



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESARROLLO DE LAS GÓNADAS EN CRÍAS DE  
*Ctenosaura pectinata* (SAURIA: IGUANIDAE):  
ASPECTOS HISTOLÓGICOS Y  
ULTRAESTRUCTURALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

GABRIELA DÍAZ JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES

CODIRECTOR DE TESIS:  
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS



MÉXICO, D.F.

2008



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.

## Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno.          Apellido paterno:          Apellido materno:          Nombre (s):          Teléfono:          Universidad Nacional Autónoma de México          Facultad de Ciencias          Carrera:          No. de Cuenta:</p>	<p>1. Datos del alumno          Díaz          Juárez          Gabriela          15 53 05 70          Universidad Nacional Autónoma de México          Facultad de Ciencias          Biología          0-9139756-0</p>
<p>2. Datos del tutor.          Grado          Nombres (s)          Apellido paterno:          Apellido materno:</p>	<p>2. Datos del tutor.          Dr.          Víctor Hugo          Reynoso          Rosales</p>
<p>3. Datos del co-tutor.          Grado          Nombres (s)          Apellido paterno:          Apellido materno:</p>	<p>3. Datos del co-tutor.          Dr.          Horacio          Merchant          Larios</p>
<p>4. Datos del sinodal 1          Grado          Nombres (s)          Apellido paterno:          Apellido materno:</p>	<p>4. Datos del sinodal 1          Dr.          Víctor          Aguirre          Hidalgo</p>
<p>5. Datos del sinodal 2          Grado          Nombre (s)          Apellido paterno:          Apellido materno:</p>	<p>5. Datos del sinodal 2          Dra.          Patricia          Rivas          Manzano</p>
<p>6. Datos del sinodal 3          Grado          Nombre (s)          Apellido paterno:          Apellido materno:</p>	<p>6. Datos del sinodal 3          M. en C.          Juana Margarita          Garza          Castro</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito          Título:           No. de páginas:          Año:</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito          Desarrollo de las gónadas en crías de  <i>Ctenosaura pectinata</i> (Reptilia: Iguanidae):          Aspectos histológicos y ultraestructurales.          85 p.          2008</p>

## **AGRADECIMIENTOS**

A los integrantes del comité:

Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales de manera especial y sincera al por su apoyo y asesoría para la realización del presente trabajo. Por brindarme una segunda oportunidad, por su paciencia y confianza. Además de contar con su amistad e intercambiar ideas y comentarios sobre la vida.

Dr. Horacio Merchant Larios agradezco profundamente su asesoría, comentarios y las facilidades otorgadas que fueron una base para la realización de este trabajo.

Dr. Víctor Aguirre Hidalgo a quien manifiesto mi sincero agradecimiento por formar parte del comité, por su paciencia y tiempo dedicado a la revisión de la tesis, a sus atinados comentarios que sin duda le dieron orden y claridad al trabajo escrito. De manera personal agradezco por contar con su amistad y su agradable compañía en la CNAR y las salidas a Nizanda.

Dra. Patricia Rivas Manzano por aceptar ser parte del comité. Su asesoría y comentarios enriquecieron el trabajo escrito.

M. en C. Juana Margarita Garza Castro por aceptar ser parte del comité, por sus ideas y comentarios.

Agradezco de manera especial a Don Armando por facilitar mi estancia en la CNAR.

A Don José y al M. en C. Alejandro Marmolejo por la asesoría en la técnica histológica. Su amena charla hizo agradable mi estancia en el laboratorio del I.I.B.

A mis compañeros y amigos de la CNAR, Daniel, Oscar, Humberto, Xitlalli, Adriana, Lizbeth y Georgina por los buenos momentos en la CNAR y en Nizanda. Agradezco a todos los voluntarios que participaron en el proyecto y en las salidas a Nizanda.

A la familia Reyes Manuel por su hospitalidad, a Clau por hacernos sentir como en casa y a todos los pequeños que ahora ya no lo son tanto, Gerardo, Avi, Liz, Paty, Gocú por no permitir la cotidianidad en Nizanda.

El proyecto del que surgió el presente trabajo estuvo apoyado por el Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza. Proyecto A-1-99/034 al Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales.

Mis estudios estuvieron apoyados por el Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL), otorgada el 29 de junio del 2000 (Oficio SDE/CPROBETEL/091/VII.2000).

La realización de este trabajo en parte estuvo financiado por CONACYT Folio: P-46679Q al Dr. Horacio Merchant Larios, con el proyecto Bases celulares y moleculares de la determinación sexual por temperatura de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

**A mi hija**

**Andrea Natalia.**

## **DEDICATORIA**

Es difícil expresar de manera breve mi agradecimiento y plasmar en un papel mis sentimientos hacia las personas que han contribuido en mi formación académica y como ser humano, que aún sin nombrar a cada una de ellas se encuentran presentes en cada logro que he tenido y por lo tanto, forman parte de este sueño.

A mis padres Alfredo y Guadalupe por darme la vida, por el esfuerzo de cada día. Su paciencia y el respeto a mis ideas y carácter, su apoyo incondicional y confianza que me han permitido construir sueños, levantarme después de cada tropiezo y han logrado ponerme los pies sobre la tierra.

A mis hermanos J. Alfredo, L. Alberto y Ma. Cristina por las vivencias y alegrías que hemos compartido juntos, por su paciencia al soportarme en mis malos ratos. Sé que cuento con ustedes.

A Faty por ser una personita muy especial para mí, por tener una personalidad fuera de serie.

A mi abuelo Don Gonzalo. Siento un orgullo inmenso por ser su nieta. Gracias por su amor, su preocupación, apoyo y las agradables e inolvidables charlas.

A todos y cada uno de los integrantes de la excepcional Familia Juárez. Son un orgullo y mi inspiración. Gracias por ser incondicionales, por su cariño y por ser tan divertidos.

De manera sincera y con mucho cariño a Don Raúl y Doña Vicky, por su confianza y gran apoyo.

A Abraham por regalarme lo más hermoso de la vida y por contribuir a la realización de cada uno de mis sueños.

Tengo la fortuna y privilegio de contar con amigos excepcionales que han dejado valiosas enseñanzas y vivencias enriquecedoras, permitiéndome librar obstáculos y sirviéndome de brújula en el camino. Quiero agradecer sinceramente y con mucho cariño por el apoyo que siempre me han brindado, por el tiempo y el espacio que hemos compartido.

Samuel, Enrique y Maura, por los bellos recuerdos y por seguir creciendo juntos. Angélica, por todas las travesuras, por toda la lucha existencial y por tu filosofía. Cinthya, por tu paz, sabiduría, por escuchar mis locuras y poner orden a mis ideas, por los versos de “nuestro libro” y la hermosa familia que tienes. Picke, por ser un gran amigo, por las chelas y el mezcal de nanche, pero sobre todo por tu apoyo. Jacobo por lo divertido que es estar contigo. Paty, por los buenos recuerdos y todo lo que hemos vivido. Ángel, Por tu honestidad y franqueza, por confiar en mi y tus atinados comentarios. Axa, por tu sinceridad y paciencia al soportar mis quejas y enojos ante la vida. Gracias por tu apoyo y contar con vos en los momentos difíciles. Adán, por tu agradable persona y los ricos abrazos de oso. Ricardo, por ser una personita tan especial, por compartir conmigo tu locura. Gabo, Adrián y Luis, por su amena compañía durante la jornada laboral. Leo, por dibujarme una sonrisa con tus chistorettes y por tus comentarios que permitieron aclarar mis ideas y establecer el rumbo que debería tener mi trabajo. Fer, por estar en el momento y en el sitio correcto, por tus comentarios y por compartir conmigo un poco de tu espacio y de aquello que tanto disfrutas.



# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
2.1 Biología de la iguana negra	5
2.2 Distribución	7
2.3 Aspectos reproductivos	8
2.3.1 Ovogénesis	9
2.3.2 Espermatogénesis	10
<b>III. ANTECEDENTES</b>	<b>14</b>
3.1 Diferenciación sexual genética	14
3.2 Diferenciación gonadal	15
3.3 Acción de las hormonas en la diferenciación gonadal	16
3.4 Descripción del testículo	17
3.5 Descripción del ovario	18
3.6 Técnica no letal para identificar el sexo	20
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>VI. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
6.1 Objetivo general	23
6.2 Objetivos particulares	23
<b>VII. MÉTODO</b>	<b>24</b>
7.1 Zona de colecta	24
7.2 Obtención de ejemplares	26
7.3 Técnica histológica	26
7.4 Desarrollo gonadal	28
7.5 Sexado quirúrgico	28
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
8.1 Histología	31
8.1.1 Descripción macroscópica del testículo y el ovario	31
8.1.2 Descripción microscópica del testículo	36
8.1.3 Descripción microscópica del ovario	40
8.1.4 Diferencia en la estructura celular de machos y hembras	43
8.2 Descripción ultraestructural y del desarrollo del testículo	43
8.3 Descripción ultraestructural y del desarrollo del Ovario	49
8.4 Sexado quirúrgico	56
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>58</b>
9.1 Histología	58

9.2	Desarrollo del testículo	61
9.3	Desarrollo del ovario	61
9.3.1	Maduración de las gónadas	62
9.4	Ultraestructura y desarrollo	63
9.5	Sexado quirúrgico	65
<b>X. CONCLUSIONES</b>		66
<b>XI. LITERATURA CITADA</b>		67
<b>XII. APÉNDICE</b>		74
<b>XIII. GLOSARIO</b>		76

## I. RESUMEN

La iguana negra, *Ctenosaura pectinata* (Wiegman, 1834) es una especie endémica para México que se distribuye a lo largo de la Costa del Pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas. La destrucción de su hábitat, el consumo y comercio de la carne y huevos en algunas regiones han provocando que sus poblaciones disminuyan drásticamente y se considere como una especie amenazada.

La carencia de caracteres sexuales secundarios en *C. pectinata* en etapas tempranas dificulta su estudio y manejo. Con el fin de contribuir al conocimiento de su biología reproductiva, en el presente trabajo se estudiaron aspectos histológicos de las gónadas durante el desarrollo post-eclosión.

Las gónadas de las crías al momento de eclosionar presentan una diferenciación sexual. El testículo posee células germinales en abundancia, las células no se encuentran agrupadas en túbulos y la túnica albugínea no se distingue. El ovario consta de una corteza constituida de células germinales y ovocitos en desarrollo, y una zona medular donde se observan vasos sanguíneos y fibras de colágeno. En hembras como en machos, el desarrollo de los elementos celulares de la gónada no presenta cambios significativos entre las edades de recién eclosionada y de crías de cinco meses. Al año de edad el ovario presenta folículos primordiales, las células de la granulosa comienzan a diferenciarse. El testículo al año de edad presenta túbulos seminíferos ya constituidos y en algunos casos el lumen se logra distinguir.

En el estudio de la ultraestructura de los elementos celulares como ovocitos, ovogonias, células foliculares, espermatogonias, espermatocitos y células de Sertoli por medio de fotomicrografías electrónicas se evidenció la presencia de mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, núcleo, nucléolo, cromatina dispuesta en pequeños parches y pequeñas vesículas lipídicas. Rodeando a los ovocitos se disponen fibroblastos y fibras de colágeno, en el citoplasma del ovocito en desarrollo se observaron láminas anulares indicando que se encuentran en una etapa de gran actividad metabólica y de diferenciación.

El análisis histológico reveló que las gónadas de *C. pectinata* se encuentran diferenciadas en ovarios o testículos a pesar de carecer de dimorfismo sexual al momento de eclosionar. Siendo así, es posible aplicar la técnica de sexado quirúrgico a las crías para identificar el sexo sin necesidad de sacrificarlas. Para establecer la confiabilidad de esta técnica se compararon los resultados del sexado histológico y el sexado quirúrgico en 12 crías de cinco meses de edad. Se realizó una prueba de  $X^2$  para comparar ambas técnicas. Debido a que el tamaño de la muestra fue pequeño se realizó una prueba de confirmación, llamada prueba exacta de Fisher. Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas en el sexado con ambas técnicas. El estudio histológico de las gónadas certificó que la técnica de sexado quirúrgico es confiable, económica y que no presenta ningún riesgo para las crías.

## **II. INTRODUCCIÓN**

Entre las especies animales, la influencia de factores externos como la temperatura, humedad, altitud, disponibilidad de espacio y alimento, etcétera; y los factores internos como la acción de hormonas específicas, determinan la constitución de los caracteres sexuales primarios, es decir, los espermaductos y los oviductos. De igual manera, dichos factores intervienen en la presencia de los caracteres sexuales secundarios, que se refieren al conjunto de diferencias morfológicas entre machos y hembras de una misma especie. Dichas características sexuales secundarias no se encuentran relacionadas con el aparato reproductor, si no que están bajo la influencia de secreciones hormonales.

Los caracteres sexuales secundarios o dimorfismo sexual se manifiestan principalmente en los machos, los cuales hacen ostentación de sus mejores características a las hembras, quienes elegirán al macho que consideren óptimo para procrear (Young, 1985). Ejemplos de dimorfismo sexual entre hembras y machos de los diferentes grupos de vertebrados son: la presencia de plumajes con vistosos colores, ornamentaciones como astas y cuernos, pigmentación de la piel, diferencia de tamaño corporal, cantos, etcétera (Booolootian, 1985; Marshall, 1987). Particularmente en reptiles, la diferenciación sexual puede ir desde escamas de mayor tamaño alrededor del ano, ornamentaciones en el rostro y el dorso y cráneo de mayor tamaño, hasta estructuras de sujeción diseñadas especialmente para detener a la hembra y poros femorales secretores de hormonas que delimitan su territorio y atraen a la hembra. Los factores externos e internos antes mencionados no influyen de igual manera en todas las especies, en algunos casos se manifiestan hasta la etapa adulta, lo que hace casi imposible determinar el sexo en edades

tempranas, *C. pectinata* (Wiegman, 1834) también conocida como iguana negra, garrobo o guchachi, es un reptil iguánido que carece de dimorfismo sexual al eclosionar (Figura 1).

Se conocen otros siete géneros de iguánidos que constituyen el grupo más primitivo de escamados vivientes, con especies insectívoras y herbívoras, terrestres, arborícolas y semimarinas. Dichos géneros son: *Amblyrhynchus* (iguana marina) que habita en las Islas Galápagos; *Brachylophus* (iguana de bandas), en las Islas Fiji y Tonga; *Conolophus* (iguana terrestre), en las Islas Galápagos; *Ctenosaura* (Garrobo) se distribuye de México a Panamá; *Cyclura* (Iguana de Roca) en las Antillas Mayores y Bahamas; *Dipsosaurus* (Iguana del desierto) del Suroeste de E.U. al Noroeste de México; *Iguana* (iguana verde) se extiende de México hasta Brasil y *Sauromalus* (iguana del desierto) en el Suroeste de E.U. y México en Sonora y Baja California. En México las especies de mayor tamaño son la iguana verde (*Iguana iguana*), iguana negra (*C. pectinata*) la iguana rayada (*C. similis*) y el tilcampo (*C. acanthura*) (Alvarado y Suazo, 1996; Frost *et al.*, 2001).

La iguana negra es endémica de México. En algunas regiones del país, debido al uso tradicional, los nativos utilizan principalmente hembras preñadas silvestres de esta especie para su consumo y comercialización afectando severamente sus poblaciones. La Norma Oficial Mexicana la considera como una especie amenazada (NOM-ECOL- 059-2001). A pesar de que los nativos conocen aspectos sobre dichos organismos, estos son escasos, ya que ignoran que al utilizar a la especie en época reproductiva interrumpen parte importantísima de su ciclo de vida.

Con el fin de establecer programas de manejo para su conservación y así evitar su extinción ha surgido el interés de realizar estudios que aporten información sobre

la biología de especies de importancia económica, como es la iguana negra y la iguana verde.

En particular, la carencia de dimorfismo sexual de las crías al eclosionar dificulta su estudio y manejo en etapas tempranas. Dicha especie alcanza la madurez sexual entre los tres y cuatro años de edad (Köhler, 1999) (Figura 2). El dimorfismo sexual redistingue a partir de los 21 meses de edad (Arcos-García *et al.*, 2005).

El estudio de las gónadas de crías de la iguana negra (*C. pectinata*) mediante la técnica histológica para microscopía electrónica, permitió conocer si las crías se encuentran diferenciadas en hembras y machos. La ultraestructura facilita el análisis cualitativo sobre el desarrollo que manifiestan las gónadas y de esta manera avalar la técnica no letal de sexado quirúrgico.



Figura 1. Crías de *C. pectinata*



Figura 2. Macho adulto de *C. pectinat*

## 2.1 Biología de la iguana negra

La iguana negra (*C. pectinata*), también conocida como garrobo o guchachi es una lagartija de gran tamaño de hábitos diurnos que alcanza un metro y medio de largo. Durante los primeros meses de vida su coloración es verde en el dorso y amarillo verdoso en el vientre. En estado adulto su coloración es gris a café amarillenta con bandas anchas transversales. El macho adulto se caracteriza por la presencia de una cresta dorsal prominente, poros femorales más desarrollados y en la cola anillos de escamas lisas y quilladas en forma de espinas (Alvarado y Suazo, 1996).

El crecimiento es lento, por lo que la etapa reproductiva se presenta hasta los tres años de edad (Arcos-García *et al.*, 2007). La etapa reproductiva se sitúa en los primeros meses del año, por lo que se considera que el apareamiento ocurre durante los meses de enero y marzo. La temporada de reproducción, la puesta de huevos y la anidación ocurren durante los meses de marzo y abril durante el periodo seco. En esta época la tierra tiene una temperatura adecuada, que asegura la máxima insolación del nido y minimiza el riesgo de inundación. Los lugares adecuados para la puesta son playas, claros de bosque y pequeñas islas dentro de áreas con vegetación y suelo arenoso y suave (Casas-Andréu y Valenzuela-López, 1984).

El desarrollo del embrión depende de las condiciones de humedad y temperatura durante la incubación. Estos factores influyen significativamente en el tamaño del cuerpo, la cabeza y la cola. La temperatura que ofrece mejor desarrollo es entre 29 y 31 °C y una humedad de 10 a 18%. La temperatura también influye en el periodo de eclosión, siendo el más corto de 75 días a 30 °C (Villegas-Zurita y Segovia-Sáenz, 1998). Si la incubación excede del rango de 28 a 31 °C la mortalidad embrionaria se incrementa (Casiano-González, 2001).

Las crías nacen al comienzo del periodo de lluvias, cuando el follaje es más abundante asegurando así el alimento y protección para las crías (Casas-Andréu y Valenzuela-López, 1984). El peso de las iguanas depende de la disponibilidad y calidad de alimento y no de la edad. En vida libre su alimentación se caracteriza de acuerdo con la edad. En crías su dieta principal se constituye de insectos, en juveniles principalmente de hojas, aunque también ingieren insectos, y en el estado adulto exclusivamente de hojas, ya que rara vez ingieren insectos (Arcos-García *et al.*, 2007).

La identificación del sexo en crías recién eclosionadas y hasta de seis meses de edad es muy difícil. Después de esta edad el peso y la longitud de la cabeza pueden ser útiles para distinguir el sexo. A los 21 meses de edad una característica importante es el incremento en el tamaño de los poros femorales en machos, además de presentar un abultamiento en la parte basal de la cola indicando la presencia de los hemipenes (Arcos-García *et al.*, 2005).



## 2.2 Distribución

La iguana negra se distribuye en el occidente de México a lo largo de las costas del Pacífico desde Sinaloa hasta el istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca y las islas Marías del Pacífico. Generalmente su hábitat es seco, en lugares abiertos y con rocas, entre las cuales tiene su madriguera (Köhler, 1999) (Figura 3).



Figura 3. Distribución de *Ctenosaura pectinata*. Tomado de Aguirre-Hidalgo (2002).

## 2.3 ASPECTOS REPRODUCTIVOS

En general en el grupo de los reptiles, el desarrollo gonadal presentan las mismas fases, con excepción de algunas especies de tortugas marinas que tienen gónadas bipotenciales, es decir que la diferenciación sexual esta determinada por la temperatura de incubación (Merchant-Larios, 1978). El desarrollo gonadal es más avanzado y complejo con respecto a la constitución de la granulosa en los escamados que en quelonios, ya que el epitelio folicular en lagartijas y serpientes presenta múltiples capas a diferencia de tortugas que es de una sola capa (Guraya, 1978).

El aparato reproductor de la hembra de *C. pectinata* presenta ovarios pareados situados delante de las glándulas adrenales y en la parte posterior del centro del cuerpo, entre el segundo y el tercer tercio del abdomen. En estado inactivo los oviductos son planos y pasan hacia atrás al lado de cada ovario, en dirección a la cloaca. El ovario de las iguanas se constituye de dos lechos germinales, como ocurre en la lagartija nocturna del desierto *Xantusia vigilis* (Familia Xantusidae), la lagartija caimán *Gerrhonotus coeruleus* (Familia Anguidae) y la lagartija escamosa *Sceloporus turquatus* (Familia Phrynosomatidae) (Uribe *et al.*, 1995).

En los machos los testículos son pareados y su tamaño depende de los cambios cíclicos. Los machos tienen un órgano copulador doble o hemipenes que no tiene relación directa con el espermaducto. Cada uno de los hemipenes tiene un surco espermático en la parte ventral, a través del cual los espermatozoides llegan a la cloaca de la hembra (Köhler, 1999).

### 2.3.1 Ovogénesis

El ciclo ovárico de las hembras se constituye de, a) una fase proliferativa que se caracteriza por la producción de un gran número de ovogonias; b) de la ovogénesis, en la que las de ovogonias se deberán diferenciar en ovocitos primarios; y c) la foliculogénesis, en la que los ovocitos primarios rodeados por las células foliculares se transforman en folículos primordiales. La constitución genética de la hembra y los factores externos influirán en el ciclo ovárico y en el número de folículos primordiales producidos (Tokars, 1978) (Figura4).

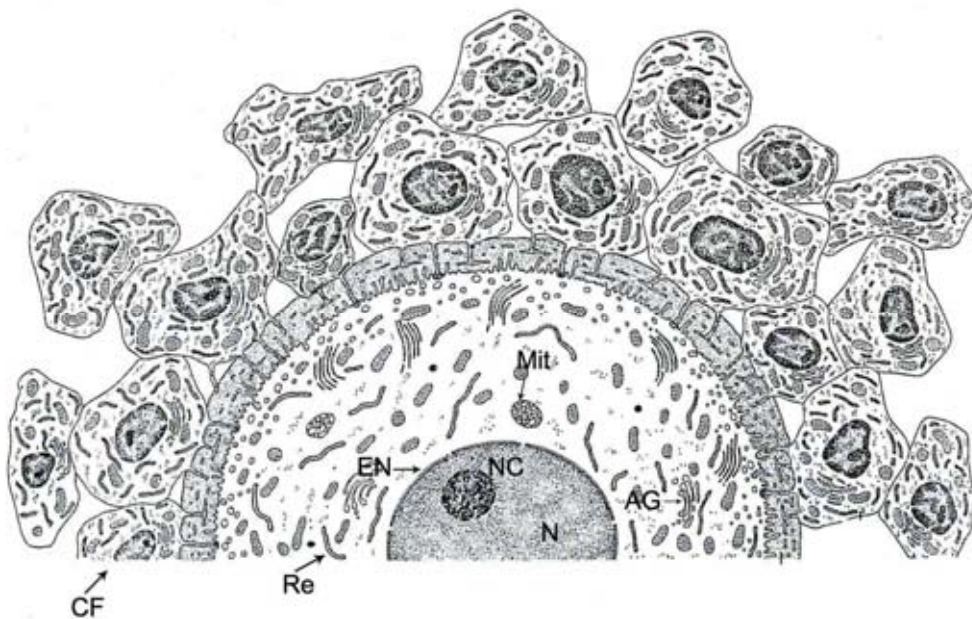


Figura 4. Dibujo de la ultraestructura del folículo primario de mamífero. Ejemplifica la disposición de las células foliculares (CF) que constituyen a la granulosa, además de los elementos del citoplasma como el retículo endoplásmico (Re), mitocondrias (Mit), aparato de Golgi (AG), núcleo (N) y nucleolo (NC). Dibujo modificado de Junqueira y Corneiro, (1982).

### 2.3.2 Espermatogénesis

El patrón espermatogénico en reptiles puede variar según la especie, pero en general se considera que se desarrolla en tres etapas; a) la multiplicación de las espermatogonias; b) la división de los espermatocitos; y la c) espermiogénesis (Villagrán-Santacruz *et al.*, 1994). El periodo reproductivo en reptiles es estacional, es decir, siguen un patrón determinado por las condiciones climáticas, como ha sido reportado para la iguana negra *C. pectinata* y la iguana verde *I. iguana* (Casas-Andréu y Valenzuela-López, 1984).

En algunas especies la maduración de las gónadas es rápida para adquirir la madurez sexual a corta edad, mientras que otras obtienen la madurez sexual después del año de edad; sin embargo, los cambios en el desarrollo de las gónadas son los mismos (Doddamani, 1994) (Figura 5).

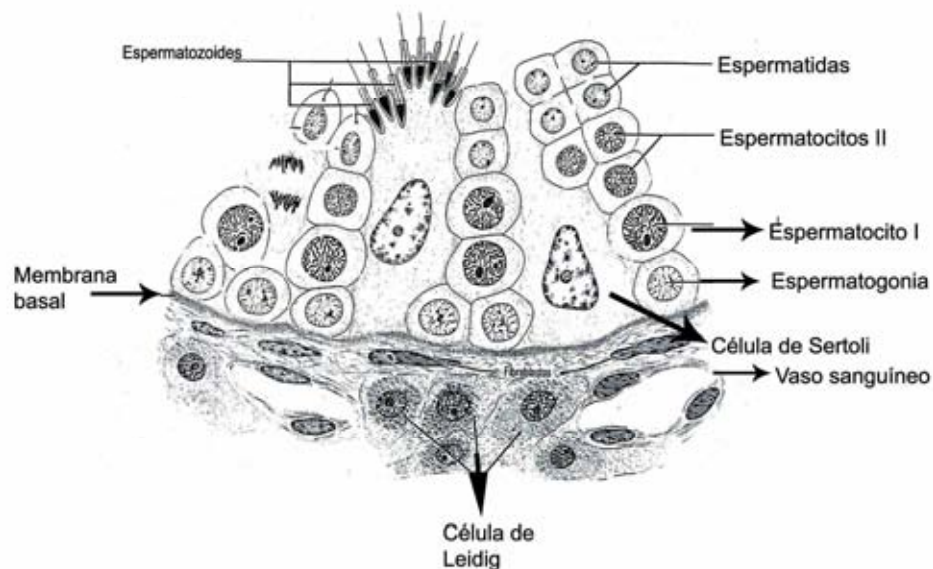


Figura 5. Dibujo del tubo seminífero maduro de mamífero. Ejemplifica la diferenciación de las espermatogonias y sus componentes. Abajo, el tejido intersticial del testículo. Las flechas indican los componentes que se observaron en las crías. Dibujo modificado de Junqueira y Corneiro, (1982).

La lagartija espinosa *Sceloporus jarrovi* (Familia Iguanidae) alcanza la madurez sexual a los seis meses de edad. Ballinger y Nietfeld (1989) describieron su ciclo espermático y ovárico en nueve estadios cada uno. Esta descripción puede servir para conocer el ciclo sexual de otros iguánidos:

### **Testículo**

Estadio 0. Diferenciación del testículo. Las células se agrupan en cordones y no se distinguen tipos celulares.

Estadio 1. Crecimiento del testículo. Los túbulos seminíferos se van desarrollando y están constituidos por células germinales, espermatogonias y espermatoцитos primarios, los cuales son más abundantes.

Estadio 2. Espermatogénesis temprana. El lumen de los túbulos se distingue y en la base de la pared del tubo descansan los espermatoцитos primarios.

Estadio 3. Espermatogénesis. Los túbulos seminíferos contienen espermatoцитos secundarios al margen del lumen.

Estadio 4. Actividad testicular. Se lleva a cabo el proceso de espermatogénesis, los espermatoцитos primarios disminuyen gradualmente y los espermatoцитos secundarios y espermátidas son más abundantes.

Estadio 5. Maduración del testículo. Se realiza la metamorfosis de las espermátidas en el lumen.

Estadio 6. Estado reproductivo. Se presentan espermatozoides maduros en el lumen y los túbulos seminíferos incrementan su diámetro.

Estadio 7. Testículo en post-producción. El diámetro del tubo seminífero disminuye y algunos espermatozoides permanecen en el lumen.

Estadio 8. Inactividad del testículo. Los túbulos seminíferos carecen de lumen y las células germinales no se encuentran en división.

## **Ovario**

Estadio 0. Diferenciación del ovario. El ovario contiene un epitelio delgado y lo rodea una agregación de mesénquima, no se desarrollan folículos y no son evidentes los nichos germinales.

Estadio 1. Ovario primordial. En un periodo breve, los nichos germinales sólo contienen ovogonias.

Estadio 2. Ovario pequeño. En una breve transición, el ovocito está rodeado por una capa simple de epitelio cuboidal. Se inicia la producción de folículos primordiales.

Estadio 3. Ovario inmaduro. El crecimiento de los folículos es constante, se expanden sobre el nicho germinal y se dirigen hacia el interior del ovario. El ovario contiene ovogonias, ovocitos desnudos y folículos primordiales y en crecimiento.

Estadio 4. Ovario en crecimiento. Se caracteriza por el crecimiento del folículo y las células de la granulosa comienzan con su crecimiento y diferenciación en células pequeñas, intermedias y piriformes.

Estadio 5. Ovario maduro. Las células piriformes de la granulosa son más abundantes, se inicia la formación de la teca y aparece la zona pelúcida. Este estadio es el último, previo a la vitelogénesis.

Estadio 6. Ovario reproductivo. El vítelo se ha depositado en el ovocito. La granulosa se reduce a una simple capa de células y el ovocito se libera durante la ovulación.

Estadio 7. Cuerpo lúteo. Se presenta después de la ovulación y da comienzo la atresia folicular.

Estadio 8. Regresión del ovario. El ovario entra en quiescencia y contiene folículos en desarrollo, similar al estadio 3.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL GENÉTICA

La determinación del sexo en algunos organismos se lleva a cabo por medio de los cromosomas sexuales desde el momento de la fertilización, representando a los machos heterogaméticos XY y a las hembras homogaméticas XX, como sucede en mamíferos. Existen otras formas, donde las hembras son heterogaméticas representadas como ZW y a los machos como ZZ, como sucede en aves y algunos reptiles (Gilbert, 2005).

Se han realizado cariotipos en algunos géneros de la Familia Iguanidae. En el género *Sceloporus* se ha encontrado la presencia de cromosomas sexuales. Recientemente se reveló la presencia de 36 cromosomas en la iguana negra (*C. pectinata*), de los cuales, se identificó un cromosoma más pequeño en el último par, lo que sugiere la existencia de cromosomas sexuales (González-Monfil, 2002).

Diversos genes se han asociado con la diferenciación sexual de mamíferos y reptiles como los genes Sox9, SF1 y Dax1, los cuales se relacionan con la producción de enzimas necesarias para la síntesis de estrógenos (Janzen y Paukstis, 1991).

En algunos reptiles la diferenciación sexual está relacionada a factores ambientales. La temperatura actúa como un disparador genético en la diferenciación de las gónadas e influye en el sexo que tendrá el embrión al final del primer tercio y comienzo del segundo tercio de la vida embrionaria durante la incubación. Dicho mecanismo se ha observado en algunas especies de cocodrilos, tortugas y lagartijas (Mrosovsky y Pieau, 1991; Crews *et al.*, 1994).



Algunos de los eventos que se presentan en la diferenciación de la gónada durante el periodo sensitivo, dependiendo del estadio y del régimen de temperatura, es la proliferación de la zona cortical y la proliferación de los cordones sexuales (Wibbels *et al.*, 1991).

### **3.2 DIFERENCIACIÓN GONADAL**

El sitio de origen de las gónadas se encuentra en el epitelio celómico, el mesenterio dorsal y la porción anterior de la mitad del riñón. Las gónadas constituyen los órganos en los cuales se lleva a cabo la proliferación, diferenciación y maduración de las células germinales; que integran un grupo de células madre reconocidas en los primeros estadios del desarrollo embrionario. Su agrupación da como resultado la formación de la médula gonadal, comenzando con el proceso de diferenciación del espermatozoide y del óvulo (Moreno-Mendoza, 1993; Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, 1997).

La determinación y diferenciación sexual se lleva a cabo en la gónada indiferenciada por medio de diversos eventos fisiológicos y morfológicos relacionados con la expresión de una cascada genética y de diversos eventos hormonales para producir un ovario o un testículo con un aparato urogenital apropiado y características sexuales secundarias (Crews *et al.*, 1994).

Se considera que la diferenciación de las gónadas se realiza en tres etapas:

- a) La diferenciación clara de las gónadas masculina y femenina.
- b) La síntesis hormonal, caracterizada por la síntesis de hormonas involucradas en la maduración de la gónada.

c) La maduración de los gametos sexuales y consecuentemente la manifestación de los caracteres sexuales secundarios.

Al estudiar la diferenciación gonadal en la lagartija verde *Lacerta viridis* (Familia Lacertidae), se observó que la diferenciación del testículo ocurre cuando el embrión adquiere un peso de 80 a 90 mg a los 17 a 19 días de incubación, cuando los cordones de la zona medular primitiva se hipertrofian formando los primordios de los túbulos seminíferos que contienen las células germinales. La diferenciación de los ovarios ocurre un poco más tarde, cuando el embrión adquiere un peso de 90 a 100 mg a los 19 a 20 días de incubación, cuando en el ovario prolifera el epitelio germinal y se comprime la zona medular primitiva (Raynaud y Pieau, 1985).

### **3.3 Acción de las hormonas en la diferenciación sexual**

La producción y secreción de hormonas juega un papel importante en la diferenciación de las gónadas, ya que algunas sustancias regulan la inhibición o inducción de los elementos que constituyen a un testículo o a un ovario. Los andrógenos inhiben la formación de la corteza en el testículo y la hormona anti-Mulleriana (HAM) producida por las células de Sertoli inhiben la formación de los conductos de Müller. Por otro lado, la testosterona, secretada por las células de Leydig promueve la diferenciación de los genitales internos. En el ovario, los estrógenos inhiben la formación de la médula (Salame-Méndez y Villalpando-Fierro, 1998).

### 3.4 Descripción del testículo

Los testículos son órganos glandulares, están constituidos por una región tubular en forma de espiral, donde se producen los espermatozoides como producto de secreción. Cada túbulo se encuentra revestido por un epitelio estratificado, constituido por gonocitos, espermatogonias, espermatoцитos primarios y secundarios, espermátidas y espermatozoides (Banks, 1981).

Las células de Sertoli funcionan como células nodrizas para el desarrollo de los gametos y son las únicas que llegan desde la lámina basal hasta el lumen. Durante la liberación del esperma y la reorganización y diferenciación de las células germinales, las células de Sertoli se localizan en la periferia del túbulo seminífero. Por ejemplo en lagartijas del género *Uma* (Familia Phrynosomatidae), las células de Sertoli se observaron en machos inmaduros, en los cuales el diámetro del túbulo seminífero es más pequeño (Mayhew y Wright, 1970).

Las células del estroma que rodean los túbulos seminíferos y vasos sanguíneos se diferencian en células miodes, fibroblastos, endotelios y las células de Leydig encargadas de secretar la hormona testosterona (Banks, 1981). Estas células intervienen en la síntesis y secreción de andrógenos y mantienen su actividad durante la espermatogénesis. Su presencia al igual que los cambios que presentan sus componentes celulares depende de la etapa del ciclo reproductivo (Fox, 1985).

La espermatogénesis en la lagartija de los muros *Podarcis muralis* (Familia Lacertidae) se desarrolla con un patrón prenupcial, característico de la mayoría de las lagartijas. Las células germinales inician su desarrollo a mitad del verano. Debido a los cambios de temperatura en el ambiente, los testículos entran en una

etapa de quiescencia, para después seguir con la espermatogénesis (Gribbins y Gist, 2003).

En el estudio sobre la citología testicular de la lagartija chilena *Liolaemus gravenhorsti* (Familia Tropicuridae), se observó que en el momento del nacimiento las células germinales migran hacia la lámina basal de los cordones seminíferos para diferenciarse en pre-espermatogonias. Las células más abundantes son las células de Sertoli que se encuentran separadas de la lámina basal del túbulo seminífero y en menor abundancia le siguen las células de Leydig en el intersticio. A los tres días de nacidas, se observa un gran número de pre-espermatogonias en el túbulo y las células de Leydig son abundantes en el tejido intersticial (Leyton *et al.*, 1982).

### **3.5 Descripción del ovario**

La diferenciación del ovario se realiza tardíamente, en comparación del testículo. Las células germinales en el ovario llamadas ovogonias concluyen su proliferación con la meiosis. Comenzada la meiosis se inicia la foliculogénesis donde los ovocitos se individualizan al ser rodeados por las células foliculares y una lamina basal, a partir de los cordones sexuales u ovígeros (Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, 1997).

Los ovarios son estructuras pareadas y glandulares, producen óvulos y secretan estrógenos y progesterona (Boya, 1996). El ovario consiste de una zona externa o corteza, la cual contiene numerosos ovocitos y folículos en diferentes estadios de desarrollo; y la zona interna o médula, que se caracteriza por la

presencia de células miodes, fibroblastos, vasos sanguíneos y células esteroidogénicas (Banks, 1981).

El ovocito de reptiles se caracteriza por ser de tamaño pequeño, con un núcleo grande y un nucléolo. El citoplasma es relativamente limpio al presentar pocos organelos (Tokarz, 1978). Una de las primeras descripciones de la ultraestructura de los ovocitos se realizó en las lagartijas *Lacerta vivipara* y *L. sicula* donde se observó que en el núcleo, la cromatina se distribuye en masas dispersas y el retículo endoplásmico rugoso y las mitocondrias se agrupan en forma de media luna cercanas a este. En el citoplasma se pueden encontrar zonas con núcleos de vítelo (Hubert, 1985). Tokarz (1978) sugiere que la presencia de dichos organelos se relaciona con la síntesis de vítelo rico en proteínas.

El tejido germinal del ovario consiste de células germinales, ovogonias y ovocitos ubicados dentro de dos parches que se localizan dorsalmente en el epitelio ovárico, llamados nichos germinales, comunes en lagartijas. Su apariencia es más opaca y granular que el resto de la pared ovárica y es de forma irregular (Klosterman, 1983).

Las células foliculares que acompañan a los nichos germinales rodean y mantienen comunicación con el ovocito por medio de desmosomas. Algunas de estas células quedan unidas al ovocito y otras se dirigen a la periferia, donde se dividirán y se transformarán en células intermedias y piriformes (Hubert, 1985). La diferenciación y organización de las células pequeñas, intermedias y piriformes constituyen la granulosa; su aparición y transformación dependerá de la etapa de vitelogénesis (Andreuccetti, 1992). La heterogeneidad de la granulosa se considera como una característica distintiva en Squamata (lagartijas, serpientes y

anfibénidos) (Klosterman, 1987). Otra de las funciones de las células de la granulosa es que ayudan a los folículos a colapsarse después de la ovulación para transformarse en tejido lúteo (Goldberg, 1970).

Pruebas histoquímicas realizadas en el abaniquillo americano *Anolis carolinensis* (Familia Polychrotidae) en el epitelio folicular muestran que la presencia de algunos organelos como el retículo endoplásmico, complejo de Golgi, ribosomas libres y microfilamentos indican una actividad sintética, además de que contribuye al crecimiento de las células piriformes y del ovocito (Guraya, 1978; Andreuccetti, 1992).

### **3.6 Técnica no letal para identificar el sexo**

Para identificar el sexo en crías de *C. pectinata*, González-Monfil (2002) implementó una sencilla técnica que no pusiera en riesgo la vida de las iguanas y que no implicara esperar dos o tres años para que las iguanas exhibieran sus características sexuales secundarias.

La técnica de sexado quirúrgico consiste en revisar la presencia o ausencia de hemipenes. Primeramente se realiza una pequeña incisión en forma de L debajo de la cloaca de las crías de *C. pectinata*; considerando que en machos los hemipenes se encuentran bien desarrollados desde la eclosión (Figura 6 y 7). Esta técnica fue aplicada en un estudio realizado sobre métodos no letales para la identificación del sexo en crías de iguana negra, donde se examinaron 383 crías obteniendo 203 machos y 180 hembras. Con la técnica aplicada ninguna cría murió y la mayoría presentó una cicatriz muy pequeña (González-Monfil, 2002).

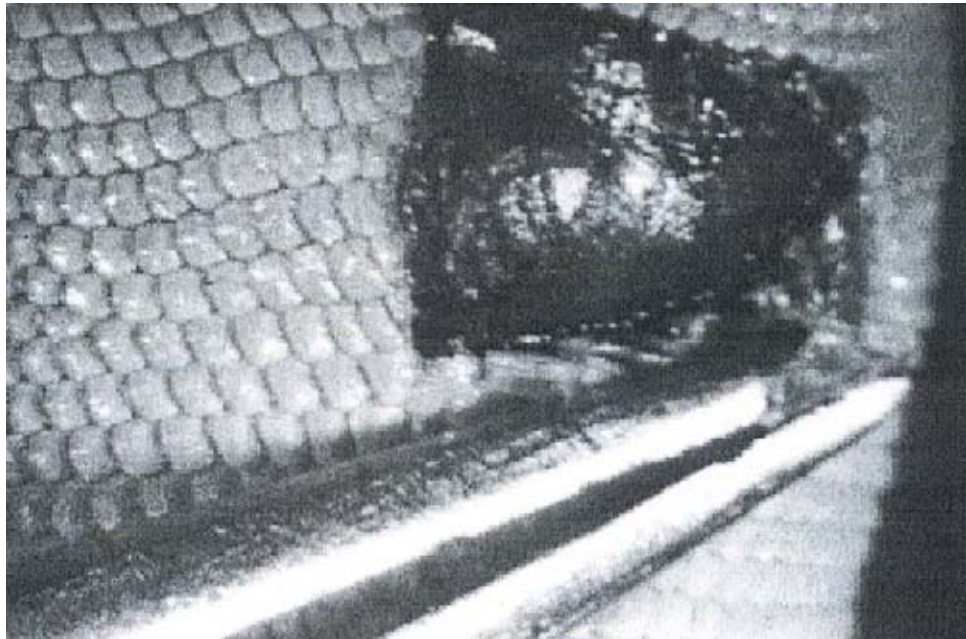


Figura 6. Sexado quirúrgico de una hembra (Tomado de González-Monfil, 2002).

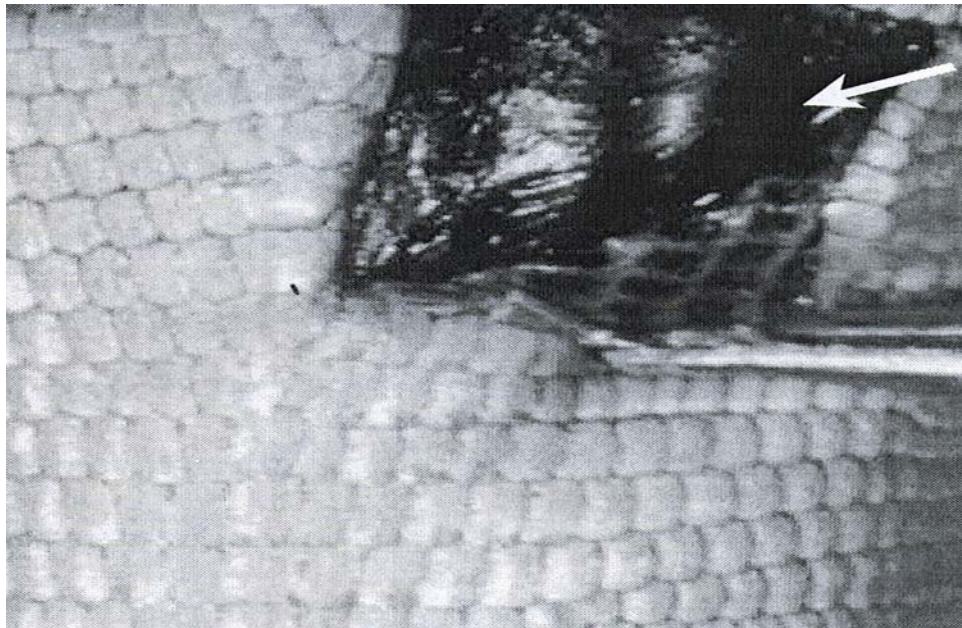


Figura 7. Sexado quirúrgico de un macho. La flecha indica la presencia de los hemipenes (Tomado de González-Monfil, 2002).

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Las iguanas constituyen una fuente de alimento y de ingresos económicos, por lo que en los últimos años el interés por la iguana verde (*Iguana iguana*) y la iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) se ha incrementado, principalmente en el estudio de su crianza en cautiverio, conducta, alimentación y distribución (Gordillo y Escobar, 1998; Núñez *et al.*, 2007; Arcos-García *et al.*, 2007). Sin embargo, son pocos los trabajos en que se aborda el estudio de la histología de los órganos reproductores en reptiles de edades tempranas.

El estudio histológico y de la ultraestructura en base a la técnica de microscopía electrónica de transmisión nos permite diferenciar el sexo, mediante la identificación de los arreglos celulares que distinguen a un testículo de un ovario. De esta manera, al conocer sí las crías se encuentran diferenciadas sexualmente al momento de eclosionar permitirá implementar otras técnicas de sexado que permitan su manejo sin necesidad de sacrificar a las crías como una alternativa en el manejo reproductivo sustentable de la iguana negra.



## **V. HIPÓTESIS**

- Las gónadas de crías de *Ctenosaura pectinata* se encuentran diferenciadas en ovarios o testículos al momento de eclosionar.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

- Identificar y comparar los arreglos tisulares que permitan diferenciar el sexo en crías de *Ctenosaura pectinata* en diferentes etapas de desarrollo mediante el análisis histológico de las gónadas.

### **6.2 Objetivos particulares**

- Realizar la descripción histológica del testículo y del ovario en crías de *Ctenosaura pectinata*.
- Comparar el grado de desarrollo gonadal en crías recién eclosionadas, de cinco meses y juveniles de un año de edad.
- Mediante el análisis y sexado histológico de las gónadas, establecer la confiabilidad de la técnica quirúrgica no letal para el sexado de crías.

## **VII. MÉTODO**

### **7.1 Zona de colecta**

Los individuos empleados para la realización de este estudio se recolectaron en los alrededores del poblado de Nizanda (16° 39' N, 95° 00' W), perteneciente al municipio de Asunción Ixtaltepec, distrito de Juchitán, en el estado de Oaxaca (México) (Figura 8). La localidad presenta una temperatura media de 25 °C y una precipitación anual de aproximadamente 1000 mm. Se distingue una época seca de noviembre a abril y una lluviosa de mayo a octubre. La vegetación que se reconoce es selva baja caducifolia, selva subperennifolia y selva mediana subcaducifolia, con parches de bosque de galería, matorral espinoso, matorral xerófilo y sabana (Pérez-García *et al.*, 2001).

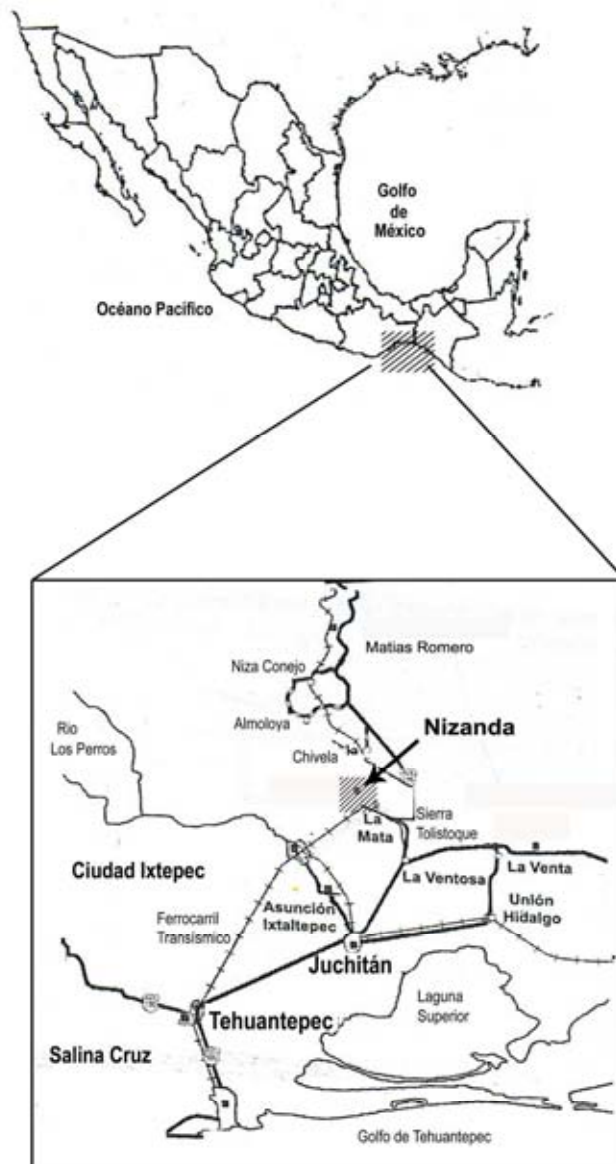


Figura 8. Ubicación del poblado de Nizanda en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca (Tomado de Pérez-García et al., 2001).

## **7.2 Obtención de ejemplares**

Durante los meses de marzo y abril del 2000 se colectaron iguanas hembras grávidas. Éstas se instalaron en encierros acondicionados con tierra suelta, ligeramente humedecida y con un pequeño hueco dentro de la tierra para simular su nido y ovipositaran.

Se utilizaron un total de 67 crías, las cuales fueron incubadas en condiciones seminaturales. Quince crías recién eclosionadas, fueron sacrificadas y disecadas *in situ*. A cada una se le extrajo el complejo urogenital y se preservó en solución Karnovsky (1965) (Apéndice). Otro grupo de crías fueron crecidas en jaulas de plástico y se alimentaron con frutas y vegetales en un ambiente de 28 a 30 °C en el laboratorio de la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología de la UNAM. Las crías que se mantuvieron vivas se sacrificaron en diferentes periodos de tiempo, es decir, un grupo de 45 crías, se sacrificó a los cinco meses de edad y otro grupo de 7 juveniles se sacrificó al año de edad. Posteriormente se procesaron en el laboratorio de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

## **7.3 Técnica histológica**

Para sacrificar a las crías, cada una de ellas se expuso a una temperatura de -5 °C durante 5 minutos para aletargarlos. Posteriormente cada cría fue decapitada, dejando que se desangrara totalmente ya que los eritrocitos enmascaran muchos de los tejidos (Merchant-Larios, com. pers; 2000). Para extraer las gónadas, se comenzó con un corte muy cercano a la cloaca, atravesando el músculo y haciendo

cortes laterales para no dañar la región ventral. Enseguida, se realizó un pequeño corte del intestino muy cercano al ano retirándose junto con el aparato digestivo para despejar la cavidad del cuerpo donde se encuentran las gónadas. Las gónadas se sitúan dorsalmente junto a las glándulas adrenales.

Para la identificación del sexo, se extrajo el complejo urogenital aislando las gónadas para procesarse con la técnica histológica para Microscopía Electrónica de Transmisión (Apéndice). El tejido fue fijado con solución Karnovsky durante 1 hora a 4 °C, después, las muestras se lavaron con Buffer de cacodilato de sodio (0.1 M) durante 1 hora y se posfijaron con tetraóxido de osmio al 1% durante una hora a 4 °C.

Después de la posfijación, las muestras se lavaron tres veces con agua destilada. En seguida, se deshidrataron a temperatura ambiente con alcoholes graduales de 70%, 80%, 90% y 95% durante diez minutos en cada uno e inmediatamente en dos cambios de 20 minutos en alcohol absoluto (100%). Transcurrido éste tiempo, se colocaron en óxido de propileno durante 20 minutos. A temperatura ambiente las muestras se impregnaron con una mezcla de Epon (812) – Óxido de propileno 1:1 durante 1 hora, Epon (812)-Óxido de propileno 2:1 durante 1 hora, y finalmente Epon (812) durante 24 horas. Cada muestra se colocó en moldes para incluirlos en Epon (812) a una temperatura de 60 °C durante 24 horas.

Para el análisis y descripción de las gónadas se realizaron cortes semifinos transversales de 1.5 µm de espesor en un ultramicrotomo. Los cortes se tiñeron por flotación durante algunos segundos con azul de toluidina al 0.5% (Apéndice), se montaron en portaobjetos y finalmente se observaron en el microscopio de luz para su análisis. Para realizar la descripción de la ultraestructura de la gónada se

escogieron los tejidos que histológicamente presentaron un desarrollo más avanzado. Con dichos tejidos se realizaron cortes finos, de los cuales se tomaron fotomicrografías electrónicas.

#### **7.4 Desarrollo gonadal**

La descripción histológica del desarrollo gonadal se realizó a partir de las gónadas que presentaran mejor desarrollo de los elementos celulares. Las observaciones de los cortes histológicos de cada gónada se realizaron en microscopio de luz, para observar los arreglos tisulares que nos permiten distinguir entre un ovario y un testículo y así identificar el sexo de las crías de iguana negra. Para la realización de la descripción de las gónadas se utilizó como base la clasificación de los cuatro primeros estadios propuesta por Ballinger y Nietfeld (1989).

Se realizó un análisis cualitativo de la ultraestructura y el desarrollo gonadal en tres etapas: crías recién eclosionadas, crías de cinco meses de edad y juveniles de un año de edad, seleccionando dos muestras (hembra y macho) por cada edad.

#### **7.5 Sexado quirúrgico**

De las 45 crías de 5 meses de edad se escogieron 12 crías al azar para realizar la técnica de sexado quirúrgico antes de ser sacrificadas. La técnica de sexado quirúrgico consistió en revisar la ausencia o presencia de hemipenes. Para este fin, se realizó una pequeña incisión ventral en la piel en forma de L debajo de la cloaca desde la primera línea ordenada de escamas. La primera incisión fue transversal de 7 a 10 escamas y de 3 a 5 escamas de manera longitudinal. Con unas pinzas pequeñas, la piel fue separada cuidadosamente del músculo para no dañarlo y así

evidenciar la presencia de los hemipenes, cabe señalar que los hemipenes se encuentran desarrollados en machos desde el nacimiento (González- Monfil, 2002).

Para establecer la confiabilidad de la prueba de sexado quirúrgico se realizó una prueba de  $X^2$ . La prueba de  $X^2$  es un análisis estadístico que compara cualitativamente con solo dos opciones de respuesta, con las que se pueden determinar si existe una relación estadísticamente significativa entre las variables estudiadas utilizando una tabla de contingencia de 2 X 2 (Tabla 1). Cuanto mayor sea la  $X^2$  menos verosímil es la hipótesis nula ( $H_0$ ). De la misma forma, cuanto más se aproxima al cero el valor de  $X^2$  ambas distribuciones estarán más ajustadas (Wayne, 2007). La fórmula de  $X^2$  es:

$$X^2 = \frac{n (ad - bc)^2}{(a+c) (b+d) (a+b) (c+d)}$$

**Tabla 1. Tabla de contingencia utilizada en la prueba de  $X^2$ . SQ = sexado quirúrgico; SH = sexado histológico.**

	SQ	SH	total
Machos	a	b	a+b
Hembras	c	d	c+d
total	a+c	b+d	n

a = n de machos del sexado quirúrgico  
 b = n de machos del sexado histológico  
 c = n de hembras del sexado quirúrgico  
 d = n de hembras del sexado histológico

Cuando los datos provienen de una muestra pequeña y los requerimientos mínimos de frecuencia no se cumplen, es decir, que  $n$  es menor que 20 ó sí  $n$  está entre 20 y 40 y una de las frecuencias es menor que 5 se recomienda la aplicación de la prueba exacta de Fisher que sustituye a la  $X^2$ . La prueba exacta de Fisher (Zar, 1996) calcula la probabilidad exacta de ocurrencia bajo la hipótesis nula de independencia. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$P = \frac{(a + b)! (c + d)! (a + c)! (b + d)!}{n! a! b! c! d!}$$

$$\begin{aligned} \log x! &= (x + 0.5) \log x - (\log e) (x) + \log \sqrt{2\pi} \\ &= (x + 0.5) \log x - 0.4343 (x) + 0.3990 \end{aligned}$$



## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Histología

El sexado histológico de las gónadas de *C. pectinata* mostraron una diferenciación sexual desde el momento de la eclosión, el desarrollo de las gónadas es muy lento especialmente en machos (Tabla 2).

Tabla 2. Sexado histológico de las crías de *Ctenosaura pectinata*.

Edad	Machos	Hembras	Total
Recién eclosionadas	7	8	15
Cinco meses	29	16	45
Un año	5	2	7

#### 8.1.1 Descripción macroscópica del testículo y el ovario

**Testículo:** Los testículos se localizan en la parte dorsal entre el segundo y tercer tercio de la cavidad abdominal, siendo el testículo derecho ligeramente anterior al izquierdo. Macroscópicamente el testículo de crías tiene en forma de lenteja de color amarillo pálido al momento de eclosionar (Figura 9). A los cinco meses de edad los testículos adquieren una apariencia de pequeños sacos y al año su forma es casi esférica (Figura 10).

**Ovario:** El ovario se localiza en la pared dorsal, entre el segundo y tercer tercio de la cavidad abdominal, siendo el ovario derecho ligeramente anterior al izquierdo. Macroscópicamente el ovario presenta una forma esférica de color amarillo pálido al momento de eclosionar. A los cinco meses de edad presentan pequeñas

lobulaciones (Figuras 11 y 12) y al año presenta múltiples protuberancias adquiriendo forma de racimos de uvas (Figura 13).

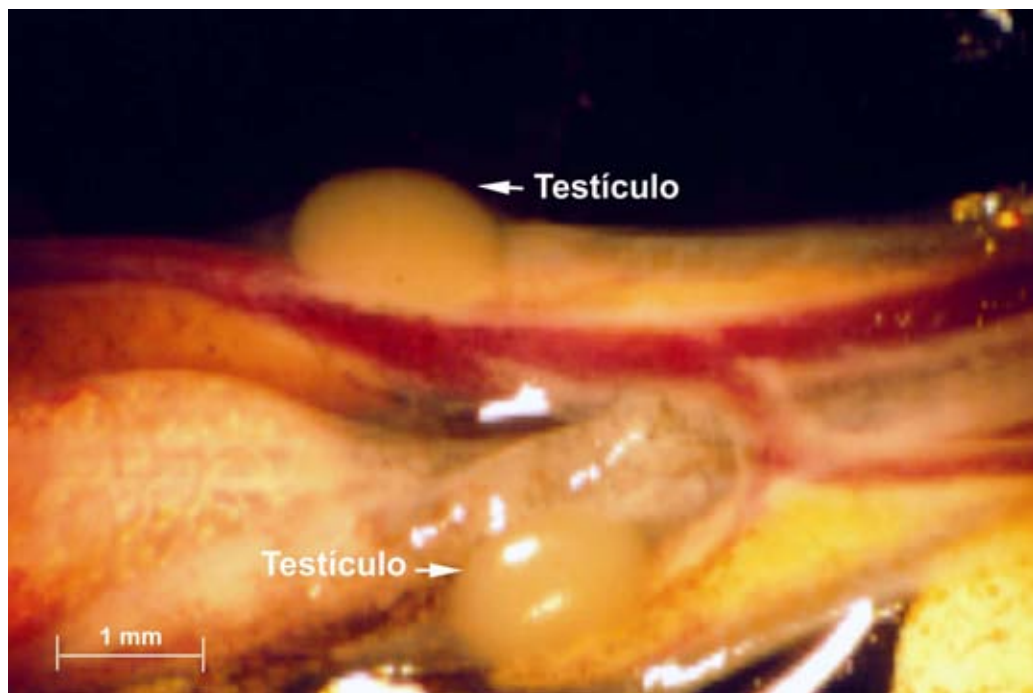


Figura 9. Testículos de *C. pectinata* (flechas) recién eclosionada en la cavidad del cuerpo

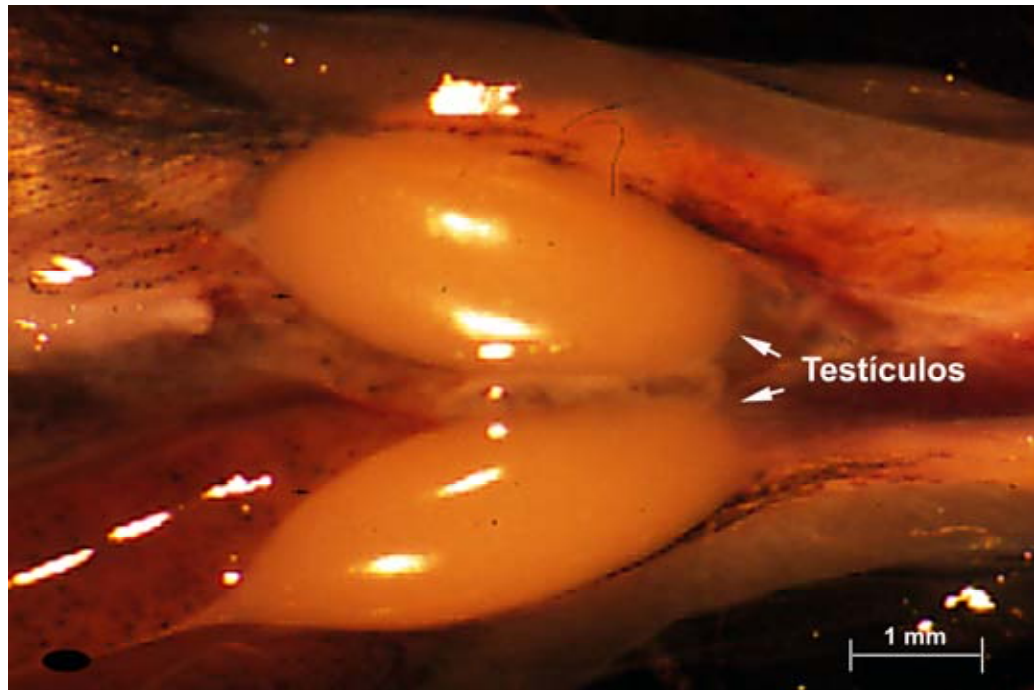


Figura 10. Testículo de *C. pectinata* (flechas) al año de edad en la cavidad del cuerpo

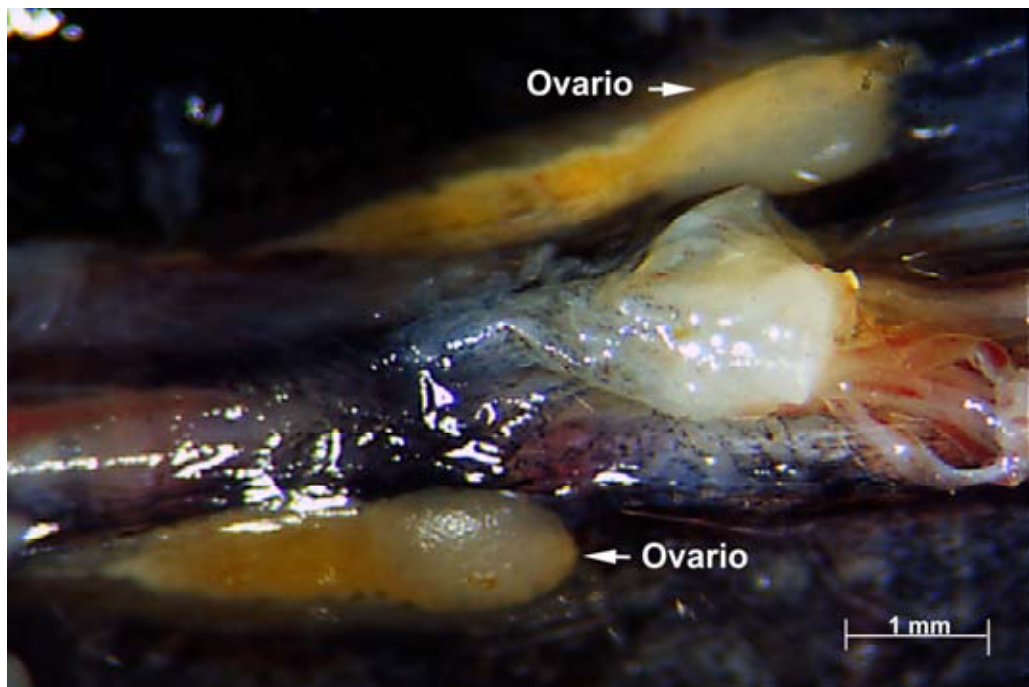


Figura 11. Ovarios de una cría recién eclosionada de *C. pectinata*. Se observan de color amarillo pálido con pequeñas granulaciones.

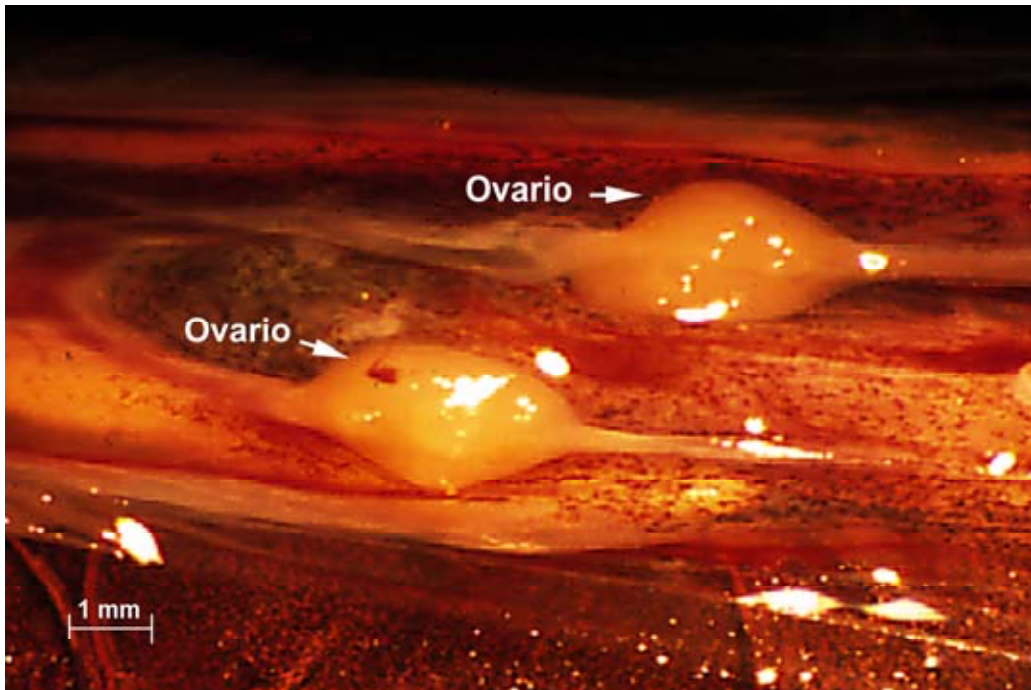


Figura 12. Ovarios de una cría de *C. pectinata* de cinco meses de edad. Se observan de color amarillo y con algunas lobulaciones.

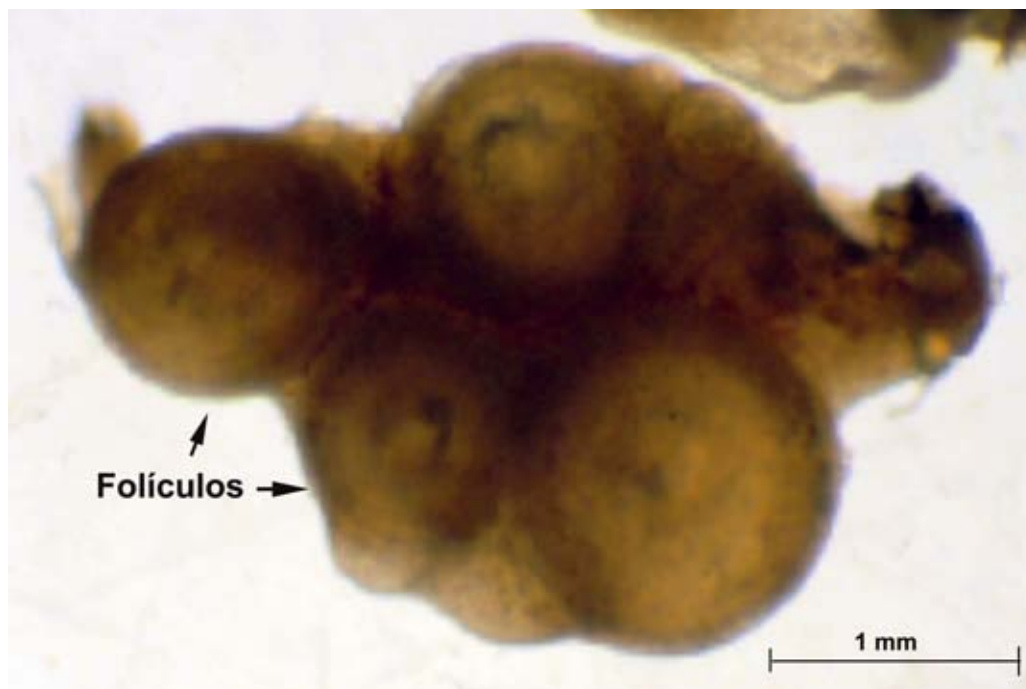


Figura 13. Ovario de *C. pectinata* de un año de edad. Se observan folículos desarrollados.

### **8.1.2 Descripción microscópica del testículo**

**Crías recién eclosionadas.** El testículo en el momento de eclosionar, presenta microscópicamente una capa simple de células germinales, los cordones sexuales no se diferencian en túbulos seminíferos y no se han diferenciado las células de Leydig. Sin embargo, se observa que las células pre-Sertoli y gonocitos comienzan a agruparse en una red de cordones epiteliales, precursores de los cordones epiteliales. El epitelio externo que cubre al testículo es aplanado y con frecuencia aparece separado de la red epitelial interna por vasos sanguíneos. No hay túnica albugínea (Figura 14).

**Crías de cinco meses de edad.** Considerando la diferenciación y organización de las células, el desarrollo del testículo resulta muy lento en comparación con el ovario. La organización histológica a los cinco meses de edad no es muy diferente a la de las crías recién eclosionadas. Las células germinales se han diferenciado en espermatogonias, las células de Sertoli se encuentran diferenciadas y son evidentes. Se observa el agrupamiento de las células germinales y las células de Sertoli en la red epitelial de cordones seminíferos, ya que se distingue la membrana basal que la separa del tejido estromático. Las células de Leydig son escasas y la túnica albugínea no se distingue (Figura 15).

**Juveniles de un año de edad.** Una clara diferenciación testicular se observó en juveniles de un año de edad. Grupos de espermatogonias entran en meiosis iniciando el proceso de espermatogénesis. Los espermatoцитos primarios se observan en gran número, algunos de ellos comienzan a diferenciarse en

espermaticos secundarios. Las células de Sertoli junto con las células germinales se encuentran agrupadas en cordones seminíferos. Se distinguen claramente la membrana basal y las células mioideas envolviendo a los cordones seminíferos en el estroma, las células de Leydig son escasas y se acompañan de fibroblastos, fibras de colágeno y vasos sanguíneos. La túnica albugínea del testículo es ahora claramente distinguible. Sólo en un macho se observó la diferenciación clara de los túbulos seminíferos, distinguiéndose la luz del tubo (Figura 16).

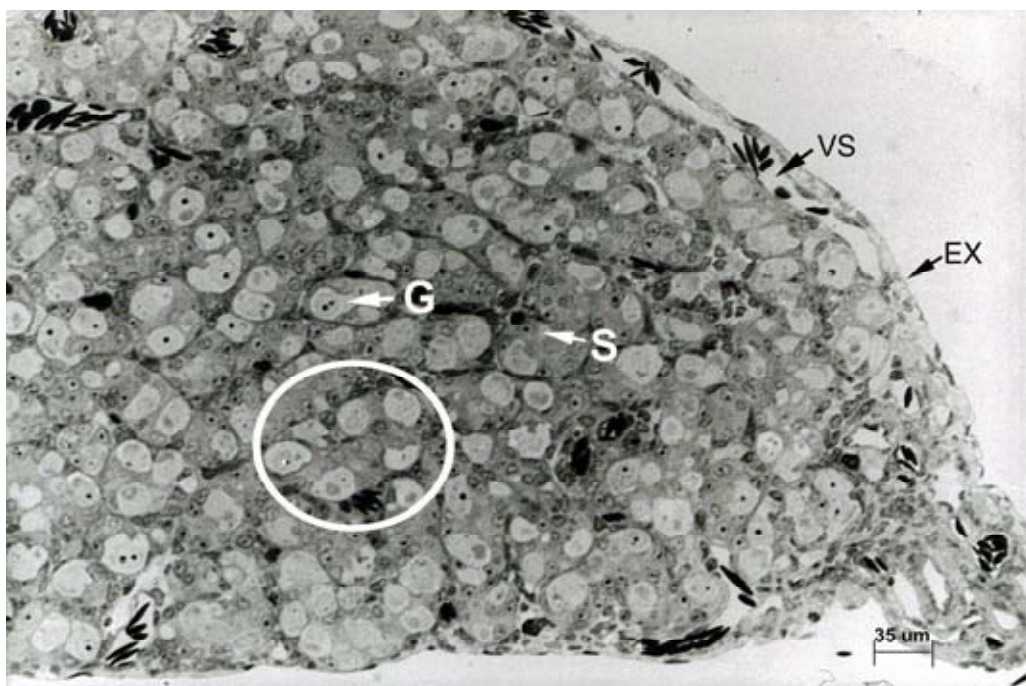


Figura 14. Corte transversal del testículo de una cría recién eclosionada de *C. pectinata*. Los cordones sexuales (círculo) aún no se diferencian en túbulos seminíferos y la capa que rodea la gónada no se distingue como túnica albugínea. Se distinguen gonocitos (G), células de Sertoli (S), vasos sanguíneos (VS) y el epitelio externo (EX).

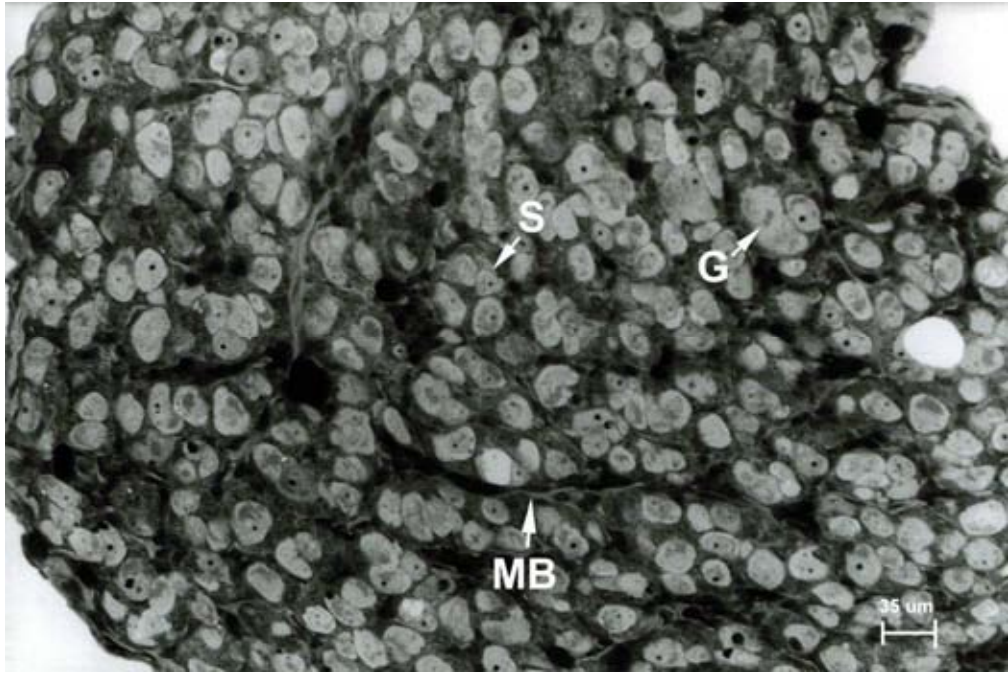


Figura 15. Corte transversal del testículo de una cría de *C. pectinata* de cinco meses edad. Aún no se observa la túnica albugínea y las células se agrupan para formar los cordones seminíferos. Se observa la membrana basal (MB), gonocitos (G) y células de Sertoli (S).



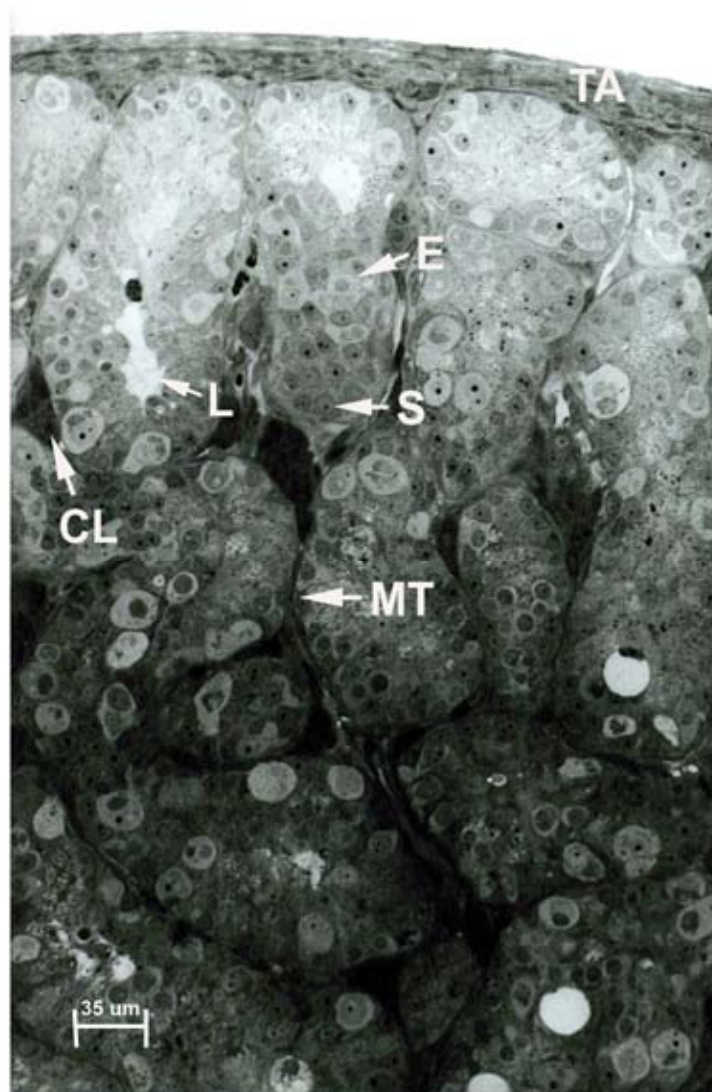


Figura 16. Corte transversal del testículo de *C. pectinata* de un año de edad. La túnica albugínea (TA) se distingue como una capa de células planas. Se distingue la formación de los túbulos seminíferos observándose la membrana del túbulo (MT). En algunos casos se distingue la luz del túbulo (L), las células de Sertoli (S), células de Leydig (CL) y espermatocitos (E).

### **8.1.3 Descripción microscópica del ovario**

**Crías recién eclosionadas.** En contraste con los testículos, los ovarios de las crías recién eclosionadas muestran una clara diferenciación. La corteza y la médula aparecen como dos regiones separadas por un tejido conectivo laxo (Figura 17). La corteza está formada por un engrosamiento del epitelio superficial que incluye grupos de ovocitos rodeados por células precursoras de las células foliculares. Sin embargo, todavía no se inicia el proceso de foliculogénesis, puesto que no hay folículos individualizados. La región medular aparece como un tejido denso, constituido por remanentes epiteliales y abundantes vasos sanguíneos. La mayoría de las células germinales sufrieron apoptosis, aunque todavía es posible distinguir algunas sobrevivientes (Figura 17, flecha).

**Crías de cinco meses de edad.** A los cinco meses post eclosión, el ovario se constituye de una corteza similar a la de recién eclosionadas. Sin embargo, se ha iniciado el proceso de foliculogénesis con la presencia de folículos individualizados (Figura 18). Las células foliculares forman un epitelio cúbico en torno al ovocito que ha iniciado un dramático crecimiento. Ambos tipos celulares están envueltos por una membrana basal y células aplanadas de tipo fibroblástico o mioide. El tejido medular es menos denso y han desaparecido los remanentes epiteliales y las células germinales. Sólo quedan vasos sanguíneos y tejido conectivo.

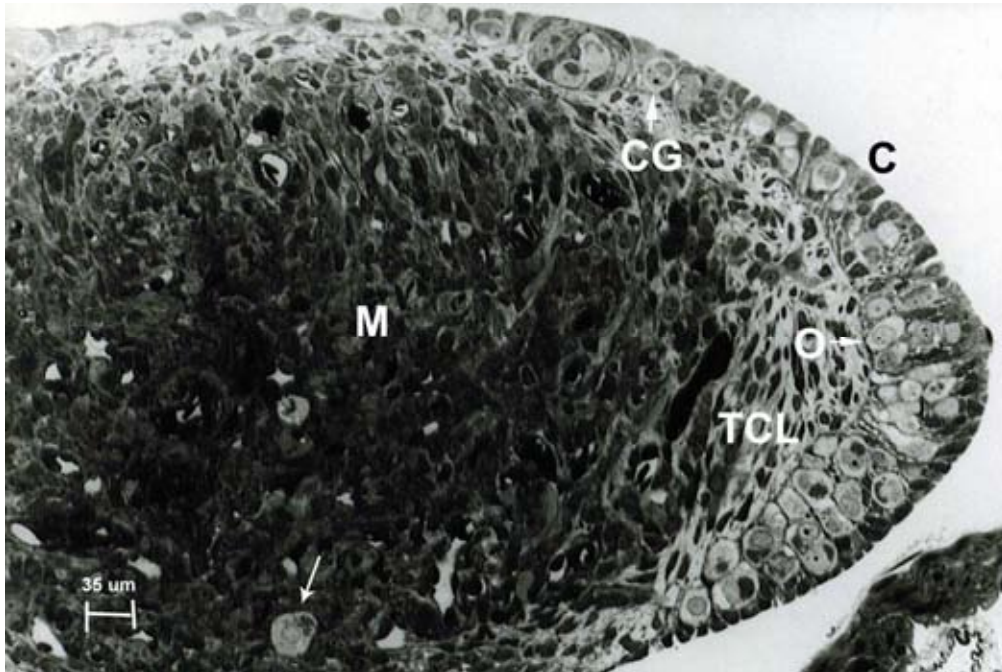


Figura 17. Corte transversal del ovario de una cría recién eclosionada de *C. pectinata*. Se distingue claramente el cortex (C) de la médula (M). En la región derecha se observa un nicho germinal conteniendo gran número de ovocitos (O) en desarrollo y células germinales (CG). La médula se constituye de tejido conectivo laxo (TCL) y células germinales que sobrevivieron a la apoptosis (Flechas).

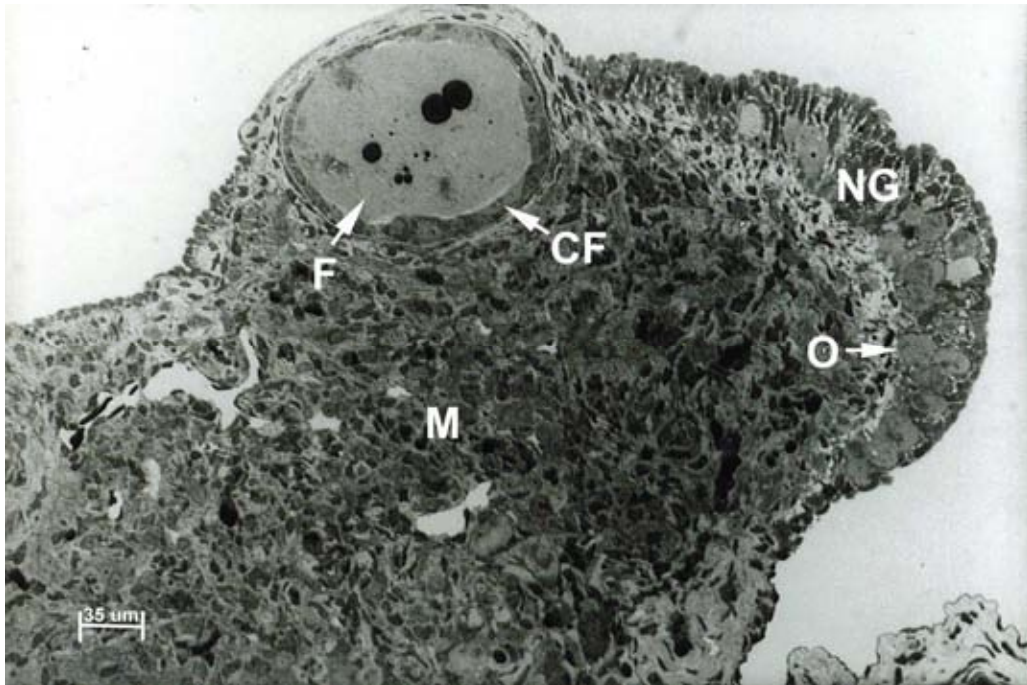


Figura 18. Corte transversal del ovario de una cría de cinco meses de edad de *C. pectinata*. Se observan folículos independientes (F); la corteza y la médula (M) se encuentran bien delimitadas. En la corteza se distinguen ovocitos (O) en diferentes fases de desarrollo; al centro un folículo (F) rodeado por una capa simple de células foliculares (CF), constituyendo en conjunto un nicho germinal (NG)

**Juveniles de un año de edad.** La corteza ovárica mantiene zonas del epitelio engrosado, similares al ovario de crías recién eclosionada. Dichas zonas son los denominados “nichos germinales”. La mayor parte del volumen ovárico es ahora ocupado por folículos en diversas etapas de desarrollo. El tamaño de los folículos está dado fundamentalmente por el crecimiento de los ovocitos, en los que, además del citoplasma activo, se inicia la acumulación de inclusiones de vítelo. Es notable también el aumento del volumen nuclear de los ovocitos (Figura 19).

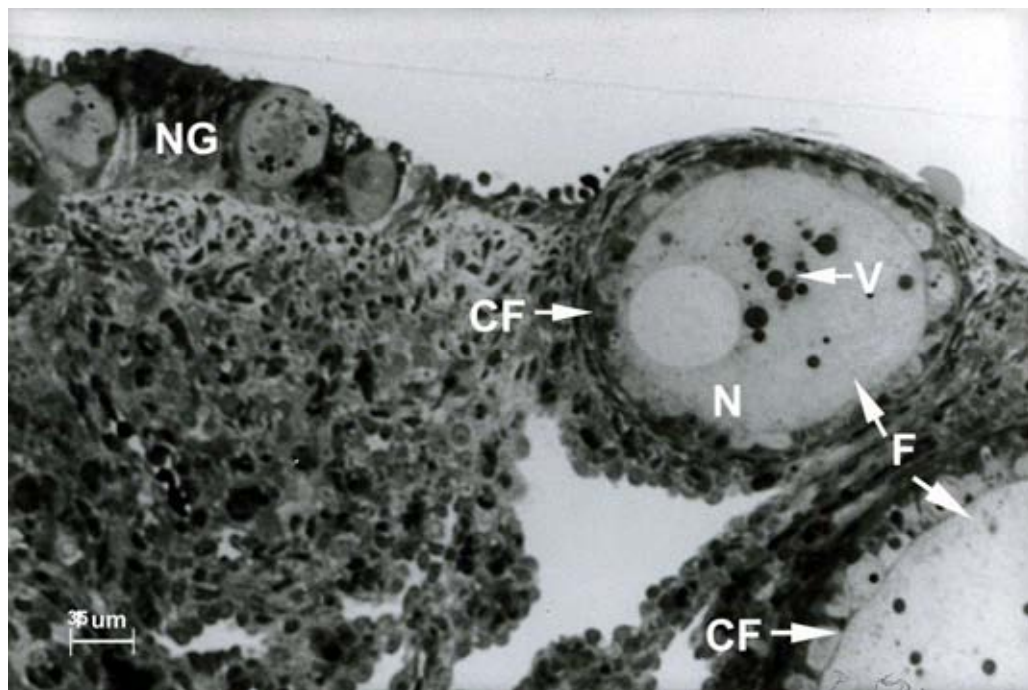


Figura 19. Corte transversal del ovario de *C. pectinata* de un año de edad. Se observa una parte del nicho germinal (NG), donde se localizan folículos (F) independientes. El folículo presenta gránulos de vítelo (V) y el núcleo (N) con gran volumen. El ovocito se encuentra rodeado por células foliculares (CF).

**8.1.4 Diferencias en la estructura celular de machos y hembras.** El desarrollo de los elementos celulares del testículo y el ovario, presentan un arreglo diferente para cada edad (Tabla 3).

Tabla 3. Características de las gónadas en diferentes edades de desarrollo.

Sexo	Crías recién eclosionadas	Crías de cinco meses	Juveniles de un año
<b>Testículo</b>	Las células se arreglan en cordones. Las células que se distinguen son células germinales y células pre-Sertoli y espermatocitos.	Las células se han agrupado en túbulos seminíferos. Los espermatocitos son los más abundantes.	La túnica albugínea se observa como una delgada capa. Adyacentes a la membrana basal se localizan las células de Sertoli. Se observan espermatocitos primarios y secundarios. En algunos casos la luz del tubo se distingue.
<b>Ovario</b>	Consta de dos zonas: la cortical y la medular. En la zona cortical se encuentran células germinales y ovocitos desnudos en desarrollo.	En la región dorsal del ovario se encuentran los nichos germinales. El número de ovocitos se han incrementado y se observan en diferentes estados de desarrollo. Las células foliculares son una capa simple de células que rodean al ovocito.	Los ovocitos son de gran tamaño y se encuentran en diferentes estados de desarrollo. Se observa el desarrollo de los óvulos. Las células foliculares en algunos casos son cuboidales. La zona cortical incrementa en grosor.

## 8.2 Descripción ultraestructural y del desarrollo del testículo

**Crías recién eclosionadas.** El análisis de la ultraestructura corrobora el lento desarrollo del testículo comparado con el ovario. Se observa un arreglo de las células en cordones epiteliales delimitados por una lámina basal agrupando a los gonocitos y células pre-Sertoli. Las células de Leydig aún no se diferencian claramente. Los organelos que se observan en el citoplasma de los gonocitos son: numerosas mitocondrias dispersas, retículo endoplásmico, un núcleo grande con la cromatina en

pequeñas condensaciones cerca de la envoltura nuclear. Entre los cordones epiteliales aparece un tejido estromático fuertemente condensado formado por células fibroblásticas, fibras de colágeno y vasos sanguíneos. Las células de pre-Sertoli muestran un núcleo de mayor tamaño donde la cromatina se condensa en pequeños grumos y en su citoplasma hay algunas mitocondrias y retículo endoplásmico. La asociación entre células de Sertoli es por medio de desmosomas (Figura 20).

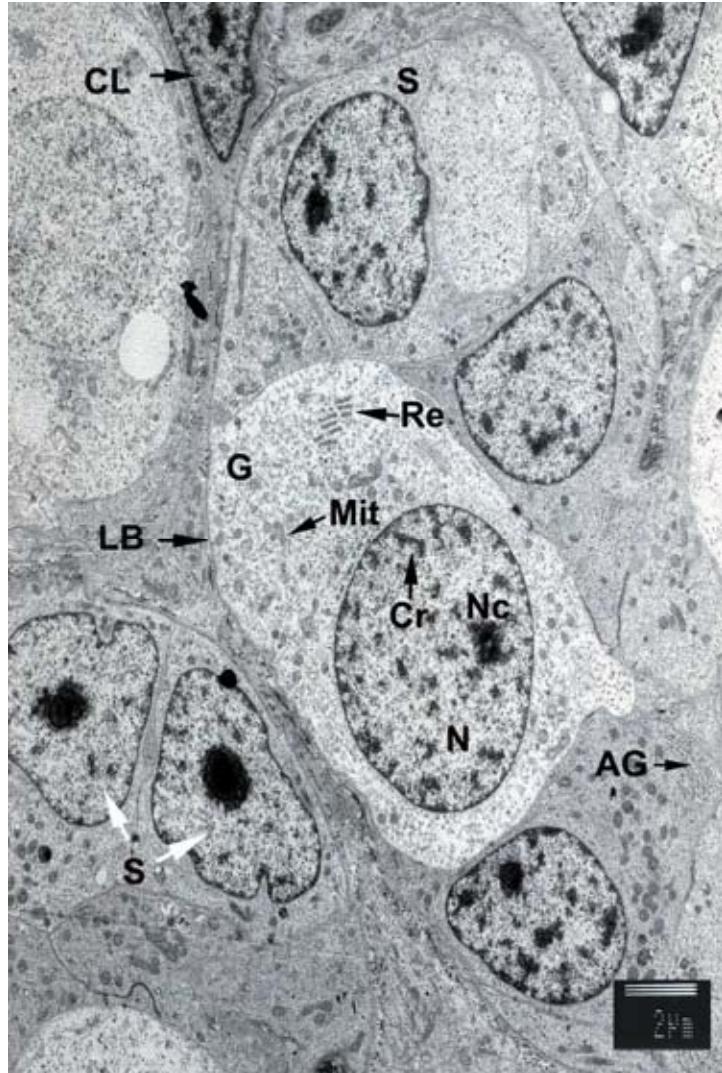


Figura 20. Microscopía electrónica de transmisión del testículo de cría recién eclosionada de *C. pectinata*. En el citoplasma del gonocito (G) se observa el retículo endoplásmico (Re), numerosas mitocondrias (Mit) y el aparato de Golgi (AG). El núcleo es grande (N), el nucleolo dista del centro (Nc) y la cromatina se encuentra dispersa en pequeños grumos (Cr). Las células de Sertoli (S) rodean al gonocito, su núcleo es de mayor tamaño, se distinguen en el citoplasma aparato de Golgi y mitocondrias. En la parte superior se logra observar una parte de la célula de Leydig (CL). La lámina basal (LB) rodea a las células de Sertoli y al gonocito.

**Crías de cinco meses.** El desarrollo que presentan los machos a esta edad es mínimo. Los componentes tisulares del testículo muestran poca diferencia con respecto a las crías recién eclosionadas. Se observa que el agrupamiento de las células germinales y de Sertoli en cordones es más evidente gracias al engrosamiento de la membrana basal, en lo que será el túbulo seminífero. Los arreglos ultraestructurales de los gonocitos no han sufrido cambios. En algunos casos se observan células germinales con núcleo alargado y nucleolo al centro, en el citoplasma se distinguen numerosas mitocondrias agrupadas y aparato de Golgi, lo que sugiere, una pronta diferenciación hacia espermatogonias. En el espacio intersticial se distinguen paquetes de fibras y algunas células de Leydig (Figura 21).

**Juveniles de un año de edad.** El testículo presenta un avance en el desarrollo. La constitución de los túbulos seminíferos es más clara; sin embargo, apenas se logra reconocer la luz del tubo. Se distinguen los espermatocitos primarios que han iniciado la meiosis por la condensación de sus cromosomas. Las células de Sertoli acompañan a los gonocitos, espermatocitos y a las espermatogonias que son las más abundantes. Se observan algunas células de Leydig, fibras de colágeno y fibroblastos (Figura 22).



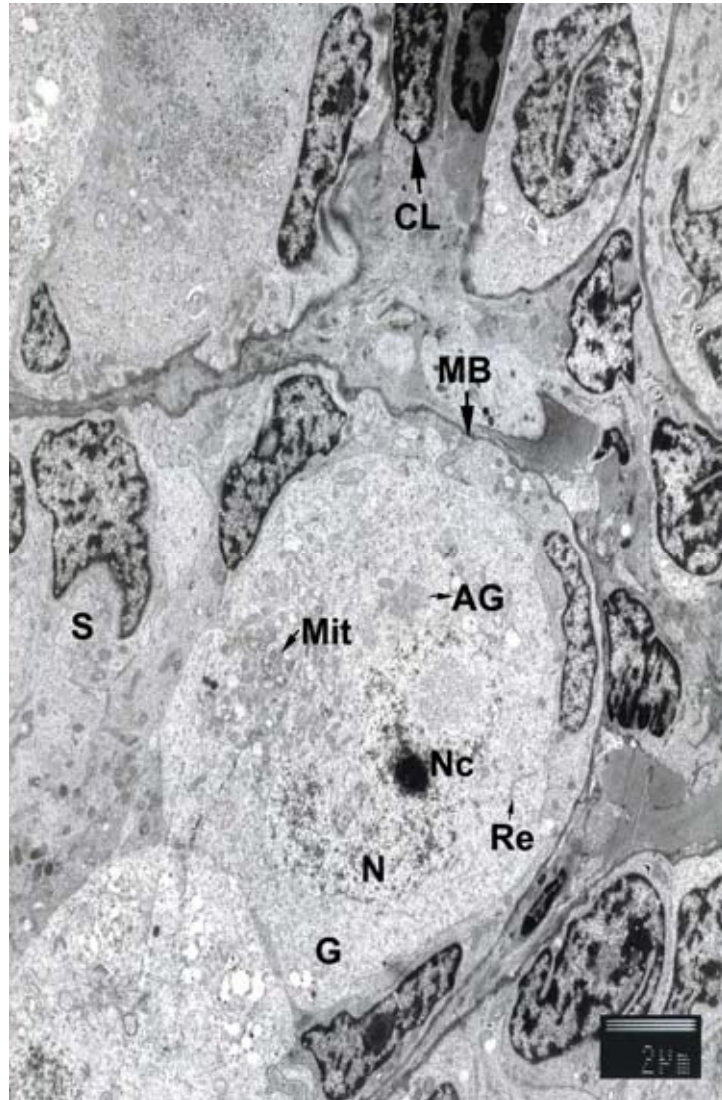


Figura 21. Microscopía electrónica de transmisión del testículo de una cría de *C. pectinata* de cinco meses de edad. En el citoplasma del gonocito (G) se observan numerosas mitocondrias (Mit), aparato de Golgi (AG), retículo endoplásmico (Re), núcleo (N), el nucleolo (NC) es grande y la cromatina se encuentra dispuesta en grumos. Las células de Sertoli (S) rodean al gonocito, su núcleo es alargado y el citoplasma presenta numerosas mitocondrias. Se distingue claramente la membrana basal (MB) y en el intersticio se observan las células de Leydig (CL).

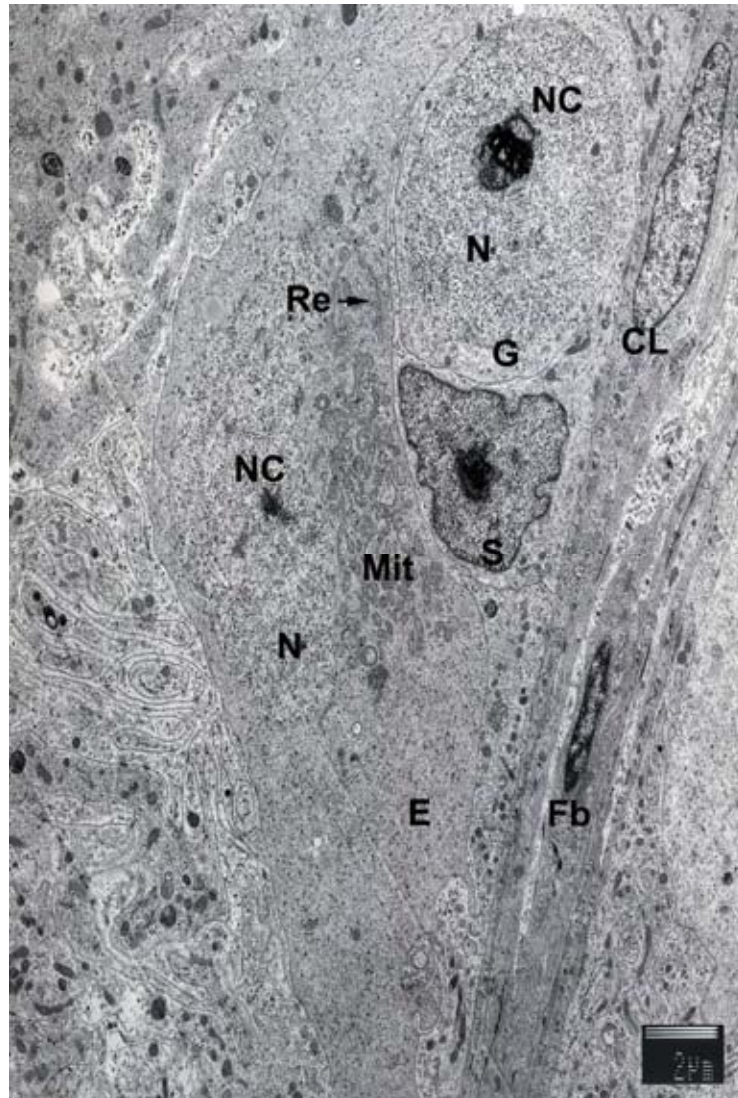


Figura 22. Microscopía electrónica de transmisión del testículo de un juvenil de *C. pectinata* de un año de edad. Se observa gonocito (G), células de Sertoli (S), fibroblastos (Fb), células de Leydig (CL). En el espermatocito (E) se observa el núcleo (N) y nucleolo (NC), cercanas al núcleo se distingue un grupo de mitocondrias (Mit).

### **8.3 Descripción ultraestructural y del desarrollo del ovario**

**Crías recién eclosionadas.** Las zonas que constituyen el ovario (médula y corteza) se encuentran bien diferenciadas. En los machos ocurre lo contrario, ya que los túbulos seminíferos no se han formado y las células no se han diferenciado, por lo que se considera que las hembras muestran un desarrollo más avanzado que los machos al momento de eclosionar. El epitelio germinal exhibe ovocitos desnudos y cercanos a ellos células foliculares que comienzan a rodear al ovocito, las células foliculares mantienen contacto con el ovocito por medio de desmosomas y alrededor se distinguen fibroblastos y fibras de colágeno. Los ovocitos están agrupados e inmersos en el nicho germinal, donde se observa también la presencia de algunas células germinales. El citoplasma del ovocito se caracteriza por el núcleo de gran tamaño, nucléolo al centro y la cromatina se encuentra dispersa. En la envoltura nuclear se logran distinguir los poros nucleares, y muy cercanas al núcleo se agrupan numerosas mitocondrias y gránulos de vítelo. En el citoplasma se distinguen filamentos largos que posiblemente forman parte del retículo endoplásmico (Figura 23).

**Crías de cinco meses de edad.** El nicho germinal se constituye de ovocitos en diferentes fases de desarrollo y las células foliculares recubren al ovocito con una capa simple. El ovocito ostenta un tamaño pequeño en relación al tamaño que adquiere al momento de estar maduro, su núcleo es grande, la cromatina se encuentra en dos pequeños lunares cercanos al nucléolo; el citoplasma contiene gran cantidad de mitocondrias y se logra distinguir el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y la presencia de láminas anulares (Figura 25). La comunicación entre

las células foliculares y el ovocito es por medio de desmosomas (Figura 24). Las células foliculares presentan una forma aplanada, con un núcleo grande y, dentro de su citoplasma, numerosas mitocondrias. (Figura 26).

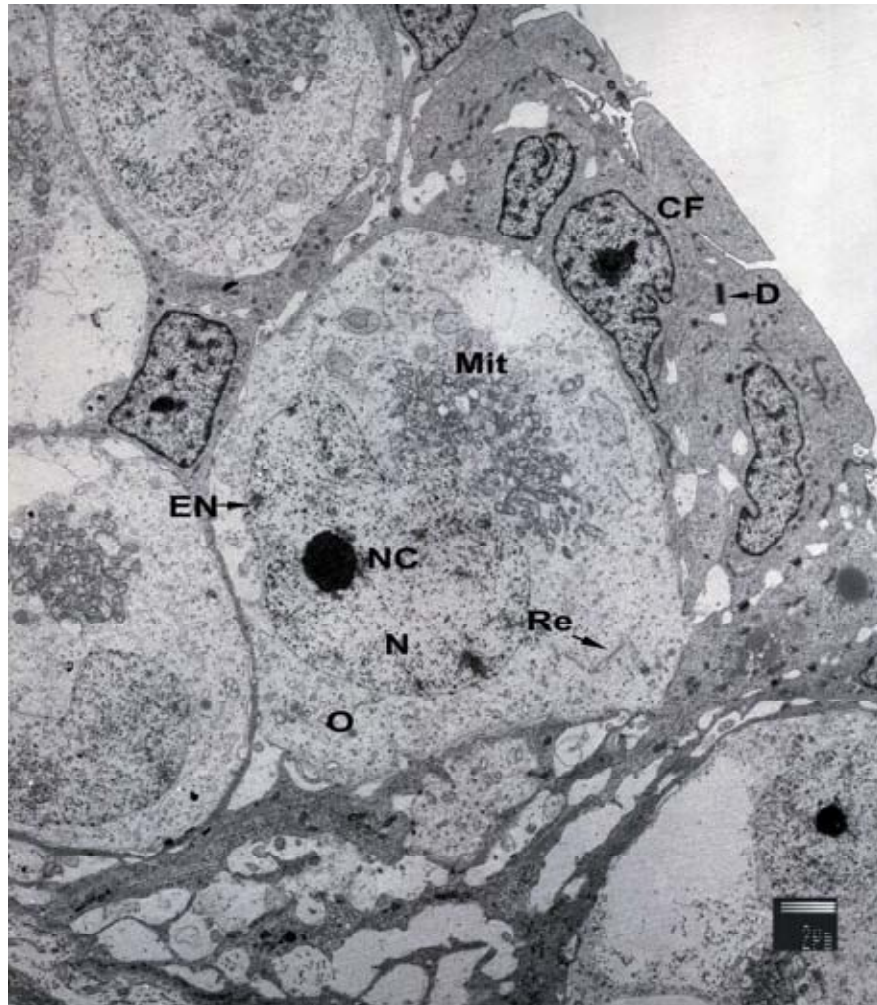


Figura 23. Microscopía electrónica de transmisión del ovario de una cría recién eclosionada de *C. pectinata*. En el citoplasma del ovocito (O) se observan mitocondrias (Mit), retículo endoplásmico (Re). El núcleo es grande (N) con nucléolo (NC) presente y se distingue claramente la envoltura nuclear (EN). Rodean al ovocito células foliculares (CF) unidas por desmosomas (D).

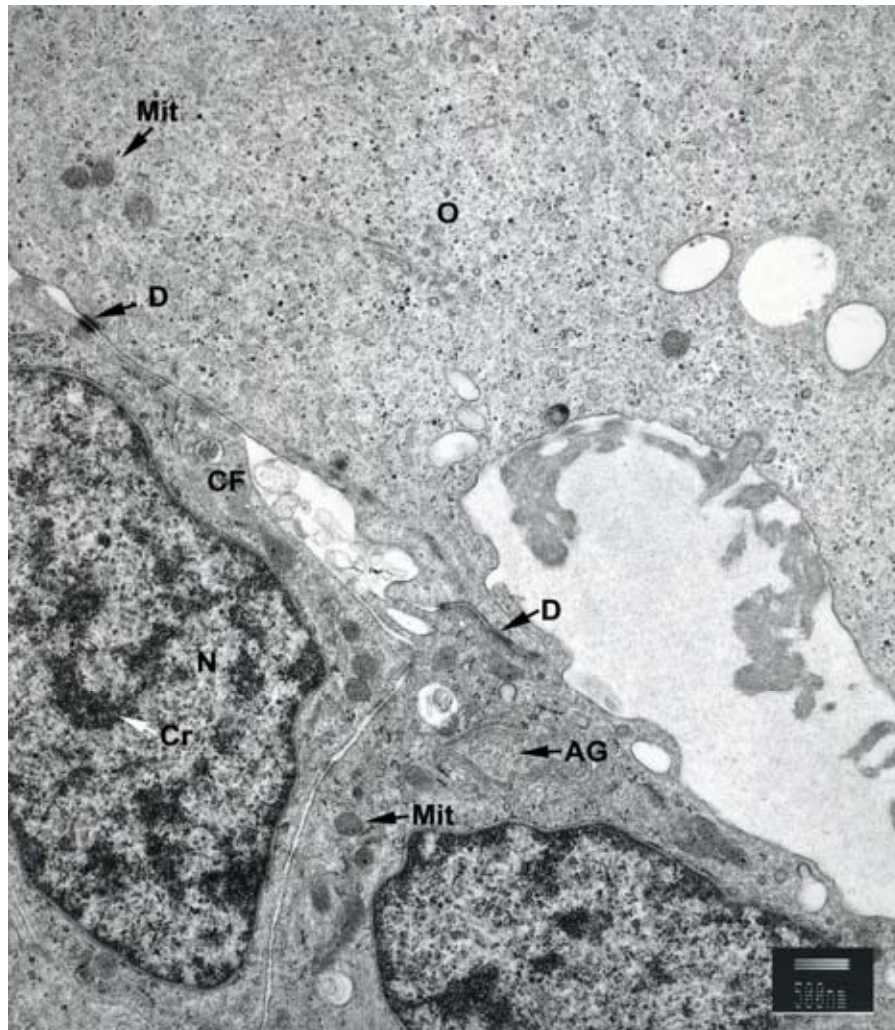


Figura 24. Microscopía electrónica del ovario de una cría de cinco meses de edad de *C. pectinata*. Se observa parte del citoplasma del ovocito (O), donde se distinguen algunas mitocondrias (Mit). Unidas por desmosomas (D) se observan células foliculares (CF), que contienen en su citoplasma mitocondrias (Mit) y aparato de Golgi (AG), el núcleo (N) es muy grande y la cromatina (Cr) se encuentra en parches.

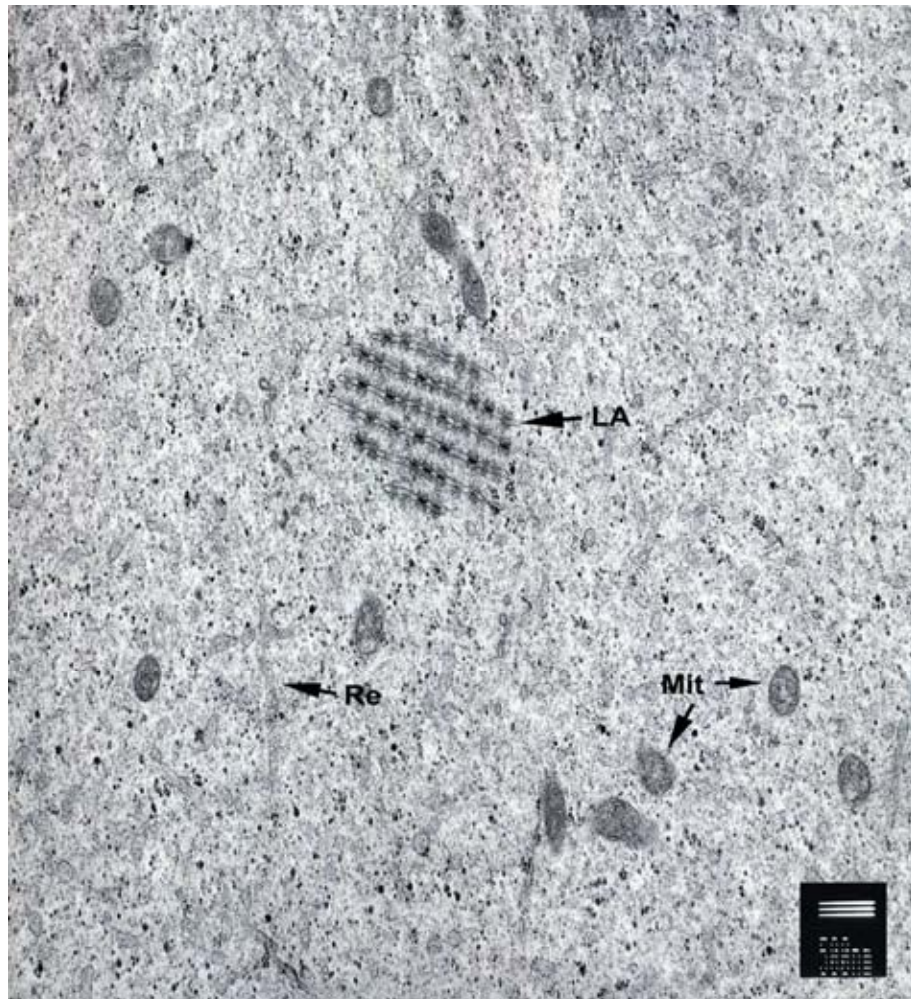


Figura 25. Microscopía electrónica del ovario de una cría de cinco meses de edad de *C. pectinata*. Se observa el citoplasma del ovocito con algunas mitocondrias (Mit), fragmentos del retículo endoplásmico (Re) y láminas anulares (LA).

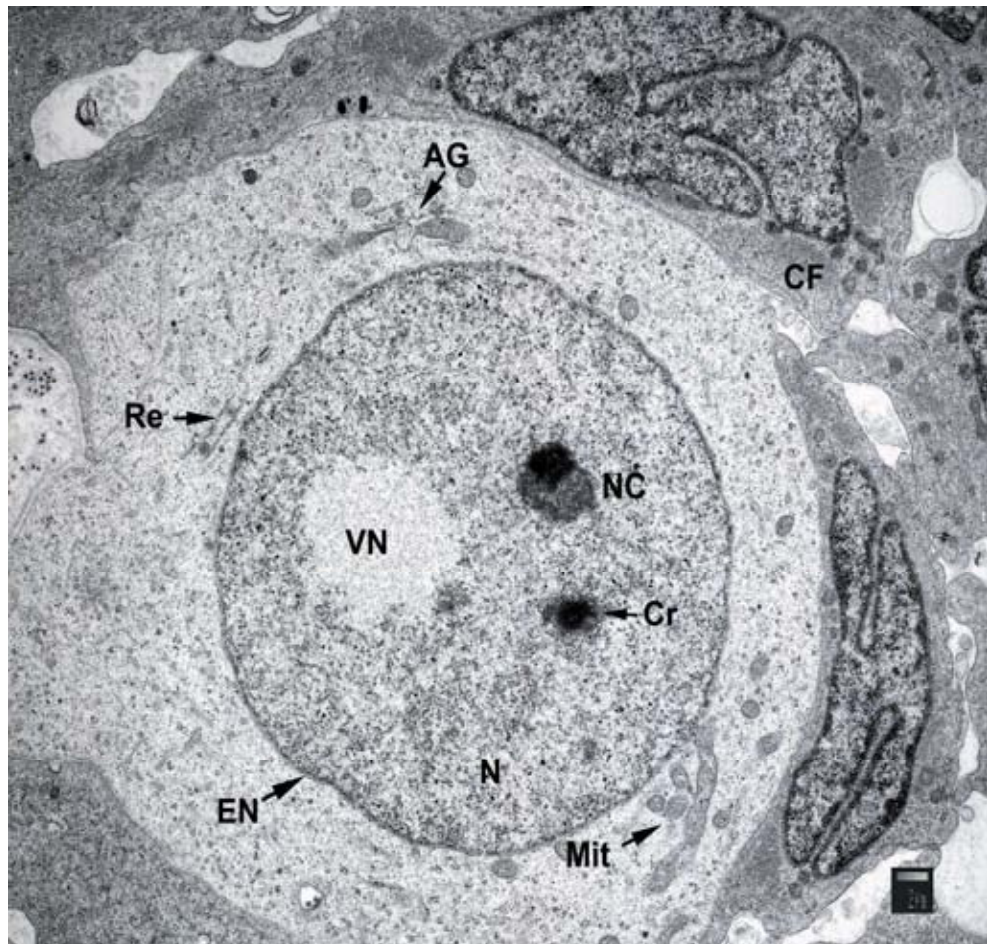


Figura 26. Microscopía electrónica del ovario de una cría de cinco meses de edad de *C. pectinata*. Se observa un ovocito con un gran núcleo (N) central con nucléolo (NC), dos lunares de cromatina condensada (Cr) y una vacuola nuclear (VN). Se distingue claramente la envoltura nuclear (EN). En el citoplasma se observan mitocondrias (Mit), aparato de Golgi (AG) y retículo endoplásmico (Re). Rodeando al ovocito se encuentran células foliculares (CF).

**Juveniles de un año de edad.** En las hembras el tejido germinal exhibe un engrosamiento, ya que hay mayor número de folículos en desarrollo, ovocitos primarios y secundarios. Los ovocito adquieren un gran tamaño al estar rodeados por una capa de células foliculares, que en algunos casos muestran una forma cuboidal. El núcleo es grande, la cromatina se encuentra dispersa y se distinguen los poros de la envoltura nuclear. En el citoplasma, se observan numerosas mitocondrias y se distingue la presencia del aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Alrededor de los folículos y ovocitos en desarrollo se encuentran múltiples paquetes de fibras de colágeno y fibroblastos (Figura 27).



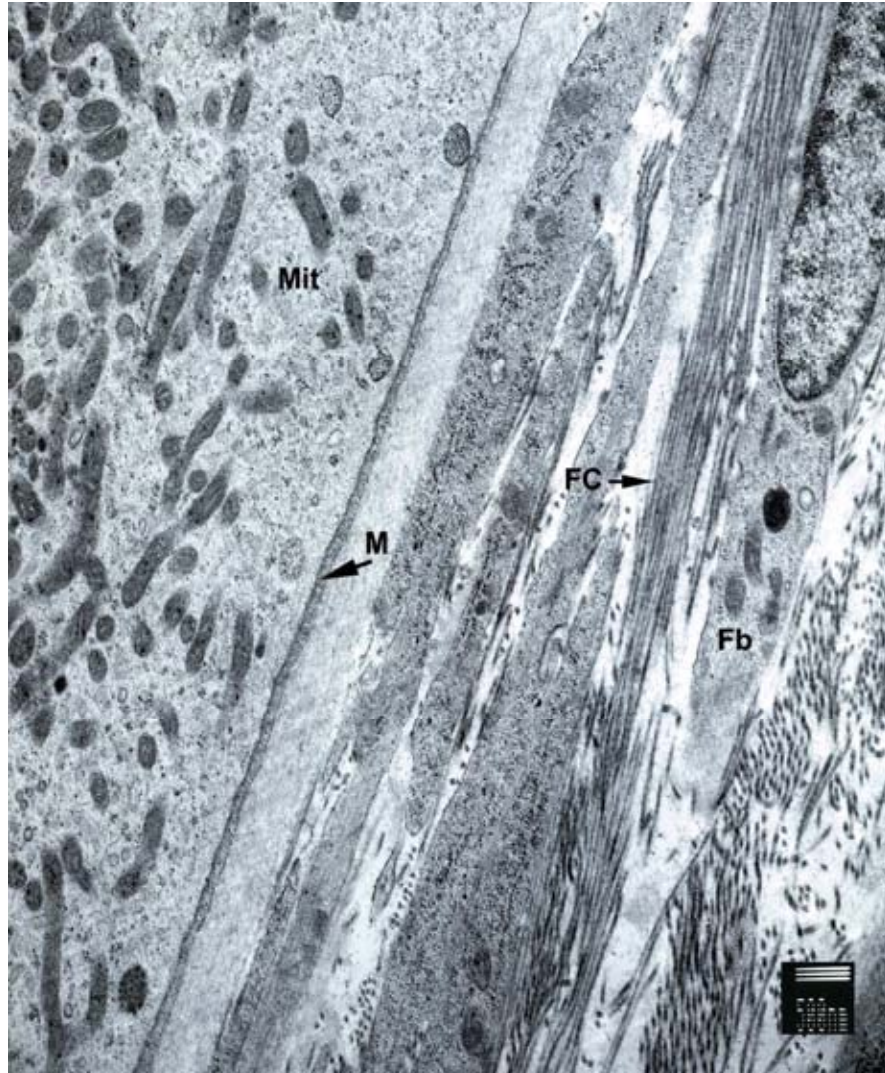


Figura 27. Microscopía electrónica de transmisión del ovario de una hembra de *C. pectinata* de un año de edad. Se observa el citoplasma del ovocito donde se distingue la membrana basal (M), numerosas mitocondrias (Mit). En el intersticio se observan paquetes de fibras de colágena (FC) y fibroblastos (Fb).

#### 8.4 Sexado quirúrgico

Del total de las 12 crías de cinco meses de edad que fueron sometidas al sexado quirúrgico, ocho resultaron ser machos y cuatro hembras. Mediante el sexado histológico se obtuvieron siete machos y cinco hembras. El sexado histológico indicó que seis machos y tres hembras fueron correctamente identificados mediante el sexado quirúrgico, y dos hembras y un macho fueron erróneamente sexados (Tabla 4) (Tabla 5). Esto representa el 25% de la muestra. La aplicación de la prueba de  $X^2$  en el análisis estadístico indica lo siguiente: La  $H_0$  se rechaza y  $H_A$  se acepta, indicando que no existen diferencias entre la aplicación del método de sexado quirúrgico e histológico ( $gl = (r - 1) (c - 1) = 1$ ;  $X^2 = 0.177$ ;  $P = 0.05$ )

Sí  $X^2 \leq 3.841$  se rechaza  $H_0$

$P \leq 0.05$  se rechaza  $H_0$

Tabla 4. Comparación del sexado quirúrgico e histológico en crías de cinco meses.

	<b>Sexado quirúrgico</b>	<b>Sexado histológico</b>	<b>Coincidencia del sexado</b>	<b>Error en el sexado</b>
<b>Machos</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>1</b>
<b>Hembras</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>3</b>

Tabla 5. Tabla de contingencia para la comparación del sexado quirúrgico e histológico.

	<b>Sexado quirúrgico</b>	<b>Sexado histológico</b>	<b>Total</b>
<b>Machos</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>15</b>
<b>Hembras</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>9</b>
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>24</b>

La aplicación de la prueba de  $X^2$  y al corroborarla con la prueba exacta de Fisher en el análisis estadístico indicó que no hay diferencias significativas entre la aplicación de ambas técnicas. ( $P = 0.016$ ).

## IX. DISCUSIÓN

### 9.1 Histología

Las características histológicas del ovario y del testículo de *Ctenosaura pectinata* coinciden con las reportadas para otras especies de reptiles (Uribe *et al.* 1996; Villagrán-Santacruz *et al.*, 1994). En el testículo se observan los cordones seminíferos con un gran número de gonocitos, espermatogonias, células Sertoli y las células de Leydig que se agrupan en el tejido conectivo. Este agrupamiento celular coincide con la descripción hecha en la lagartija chilena *Liolaemus gravenhorsti* a los tres días posparto (Leyton *et al.*, 1982).

Aparentemente el desarrollo histológico de *C. pectinata* se encuentra retardado a diferencia de otras lagartijas de vida corta. Según la descripción Ballinger y Nietfeldt (1989) los machos a los cinco meses presentan el estadio uno. Los túbulos seminíferos comienzan a desarrollarse conteniendo células germinales, espermatogonias y espermatoцитos primarios, considerando al testículo en crecimiento, mientras que *Sceloporus jarrovi* alcanza este estadio a una edad de dos meses (Figura 28). En juveniles de *C. pectinata* de un año de edad se comienza a distinguir la luz del tubo y los espermatoцитos, gonocitos y espermatogonias constituyen el tubo seminífero; en este momento, se encuentran en el estadio dos o espermatogénesis temprana. La lagartija *S. jarrovi* a los seis meses de edad alcanza el estadio dos (Figura 29).

Se observó que el ovario consiste de ovogonias, ovocitos, células germinales y ocasionalmente folículos en desarrollo, dentro de dos parches localizados en la pared dorsal del ovario denominados nichos germinales. Éstos son reportados por Klosterman (1983) para la lagartija caimán *Gerrhonotus coeruleus* (Familia

Anguidae). La presencia de dos nichos germinales también se encuentra en otras lagartijas como la lagartija escamosa *Sceloporus torquatus t.* (Familia Phrynosomatidae), la lagartija nocturna del desierto *Xantusia vigilis* (Familia Xantusidae). Esto difiere de otras especies, como la lagartija cambiante *Calotes versicolor* (Familia Agamidae) y el camaleón americano o anolis verde *Anolis carolinensis* (Familia Polychrotidae) que solo presentan un nicho germinal (Uribe *et al.*, 1995). Existen casos raros, como el caso de la lagartija de cinco líneas *Eumeces faciatus* y *Eumeces copei* (Familia Scincidae), que presentan múltiples nichos sobre la superficie dorsal del ovario. Se considera que el número de nichos germinales se encuentra relacionado con la capacidad del ovario para desarrollar más de un folículo, en consecuencia esto determina el tamaño de la nidada (Jones *et al.*, 1982).

Las hembras al momento de eclosionar presentan el estadio 1 según la descripción de *S. jarrovi* (Ballinger y Nitfeldt, 1989) (Figura 28). A los cinco meses de edad se encuentran en el estadio 2 con la formación de los folículos o foliculogénesis temprana. Las juveniles de un año de edad manifiestan el estadio tres, donde los nichos germinales contienen ovogonias, ovocitos desnudos y folículos en desarrollo o en proceso de foliculogénesis. La morfología del ovario de *C. pectinata* es similar a de otras iguanas o lagartijas emparentadas, las diferencias se delimitan por factores externos (temperatura, humedad, altitud, disponibilidad de alimento y de espacio) o internos (constitución y tamaño de la hembra), de esta manera, la iguana negra manifiesta un desarrollo lento de las gónadas.

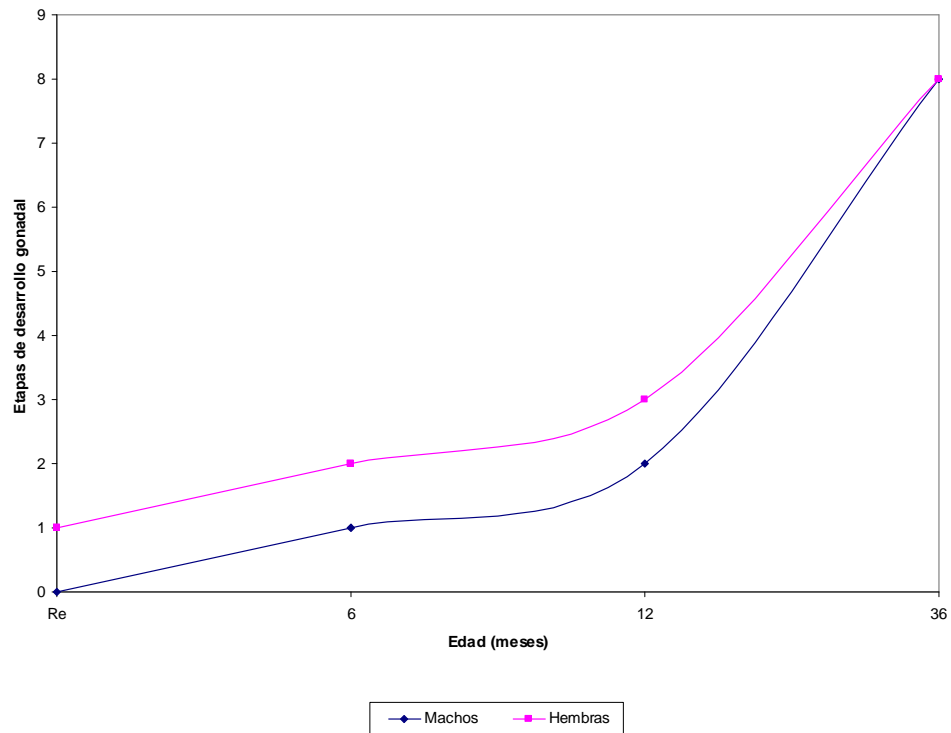


Figura 28. Relación de la velocidad del desarrollo gonadal entre macho y hembra de *C. pectinata* recién eclosionada hasta la edad adulta. Se observa que el desarrollo en hembras es un estadio más rápido que en machos.

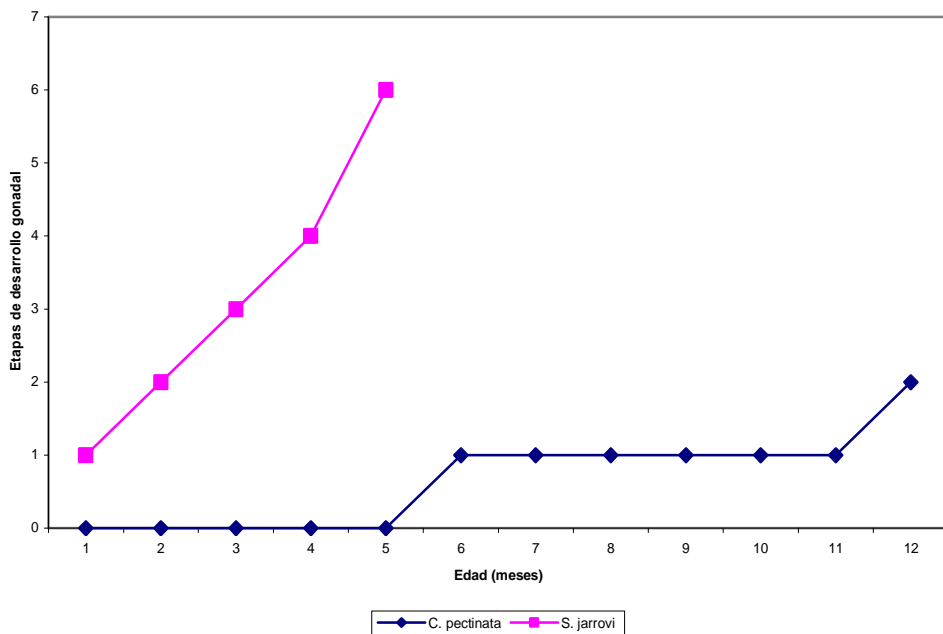


Figura 29. Relación de la velocidad del desarrollo gonadal entre *C. pectinata* y *S. jarrovi*. Se observa que *S. jarrovi* presenta un ciclo de vida corta, por lo que su madurez la obtiene a los seis meses de edad. En *C. pectinata* presenta un ciclo de vida larga, por lo que a los seis meses presenta el estadio uno.

## **9.2 Desarrollo del testículo**

El desarrollo del testículo en crías recién eclosionadas de *Ctenosaura pectinata* es lento en comparación con el de la hembra (Figura 28) que a esta edad lleva un estadio de adelanto, según el ciclo espermatogénico y ovárico de Ballinger y Nietfeld (1989) y Villagran *et al.* (1994)

El desarrollo del testículo permanece con muy pocos cambios en los primeros meses de vida. Al año de edad se observó el avance más significativo en el desarrollo. A esta edad los túbulos seminíferos se encuentran constituidos y bien delimitados por una membrana basal. El número de espermatocitos ha aumentado al igual que las células de Sertoli que se ubican en la membrana basal. Sin embargo, según la descripción de Mayhew y Wright (1970) para lagartijas del género *Uma* (familia Phrynosomatidae) el testículo se mantiene en una etapa muy temprana, ya que la luz del lumen solo se distingue en muy poco túbulos, es decir que el diámetro del túbulo es menor en individuos juveniles a diferencia del diámetro mayor que presentan los adultos.

## **9.3 Desarrollo del ovario**

En el caso de las hembras el avance en el desarrollo del ovario en el momento de la eclosión y a los cinco meses es mayor que el desarrollo que presentan los machos a la misma edad. En el epitelio germinal proliferan células germinales y ovogonias dentro de los nichos germinales bien delimitados de la zona medular. A los cinco meses de edad los nichos germinales contienen ovogonias, ovocitos desnudos y ovocitos rodeados por células foliculares. Al año de edad, el epitelio germinal ha aumentado de grosor, el número de folículos en desarrollo es mayor, los ovocitos

han aumentado de tamaño, al igual que las células foliculares, que han adquirido en algunos casos una forma cuboidal.

**9.3.1 Maduración de las gónadas.** En general el proceso de maduración de las gónadas depende de las condiciones ambientales y de la especie, donde el proceso de desarrollo testicular es lento en comparación con el ovario. En algunas especies los patrones reproductivos son cíclicos y ocurren poco después del nacimiento, en un intervalo de tres a seis meses, por lo que la maduración de las gónadas es más rápida (Doddamani, 1994). La altitud y las condiciones ambientales favorecen la velocidad del desarrollo de las gónadas, como en el caso de *S. jarrovi* que alcanza la madurez sexual a los seis meses de edad (Ballinger y Nietfeldt, 1989). Ocurre lo contrario en aquellas especies que no llegan a madurar en un año, como en el caso de *C. pectinata* que llega a la madurez sexual a los dos o tres años de edad. Sin embargo los cambios histológicos en el desarrollo de las gónadas son similares entre los iguánidos (Villagrán *et al.*, 1994).

El macho de *C. pectinata* en estado adulto presenta testículos constituidos por túbulos seminíferos rodeados por tejido intersticial y cubiertos por la túnica albugínea, la cual es una capa gruesa de fibras de colágeno, fibroblastos, vasos sanguíneos y cerca de ellos se observan células de Leydig. Al centro del túbulo se observan espermatozoides, que en algunos casos obliteran la luz. Los espermatocitos primarios son los más abundantes (Reygoza, 1988).

La hembra en estado adulto presenta en cada ovario dos nichos germinales en la región dorsal. Cada nicho germinal contiene ovogonias, ovocitos primarios y células epiteliales. Los folículos se encuentran en diferentes estados de desarrollo.



#### **9.4 Ultraestructura y desarrollo**

Los elementos ultraestructurales que constituyen a un testículo u ovario permanecen constantes desde el momento de eclosionar y durante su vida reproductiva. El indicativo de la etapa o fase de desarrollo en que se encuentra la gónada, lo determinará el número de sus elementos y de los cambios morfológicos y fisiológicos (Uribe y Guillette Jr., 2000).

En este estudio observamos que los elementos estructurales del testículo y el ovario de *C. pectinata* al nacimiento, a los cinco meses y al año de edad son similares a otros iguánidos y se encuentra en una etapa inmadura. En las tres edades consideradas en el presente trabajo, las células de Leydig son poco abundantes, lo que nos permite establecer que el testículo al año de edad aún es inmaduro. En el estado adulto las células de Leydig son más abundantes, localizándose en la periferia de los túbulos seminíferos. La presencia de las células de Leydig se relacionan con la producción de hormonas esteroides y la manifestación de las características sexuales secundarias útiles en el momento de la reproducción (Fox, 1985).

Las células de Sertoli se encuentran en mayor número a partir de los cinco meses de edad. La ultraestructura muestra la presencia de mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, lo que supone una actividad sintética. Su núcleo es grande de forma triangular en la mayoría de los casos, el nucleoplasma presenta un nucléolo y la cromatina se encuentra dispersa y en pequeños parches alrededor de la membrana nuclear. Estas células mantienen una estrecha comunicación con las espermatogonias, Leyton (1982) sugiere que podrían tener una función similar a la que presentan las células foliculares al nutrir al ovocito. Al año de edad, en algunos

casos la forma del espermatozoido va cambiando, ya que el núcleo es alargado y las mitocondrias se ubican cerca del núcleo, por lo que podemos inferir el comienzo de la espermiogénesis.

En el ovario, la agrupación de mitocondrias de forma tubular cerca del núcleo indica una gran actividad metabólica para la posterior formación del vitelo. En el estadio de vitelogénesis se forman numerosas vacuolas que se agrupan al centro del ovocito en la etapa adulta (Uribe *et al.*, 1996).

En el citoplasma se observó la presencia de laminillas anulares, parecidas a la envoltura nuclear por la presencia de poros, las cuales, son comunes en células sexuales en estado inmaduro o en células con gran actividad de síntesis proteica. Su función es de compartimiento de reserva para formar la envoltura nuclear y como medio de transporte (Alberts *et al.*, 1983).

Los ovocitos con mayor desarrollo presentan una capa simple de células foliculares unidas por puentes citoplasmáticos, los cuales también fueron observados. Dichas células se diferenciaron en células intermedias y piriformes, constituyendo así a la granulosa que desempeñan una función sintética y de soporte para el ovocito, principalmente en el etapa previtelogénica (Andreuccetti, 1992). Según la descripción de Klosterman (1987) para *Gerrhonotus coeruleus* y por las observaciones realizadas en este estudio podríamos considerar al folículo de *C. pectinata* en una etapa temprana con respecto al desarrollo de la granulosa.

### **9.5 Sexado quirúrgico**

Dado que no hubo diferencias significativas entre la técnica histológica y el sexado quirúrgico, los resultados de este estudio validan la utilización del sexado quirúrgico como un método confiable para la determinación del sexo en crías, ya que los errores pueden ser nulos con la práctica y dominio de la técnica. Al utilizar esta técnica no es necesario el sacrificio de las crías, lo cual es indispensable en proyectos de conservación y manejo en cautiverio. Otra ventaja de esta técnica es el ahorro de tiempo, ya que no es necesario esperar la presencia de los caracteres sexuales secundarios.

## X. CONCLUSIONES

La información de iguánidos y su biología reproductiva en etapas embrionarias y post-eclosión son escasas, ya que las descripciones histológicas se realizan principalmente en adultos para conocer su ciclo reproductivo. Por lo que este trabajo contribuye ampliamente a conocer aspectos sobre su desarrollo en etapas tempranas para corroborar que las gónadas de crías de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) al momento de eclosionar se encuentran diferenciadas en hembras y machos.

El estudio histológico y ultraestructural indica que las gónadas de *C. pectinata* presentan los arreglos tisulares que caracterizan a un ovario y a un testículo, coincidiendo con las descripciones realizadas a otros iguánidos. El desarrollo gonadal del macho es más lento que en la hembra, pero en ambos es progresivo durante las edades de recién eclosionadas y de cinco meses. Las diferencias más significativas se observaron al año de edad. Esto dificulta que alcancen su madurez sexual al año de edad a diferencia de otras especies de iguánidos de vida corta.

El manejo y utilización de las crías se puede realizar gracias a que el sexado histológico de las gónadas estableció que la técnica de sexado quirúrgico es confiable para la identificación del sexo en crías sin necesidad de sacrificarlas o esperar la presencia de los caracteres sexuales secundarios.

Aún quedan aspectos por conocer sobre el desarrollo de la iguana negra desde etapas embrionarias hasta el momento en el que llegan a la madurez sexual, así como la influencia de la temperatura en la velocidad de desarrollo durante el periodo de incubación y post-eclosión, que pueden resultar de gran importancia para su manejo y conservación.

## XI. LITERATURA CITADA

**Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson.** 1983.

Biología molecular de la célula. Ediciones Omega S. A. Barcelona España,  
1230 págs.

**Alvarado, D. J. y O. I. Suazo.** 1996. Las iguanas de México: Historia Natural y

Conservación. Laboratorio de tortuga marina y Biología de la Conservación.  
Escuela de Biología. UMNSNH. Morelia Michoacan, 77 págs.

**Andreuccetti, P.** 1992. An ultrastructural study of differentiation of pyriform cell

and their contribution to oocyte growth in representative squamata Joal of  
Morphology. 212: 1-11.

**Arcos-García, J. L., V. H. Reynoso Rosales, G. D. Mendoza Martínez y D.**

**Hernández Sánchez.** 2005. Identificación del sexo y medición del  
crecimiento en Iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) en las etapas de cría y  
juvenil. Revista Científica, FCV-LUZ 15 (4): 338-344.

**Arcos-García, J. L., M. A. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez, V. H.**

**Reynoso, G. D. Mendoza Martínez y B. C. Aguilar Valdez.** 2007.  
Digestibilidad de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) alimentándolas con  
dietas a base de diferentes componentes de insectos y vegetales. Revista  
Científica, FCV-LUZ 17 (3): 255-261.

**Ballinger, R. E. y J.W. Nietfeldt.** 1989. Ontogenetic stages of reproductive

maturity in the viviparous lizard, *Sceloporus jarrovi* (Iguanidae) Journal of  
Herpetology. 23 (3):282-292.

- Banks, W. J.** 1981. Histología veterinaria aplicada. Editorial El Manual Moderno S.A. de C. V. México D. F., 606 págs.
- Boya, V. J.** 1996. Atlas de histología y organografía microscópica. Editorial Médica Panamericana. Madrid España, 317 págs.
- Booolootian, R. A.** 1985. Fundamentos de zoología. Editorial Limusa. México. 616 págs.
- Casas-Andreu, G. y G. Valenzuela-López.** 1984. Observaciones sobre los ciclos reproductivos de *Ctenosaura pectinata* e *Iguana iguana* (Reptilia: Iguanidae) en Chamela, Jalisco. Anales del Instituto de Biología. UNAM Ser. Zool. 55 (2): 253-262.
- Casiano-González, C.** 2001. Obtención de crías de iguana (Manejo y cuidados en el proceso de desove, incubación y eclosión). Cuarto Taller Nacional sobre manejo de iguanas en cautiverio. Puerto Ángel, Oax. 10 pág.
- Crews, D., J. M. Bergeron y J.J. Bull.** 1994. Temperature-dependent sex determination in reptiles: proximate mechanisms, ultimate outcomes and practical applications. Developmental Genetics. 15:297-312.
- Doddamani, L. S.** 1994. Histoenzymological studies on embryonic and posthatching development of the ovary in the tropical oviparous lizard, *Calotes versicolors*. Journal of Morphology. 222:1-10.
- Fox, H.** 1985. The Gonads: Urinogenital system of reptiles. Vol. 6, Págs. 48-105 en (Gans C. y W. T. Dawson. Eds.) Biology of the Reptilia. Academic Press, New York, USA.

- Frost, D. R., Etheridge R., Janies D. y Titus T. A.** 2001. Total evidence alignment, evolution of polychrotid lizard and reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *American Museum Novitates* 3343: 38 págs.
- Gilbert, S. F.** 2005. *Developmental Biology*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires y México, 881 págs.
- Goldberg, S. R.** 1970. Seasonal ovarian histology of the ovoviviparous iguanid lizard *Sceloporus jarrovi* Cope. *Journal of Morphology*. 132: 265-276.
- González-Monfil, G.** 2002. Desarrollo de métodos no letales de sexado en crías de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*), para la obtención de proporciones sexuales al nacimiento. Tesis de Licenciatura para obtener el Título de Biólogo, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 95 págs.
- Gordillo, S. y J. Escobar O.** 1998. Manejo de la iguana verde en semicautiverio: Una estrategia para el desarrollo comunitario y la conservación en áreas naturales del trópico mexicano. Primer Taller Nacional sobre manejo de iguanas en cautiverio. Pátzcuaro, Michoacán.
- Gribbins, K. M. y D. H. Gist.** 2003. Cytological evaluation of spermatogenesis within the germinal epithelium of the male european wall lizard, *Podaris muralis* *Journal of Morphology*. 258: 296-306.
- Guraya,** 1978. Follicular cells. Págs. 261-320 en R. E. Jones. (Eds.) *The vertebrate ovary. Comparative Biology and Evolution*. Plenum Press New York and London.
- Hubert, J.** 1985. Origin and development of oocytes. Vol. 15 (2), Págs. 2:43-71 en Gans C. y W. R. Dawson. (Eds.) *Biology of the Reptilia*. Academic Press, London and New York.

- Janzen, F.J. y G. L. Paukstis.** 1991. Environmental sex determination in reptiles. Ecology, Evolution and Experimental desing. Quart. Rev. Biol. 66 (2): 149-179.
- Jones, R. E., T. Swain, L. J. Jr. Guillet y K. T. Fitzwerald.** 1982. The comparative anatomy of lizard ovaries, with emphasis on the number of germinal beds. Journal of Herpetology. 16: 240-252.
- Junqueira, L. C. y J. Corneiro.** 1982. Aparato reproductor masculino y femenino. Cap. 21, Págs. 421 a 465 en (Salvat Editores, S. A.) Histología básica. Barcelona, España.
- Karnovsky, M. J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal Cell of Biology. 27: 137A-138A.
- Klosterman, L. L.** 1983. The ultrastructure of germinal beds in the ovary of *Gerrhonotus coeruleus* (Reptilia: Anguidae). Journal of Morphology. 178: 247-265.
- Klosterman, L. L.** 1987. Ultrastructural and quantitative dynamics of the granulosa of ovarian follicles of the lizard *Gerrhonotus coeruleus* (Family Anguidae). Journal of Morphology. 192: 125-144.
- Köhler, G.** 1999. La Iguana Verde. Biología, cuidado, cría, enfermedades. Herpeton Verlag Köhler Im Mittelfeld 27, D-63075 Offenbach, Germany. 96 págs.
- Leyton, V., E. Miranda y E. Bustos-Obregón** 1982. Cytological characterization of the germinal line during testicular differentiation in the lizard *Liolaemus gravenhorsti* (Gray). Journal of Morphology. 174: 169-184.



- Marshall, A. J., T. J. Parker y W. A. Haswell.** 1987. Zoología de los cordados. Editorial Reverte. Barcelona y Mexico. 981 págs.
- Mayhew, W. W. y S. J. Wright.** 1970. Seasonal changes in testicular histology of three species of the lizard genus *Uma*. *Journal of Morphology*. 130: 163-186.
- Merchant-Larios, H.** 1978. Ovarian differentiation. Págs. 47-81 en R. E. Jones (Eds.) *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. Plenum Press New York and London.
- Moreno-Mendoza, N.** 1993. Estudio inmunohistoquímico de la diferenciación del ovario fetal y papel de las gonadotropinas en la foliculogénesis del ratón (*Mus musculus*). Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, UAP, Puebla, Pue. 61 págs.
- Moreno-Mendoza, N y H. Merchant-Larios.** 1997. Desarrollo Embrionario de las Gónadas. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Sociedad Mexicana de Ciencias fisiológicas, AC. 255-269 págs.
- Mrosovsky, N. y C. Pieau.** 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*. 12: 169-179.
- Núñez, O. J., D. Rojas Almaraz, R. López-Pozos, R. Barcena G., F. Plata P. y J. L. Arcos-García.** 2007 La edad y el comportamiento reproductivo de la iguana verde (*Iguana iguana*) en condiciones de cautiverio. X Reunión Nacional sobre Iguanas en Cautiverio. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Pág. 95

- Pérez-García, E. A., C. Gallardo y J. Meave.** 2001. Vegetación y Flora de la región de Nizanda, Istmo de Tehuantepec. Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana*, 56: 19-88.
- Raynaud, A. y C. Pieau.** 1985. Embryonic development of the genital system. Vol. 15 (4), Págs. 151-287 en Gans C. y W. R. Dawson. (Eds.) *The Biology of the Reptilia*. Academia Press. London and New York.
- Raygoza, C. H.** 1988 Estudio histológico de testículo y epidídimo de la iguana mexicana *Ctenosaura pectinata*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM, México D. F. 51 págs.
- Salame-Méndez, A. y I. Villalpando-Fierro,** 1998. La diferenciación sexual en vertebrados: hipótesis y teorías. *Acta Zoológica Mexicana*, 73: 89-110.
- Secretaria de Desarrollo Social. Norma Oficial Mexicana.** NOM-059-Ecol-2001 México D. F.
- Tokarz, R. R.** 1978. Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. Págs.145-165 en R.E. Jones. (Eds.) *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. Plenum Press, New York and London.
- Uribe, M. C. A., G. L. Portales y L. J. Gillette Jr.** 1996. Ovarian folliculogenesis in the oviparous mexican lizard *Ctenosaura pectinata*. *Journal of Morphology*. 230: 99-112.
- Uribe, M. C. A. y L. J. Gillette Jr.** 2000. Oogenesis and ovarian histology of the american Alligator *Alligator mississippiensis*. *Journal of Morphology*. 245: 225-240.

- Uribe, M. C. A., M. E. Méndez O., J. E. González Q. y L. J. Gillette Jr.** 1995. Seasonal variation in ovarian histology of the viviparous lizard *Sceloporus torquatus torquatus*. *Journal of Morphology*. 226: 103-119.
- Villegas-Zurita y Segovia-Sáenz.** 1998. Incubación de huevos de iguana (Reptilia: Iguanidae): Técnica y efecto de la temperatura y humedad. Memorias del Primer Taller Nacional sobre manejo de iguanas en cautiverio. Pátzcuaro, Michoacán.
- Villagrán-Santacruz M., F. R. Méndez-de la Cruz y L. Parra-Gómez.** 1994. Ciclo espermatogénico del lacertilio *Sceloporus mucronatus* (Reptilia: Phrynosomatidae). *Rev. Biol. Trop.* 42 (1/2): 289-296.
- Wayne, W. D.** 2007. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 571-652 págs en Ed. Limusa Wiley. México, D. F.
- Wibbels, T.; J. J. Bull y D. Crews.** 1991. Chronology and morphology of temperature dependent sex determination. *The Journal of Experimental Zoology*. 260: 371-381.
- Young, J. Z.** 1985. La vida de los vertebrados. Editorial Omega. Barcelona, España. 606 págs.
- Zar, J. H.** 1996. Biostatistical analysis. Third edition. 483-511 págs en Ed. Prentice – Hall, Inc. U.S. A.

## **XII. APÉNDICE**

### **Técnica histológica para microscopia electrónica**

#### **FIJACIÓN**

Las gónada se fijaron con solución Karnovsky 0.1 M (4 °C)

#### **POST-FIJACIÓN**

Los tejidos se lavaron con Buffer de Cacodilato de Sodio 0.1 M 1 hr. (4 °C)

Los tejidos se colocaron en Tetraóxido de Osmio 1% Zelter QUST 1 hr. (4 °C)

Se lavan los tejidos con agua destilada tres veces

#### **DESHIDRATACIÓN**

Se realizan dos cambios con alcohol al 70% y se deja con el tercero 10 min. (4 °C)

Dos cambios con alcohol al 80% y se deja con el tercero 10 min. (4 °C)

Dos cambios con alcohol al 90% y se deja con el tercero 10 min.

Dos cambios con alcohol al 95% y se deja con el tercero 10 min.

Dos cambios con alcohol al 100% y se deja con el tercero 20 min.

Dos cambios con alcohol al 100% y se deja con el tercero 20 min.

Óxido de propileno 20 min.

Óxido de propileno 20 min.

#### **IMPREGNACIÓN**

Los tejidos se colocan en una mezcla de Epón con Óxido de propileno

Epón-Óxido de propileno 1:1 1 hr.

Epón-Óxido de propileno 2:1 1 hr.

Epón puro 24 hrs.

#### **INCLUSIÓN**

La inclusión se realiza con Epón en moldes, según el tamaño de la muestra y las necesidades, se deja en una estufa a 60 °C 24 hrs.

## PREPARACIÓN DE EPÓN 812 PELCO (Cat. 18009)

Mezcla A

Med Cast 50 ml

Dodecenil succinico anhídrido (DDSA) 81 ml.

Temperatura 4 °C

Mezcla B

Med Cast 50 ml

Metil nádico anhídrido (NMA) 44 ml.

Temperatura 4 °C

Para preparar 10 ml; se colocan 7 ml de mezcla A y 3 ml de mezcla B, además de agregar catalizador DMP -30 ( 2,4,6 – tris-dimetil aminofenil fenol) 0.15 ml , mezclándose perfectamente, evitando la formación de burbujas durante 20 min.

El Epón se prepara y utiliza a temperatura ambiente, cerca de una lámpara.

Ya que fueron utilizadas las mezclas se mantienen en refrigeración.

## AZUL DE TOLUIDINA

Azul de toluidina 0.5%

Sal de Borato de Sodio 4.0%

Para preparar un litro se requiere de:

Azul de toluidina 5.0 gr en 300 ml de Agua destilada

Tetraborato de sodio 40.0 gr aforados a 1 lt.

Hervir 15 min

Dejar enfriar

### XIII. GLOSARIO

**Apoptosis:** Muerte celular programada. Es un proceso genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos para mantener la homeostasis del organismo.

**Células foliculares:** Células que rodean y nutren al ovocito en su proceso de maduración. Se disponen en una sola capa plana al comienzo en la maduración del ovocito.

**Desmosoma:** (mácula adherens). Es un tipo de unión que se observa como un engrosamiento de la membrana plasmática, a la cual se adhieren asas de microfilamentos, formando una red continua.

**Espermatocito primario:** Son el resultado de la división mitótica de las espermatogonias, posteriormente se realiza el intercambio genético, se reduce el número cromosómico. Después de la meiosis I se transforman en espermatocitos secundarios

**Espermatogonias:** Células germinales que migran desde el saco vitelino durante el desarrollo embrionario hacia la gónada, donde se diferencian en gonocitos, estos al multiplicarse se transforman en espermatogonias.

**Fibroblastos:** Células de tejido conectivo encargadas de una producción activa de colágeno y mucopolisacáridos.

**Folículo primordial:** Se compone de un ovocito rodeado por células epiteliales aplanadas o células foliculares y están incluidos en gran número en la corteza del ovario.

**Gonocitos:** Durante el desarrollo embrionario las células germinales migran desde el saco vitelino hacia la gónada en desarrollo y forman parte de los cordones sexuales. Los gonocitos surgen de estas células germinales.

**Granulosa:** Células foliculares que sufren proliferación por división mitótica, formando un epitelio estratificado de células planas, cúbicas y piriformes.

**Lámina basal:** Es una fina capa de matriz extracelular que se ubica entre el tejido epitelial el tejido conjuntivo subyacente. Se forma de un retículo laminar colágeno de tipo IV unidas a moléculas específicas que le permite unirse a células vecinas

**Ovocito primario:** Se originan a partir de la multiplicación por mitosis de las ovogonias. Posteriormente experimenta meiosis y forma el óvulo.

**Ovogonias:** Células germinales que migran desde el saco vitelino durante el desarrollo embrionario hacia la gónada, donde se diferencian en gonocitos y al multiplicarse por mitosis se denominan ovogonias.

**Quiescencia:** Detención del crecimiento debido a condiciones ambientales.

**Túnica albugínea:** Es una cápsula de tejido conectivo fibrosa y blanca que rodea y delimita al testículo.