante (Tyrode-PLG) (E-T3h) y la otra en PBS (C-T3h). Los diez microlitros restantes se utilizaron para determinar la concentración de espermatozoides de cada macho. Se determinó la presencia de $R\alpha-E_2$ usando un anticuerpo policlonal de conejo (PAS-16440, Invitrogen) y de $R-P_4$ (PAS-94983, Invitrogen) en frotis. Se encontró que los espermatozoides de ambas especies mostraron receptores en la región acrosomal y en la pieza media. En ambas especies, la incubación en el medio capacitante incrementó significativamente el número de espermatozoides con receptores a ambas hormonas en la pieza media. En cambio, la cantidad de espermatozoides con receptores en el acrosoma no presentó diferencias significativas entre tratamientos. Estas observaciones sugieren que la P_4 y el E_2 podrían estar participando, como en los mamíferos, en la regulación de la movilidad espermática y la inducción de la reacción acrosomal.

Palabras clave: capacitación espermática, esteroide sexual, inmunocitoquímica, *Sceloporus*, saurio.

Introducción

1. Reproducción

La reproducción es un proceso biológico mediante el cual un organismo unicelular o pluricelular da origen a un nuevo individuo. Este proceso ocurre en todos los seres vivos y es fundamental para la preservación y evolución de las especies (Vitt y Caldwell, 2013). En los vertebrados existen dos tipos de reproducción: la asexual y la sexual. La reproducción asexual se caracteriza por no presentar intercambio genético y se presenta en aproximadamente 100 especies de vertebrados (Manríquez-Morán, 2014), entre los cuales se encuentran algunas especies de peces, anfibios y reptiles. En el orden Squamata existen alrededor de 40 especies de lagartijas que se reproducen asexualmente mediante partenogénesis (Manríquez-Morán, 2014). La partenogénesis puede ser obligada, es decir, donde los gametos no presentan reducción en la ploidía y originan organismos idénticos a la madre (Cuellar, 1987), lo cual origina especies constituidas exclusivamente por hembras. Por otra parte, la partenogénesis facultativa puede dar origen a descendientes machos y las hembras recurren a este recurso cuando el ambiente no es favorable o hay ausencia de machos para la reproducción sexual. Este tipo de reproducción se ha observado en hembras de diversas especies de lagartijas (*Varanus komodoensis*, *V. panoptes*, *V. ornatus*) y serpientes (*Python molurus*, *Thamnophis elegans*, *T. marcianus*, *Crotalus horridus*, *C. unicolor* y *Acrochordus arafurae*) (Manríquez-Morán, 2014).

La reproducción sexual, en cambio, es un proceso por el cual dos células altamente especializadas (gametos) de distintos progenitores se fusionan en un proceso llamado fecundación para dar origen a un nuevo individuo, con un genoma diferente al de los progenitores. Durante la reproducción sexual aumenta la variabilidad genética de los descendientes (Nelson *et al.*, 1973). Este tipo de reproducción es la más común en los vertebrados.

2. Reproducción en reptiles

Los reptiles son vertebrados ectotérmicos cuya principal característica es la presencia de escamas córneas que protegen su cuerpo de la desecación (Luna-Reyes *et al.*, 2013). La reproducción puede ser sexual o asexual (Halliday y Adler, 2007) dependiendo de la especie y existen reptiles tanto ovíparos como vivíparos.

2.1 Reproducción en ovíparos

Esta modalidad de reproducción en los reptiles está dada por el desarrollo de los embriones en un huevo amniótico, el cual es depositado en un medio externo (Villagrán-Santa Cruz, 1993). El huevo amniótico está caracterizado por la presencia de cuatro membranas fetales: amnios, corion, alantoides y saco vitelino (Colbert, 1980) (Fig. 1).

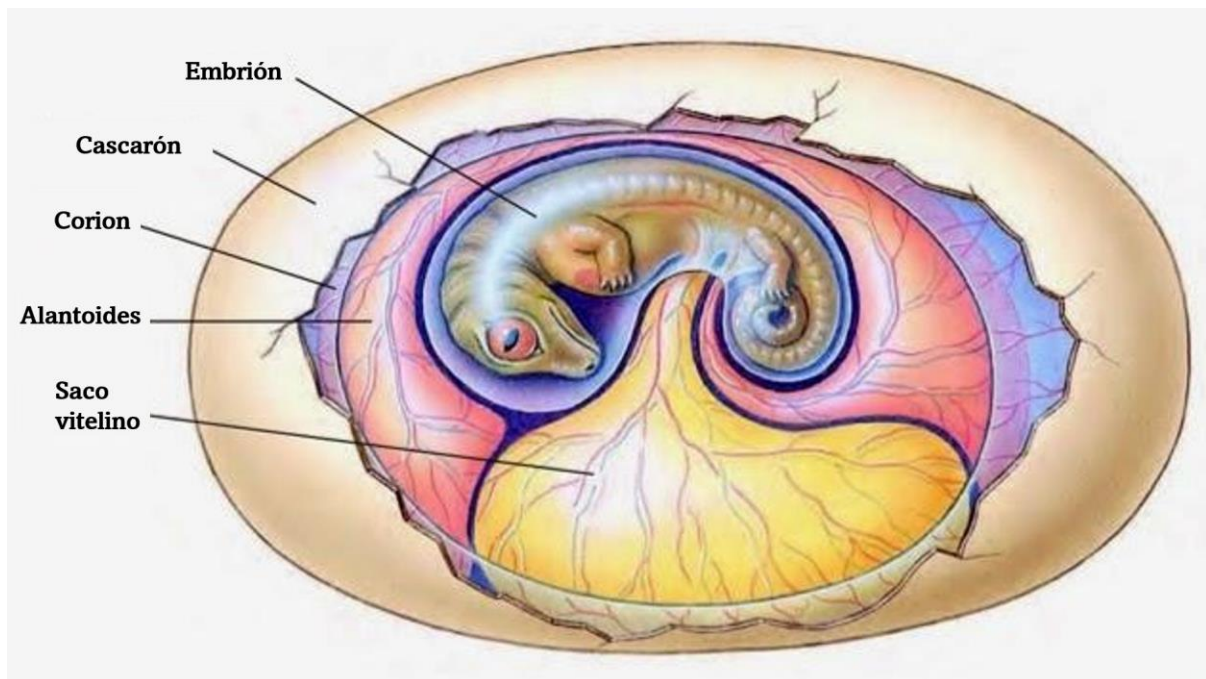


Figura 1. Membranas embrionarias de un huevo amniótico de reptil. (Imagen de autor desconocido, modificado de Hernández-Barreña, 2017).

El saco vitelino proporciona al embrión los nutrientes necesarios para su desarrollo. El alantoides junto con el corion tienen la función de eliminar los desechos nitrogenados producidos por el metabolismo celular embrionario, así como proveer oxígeno. La membrana amniótica surge a consecuencia del desarrollo del corion

(Villagrán-Santa Cruz, 1993). Su interior está lleno de líquido amniótico que le confiere al embrión protección mecánica y contra la desecación (Villagrán-Santa Cruz, 1993).

La mayoría de los reptiles del orden Squamata presentan este tipo de reproducción (Crocco *et al.*, 2008) aunque algunas especies que habitan ambientes templados de montaña o elevadas altitudes presentan retención de huevos en el oviducto de la hembra debido a restricciones ambientales como bajas temperaturas o alta mortalidad de las crías (Ramírez-Bautista *et al.*, 2021), como es el caso de *Sceloporus aeneus* (Andrews, 1997).

2.2 Reproducción en vivíparos

La reproducción vivípara en el orden Squamata ha evolucionado más de 115 veces de manera independiente (Whittington, 2021). El género *Sceloporus* está compuesto por alrededor de 110 especies y aproximadamente 30 son vivíparas (Sites *et al.*, 1992). Este modo reproductivo está asociado con la gestación durante el invierno en altitudes altas o climas templados (Guillette *et al.*, 1980).

Las hembras desarrollan placenta para permitir el intercambio fisiológico para que concluya la gestación del embrión. El intercambio gaseoso (O₂ y CO₂) es el propósito principal de este órgano, así como el intercambio de nutrientes (glucosa, aminoácidos, electrolitos, etc.) (Roa *et al.*, 2012). La placenta puede originarse por la fusión del corion con el alantoides (placenta corioalantoidea) o con el saco vitelino (placenta coriovitelina). A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, en los que la membrana coriovitelina es por lo general vascularizada, en los reptiles se forma una onfalopleura bilaminar por fusión de los epitelios del trofoectodermo y del saco vitelino, sin que se interponga una capa de mesodermo vascularizado entre ellos (Barbeito, 2008) (Fig. 2). La hendidura vitelina y la masa vitelina aislada que se presentan en Squamata son únicas entre los amniotas (Crocco *et al.*, 2008).

SACO VITELINO

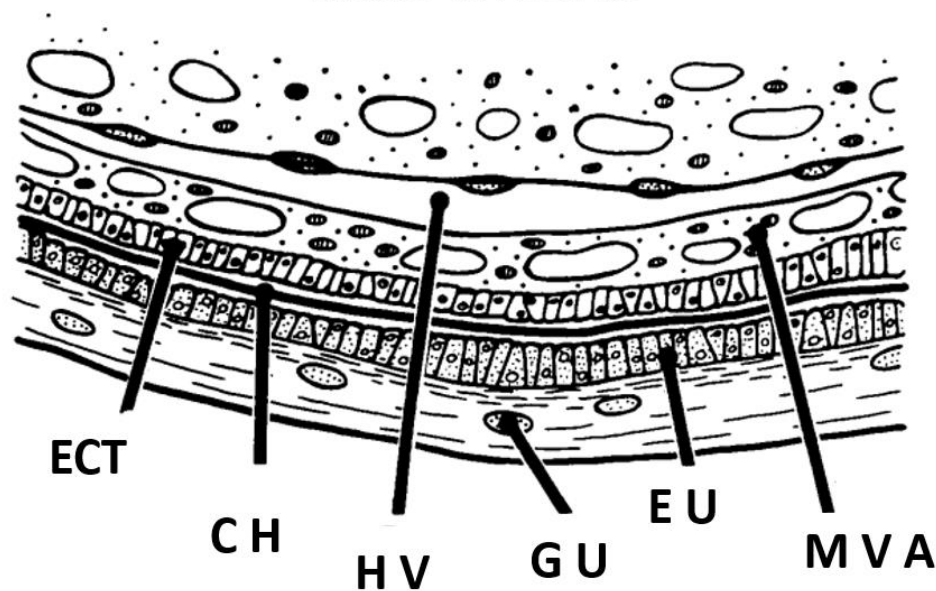


Figura 2. Onfaloplacenta de la lagartija vivípara *Eulamprus* sp. (modificado de Stewart y Thompson, 2000). ECT. Ectodermo de la onfaloplacenta bilaminar, CH. Cubierta del huevo, GU. Glándula uterina, MVA. Masa vitelina aislada, EU. Epitelio uterino, HV. Hendidura vitelina.

3. Reproducción en saurios

Los saurios están comprendidos dentro de 43 familias del orden Squamata (Vitt y Cadwell, 2013). Su reproducción es mayoritariamente sexual, aunque existen especies partenogenéticas obligadas como es el caso de lagartijas del género *Lepidophyma* (Sinclair *et al.*, 2009) y especies partenogenéticas facultativas (*Varanus komodoensis*, *V. panoptes*, *V. ornatus*) (Manríquez-Morán, 2014).

Los lacertilios pueden ser ovíparos o vivíparos y algunas especies de la familia Anguidae (Martínez-Torres, 1997) y Scincidae (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014) presentan algún tipo de placentación. Muchas de las especies tienen una época reproductiva concreta, la cual puede desencadenarse a partir de algún estímulo ambiental como la temperatura o humedad, sin embargo, la temporada de reproducción es variable dependiendo de las especies (Ibargüengoytía, 2008).

3.1 Ciclos reproductivos

El éxito reproductivo de las especies de reptiles requiere de la coordinación de señales externas (ambientales: la temperatura, el fotoperiodo y la precipitación) y procesos internos (producción y liberación de hormonas: gonadotropinas, esteroides sexuales) (Hill *et al.*, 2006). Por ello, las especies han generado distintas estrategias reproductivas, lo que ha culminado en distintos tipos de ciclos reproductivos: continuos y estacionales, sincrónicos y asincrónicos.

3.1.1 Ciclos continuos y estacionales

Los ciclos reproductivos continuos suponen la cópula y reproducción regular entre los individuos durante todo el año debido a que existe formación y maduración de gametos en la población durante todos los meses. En cambio, los ciclos reproductivos estacionales se caracterizan por periodos concretos de cortejo y apareamiento debido a que el periodo de actividad gonadal tanto en machos como en hembras no es constante, es decir, hay periodos de inactividad (Ibargüengoytía, 2008).

La mayoría de las especies de reptiles tropicales presentan el ciclo reproductivo continuo, debido a poca variación estacional en el ambiente. Este es el caso de *Cosymbotus platyurus*, *Hemidactylus frenatus*, *Peropus mutilatus*, *Phyllodactylus tuberculatus* y *Anolis trinitatus* (Lagunas-Cortés, 2014). En cambio, muchas especies de climas templados presentan ciclos reproductivos estacionales. La mayoría de las especies del género *Sceloporus* presentan este ciclo (Gadsden *et al.*, 2005).

3.1.2 Ciclos reproductivos sincrónicos y asincrónicos

Dentro de los ciclos reproductivos estacionales puede haber dos patrones: sincrónicos y asincrónicos. Los ciclos reproductivos sincrónicos se caracterizan porque la espermiogénesis y ovulación ocurren en la misma temporada en que se presenta el apareamiento. En cambio, en los asincrónicos, la actividad gonadal del macho comienza en determinada estación del año y la presencia de espermatozoides ocurre antes de que la hembra tenga sus gametos maduros. La ovulación sucede después de la cópula, por lo que posterior al apareamiento es necesario un mecanismo de

almacenamiento de los espermatozoides en la hembra para que sean liberados antes de la ovulación (Fig. 3) (Ibargüengoytía, 2008).

En varias especies, los machos exhiben el inicio de la actividad testicular durante la primavera o verano, mientras que las hembras ovulan en otoño (*Sceloporus gramicus*: Guillette y Casas-Andreu, 1980; *S. mucronatus*: Méndez-de la Cruz *et al.*, 1988, *S. palaciosi*: Méndez y Villagrán, 1998).

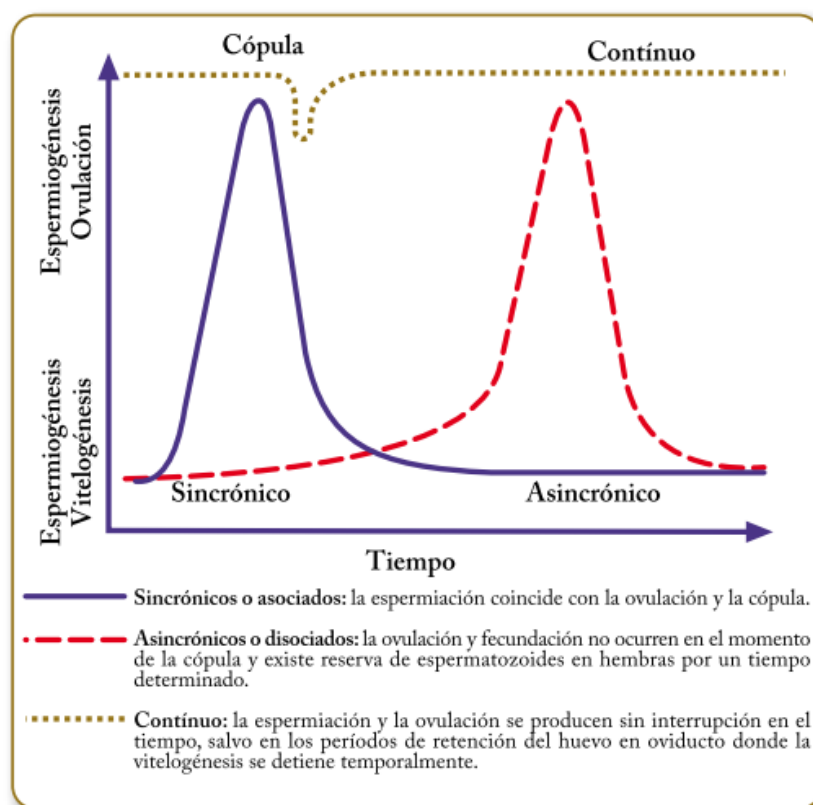


Figura 3. Representación de los ciclos reproductivos sincrónicos y asincrónicos. Esquema tomado de Ibargüengoytía (2008).

3.2 Morfología espermática en saurios

Los espermatozoides de lagartijas tienen una estructura filiforme que se divide en tres regiones: cabeza, pieza media y flagelo. El espermatozoide está cubierto por la membrana espermática, la cual es una estructura heterogénea y dinámica que

presenta cinco dominios diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola (Colli *et al.*, 2007). Además, participa en el reconocimiento y transporte de moléculas (Lenzi *et al.*, 1996). En los mamíferos, la composición de la membrana plasmática del espermatozoide está dada en mayor medida por fosfolípidos y proteínas y presenta canales a cationes (como el Ca^{+2}) específicos de los espermatozoides (canales Catsper). Éstos son activados una vez que están en el tracto reproductor femenino a medida que se acercan a un ambiente alcalino (Qi *et al.*, 2007).

En el 2007, Colli y colaboradores describieron la ultraestructura de los espermatozoides de cinco especies de la familia Teiidae. Señalan que la región de la cabeza está conformada por el acrosoma, que contiene enzimas hidrolíticas, y el núcleo, que guarda el material genético. A su vez, el acrosoma consiste en dos capas: la capa externa o vesícula acrosomal y la capa interna o cono subacrosomal (Fig. 4). La pieza media está constituida del axonema rodeado por la vaina fibrosa, hileras mitocondriales y anillos de cuerpos densos (estructuras anulares). El axonema es el componente axial de la pieza media y flagelo, y está compuesto por un par de microtúbulos centrales (singletes) rodeados por nueve dobletes de microtúbulos, que están rodeadas por nueve fibras densas periféricas.

Finalmente, el flagelo está dividido en pieza principal y pieza final: la primera es la parte más larga del espermatozoide consiste en el axonema rodeado por una vaina fibrosa, citoplasma y membrana plasmática. En esta región, la fibra central, periférica, fibras densas, cuerpos densos y mitocondrias están ausentes. En la pieza final hay un tramo corto de axonema. El patrón 9 + 2 de los microtúbulos del axonema se mantiene inicialmente, aunque su diámetro se reduce. Posteriormente, la disposición de los microtúbulos se vuelve cada vez más interrumpida (Colli *et al.*, 2007).

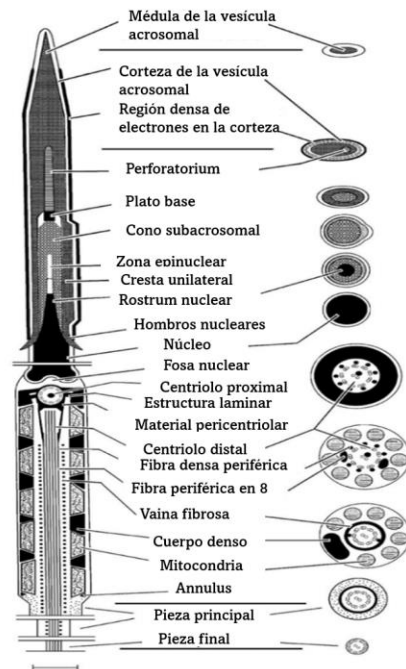


Figura 4. Esquema general de la estructura de los espermatozoides de *Dicrodon guttulatum* y *Teius oculatus*. Tomado de Colli *et al.* (2007).

3.3 Calidad espermática

Los espermatozoides deben tener características óptimas para la correcta interacción con el ovocito. Éstas comprenden lo que se conoce como “calidad espermática”, ya que la calidad de los gametos es un factor determinante para alcanzar el éxito reproductivo. La calidad espermática ha sido estudiada en distintas especies, tanto de fauna silvestre (Ej., guepardo, *Acinonyx jubatus*; Wildt *et al.*, 1983), entre ellas algunos saurios (la lagartija espinosa de collar *Sceloporus torquatus*; Martínez-Torres *et al.*, 2019) como domésticas (Ej., perro, *Canis lupus familiaris*; Carlotto *et al.*, 2011) debido a que permite estimar de manera indirecta la fertilidad potencial de los machos (Sorensen, 1982). Cuando se realiza un análisis seminal, se considera que la viabilidad, la movilidad, la integridad de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma del espermatozoide, son los factores más importantes a evaluar porque tienen una participación fundamental en eventos como la capacitación, la señalización intraespermática, la reacción acrosomal y la interacción con la zona pelúcida del ovocito (Salinas *et al.*, 2014).

Sin embargo, estos parámetros de calidad espermática se pueden ver afectados una vez que los espermatozoides se encuentran en el tracto reproductor de la hembra,

debido al cambio en la temperatura, la acidez y composición molecular del medio externo y el tiempo. Por ello, las especies han generado distintas estrategias reproductivas. Por ejemplo, en reptiles, la concentración de espermatozoides en una muestra de semen (*Iguana iguana*: Zimmerman *et al.*, 2013) es más alta que en algunas especies de mamíferos (*Bos taurus*, *Equus caballus*: Ax *et al.*, 2016). Esto puede deberse a que la alta concentración de espermatozoides compensa los bajos volúmenes de líquido seminal, o bien, a que en los reptiles, los espermatozoides pueden almacenarse en el tracto reproductor de las hembras durante meses o años después de la cópula (Zimmerman *et al.*, 2013).

3.4 Almacenamiento de espermatozoides

En las especies de lagartijas que tienen un ciclo reproductivo asincrónico es fundamental el almacenamiento de espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra, ya que los espermatozoides deben permanecer durante semanas a meses hasta la fecundación. Los espermatozoides pueden ser almacenados en receptáculos seminales ubicados en pliegues de la vagina de la hembra, como es el caso de *Chamaeleo basiliscus*, *C. chamaeleon*, *C. lateralis* (Saint-Girons, 1962) y *Anolis carolinensis* (Conner y Crews, 1980), o bien, pueden estar almacenados en túbulos del infundíbulo (*Plestiodon egregius*: Schafer y Roeding, 1973; *Phyllodactylus homolepidurus*: Cuellar, 1966). En algunas especies de reptiles pueden ser encontrados en ambas ubicaciones (*Calotes versicolor*: Kumari *et al.*, 1990; *Holbrookia elegans*: Cuellar, 1966).

En *S. torquatus* se describió el almacén de espermatozoides en un sistema de túbulos especiales presentes en la vagina durante al menos cinco meses (Martínez-Torres, 2009). Aunque en ese estudio no encontraron receptáculos seminales en el útero e infundíbulo, se observaron espermatozoides libres en estas regiones.

4. Capacitación espermática

Aunque los espermatozoides eyaculados de los mamíferos son células completamente diferenciadas, únicamente son capaces de fertilizar al ovocito después de pasar por un proceso conocido como capacitación espermática (López-Torres y

Chirinos, 2017). Ésta ocurre después de la eyaculación, en el tracto reproductor de la hembra (útero y oviducto) y considera a todos los cambios fisiológicos que experimenta el espermatozoide en el proceso de adquisición de la capacidad para fecundar al ovocito. Esta fase es de suma importancia porque provee al espermatozoide de las cualidades necesarias para realizar la reacción acrosomal y atravesar la zona pelúcida del ovocito (Somanath *et al.*, 2000). Los cambios principales que experimentan los espermatozoides durante la capacitación son: a) la remoción del colesterol de la membrana plasmática por aceptores de colesterol como la albúmina, b) la hiperpolarización de la membrana plasmática y c) el aumento de calcio (Ca^{+2}) intracelular y bicarbonato (HCO_3). Estos eventos inician cascadas de señalización que provocan la producción de AMPc y, por consiguiente, la activación de proteínas cinasas que culminan en la fosforilación de residuos de tirosina, lo cual provoca la hiperactivación de la movilidad del espermatozoide y lo prepara para la reacción acrosomal (Fujinoki *et al.*, 2016).

El inicio y progresión de la capacitación espermática en mamíferos pueden ser regulados por el plasma seminal y por distintos factores oviductales y uterinos, así como esteroides sexuales presentes en el fluido folicular de la hembra (Salazar-Cartín, 2019).

5. Factores de regulación espermática en el plasma seminal

Uno de los componentes más abundantes en el plasma seminal de los mamíferos es el colesterol y es considerado como el principal inhibidor de la capacitación espermática cuando se encuentra en concentraciones altas, sin embargo; también funciona como un promotor de ésta cuando se encuentra en concentraciones bajas (Travis y Kopf, 2002).

Durante la capacitación, la salida de colesterol también induce la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y los canales de ion bicarbonato (Olivera *et al.*, 2006), por ello, se acepta que otro factor regulador son las vesículas seminales ricas en colesterol que almacenan calcio y están presentes en el plasma seminal (Salazar-Cartín, 2019). Se ha demostrado que estas vesículas confieren calcio al citoplasma del espermatozoide mediante fusión con la membrana plasmática. Para

esto es necesario un pH de 5.0-6.0; lo cual es muy similar a la condición del pH de la vagina (pH de 4.5-6.0) en el momento del período periovulatorio (Arienti *et al.*, 2004).

Por otra parte, en el plasma seminal humano también se encuentra un tripéptido semejante a la hormona liberadora de la tirotropina, llamado péptido promotor de la fertilización, el cual estimula la capacitación espermática tras una hora de incubación, aunque no se conoce bien su mecanismo de acción (De Jonge, 2005).

6. Factores de regulación espermática en el tracto reproductor femenino

Los espermatozoides de los mamíferos interactúan con distintos componentes oviductales y uterinos durante el tránsito por el tracto reproductor femenino (Yanagimachi, 1994). Por ejemplo, los espermatozoides tienen una disminución en la concentración de fosfolípidos de membrana y vitamina E después de la migración a través del moco cervical (Feki *et al.*, 2004). La vitamina E evita la lipoxidación por los radicales libres de oxígeno en los espermatozoides (Salazar-Cartín, 2019), lo cual genera daño e, incluso, la muerte celular, principalmente en espermatozoides inmaduros o con anormalidades (Ford, 2004).

Por otra parte, en el útero los espermatozoides continúan teniendo modificaciones en la membrana plasmática, una de ellas es la continua remoción de colesterol (López-Úbeda y Matás, 2015), así como la unión a proteínas ligadoras de ácido siálico (Lu *et al.*, 2006). Estas proteínas promueven la fijación de calcio en el citoplasma de los espermatozoides (Lu *et al.*, 2006), lo cual es un requisito importante en el proceso de capacitación. La síntesis y excreción de éstas es regulada por el estradiol (Sen *et al.*, 2001). En el oviducto, los espermatozoides pierden factores descapacitantes como mucopolisacáridos y proteínas que habían aportado las glándulas anexas del tracto reproductor masculino (Olivera *et al.*, 2006). Además, distintos procesos que ocurren en la capacitación también son mediados por hormonas esteroideas presentes en el aparato reproductor femenino (Astle *et al.*, 2003).

7. Esteroides sexuales

Los esteroides sexuales son estructuras lipídicas sintetizadas a partir del colesterol (Fig. 5) por las gónadas o por las glándulas adrenales y reguladas por el eje hipotálamo-pituitario-gonadal (Hsiao y Gardner, 2019). Su producción está regulada por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) liberada por el hipotálamo, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) producida por el lóbulo anterior de la hipófisis (Marcos-Becerro, 2008). Los esteroides sexuales son llamados hormonas sexuales debido a que son producidos por las gónadas y a su participación en el desarrollo de los órganos y caracteres sexuales (Jameson y Harrison, 2013). Este grupo incluye a los andrógenos, estrógenos y progestágenos (Hsiao y Gardner, 2019).

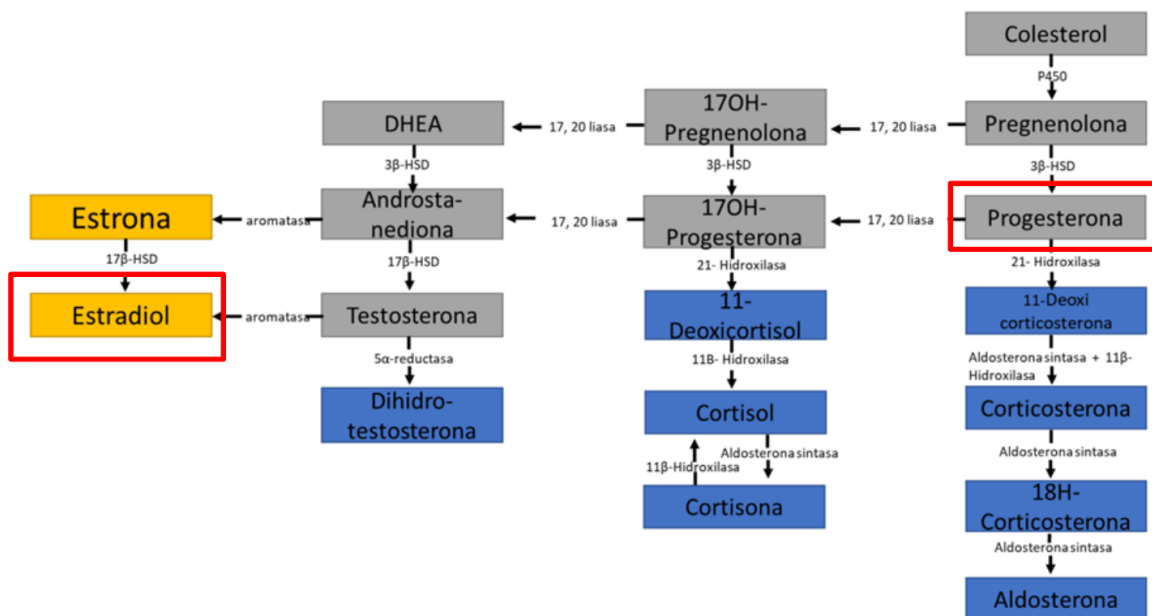


Figura 5. Esquema de la esteroidogénesis. Tomado de Grados-Porro (2019). El estradiol es sintetizado a partir de la testosterona por la enzima aromatasa, o bien en una vía alterna, es sintetizado a partir de la estrona por la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD). La progesterona es sintetizada a partir de la pregnenolona por la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3βHSD).

7.1 Estradiol

El estradiol (E_2 o 17β -estradiol) pertenece al grupo de los estrógenos. Es sintetizado a partir de la testosterona por la enzima aromatasa citocromo P450 (Fig. 5). En su estructura molecular contiene dos grupos hidroxilos (Fig. 6). Esta hormona participa en la diferenciación sexual fenotípica y cerebral, en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y en diversos eventos reproductivos, como la ovulación (Sánchez-Pastrana, 2022).

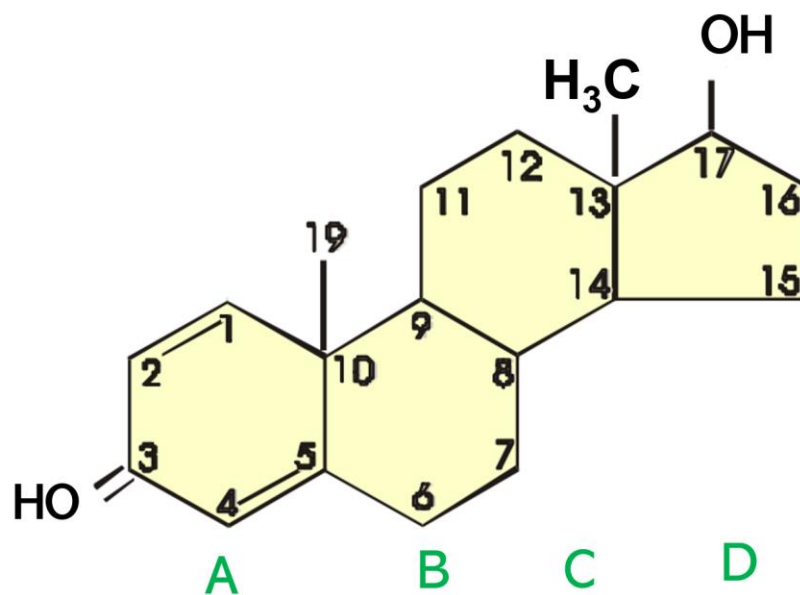


Figura 6. Estructura molecular del estradiol. Molécula formada por tres anillos ciclohexanos (A, B, C) y un anillo ciclopentano (D). El lugar de fijación específica de los receptores estrogénicos es en el carbono 3 del anillo fenólico A. Imagen modificada de Malgor y Valsecia (2013).

En los machos de mamíferos, el estradiol es producido por las células de Sertoli en los testículos y se ha demostrado *in vitro* que la presencia de este esteroide previene e inhibe la apoptosis de los espermatozoides (Pentikäinen *et al.*, 2000). En hembras, el estradiol es sintetizado por las células de la granulosa ovárica (Malgor y Valsecia, 2013).

7.2 Progesterona

La progesterona (P_4 o pregn-4-en-3,20-diona) pertenece al grupo de los progestágenos. Su estructura consiste en cuatro hidrocarburos cíclicos interconectados con grupos funcionales de cetona y oxígeno, como también dos sustituyentes metilo (Fig. 7). Es sintetizada en las gónadas, placenta, corteza adrenal y sistema nervioso central (SNC) a partir de la pregnenolona por la enzima 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Fig. 7) (Bello-Álvarez, 2022). Los tejidos que la sintetizan son principalmente la capa granulosa y los cuerpos lúteos en hembras, así como las células de Leydig en machos (Anawalt y Braunstein, 2019). Esta hormona interviene en la regulación y desarrollo de las funciones reproductivas, así como en la diferenciación sexual y la conducta reproductiva a nivel del SNC (Bello-Álvarez, 2022).

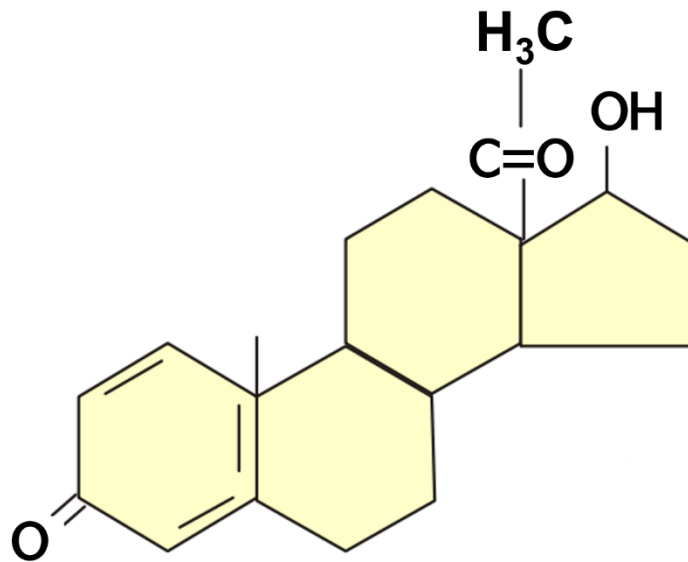


Figura 7. Estructura molecular de la progesterona. Molécula tetracíclica con dos grupos cetonas. Modificado de Malgor y Valsecia (2013).

8. Receptores a esteroides

Las hormonas esteroideas tienen efecto en las células diana mediante la unión a receptores que pueden encontrarse en la membrana plasmática para iniciar procesos de cascadas de señalización o bien, pueden estar ubicados en el núcleo y citoplasma

de la célula (Zheng y Murphy, 2016). Existen receptores nucleares específicos para todos los tipos de esteroides, aunque la mayoría de los receptores a andrógenos y glucocorticoides se encuentran en el citoplasma (Zheng y Murphy, 2016).

Los receptores de hormonas esteroides pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y comparten una estructura similar, que consiste en un dominio carboxi-terminal de unión al ligando, una región bisagra que participa en la unión a la proteína de choque térmico HS90, una región localizada en el centro de la estructura capaz de unir ADN, contiene dos estructuras en forma de dedos de zinc que juega un papel importante en la dimerización del receptor y la unión a secuencias específicas del ADN (Nilsson *et al.*, 2001) y un dominio amino-terminal requerido para la completa actividad transcripcional del receptor. Presentan además dos funciones activadoras de la transcripción (Fig. 8) (Bottino y Lanari, 2010).

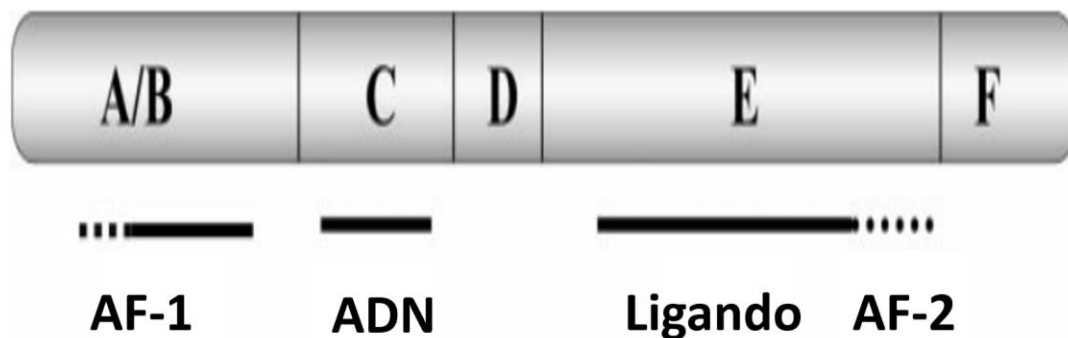


Figura 8. Estructura general de los receptores de hormonas esteroides: dominio amino terminal (A/B), dominio de unión al ADN (C), región bisagra (D), dominio carboxi-terminal de unión al ligando (E/F). AF-1 y AF-2 funciones activadoras. Modificado de Nilsson y colaboradores (2001).

8.1 Receptor a estradiol

Hace algunas décadas se consideraba que un solo receptor de estradiol era el responsable de mediar todos los procesos fisiológicos de estrógenos, tanto naturales como sintéticos (Nilsson *et al.*, 2001). Sin embargo, en 1996 se descubrió un segundo

receptor con varias isoformas al que llamaron receptor a estradiol beta ($R\beta$ -E₂) para diferenciarlo del original, el receptor a estradiol alfa ($R\alpha$ -E₂) (Kuiper *et al.*, 1996).

Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares esteroideos, por lo que comparten una estructura similar (Nilsson *et al.*, 2001) con algunas diferencias. El gen que codifica al $R\alpha$ -E₂ se encuentra en el brazo largo del cromosoma 6 y el gen del $R\beta$ -E₂ en el brazo largo del cromosoma 14, por lo que ambos receptores son producto de genes independientes. La expresión de estos genes determinada por los niveles de ARNm y por su afinidad de unión a ligandos, varía en cada tejido blanco, lo que sugiere que cada receptor tiene un papel biológico distinto (Mosselman *et al.*, 1996).

Comparten una secuencia altamente similar con baja homología en las regiones amino terminal (Fig. 9), por lo que existen diferencias en su respuesta a varios ligandos, además, el $R\beta$ -E₂ carece de la zona carboxilo terminal (Dominio F) (Nilsson *et al.*, 2001).

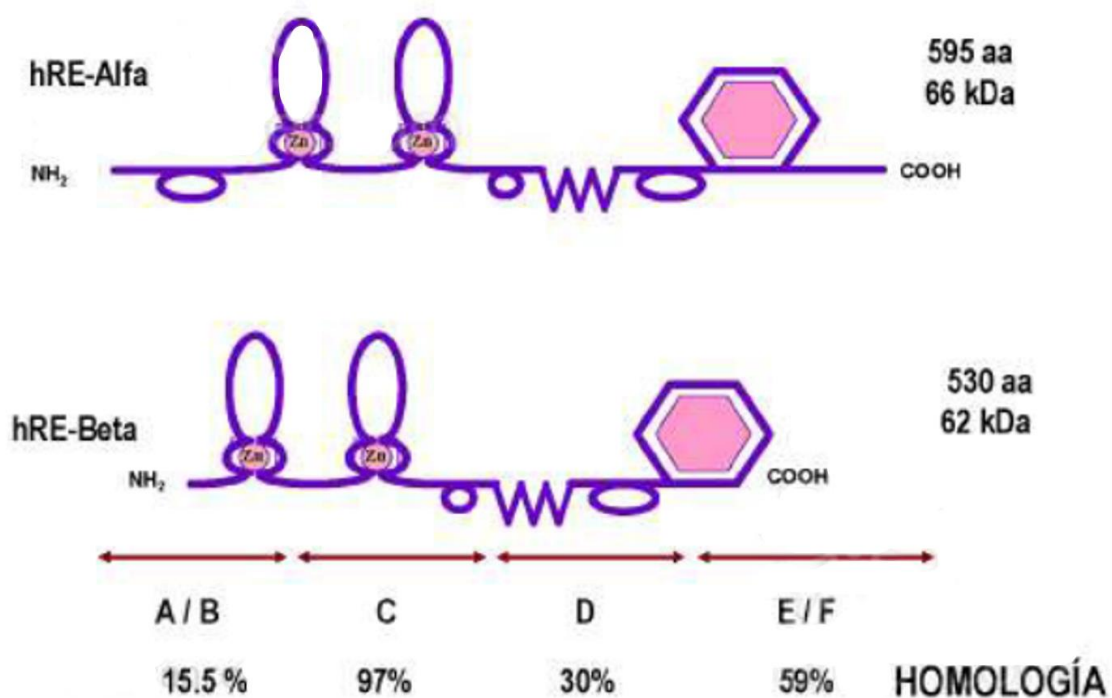


Figura 9. Comparación de la estructura de los receptores $R\alpha$ -E₂ y $R\beta$ -E₂. Tomado de Díaz-Chico y colaboradores (2004). La zona carboxilo terminal está ausente en el $R\beta$ -E₂.

8.2 Receptor a progesterona

Los efectos biológicos de la progesterona son mediados por dos isoformas del receptor a progesterona (RP₄): el receptor A y el B. Ambas isoformas son codificadas por un solo gen ubicado en el cromosoma 11 en la región q22. La diferencia entre éstas radica en 164 aminoácidos presentes en la región amino terminal del receptor A, mismos que están ausentes en B (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Ambas isoformas son reguladas por dos promotores distintos que determinan su expresión celular como homodímeros (AA/BB) o heterodímeros (AB) (Suárez-Calderón y Díaz-Yamal, 2008).

9. Mecanismos de acción genómicos y no genómicos de las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas ejercen su efecto mediante dos principales mecanismos de acción: genómico y no genómico. El mecanismo genómico involucra un cambio en la expresión génica y se encuentra mediado por receptores citosólicos o nucleares (Trujillo-Sánchez y Villamil-Jiménez, 2020). Primero, las hormonas esteroideas atraviesan la membrana celular mediante difusión simple y se unen a sus receptores en el citosol, donde este complejo estrógeno- receptor estrogénico se transloca al núcleo (Nilsson *et al.*, 2001), o bien, pueden unirse directamente a receptores nucleares (Fig. 10). Esta unión provoca cambios estructurales en el receptor que permiten la disociación de proteínas de choque térmico asociadas a éste (HSP90, HSP70 y HSP56) (Tsai y Malley, 1994) que, además de activarlo a través de la exposición de la región que le permite dimerizarse, genera una estructura con alta afinidad a secuencias específicas en el ADN llamadas Elementos de Respuesta a Estrógenos (EREs) (Yáñez, 2008). Posteriormente, en el núcleo el complejo esteroide-receptor estrogénico se une a los EREs (Fig. 10) donde actúa como cofactor o factor de transcripción de algunos genes regulados por hormonas esteroideas. Esto causa el reclutamiento de proteínas correguladoras (coactivadores o correpresores) del promotor, aumentando o disminuyendo la síntesis de ARNm y la producción de proteína asociada (Jensen *et al.*, 1972). Este mecanismo genómico es llevado a cabo en un tiempo de al menos cinco horas (Yáñez, 2008).

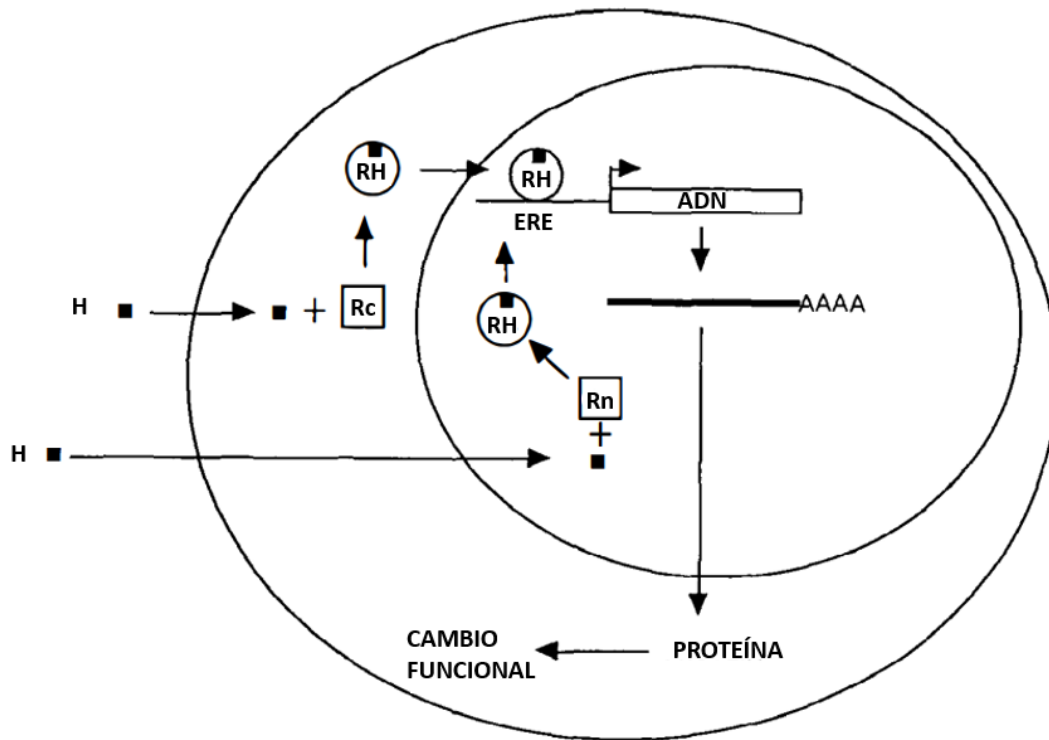


Figura 10. Modelo de la acción genómica de las hormonas esteroideas. H: hormona, Rc: receptor citosólico, Rn: receptor nuclear, RH: complejo receptor-hormona, ERE: elemento de respuesta estrogénico. Figura modificada de Tsai y Malley (1994).

A diferencia de éste, los mecanismos de acción no genómica no requieren la síntesis de ARN y provocan respuestas rápidas de segundos o minutos (Trujillo-Sánchez y Villamil-Jiménez, 2020). El mecanismo de acción no genómica de hormonas esteroideas comienza en la membrana celular mediante la unión a receptores de hormonas similares a los receptores del núcleo. La unión receptor-ligando puede inducir la producción de segundos mensajeros, la modificación en la actividad de canales de iones como el calcio, potasio, sodio o cloro, el desencadenamiento de potenciales de acción, la descarga de vesículas secretoras o la activación de proteínas cinasas asociadas a la membrana (Reichardt y Schütz, 1998).

Los receptores estrogénicos de membrana se encuentran en distintos tipos celulares tales como células ováricas, uterinas, pancreáticas, osteoblastos, neuronas y espermatozoides (Márquez, 2010). Por ejemplo, se han descrito en células ováricas de hámster los efectos no genómicos del estradiol, el cual provoca la activación de proteínas G y estimula vías de transducción de señales incrementando niveles

intracelulares de segundos mensajeros como el inositol- 1,4,5-trifosfato (IP3) y el adenosín 5-monofosfato cíclico (AMPc) (Razandi *et al.*, 1999).

En osteoblastos, el estrógeno provoca el aumento del calcio intracelular y niveles intracelulares de segundos mensajeros (AMPc, IP3, guanosín monofostato cíclico (GMPc)) y la activación de proteínas cinasas (Márquez, 2010).

10. Esteroides sexuales y su participación en la capacitación espermática

Entre los principales esteroides sexuales que tienen efectos en la capacitación espermática se encuentran el 17- β estradiol (E₂) y la progesterona (P₄). En los mamíferos se encuentran en el tracto reproductor femenino en distintas concentraciones, son secretados en gran parte por células de la granulosa y están involucrados en la ovulación y el desarrollo de órganos sexuales (Astle *et al.*, 2003). Además, se ha establecido su participación en la modulación de la actividad espermática debido a las evidencias sobre la presencia de receptores a estos esteroides en la membrana plasmática de espermatozoides de diversos mamíferos (López-Torres y Chirinos, 2017).

10.1 Estradiol

En cuanto al E₂, existen resultados contradictorios. Se ha informado que en los espermatozoides de humano fomenta la remoción del colesterol en la membrana plasmática, el influjo de calcio, la fosforilación de tirosinas y la velocidad de la movilidad del espermatozoide (López-Torres y Chirinos, 2017). Sin embargo, el estradiol también actúa regulando negativamente el influjo de calcio inducido por P₄ cuando está en presencia de éste (López-Torres y Chirinos, 2017). Otros investigadores han encontrado que el E₂ suprime la reacción acrosomal y la hiperactivación inducida por P₄ mediante regulación no genómica (Luconi *et al.*, 1999; Baldi *et al.*, 2000). Además, el E₂ incrementa el metabolismo oxidativo, entre ellos el de los ácidos grasos y la concentración intracelular de adenosín trifosfato (ATP), por lo que está asociado con el metabolismo del espermatozoide y la activación del flagelo (Aquila y De Amicis, 2014).

10.2 Progesterona

Durante su trayecto por el tracto genital femenino, los espermatozoides de mamíferos experimentan modificaciones mediante procesos no genómicos (Aquila y De Amicis, 2014). Se ha demostrado que la P_4 promueve la hiperactivación de la movilidad y la reacción acrosomal (Osman *et al.*, 1989; Baldi *et al.*, 2009; López-Torres y Chirinos, 2017) a través del influjo de Ca^{+2} al citoplasma del espermatozoide, la salida del colesterol de membrana y el incremento en la producción de AMPc. Además, este esteroide induce la activación de las vías de señalización de la proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC), activando la fosforilación de tirosinas (Aquila y De Amicis, 2014).

La P_4 también modula la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la cual regula la actividad de la vía de pentosas fosfatos (Fig. 11), que a su vez se encarga de la oxidación de la glucosa (Aquila y De Amicis, 2014). Es decir, la glucosa como fuente de energía metabólica en los espermatozoides es necesaria para la correcta habilidad fértil en éstos.

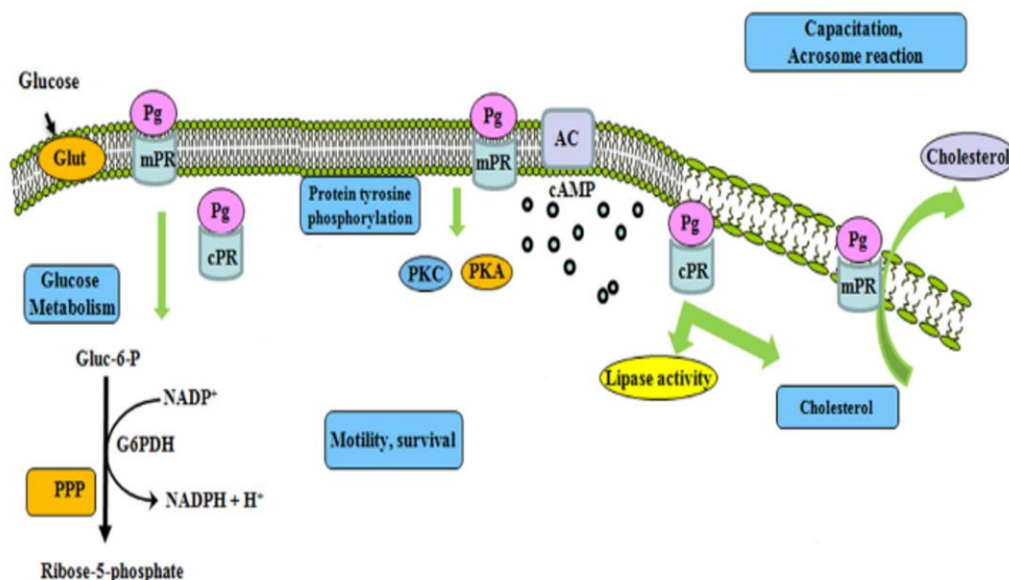


Figura 11. Acciones de P_4 / RP_4 en espermatozoides. La progesterona (Pg) puede actuar por medio de receptores de membrana (mPR) o receptores del citosol (cPR). Interviene modulando la actividad de la G6PDH y promoviendo la oxidación de la glucosa. También promueve la fosforilación de residuos de tirosina, el aumento de AMPc intracelular y la

remoción de colesterol de la membrana plasmática. Esquema modificado de Aquila y De Amicis (2014).

De igual manera, en humanos (Teves *et al.*, 2006) y conejos (Guidobaldi *et al.*, 2008), la P₄ presente en el fluido folicular funciona como un quimioatrayente para los espermatozoides, creando un gradiente desde el ovocito hacia el oviducto (Oren-Benaroya *et al.*, 2008) además de ser un esteroide importante para la capacitación *in vitro* (Yamano *et al.*, 2004). Uno de los efectos de la P₄ en la capacitación es promover la exocitosis de la vesícula acrosomal en mamíferos tales como ratón (Roldan *et al.*, 1994), cerdo (Melendrez *et al.*, 1994), cabra (Somanath *et al.*, 2000) y caballo (Meyers *et al.*, 1995).

11. Características generales de *S. torquatus* y *S. aeneus* y biología reproductiva.

El género *Sceloporus* es el más diverso de la familia Phrynosomatidae y la mayoría de sus especies son de reproducción estacional (Vitt y Caldwell, 2013). Diversas especies de sceloporinos se encuentran en estatus de amenaza, ya que sus poblaciones han disminuido drásticamente debido al cambio climático y al impacto humano directo (Sinervo *et al.*, 2010). Sin embargo, hay otras que se encuentran en la categoría de preocupación menor porque son abundantes y de amplia distribución. Dentro de éstas, se encuentran *S. torquatus* y *S. aeneus*. El primero es un saurio endémico de México y se distribuye en la parte central del país (Dixon y Lemos-Espinal, 2010). Tiene una coloración grisácea con bandas claras en el dorso y los machos presentan un collar nucal oscuro (Fig. 12) (Vázquez, 2008). En la parte ventral los machos presentan parches de color azul (Fig. 12) (Martínez-Méndez y Méndez-de la Cruz, 2007). Los machos adultos alcanzan una longitud promedio de 95 mm de longitud hocico-cloaca (LHC) y una longitud total máxima de 200 mm (García, 2014).

Es una especie vivípara y con reproducción estacional otoñal. El ciclo reproductivo del macho comienza con la recrudescencia testicular en junio-julio y exhibe el máximo volumen gonadal durante septiembre-octubre (Sánchez-Rivera, 2017). Posteriormente, el volumen y el peso testicular declinan dramáticamente entre noviembre-diciembre (época de cortejo y apareamiento, Martínez-Torres *et al.*, 2019) y se mantienen al mínimo hasta que la recrudescencia comienza otra vez (Guillette y Méndez-de la Cruz, 1993). En las hembras la vitelogénesis comienza a fines del

verano (agosto- principios de septiembre) y la ovulación ocurre durante noviembre-diciembre y permanecen preñadas durante todo el invierno. El nacimiento de las crías ocurre en primavera (abril-mayo) (Guillette y Méndez-De la Cruz, 1993).



Figura 12. Macho de *Sceloporus torquatus*. (A) vista dorsal y (B) vista ventral.

Por otra parte, *S. aeneus* presenta coloración en tonalidades de café, así como un par de franjas de color más claro en la parte dorsal y un par en la región lateral, y los machos presentan dos parches de color azul en la parte ventral más marcados que en las hembras (Fig. 13) (Ramírez-Bautista *et al.*, 2016). Los adultos alcanzan una longitud promedio de 50.1 mm LHC (Rodríguez-Ramírez, 2020). Es una especie ovípara y exhibe un ciclo reproductivo estacional donde el cortejo y el apareamiento ocurren en los meses marzo y abril (Manríquez-Morán *et al.*, 2013).

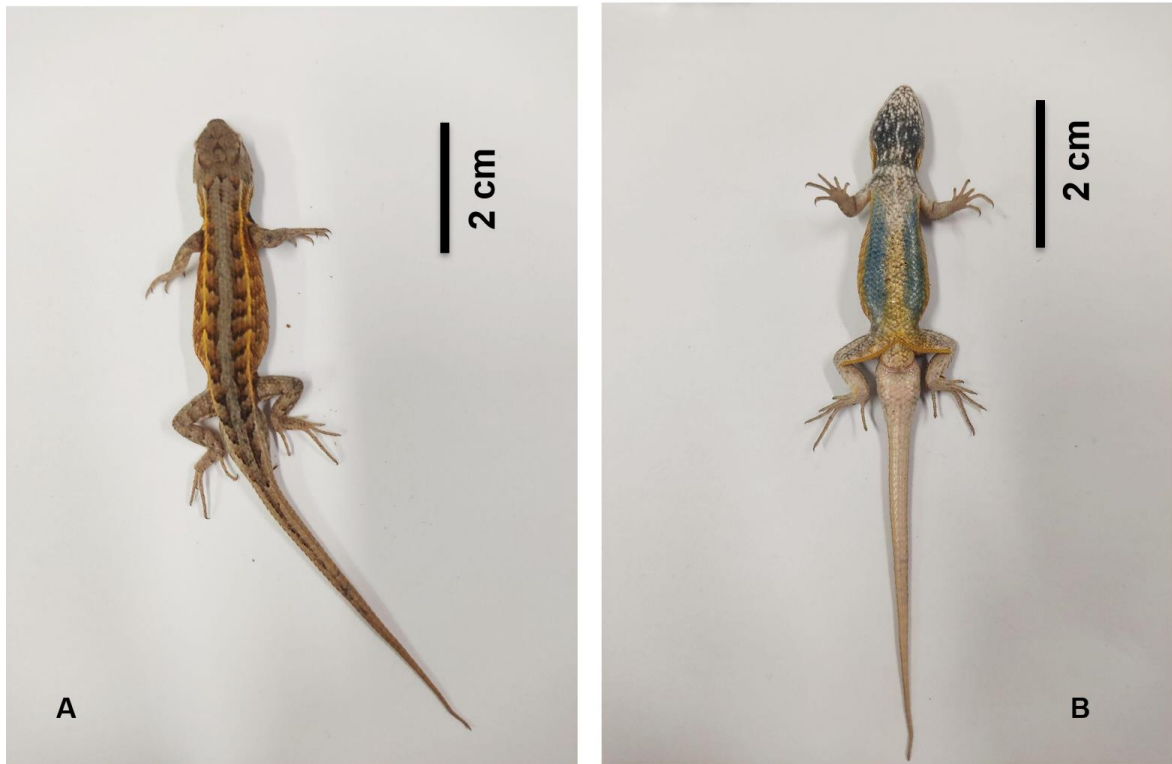


Figura 13. Macho de *Sceloporus aeneus*. (A) vista dorsal y (B) vista ventral.

Antecedentes

1. Receptores a estradiol y progesterona en los espermatozoides

La presencia de R-E₂ y R-P₄ ha sido ubicada en distintas regiones de la membrana plasmática de los espermatozoides de diversas especies de mamíferos (Cuadro 1). En la cabeza del espermatozoide se han encontrado receptores a estos esteroides en la región acrosomal y postacrosomal (Somanath y Gandhi, 2002; De Amicis *et al.*, 2012) y en algunos estudios, la marca de R-P₄ (Somanath y Gandhi, 2002) y R β -E₂ (Gimeno-Martos *et al.*, 2017) disminuyó cuando los espermatozoides fueron incubados en medios capacitantes.

Cuadro 1

Localización de receptores a esteroides sexuales en espermatozoides de mamíferos

Región	Receptor			Taxa	Autor(es)
	R-P ₄	R α -E ₂	R β -E ₂		
Cabeza	X	X		Oveja	(Gimeno-Martos <i>et al.</i> , 2017)
	X			Humano	(Sabeur <i>et al.</i> , 1996)
	X			Cabra	(Somanath y Gandhi, 2002)
	X			Jabalí	(De Amicis <i>et al.</i> , 2012)
		X	X	Caballo	(Arkoun <i>et al.</i> , 2014)
		X		Humano	(Solakidi <i>et al.</i> , 2005)
			X	Cerdo	(Rago <i>et al.</i> , 2007)
			X	Ratón	(Sebkova <i>et al.</i> , 2012)
				Oveja	(Gimeno-Martos <i>et al.</i> , 2017)
Pieza media	X			Jabalí	(De Amicis <i>et al.</i> , 2012)
	X			Humano	(De Amicis <i>et al.</i> , 2011)
		X	X	Caballo	(Arkoun <i>et al.</i> , 2014)
			X	Humano	(Solakidi <i>et al.</i> , 2005)
		X		Humano	(Guido <i>et al.</i> , 2011)
		X		Cerdo	(Rago <i>et al.</i> , 2007)
		X	X	Caballo	(Arkoun <i>et al.</i> , 2014)

2. Capacitación en reptiles

Hasta el momento existen pocos estudios sobre la fisiología espermática de los saurios, sin embargo, bajo condiciones experimentales, se han encontrado evidencias que sugieren que la capacitación es un proceso que también puede ocurrir en los espermatozoides de los reptiles. Inicialmente, Depeiges y Dacheux (1985) realizaron un estudio sobre la adquisición de la motilidad de los espermatozoides durante su almacenamiento en la lagartija *Lacerta vivipara*. En este trabajo se observó que la adición de un inhibidor de la fosfodiesterasa (cafeína) indujo la motilidad progresiva

de los espermatozoides, lo cual sugirió que la motilidad de los espermatozoides en esa especie, como en los mamíferos, depende del AMP cíclico. Por otra parte, Nixon y colaboradores (2016) estudiaron los atributos funcionales asociados con la maduración post testicular en espermatozoides de cocodrilo (*Crocodylus porosus*), e hicieron dos importantes observaciones: primero, que la incubación de los espermatozoides de cocodrilo en medios capacitantes para mamíferos permite mantener activa la velocidad progresiva del flagelo, así como reactivar el movimiento cuando los espermatozoides se incubaron por varias horas en medio no capacitante. La segunda observación se basó en que esta capacidad para mantener el movimiento flagelar se relacionó con la activación de cascadas de señalización mediadas por AMPc, las cuales incorporan a la proteína cinasa A (PKA) como una quinasa intermediaria y culmina en la fosforilación de tirosinas, al igual que ocurre en la capacitación espermática de los mamíferos. Recientemente en el Laboratorio de Investigación de Saurios en Asistencia Reproductiva y Desarrollo (LISARD), de la FES Iztacala, se encontró que al aplicar el ensayo de clortetraciclina -prueba que evalúa el estado de capacitación- a espermatozoides de la lagartija *S. torquatus* (Dávila-Govántes *et al.*, 2018), se presentaron patrones similares a los encontrados en los mamíferos. Las observaciones arriba señaladas sugieren que en los espermatozoides de los reptiles también se puede dar la capacitación.

Justificación

En los mamíferos se ha demostrado fehacientemente la participación tanto de la P₄ como del E₂ y sus receptores en la regulación de la actividad espermática durante la capacitación (Osman *et al.*, 1989; Baldi *et al.*, 2009; López-Torres y Chirinos, 2017) y evidencias recientes sugieren que la capacitación también puede darse en los reptiles (Depeiges y Dacheux, 1985; Nixon *et al.*, 2016; Dávila-Govántes *et al.*, 2018). A pesar de la importancia que tienen los reptiles en los ecosistemas (Gallardo, 1979), existen escasos trabajos enfocados al estudio de su endocrinología reproductiva. Dada la importancia de la capacitación y la participación de estos esteroides en la regulación de la actividad espermática, es necesario determinar la presencia de los receptores a P₄ y E₂ en los espermatozoides de saurios, pues esto permitiría iniciar trabajos que aclaren cuál es su función en la regulación de los cambios que conllevan a la capacitación y así poder generar la información necesaria para aumentar las

posibilidades de éxito de futuros programas de reproducción asistida. En el LISARD de la FES Iztacala, se ha iniciado una línea de investigación para estudiar aspectos endócrinos sobre la reproducción de saurios utilizando como modelo las lagartijas del género *Sceloporus*. Éstas son el modelo ideal para este tipo de estudios por ser especies abundantes, de amplia distribución, fáciles para mantener en cautiverio y factibles para la obtención de semen y espermatozoides.

Objetivos

1. General

Determinar mediante un ensayo inmunohistoquímico la presencia de $R\alpha-E_2$ y RP_4 en espermatozoides obtenidos del semen fresco y capacitados *in vitro* de *S. torquatus* y *S. aeneus*.

2. Particulares

- Determinar si los espermatozoides de *S. torquatus* y *S. aeneus* presentan receptores $R\alpha-E_2$ y/o RP_4 y su inmunolocalización.
- Establecer en qué región de los espermatozoides es más recurrente la marca de $R\alpha-E_2$ y/o RP_4 .
- Establecer si existe diferencia en la cantidad de espermatozoides que presentan receptores antes y después de la incubación en el medio capacitante en las dos especies de sceloporinos.

Materiales y métodos

1. Áreas de colecta

1.1 Parque Estatal Sierra de Guadalupe

El parque Estatal Sierra de Guadalupe es una Área Natural Protegida (ANP) ubicada en la alcaldía Gustavo A. Madero y rodeada por el Estado de México (SEDEMA, 2022). Pertenece a la provincia fisiográfica del eje Neovolcánico y a la subprovincia lagos y volcanes de Anáhuac. Presenta un clima templado subhúmedo con una precipitación

total anual de 700 mm (INEGI, 2019). Está conformada por diversos tipos de vegetación: matorral xerófilo, bosque de encino y pastizal. En cuanto a la fauna, se tienen registradas 135 especies de vertebrados, distribuidas en 8 especies de anfibios, 20 de reptiles, 80 de aves y 27 de mamíferos, de las cuales 11 están sujetas a protección especial, 6 amenazadas, 1 en peligro de extinción y 8 de ellas reportadas como endémicas, de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2001 (SEDEMA, 2022).



Figura 14. Mapa poligonal del Parque Estatal Sierra de Guadalupe. Tomado de SEDEMA (2022).

1.2 Tlazala de Fabela, Estado de México

El municipio Tlazala de Fabela se encuentra ubicado al noroeste del Estado de México (Fig. 15). En el municipio predomina el clima templado subhúmedo con lluvias en verano y una temperatura promedio de 12°C. Se encuentra ubicado en una zona montañosa, por lo que la altitud varía entre los 2500 a los 3600 metros sobre el nivel

del mar (msnm) (Plan Municipal de Desarrollo Urbano de Isidro Fabela, 2009). La vegetación predominante es bosque de pino-encino y áreas de cultivo (Canales-Delgadillo *et al.*, 2004).

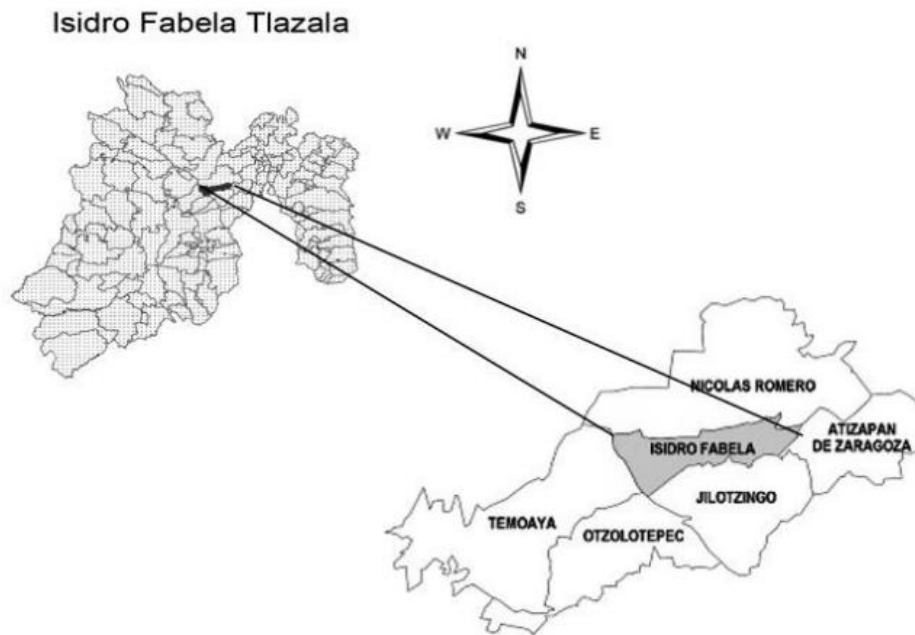


Figura 15. Localización del municipio Isidro Fabela, Estado de México. Tomado de García-Mares (2018).

2. Colecta y mantenimiento de organismos

La colecta de organismos se realizó bajo el permiso SGPA/DGPVS/09/K5/1026/10/21. Se colectaron machos adultos de *S. torquatus* ($n = 4$) mediante captura manual en Parque Estatal Sierra de Guadalupe, ($19^{\circ}37' - 19^{\circ}29' N$; $99^{\circ}12' - 99^{\circ}02' W$, entre 2,200 y 3,000 m de altitud), Estado de México durante el mes de octubre, previo a la época de apareamiento. Los machos adultos de *S. aeneus* ($n = 4$) se colectaron en Tlaxala de Fabela, Estado de México durante la segunda quincena de marzo (dos semanas previas a la época de apareamiento). Los organismos fueron trasladados al LISARD en la FES Iztacala donde se registró el peso corporal y las medidas morfométricas de cada individuo. El marcaje de los organismos se realizó mediante la ectomización de falanges (Aguirre-León, 2011). Los machos de *S. torquatus* fueron mantenidos en encierros de 3.0 m x 5.0 m x 2.0 m, ubicados en el invernadero de la Unidad de Morfofisiología y Función (UMF), acondicionados con vegetación y rocas para simular el ambiente natural donde habitan (Fig. 16 A). Los machos de *S. aeneus* se

mantuvieron dentro del laboratorio en mascoterías de plástico (33 cm x 21 cm x 20 cm), acondicionadas con sustrato de papel periódico y estructuras del mismo material que fungieron como refugios (Fig. 16 B). Ambas especies fueron provistas de agua *ad libitum* y alimentadas tres veces por semana: dos veces con grillos (*Acheta domestica*); y una con larvas de polillas (*Galleria mellonella*) para procurar una dieta balanceada. También fueron expuestas a luz solar directa durante periodos de 3 horas en promedio, tres veces a la semana. Una vez terminada la obtención de semen de los organismos, éstos fueron puestos en observación y posteriormente devueltos al lugar de colecta.



Figura 16. Mantenimiento de (A) *Sceloporus torquatus* en encierros al aire libre del invernadero de la FES Iztacala y (B) *Sceloporus aeneus* en transportadoras de plástico con sustrato de papel periódico.

3. Manejo de muestras

3.1 Obtención del semen

Se realizó una selección previa de los machos donadores para la obtención de semen y se utilizaron aquellos que presentaron las glándulas femorales hipertrofiadas como

signo de madurez sexual, y tapones en los hemipenes como evidencia de que aún no habían copulado (Martín y López, 2009; Martínez-Torres *et al.*, 2019) (Fig. 17).

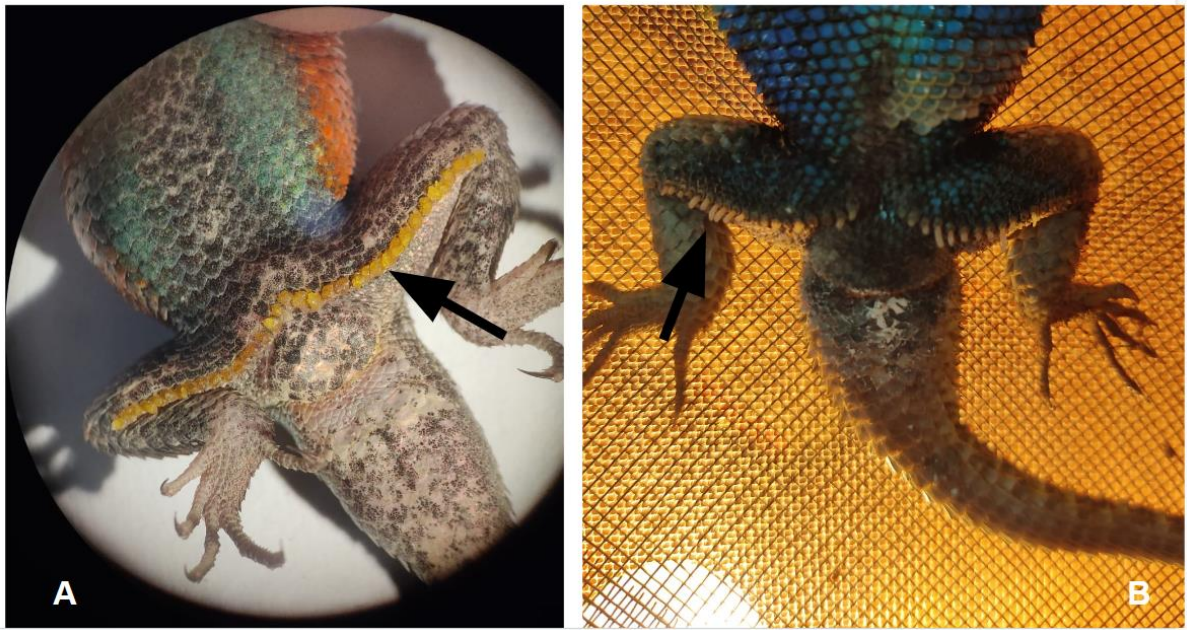


Figura 17. Poros femorales intactos (✦) en: (A) *Sceloporus aeneus* y (B) *Sceloporus torquatus*.

Una vez seleccionados los machos, se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital sódico ($16 \mu\text{g}/10\text{g}$ de peso corporal, Martínez-Torres *et al.*, 2019). Inmediatamente después de alcanzar la fase de relajación profunda, se limpió la cloaca con solución salina (0.7% NaCl) y se obtuvo el eyaculado mediante la opresión de la papila genital (Martínez-Torres *et al.*, 2019). El semen fue recuperado con una micropipeta ($0.5\text{-}10 \mu\text{l}$) usando puntas de micropipeta graduadas a cada microlitro (Fig. 18). Posterior a eso, los organismos se mantuvieron en observación y en un lugar cálido hasta su recuperación.

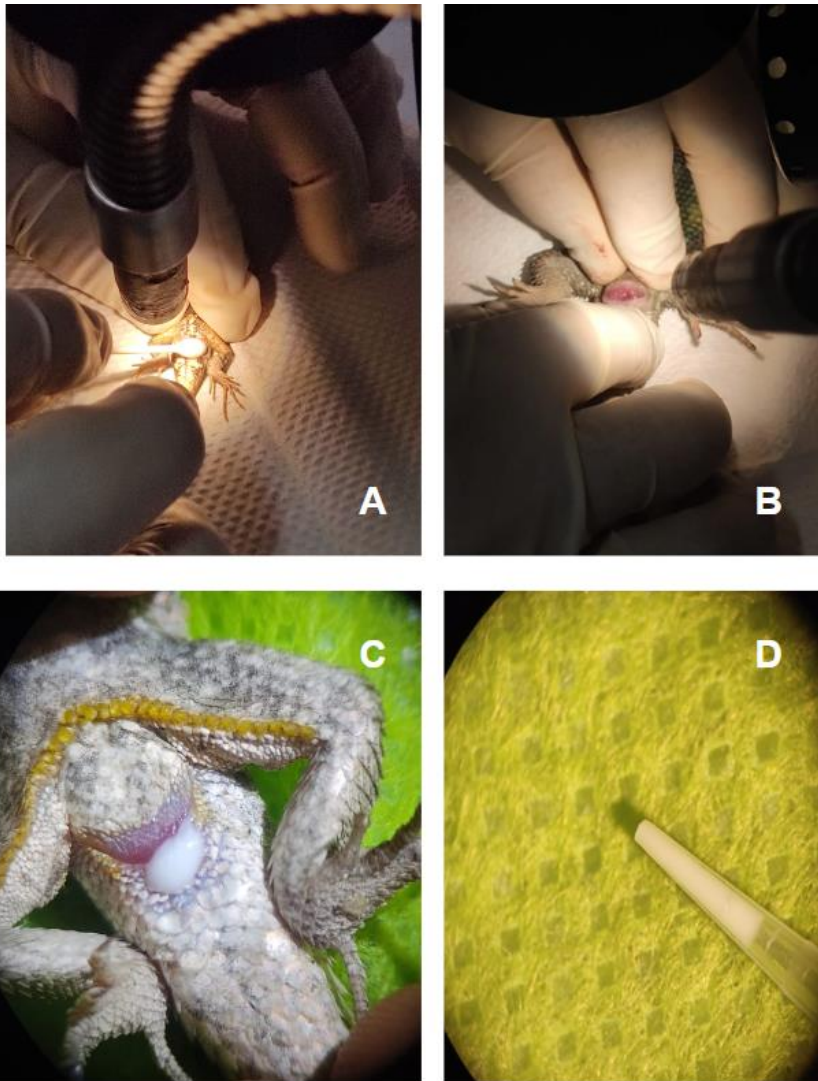


Figura 18. Obtención de semen de saurios. A) Limpieza de la cloaca con un hisopo impregnado con solución salina (0.7% NaCl). B) Opresión de la papila urogenital. C) Eyaculado de *Sceloporus aeneus*. D) Recuperación de semen.

3.2 Tratamiento del semen

La obtención y manejo del semen se realizó en un cuarto aislado con una temperatura ambiental de 25-28°C. La muestra de semen obtenida se depositó en un microtubo y se le adicionó solución de Fosfato Salino Amortiguado a pH 7.4 (PBS por sus siglas en inglés) (Checa-Rojas, 2017) hasta alcanzar un volumen final de 100 µl. Inmediatamente, se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de PBS. A esta suspensión se le denominó solución madre de espermatozoides (SME). De la SME se tomaron 30 µl que fueron fijados inmediatamente con formol al 3% para utilizarlo como

grupo control de cero horas de incubación (C-T0h). Asimismo, se tomó una alícuota de 30 μ l de la SME, a la cual se le agregaron 20 μ l de solución capacitante Tyrode-PLG (Rogers y Yanagimachi, 1975) y se incubó durante tres horas a 30°C protegido de la luz. Esta alícuota fue utilizada como grupo experimental de incubación en medio capacitante (E-T3H). Finalmente, se tomaron otros 30 μ l de la SME a los cuales se les agregaron 20 μ l de solución PBS y se incubaron durante tres horas a 30°C y protegidos de la luz para ser utilizados como grupo control de tres horas de incubación en medio no capacitante (C-T3h). Los 10 μ l restantes fueron utilizados para determinar la concentración espermática. Terminado el tiempo de incubación, todas las muestras se fijaron con formol al 3% (fue agregado el volumen de formol equivalente al volumen de la muestra) durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugaron a 3000 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50 μ l de una solución PBS adicionado con 50 mM de cloruro de amonio (NH_4CL). Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron de nuevo a la misma frecuencia. El sobrenadante se desechó y el producto fue resuspendido en 50 μ l de PBS.

Concentración espermática. Se realizó el conteo con una cámara de Neubauer (Bastidas, 2002) agregando 10 μ l de una solución fijada de espermatozoides de la SME. Se utilizó un factor de dilución 1:200.

4. Determinación de la presencia de $\text{R}\alpha\text{E}$ y RP_4

Se realizaron pruebas inmunocitoquímicas tanto a los lotes control (C-T0h y C-T3h) como al incubado en medio capacitante (E-T3h) para detectar la presencia de $\text{R}\alpha\text{-E}_2$ R-P_4 en los frotis de espermatozoides, de acuerdo a las instrucciones del Kit Vectastain PK-8800 (Vector Laboratories, 2019). Se determinó la presencia $\text{R}\alpha\text{-E}_2$ usando un anticuerpo policlonal de conejo (PAS-16440, Invitrogen) y el R-P_4 (PAS-94983, Invitrogen). Para validar el anticuerpo se realizó un ensayo inmunohistoquímico utilizando el anticuerpo de P_4 en útero de ratona y se comparó aplicando la misma prueba en el oviducto de *Sceloporus sp* (Fig. 20).

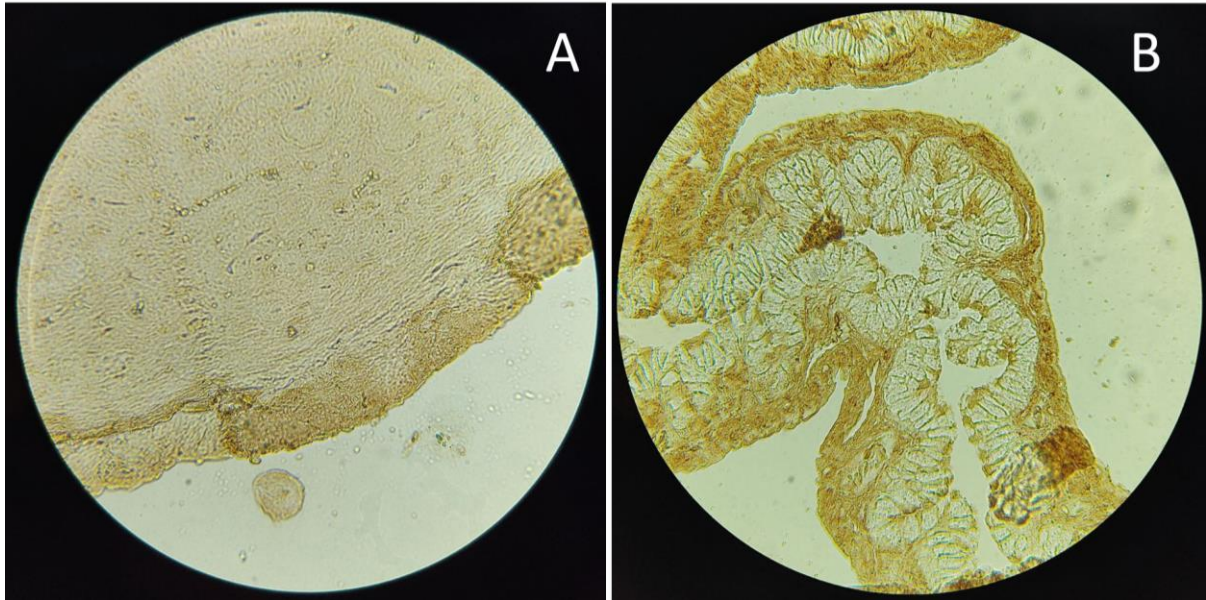


Figura 19. Marca de receptores a progesterona en: (A) útero de ratona e (B) infundíbulo de *Sceloporus sp.* Imagen de microscopio óptico, 40 x.

Se realizaron frotis de espermatozoides de los tres tiempos de incubación y se hizo el bloqueo de la peroxidasa endógena agregando peróxido de hidrógeno al 3% durante cinco minutos. Acto seguido se lavaron con PBS y se incubaron con una solución de bloqueo agregando albúmina de bovino (BSA) al 5% en PBS durante 30 min. Pasado el tiempo, se retiró la solución de bloqueo y la muestra se incubó durante toda la noche con el primer anticuerpo (E₂ y P₄) diluido 1:50 en PBS al 5%. Posteriormente, se lavó la muestra con PBS y se incubó con anticuerpo secundario biotilado durante 10 minutos. Enseguida, la muestra se lavó de nuevo con PBS y se incubó durante cinco minutos con el complejo Estreptavidina/peroxidasa. Se realizó otro lavado y finalmente, la muestra se incubó con diaminobencidina (DAB) durante tres minutos para ser observada al microscopio óptico. Para determinar la presencia y distribución de la marca se observaron 200 espermatozoides considerando distintos campos con el objetivo 100x. Posteriormente se calculó el porcentaje de espermatozoides que presentaron marca con respecto al total.

5. Análisis estadístico

Se aplicó pruebas “t” de Student para comparar la cantidad de espermatozoides que presentaron marcas de receptores en la cabeza y pieza media entre el tiempo cero (espermatozoides frescos) y la incubación a tres horas en medio capacitante.

Asimismo, se realizó la misma prueba para comparar la cantidad de espermatozoides que presentaron marcas cuando fueron incubados tres horas en medio capacitante contra los incubados tres horas en PBS, estableciendo la significancia cuando $p < 0.05$ utilizando el software SPSS.

Resultados

1. Características morfométricas de los organismos

Una vez que estuvieron los machos en el laboratorio, se registró el peso y la longitud hocico-cloaca (LH-C) así como la longitud cloaca-cola (LC-C) (Cuadro 2).

Cuadro 2.

Características morfométricas de las especies

Especie	Peso corporal (g)	LHC (mm)	LCC (mm)
<i>S. torquatus</i> (n=4)	43.55 ± 5.91 (37.64 – 50.95)	95.25 ± 9.97 (83.2 – 106)	96.25 ± 14.40 (81.12 – 114)
<i>S. aeneus</i> (n=4)	3.45 ± 0.604 (2.95 – 4.2)	47 ± 2.16 (47 – 49)	59 ± 3.464 (56.35 – 62.2)

Longitud promedio corporal ± desviación estándar. LH-C: Longitud hocico cloaca, LC-C:

Longitud hocico cola.

2. Características del semen

El semen de ambas especies fue inicialmente evaluado macroscópicamente. La consistencia fue viscosa en cinco casos y fluida en los tres casos restantes. La apariencia del semen fue blanca en todos los individuos. Se midió el volumen

eyaculado (μl) y se calculó la concentración de espermatozoides por mililitro (ml) (Cuadro 3).

Cuadro 3.

Características del semen

Especie	Volumen (μl)	Concentración ($\times 10^6/\text{ml}$)
<i>S. torquatus</i> (n=4)	4.5 ± 2.08 (2.0 – 7.0)	204.142 ± 119.32 (93.0 – 365.568)
<i>S. aeneus</i> (n=4)	1.0 ± 0.40 (0.5 – 1.5)	366.55 ± 59.41 (280.0 – 410.0)

3. Receptores en espermatozoides de *S. torquatus*

3.1 Presencia y ubicación de R α -E₂ y R-P₄

Se localizaron tanto R α -E₂ como R-P₄ en los espermatozoides de *S. torquatus* principalmente en dos regiones: acrosoma y pieza media (Fig. 21). En mínima medida (alrededor del 1%) se presentaron R-P₄ en la región postacrosomal de espermatozoides “hinchados”, por lo que no se consideraron en los registros. Las marcas en el acrosoma se presentaron como una “banda” uniforme que abarca la región acrosomal y en la pieza media en forma de “anillos”.

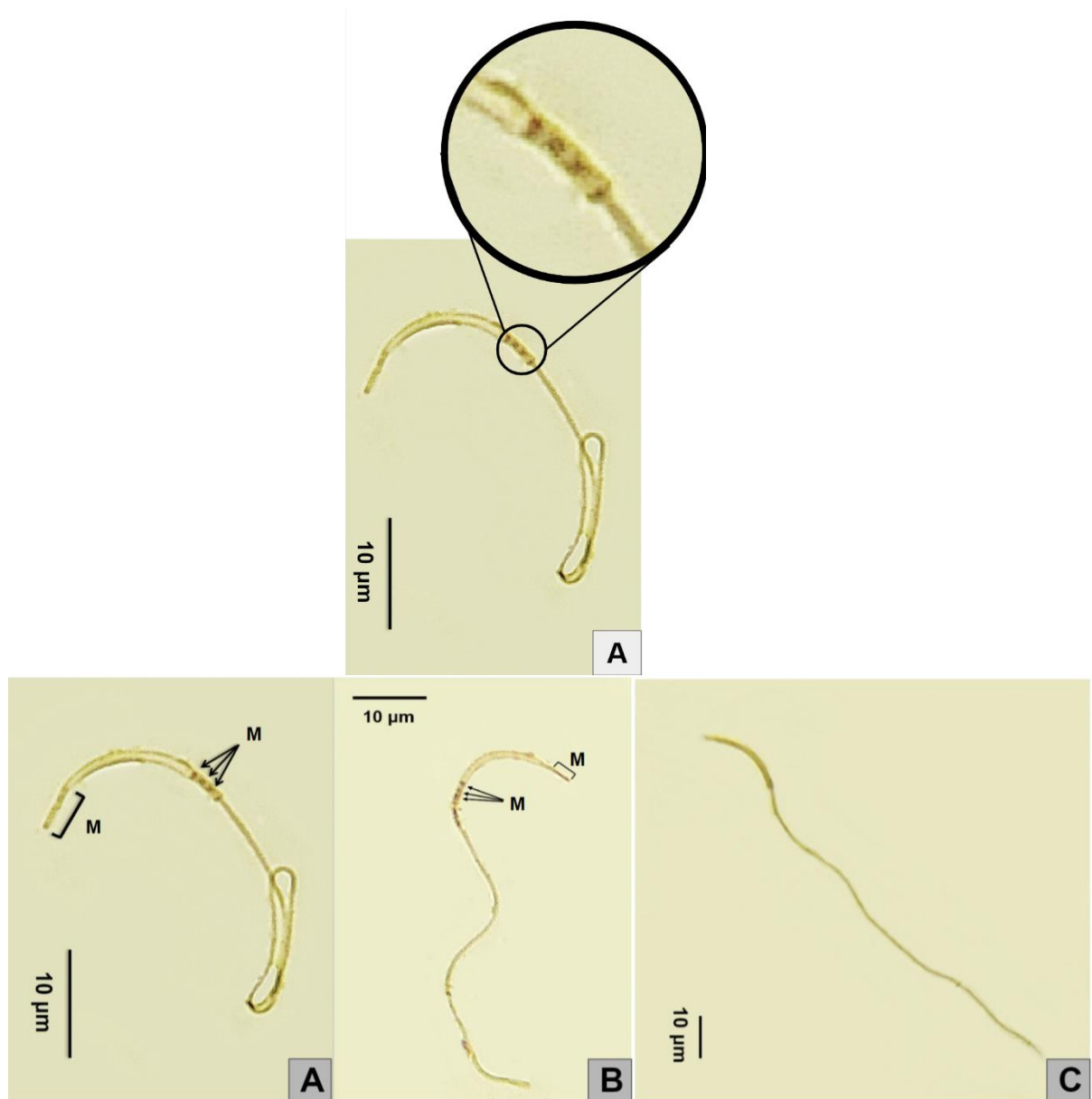


Figura 20. Receptores a progesterona ($R-P_4$) y estradiol ($R\alpha-E_2$) en el acrosoma y la pieza media de los espermatozoides de *S. torquatus*. M) marca del receptor, A) $R\alpha-E_2$, B) $R-P_4$, C) Control negativo.

Las marcas a ambos receptores no se encontraron en todos los espermatozoides. En los que sí se presentó la marca, ésta podía encontrarse en ambas regiones (acrosoma y pieza media) en un mismo espermatozoide, o bien, sólo en una región.

3.2 Espermatozoides con R α -E₂ y R-P₄ en función del medio de incubación

El porcentaje de espermatozoides que presentaron la marca a los receptores varió en función del medio de incubación y del tiempo (Fig. 23 y 24). La marca tanto a R α -E₂ como a R-P₄ fue localizada en mayor porcentaje en la pieza media (67.17 \pm 6.0 y 70.85 \pm 5.2, respectivamente), en comparación con las localizadas en el acrosoma (9.06 \pm 2.3 y 12.4 \pm 4.4) (Fig. 22).

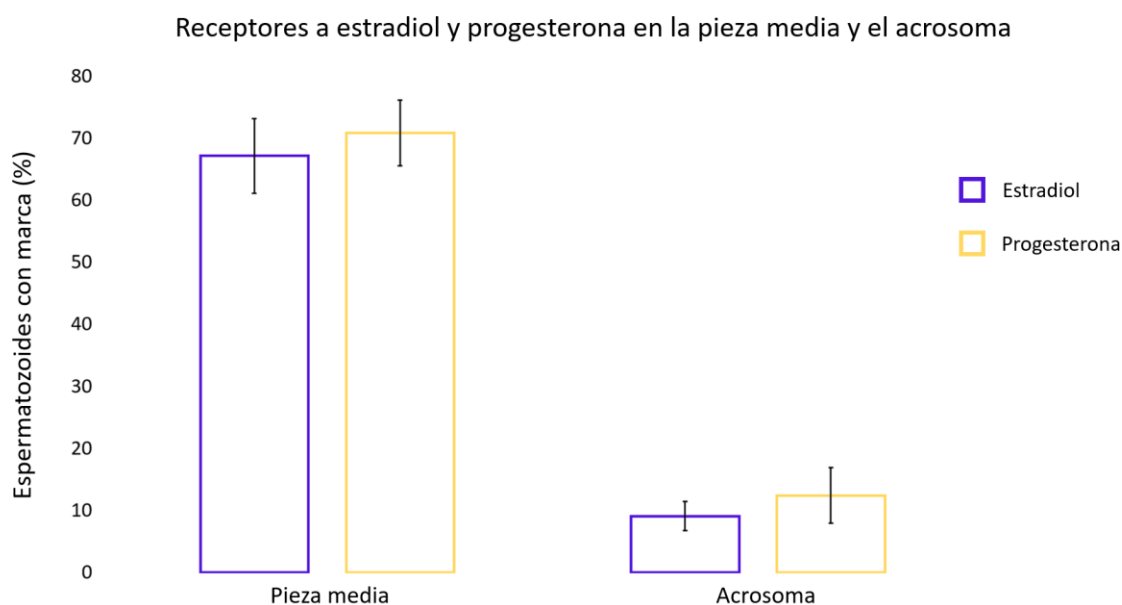


Figura 21. Porcentajes de espermatozoides (*S. torquatus*) que presentaron marca a R α -E₂ y R-P₄ en la pieza media y acrosoma.

En la pieza media se encontró que el porcentaje de espermatozoides que presentaron marcas a R α -E₂ fue significativamente mayor ($t_3 = 4.67$, valor crítico de "t" = 2.35, $p < 0.05$) cuando éstos fueron incubados en medio capacitante (67.17 \pm 6.03), con respecto a aquellos que fueron incubados en PBS (54.58 \pm 4.69) y aquellos que no fueron incubados ($t_3 = 11.06$, valor crítico de "t" = 2.35, $p < 0.05$) (42.65 \pm 3.37) (Fig. 23).

Una situación similar se observó en el porcentaje de las marcas al R-P₄. Este fue significativamente mayor ($t_3 = 2.77$, valor crítico de "t" = 2.35, $p < 0.05$) en los espermatozoides incubados en medio capacitante (70.78 \pm 5.29) con respecto a aquellos que fueron incubados en PBS (53.65 \pm 7.03) y a aquellos que no fueron incubados ($t_3 = 6.76$, valor crítico de "t" = 2.35, $p < 0.05$) (40.68 \pm 4.63) (Fig. 23).

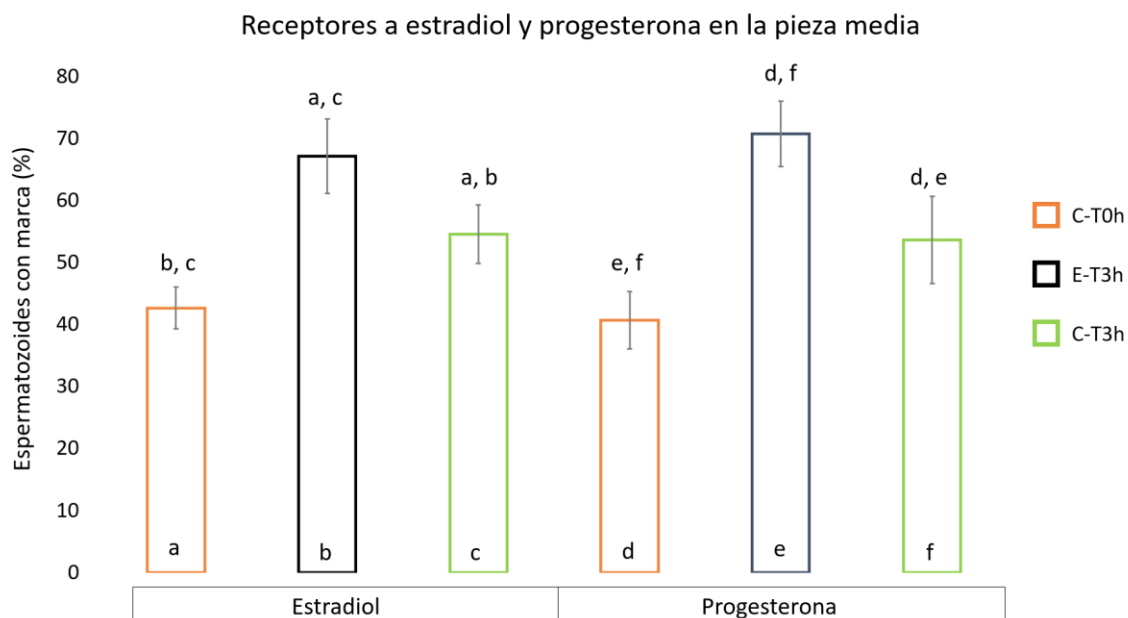


Figura 22. Porcentaje de espermatozoides de *S. torquatus* que presentaron marca a $R\alpha$ -E₂ y R-P₄ en la pieza media de acuerdo con el medio (capacitante: □ y no capacitante: □, □) y tiempo de incubación (cero horas: T0h y tres horas: T3h). Las letras sobre las barras representan los grupos con los cuales tienen diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otra parte, en el acrosoma no se encontraron diferencias significativas para ambos receptores entre los grupos experimental y control (Fig. 24). El porcentaje de espermatozoides que presentaron marca a $R\alpha$ -E₂ fue de 9.06 ± 2.3 cuando fueron incubados en medio capacitante (E-T3h); 7.60 ± 1.0 en medio PBS (C-T3h); y 8.89 ± 4.3 en espermatozoides sin incubar (C-T0h). En cuanto a los R-P₄, los promedios fueron de 7.60 ± 1.9 en el grupo E-T3h; 9.0 ± 2.3 en C-T3h; y 12.40 ± 4.4 en C-T0h.

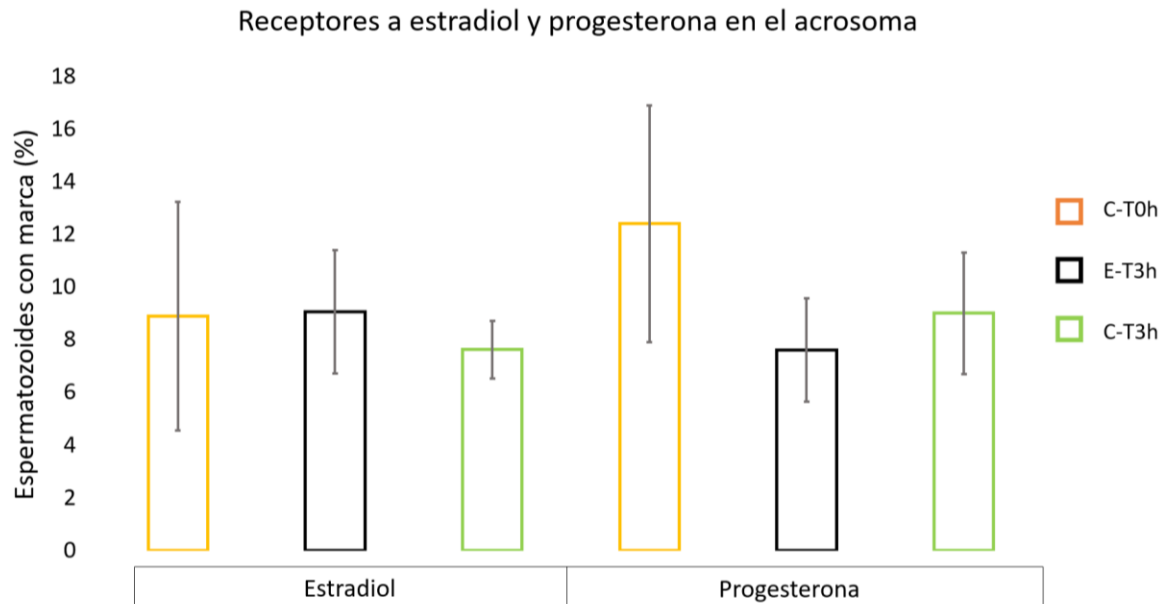


Figura 23. Porcentaje de espermatozoides de *S. torquatus* que presentaron marca a R-P₄ y R α -E₂ en el acrosoma de acuerdo con el medio (capacitante: □ y no capacitante: □, □) y tiempo de incubación (cero horas: T0h y tres horas: T3h).

4. Receptores en espermatozoides de *S. aeneus*

4.1 Presencia y ubicación de R α -E₂ y R-P₄

En los espermatozoides de los machos de *S. aeneus* también se encontraron receptores a ambos esteroides sexuales, ubicados en el acrosoma como una marca uniforme y la pieza media en forma de “anillos” (Fig. 25). Las marcas a ambos receptores no se encontraron en todos los espermatozoides. En los que sí se presentó la marca, ésta podía encontrarse en ambas regiones (acrosoma y pieza media) en un mismo espermatozoide, o bien, sólo en una región.

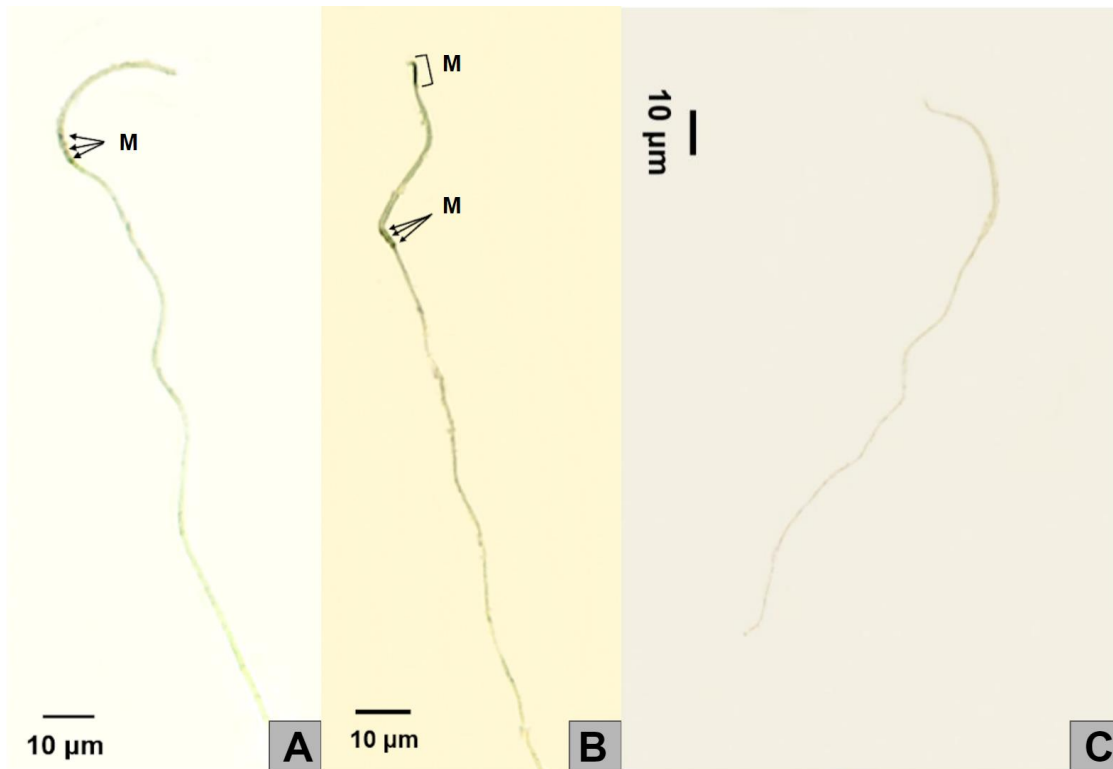


Figura 24. Presencia de R α -E₂ y R-P₄ en espermatozoides de *S. aeneus*. M: marca del receptor, A: R-P₄, B: R α -E₂, C: Control negativo.

4.2 Espermatozoides con R α -E₂ y R-P₄ en función del medio de incubación

Al igual que en *S. torquatus*, la marca tanto a R α -E₂ como a R-P₄ fue localizada principalmente en la pieza media (71.57 ± 4.0 y 59.86 ± 5.8 , respectivamente), en comparación con las halladas en el acrosoma (6.85 ± 1.5 y 18.6 ± 8.3) (Fig. 26).

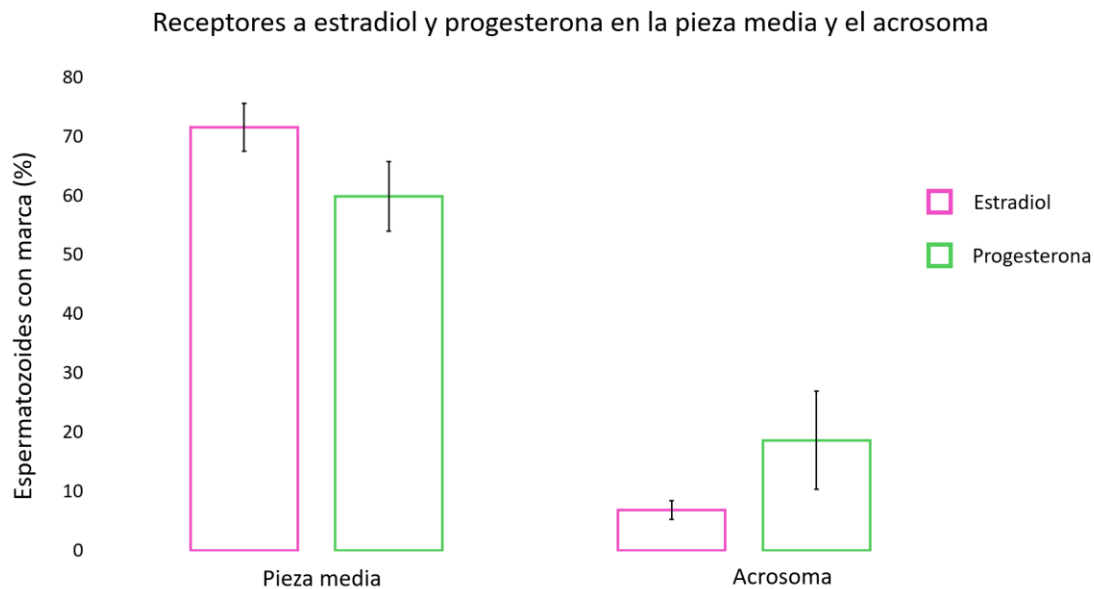


Figura 25. Porcentaje de espermatozoides que presentaron marca a $R\alpha$ -E₂ y R-P₄ en la pieza media y acrosoma.

En la pieza media se encontró que el porcentaje de espermatozoides que presentaron marcas de $R\alpha$ -E₂ fue significativamente mayor ($t_3 = 20.26$, valor crítico de “t” = 2.35, $p < 0.001$) cuando éstos fueron incubados en medio capacitante (71.57 ± 4.03), con respecto a aquellos que fueron incubados en PBS (49.98 ± 5.73) y aquellos que no fueron incubados ($t_3 = 39.43$, valor crítico de “t” = 2.35, $p < 0.001$) (39.63 ± 4.27) (Fig. 27).

Una situación similar se observó para los R-P₄. El porcentaje de espermatozoides incubados en medio capacitante (59.86 ± 5.86) fue significativamente mayor ($t_3 = 3.70$, valor crítico de “t” = 2.35, $p < 0.05$) con respecto a aquellos que fueron incubados en PBS (44.89 ± 4.45) y aquellos que no fueron incubados ($t_3 = 8.27$, valor crítico de “t” = 2.35, $p < 0.05$) (35.13 ± 5.73) (Fig. 27).

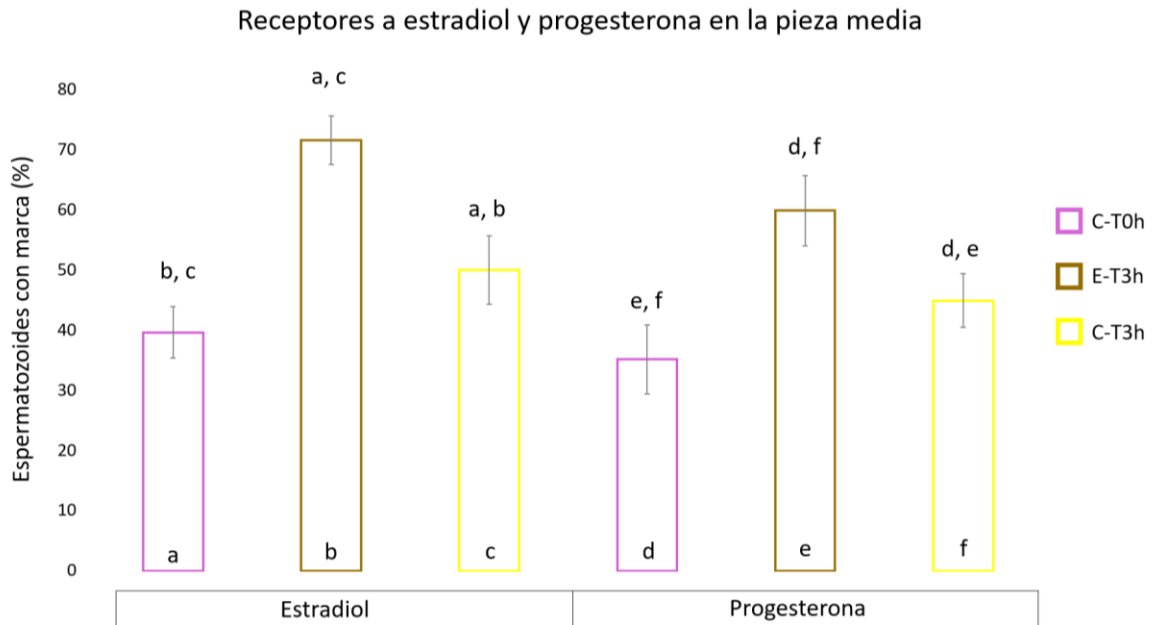


Figura 26. Porcentaje de espermatozoides de *S. aeneus* que presentaron marca a $R\alpha-E_2$ y $R-P_4$ en la pieza media de acuerdo con el medio (capacitante: \square y no capacitante: \square , \square) y tiempo de incubación (cero horas: T0h y tres horas: T3h). Las letras sobre las barras representan los grupos con los cuales tienen diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el acrosoma, por el contrario, no hubo diferencias significativas para ambos receptores entre los grupos experimental y controles (Fig. 28). El porcentaje de espermatozoides que presentaron marca a $R\alpha-E_2$ fue de 4.93 ± 1.5 en el grupo E-T3h; 6.85 ± 1.5 en C-T3h; y 6.66 ± 1.0 en C-T0h. En cuanto a los $R-P_4$, los promedios fueron de 18.63 ± 8.3 en el grupo E-T3h; 13.87 ± 1.9 en C-T3h; y 16.17 ± 1.4 en C-T0h.

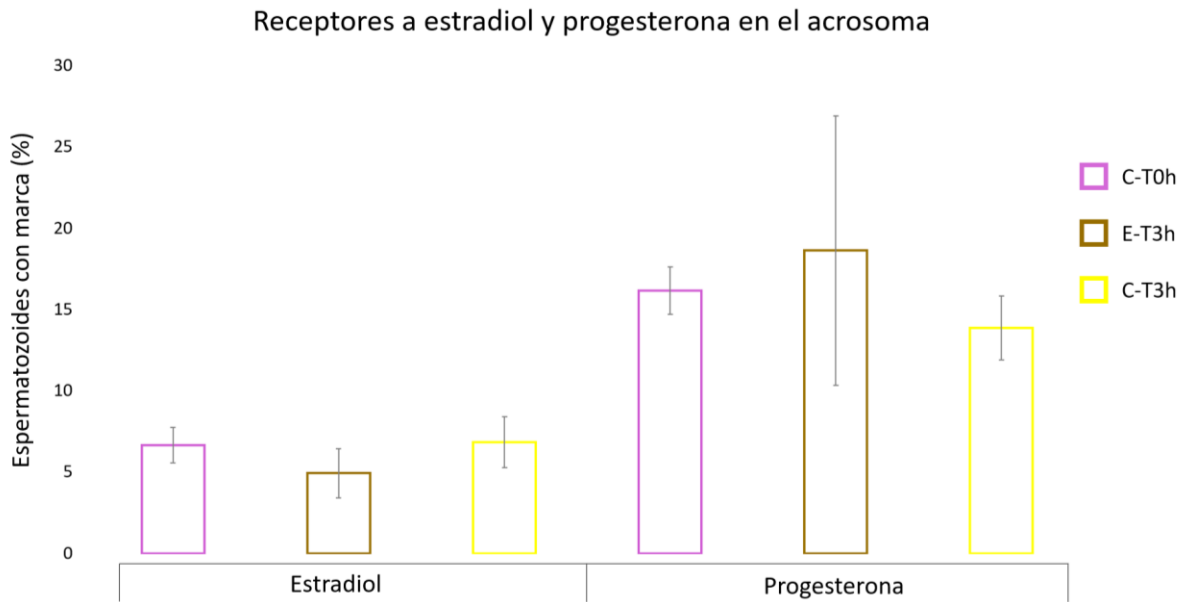


Figura 27. Porcentaje de espermatozoides de *S. aeneus* que presentaron marca a $R\alpha-E_2$ y $R-P_4$ en el acrosoma de acuerdo con el medio (capacitante: \square y no capacitante: \square , \square) y tiempo de incubación (cero horas: T0h y tres horas: T3h).

Discusión

1. Características del semen

El semen eyaculado de todos los organismos presentó una apariencia blanca, de consistencia espesa y en algunos casos más fluida. Estas características han sido reportadas en el semen de otros reptiles, como iguanas (Zimmerman *et al.*, 2013), serpientes (Zacariotti *et al.*, 2007) y algunas especies de lagartos del género *Sceloporus* (Martínez-Torres *et al.*, 2019; Sánchez-Rivera, 2020), por lo que pueden considerarse como “normales”. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios para certificar la calidad espermática y descartar que presenten anomalías morfológicas y/o funcionales. El volumen de semen obtenido en *S. torquatus* y *S. aeneus* fue menor al descrito por Martínez-Torres *et al.* (2019) y por Sánchez-Rivera (2020). Sin embargo, la concentración espermática de *S. aeneus* concuerda con lo descrito por Sánchez-Rivera (2020). A pesar de que *S. aeneus* es una especie con menor tamaño corporal que *S. torquatus*, la primera presentó una mayor concentración espermática. Esto puede ocurrir como una compensación por un menor volumen de semen eyaculado (Gist *et al.*, 2000).

2. Localización de R α -E₂ y R-P₄

Se ha demostrado que el E₂ y la P₄ participan en la capacitación espermática, induciendo mediante mecanismos no genómicos, el influjo de Ca⁺² al espermatozoide, así como la remoción del colesterol de la membrana plasmática (Aquila y De Amicis, 2014; López-Torres y Chirinos, 2017). Los receptores a E₂ y P₄ han sido localizados en distintas regiones de los espermatozoides de diversos mamíferos, pero hasta el momento no se han descrito en reptiles. La presente investigación reveló la presencia de R α -E₂ y R-P₄ en los espermatozoides de *S. torquatus* y *S. aeneus*, estableciendo que la marca a estos receptores se encontró principalmente en la pieza media y en la cabeza, particularmente en el acrosoma. Esto coincide con lo descrito en espermatozoides de carnero (Gimeno-Martos *et al.*, 2017) donde se encontraron receptores a estas hormonas en la cabeza del espermatozoide y R-P₄ en la pieza media.

La presencia de R-P₄ también ha sido localizada en la cabeza espermática de otros mamíferos (humano; Sabeur *et al.*, 1996; cabra; Somanath y Gandhi, 2002; jabalí; De Amicis *et al.*, 2012) y en la pieza media (humano; De Amicis *et al.*, 2011; jabalí; De Amicis *et al.*, 2012). Los R α -E₂, a su vez, se han descrito en la cabeza (humano; Solakidi *et al.*, 2005; caballo; Arkoun *et al.*, 2014), pieza media (cerdo; Rago *et al.*, 2007; humano; Guido *et al.*, 2011) y flagelo (caballo; Arkoun *et al.*, 2014) del espermatozoide. Se encontraron marcas de R-P₄ en la región postacrosomal, pero sólo en algunos espermatozoides hinchados de *S. torquatus*. Esto puede deberse a que modificaciones en la morfología pueden alterar la presencia y distribución de los receptores en la membrana. Estas anomalías en la morfología podrían estar relacionadas con la infertilidad intrínseca de los espermatozoides causada fundamentalmente por defectos durante la espermatogénesis (Skowronek *et al.*, 2010; Rajender *et al.*, 2011) o con el manejo de la muestra. Las diferencias en la localización de estos receptores en espermatozoides de diversas especies pueden ser atribuidas a patrones de expresión específicos de la especie (Sirivaidyapong *et al.*, 2001; Gimeno-Martos *et al.*, 2017). Asimismo, la expresión de estos receptores en dos regiones distintas del espermatozoide sugiere distintos roles de participación de estas hormonas en la fisiología espermática. Los receptores posicionados en la pieza media podrían estar involucrados en la regulación del movimiento flagelar y aquellos en el acrosoma estarían involucrados en la reacción acrosomal.

3. Regulación de la actividad espermática

El movimiento flagelar en el espermatozoide de los mamíferos está dado por las proteínas motoras (dineínas) presentes en el axonema (Inaba, 2003), las cuales pueden ser activadas mediante distintos mecanismos. En el citoplasma, la hiperactivación del flagelo es mediada en gran medida por la participación de distintos cationes (Ca^{+2} , Na^{+} , K^{+} y H^{+}). El tránsito de éstos puede ser inducido por las diferencias de concentración extra e intracelular o la unión de ligandos (P_4 y E_2) a receptores de membrana. El intercambio de cationes provoca cambios en la composición iónica intracelular y subsecuentemente cambios en el potencial de membrana (Olivera *et al.*, 2006). La P_4 y E_2 inducen la entrada de Ca^{+2} a la célula a través de los canales Catsper, lo que provoca la activación de las enzimas ciclasas y el aumento de AMPc y GMPc en la célula. Consecutivamente se abren los canales de K^{+} dependientes de GMPc, lo que provoca la salida de K^{+} y posteriormente la hiperpolarización de la membrana espermática dependiente de AMPc. La hiperpolarización activa el intercambiador de voltaje dependiente Na^{+}/H con la consecuente salida de H^{+} , lo que induce la alcalinización del citosol y activa las dineínas (Olivera *et al.*, 2006). El calcio juega el papel más importante en la regulación del movimiento flagelar (Ho y Suárez, 2001). En espermatozoides de hámster el calcio extracelular es indispensable para mantener la hiperactivación (Yanagimachi, 1994). Una situación similar podría ocurrir también en los saurios.

La presencia de receptores a estos esteroides en la pieza media del espermatozoide de los saurios podría jugar un papel importante en la regulación de la movilidad del flagelo como ha sido observada en los mamíferos. En la pieza media, la entrada de Ca^{+2} provocada por la unión de E_2 y P_4 a sus receptores, genera el aumento de AMPc. Este aumento induce la fosforilación y desfosforilación de tirosinas mediadas por la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Olivera *et al.*, 2006). La subunidad catalítica de la PKA se encuentra anclada a los microtúbulos y posee una estructura única y específica en el espermatozoide. La PKA está ubicada muy cerca al brazo de dineína externo, lo que explicaría la rápida fosforilación que sufren los polipéptidos de la cadena liviana de este brazo en el momento de la activación de la movilidad (Inaba, 2003; Olivera *et al.*, 2006; Wirschell *et al.*, 2011). Además de esto, las fosfatasas unidas al axonema están relacionadas con la regulación de la fosforilación de la dineína y estas fosfatasas son dependientes de Ca^{+2} (Olivera *et al.*, 2006). Estos

estudios indican que el sitio crucial para la acción del Ca^{+2} es el axonema (Ho y Suárez, 2001).

Por otro lado, los receptores encontrados en el acrosoma del espermatozoide están relacionados con la regulación de la reacción acrosomal (Witte y Schäfer-Somi, 2007). La membrana plasmática del espermatozoide de los mamíferos presenta diferentes dominios de los esteroides de membrana en la cabeza y en la cola, confiriéndole una distribución heterogénea de los mismos a lo largo de toda la membrana. Estos dominios acoplan proteínas que inducen diferentes rutas de señalización. En la cabeza, el acrosoma se caracteriza por presentar islas de composición ordenada de colesterol y esfingolípidos anclados a caveolinas (Olivera *et al.*, 2006). La disminución del colesterol en la membrana es estrictamente necesaria para la activación de las tirosinas quinasas. Éstas inducen cambios en la conformación proteica de la membrana plasmática del espermatozoide y le otorga fluidez (Witte y Schäfer-Somi, 2007), por lo que la remoción del colesterol inducida por E_2 es fundamental en la capacitación y reacción acrosomal (López-Torres y Chirinos, 2017).

Así mismo, existen diversas evidencias que establecen que la reacción acrosomal puede ser inducida *in vitro* mediante la incubación de espermatozoides con P_4 o ionóforos de Ca^{+2} (Neild *et al.*, 2005) y es dependiente de la dosis de P_4 (Wu *et al.*, 2005). En caballos, la P_4 se une a su receptor no genómico en la región acrosomal de la membrana, expuesto durante la capacitación. Esta unión activa la proteína tirosina cinasa (PTK) acoplada a la fosfolipasa C (PLC). La PLC activada escinde el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). A su vez, el DAG estimula la proteína cinasa C (PKC) y lo traslada a la membrana plasmática, lo que conduce a la entrada de Ca^{+2} extracelular (Rathi *et al.*, 2003). El incremento de Ca^{+2} en el citosol causa la fosforilación de proteínas y resulta en la exocitosis de enzimas hidrolíticas en el acrosoma (Witte y Schäfer-Somi, 2007). En espermatozoides de ovejas, la P_4 provoca el incremento de Ca^{+2} así como la movilización de éste desde la pieza media al acrosoma (Gimeno-Martos *et al.*, 2020). Igualmente, la entrada de Ca^{+2} inducida por la P_4 provoca la desactivación de las ATPasas, además de aumentar el Na^+ intracelular y generar la salida de H^+ y, en consecuencia, un aumento del pH intracrosomal, lo que induce la activación de enzimas como la acrosina (Ríos *et al.*, 2010). Estas enzimas se liberan del acrosoma como consecuencia de la reacción acrosomal. Es posible que este mecanismo

descrito en los mamíferos ocurra en los espermatozoides de los reptiles. Es necesario, una vez establecida la presencia de receptores en estas dos estructuras, demostrar que participan en la promoción de la entrada de Ca^{+2} para fortalecer las propuestas arriba señaladas.

4. $R\alpha-E_2$ y $R-P_4$ en función del medio de incubación

La incubación de espermatozoides en medios capacitantes ha permitido realizar distintas investigaciones sobre la fisiología espermática. Se han utilizado medios adicionados con AMPc (Colas *et al.*, 2008; Gimeno-Martos *et al.*, 2017), inhibidores de fosfodiesterasas (Nixon *et al.*, 2016) y esteroides sexuales (P_4 ; Somanath y Gandhi, 2002). En este caso, los espermatozoides de *S. torquatus* y *S. aeneus* fueron incubados en medio Tyrode con albúmina de suero bovino y bicarbonato como agentes capacitantes. La albúmina es el aceptor del colesterol durante la remoción de éste de la membrana plasmática, lo cual es necesario para aumentar la fluidez de la membrana y permitir el curso de la capacitación (Fujinoki *et al.*, 2016). La salida de colesterol durante la capacitación también induce la activación de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje y de los canales de bicarbonato (HCO_3^-). El ingreso de este último al citosol, activa la adenilciclasa dependiente de HCO_3^- (ACs) que aumenta las concentraciones de AMPc, activando, a su vez, la proteína quinasa A1 (PKA1) (Olivera *et al.*, 2006; Fujinoki *et al.*, 2016). Estos agentes han demostrado la capacitación exitosa en espermatozoides de carnero (Grasa *et al.*, 2006) y cabra (Somanath y Gandhi, 2002).

En ambas especies de saurios, las marcas de los $R\alpha-E_2$ y $R-P_4$ se presentaron en mayor medida en la pieza media, en contraste con el acrosoma. Esta situación podría atribuirse a la necesidad de una mayor cantidad de receptores en la pieza media para mediar la entrada de una gran cantidad de Ca^{+2} a la célula que sea suficiente para promover la hiperactivación (Visconti *et al.*, 1990). Así mismo, en ambas especies, las marcas de los $R\alpha-E_2$ y $R-P_4$ se presentaron en el acrosoma y la pieza media desde el tiempo cero de incubación, lo cual concuerda con lo descrito por Somanath y Gandhi (2002) respecto a los $R-P_4$. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides que presentaron marcas de ambos receptores en la pieza media fueron significativamente más altos ($p < 0.05$) cuando éstos fueron incubados durante tres horas en medio no capacitante, con respecto a aquellos que no fueron incubados. A su vez, cuando los

espermatozoides fueron incubados en medio capacitante, este porcentaje fue significativamente más alto ($p < 0.05$) que en aquellos incubados en medio no capacitante. El aumento de espermatozoides que presentaron marca conforme avanza el tiempo de incubación y el cambio en el medio puede ser atribuido a una remodelación de la membrana plasmática (Ríos *et al.*, 2010; Gimeno-Martos *et al.*, 2017) que permite la exposición de los receptores al medio externo, o bien, a la remoción de factores descapacitantes adicionados por el plasma seminal que enmascaran a los receptores y que son removidos durante la capacitación (Olivera *et al.*, 2006; Ríos *et al.*, 2010). La exposición de los receptores en la membrana también podría ocurrir por la dilución del semen durante el tiempo de incubación en medio no capacitante, como sugieren Sirivaidyapong y colaboradores (2001).

En los espermatozoides de cabra, la disminución significativa de la marca en el acrosoma conforme avanza la incubación en medio capacitante podría sugerir la pérdida de la membrana plasmática en la región acrosomal atribuido a espermatozoides reaccionados (Somanath y Gandhi, 2002). Sin embargo, en la presente investigación, un porcentaje bajo de espermatozoides presentaron marca de R α -E₂ y R-P₄ en el acrosoma y no hubo diferencias significativas dependientes del medio de incubación o del tiempo. Debido a esto, se puede proponer que los espermatozoides de *S. torquatus* y *S. aeneus* no alcanzaron la fase de la reacción acrosomal, es decir, experimentaron los primeros momentos de la capacitación espermática como la hipermovilidad. En caballos, la proporción de espermatozoides con R-P₄ expuestos parece correlacionarse con la fertilidad de un animal dado (Rathi *et al.*, 2003). Estas evidencias muestran la importancia de los receptores de progesterona en el acrosoma, por lo que una situación similar puede ocurrir en los espermatozoides de los saurios aquí estudiados. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta en investigaciones futuras el estudio de la integridad de la membrana plasmática para obtener una visión más adecuada del estado funcional de los espermatozoides.

Conclusiones

- Se demostró la presencia de R α -E₂ y R-P₄ en espermatozoides de *S. torquatus* y *S. aeneus*.
- Ambos receptores se encontraron en la pieza media y el acrosoma de los espermatozoides.
- En ambas especies, el porcentaje de espermatozoides que presentó R-P₄ y R α -E₂ en la pieza media aumentó significativamente después de su incubación en medio capacitante.
- En el acrosoma, la presencia de ambos receptores no mostró diferencias significativas de acuerdo con el medio de incubación o con el tiempo.

Referencias

- Aguirre-León, G. 2011. Métodos de estimación, captura y contención de anfibios y reptiles. *Manual de Técnicas para el estudio de la Fauna*, 1, 48-65.
- Anawalt, B. D. y G. D. Braunstein. 2019. Testículos. In: Gardner DG, Shoback D. eds. Greenspan. Endocrinología básica y clínica 10e. McGraw Hill.
- Andrews, R.M. 1997. Evolution of viviparity: Variation between two sceloporine lizards in the ability to extend egg retention. *J Zool*, 243, 579-595.
- Aquila, S. y F. De Amicis. 2014. Steroid receptors and their ligands: Effects on male gamete functions. *Exp Cell Res*, 328, 303-313.
- Arienti G, E. Carlini, C. Saccardi y C. A. Palmerini. 2004. Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. *J Cell Mol Med*, 8, 77-84.
- Arkoun, B., C. Gautier, C. Delalande, I. Barrier-Battut, I., Guénon, D. Goux y H. Bouraïma-Lelong. 2014. Stallion spermatozoa: Putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors ESR1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER. *Gen Comp Endocrinol*, 200, 35-43.
- Astle, S., D. M. Slater y S. Thornton. 2003. The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 108, 177-181.
- Ax, R. L., M. Dally, B. A. Didion, R. W. Lenz, C. C. Love, D. D. Varner y M. E. Bellin. 2016. *Semen Evaluation. Reprod Farm Anim*, 363-375.
- Baldi E., M. Luconi, M. Muratori y G. Forti. 2000. A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Mol Cell Endocrinol*, 161, 31-35.

- Baldi E., M. Luconi, M. Muratori, S. Marchiani, L. Tamburrino y G. Forti. 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol*, 308, 39-46.
- Barbeito, C. G. 2008. Historia de las placentas y su relación con la morfología. *Ciencias Morfológicas*, 10, 1-15.
- Bastidas, O. 2002. Conteo Celular con Hematocitómetro Uso Elemental del Hematocitómetro.
- Bello-Álvarez, C. 2022. Papel de la interacción entre los receptores intracelulares a progesterona y la proteína cSRC, en la migración e invasión de células de glioblastoma humano (Tesis de doctorado). UNAM.
- Bottino, M. C., y C. Lanari. 2010. Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 70, 173-184.
- Canales-Delgadillo, J. C., T. A. Altamirano-Álvarez y M. Soriano-Sarabia. 2004. Riqueza avifaunística del municipio de Isidro Fabela, Estado de México. *Rev Zool*, 14-19.
- Carlotto, R., A. Fernández, M. Lira. y A. Santiani, A. 2011. Momento de adición del glicerol sobre la calidad espermática en la criopreservación de semen canino. *Rev Investig Vet Perú*, 22,183-189.
- Checa-Rojas, A. 2017. Método: Disolución amortiguadora de fosfatos (PBS). *Conogasi*. Recuperado de <https://conogasi.org/articulos/metodo-disolucion-amortiguadora-de-fosfatos-pbs/> Consultado el 23 de junio del 2022.
- Colas, C., P. James, L. Howes, R. Jones, J. A. Cebrian-Perez y T. Muino-Blanco. 2008. Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod Fertil Dev*, 20, 649-658.
- Colbert, H. E. 1980. Evolution of the Vertebrates, A History of the backboneed animals through time. 3era ed. Universidad de Michigan. pp 510.
- Colli, G. R., R. D. Teixeira, D. M. Scheltinga, D. O. Mesquita, H. C. Wiederhecker, y S. N. Báó. 2007. Comparative study of sperm ultrastructure of five species of teiid lizards (Teiidae, Squamata), and *Cercosaura ocellata* (Gymnophthalmidae, Squamata). *Tissue Cell*, 39, 59-78.
- Conner J y D. Crews. 1980. Sperm transfer and storage in the lizard, *Anolis carolinensis*. *J Morphol* 163, 331-348.

- Crocco, M., N. R. Ibarquengoytía y V. Cussac. 2008. Contributions to the study of oviparity–viviparity transition: Placentary structures of *Liolaemus elongatus* (Squamata: Liolaemidae). *J Morphol*, 269, 865-874.
- Cuellar O. 1966. Oviductal anatomy and sperm storage structures in lizards. *J Morphol* 119, 129-136.
- Cuellar, O. 1987. The evolution of parthenogenesis: A historical perspective. *Meiosis*, New York: Academic Press pp. 43-103.
- Dávila-Govantes, R., A. Medrano, A. Alcántar, U. Sánchez-Rivera, N. Cruz-Cano y M. Martínez-Torres. 2018. En: VX Congreso Luso-Español de Herpetología / XIX Congreso Español de Herpetología, Libro de resúmenes. Colino-Rabanal, V.J., M. Lizana y JJ. Morales (eds.), Salamanca, España.
- De Amicis, F., C. Guido, I. Perrotta, P. Avena, S. Panza, S., Andò, S., y S. Aquila. 2011. Conventional progesterone receptors (PR) B and PRA are expressed in human spermatozoa and may be involved in the pathophysiology of varicocoele: a role for progesterone in metabolism. *Int J Androl*, 34, 430-445.
- De Amicis, F., M. Santoro, C. Guido, D. Sisci, R. Bruno, A. Carpino y S. Aquila. 2012. Progesterone through progesterone receptors affects survival and metabolism of pig sperm. *Anim Reprod Sci*, 135, 75-84.
- De Jonge, C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod*, 11, 205-214.
- Depeiges A. y J. L. Dacheux. 1985. Acquisition of sperm motility and its maintenance during storage in the lizard, *Lacerta vivipara*. *J Reprod Fertil*, 74, 23-27.
- Díaz-Chico, B. N., D. Navarro-Bosch y M. Zumbado-Peña. 2004. Hormonas y cáncer: carcinogénesis mamaria por estrógenos. *Biocancer*, 1.
- Dixon, J. R. y J. A. Lemos-Espinal. 2010. Anfibios y reptiles del estado de Querétaro, México. Universidad de Texas y Universidad Nacional Autónoma de México, pp 65-79.
- Feki, N. C., P. Therond, M. Couturier, G. Limea, A. Legrand, P. Jouannet y J. Auger. 2004. Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. *Mol Hum Reprod*, 10, 137-142.
- Flores-Villela, O., y U. O. García-Vázquez. 2014. Biodiversity of reptiles in Mexico. *Rev Mex Biodivers*, 85, 467-475.

- Ford, W. C. L. 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 10, 387-399.
- Fujinoki, M., G. Takei y H. Kon, H. 2016. Non-genomic regulation and disruption of spermatozoal in vitro hyperactivation by oviductal hormones. *J Physiol Sci.*, 66, 207-212.
- Gadsden, H., R. Martínez, F. Méndez-de la Cruz y F. Rodríguez-Romero. 2005. Ciclo reproductor de *Sceloporus Poinsettii* Baird y Girard 1852 (Squamata: Phrynosomatidae) en el centro del Desierto Chihuahuense, México. *Acta Zool Mex*, 21, 93-107.
- Gallardo, J. M. 1979. Importancia de la conservación de las faunas de anfibios y reptiles. *Acta ZoolLilloana*, 102-106.
- García, J. L. 2014. Dimorfismo sexual en tamaño y forma corporal en *Sceloporus gadoviae* y *Sceloporus torquatus* (Squamata: Phrynosomatidae). Tesis de Licenciatura. UNAM.
- García-Mares, A. 2018. *Diagnóstico ambiental de un ecosistema forestal en el Municipio de Isidro Fabela-Tlazala, Estado de México* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.
- Gimeno-Martos, S., M. González-Arto, A. Casao, M. Gallego, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, y R. Pérez-Pé. 2017. Steroid hormone receptors and direct effects of steroid hormones on ram spermatozoa. *Reproduction*, 154, 469-481.
- Gimeno-Martos, S., S. Miguel-Jiménez, A. Casao, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco y R. Pérez-Pe. 2020. Underlying molecular mechanism in the modulation of the ram sperm acrosome reaction by progesterone and 17 β -estradiol. *Anim Reprod Sci*, 222.
- Grados Porro, E. 2019. *Papel de las hormonas esteroideas sexuales en las crisis de ausencia en ratas mutantes de Mielina Taiep* (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Grasa, P., J. A. Cebrian-Perez y T. Muino-Blanco. 2006. *Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation*. *Reprod*, 132, 721-732.
- Gist, D. H., T. W. Turner y J. D. Congdon. 2000. Chemical and thermal effects on the viability and motility of spermatozoa from the turtle epididymis. *J Reprod Fertil*, 119, 271-278.

- Guerra-Araiza, C. y I. Camacho Arroyo. 2000. Las isoformas del receptor a progesterona: función y regulación. *Rev invest Clin*, 52, 686-91.
- Guido, C., I. Perrotta, S. Panza, E. Middea, P. Avena, M. Santoro, S. Marsico, P. Imbrogno, S. Andò y S. Aquila. 2011. Human sperm physiology: estrogen 471 receptor alpha (ERa) and estrogen receptor beta (ERb) influence sperm 472 metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele- 473 associated male infertility. *J Cell Physiol* 226, 3403-3412.
- Guidobaldi H., M. Teves, D. Unates, A. Anastasia y L. Giojalas. 2008. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One*, 3, 3040.
- Guillette, L. J., y G. Casas-Andreu. 1980. Fall reproductive activity in the high altitude Mexican lizard, *Sceloporus grammicus microlepidotus*. *J Herpetol*, 14, 143-147.
- Guillette, L. J., R. E. Jones, K. T. Fitzgerald y H. M. Smith. 1980. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus*. *Herpetol*, 43, 201-215.
- Guillette, L. J., y F. R. M. Méndez-de la Cruz. 1993. The Reproductive Cycle of the Viviparous Mexican Lizard *Sceloporus torquatus*. *J Herpetol*, 27, 168.
- Halliday, T. y K. Adler. 2007. La gran enciclopedia de los anfibios y reptiles. Editorial LIBSA, Madrid, España, 240 pp.
- Hernández-Barreña, D. 2017. Los reptiles, pioneros fuera del agua. *Hombre geológico*. Tomado de <https://geologicalmanblog.wordpress.com/2017/06/28/origen-reptiles/>
- Hill W. H., A. W. Gordon y M. Anderson. 2006. Fisiología animal. Ed. Panamericana. Argentina. 1038 pp.
- Ho, H. C., y S. S. Suarez. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reprod*, 122, 519-526.
- Hsiao E. C. y D. G. Gardner. 2019. Hormonas y acción hormonal. Gardner D.G., y Shoback D. (Eds.), *Greenspan. Endocrinología básica y clínica 10e*. McGraw Hill.
- Ibargüengoytía, N. 2008. Estrategias reproductivas en reptiles. Reptiles de Chile. 392-425.
- Inaba K. 2003. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zool Sci*, 20,1043-1056.

- Jameson, J. L. y T. R. Harrison. 2013. *Harrison's endocrinology*. 1a edición. McGraw-Hill Medical.
- Jensen, E. V. y E. R. DeSombre. 1972. Mechanism of action of the sex hormones. *Annu Rev Biochem*, 41, 203-223.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Pelto-Huikko, S. Nilsson y J. A. Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci*, 93, 5925-5930.
- Kumari T. R. S., H. D. Sarkar y T. Shivanandappa. 1990. Histology and histochemistry of the oviductal sperm storage pockets of the agamid lizard *Calotes versicolor*. *J Morphol* 203, 97-106.
- Lagunas-Cortés, A. I. 2014. Ciclos reproductivos y de lípidos de la lagartija vivípara *Plestiodon indubitus* (Scincidae) al Noroeste del Estado de Morelos (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lenzi, A., M. Picardo, L. Gandini y F. Dondero. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod*, 2, 246-256.
- López-Torres, A. S. y M. Chirinos. 2017. Modulation of human sperm capacitation by progesterone, estradiol, and luteinizing hormone. *Reprod Sci*, 24, 193-201.
- López-Úbeda R., y C. Matás. 2015. An Approach to the Factors Related to Sperm Capacitation Process. *Andrology-Open*, 4.
- Lu Y., R. Huo, Y. Yuan, J. Li, Q. Shi y J. Sha. 2006. Human testicular protein NYD-SP16 is involved in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril* 86, 1228-1234.
- Luconi, M., M. Muratori, G. Forti y E. Baldi. 1999. Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J Clin Endocrinol Metabol* 84,1670-1678.
- Luna-Reyes, R., L. Canseco-Márquez y E. Hernández-García. 2013. Los reptiles. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Ed.). La biodiversidad de Chiapas, Estudio de Estado: México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)/Gobierno del Estado de Chiapas*, 319-328.

- Malgor, L. A. y M. E. Valsecia. 2013. *Farmacología de las hormonas sexuales femeninas*. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Recuperado de https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap26_femen.pdf
- Manríquez-Morán, N. L., M. Vigllagrán-Santa Cruz y F. R. Méndez-de la Cruz. 2013. Reproductive activity in females of the oviparous lizard *Sceloporus aeneus*. *The Southwestern Naturalist*, 58, 325-329.
- Manríquez-Morán, N. L. 2014. Partenogénesis en reptiles. *Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingeniería*, 2.
- Marcos-Becerro, J.F. 2008. Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. *Rev Andaluza Med del Deport*, 1, 22-36.
- Márquez, D. C. 2010. Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina. Universidad de California, Los Ángeles.
- Martí-n, J. y P. López. 2009. Evolución de señales químicas en los procesos de selección sexual en reptiles. En: Dopazo, H. y Navarro, A. (Eds.) *Adaptación y Evolución. 150 Años Después del Origen de las Especies*. Sociedad Española de Biología Evolutiva. Ed. Obra Propia, Valencia, pp: 261-269.
- Martínez-Méndez N. y F. Méndez- de la Cruz. 2007. Molecular phylogeny of the *Sceloporus t. torquatus* species-group (Squamata:Phrynosomatidae). *Zootaxa*, 1609, 53-68.
- 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), UNAM.
- Martínez-Torres, M. 2009. Almacenamiento de espermatozoides en la vagina de la lagartija vivípara *Sceloporus torquatus* (Sauria: Phrynosomatidae). *Acta Zool Mex*, 25, 497-506.
- Martínez-Torres, M., U. A. Sánchez-Rivera, N. B. Cruz-Cano, Y. J. Castro-Camacho, J. Luis y A. Medrano. 2019. A non-invasive method for semen collection and evaluation in small and median size lizards. *Reprod Dom Anim*, 54, 54-58.
- Melendrez, C.S., S. Meizel y T. Berger. 1994. Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction *in vitro*. *Mol Repro Dev*, 39, 433-438.

- Méndez, F. R. y M. Villagrán. 1998. Reproducción asincrónica de *Sceloporus palaciosi* (Sauria: Phrynosomatidae) en México, con comentarios sobre sus ventajas y regulación. *Rev Biol Trop*, 46, 1159-1161.
- Méndez-de la Cruz, L. J., J. R. Guillette, M. Villagrán-Santa Cruz, y G. Casas-Andreu. 1988. Reproductive and fat body cycle of the viviparous lizard *Sceloporus mucronatus*. *J. Herpetol*, 22, 1-12.
- Meyers S. A., J. W. Overstreet, K. Liu y E. Z. Drobnis. 1995. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J Androl*, 16, 47-54.
- Mosselman, S., J. Polman y R. Dijkma. 1996. ER- β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*, 392, 49-53.
- Neild, D.N., B. M. Gadella, A. Agüero, T. A. E. Stout y B. Colenbrander. 2005. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim Reprod Sci*, 89, 47-56.
- Nelson, G. E., G. G. Robinson y R. A. Boolootian. 1973. *Conceptos Fundamentales de Biología*. Limusa. Mexico.
- Nilsson, S., S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson y J. A. Gustafsson. 2001. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol Rev*, 81, 1535-1565.
- Nixon, B., A. Anderson, N. Smith, R. McLeod y S. Johnston. 2016. The Australian saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) provides evidence that the capacitation of spermatozoa may extend beyond the mammalian lineage. *Proc Biol Sci*, 283.
- Olivera, M., T. Ruiz, A. Tarazona y C. Giraldo. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 19, 426-436.
- Oren-Benaroya R., R. Orvieto, A. Gakamsky, M. Pinchasov y M. Eisenbach. 2008. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod*, 23, 2339-2345.
- Osman, R. A., M. L. Andria, A. D. Jones y S. Meizel. 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 828-833.
- Pentikäinen, V., K. Erkkilä, L. Suomalainen, M. Parvinen y L. Dunkel. 2000. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol*, 85, 2057-2067.

- Plan Municipal de Desarrollo Urbano de Isidro Fabela. 2009. Obtenido de: http://seduv.edomexico.gob.mx/planes_municipales/isidro_fabela/Documento%20PMDUIsidroFabela.pdf
- Qi, H., M. M. Moran, B. Navarro, J. A. Chong, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky y D. E. Clapham. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *PNAS*, 104, 1219-1223.
- Rago, V., S. Aquila, R. Panza y A. Carpino. 2007. Cytochrome P450arom, androgen 525 and estrogen receptors in pig sperm. *Reprod Biol Endocrinol*, 5, 1-6.
- Rajender, S., K. Avery y A. Agarwal. 2011. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*, 727, 62-71.
- Ramírez-Bautista, A., U. Hernández-Salinas, R. Cruz-Elizalde, A. Lozano y F. D. J. Rodríguez-Romero. 2016. Sexual dimorphism and reproductive traits over time in *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae), based on a population in the Transmexican Volcanic Belt, Mexico. *Salamandra*, 52, 197-203.
- Ramírez-Bautista, A., R. Cruz-Elizalde, A. P. Martínez-Falcón, U. Hernández-Salinas y C. Berriozabal-Islas. 2021. ¿Por qué la retención de los huevos en especies ovíparas es un paso a la viviparidad?: un ejemplo con lagartijas. *Cuadernos de Biodiversidad* 60, 26-32.
- Rathí, R., B. Colenbrander, T. A. E. Stout, M. M. Bevers y B. M. Gadella. 2003. Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Mol Reprod Dev*, 64, 120-128.
- Razandi, M., A. Pedram, G. L. Greene y E. R. Levin. 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: Studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*, 13, 307-19.
- Reichardt, H. M. y G. Schütz. 1998. Glucocorticoid signalling - Multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol*, 146, 1-6.
- Ríos, E. A., A. C. Ruiz, D. A. García, P. J. Rubio, A. R. Tobón y A. R. García. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *ContactoS*, 78, 5-11.
- Roa, I., C. Smok, y R. Prieto. 2012. Placenta: Anatomía e histología comparada. *Int J Morphol*, 30, 1490-1496.

- Rogers, J. B., y R. Yanagimachi. 1975. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biol Reprod*, 13, 568-575.
- Roldan, E. R., T. Murase y Q. X. Shi. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266, 1578-1581.
- Sabeur, K., D. P. Edwards y S. Meizel. 1996. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod*, 54, 993-1001.
- Saint-Girons H. 1962. Presence de receptacles seminaux chez les cameleons. *Beaufortia* 9, 165-172.
- Salazar-Cartín, J. A. 2019. Biología de la capacitación espermática: un proceso in vivo. *Rev Col Microb Quim Clin de Costa Rica*, 25.
- Salinas, P., F. Pezo, R. Sánchez y J. Risopatrón. 2014. Validación de SYBR-14 y 6-CFDA para Evaluar la Viabilidad e Integridad de la Membrana Plasmática en Espermatozoides Caninos de Raza Chihuahua. *Int J Morphol*, 32,16-21.
- Sánchez-Pastrana, B. L. 2022. El estradiol y el receptor alfa estrogénico en la regulación de la conducta materna del gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) (Tesis de Licenciatura). UNAM.
- Sánchez-Rivera, U. A. 2017. *Análisis hormonal y citológico de la espermatogénesis mediante biopsia testicular en Sceloporus torquatus* (Sauria: Phrynosomatidae) (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez-Rivera, U. A. 2020. Implementación de una metodología para la criopreservación de espermatozoides de saurios del género *Sceloporus*. Tesis de Maestría, UNAM.
- Schafer, G.C. y C. E. Roeding. 1973. Evidence for vaginal sperm storage in the mole skink, *Eumeces egregius*. *Copeia*, 1973, 346–347.
- Sebkova, N., M. Cerna, L. Ded, J. Peknicova, y K. Dvorakova-Hortova. 2012. The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens. *Reproduction*, 143.
- SEDEMA. 2022. Sierra de Guadalupe. Obtenido de: <http://www.sadsma.cdmx.gob.mx:9000/rally/pex/assets/pages/sitios/sierraG.php>

- Sen, S., G. Chowdhury y M. Chowdhury. 2001. Sialic acid binding protein of human endometrium: its regulation by steroids. *Mol Cell Biochem*, 221, 17-23.
- Sinclair, E. A., J. B. Pramuk, R. L. Bezy, K. A. Crandall y J. W. Sites. 2009. DNA evidence for non-hybrid origins of parthenogenesis in natural populations of vertebrates. *Evolution*, 64, 1346-1357.
- Sinervo, B., F. Mendez-De-La-Cruz, D. B. Miles, B. Heulin, E. Bastiaans, M. Villagrán-Santa Cruz y J. W. Sites. 2010. Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science*, 328, 894-899.
- Sirivaidyapong, S., M. M. Bevers, B. M. Gadella y B. Colenbrander. 2001. Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved. *Mol Reprod Dev*, 58, 451-459.
- Sites, J. W., J. W. Archie, C. J. Cole, y O. Flores-Villela. 1992. A review of phylogenetic hypotheses for lizards of the genus *Sceloporus* (Phrynosomatidae): implications for ecological and evolutionary studies. *Bulletin of the AMNH*, (213), 1-110.
- Skowronek, M. F., J. Alciaturi, G. Casanova, A. Capurro, J. M. Montes y R. Sapiro. 2010. Value of quantitative ultramorphological sperm analysis in infertile men. *Reprod Biol*, 10, 125-139.
- Solakidi, S., A. M. Psarra, S. Nikolaropoulos y C. E. Sekeris. 2005. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod*, 20, 3481-3487.
- Somanath, P.R., K. Suraj y K. K. Gandhi. 2000. Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Ruminant Res*, 37, 279-286.
- Somanath, P. y K. Gandhi. 2002. Expression of membrane associated non-genomic progesterone receptor(s) in caprine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 74, 195-205.
- SOPs, Standard Operating Procedures. 2008. Laboratorio de genómica viral y humana. Facultad de medicina, UASLP.
- Sorensen, A. 1982. Evaluación de la aptitud reproductiva. En: Sorensen A. Reproducción animal, principios básicos y prácticos. 1° ed. Argentina: McGraw-Hill, pp.124-143.

- Stewart, J. R. y M. B. Thompson. 2000. Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol*, 127, 411-431.
- Suárez-Calderón, D. M., y I. Díaz-Yamal. 2008. Antagonistas de receptores de progesterona (PRA) y moduladores selectivos de receptores de progesterona (SPRM): aplicaciones en ginecología y obstetricia. *RCOG*, 59, 31-37.
- Teves M., F. Barbano, H. Guidobaldi, R. Sanchez, W. Miska y L. Giojalas. 2006. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril*, 86, 745-749.
- Travis, A. y G. Kopf. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest*, 110, 731-736.
- Trujillo-Sánchez, L. M., y G. Villamil-Jiménez. 2020. Hormonas esteroideas de origen sexual y su importancia en reproducción bovina. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Cooperativa de Colombia.
- Tsai, M. y B. W. O. Malley. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 63, 451-86.
- Vázquez, G. S. 2008. *Algunas características ecológicas y reproductivas de la lagartija de collar Sceloporus torquatus Weigmann 1828 (Squamata:Phrynosomatidae) en la Sierra de Tepetzotlán, Estado de México* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Villagrán-Santacruz, M. 1993. El huevo amniota y la evolución de los vertebrados. *Ciencias*, 1.
- Visconti, P. E., J. P. Muschietti, M. M. Flawia y J. G. Tezon. 1990. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochem Biophys*, 1054, 231-236.
- Vitt I. J. y J. P. Cadwell. 2013. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. 4th edition, Elsevier, United Kingdom, pp. 3-81.
- Whittington, C. M. 2021. Evolution of lizard viviparity. *Ecol Evol*, 5, 1476-1477.
- Wildt, D. E., M. Bush, J. Howard, S. O'Brien, D. Meltzer, A. Van Dyk y D. Brand. 1983. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Rep*, 29, 1019-1025.
- Wirschell, M., R. Yamamoto, L. Alford, A. Gokhale, A. Gaillard y W. S. Sale. 2011. Regulation of ciliary motility: Conserved protein kinases and

phosphatases are targeted and anchored in the ciliary axoneme. *Arch Biochem*, 510, 93-100.

- Witte, T. S. y S. Schäfer-Somi. 2007. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 102, 181-193.
- Yamano, S., J. Yamazaki, M. Irahara, A. Tokumura, K. Nakagawa y H. Saito. 2004. Human spermatozoa capacitated with progesterone or a long incubation show accelerated internalization by an alkyl ether lysophospholipid. *Fertil Steril*, 81, 605-610.
- Yanagimachi, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2, 371-372.
- Yáñez Soto, P. A. 2008. Evaluación de respuestas de tipo estrogénico, genómicas y no-genómicas, de un extracto de planta nativa (Tesis de Licenciatura). Universidad de Chile.
- Zacariotti, R. L., K. F. Grego, W. Fernandes, S. S. Sant'Anna y M. A. de Barros Vaz- Guimarães. 2007. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). *Zoo Biol*, 26, 155-160.
- Zheng, Y. y L. C. Murphy. 2016. Regulation of steroid hormone receptors and coregulators during the cell cycle highlights potential novel function in addition to roles as transcription factors. *Nucl Recept Signal*, 14.
- Zimmerman, D. M., M. A. Mitchell y B. H. Perry. 2013. Collection and characterization of semen from green iguanas (*Iguana iguana*). *Am J Vet Res*, 74, 1536-1541.