



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

EFFECTO DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA SOBRE LA
ACTIVIDAD OVÁRICA DE HEMBRAS PREÑADAS DE LA LAGARTIJA
VIVÍPARA *Barisia imbricata imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

LUIS RICARDO SOSA AGUILAR

ASESOR: M. EN C. MARTÍN MARTÍNEZ TORRES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Efecto de la gonadotropina coriónica humana sobre la actividad
ovárica de hembras preñadas de la lagartija vivípara Barisia
imbricata imbricata (REPTILIA: ANGUIDAE).

que presenta el pasante: Luis Ricardo Sosa Aguilar
con número de cuenta: 9130881-4 para obtener el título de :
Médico Veterinario Zootecnista

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Junio de 2010.

PRESIDENTE	<u>MC. Martín Martínez Torres</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Gerardo López Islas</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Tiziano Santos Morin</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Alan Olazábal Fenochio</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Francisco Rodolfo González Díaz</u>	

Dedicatoria

Al MC. Martín Martínez por su apoyo para la realización de mi tesis.

A la mujer más buena del mundo, donde quiera que te encuentres, ¡Gracias abuelita!

A mis padres por ser el mejor ejemplo de trabajo y tenacidad, siempre luchando por sus hijos.

A mis hermanos, Erick y Sandro, compañeros de juego.

A mi hermana Ivonne por cuidarnos como una madre.

A mi esposa Edith por apoyarme y alentarme a seguir estudiando. Este logro es de los dos. Te amo.

A mis hijos Einar, Emilia y Sofía, el motor que me impulsa cada día, ustedes siempre serán mi inspiración. Los amo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

A mis amigos y compañeros.

A todos los que no tienen voz, que sienten y sufren igual que nosotros... mis queridos perros.

"El médico ayuda con lo que sabe, no con lo que ignora e ignorar las cosas universalmente sabidas es privar al enfermo de un beneficio sin el cual puede quedar comprometida su salud o su vida"

MVZ Luis Jorge Alanis Calderón



ÍNDICE	Página
RESUMEN.	1
I. INTRODUCCIÓN.	2
I.I Aparato Reproductor.	2
I.II Ovario.	3
I.III Oviducto.	5
I.IV Infundíbulo.	6
I.V Útero.	6
I.VI Regulación del desarrollo folicular.	7
I.VI a Señales ambientales y gonadotropinas.	7
I.VI b Estimulación con gonadotropinas de mamífero.	8
II. ANTECEDENTES.	8
II.I Viviparidad.	8
II.II Cuerpo lúteo y progesterona.	9
II.III Esteroidogénesis ovárica.	10
II.IV Regulación de la producción de progesterona.	11
II.V Biología reproductora de <i>Barisia imbricata imbricata</i> .	12
II.VI Fases del desarrollo del cuerpo lúteo (CL).	12
II.VI a Formación.	12
II.VI b Involución.	14
II.VII Perfil de progesterona (P ₄) en <i>Barisia imbricata</i> .	14

III. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	15
IV. OBJETIVOS.	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS.	16
V.I Localización.	16
V.II Animales.	16
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.	17
VI.I Obtención de sangre.	17
VI.II Procedimiento quirúrgico.	17
VI.III Administración farmacológica.	18
VI.IV Procesamiento y tinción.	19
VI.V Radioinmunoanálisis (RIA).	19
VI.VI Análisis estadístico.	19
VII. RESULTADOS.	20
VII.I Histología de los cuerpos lúteos previo al tratamiento.	21
VII.II Histología de los cuerpos lúteos después del tratamiento.	22
VII.III Cuerpos lúteos del grupo experimental.	22
VII.IV Cuerpos lúteos del grupo control.	22
VII.V Progesterona.	23
VII.VI Concentración de progesterona en el tejido luteal.	23
VII.VII Concentración de progesterona en el plasma.	24

VIII DISCUSIÓN.	25
IX CONCLUSIONES.	28
X APÉNDICE.	29
XI REFERENCIAS.	32

RESUMEN.

Durante la gestación de los mamíferos la actividad del cuerpo lúteo (CL) está regulada por gonadotropinas placentarias como la gonadotropina coriónica humana (GCh), la gonadotropina de suero de yegua preñada o la gonadotropina coriónica (en roedores). Diversos autores le han asignado al CL un papel central en el mantenimiento del periodo de gravidez, y en la evolución de la viviparidad de los reptiles debido a su capacidad para producir progesterona. A pesar de la importancia que se le ha dado al CL, en los reptiles, se desconocen los mecanismos que regulan su actividad. Se ha sugerido que la actividad del CL pudiera ser regulada por gonadotropinas (como en los mamíferos), sin embargo no existen trabajos al respecto. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la Gonadotropina Coriónica Humana (GCh), sobre la actividad ovárica en hembras gestantes de la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata*. Se emplearon 10 hembras de esta lagartija que cursaban el primer tercio de la gestación. Se dividieron aleatoriamente en dos grupos de cinco animales cada uno, el primero se denominó grupo experimental (grupo 1), el segundo como grupo control (grupo 2). El protocolo farmacológico fue; administración intraperitoneal (IP) de 50 UI de GCh equivalente a 0.05 ml de solución dos veces por semana durante 9 semanas al grupo experimental. Al grupo control se le administró vía IP a 0.05 ml solución de cloruro de sodio al 0.9%, con la misma frecuencia y periodo de tiempo al del grupo experimental.

Los resultados de los cortes histológicos muestran que los cuerpos lúteos (CL) de las hembras del grupo experimental tratadas con GCh presentaron cambios degenerativos típicos de luteólisis, y los niveles plasmáticos de progesterona (P_4) disminuyeron significativamente ($p < 0.05$, $t = 1.173$) encontrándose concentraciones de 12.14 ± 4.2 /cuerpo lúteo. Estos datos sugieren que el CL de *Barisia imbricata imbricata* carece de receptores a esta gonadotropina. Sin embargo, se observó que todas las hembras tratadas con GCh desarrollaron folículos vitelogénicos. Estas observaciones demuestran de manera indirecta que los folículos ováricos de esta lagartija si presentan receptores a esta gonadotropina y que estos se pierden luego de la ovulación.

I. INTRODUCCIÓN

Los reptiles se distinguen de cualquier otro vertebrado, fundamentalmente, porque su cuerpo está cubierto de escamas. Además, son organismos poiquiloterms, es decir: no tienen el control endógeno de su temperatura corporal. Además, tienen la capacidad para respirar aire atmosférico por medio de pulmones, y al nacimiento los jóvenes son similares en forma y costumbres a sus padres (Bellairs y Attridge, 1978). Muestran una gran variación en su tamaño: van desde unos centímetros, como en el caso de la mayoría de las lagartijas, hasta algunos metros como, en el caso de las serpientes y cocodrilos (Bellairs y Attridge, 1978).

Los reptiles están adaptados a infinidad de hábitats y evolutivamente han producido diversos modelos de estructura y comportamiento. El mayor número de géneros y especies se distribuye en los trópicos, descendiendo rápidamente hacia las zonas templadas (Bellairs y Attridge, 1978; Goin y col., 1978).

Muchos reptiles son terrestres, caminan, corren o reptan sobre la superficie de la tierra y podemos encontrarlos bajo las piedras, entre las raíces, trepados en los árboles o bajo la tierra. No obstante, podemos encontrar algunas especies con un grado de adaptación acuática sorprendente (Bellairs y Attridge, 1978; Goin y col., 1978).

Todas las tortugas, cocodrilos y diversos escamosos son ovíparos, sin embargo, encontramos que el 20% de las 6000 especies de escamosos (lagartijas y serpientes) son vivíparos (Xavier, 1987; Martínez-Torres, 1997), lo que implica no solo la retención del embrión en el tracto reproductor materno, sino también el intercambio de material entre el embrión y el torrente sanguíneo de la madre (Goin y col., 1978; Hildebrand, 1985).

I.I Aparato Reproductor.

La anatomía macroscópica del tracto reproductor femenino en reptiles ha sido descrita en trabajos publicados desde mediados del siglo XIX. Así mismo, la información disponible ha permitido el reconocimiento de un patrón reptil básico (figura 1), en donde observamos un par de ovarios ovales o alargados ubicados en la cavidad abdominal y están sostenidos a la pared dorsal del cuerpo por el mesovario (Blackburn, 1998; Van Tienhoven, 1983, Goin y col., 1978). Están seguidos por dos tubos pares (los oviductos) divididos en tres regiones: la anterior denominada infundíbulo, la media llamada útero y finalmente la vagina (Cuellar, 1966).

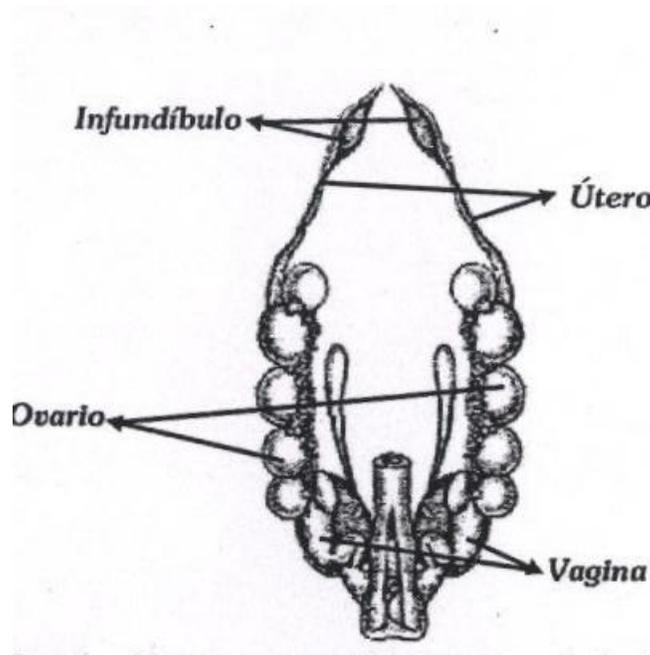


Figura 1. Esquema, vista ventral del aparato reproductor femenino de reptil (modificado de Romer, 1970).

Como en muchos otros vertebrados, los órganos reproductores presentan cambios cíclicos, es decir, se observan periodos de actividad reproductora, seguido por periodos de quiescencia (Guillette y Casas-Andreu, 1987). Estos cambios están determinados por la actividad de glándulas endócrinas como la hipófisis y también influenciados por factores ambientales como la temperatura, luz, humedad y el suministro de alimento (Bellairs y Attridge, 1987).

I.II Ovario.

El aspecto del ovario cambia durante el ciclo reproductor. De manera general podemos señalar que durante la vitelogénesis el parénquima ovárico presenta folículos previtelogénicos poco aparentes, folículos vitelogénicos (los cuales incrementan su volumen conforme avanza la vitelogenesis) y folículos atrésicos. Durante la temporada de gestación son muy evidentes los cuerpos lúteos, aunque también pueden encontrarse folículos atrésicos y folículos previtelogénicos poco aparentes. A diferencia de las aves y de los mamíferos, el ovario de los reptiles produce ovocitos a partir de ovogonias durante toda la vida, por lo que también en la parte dorsal del ovario se encuentra uno o varios lechos germinales donde se encuentran las ovogonias, las cuales proliferan y producen folículos primordiales previo a cada ciclo reproductivo (Byscov 1978; Guraya y Varma 1976). El

estroma ovárico está compuesto por fibras y diferentes tipos de células del parénquima, siendo los fibroblastos los más abundantes (figura 2).

El ovario cumple dos funciones fundamentales para la reproducción: la producción de gametos y la producción de hormonas.

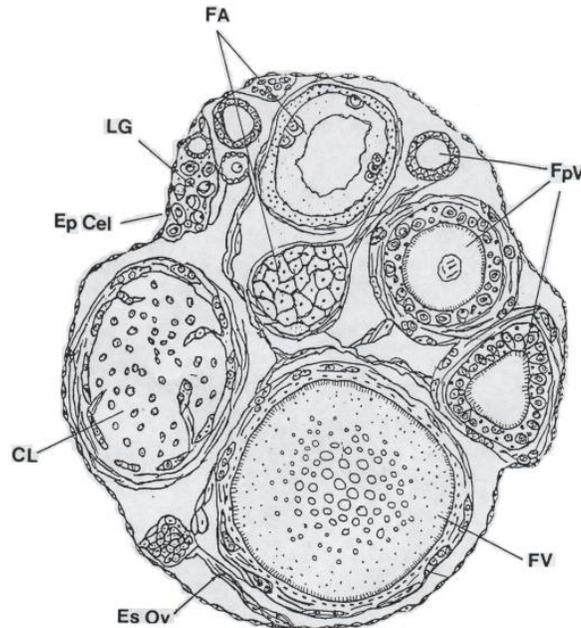


Figura 2. LG: Lecho Germinal; FpV: Folículos previtelogénicos; FV: Folículo Vitelogénico; FA: Folículos Atrésicos; CL: Cuerpo Lúteo activo; Es Ov: Estroma Ovárico; Ep Cel: Epitelio Celómico. (Tomada de Villagrán, 1989).

Crecimiento folicular.- Dentro del lecho germinal los ovocitos de los reptiles crecen y maduran, posteriormente lo abandonan y de manera simultánea se rodean de la capa vitelina (o zona pelúcida) y de una capa de células planas: el epitelio folicular (o capa granulosa) (Guraya 1978; Guraya y Varma 1976) que se originan a partir de las células indiferenciadas de la pared del lecho germinal. El ovocito en estos momentos mide, aproximadamente, 40 μ m de diámetro. Posteriormente el ovocito crece y la pared folicular se convierte en un epitelio estratificado constituido por tres tipos de células foliculares: células pequeñas, células intermedias y células piriformes (Guraya 1978).

Las células piriformes están en comunicación con el ovocito a través de proyecciones citoplásmicas y a su vez el ovocito presenta microvellosidades (figura 3). Durante el crecimiento ulterior, el folículo del epitelio folicular se adelgaza; en los folículos

vitelogénicos la teca se diferencia morfológicamente en teca externa y teca interna y el epitelio folicular está compuesto por una sola capa de células planas las cuales tienen un tamaño y forma similar; conforme se va acumulando vitelo en el ovocito las células foliculares se van aplanando cada vez más, la zona pelúcida se vuelve más gruesa que en estadios previos y la teca incrementa su grosor y vascularización (Saidapur, 1982).

Los folículos vitelogénicos preovulatorios presentan la zona pelúcida todavía más engrosada, las células del epitelio folicular son sumamente aplanadas, hay una amplia vascularización en los límites de la teca interna y externa. La teca externa ha incrementado su grosor y es rica en fibras de colágena, la teca interna presenta células hipertrofiadas de citoplasma claro y núcleo vesicular (Guraya 1976, 1978).

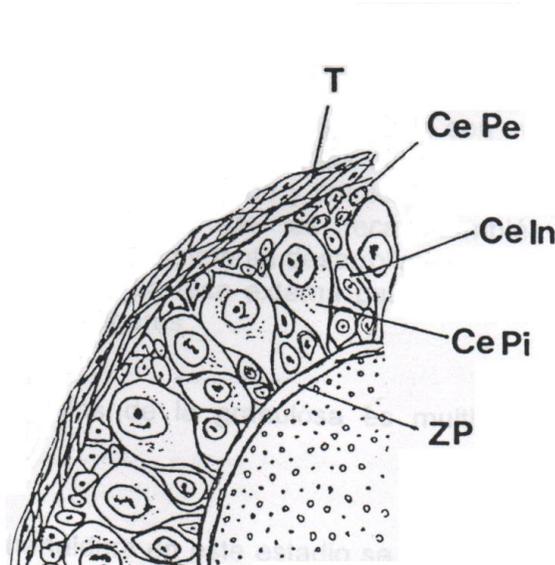


Figura 3. ZP: Zona Pelúcida, Ce Pe: Epitelio folicular compuesto de células pequeñas, Ce In: Células intermedias, Ce Pi: Células piriformes, y T: Teca.

I.III Oviducto.

Es un derivado de los conductos de Müller. Estos conductos son pares y se observan como tubos de pared delgada que se extienden a lo largo de la cavidad torácica (Blackburn, 1998; Van Tienhoven, 1983). Estas estructuras participan en la fertilización, en el almacenamiento de esperma, el transporte de huevos, el mantenimiento del embrión y la expulsión del huevo o feto. (Blackburn, 1998).

De acuerdo a Blackburn (1998), histológicamente el oviducto consta de tres capas generales: el epitelio, la capa intermedia o lámina propia y la capa muscular externa o miometrio. La mucosa oviductal comprende las dos primeras capas. El epitelio que reviste el *lúmen* consiste de una sola capa de células de aspecto escamoso cúbico o columnar dependiendo de la región y estado reproductivo. Algunas células presentan ciclos o proyecciones plasmáticas, solo visibles en el microscopio electrónico.

La lámina propia consiste de tejido conectivo irregular laxo o denso con abundantes fibras de colágena y fibroblastos, glándulas y ocasionalmente macrófagos. También encontramos vasos sanguíneos así como glándulas multicelulares (Blackburn., 1998).

El movimiento del oviducto es generado por la contracción de la bicapa de músculo liso. La capa interna es circular y la capa externa longitudinal. Externamente el oviducto está recubierto por una membrana serosa (Blackburn., 1998).

I.IV Infundíbulo.

Es la primera región del oviducto y es responsable de captar al ovocito recién expulsado del ovario, es de forma estrellada, flácido y translúcido, y se caracteriza por presentar pliegues prominentes (Blackburn, 1998).

En los lacertilios los oviductos se encuentran siempre separados por lo que cada conducto forma de manera independiente un útero y una vagina (Bellairs y Attridge, 1978).

I.V Útero.

En reptiles ovíparos (tortugas, cocodrilos algunas serpientes y lagartijas), el útero aloja a los embriones en desarrollo y deposita las cubiertas ovulares como la membrana de la cáscara y la capa de carbonato de calcio que forman la cáscara del huevo (Blackburn, 1998, Goin y col., 1978). En las especies vivíparas contribuye, junto con la placenta, al intercambio de gases y al suministro de nutrientes al feto. Durante la preñez el útero se presenta distendido por los embriones y cuando más de un huevo se aloja en él, se forman cámaras de incubación que se alternan con regiones interembriónicas constreñidas. En las especies vivíparas el útero post-grávido comúnmente aparece distendido, evidencia de la reciente presencia de huevos (Blackburn, 1998).

El útero presenta cambios estacionales dramáticos en la altura del epitelio, así como en el tamaño y estado de actividad de las glándulas uterinas. También se registran cambios estacionales en el espesor de la lámina propia y del miometrio, sin embargo, en algunas especies, los cambios en la altura del epitelio son pequeños o inexistentes (Blackburn, 1998).

Como resultado de la adaptación a la viviparidad, el útero se modifica en las formas vivíparas a través de un aumento en la vascularidad, así como en la disminución en el tamaño de las glándulas de la cáscara y en la altura del epitelio (Blackburn, 1998).

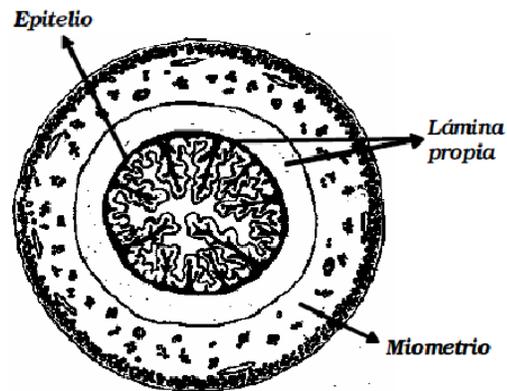


Figura 4. Corte transversal de oviducto de reptil (tomado de Martínez-Torres, 1997).

I.VI Regulación del desarrollo folicular.

I.VI a. Señales Ambientales y Gonadotropinas.

La temperatura, el fotoperiodo la disponibilidad de alimentos y la lluvia son los principales factores ambientales que participan en el control del inicio de la actividad gonadal en los reptiles escamados. Hay evidencias de que el factor liberador de gonadotropinas está presente en el hipotálamo reptil y existen evidencias bioquímicas que muestran que existen dos gonadotropinas químicamente diferentes en la hipófisis anterior de diversas especies de quelonios y cocodrilos. Sin embargo los intentos por aislar estas entidades por separado a partir de la hipófisis de los escamados no han sido posibles. Recientemente sólo ha sido posible identificar gonadotropos productores de hormona folículo estimulante (FSH) en la lagartija *Podarsis simula Uromastyx acanthinura*. Además, el papel biológico, por separado, de cada una de estas gonadotropinas tampoco ha sido del todo aclarado (Callard y Kleis, 1985).

I.VI b Estimulación con Gonadotropinas de mamífero.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la gónada de los reptiles escamosos es sensible a la estimulación con gonadotropinas de mamífero (Licht and Pearson 1969; Licht, 1970; Callard et al.1972) o sus análogos. La aplicación de gonadotropinas de ovino a lagartijas adultas mostró que tanto la hormona folículo estimulante (FSH) como la hormona luteinizante (LH) son capaces de promover desarrollo ovárico y la esteroidogénesis (*Anolis carolinensis*, *Uta stansburiana* y *Sceloporus occidentalis*, Licht 1970). Sin embargo, parece ser que la FSH de ovino es más eficiente que la LH, ya que se observó que la administración de dosis “bajas” de FSH altamente purificada inducen el desarrollo folicular, la ovulación y el incremento en el peso del oviducto (Licht, 1970). La ovulación también ha sido inducida con gonadotropinas en los saurios mediante la aplicación de gonadotropinas de mamífero (Jones and Guillette, 1982, Martínez-Torres, et al 2008).

II ANTECEDENTES.

II.I Viviparidad.

La viviparidad es una estrategia reproductora que se presenta en diversas especies de reptiles escamados (serpientes lagartijas y anfisbénidos) (Martínez, 1997). Esta forma de parto se presenta en alrededor del 20% de las 6000 especies de lagartijas y serpientes que existen en el mundo (Shine, 1995).

Existen diversas hipótesis acerca de las condiciones ecológicas que promovieron la evolución de la viviparidad. La hipótesis del clima frío es la más aceptada y propone que las hembras grávidas retienen el huevo embrionado como respuesta termorreguladora a estas condiciones climáticas (Shine, 1995). Además, existen reportes de diversos autores que apoyan este punto de vista; por ejemplo Braña y col. (1991) estudiaron distintas poblaciones de especies de lagartijas europeas y encontraron que a mayor altitud, el tiempo de retención del huevo es más prolongado. En México Camarillo (1981) observó que en poblaciones de lagartijas de zonas templadas a elevadas latitudes, hay un mayor número de especies vivíparas que ovíparas.

Por otro lado, hay evidencias que sugieren que la viviparidad no solo surgió como una adaptación a climas fríos; ya que se han encontrado especies vivíparas en climas tropicales y que además, no provienen de ancestros que habitaran en climas templados (Blackburn y

col. 1984). Además, se ha señalado que la viviparidad también pudo surgir como respuesta a otros factores tales como la depredación, humedad, sequedad, etcétera. (Martínez Torres 1997).

Durante la evolución de la viviparidad reptil ocurrieron una serie de cambios tanto en la hembra gestante y como en el embrión, dentro de las que destacan las siguientes: a) alargamiento de la vida media del cuerpo lúteo, b) alargamiento del patrón de secreción de progesterona, c) incremento en la vascularidad uterina, d) reducción de las glándulas uterinas, e) pérdida del cascarón calcáreo, f) desarrollo de la placenta (Blackburn, 2000; Callard et al., 1992; Guillette, 1993).

II.II Cuerpo lúteo y Progesterona.

El CL es una glándula de secreción endocrina efímera presente en todas las hembras grávidas de los vertebrados, se desarrolla en los ovarios después de la ovulación a partir de las membranas de los folículos preovulatorios. Su función principal es sintetizar y secretar esteroides, primordialmente progesterona, la cual es requerida para el establecimiento de la preñez (Xavier, 1987).

La formación del CL en los reptiles se inicia por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos en las células de la granulosa y de la teca interna del folículo pre ovulatorio. Después del estímulo ovulatorio, pero antes de la ovulación hay una hipertrofia de las células de la granulosa y activación nuclear (Gordon y Net, 1988; Xavier, 1987).

Diversos autores le han dado al CL un papel central en la evolución de la viviparidad y en el mantenimiento de la gestación por su capacidad de producir progesterona (P_4). (Callard 1992, Shine and Guillette, 1988).

Es ampliamente conocido que la P_4 es el producto más importante del CL, y que tanto las especies vivíparas como las ovíparas tienen la capacidad de sintetizar este esteroide; aunque difieran en la cantidad y duración de la secreción. En reptiles ovíparas como la tortuga *Chelonia mydas* exhiben un incremento en la producción de la P_4 antes de la ovulación y esta decae en la fase luteal en forma marcada. A diferencia de las especies vivíparas como en los saurios *Trachydosaurus rugosus* (Bourne, 1972), *Sceloporus jarrovi* (Guillette y col., 1992) y *Barisia imbricata* (Martínez-Torres et al., 2003), los cuales

exhiben una producción abundante de esta hormona en el periodo postovulatorio. La progesterona cumple funciones fundamentales tanto para el establecimiento como para el mantenimiento de la gestación entre los que destacan: preparar al útero para la implantación, inhibición de la contractilidad uterina, participa en la regulación de la respuesta inmune, (Graham and Clarke, 1997) en los reptiles modulan la respuesta del miometrio en la preñez tardía a la arginina-vasotocina (Martínez-Torres et al., 2010).

II.III Esteroidogénesis ovárica.

La P_4 como los demás esteroides, posee un anillo ciclopentanoperhidrofenantreno de 17 carbonos como estructura principal. Es sintetizada a partir del colesterol (molécula de 27 carbonos) incorporado a través del alimento o sintetizado a partir del acetato en el retículo endoplásmico. El colesterol, mediante la enzima 20,22 esteroide liasa se transforma en pregnenolona, debido a pérdida de 6 átomos de carbono (C) de la cadena lateral en el C17, si sigue por la vía Δ_4 , la oxidación del grupo alcohol y el desplazamiento de la doble ligadura del anillo B al anillo A mediado por la $\Delta^{5,4}\beta$ HSD. La pregnenolona se transforma en P_4 . En el caso de la vía Δ^{-5} mediante la P450c17 (que tiene la capacidad de actuar como una hidrolasa o una liasa) se forma 17α hidroxipregnenolona, por la adición de un grupo OH en el C17 en posición α . A partir de la 17α hidroxipregnenolona mediante la acción de la $\Delta^{5,4}\beta$ HSD se forma P_4 (Callard y Kleis, 1985). La P_4 mediante la P450c17 se transforma en androstenediona debido a la incisión de 2 C en la posición 17-20 y la formación en este carbono de un grupo ceto. Para que se forme testosterona a partir de la androstenediona deba haber una hidroxilación mediante la acción de una 17-cetoreductasa. La testosterona mediante el complejo P450c17 aromatasa se transforma en estradiol debido a la aromatización del anillo A (Miller, 1988).

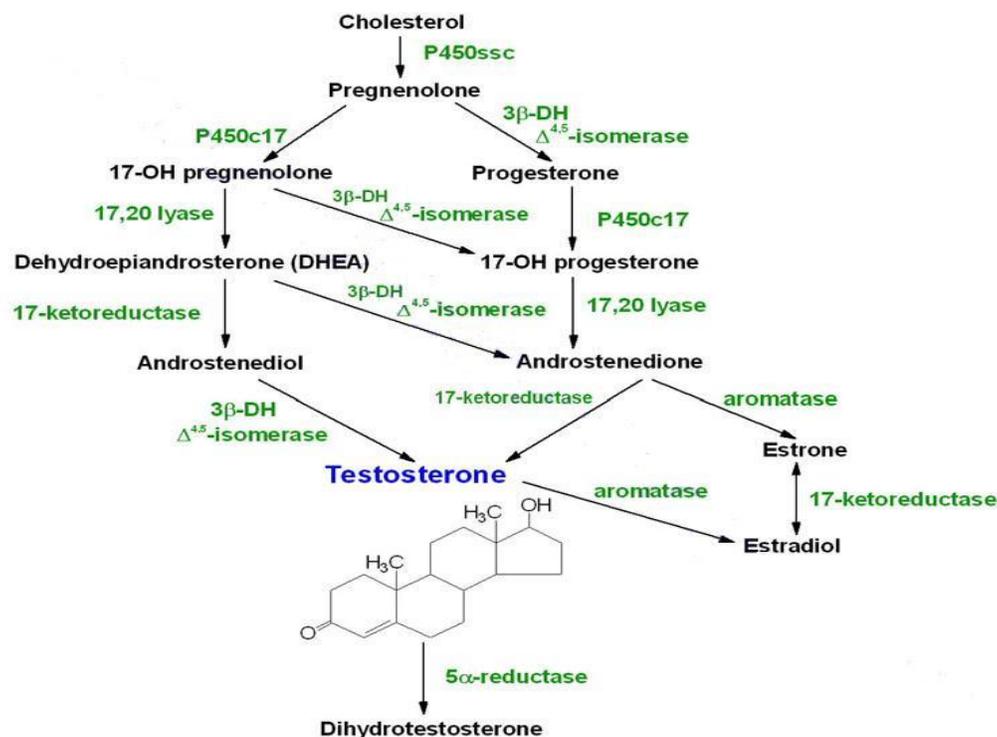


Figura 5. Vías de síntesis de las hormonas esteroides Sexuales. Esteroides producidos en el folículo ovárico a partir del colesterol.

II.IV Regulación de la producción de Progesterona.

Un evento clave en la evolución de la viviparidad y en el mantenimiento de la gestación en especies vivíparas actuales es el establecimiento de un mecanismo que mantenga un ambiente progestacional que permita la retención del huevo para que todo el desarrollo embrionario ocurra dentro del útero. En mamíferos se tiene perfectamente establecido que gonadotropinas provenientes del embrión alargan la vida media del CL y regulan la producción de progesterona durante parte de la gestación (humano) o bien durante toda la gestación (conejos). (Hafez, 1970).

Aunque hay diversas líneas de evidencia indican que el CL de los reptiles produce progesterona bajo la influencia de la pituitaria (Chan y col., 1973; Callard et al., 1972, 1976; Klicka y Mahmoud, 1972, 1973), los detalles concernientes a los efectos de FSH y LH en estos tejidos postovulatorios son limitados. Recientemente, en el laboratorio de Biología de la Reproducción FES Iztacala UNAM se ha observado que la gónada (ovario) de juveniles de *Barisa i. imbricata* puede ser estimulada con análogos de gonadotropinas hipofisarias de mamífero (Gonadotropina Coriónica Humana –GCh- y Gonadotropina de

Suero de Yegua Preñada –PMSG) (Martínez-Torres y Martínez-Juárez, 2006) y que el desarrollo folicular puede ser inducido mediante la aplicación de PMSG a hembras con fracaso reproductor de esta misma especie (Martínez-Torres et al., 2009). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si la actividad del ovario, particularmente el CL de las hembras preñadas de los reptiles puede ser estimulado con FSH o LH de mamífero o sus análogos.

II.V Biología Reproductora de *Barisia imbricata imbricata*.

Barisia i. imbricata es una lagartija vivípara de zona templada y una de las cuatro subespecies endémicas descritas por Guillette y Smith (1982). Habita en altitudes elevadas (2100-4000 m.s.n.m.), en pastizales asociados a bosques de pino de la zona transvolcánica de los estados del centro de la República Mexicana (Distrito Federal, Estado de México, Hidalgo, Puebla, Morelos, Michoacán, Jalisco, Oaxaca, y Veracruz). El apareamiento ocurre en octubre (Martínez-Torres datos no publicados) y la ovulación en noviembre; y principios de diciembre (Martínez-Torres et al., 2006a). El desarrollo embrionario es largo, dura alrededor de siete meses, inicia a finales de otoño y termina ya entrada la primavera (Martínez y col., 2006). Machos de *B. i. imbricata* exhiben una recrudescencia testicular en primavera (Guillette, Casas-Andreu 1987).

En el laboratorio de Biología de la Reproducción de la FES Iztacala de la UNAM se ha utilizado a este reptil como modelo para estudiar el control hormonal de la gestación. Inicialmente se establecieron las características histológicas e histoquímicas del CL de *Barisia i. imbricata* (Martínez y col. 2003). Las hembras están grávidas desde finales del otoño todo el invierno y gran parte de la primavera (fines de noviembre o principios de diciembre, hasta fines de mayo o principio de junio). Además, estos autores (Martínez y col. 2003) determinaron que el desarrollo del cuerpo lúteo ocurrió en el primer tercio de la gestación (diciembre y enero); y la regresión lútea ocupó los 2 tercios restantes cursando por cuatro estadios secuenciales durante el desarrollo lúteo y tres durante su regresión.

II.VI Fases del desarrollo del cuerpo lúteo (CL).

II.VI a Formación.

Etapa I. En esta etapa los folículos postovulatorios tienen una amplia cavidad central y presentan su mayor diámetro ($1719 \pm 403.9\mu\text{m}$). Las células de la granulosa se tornan en múltiples capas probablemente debido a la contracción folicular, y no se observan mitosis en estas células. En esta etapa, las células de la granulosa, las cuales son ovales o planas en

los folículos preovulatorios, se transforman en esféricas e incrementan su tamaño debido a hipertrofia. Así, luego de la ovulación éstas fueron transformadas en células de la granulosa luteal, las cuales no son teñidas con uniformidad como algunas de ellas que fueron profundamente teñidas con núcleos compactos, considerando que otras eran tenues. La teca interna es delgada y relativamente más celular que la teca externa y consiste principalmente de células redondas y fibroblastos; estas últimas se encuentran en el borde interno de la teca. La teca externa es una placa fibrosa la cual consiste de fibras de colágena, fibroblastos y vasos sanguíneos (Martínez y col., 2003) (b).

Etapa II. Las células de la granulosa luteal son multiestratificadas y la reducción de la cavidad progresa, debido a hipertrofia celular. A lo largo del borde interno de la teca interna se encuentra una placa hipertrofiada de células redondas con núcleos aplanados (tipo adipocitos). Algunas células y fibras de colágeno emergen de la teca invadiendo el área de las células luteales. Las capas tecales no difieren mucho de la primera etapa, excepto que los espacios abiertos entre las dos tecas son relativamente más numerosos y alargados, conteniendo grandes largos vasos sanguíneos (Martínez y col., 2003) (b).

Etapa III. La cavidad del CL se ha estrechado considerablemente. Se presentan abundantes células con núcleos oscuros en muchos lugares en la teca interna e infiltración masiva de células de la teca en la masa de células lúteas. Se encuentran dos tipos de células lúteas en esta etapa (a) células grandes con citoplasma acidófilo claro con núcleos que poseen uno, dos o tres nucléolos y (b) células pequeñas con núcleos condensados fuertemente teñidos. Los espacios entre las tecas están considerablemente más estrechos pero aún presentan vasos sanguíneos (Martínez y col., 2003) (b).

Etapa IV. En esta etapa, el CL muestra una estructura sólida y compacta. La transformación de células de la granulosa y tecales a luteales esta completada. Cada célula de la masa de células luteales tiene abundante citoplasma acidófilo con núcleos vacuolados, de forma redonda a oval, y de uno a tres nucléolos. Algunos pequeños capilares dentro del delgado septo de fibras de colágeno se observan en la masa de células luteales. La teca interna es una capa delgada bien definida que contiene células alargadas. La teca externa está constituida en su mayoría por fibras de colágena, algunas células hipertrofiadas y fibroblastos con núcleos fuertemente teñidos embebidos en una fina matriz (Martínez y col., 2003) (b).

II.VI b Involución.

Etapa I. Las células luteales has comenzado el proceso picnótico; sus núcleos, que inicialmente eran esféricos u ovals se tornan contraídos o rotos. El espesor de las dos tecas disminuye y el número y diámetro de los vasos sanguíneos es menor. Las células luteales periféricas muestran vacuolas lipídicas en su citoplasma (Martínez y col., 2003) (b).

Etapa II. Esta etapa es caracterizada porque todas las células luteales presentan una vacuola lipídica en su citoplasma, el proceso picnótico se ha esparcido a toda la masa de células luteas. El cambio más significativo en la masa de células luteales fue la infiltración de septos de tejido conectivo de la teca interna. Una significativa reducción del espesor de la teca interna y externa ocurren en esta etapa y el tamaño del CL se reduce (Martínez y col., 2003) (b).

Etapa III. Mientras el proceso degenerativo progresa, más infiltración de tejido conectivo se observa. El cincuenta por ciento del CL tiene pequeñas cavidades en la región central de la masa de células lúteas y células luteales vacuoladas con núcleos encogidos. La teca interna y externa forman una delgada capa compacta y el CL está muy encogido. Se encuentran en el 30% de los CL abundante infiltración de leucocitos eosinófilos y dos tipos de células luteales; (a) células con núcleos pequeños y condensados y (b) células con un gran núcleo las cuales han perdido casi todo su citoplasma. Dentro de la masa de células luteales hay un incremento de una sustancia intracelular acidófila con apariencia hialina y una reducción en el número de células. El septo de fibras colágenas no es visible en estos folículos postovulatorios (Martínez y col., 2003) (b).

II.VII Perfil de pogesterona (P₄) en *Barisia i. imbricata*.

Los niveles de P₄ se incrementan al inicio de la gestación alcanzando su nivel más alto durante enero, presentando disminución gradual en el segundo y tercer tercio coincidiendo con los cambios degenerativos del tejido luteal. (Martínez y col., 2003) (a).

La validación de P₄ fue probada (Martínez y col., 2003) por la comparación de una dilución serial de plasma obtenida de hembras preñadas de *B. imbricata* con una curva estándar. La concentración media mensual de P₄ plasmática a través de la gestación de hembras de *B. imbricata* es mostrada en la tabla 2.

Mes	Niveles de P ₄ (ng/ml)
Diciembre	0.39 ± 0.14
Enero	3.97 ± 1.04
Febrero	2.03 ± 0.69
Marzo	1.31 ± 0.32
Abril	1.19 ± 0.45
Mayo	0.74 ± 0.24

Tabla 1. Promedio en los niveles de progesterona (Martínez y col., 2002).

III. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Justificación. En los mamíferos existe una amplia información acerca de los mecanismos que regulan la actividad del ovario, esto ha permitido mejorar el potencial reproductor de las especies productivas. Sin embargo, en las especies silvestres (reptiles, peces etc.) se desconocen los mecanismos que mantienen el estado de gravidez. Debido a que, por un lado, en años recientes la aceptación de estos organismos como animales de compañía y ornato y por otro, que el número de especies de reptiles amenazadas se ha incrementado dramáticamente en los últimos 10 años (ver lista roja de la IUCN -<http://www.redlist.org/>-), es necesario estudiar los mecanismos que regulan su reproducción. También pueden ser utilizados como modelos para investigar diversos tópicos relacionados con la evolución, la inmunología, la fisiología etc. Por otro lado, mantener reptiles como mascotas es una idea relativamente reciente, los reptiles históricamente han estado rodeados de miedos, mitos y leyendas, y, aunque para algunos puedan parecer poco agradables, para muchos de nosotros son fascinantes. Además, debido al desconocimiento de su biología se presentan diversos problemas para su mantenimiento y sobre todo la terapéutica para optimizar su reproducción, por lo que desde el punto de vista médico veterinario, es importante adentrarse en el conocimiento de su biología reproductora.

Los reptiles pueden ser realmente mascotas fascinantes cuando son mantenidos con conocimiento y entendimiento de sus requerimientos. Existen muchos opositores al

mantenimiento de mascotas exóticas en general, pero en opinión de otros es responsabilidad de quien practica la medicina veterinaria proveer cuidado, educación y consejo para asegurar el bienestar de nuestros pacientes reptiles. El tratarlos en la práctica clínica es interesante y gratificante y nuestra experiencia debe expandirse en el área del conocimiento de la medicina.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo general. Determinar el efecto de la administración gonadotropina coriónica humana, en el primer tercio de la preñez, sobre el desarrollo del cuerpo lúteo y los niveles plasmáticos de progesterona en hembras gestantes de la lagartija vivípara *Barisia imbricata imbricata*.

Objetivos particulares.

- 1.- Determinar el efecto de la administración de la gonadotropina coriónica humana sobre los niveles plasmáticos de progesterona y la concentración de esta hormona en el cuerpo lúteo de hembras gestantes de *Barisia i. imbricata* luego de 9 semanas de tratamiento.
- 2.- Establecer el efecto de la administración de la Gonadotropina corionica Humana sobre el cuerpo lúteo y los folículos ováricos. Establecer las características histológicas del CL de hembras gestantes de *Barisia i. imbricata* luego de 9 semanas de administración de GCh y determinar si su involución puede ser retrasada.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.I Localización.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la Unidad de Morfofisiología, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM así como en el Laboratorio de Hormonas Proteicas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

V.II Animales.

Se emplearon 10 hembras que cursaban por el primer tercio de la gestación (Martínez-Torres et al., 2003) de *Barisia i. imbricata* en edad reproductiva, proporcionadas por el Laboratorio de Biología de la Reproducción arriba mencionado que fueron colectadas en el Municipio de Cahuacán Estado de México (19°38'N, 99°25'W) a principios del mes de

diciembre de 2009. Las hembras fueron marcadas por escisión falangiana, medidas y pesadas para su registro. Se dividieron en dos grupos de cinco animales cada uno, el primero se denominó grupo experimental (grupo 1), el segundo como grupo control (grupo 2). Las lagartijas se mantuvieron en condiciones de cautiverio en un invernadero anexo a la unidad de morfofisiología en condiciones atmosféricas naturales, con agua y alimento a base de de grillos y larvas de gusano de cera a libre acceso.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.

VI.I Obtención de sangre. Un par de horas antes del al tratamiento experimental, a todas las hembras les fue tomada una muestra de 200µl de sangre por punción cardiaca, misma que se centrifugó a 10 000RPM durante 30 seg. Se decanto el suero, el cual fue conservado en un ultracongelador a -40°C hasta el momento del ensayo para la determinación de progesterona.

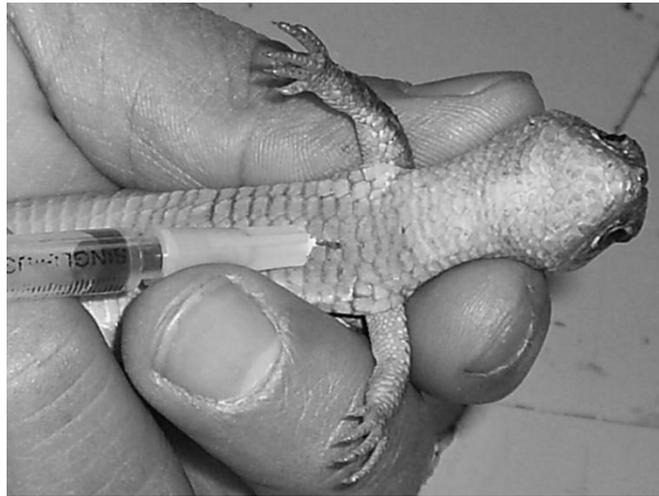


Figura 6. Punción cardiaca.

VI.II Procedimiento quirúrgico. Las lagartijas, de ambos grupos, fueron sometidas a celiotomía, previo baño con hipoclorito de sodio al 10% y embrocación de iodopovidona al 11% en la región ventral desde la cloaca hasta caja torácica. La inducción anestésica fue en cámara de gas con éter. Incisión ventral paramedial derecha en cavidad abdominal (fig. 7).

Se ubicó el ovario, se registró la ausencia o presencia de folículos no vitelogénicos y vitelogenicos y se practicó lutectomía parcial extirpando de 2 CL a cada una de las hembras .Un CL se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% en solución amortiguada de fosfatos a pH 7.4 preparado en fresco durante 24 hrs. El segundo CL se depositó en un tubo eppendorf y se congeló inmediatamente en una mezcla de acetona-CO2 sólido y se almaceno a -40°C hasta el momento de la sonicación. Las hembras se suturaron con puntos separados con nylon monofilamento de seis ceros. Como antibioterapia postquirúrgica, a cada lagartija de ambos grupos se administró una combinación de penicilina G 5000 UI + Sulfato de estreptomicina 48 mcg. durante tres días, Antibioserva 4,000,000 U.I. (Intervet ®).

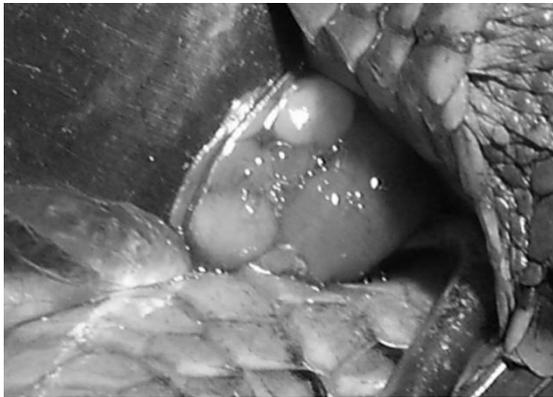


Figura 7 Incisión paramedial derecha
cirugía previa al tratamiento

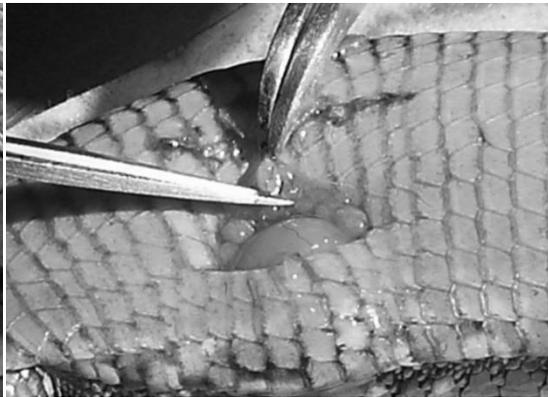


Figura 8 Incisión paramedial izquierda.
cirugía al final del tratamiento

VI.III Administración farmacológica.

Una vez realizada la lutectomía, se administró GCh 5000 UI + Solvente Na Cl al 0.9% dilución en 5 ml de cloruro de sodio al 0.9%. El protocolo fue; administración intraperitoneal de 50 UI de GCh equivalente a 0.05 ml de solución dos veces por semana durante 9 semanas al grupo experimental. Al grupo control se le administró vía IP a 0.05 ml solución de cloruro de sodio al 0.9%, dos veces por semana durante 9 semanas. Al término de la fase experimental los animales fueron sometidos nuevamente a celiotomía paramedial izquierda, para la escisión de dos CL, siguiendo los mismos métodos de conservación, y obtención de 200µl de sangre previa a la cirugía siguiendo el protocolo arriba mencionado.

VI.IV Procesamiento y tinción

Todos los CL fijados en paraformaldehído fueron procesados para la técnica histológica de rutina; deshidratados con alcoholes graduales hasta etanol absoluto, aclarados con Xileno e incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 7 μm de grosor y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (ver apéndice I). Los cortes histológicos obtenidos fueron evaluados al microscopio de luz y se determinó su estadio de acuerdo a Martínez-Torres et al., (2003).



Figura 9 Gonadotropina Coriónica Humana.

VI.V Radioinmunoanálisis (RIA).

Los CL en congelación se descongelaron a temperatura ambiente y fueron homogenizados por sonicación en 1 ml de Amortiguador de fosfatos frío a pH 7.4. El homogeneizado se evaluó mediante RIA (ver apéndiceII) para determinar las concentraciones de progesterona. La determinación se llevo a cabo en el laboratorio de hormonas proteicas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El análisis se llevo a cabo con un kit Siemens Coat-A-Count Arca TPG1 1288.

VI.VI Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la medición de progesterona tanto de los CL como del plasma fueron analizados mediante una prueba de T de Student pareada con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y se determinó si el tratamiento hormonal tuvo efecto sobre la producción de progesterona (P_4).

VII. RESULTADOS.

Los ovarios de esta lagartija son estructuras alargadas en forma de saco. Ninguna de las hembras de los grupos experimental y control presentó folículos vitelogénicos antes del tratamiento con hGC; en cambio todas poseían CL. Estos son fácilmente reconocibles por su tamaño y su colocación. Son estructuras ovaladas (de alrededor 2 a 3 mm en su longitud mayor, por 1.5 a 2.5 mm en su longitud menor), con una pequeña depresión central y de color amarillo pálido (Fig. 10a).

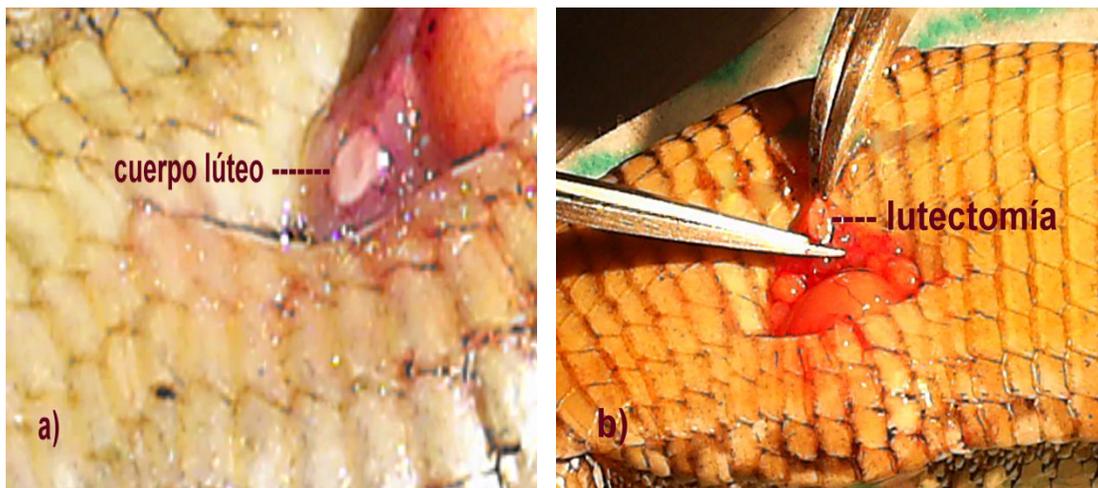
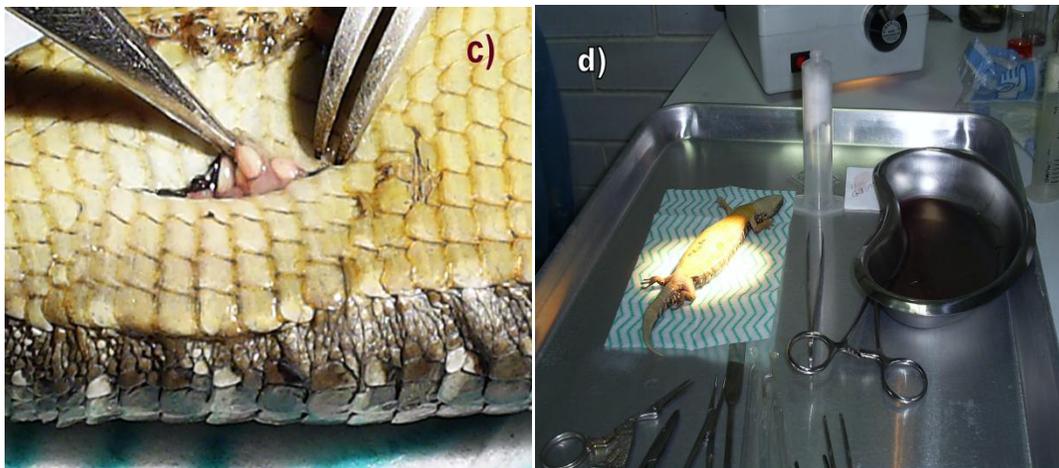


Figura 10 Lutectomía previa a la administración de Gonadotropina Coriónica Humana. Grupo control: a) identificación CL, b) lutectomía.



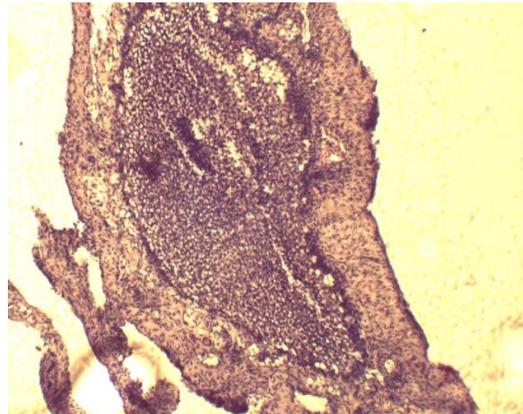
c) Lutectomía posterior al protocolo de administración de Gonadotropina Coriónica Humana. d) final de laparotomía

VII.I Histología de los cuerpos lúteos previo al tratamiento.

Los CL obtenidos previo a la administración de la GCh se encontraban en el estadio III (3 organismos Fig. 11a) y IV (2 organismos fig. 11b) de desarrollo luteal, en cambio los del grupo control se encontraban entre los estadios II (2 organismos fig. 11c) y III (3 organismos fig. 11 d) de desarrollo folicular.



Figura 11a corte 40X estadio III.



11b corte 10X estadio IV.

Cuerpos lúteos en estadio II de desarrollo luteal. Presentan una amplia cavidad central rodeada de células luteales de origen folicular. Éstas se caracterizan por su aspecto elíptico, son de citoplasma acidófilo, con núcleo basófilo de cara abierta con uno a tres nucléolos. La teca está bien diferenciada en teca interna y teca externa (fig. 11c).

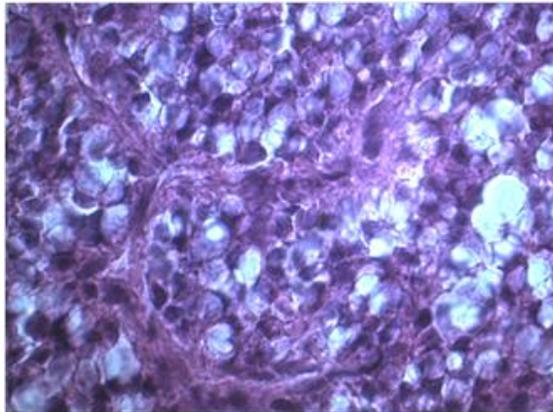


figura 11c corte 40X estadio II.

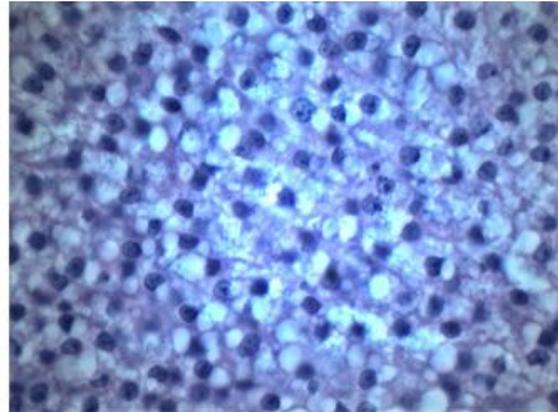


figura 11d corte 40X estadio III.

Cuerpos lúteos en estadio III de desarrollo luteal. Este estadio se caracteriza por infiltración de las células de la teca interna hacia la masa de células lúteas y reducción de la cavidad debido a la hipertrofia de la masa de células lúteas (Fig. 11d).

Cuerpos lúteos en estadio IV de desarrollo luteal. Son estructuras compactas, la cavidad ha desaparecido. La masa de células lúteas presenta células de citoplasma acidófilo claro y núcleo de cara abierta con 1 a 3 nucléolos. Dispersas entre esta población, se pueden observar algunas células de cromatina condensada (Fig. 11b).

VII.II Histología de los cuerpos lúteos después del tratamiento.

Todos los cuerpos lúteos de las hembras experimentales y de las hembras control se encuentran en etapa de regresión; excepto en una hembra: En ésta el tejido luteal se encuentra en etapa IV de desarrollo luteal.

VII.III Cuerpos lúteos del grupo experimental.

Particularmente los CL de las hembras del grupo experimental se encuentran en el estadio I (una hembra), II (2 hembras), III (2 hembras). Los cuerpos lúteos en las hembras del grupo control se encuentran en el estadio I (una hembra), II (2 hembras) III (una hembra) de regresión y sólo una hembra se observó en estadio IV de desarrollo luteal.

VII.IV Cuerpos lúteos del grupo control.

Las características de estos estadios son las siguientes:

Cuerpos lúteos en etapa I de degeneración. Se caracterizan por la contracción del núcleo de la masa de células lúteas y la presencia de células en anillo en el límite de la masa de células lúteas y la teca interna. Las tecas son más delgadas en relación a las que presentan los cuerpos lúteos de fase IV de desarrollo (Fig. 12a). Las llamadas “células en anillo” presentan el núcleo basófilo aplanado y desplazado hacia la periferia de la célula, el citoplasma es levemente acidófilo (Fig. 12b).

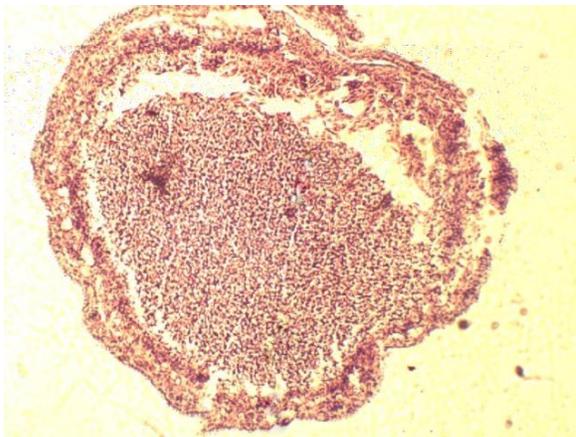


figura 12a 10x.

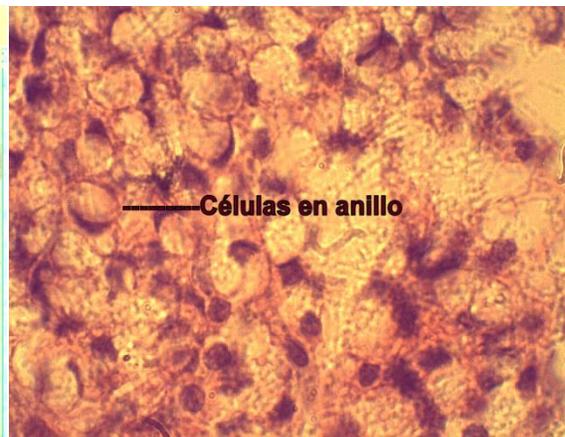


figura 12b 40x.

Cuerpos lúteos en etapa II de degeneración. La característica distintiva de esta etapa es todas las células lúteas adoptan el aspecto de “células en anillo” así como el adelgazamiento de las tecas. En la masa de células lúteas se observan algunas trabéculas finas de tejido conectivo. La disminución del volumen de todo el CL es notoria.

Cuerpos lúteos en etapa III de degeneración. La infiltración masiva de tejido conectivo así como la presencia de pequeñas cavidades de diámetro irregular es la lo que caracteriza a esta etapa. Además en esta etapa no es posible diferenciar la teca interna de la externa.

VII.V Progesterona.

Se encontró que la progesterona obtenida de los cuerpos lúteos es mucho mayor que la concentración medida en el plasma. Mientras la concentración promedio esta por arriba de los 10 ng/ml, la concentración media en plasma fue menor a 1 ng/ml.

VII.VI Concentración de progesterona en el tejido luteal

La concentración promedio de progesterona fue de 18.5 ± 3.3 ng/cuerpo lúteo en los organismos experimentales previos al tratamiento con GCh. Después del tratamiento, la progesterona disminuyó significativamente, ($p < 0.05$, $t = 1.173$) encontrándose concentraciones de 12.14 ± 4.2 /cuerpo lúteo (Tabla 3).

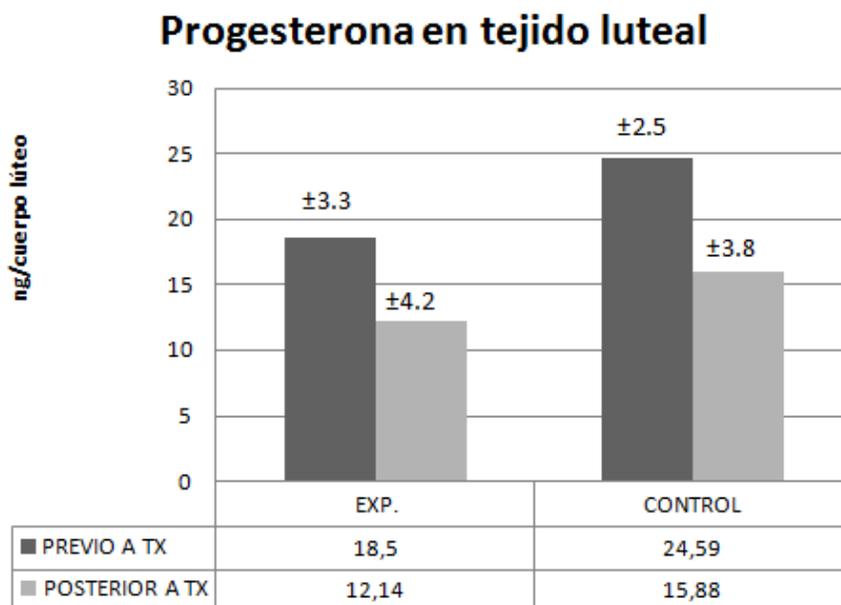


Gráfico 1. Niveles de P₄ en Tejido Luteal.

En cuanto al promedio de progesterona en los cuerpos lúteos de las hembras control es de 24.59 ± 2.5 ng/cuerpo lúteo, previo a la administración. Al igual que en los organismos experimentales, la concentración media de progesterona disminuyó significativamente ($p < 0.05$, $t = 1.51$) después de 9 semanas de aplicar la solución fisiológica siendo de 15.88 ± 3.8 ng/cuerpo lúteo.

VII.VII Concentración de progesterona en el plasma.

La concentración promedio de progesterona en el plasma de las hembras experimentales antes del tratamiento fue de 0.53 ± 0.2 ng/ml, después del tratamiento las concentraciones disminuyeron (0.4 ± 0.18 ng/ml), aunque no significativamente ($p = 0.62$, $t = 0.516$). En las hembras control la concentración media de progesterona previa a la aplicación del suero fisiológico es de 0.42 ± 0.09 y al finalizar el tratamiento se observó un aumento (0.71 ± 0.2 ng/ml), aunque tampoco fue estadísticamente significativo ($P = 0.29$, $t = 1.13$). (Tabla 4).

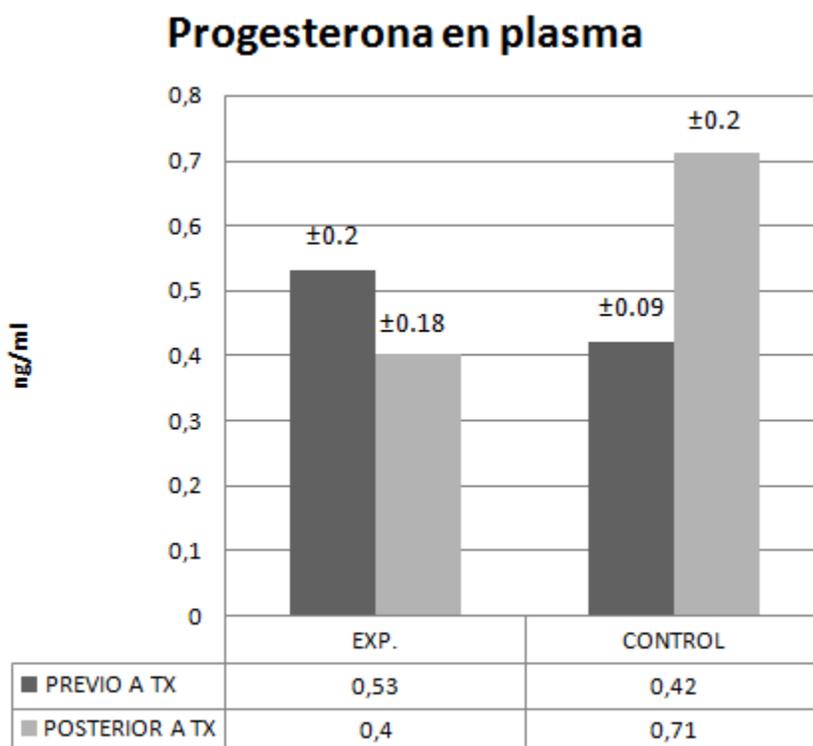


Gráfico 2. Niveles plasmáticos de P₄.

VIII DISCUSIÓN.

La necesidad de P_4 en el mantenimiento de la gestación parece ser bastante clara, pues la presencia de esta hormona ha sido detectada a lo largo de la gestación en las hembras grávidas de cualquier especie de vertebrado (Martínez-Torres, et al., 2003a,b). Además, hasta el momento no se conoce ninguna especie vivípara en que el periodo de gravidez pueda ser mantenido en ausencia de P_4 (Martínez-Torres et al, 2003b; 2010).

Existen diversas evidencias que sugieren que el CL es una fuente importante de P_4 durante el periodo de gravidez en diversos saurios (para revisión véase Xavier, 1988), entre ellos *Barisia. i. imbricata* (Martínez-Torres et al., 2003a). Por esta razón diversos autores le han asignado un papel central en el mantenimiento de la gestación en reptiles (ovíparos y vivíparos) y en la evolución de la viviparidad reptileana (Jones y Guillette, 1982; Yaron, 1985; Guillette, 1985, Callard et al., 1992). En los mamíferos es muy conocido que la actividad del ovario se modifica durante la gestación. Es decir, mientras que la vida del cuerpo lúteo así como el patrón de secreción de progesterona se alargan, el crecimiento y maduración de nuevos folículos ováricos se detiene durante todo el periodo de gravidez. También es bien conocido que durante una parte del embarazo (humano, macaco), o durante la gestación completa (rata, ratón, conejo) las gonadotropinas, estimulan la actividad del CL, retrasan la luteólisis y alargan la vida media del cuerpo lúteo. También se sabe que la administración exógena de luteotropinas hipofisarias (LH y LTH) alargan la vida media del cuerpo lúteo (Ganong, W.F., Fis. Med., 2004). En este trabajo se encontró que la administración intracelómica de GCh no alargó la vida media del cuerpo lúteo. El proceso regresivo se presentó en el cuerpo lúteo de todos los organismos que fueron administrados con esta gonadotropina.

Tampoco se observó un incremento en la producción de progesterona; al contrario, se encontró que después del tratamiento la concentración de progesterona lútea disminuyó significativamente a niveles similares a los encontrados en el grupo control.

Estos datos sugieren que el cuerpo lúteo de *Barisia i. imbricata* no presenta receptores a esta hormona (GCh). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la gónada de los reptiles escamosos es sensible a la estimulación con gonadotropinas de mamífero (Licht and Pearson 1969; Licht, 1970; Callard et al.1972). La aplicación de gonadotropinas de mamífero a lagartijas adultas (*Anolis carolinensis*, *Uta tansburiana* y *Sceloporus occidentalis*, Licht 1970) mostró que tanto la hormona folículo estimulante (FSH) como la hormona luteinizante (LH) son capaces de promover desarrollo ovárico y la esteroidogénesis. Además Licht y Papkoff (1973) demostraron que la LH de ovino puede promover la espermatogénesis en adultos hipofisectomizados de *A.carolinensis* y se ha observado que esta misma hormona puede estimular el desarrollo de los folículos ováricos en adultos de esta misma especie (Licht, 1970), aunque su efecto es menor comparado con el producido por la FSH.

Recientemente se ha encontrado que la espermatogénesis puede ser promovida en juveniles de *Barisia i. imbricata* con GCh o con gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG, por sus siglas en ingles) (Martínez-Torres y Martínez-López, 2006) y el desarrollo folicular puede ser estimulado con PMSG en hembras adultas de esta especie con fracaso reproductor (Martínez-Torres et al., 2009). Un hecho sorprendente que se encontró en este trabajo es que todas las hembras gestantes presentaron folículos vitelogénicos después del tratamiento con GCh. Esta situación demuestra que el folículo ovárico de esta lagartija si presenta receptores a la GCh y sugiere que después de la ovulación estos se pierden. Sin embargo, se desconoce en qué etapa del desarrollo luteal esto sucede. Es posible que suceda inmediatamente después de la ovulación o en los estadios iniciales del desarrollo luteal, ya que al momento que se les administró la GCh, los cuerpos lúteos se encontraban en etapa III y IV de desarrollo luteal. Es necesario realizar más experimentos para determinar en qué momento se pierden los receptores a esta hormona ya sea mediante la administración de la GCh luego de la ovulación o bien mediante un método inmunohistoquímico.

Por otro lado, es ampliamente conocido que el desarrollo y maduración de nuevos folículos ováricos se suspende durante la gestación de los reptiles y que los folículos cuyos

ovocitos no maduran o no son ovulados se transforman en atrésicos (Byscov, 1972). Los folículos vitelogénicos encontrados luego del tratamiento con GCh representan estructuras que se formaron después del tratamiento con esta hormona, ya que al momento de obtener los cuerpos lúteos previo a la administración de la gonadotropina se determinó la ausencia de este tipo de folículos en cada una de las hembras. Una de las funciones de la progesterona en los vertebrados no mamíferos es la inhibición de la síntesis de vitelogenina (Callard et al., 1991). Durante la gestación de los escamosos vivíparos la progesterona es la hormona dominante (Yaron, 1985, Xavier, 1988) y *Barisia i. imbricata* no es la excepción (Martínez-Torres, 2003a). Por lo que durante la gravidez, la producción de progesterona se incrementa y el desarrollo de nuevos folículos se inhibe durante esta etapa. Callard et al., (1972, 1991) reportaron que en diversas especies de escamosos vivíparos el desarrollo folicular no puede ser inducido con gonadotropinas durante la gestación. Sin embargo nosotros encontramos que el crecimiento folicular y la vitelogenesis pudo ser inducido en hembras gestantes de *B. i. imbricata*. Estas observaciones sugieren que el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la síntesis de vitelo, durante la gestación, puede ser abrogado.

Estos resultados abren la posibilidad de iniciar proyectos que permitan la manipulación de la reproducción en los saurios.

IX CONCLUSIONES.

1.- La administración intracelómica de la Gonadotropina Coriónica Humana a hembras gestantes de *Barisia i. imbricata*, no pospone la luteolisis, ni estimula el incremento de la síntesis de progesterona en los cuerpos lúteos.

2.-Las lagartijas de ambos grupos presentaron niveles serológicos de progesterona similares al concluir el protocolo de administración farmacológica.

3.- La Gonadotropina Coriónica Humana induce la vitelogénesis en hembras preñadas de *Barisia i. imbricata*.

X. APÉNDICE

TÉCNICA HISTOLÓGICA DE RUTINA.

El tejido fijado en formol fue lavado con solución de agua corriente durante 24 hrs. Siguiendo con la deshidratación del tejido en un gradiente de alcohol, desde 60% hasta alcohol absoluto por una hora cada uno en agitación, después en alcohol absoluto por 12 hrs. Prosiguiendo a la inclusión en parafina, primero el tejido se pasó por parafina I por una hora, seguido con parafina II por una hora y finalmente los CL se incluyó en parafina para inclusiones histológicas. Los tejidos se cortaron a 5 μm en un micrótomo rotatorio y los cortes se adhirieron en un portaobjetos con solución Ruyter. Los portaobjetos se colocaron en el horno para desparafinar.

TÉCNICA DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA (LUNA 1968).

Los cortes ya montados se desparafinaron en xileno (2 baños por 3 min c/u), después los tejidos se rehidrataron en gradientes de alcohol, iniciando en absoluto hasta etanol al 70% y posteriormente en agua destilada. Se colocaron en hematoxilina de Harris por 7 minutos y se lavaron en un baño rápido de agua corriente. Se dieron dos baños rápidos en agua amoniacal, se diferenciaron en alcohol ácido y se colocaron en eosina alcohólica durante un minuto. Se deshidrataron en alcoholes graduales, desde alcohol al 90% hasta alcohol absoluto y se montaron con resina sintética.

RIA (Radio Inmuno Análisis).

Principio del análisis. El ensayo Progesterona Coat-A-Count es un radio inmuno análisis de fase sólida, donde la progesterona marcada con I^{125} compite por un tiempo fijo con progesterona de la muestra del paciente por sitios de unión al anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar con la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo de la progesterona marcada con I^{125} . La lectura del tubo en un contador gamma, proporciona entonces, un número que se convierte por medio de una curva de calibración, en una medida de la progesterona presente en la muestra del paciente.

Se etiquetan dos tubos planos de polipropileno T (cuentas totales) y dos tubos NBS (uniones específicas). Además se etiquetan 14 tubos con anticuerpo desde la A hasta la G para obtener la curva patrón. Al tubo A se le denomina de máxima unión.

Calibrador	ng/ml.	nmol/l.
A(MU)	0	0
B	0.1	0.3
C	0.5	1.6
D	2	6.4
E	10	31.8
F	20	63.6
G	40	127.2

En cada tubo se pipetea 100ml de progesterona (P_4) y 10 ml de progesterona marcada (^{125}I P_4) y se agitan en un vortex. Se incuban los tubos durante 3 horas a temperatura de 15-28°C. Posteriormente se decantan cuidadosamente y los tubos son colocados en un contador gamma. Las cuentas obtenidas fueron procesadas con el programa WHO (Organización Mundial de la Salud) para transformarlas a nanogramos/ml.

BUFFER DE FOSFATOS

Solución A (NaH_2PO_4 0,2 M): disolver 27.6 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ en agua destilada, completando un litro.

Solución B (Na_2HPO_4 0,2 M): 53.65 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$ se disuelven en agua destilada, llevando el volumen final a 1 litro.

Solución A (ml)	Solución B (ml)	Agua destilada (ml)	pH
225	275	500	6.9
195	305	500	7
165	335	500	7.1
140	360	500	7.2
115	385	500	7.3
95	405	500	7.4
80	420	500	7.5
65	435	500	7.6

CENTRIFUGACIÓN.

La centrifugación es una técnica de transporte basada en el movimiento de las partículas, suspendidas en un medio líquido específico, impulsadas por una fuerza denominada centrífuga, que tiende a desplazarlas hacia fuera del centro de rotación. Tanto la viscosidad de la disolución-muestra (esto es de gran interés para las aplicaciones analíticas) como las propiedades físicas de las partículas afectarán a la sedimentación individual de las mismas.

XI. REFERENCIAS.

- Arslan, M., Zaidi, P., Lobo, J., Zaidi, A. A. and Quzi, M. H., (1978). Steroid levels in preovulatory and gravid lizards (*Uromastix hardwicki*). Gen. Comp. Endocrinol. 34.
- Bellairs, A. y Attridge, J. (1987). Los reptiles. Ed. Blume, Madrid España.
- Blackburn, D.G. (1998). Structure, function and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. J. Exp. Zool. 282.
- Blackburn, D.G., L. Vitt, and C. A. Beuchat. (1984). Eutherian-like reproductive specializations in a viviparous reptile. Proc. Natl. Acad. Sci. 81.
- Blackburn, D.G. (2000). Reptilian viviparity. Past research, future directions, and appropriate models. Com. Bioch. Physiol. Part A 127.
- Bourne, A.R. (1972). Reproductive endocrinology of the viviparous lizard, *Tiliqua rugosa*. PhD Dissertation, University of Adelaide.
- Braña, F., A. Bea y M. J. Arrayago (1991). Egg retention in the lizard lacertids; relationship with reproductive ecology and the evolution of viviparity. Herpetol. 47.
- Browning, H. (1973). The evolutionary history of the corpus luteum. Biol. Reprod. 8.
- Byscov, A. G. (1978). Follicular atresia. In: The vertebrate ovary: Comparative biology and evolution. R. E. Jones. ed. Plenum Press, New York.
- Callard, I. P., Bayne, C. G. and McConnell., W. F., (1972) Hormones and reproduction in the female lizard, *Sceloporus cyanogenys*. Gen. Comp. Endocrinol. 18.
- Callard, I. P., L.A. Fileti, I.E., Pérez., L.A., Sorbera, G. Giannoukos, L.L. Klosterman, P. Tsang y J.A. McCracken (1992). Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. Amer. Zool. 32.
- Callard, I. P. y S. Kleis (1985). Regulation of vitellogenesis in reptiles: correlations with oviparity and viviparity. pp. 359-361 in B. Lofts and W. N. Holmes, ed. Current Trends in Comparative Endocrinology. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Camarillo, J. L. (1981). Distribución altitudinal de la herpetofauna en el transecto Huitzilac, Morelos, La Ladrillera, Edo de México, Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM.
- Chan, S. W. and Callard, I. P., (1974). Reptilian ovarian steroidogenesis and the influence of mammalian gonadotropins (follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone) *in vitro*. J. Endocrinol. 62.

- Chan, S. W. C., Ziegel, S., Callard, I. P. (1973). Plasma progesterone in snakes. *Comp. Biochem. Physiol.* 44A.
- Cuellar, O. (1966). Oviductal anatomy and sperm storage structures in lizards. *J. Morphol.* 119.
- Ganong, W. F. (2004). *Fisiología médica*. 19 ed. El manual moderno. México.
- Goin, C. J., Goin, O. B. and Zug, G. R. (1978). *Introduction to Herpetology*. 3 ed. Freeman & Co. San Francisco, USA.
- Gordon, D. N., Net, T. N. (1988). The corpus luteum and its control. In: Knobil E., Neil J. D. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raben Press, Ltd., New York.
- Graham, J. D. and Clarke, C.L., (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Edocrine Rev.* 18.
- Guillette, L. J., Jr., and H.M. Smith (1982). A review of the Mexican lizard *Barisia imbricata*, with the description of a new subspecies. *Trans. Kansas Acad. Sci.* 85.
- Guillette, L. J., Jr., and G. Casas-Andreu (1987). The reproductive biology of the high elevation Mexican lizard *Barisia imbricata*. *Herpetol.* 43.
- Guraya, S.S. (1978). Maturation of the follicular wall of nonmammalian vertebrates. En: Jones, (ed.) *The vertebrate ovary*. Plenum, New York.
- Guraya, S. S. y S. K. Varma. (1976). Morphology of ovarian changes during the reproductive cycle of the house lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. *Acta Morph. Nerrl.-Scand.* 14.
- Hafez, E. S. E. (1970). *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Lea and Fabiger. Philadelphia. USA.
- Hildebrand, Milton. (1985). *Anatomía y embriología de los vertebrados*. Ed. Limusa México.
- Jones, R. E. and Guillette, L. J. Jr., (1982). Hormonal control of oviposition and parturition in lizards. *Herpetologica* 38.
- Klicka, J. and Mahmoud, I. Y. (1972). Conversion of pregnenolone (4^{14}C) to progesterone (4^{14}C) by turtle corpus luteum. *Gen Comp. Endocrinol.* 19.
- Klicka, J. and Mahmoud, I. Y. (1973). Conversion of cholesterol to progesterone by turtle corpus luteum. *Steroids* 21.

- Litch, P. (1970). Effects of mammalian gonadotropins (ovine FSH and LH) in female lizards. *Gen. Comp. Endocrinol.* 14.
- Licht, P., and Papkoff, H. (1973). Evidence for an intrinsic gonadotropic activity of ovine LH in the lizard. *Gen. Comp. Endocrinol.* 20.
- Licht, P., and Pearson, A. K. (1969). Effects of nonmammalian gonadotropins (FSH and LH) on the testis of the lizard *Anolis carolinensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13.
- Licht, P., and Tsui, H. W., (1975). Evidence for the intrinsic activity of ovine FSH on spermatogenesis, ovarian growth, steroidogenesis and ovulation in lizards. *Biol. Reprod.* 12.
- Martínez-Torres, M. (1997). Placentación y participación del cuerpo lúteo en el mantenimiento de la gestación de *Barisia imbricata imbricata* – Una perspectiva evolutiva- (Reptilia-Anguidae). Tesis de Maestría, E.N.E.P. Iztacala, UNAM.
- Martínez-Torres M. y Martínez-López, J. (2006). Efecto de la PMSG y de la hCG sobre la gónada de críos macho de *Barisia imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE). En la IX Reunión Nacional de Herpetología en Monterrey Nuevo León México.
- Martínez-Torres, M., M. E. Hernández-Caballero, Luis-Díaz J. and G. Ortiz-López. (2003)(a). Luteal development and progesterone level during pregnancy of the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae) *Gen. Comp. Endocrinology* 132.
- Martínez-Torres M., Nájera García N., Yáñez-Espinosa de los Monteros A. y Cárdenas León M. (2003)(b). “Early degeneration and alterations of the corpus luteum during luteolysis in a pseudopregnancy model of the viviparous lizard *Barisia imbricata imbricata*”. en la XXVIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción y Reunión de la Sociedad Mexicana de Biología de la Reproducción Humana A. C. celebrada en Veracruz, México.
- Martínez-Torres M., Salcedo-Álvarez M.; Guzmán-Rodríguez R.; Ortiz-López G.; Hernández-Esparza T. (2009). Fracaso reproductor en hembras adultas de *Barisia imbricata imbricata*. *Mesamericana* 13.
- Miller, W. D. (1988). Molecular biology of the steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9.
- Romer, A. Sh. (1970). Anatomía comparada (vertebrados). 4a ed. Nueva editorial Interamericana.
- Saidapur, S. K. (1982). Structure and function of postovulatory follicles (corpora lutea) in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *Intern. Rev. Cytol.* 75.

- Shine, R. and Guillette, L. J. Jr. (1988). The evolution of viviparity in Reptiles: A Physiological Model and its ecological consequences. *J. Theor. Biol.* 132.
- Shine, R. (1985). Physiological and ecological questions on the evolution of reptilian viviparity. En: *Respiration and metabolism of embryonic vertebrates*. Seymour, R, R. S. (Ed). Dr. Junk Publishers, Dordrecht/Boston/London..
- Shine, R. (1995). Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia* 96.
- Van, Tienhoven, A. (1983). *Reproductive physiology of vertebrates*. 2a. ed. Cornell University Press, London.
- Villagrán, M. (1989). Desarrollo embrionario, placentación y su relación con el cuerpo lúteo y la atresia folicular en *Sceloporus miconatus* y *Sceloporus grammicus* (Sauria: Iguanidae). Tesis doctoral. UNAM. México.
- Wourms, J.P. (1981). Viviparity: Maternal-fetal relationship in fishes. *Amer. Zool.* 21.
- Xavier, F. (1987). Funtional morfology and regulation to the corpus luteum. 241-181; en: *Hormones and Reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. D. O. Norris and R. E. Jones. Eds. Plenum press.
- Yaron, Z. (1985). Reptilian placentation and gestation: estructura, function and endocrine control, 528-603; en: *Biology of the Reptilia Vol. 15*. C. Gans and F. Billet (eds.) Jonh Wiley & Sons, New York.