

**Localización inmunohistoquímica de la enzima  $3\beta$  HSD y los receptores de progesterona (PR) en el ovario de *Mabuya* sp (Squamata: Scincidae)**

**Jennifer Yesenia Quintero Silva**

**Trabajo de grado como requisito para optar por el título de Bióloga**

**Directora:**

**Martha Patricia Ramírez Pinilla**

**Doctora en Ciencias Biológicas**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Bucaramanga**

**2017**

### **Agradecimientos**

A Dios, a mis padres y hermanas por apoyarme en todos los proyectos, pero principalmente en este de graduarme como bióloga, con su ayuda incondicional y su amor.

A Melissa Duarte Méndez por su gran apoyo en la realización de este proyecto. A Ezequiel González y Elson Meneses por la colecta de los individuos. A mis amigos y compañeros de laboratorio por todos los aportes en el proceso. A los profesores que participaron en mi formación académica, principalmente a Martha Patricia Ramírez por permitirme aprender en su laboratorio.

**Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	11
1. Marco teórico .....	14
1.1 Viviparidad en reptiles escamados.....	14
1.2 Mabuya .....	16
1.3 Placenta.....	17
1.4 Ovario .....	17
2. Materiales y métodos .....	20
2.1 Recolecta de ejemplares y área de muestreo.....	20
2.2 Fase de laboratorio.....	21
2.3 Western blot.....	22
3. Resultados .....	24
3.1 Hembra gestante en segmentación.....	24
3.2 Gestación temprana (néurula y farínula).....	26
3.3 Gestación media (desarrollo de miembros, estados 34 - 36) .....	26
3.4 Gestación tardía (estados 39 y 40) .....	29
3.5 Hembras pos-parto y vitelogénicas .....	29
3.6 Western blot .....	34
4. Discusión.....	36
5. Conclusiones.....	40

Bibliografía ..... 42

**Lista de figuras**

	<b>Pág.</b>
<i>Figura.1.</i> A. Ovario de una hembra de <i>Mabuya sp</i> con embriones en segmentación. ....	25
<i>Figura 2.</i> A. Ovario de <i>Mabuya sp</i> en gestación temprana. ....	27
<i>Figura 3.</i> A. Ovario de <i>Mabuya sp</i> en gestación media. ....	28
<i>Figura 4.</i> A. Ovario de <i>Mabuya sp</i> en gestación tardía. ....	30
<i>Figura 5.</i> A. Ovario de <i>Mabuya sp</i> de hembra vitelogénica post-parto. ....	31
<i>Figura 6.</i> A. Hígado de <i>Hemidactylus frenatus</i> , células hepáticas positivas para para PR. Tinción AB. (Control positivo). ....	32
<i>Figura 7.</i> Resultados del análisis de Western blot de ovario y placenta de <i>Mabuya sp</i> para la enzima 3 $\beta$ HSD. ....	34
<i>Figura 8.</i> Picos de intensidad de las bandas del <i>Western blot</i> con anticuerpo monoclonal para 3 $\beta$ HSD y anticuerpo secundario FITC en los extractos de placenta y ovario de <i>Mabuya sp</i> . ....	35
<i>Figura 9.</i> Histograma de intensidad de las bandas del <i>Western blot</i> para 3 $\beta$ HSD en los extractos de placenta y ovario de <i>Mabuya sp</i> . ....	36

**Lista de tablas****Pág.**

Tabla 1. <i>Resultados para la enzima 3<math>\beta</math> HSD en los diferentes tipos celulares del ovario de Mabuya sp. Método Avidina-Biotina y FITC. La intensidad de la reacción se simbolizó en un gradiente de negativo (-) a positivo: débilmente expresado (+) y fuertemente expresado (++)</i> . 33	33
Tabla 2. <i>Resultados para los receptores de Pg en los diferentes tipos celulares del ovario de Mabuya sp. Método Avidina-Biotina y FITC. Positivo: débilmente expresado (+), fuertemente expresado (++) y negativo (-)</i> . 33	33

## Resumen

**Título:** Localización inmunohistoquímica de la enzima 3 $\beta$  HSD y los receptores de progesterona (PR) en el ovario de *Mabuya* sp (Squamata: Scincidae) \*

**Autor:** Jennifer Yesenia Quintero Silva \*\*

**Palabras claves:** Inmunohistoquímica, anticuerpos, viviparidad, ovarios, progesterona.

### Descripción

La progesterona (Pg) juega un papel fundamental en la evolución de la viviparidad, se encarga del mantenimiento gestacional hasta el final del desarrollo contribuyendo en la inhibición de la movilidad uterina. El cuerpo lúteo produce Pg durante la mayor parte de la gestación; sin embargo, en una especie matotrófica del género *Mabuya* la luteólisis es temprana, por esto se sugiere la existencia de una fuente alterna de Pg. Para probar la hipótesis de una fuente ovárica de Pg alterna al cuerpo lúteo, este trabajo localiza la enzima que cataliza la síntesis de Pg (3 $\beta$ -HSD) y los receptores de progesterona (PR) en el ovario en diferentes estados de gestación de *Mabuya* sp. Se realizaron cortes en el micrótomo de los tejidos, para localizar la Pg y los PR, los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario específico para PR y 3 $\beta$  HSD, para visualizar la unión de los anticuerpos al antígeno se utilizó dos métodos, un anticuerpo secundario biotinilado avidina-biotina (AB) y otro anticuerpo secundario de Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se cuantificó la 3 $\beta$  HSD con *Western blot*; se usó un anticuerpo primario específico para la enzima y se reveló con fluorescencia. Se encontró que en gestación temprana el ovario produce Pg en las células luteales activas, en la granulosa (epitelio folicular) y la teca en folículos previtelogénicos; en gestación media y tardía no se produce Pg en los cuerpos lúteos (CL) y se produce Pg en menor proporción en los folículos previtelogénicos. Los PR se localizaron en las células donde se expresó la enzima. Los folículos atrésicos no parecen ser una fuente ovárica alterna de Pg. En conclusión el ovario produce Pg en el cuerpo lúteo y folículos previtelogénicos, la producción máxima se da al inicio de la gestación y disminuye en gestación media al momento de la luteólisis.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de ciencias. Escuela de Biología. Directora: Martha P. Ramírez Pinilla, Doctora En Ciencias Biológicas

### Abstract

**Título:** Immunohistochemical localization of  $3\beta$  HSD enzyme and progesterone receptors (PR) in the ovary of de *Mabuya* sp (Squamata: Scincidae) \*

**Author:** Jennifer Yesenia Quintero Silva \*\*

**Key words:** Immunohistochemistry, antibodies, viviparity, ovaries, progesterone.

### Description

The Progesterone (Pg) has a fundamental role in the evolution of viviparity since it is responsible of the gestational balance until the end of the development, contributing to the inhibition of uterine motility. However, in a species of the *Mabuya* genus that is matrotrophic and was evidenced an early luteolysis. Therefore, an alternate source of Pg was suggested. To test the hypothesis of the existence of an additional ovarian Pg source, this paper locates the enzyme that catalyzes the synthesis of Pg ( $3\beta$  HSD) and progesterone (PR) receptors in the ovary of *Mabuya* sp in different states of gestation. Serial sections were made on microtome from paraffin embedded tissues. To localize the Pg and PR, the sections were incubated with the primary antibody specific for PR and for the  $3\beta$  HSD enzyme. Two methods were used to visualize the binding of the antibodies to the antigen; biotinylated avidin-biotin (AB) secondary antibody and the fluorescein isothiocyanate (FITC) secondary antibody. The  $3\beta$  HSD enzyme was quantified in the ovary using the Western blot technique; a primary antibody specific for the enzyme was used and was revealed with fluorescence (FITC). It was found that in early gestation the ovary produces Pg in active luteal cells and in theca and granulosa cells of previtelogenic follicles; in the middle and late gestation the expression of Pg is very low in previtelogenic follicles and is not observed in the corpora lutea, which are in regression. PR were localized in same cells where the enzyme was expressed. Atretic follicles do not appear to be an alternative ovarian source of Pg in *Mabuya* sp. In conclusion the ovary produces Pg in the corpus luteum and previtelogenic follicles; the maximum production is at the beginning of gestation and decreases in middle gestation in direct relation with luteolysis.

---

\* Degree Work.

\*\* Science Faculty. Department of Biology. Director: Martha P. Ramírez Pinilla, PhD in Biological Sciences

## Introducción

Las progestinas y los estrógenos son las dos clases de esteroides primarios que están estrechamente relacionados con la actividad reproductiva en hembras de reptiles así como en muchos otros vertebrados (Kime, 1987; Norris, 2007). En los reptiles el ovario es un órgano de estructura compleja, con numerosos folículos en diferentes estados de diferenciación y de desarrollo; una de sus principales funciones es la endocrina y dentro de ella se destaca la capacidad de secretar progesterona (Norris & Lopez, 2011).

La transición a la viviparidad ha evolucionado de forma independiente más de 100 veces en los reptiles escamados (Blackburn 2000, 2006) y el mantenimiento del equilibrio gestacional hasta el final del desarrollo ha sido esencial para esta transición. La progesterona (Pg) tiene funciones importantes relacionadas con inhibición de la movilidad uterina asociada con la retención del huevo, embriogénesis, desarrollo de la placenta y la inhibición de la síntesis de vitelogenina hepática asociada con la disminución de la nutrición lecitotrófica en favor de la matrotófica y en la evolución de la placentación (Callard et al., 1992). En todas las especies de lagartos vivíparos estudiados el cuerpo lúteo tiene un papel fundamental en la producción de Pg (Callard et al., 1992). La necesidad de Pg en el mantenimiento de la gestación en reptiles está bien documentada, en escamados varios estudios han detectado Pg en diferentes momentos durante la gestación (Callard et al., 1992; Martínez-Torres et al., 2006).

En las especies de lagartos vivíparos estudiadas hasta ahora el cuerpo lúteo (CL) es la fuente principal de Pg durante la gestación (Xavier, 1987; Bonnet et al., 2001). Sin embargo, existen evidencias que muestran que en algunas especies de lagartos (p.ej. *Tiliqua rugosa*, Fergusson & Bradshaw, 1991; *Chalcides chalcides*, Guarino et al., 1998; *Sceloporus jarrovi*, Painter & Moore, 2005; y *Barisia imbricata imbricata*, Martínez-Torres et al., 2010) además de tejido luteal, existe una fuente de Pg secundaria (probablemente la glándula suprarrenal o la placenta, o folículos atrésicos en el ovario).

Los escíncidos del género *Mabuya* presentan una distribución neotropical, abarcando Suramérica, Centroamérica y las Antillas (Miralles et al., 2009). Las especies del género son uno de los pocos linajes de amniotas (excluyendo Mammalia) que han evolucionado al grado de placentotrofia en el que la placenta proporciona la mayor parte de los nutrientes para el desarrollo embrionario (Blackburn & Vitt, 1992; Ramírez-Pinilla et al., 2006; Ramírez-Pinilla et al., 2011). Para una población colombiana de este género se ha observado que en el ovario se producen los CLs pero que estos degeneran muy pronto (cuando los embriones están en gastrulación), si se piensa en la gestación prolongada (9-10 meses) que tiene este grupo (Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004). Por lo tanto, la mayor parte del desarrollo embrionario y fetal intrauterino sucede sin que haya CLs activos, sugiriendo una fuente alternativa de Pg. Esta fuente alternativa puede ser ovárica o extraovárica.

Los folículos atrésicos han sido hipotetizados como fuente ovárica de Pg diferente a los cuerpos lúteos (Guillette et al., 1981; Martínez-Torres et al., 2012) y se ha visto que durante la gestación en las poblaciones colombianas de *Mabuya* hay un alto índice de atresia folicular

(Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004). Este trabajo pretende responder a las siguientes preguntas ¿Dónde y en qué etapas de la gestación se localizan en el ovario de la hembra gestante las células responsables de la secreción de la Pg?, ¿Hay una fuente ovárica diferente a la de los CLs que provea la Pg necesaria o alternativa para el mantenimiento de la gestación en una población de *Mabuya sp*?

## 1. Marco teórico

### 1.1 Viviparidad en reptiles escamados

La transición a la viviparidad se ha producido de forma independiente más de 100 veces en los escamados (Blackburn, 1982, 1992, 2000, 2006), este es un número muy grande en comparación con otros taxones; las especies ovíparas de este taxón se han considerado pre-adaptados para la viviparidad ya que la mayoría conserva los huevos dentro del oviducto durante al menos el primer tercio de la gestación (Guillette, 1985; Blackburn, 2006; Blackburn & Stewart, 2011). La viviparidad ocurre en 25 de las 61 familias de escamados (aproximadamente el 20% de las especies) (Sites et al., 2011; Blackburn, 2015; Roberts et al., 2016), incluyendo al menos tres especies de lagartos que poseen ambas poblaciones ovíparas y vivíparas (*Lacerta vivipara* Heulin et al., 1997; *Lerista bougainvillii* Smith & Shine, 1997; Qualls & Shine, 1998; y *Saiphos equalis* Smith & Shine, 1997); esto demuestra una gran plasticidad de la condición de paridad dentro de este linaje.

La necesidad de Pg en el mantenimiento de la gestación en reptiles ha sido ampliamente estudiada, encontrando especies de escamados en las que se ha detectado Pg durante toda la gestación (Callard et al., 1992; Martínez-Torres et al., 2006). Los escamados vivíparos en general exhiben un período prolongado de producción de Pg con elevadas concentraciones en plasma durante la gestación; estos niveles incrementan levemente durante la vitelogénesis, después de la ovulación, y alcanzan un máximo durante la gestación (Xavier, 1987).

La Pg es sintetizada y secretada por el ovario y transportada en el torrente sanguíneo a sus tejidos diana, donde ejerce sus efectos biológicos a través de receptores específicos (Kimmins & Mac-Laren, 2001). Los receptores son regulados por las hormonas y presentan un complejo mecanismo de control, en el cual es necesario tener en cuenta varios factores, entre ellos la etapa del desarrollo y estado reproductivo del animal y las diferencias entre las diversas especies (Robinson et al., 2001). Los receptores de progesterona (PR) hacen parte de la superfamilia de receptores nucleares que actúan como dímeros para inducir la activación transcripcional de los genes (Williams & Sigler, 1998). Los PR en el tracto reproductivo de reptiles fueron identificados por primera vez en tortugas del género *Chrysemys* (Ho et al., 1981) y en serpientes vivíparas del género *Nerodia* (Kleis-San Francisco & Callard, 1986); en la tortuga *Chrysemys picta* (Riley et al., 1988) se identificaron PR en el hígado.

El mantenimiento del equilibrio gestacional hasta el final del desarrollo ha sido esencial para la evolución de la viviparidad. En varias especies de lagartos vivíparos el cuerpo lúteo (CL) es la fuente principal de Pg durante la gestación (Xavier, 1987; Gemmell, 1995); así, varios autores han asignado al CL un papel central en el mantenimiento de la gestación y la viviparidad en los reptiles. Sin embargo existen evidencias que muestran que en algunas especies de lagartos (*Tiliqua rugosa*, Fergusson & Bradshaw, 1991; *Chalcides chalcides*, Guarino et al., 1998; *Sceloporus jarrovi*, Painter & Moore, 2005; y *Barisia imbricata imbricata*, Martínez-Torres et al., 2010) además de tejido luteal, existen fuentes de Pg secundarias que mantienen la gestación hasta el parto (probablemente la glándula suprarrenal o la placenta, como fuentes extraováricas, o los folículos atrésicos como fuente ovárica de Pg).

## 1.2 Mabuya

Los scíncidos del género *Mabuya* tienen una distribución que abarca Suramérica, Centroamérica y el Caribe (Miralles et al., 2009). Se sabe que sólo algunos amniotas como el género *Mabuya* han convergido con los mamíferos Theria en un grado evolutivo de placentotrofía en el que la placenta se encarga de la provisión de grandes cantidades de nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario (Blackburn & Vitt, 1992; Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004; Brandley et al., 2012). Las características comunes de sus patrones reproductivos incluyen (además de viviparidad y placentotrofía) madurez sexual temprana, ovocitos pequeños (diámetro de 1-2 mm ya que contienen muy poca yema), un período de gestación prolongada y dimorfismo sexual en el que las hembras son más grandes que los machos (Vitt and Blackburn, 1983, 1991; Jerez & Ramírez-Pinilla, 2001). El modo de reproducción, el tipo de placentación, y el patrón de la nutrición fetal, hacen que este grupo sea interesante para el estudio de las estructuras reproductivas asociadas con la evolución de la viviparidad, matrotrofía y placentotrofía (Blackburn & Vitt, 1992; Gómez & Ramírez-Pinilla 2004).

Las mabuyas Sudamericanas estudiadas tienen actividad reproductiva estacional y tienen períodos de parto con un patrón unimodal concentrados en la temporada de lluvia o en la transición seca-húmeda (Vrcibradic & Rocha, 2011). Una población colombiana de *Mabuya* sp demostró tener un período de parto bimodal coincidente con los dos períodos de baja precipitación en su hábitat andino (Ramírez-Pinilla et al., 2002). Sin embargo, los nacimientos se producen al final de estos períodos, como en otras especies sudamericanas (Ramírez-Pinilla et

al., 2002). A pesar de las diferencias en los patrones temporales de parto, cada hembra da a luz una sola vez al año dado su largo período de gestación (Vrcibradic & Rocha, 2011).

### 1.3 Placenta

Las funciones que se le atribuyen al tejido placentario son diversas, algunas de estas son: intercambio gaseoso, transporte de agua, transporte de nutrientes, síntesis de hormonas (fundamentalmente esteroides), y síntesis de factores inmunoreguladores (Martínez-Torres et al., 2006). El conocimiento de la capacidad endocrina en la placenta de escamados vivíparos es poca; Martínez-Torres et al. (2006) encontraron que la onfaloplacenta de la especie de lagarto ánguido *Barisia imbricata imbricata* tiene capacidad esteroidogénica, ya sea para producir hormonas como la progesterona, o bien para depurar esteroides producidos por la hembra gestante. Hasta el momento se ha demostrado que la placenta corioalantoica de la lagartija scíncida *Chalcides chalcides* tiene capacidad esteroidogénica (Guarino et al., 1998) y existen evidencias indirectas de que la alantoplacenta del lagarto *Sceloporus jarrovi* puede metabolizar los esteroides sexuales producidos por la hembra gestante (Painter & Moore, 2005).

### 1.4 Ovario

En los reptiles el ovario es un órgano de estructura compleja, con numerosos folículos en diferentes estadios de diferenciación y de desarrollo (Bulfon et al., 2009). Gómez & Ramírez-Pinilla (2004) encontraron en una población colombiana de *Mabuya* sp que los ovarios eran pequeñas estructuras saculares e irregulares con folículos que alcanzaban un diámetro máximo

de 1.88 mm; también describieron la morfología tisular en las etapas de foliculogénesis, atresia, luteogénesis y luteólisis.

El cuerpo lúteo presente en el ovario es una glándula endocrina transitoria encontrado en la mayoría de hembras gestantes de vertebrados; hay consenso en la idea de que el CL es la fuente más importante de progesterona durante el período de gestación (Xavier, 1987). La duración del cuerpo lúteo es variable y depende de la especie y el modo reproductivo (Xavier, 1987; Villagrán-Santacruz & Méndez de la Cruz, 1999). En algunas especies vivíparas como *Chalcides ocellatus* (Badir, 1967) y *Sceloporus jarrovi* (Guillette et al., 1981) los niveles de progesterona en plasma permanecen altos o incluso incrementan cuando el cuerpo lúteo se degenera durante la gravidez tardía. En *Mabuya* sp el cuerpo lúteo está formado por células de la granulosa y éste muestra claros signos de regresión durante la etapa de gástrula y néurula del desarrollo embrionario (Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004; Ramírez-Pinilla, 2014), cuando la corioplacenta está activa en los procesos histotróficos (Jeréz & Ramírez-Pinilla, 2001). De acuerdo con Gómez & Ramírez-Pinilla (2004) los cambios en la morfología del cuerpo lúteo a través de la gestación en *Mabuya* sp son similares a los descritos en *Trachylepis brevicollis* (Farag, 1983) y *C. chalcides* (Guarino et al., 1998). Esta luteólisis temprana sugiere que la corioplacenta y alantoplacenta pueden tener una función endocrina produciendo la progesterona necesaria para mantener el desarrollo gestacional (Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004).

Algunos autores han encontrado evidencias indirectas que sugieren que los folículos vitelogénicos atrésicos (AVF), las glándulas adrenales (AG), y la placenta corioalantoica (CAP), serían capaces de producir Pg durante algunos períodos de la gestación (Bourne, 1981; Guillette

et al., 1981; Dauphin-Villemant & Xavier, 1987; Villagrán-Santacruz, 1989). La enzima 3 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa (3 $\beta$  HSD) tiene la capacidad de convertir pregnelona en Pg y está presente en los folículos vitelogénicos atrésicos (AVFs) en muchos reptiles, exhibiendo actividad alta en AVFs grandes y baja en AVFs pequeños, lo que sugiere que éste podría estar relacionado con la actividad esteroidogénica del ovario (Sekharappa et al., 1978; Martínez-Torres et al., 2010).

La atresia se produce en todos los tipos foliculares pero con más frecuencia en los folículos en crecimiento con la granulosa polimórfica (previtelogénicos APFs) de especies de escamados (Saidapur, 1978; Guraya, 1989). En los ovarios preovulatorios, la atresia proporciona un mecanismo para controlar el número final de folículos que se ovulan durante el proceso de selección folicular (Jones & Guillette, 1982; Andreuccetti et al, 1990). Jones & Swain (2000) sugieren dos posibles mecanismos que regulan el tamaño de puesta en Squamata, el reclutamiento (Sinervo & Licht, 1991) o una atresia posterior (Méndez de la Cruz et al., 1993). En las especies vivíparas existe un tercer mecanismo, la pérdida de embriones en desarrollo (Blackburn, 1998). Durante la vitelogénesis se han documentado bajas tasas de atresia en las especies vivíparas de Scincidae *Niveoscincus metallicus* (Jones & Swain, 1996; Bennett & Jones, 2002) y *N. ocellatus* (Jones et al., 1997). En *Mabuya* sp la atresia es más o menos constante en todas las etapas reproductivas de las hembras inmaduras a las preñadas; sin embargo, la atresia folicular es muy elevada en los folículos en crecimiento (APFs) y mínima en los folículos preovulatorios (AVFs, Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004) por lo que no se esperaría una fuente importante de Pg a partir de AVFs en este grupo. Durante la etapa final de la gestación en *Mabuya* hay un crecimiento folicular preovulatorio en las hembras preñadas a término, lo que

sugiere que después del parto ocurre una ovulación inmediata y comienza un nuevo ciclo reproductivo (Ramírez-Pinilla et al., 2002). Así, como en las otras especies de scíncidos estudiadas, en las hembras durante la vitelogénesis (y cuando las hembras tienen embriones a término), la atresia folicular disminuye. Estos eventos podrían relacionarse con la caída de los niveles de progesterona cuando se produce el parto al final de la gestación.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Recolecta de ejemplares y área de muestreo

Pinto-Sánchez et al. (2015) estudiaron las poblaciones del género *Mabuya* distribuidas en Colombia y concluyeron que la especie andina colombiana estudiada en este trabajo corresponde a la especie candidata *Mabuya* sp IV. El presente trabajo se realiza con especímenes de esta especie candidata. Los especímenes estudiados se recolectaron en el departamento de Santander en los municipios de Curití, Zapatoca y Bucaramanga. Se recolectaron 13 hembras en diferentes fases de gestación, se trasladaron al laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander y se tomaron las medidas de longitud rostro-cloaca (SVL) de cada individuo con un calibrador Vernier (0.02 mm de precisión). Las hembras se eutanzaron con una inyección de lidocaína al 10%, se disecaron y se determinaron los estados de actividad reproductiva (previtelogénica, vitelogénica, gestante). De estas últimas se determinó el estado de

avance de la gestación al analizar el estado de desarrollo embrionario siguiendo la tabla de desarrollo para embriones de *Lacerta vivipara* de Dufaure & Hubert (1961).

## 2.2 Fase de laboratorio

Los ovarios se extrajeron y fueron fijados en paraformaldehído amortiguado al 4% y se almacenaron a -4°C. Estas muestras de ovarios se utilizaron para la localización de PR y de la enzima 3- $\beta$ -HSD con histotecnica tradicional. Las características histológicas observadas para cada estado del ciclo ovárico siguieron las descripciones y nomenclatura de Gómez y Ramírez-Pinilla (2004). Los ovarios se deshidrataron, se embebieron en parafina y se cortaron a 6 micras. Las secciones de tejido fijos en láminas de vidrio se desparafinaron en un disolvente de parafina (citrosol v) y se rehidrataron con un gradiente de concentración de etanol (de 100 a 70%) amortiguado con Tris al 0,1M. Para los PR, las láminas se incubaron con una disolución de anticuerpo monoclonal (alpha PR-22, Thermo Scientific, diluido 1  $\mu$ g/ml). Para la localización de la enzima 3- $\beta$ -HSD las láminas se incubaron con una disolución de anticuerpo monoclonal (anti-3 beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase sc-100466, Santa Cruz Biotechnology®, diluido 1  $\mu$ g/ml). Se utilizó unas láminas como control tanto para los PR como para la enzima y se trataron con suero de caballo sin el anticuerpo primario. Para el control positivo de la enzima 3- $\beta$ -HSD se utilizaron cortes de ovario de *Hemidactylus frenatus* que presentaban cuerpos lúteos activos positivos para la enzima y para los receptores se tomó láminas de hígado y oviducto de *H. frenatus* (PR presentes en células hepáticas en el hígado y en tejido conectivo y epitelio luminal en el oviducto).

Una vez incubadas las láminas con anticuerpos primarios para visualizar la unión de los anticuerpos al antígeno se utilizó dos métodos, uno de ellos fue un anticuerpo secundario biotinilado (avidina-biotina ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology), un complejo de moléculas que reacciona a la actividad peroxidasa del sustrato cromógeno, el cromógeno da una coloración específica como indicador de su localización; finalmente las láminas se tiñeron con hematoxilina contrastante. El otro método que se usó para visualizar los PR y la enzima 3 $\beta$  HSD fue un anticuerpo secundario FITC (Isotiocianato de fluoresceína IgG de conejo FITC sc: 69871) que mostró fluorescencia. Las láminas se observaron bajo el microscopio de luz NIKON ECLIPSE 55i ® con cámara adaptada (CANON DS126191®) para el primer método y microscopio de fluorescencia 6 Axio Scope.A1® con cámara incluida para el segundo.

### **2.3 Western blot**

Para confirmar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica de la presencia de la enzima en el ovario, se realizó un *Western blot* sobre muestras de ovario de dos estados de gestación (temprana y media), las cuales fueron pesadas y lavadas con una solución de buffer fosfato salino 10 Mm pH 7.4. Cada muestra se lisó utilizando un procesador de ultrasónico (Cole-Parmer USA®) en buffer de lisis (úrea 7 M, tiourea 2 M, ditioneitol (DTT) 100 mM, Tris 40 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, Chaps 4% p/v, anfolitos 1% v/v, ortovanadato de sodio 1 mM). Las proteínas obtenidas se precipitaron con diclorometano/metanol en frío siguiendo el protocolo propuesto por Centlow et al. (2009), con algunas modificaciones. Enseguida las muestras se centrifugaron a 14000g durante diez minutos a 4 °C, se añadieron tres volúmenes de

metanol y se centrifugaron de nuevo a 18000g durante diez minutos a 4 °C (dos veces). La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1976).

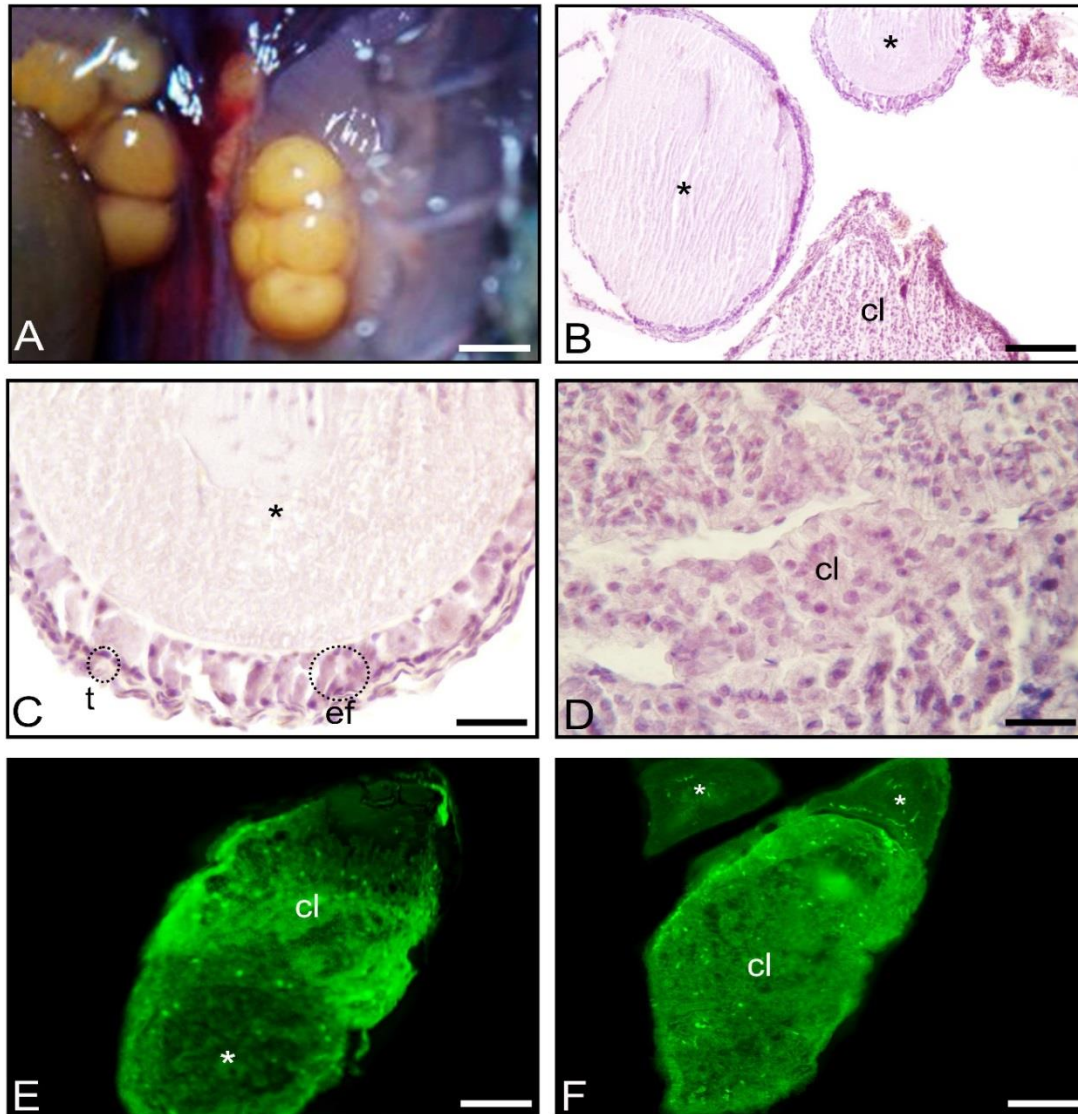
Para realizar el protocolo del *Western blott* las muestras fueron mezcladas con buffer de carga (25% de Tris-HCl 0.5 M, glicerol 20% v/v, SDS 10% w/v, 2-mercaptoetanol 10% v/v, azul de bromofenol 5% w/v). Se cargaron 20  $\mu$ l en un gel de poliacrilamida al 12% (Laemmli, 1970) y fueron calentadas por 5 minutos a 90°C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel de 12% de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) a 150V. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno a 100V por 2 horas en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20% v/v). Se agregó una solución de bloqueo (leche en polvo sin grasa 5% p/v, TBST: Tris 20 Mm pH 7.5, Cloruro de sodio 150 mM, Tween 20 0.1% v/v) durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBST y se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal: 3 $\beta$  HSD (sc-100466, Santa Cruz Biotechnology®) en una dilución 1:1000. Las membranas se lavaron de nuevo 3 veces con TBST y se incubaron con anticuerpo secundario: anti ratón IgG de conejo FITC (sc: 69871, Santa Cruz Biotechnology®) en dilución 1:1000 durante 1 hora. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min en TBST. Las bandas se detectaron con un documentador de geles (GelDoc XR) y se analizaron con el software Image Lab v.5.2.1.

### 3. Resultados

De las 13 hembras de *Mabuya* sp colectadas, tres hembras gestantes se encontraron con huevos oviductales (ovulación reciente, segmentación), dos en estado de gestación temprana (néurula/faríngrula), cinco en estado gestación media (desarrollo de los miembros, estados 34-36), dos en estado de gestación final (previa al parto, estados 39-40) y una hembra post-parto y vitelogénica. Los resultados obtenidos en cada estado se muestran a continuación.

#### 3.1 Hembra gestante en segmentación

En este estado los ovarios están conformados por folículos previtelogénicos (3-6), folículos atrésicos previtelogénicos (APF), y cuerpos lúteos (2-5). Los cuerpos lúteos se observaron en luteogénesis, con una cavidad central grande que comienza a llenarse de células de la granulosa (redondeadas con núcleos ovoides) formando el tejido luteal; la teca interna es gruesa y consiste de células redondeadas, la teca externa es más delgada y más fibrilar que la teca interna. La enzima  $3\beta$ -HSD se localizó en las células de la granulosa y de la teca en los folículos previtelogénicos y con mayor intensidad en las células luteales de los cuerpos lúteos. Para los PR se observaron resultados similares, hubo mayor tinción en el cuerpo lúteo comparado con folículos previtelogénicos. (Fig. 1).



**Figura.1. A. Ovario de una hembra de *Mabuya* sp con embriones en segmentación.**

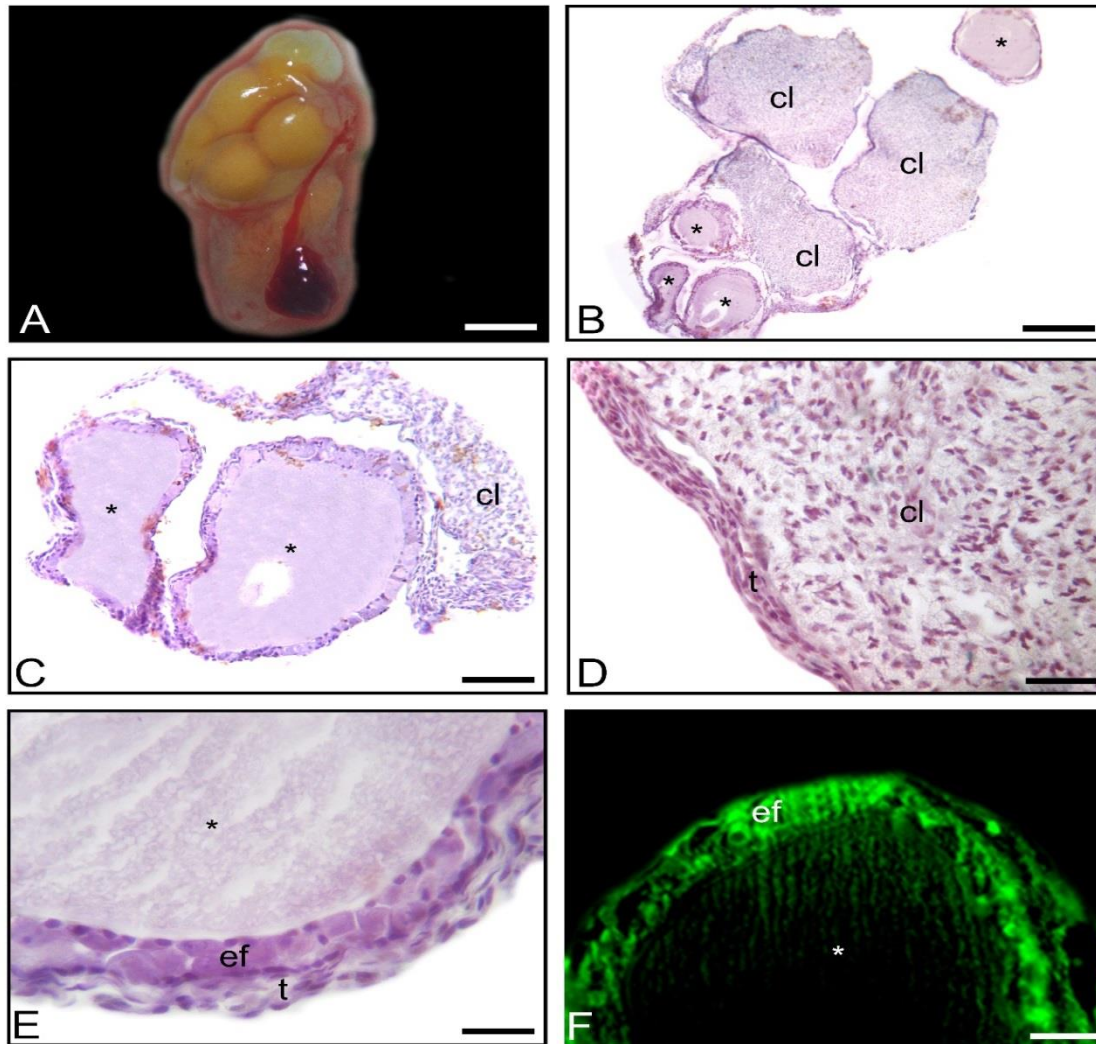
*Nota:* B. folículos previtelogénicos (\*) y cuerpo lúteo (cl) en luteogénesis. Tinción AB positivo para 3 $\beta$  HSD. C. Folículo previtelogénico positivo para 3 $\beta$  HSD en células de la teca (t) y células del epitelio folicular (ef). Tinción AB. D. Cuerpo lúteo positivo para PR. Tinción AB. E. Folículo previtelogénico y cuerpo lúteo positivos para 3 $\beta$  HSD. Tinción FITC; F. Folículos previtelogénicos y cuerpo lúteo positivos para PR. Tinción FITC. Barra de escala: A. 1 mm; B. 130  $\mu$ m; C. 30  $\mu$ m; D 30  $\mu$ m; E 90  $\mu$ m; F 90  $\mu$ m.

### **3.2 Gestación temprana (néurula y farínula)**

En este estado los ovarios tienen folículos previtelogénicos (4-6) y cuerpos lúteos (3-5). Los cuerpos lúteos se encuentran en luteólisis, están formados por células de la granulosa que comienzan a mostrar signos de regresión (las células luteales ya no se ven redondeadas y exhiben núcleos picnóticos); se observa la formación de septos por invasión de la teca interna en la región central, la teca externa es más delgada. La enzima se localizó en las células de la granulosa y de la teca en los folículos previtelogénicos y de igual forma e intensidad en las células luteales. Los receptores (PR) se expresaron en los mismos tejidos que la enzima pero con menor intensidad (Fig. 2).

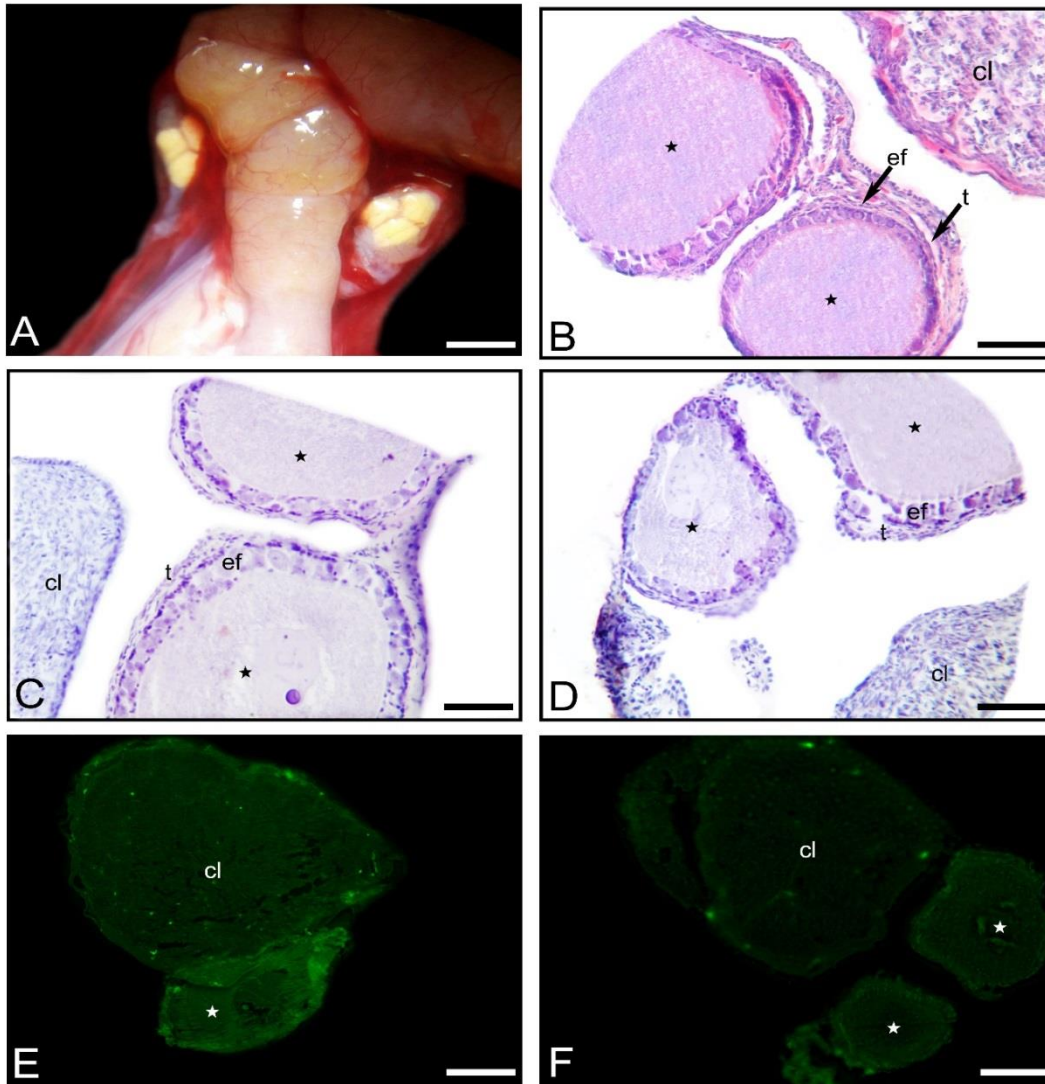
### **3.3 Gestación media (desarrollo de miembros, estados 34 - 36)**

En este estado de la gestación los embriones han alcanzado estados avanzados de desarrollo en los que se desarrollan los miembros y la placenta corioalantoica es muy activa en la transferencia de nutrientes hacia el embrión. En los ovarios se pueden observar folículos previtelogénicos (4-6) y cuerpos lúteos (3-5). El cuerpo lúteo en luteólisis tardía muestra varios septos en la región central, las células de la granulosa y la teca presentan núcleos celulares alargados (picnóticos). La enzima se expresó débilmente en las células de la granulosa y de la teca en los folículos previtelogénicos y no se expresó en las células luteales. Los receptores se expresaron en las células de la granulosa y teca de los folículos previtelogénicos, no se expresaron en el cuerpo lúteo (Fig. 3).



**Figura 2. A. Ovario de *Mabuya* sp en gestación temprana.**

*Nota:* B. Folículos previtelogénicos (\*) y cuerpos lúteos (cl) en luteólisis temprana, positivos para 3 $\beta$  HSD. Tinción AB. C. Folículos previtelogénicos y cuerpo lúteo positivos para 3 $\beta$  HSD. Tinción AB. D. Cuerpo lúteo positivo para PR. Tinción AB. E. Folículo previtelogénico positivo para 3 $\beta$  HSD en epitelio folicular (ef) y teca (t). Tinción AB. F. Folículo previtelogénico positivo para 3 $\beta$  HSD. Tinción FITC. Barra de escala: A. 500  $\mu$ m B 270  $\mu$ m; C. 70  $\mu$ m; D 30  $\mu$ m; E 30  $\mu$ m; F 20  $\mu$ m.



**Figura 3. A. Ovario de *Mabuya* sp en gestación media.**

*Nota:* B. Folículos previtelogénicos (\*) y cuerpo lúteo (cl) en luteolisis tardía. Tinción H&E. C. Folículos previtelogénicos positivos para  $3\beta$  HSD en células de la teca (t) y epitelio folicular (ef); cuerpo lúteo; negativo para  $3\beta$  HSD. Tinción AB. D. Folículos previtelogénicos positivos para PR; cuerpo lúteo; negativo para PR. Tinción AB; E. Folículos previtelogénicos positivos para  $3\beta$  HSD; cuerpo lúteo; negativo para  $3\beta$  HSD. Tinción FITC. F. Folículos previtelogénicos positivos para PR; cuerpo lúteo negativo para PR. Tinción FITC. Barra de escala: A. 2 mm; B. 70  $\mu$ m; C. 70  $\mu$ m; D 70  $\mu$ m; E 20  $\mu$ m; F 20  $\mu$ m.

### 3.4 Gestación tardía (estados 39 y 40)

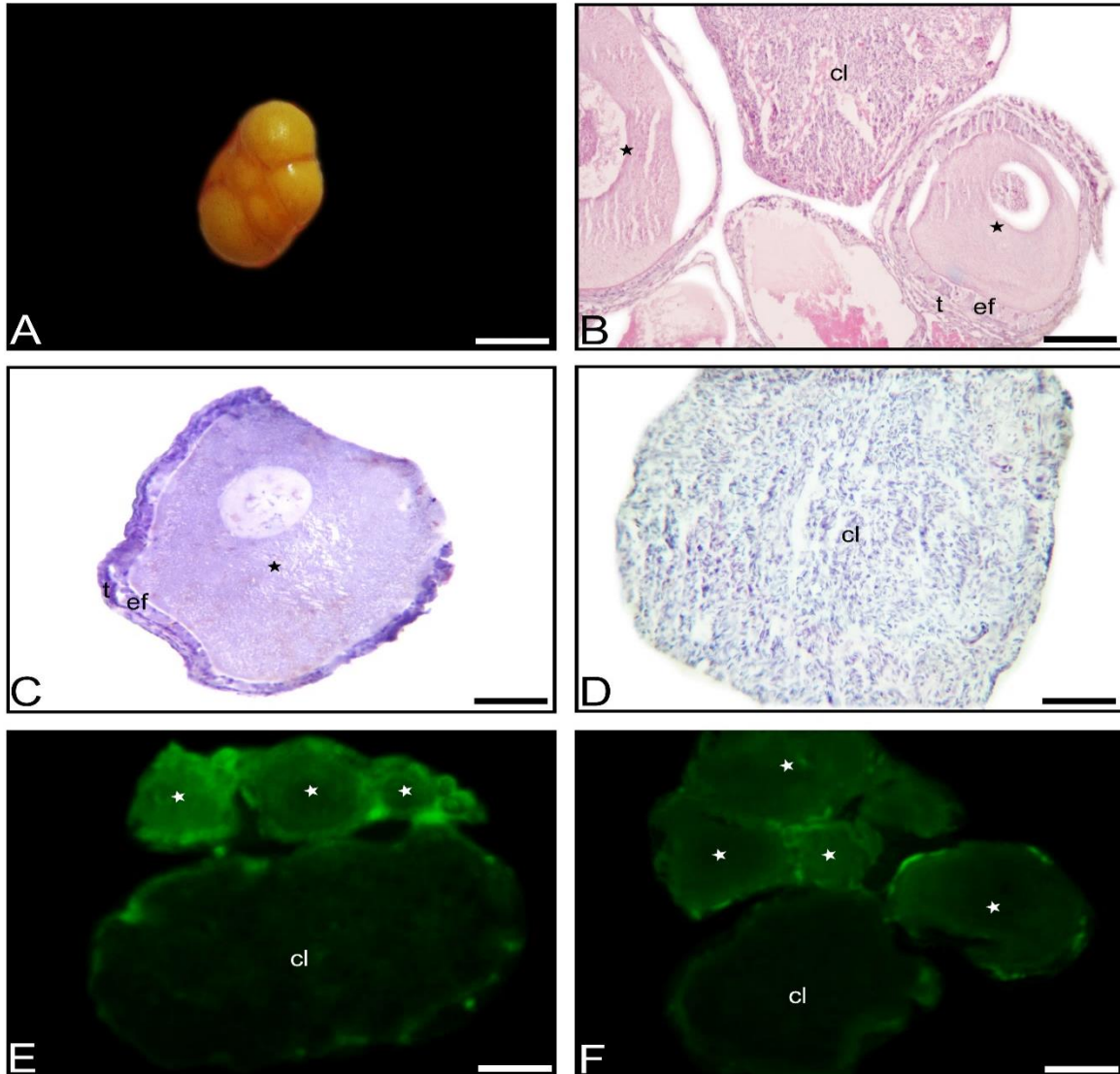
Corresponden a los últimos estados de la gestación. En el estado 40 el parto es inminente. Los fetos ya tienen todas las características de un neonato. Los ovarios de estos estados en general contienen folículos vitelogénicos (3-5), previtelogénicos pequeños (5-7) y cuerpos lúteos (3-5). En estos estados el cuerpo lúteo en luteólisis tardía muestra un gran septo en la región central con vacuolas tanto en granulosa como en la teca. La expresión de la enzima fue mucho menor comparada con los estados anteriores, se observó en las células de la granulosa y de la teca en los folículos previtelogénicos y no hubo expresión en el cuerpo lúteo; los resultados encontrados para los receptores son similares a los obtenidos con la enzima (Fig. 4).

### 3.5 Hembras pos-parto y vitelogénicas

Las hembras recientemente paridas tienen ovarios que contienen folículos previtelogénicos, vitelogénicos, cuerpos lúteos y folículos atrésicos. No se observó expresión de la enzima ni de los PR, en ninguno de los componentes ováricos (Fig. 5).

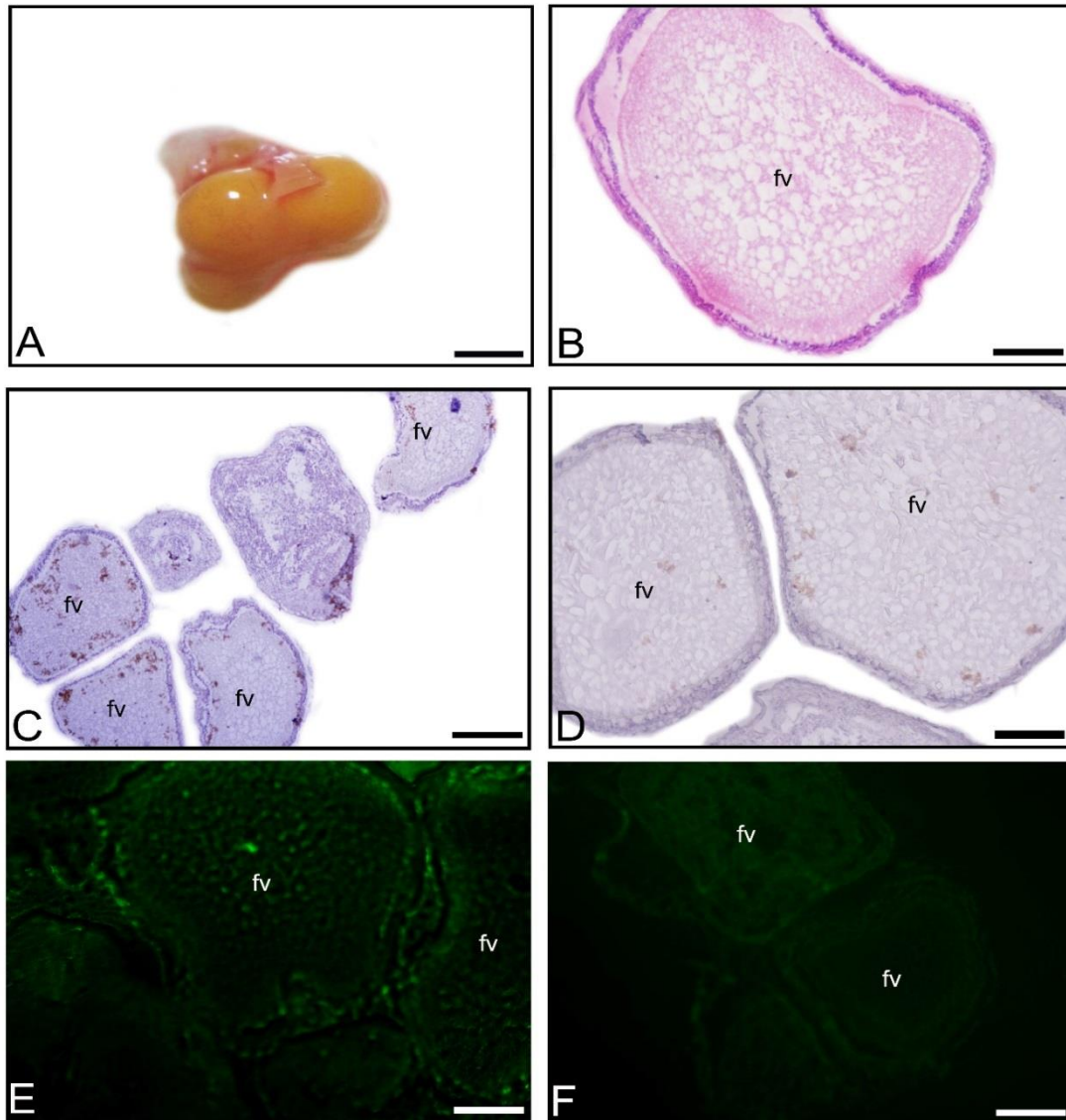
Los resultados del control positivo y blanco de la tinción AB y FITC de células hepáticas para la enzima  $3\beta$  HSD y los PR en el hígado de *Hemidactylus frenatus*. Se muestran en la figura 6.

Los resultados obtenidos por los dos métodos inmunohistoquímicos (Avidina-Biotina y FITC) tanto para la enzima como para los receptores de Pg fueron similares y se muestran en las tablas 1 y 2.



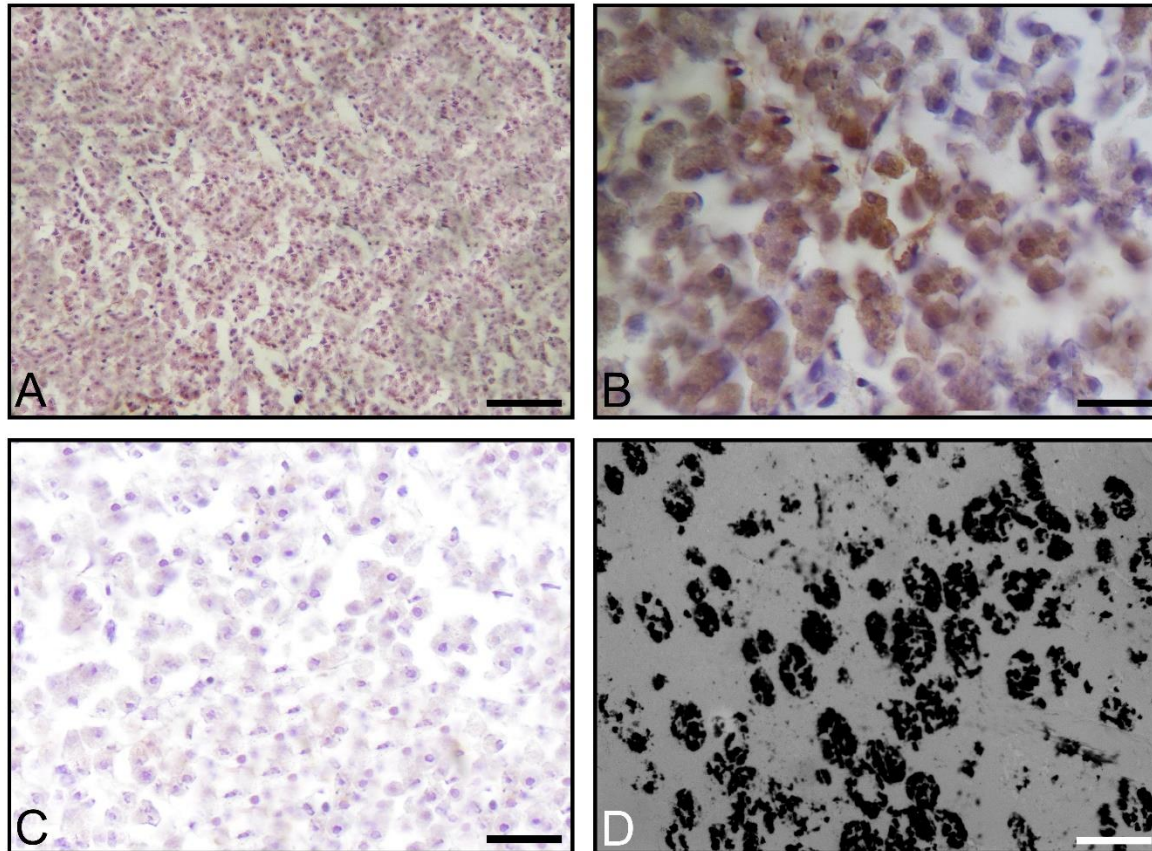
**Figura 4. A. Ovario de *Mabuya* sp en gestación tardía.**

*Nota:* B. Folículos previtelogénicos (\*) y cuerpo lúteo (cl) en luteolisis tardía. Tinción H&E. C. Folículos previtelogénico positivo para 3 $\beta$  HSD en células de la teca (t) y en epitelio folicular (ef). Tinción AB. D. Cuerpo lúteo; negativo para PR. Tinción AB. E. Folículos previtelogénicos; positivos para 3 $\beta$  HSD; cuerpo lúteo; negativo para 3 $\beta$  HSD. Tinción FITC. F. Folículos previtelogénicos; positivos para PR; cuerpo lúteo; negativo para PR. Tinción FITC. Barra de escala: A. 500  $\mu$ m B 130  $\mu$ m; C. 70  $\mu$ m; D 70  $\mu$ m; E 20  $\mu$ m; F 20  $\mu$ m.



**Figura 5. A. Ovario de *Mabuya* sp de hembra vitelogénica post-parto.**

*Nota:* B. Folículo vitelogénico (fv). Tinción H&E. C. Folículos vitelogénicos negativos para  $3\beta$  HSD en células de la teca (t) y en epitelio folicular (ef). Tinción AB. D. Folículos vitelogénicos negativos para PR. Tinción AB. E. Folículos vitelogénicos negativos para  $3\beta$  HSD. Tinción FITC. F. Folículos vitelogénicos negativos para PR. Tinción FITC. Barra de escala: A. 1 mm B 130  $\mu$ m; C. 270  $\mu$ m; D 130  $\mu$ m; E 20  $\mu$ m; F 20  $\mu$ m.



**Figura 6. A. Hígado de *Hemidactylus frenatus*, células hepáticas positivas para para PR.**

**Tinción AB. (Control positivo).**

*Nota.* B. Células hepáticas positivas para para  $3\beta$  HSD. Tinción AB. (Control positivo). C. Células hepáticas negativas para para  $3\beta$  HSD (Blanco). Tinción AB. D. Células hepáticas negativas para para  $3\beta$  HSD (Blanco). Tinción FITC. Barra de escala: A. 270  $\mu$ m B 30  $\mu$ m; C. 70  $\mu$ m; D 90  $\mu$ m.

**Tabla 1. Resultados para la enzima 3 $\beta$  HSD en los diferentes tipos celulares del ovario de *Mabuya sp.* Método Avidina-Biotina y FITC. La intensidad de la reacción se simbolizó en un gradiente de negativo (-) a positivo: débilmente expresado (+) y fuertemente expresado (++)**

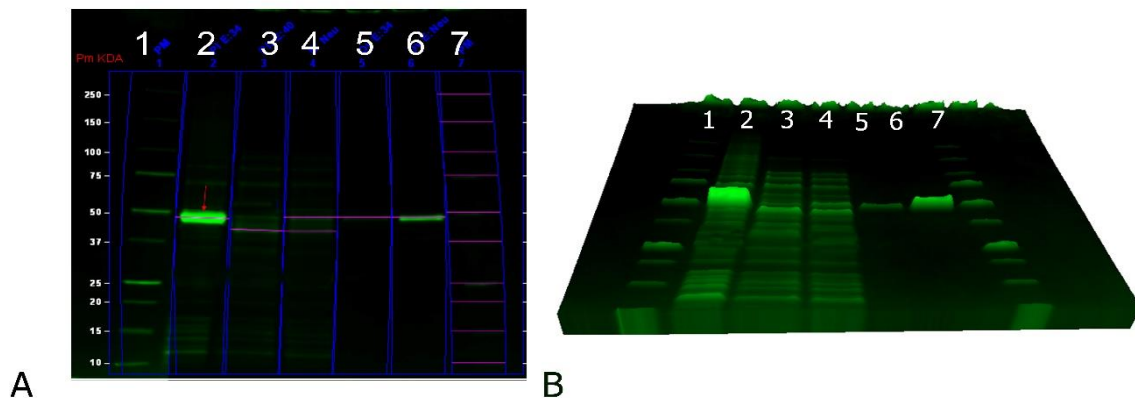
Etapa/ tipo celular	En segmentación	Gestación temprana	Gestación Media	Gestación final	Hembra Post-parto
Células de la granulosa	++	++	+	+	-
Células de la teca	++	++	+	+	-
Células luteales	++	+	-	-	-

**Tabla 2. Resultados para los receptores de Pg en los diferentes tipos celulares del ovario de *Mabuya sp.* Método Avidina-Biotina y FITC. Positivo: débilmente expresado (+), fuertemente expresado (++) y negativo (-).**

Etapa/ tipo celular	En segmentación	Gestación temprana	Gestación Media	Gestación final	Hembra Post-parto
Células de la granulosa	++	++	+	+	-
Células de la teca	++	++	+	+	-
Células luteales	++	++	-	-	-

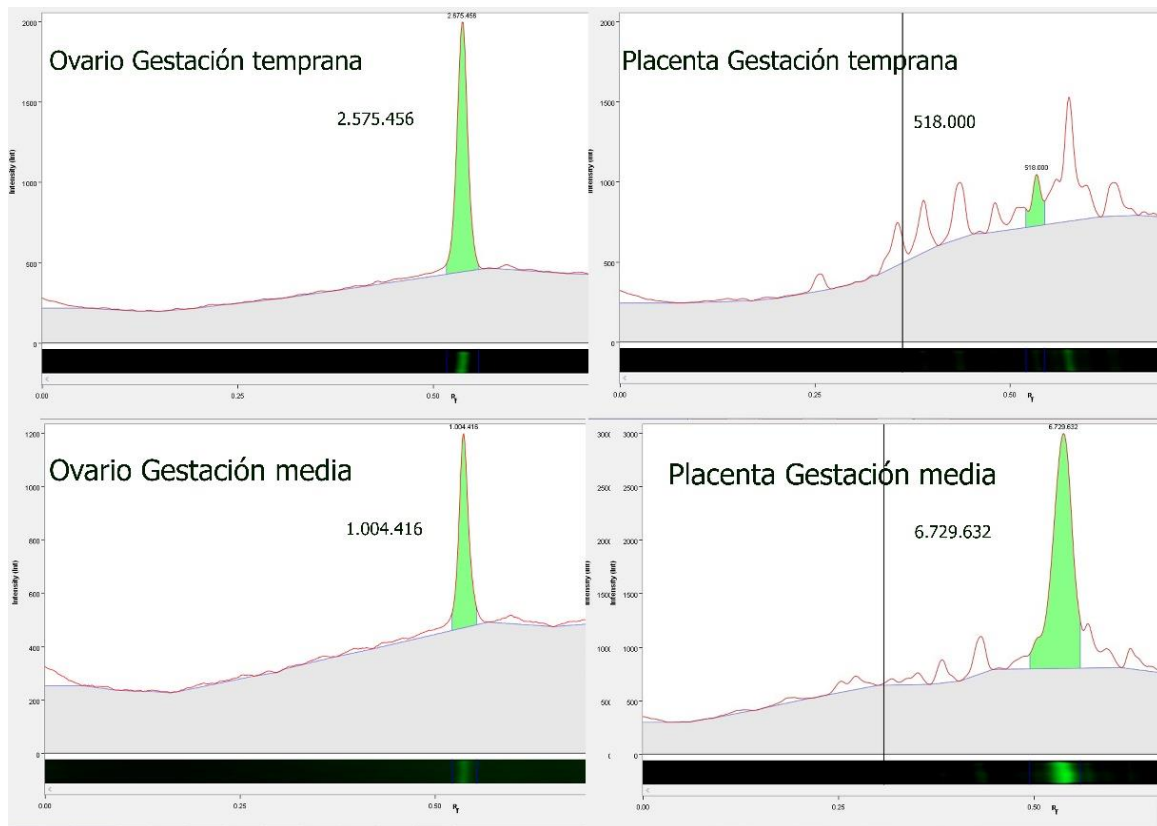
### 3.6 Western blot

Los resultados del *Western blot* del ovario de *Mabuya* sp con el anticuerpo monoclonal para la enzima 3 $\beta$ -HSD y el anticuerpo secundario FITC en gestación temprana y media y teniendo en cuenta la placenta, mostraron los siguientes resultados (Fig. 7 A y B): El ovario en gestación media muestra una banda de peso molecular de 47.5 KDa correspondiente al peso de la enzima (línea 5) y con un volumen de intensidad bajo, y el ovario en gestación temprana con una banda de peso molecular de 47.5 KDa (línea 6) muestra un volumen de intensidad alto (Fig. 8). La figura 9 muestra la diferencia en los cambios de intensidad en la placenta y el ovario en los diferentes estados de gestación en *Mabuya* sp.



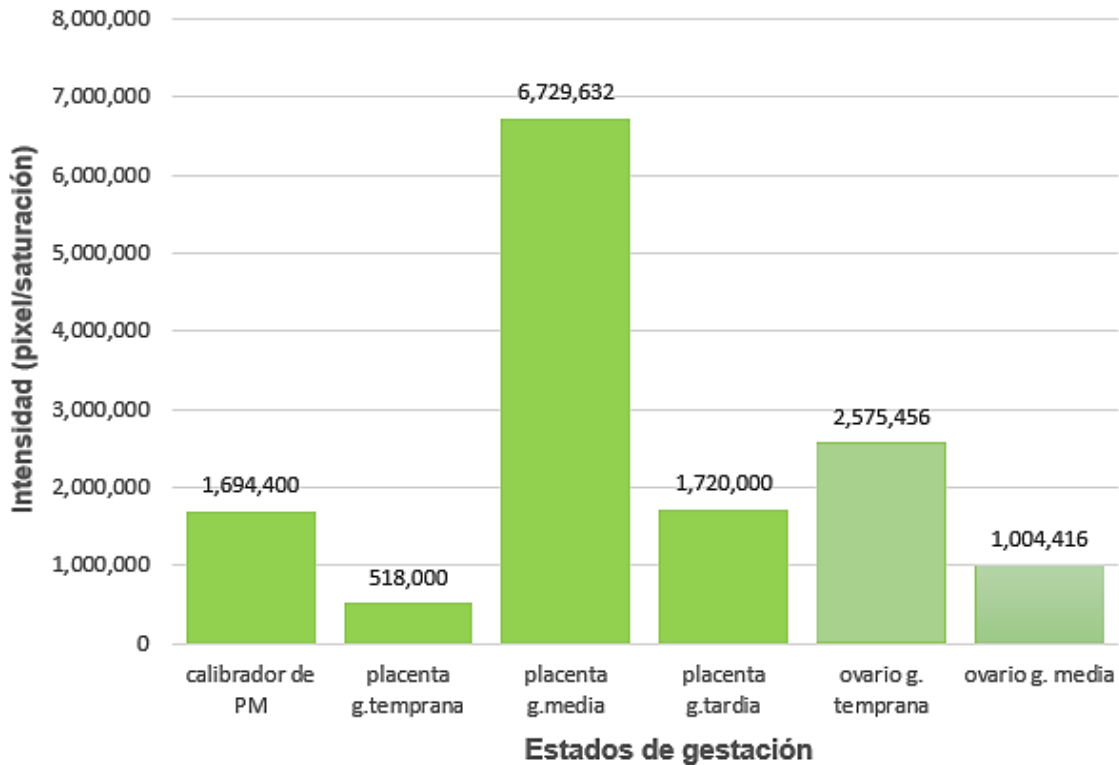
**Figura 7. Resultados del análisis de Western blot de ovario y placenta de *Mabuya* sp para la enzima 3 $\beta$  HSD.**

*Nota:* A. Línea 1, marcador de peso molecular (Pm KDa); Línea 2, placenta en gestación media (47.3 KDa); Línea 3, placenta en gestación tardía (47.9 KDa); Línea 4, placenta en gestación temprana (41.1 KDa); Línea 5, ovario en gestación media (47.5 KDa); Línea 6, ovario en gestación temprana (47.5 KDa); Línea 7, marcador de peso molecular. B. Diagrama de western blot en 3D, la altura de cada banda representa la intensidad (pixel/saturación).



**Figura 8.** Picos de intensidad de las bandas del *Western blot* con anticuerpo monoclonal para 3 $\beta$  HSD y anticuerpo secundario FITC en los extractos de placenta y ovario de *Mabuya* sp.

*Nota:* Los valores mostrados representan el volumen de intensidad.



**Figura 9.** Histograma de intensidad de las bandas del *Western blot* para 3 $\beta$  HSD en los extractos de placenta y ovario de *Mabuya* sp.

*Nota:* Los valores mostrados representan el volumen de intensidad (pixel/saturación). Calibrador de peso molecular (PM).

#### 4. Discusión

Los resultados del estudio proveen evidencia de que en el ovario de *Mabuya* sp el cuerpo lúteo y los folículos previtelogénicos producen Pg y PR en las etapas tempranas de la gestación, con una disminución sustancial en las etapas medias y no producen al final de la gestación y cuando son vitelogénicas. Teniendo en cuenta que en esta especie la luteólisis ocurre en estados tempranos

del desarrollo, en la gestación media y tardía debe haber una fuente alternativa de Pg, que puede ser la placenta u otra fuente extraovárica.

Se ha observado relación entre la funcionalidad del CL con la producción ovárica de Pg. Así por ejemplo en el lagarto ovíparo *Hemidactylus flaviviridis* los niveles de Pg fueron elevados cuando el cuerpo lúteo estaba activo y con el inicio de la luteólisis hubo un decaimiento abrupto en los niveles de progesterona (Al-amri et al., 2012). Igualmente se ha visto en otra especie ovípara (*Chameleo pumillus*) en la que hay altas concentraciones de Pg en el CL durante toda la permanencia de los huevos en el oviducto, siendo entonces el CL la fuente principal de producción de Pg ya que comienza a degenerarse justo antes de la oviposición (Veith, 1974).

Asimismo, en especies vivíparas se ha demostrado la presencia de Pg en el CL, por ejemplo en *Barisia imbricata imbricata* se observó la actividad de la enzima  $3\beta$  HSD en el CL, en mayor concentración al inicio de la preñez, y una disminución en el segundo y último tercio de la gestación, por lo tanto se sugirió que en esta especie la principal fuente de Pg es el CL (Martínez-Torres et al., 2003).

En ovarios de otras especies vivíparas se ha evidenciado la relación del cuerpo lúteo y la presencia de Pg plasmática, como es el caso de *Tilicua rugosa* en la que hay elevadas concentraciones de Pg al inicio de la preñez y una disminución de la misma al final de la gestación. Esta disminución está relacionada con los cambios degenerativos del CL, lo que sugirió a los autores que una fuente diferente de producción de Pg debe existir cuando los CLs entran en regresión (Fergusson & Bradshaw, 1991). Estas variaciones guardan similitud con las encontradas en *Mabuya* sp.

De igual manera, en el scincido vivíparo con un grado medio de placentotrofia, *Chalcides chalcides* se encontró que la actividad esteroideogénica del CL es alta en la gestación temprana y hasta la media cuando comienza la luteólisis; hacia el final de la gestación la presencia de la enzima  $3\beta$  HSD es débil en el CL pero es altamente expresada en su placenta corioalantoica, por lo que la placenta sería una fuente extraovárica alternativa de Pg (Guarino et al., 1998).

Se ha indagado por fuentes alternativas de Pg en el ovario. Por ejemplo, en el lagarto vivíparo mexicano *Sceloporus mucronatus* se observó que en el primer tercio de la gestación (gestación temprana) la actividad de la enzima  $3\beta$  HSD en el CL es más alta comparada con el segundo y último tercio (gestación media y tardía); sin embargo se evidenció la producción de Pg en los folículos vitelogénicos atrésicos (AVFs) aunque la actividad es muy baja comparada con la del CL. Estos resultados sugieren que el CL es la fuente más importante de Pg y que existe una participación adicional de los AVFs en la producción de la misma (Martínez-Torres et al., 2012). En *Mabuya* sp. sin embargo no se encontraron AVFs quizá debido a que el proceso vitelogénico en este grupo es reducido en tiempo y en intensidad de almacenamiento de nutrientes lecitotróficos (Vieira et al., 2007) y por tanto su participación como fuente alternativa de Pg es dudosa.

Así, los mecanismos gestacionales varían entre especies y se ven reflejados en las diferencias del tiempo de vida útil del CL y la producción adicional de Pg implicada en la gestación (Fergusson & Bradshaw 1991; Jones & Baxter 1991). Esta variación puede relacionarse con el tiempo de gestación y las fuentes adicionales alternativas de Pg (Blackburn, 2015).

En mamíferos euterios se pueden encontrar similares variaciones. Así por ejemplo, en conejos y ratas el CL es la única fuente de Pg, ya que el tejido luteal permanece activo hasta el final de la gestación (Holt., 1989; Sugino et al., 1997). Asimismo, en la cabra japonesa se observó que la fuente principal de producción de Pg es el CL y que la enzima 3 $\beta$  HSD no está presente en la placenta, lo que sugiere que en esta especie el CL es el único que produce Pg (Weng et al., 2005). En contraste, en el perro doméstico la fuente de Pg es el CL hasta la gestación media, pero en la tardía es desconocida (Nishiyama et al., 1999). Se ha pensado entonces que en mamíferos euterios con cortos periodos de gestación, como es el caso de cabras, conejos y ratas, el CL es el principal tejido productor de Pg (Ryan, 1971; Qiang et al., 2005).

De igual forma en mamíferos con periodos de gestación prolongados la producción de progesterona es similar a la que se muestra para *Mabuya sp*. Por ejemplo en el elefante *Loxodonta africana* se encontró que las altas concentraciones de Pg en plasma coinciden con el período luteal corto en esta especie (Brannian et al., 1988). Shemesh (1990) encontró que en vacas el CL produce Pg en la gestación temprana y la placenta se encarga de producirla en la gestación media y tardía, considerándose la fuente principal extra-ovárica de producción de Pg.

En *Mabuya sp* la expresión de los PR arrojó resultados similares comparados a los obtenidos con la enzima 3 $\beta$  HSD, es decir los mismos tejidos encargados de producir Pg en el ovario tienen sus receptores, de manera que habría una respuesta local. En el lagarto *Uromastix acanthinura* también se observó la expresión de los PR en los tejidos de producción de Pg y por

consiguiente una acción autocrina tanto en folículos vitelogénicos como en previtelogénicos en el ovario de esta especie (Sadjia et al., 2007).

En ratones también se ha visto que la producción de Pg en el ovario está en los mismos tejidos que la expresión de los PR, Cai & Stocco (2005) sugirieron por tanto una acción autocrina de la Pg en el ovario a nivel del cuerpo lúteo y folículos previtelgénicos, de manera que la Pg producida por el cuerpo lúteo actúa localmente para estimular su propia producción y controlar la cantidad necesaria antes de comenzar la luteólisis.

Los resultados del *Western blot* del ovario de *Mabuya* sp demuestran claramente que en la gestación temprana el ovario produce la mayor proporción de la Pg mientras que en la gestación media esta producción disminuye, siendo reemplazada por una muy alta producción a nivel placentario en la gestación media. Así como en otros lagartos vivíparos, una fuente extraovárica como la placenta es la responsable de la producción de Pg hasta el final de la gestación (Guarino et al., 1998; Painter & Moore, 2005; Martínez-Torres et al., 2010).

## 5. Conclusiones

El ovario de *Mabuya* sp produce progesterona en el cuerpo lúteo y los folículos previtelogénicos en las hembras gestantes; esta producción es máxima al inicio de la gestación, disminuyendo drásticamente en la gestación media en relación directa con el proceso de luteólisis.

Se determinó la presencia de receptores de progesterona (PR) durante la gestación en los mismos tejidos donde se produce la progesterona, de manera que se puede sugerir una función autocrina reguladora de la producción de Pg.

Los folículos atrésicos no parecen ser una fuente ovárica alterna de Pg en *Mabuya* sp. No se obtuvo ninguna evidencia de la producción de Pg o sus receptores en los folículos atrésicos previtelogénicos en ningún momento de la gestación, ni se observaron folículos atrésicos vitelogénicos

### Bibliografía

- Al-Amri, I. S., Mahmoud, I. Y., Waring, C. P., Alkindi, A. Y., Khan, T., & Bakheit, C. (2012). Seasonal changes in plasma steroid levels in relation to ovarian steroidogenic ultrastructural features and progesterone receptors in the house gecko, *Hemidactylus flaviviridis*, in Omán. *General and Comparative Endocrinology*, 177(1):46-54.
- Andreuccetti, P., Motta, C. M., & Filosa, S. (1990). Regulation of oocyte number during oocyte differentiation in the lizard *Podarcis sicula*. *Cell differentiation and Development*, 29(2):129-141.
- Badir, N. (1967). Structure and function of corpus luteum during gestation in the viviparous lizard *Chalcides ocellatus*. *Anatomischer Anzeiger*, 122(1):1-10.
- Blackburn, D. G. (1982). Evolutionary origins of viviparity in the Reptilia. I. Sauria. *Amphibia-Reptilia*, 3(2):185-205.
- Blackburn, D. G. (1992). Convergent evolution of viviparity, matrotrophy, and specializations for fetal nutrition in reptiles and other vertebrates. *American Zoologist* 32(2):313-321.
- Blackburn, D. G. (1998). Reconstructing the evolution of viviparity and placentation. *Journal of Theoretical Biology*, 192(2):183-190.

- Blackburn, D. G. (2000). Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 127(4):391–409
- Blackburn, D. G. (2006). Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs* 20(1):131–146.
- Blackburn, D. G., & Vitt, L. J. (1992). Reproduction in viviparous South American lizards of the genus *Mabuya*. In *Reproductive Biology of South American Vertebrates* (pp. 150-164). Springer New York.
- Blackburn, D. G., & Stewart, J. R. (2011). Viviparity and placentation in snakes. *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, 9:119-181.
- Blackburn, D. G. (2015). Evolution of vertebrate viviparity and specializations for fetal nutrition: a quantitative and qualitative analysis. *Journal of Morphology*, 276(8):961-990.
- Brannian, J. D., Griffin, F., Papkoff, H., & Terranova, P. F. (1988). Short and long phases of progesterone secretion during the oestrous cycle of the African elephant (*Loxodonta africana*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 84(1):357-365.

- Bennett, E. J., & Jones, S. M. (2002). Interrelationships among plasma progesterone concentrations, luteal anatomy and function, and placental ontogeny during gestation in a viviparous lizard (*Niveoscincus metallicus*: Scincidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 131(3):647-656.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Bradshaw, D., & Shine, R. (2001). Changes in plasma progesterone in relation to vitellogenesis and gestation in the viviparous snake *Vipera aspis*. *General and Comparative Endocrinology*, 121(1):84-94.
- Bourne, A. R., (1981). Progesterone like activity in the plasma of the viviparous skink, *Trachidosaurus rugosus* (stump-tailed lizard). *Proceedings of the Melbourne Herpetological Symposium 1981*; 81, 17:24-27.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-254.
- Brandley, M. C., Young, R. L., Warren, D. L., Thompson, M. B., & Wagner, G. P. (2012). Uterine gene expression in the live-bearing lizard, *Chalcides ocellatus*, reveals convergence of squamate reptile and mammalian pregnancy mechanisms. *Genome Biology and Evolution*, 4(3):394-411.

- Bulfon, M., & Bee de Speroni, N. (2009). Análisis estructural e inmunohistoquímico de la atresia folicular de *Vanellus chilensis* (Charadriidae) e *Himantopus melanurus* (Recurvirostridae). *Revista Peruana de Biología*, 16(2):169-174.
- Cai, Z., & Stocco, C. (2005). Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology*, 146(12):5522-5532.
- Callard, I. P., Fileti, L. A., Perez, L. E., Sorbera, L. A., Giannoukos, G., Klosterman, L. L., & McCracken, J. A. (1992). Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. *American Zoologist*, 32(2):264-275.
- Dauphin-Villemant, C., & Xavier, F. (1987). Nychthemeral variations of plasma corticosteroids in captive female *Lacerta vivipara* Jacquin: influence of stress and reproductive state. *General and Comparative Endocrinology*, 67(3):292-302.
- Dufaure, J. P., & Hubert, J. (1961). Table De Developpement Du Lezard Vivipare-Lacerta (Zootoca) Vivipara Jacquin. *Archives D Anatomie Microscopique Et De Morphologie Experimentale*, 50(3):309-328.
- Farag, A. (1983). Histology of the ovary of the viviparous Wiegman's skink *Mabuya brevicollis* during its gestation period. *Annales de Zootechnie (Agra)*, 20:147-165.

- Fergusson, B., & Bradshaw, S. D. (1991). Plasma arginine vasotocin, progesterone, and luteal development during pregnancy in the viviparous lizard *Tiliqua rugosa*. *General and Comparative Endocrinology*, 82(1):140-151.
- Gemmell, R. T. (1995). A comparative study of the corpus luteum. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(3):303-312.
- Gómez, D., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2004). Ovarian histology of the placentotrophic *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology*, 259(1):90-105.
- Guarino, F. M., Paulesu, L., Cardone, A., Bellini, L., Ghiara, G., & Angelini, F. (1998). Endocrine Activity of the Corpus Luteum and Placenta during Pregnancy in *Chalcides chalcides* (Reptilia, Squamata). *General and Comparative Endocrinology*, 111(3):261-270.
- Guillette Jr, L. J., Speilvogel S. S., & Moore, F. L. (1981). Luteal development, placentation and plasma progesterone concentration in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. *General and Comparative Endocrinology*, 43(1):20-29.
- Guillette Jr, L. J. (1985). The evolution of egg retention in lizards: A Physiological model. In: G. Gordon, R. Shine and H. Ehmann, eds. *Biology of Australasian Frogs and Reptiles*, 379-386.
- Guraya S. S. (1989). Ovarian follicles in reptiles and birds. Springer-Verlag, Berlin, p.p 287.

- Heulin, B., Osenegg-Leconte, K., & Michel, D. (1997). Demography of a bimodal reproductive species of lizard (*Lacerta vivipara*): survival and density characteristics of oviparous populations. *Herpetologica*, 432-444.
- Ho, S. M., Danko, D., & Callard, I. P. (1981). Effect of exogenous estradiol-17 $\beta$  on plasma vitellogenin levels in male and female *Chrysemys* and its modulation by testosterone and progesterone. *General and Comparative Endocrinology*, 43(4):413-421.
- Holt, J. A. (1989). Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 40(2):201-208.
- Jeréz, A., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2001). The allantoplacenta of *Mabuya mabouya* (Sauria, Scincidae). *Journal of Morphology*, 249(2):132-146.
- Jones, R. E., Guillette Jr, J. L. (1982). Hormonal control of oviposition and parturition in lizards. *Herpetologica*, 38:80-93.
- Jones, R. E., & Baxter, D. C. (1991). Gestation, with emphasis on corpus luteum biology, placentation, and parturition. *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*, 4(Part A):205-302.

- Jones, S. M., & Swain, R. (1996). Annual reproductive cycle and annual cycles of reproductive hormones in plasma of female of *Niveoscincus metallicus* (Scincidae) from Tasmania. *Journal of Herpetology*, 30:140–146.
- Jones, S. M., Wapstra, E., Swain, R. (1997). Asynchronous male and female gonadal cycles and plasma steroid concentrations in a viviparous lizard, *Niveoscincus ocellatus* (Scincidae), from Tasmania. *General and Comparative Endocrinology*, 108(2):271-281.
- Jones, S. M., & Swain, R. 2000. Effects of exogenous FSH on follicular recruitment in a viviparous lizard *Niveoscincus metallicus* (Scincidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 127(4):487-493.
- Kime, D. E. (1987). The Steroids. In I. Chester-Jones, P. M. Ingleton, & J. G. Phillips (Eds.), “*Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology*” (pp. 3–56). New York and London: Plenum Press.
- Kimmins, S., & Mac-Laren, L. A. (2001). Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*, 22:742-8.
- Kleis-San Francisco, S. M., & Callard, I. P. (1986). Identification of a putative progesterone receptor in the oviduct of a viviparous watersnake (*Nerodia*). *General and Comparative Endocrinology*, 61(3):490-498

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Martínez-Torres, M., Hernández-Caballero, M. E., Álvarez-Rodríguez, C., Luis-Díaz, J. A., & Ortiz-López, G. (2003). Luteal development and progesterone levels during pregnancy of the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae). *General and Comparative Endocrinology*, 132(1):55-65.
- Martínez-Torres M., Álvarez-Rodríguez C., & Andrade-Terrazas J. (2006). Características de las membranas extraembrionarias desalojadas por los críos de *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia, Anguidae) después del nacimiento. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 2006, 51:401-406.
- Martínez-Torres, M., Hernández-Caballero, M. E., Luis-Díaz, J. A., Ortiz-López, G., Cárdenas-León, M., & Moreno-Fierros, L. (2010). Effects of luteectomy in early pregnancy on the maintenance of gestation and plasma progesterone concentrations in the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1):19.
- Martínez-Torres, M., Pérez-Armendariz, E. M., & Caballero, M. E. H. (2012). Histochemical activity of 5-4-isomerase-3-B hydroxy steroid dehydrogenase in the ovary of the viviparous Mexican lizard *Sceloporus mucronatus* (Reptilia: Prhynosomatidae) and

interrelationship with progesterone levels during pregnancy. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 1(1):17-21

Méndez de la Cruz, F., Guillette Jr, L. J., Villagrán-Santa Cruz M. (1993). Differential atresia of ovarian follicles and its effect on the clutch size of two populations of the viviparous lizard *Sceloporus mucronatus*. *Functional Ecology*, 7:535–540.

Miralles, A., Fuenmayor, G. R., Bonillo, C., Schargel, W. E., Barros, T., García-Perez, J. E., & Barrio-Amorós, C. L. (2009). Molecular systematics of Caribbean skinks of the genus *Mabuya* (Reptilia, Scincidae), with descriptions of two new species from Venezuela. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156(3):598-616.

Nishiyama, T., Tsumagari, S., Ito, M., Kimura, J., Watanabe, G., Taya, K., & Takeishi, M. (1999). Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. *Anatomia Histologia Embryologia*, 28(2):125-130.

Norris, D. O. (2007). *Vertebrate Endocrinology*. San Diego and London: Academic Press. New York.

Norris, D. O., & Lopez, K. H. (2011). The Endocrinology of the Mammalian Ovary. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, 5:59.

- Painter, D. L., & Moore, M. C. (2005). Steroid hormone metabolism by the chorioallantoic placenta of the mountain spiny lizard *Sceloporus jarrovi* as a possible mechanism for buffering maternal-fetal hormone exchange. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(3):364-372.
- Pinto-Sánchez, N. R., Calderón-Espinosa, M. L., Miralles, A., Crawford, A. J., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2015). Molecular phylogenetics and biogeography of the Neotropical skink genus *Mabuya* Fitzinger (Squamata: Scincidae) with emphasis on Colombian populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 93:188-211.
- Qiang, W. E. N. G., Medan, M. S., LongQuan, R. E. N., Watanabe, G., Tsubota, T., & Kazuyoshi, T. A. Y. A. (2005). Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the corpus luteum and placenta of the Japanese Shiba goat. *Journal of Reproduction and Development*, 51(2):247-252.
- Qualls, C. P., & Shine, R. (1998). Costs of reproduction in conspecific oviparous and viviparous lizards, *Lerista bougainvillii*. *Oikos* 82:539–551.
- Ramírez-Pinilla, M. P., Serrano, V. H., & Galeano, J. C. (2002). Annual reproductive activity of *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Herpetology*, 36(4):667-677.

- Ramírez-Pinilla, M. P., De Pérez, G., & Carreño-Escobar, J. F. (2006). Allantoplacental ultrastructure of an Andean population of *Mabuya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology*, 267(10):1227-1247.
- Ramírez-Pinilla, M. P., Rueda, E. D., & Stashenko, E. (2011). Transplacental nutrient transfer during gestation in the Andean lizard *Mabuya* sp. (Squamata, Scincidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 181(2):249-268.
- Ramírez-Pinilla, M. P. (2014). Biología reproductiva y placentotrofia en lagartijas del género *Mabuya*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38:106-117.
- Riley, D., Reese, J. C., & Callard, I. P. (1988). Hepatic progesterone receptors: Characterization in the turtle *Chrysemys picta*. *Endocrinology* 123(2):1195–1201.
- Roberts, R. M., Green, J. A., & Schulz, L. C. (2016). The evolution of the placenta. *Reproduction*, 152(5), R179-R189
- Robinson, R. S.; Mann, G. E.; Lamming, G. E. & Wathes, D. C. (2001). Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples through the oestrus cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, 122(6): 965-79.

- Ryan, K. J. (1971). Endocrine control of gestational length: a time to be born. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 109(2):299-306.
- Sadjia, H., Gernigon-Spychalowicz, T., & Exbrayat, J. M. (2007). Immunolocalization of estrogens and progesterone receptors within the ovary of the lizard *Uromastix acanthinura* from vitellogenesis to rest season. *Folia Histochemica et Cytobiologica. Supplement*, 45(1):23-27.
- Saidapur, S. K. (1978). Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *International Review of Cytology*, 54:225-244.
- Sekharappa, B. M., & Devaraj-Sarkar, H. B., (1978). Role of corpora lutea in skink *Mabuya carinata*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 16(10):1097-1098.
- Shemesh, M. (1990). Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: a personal review. *Reproduction, Fertility and Development*, 2(2):129-135.
- Sinervo, B., & Licht, P., 1991. Hormonal and physiological control of clutch size, egg size, and egg shape in side-blotched lizards (*Uta stansburiana*): constraints on the evolution of lizard life histories. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 257(2):252-264.

- Sites Jr, J. W., Reeder, T. W., & Wiens, J. J. (2011). Phylogenetic insights on evolutionary novelties in lizards and snakes: sex, birth, bodies, niches, and venom. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42:227-244.
- Smith, S. A., & Shine, R., (1997). Intraspecific variation in reproductive mode within the scincid lizard *Saiphos equalis*. *Australian Journal of Zoology* 45:435–445.
- Sugino, N., Telleria, C. M., & Gibori, G. (1997). Progesterone inhibits  $20\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase expression in the rat corpus luteum through the glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, 138(10): 4497-4500.
- Veith, W. J. (1974). Reproductive biology of *Chamaeleo pumilus pumilus* with special reference to the role of the corpus luteum and progesterone. *African Zoology*, 9(2):161-183.
- Vrcibradic, D., & Rocha, C. F. D. (2011). An overview of female reproductive traits in South American *Mabuya* (Squamata, Scincidae), with emphasis on brood size and its correlates. *Journal of Natural History*, 45(13-14):813-825.
- Villagrán-Santa Cruz M., 1989. Desarrollo embrionario y placentación y su relación con el cuerpo lúteo y la atresia folicular en *Sceloporus mucronatus* y *Sceloporus gramicus* (Sauria: Iguanidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM., p. 158.

Villagrán-Santa Cruz, M. & Mendez de la Cruz, F. R. (1999). Corpus luteum through the gestation of *Sceloporus palaciosi* (Sauria: Phrynosomatidae). *Copeia* 1999:214–218.

Williams, S. P., & Sigler, P. B. (1998). Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature*, 393(6683):392-396.

Xavier, F. (1987). Functional morphology and regulation of the corpus luteum. In *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles* (pp. 241-282). Springer US.