

**Determinación de los niveles de hormonas esteroides sexuales en plasma de hembras de
Mabuya sp. en diferentes estados de actividad reproductiva**

Salomé Rodríguez Chaparro

Trabajo de grado para optar por el título de Bióloga

Directora

Martha Patricia Ramírez Pinilla

Doctora en Ciencias Biológicas

Tutor

Heriberto Barbosa Moyano

Biólogo y Veterinario

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

Gracias es una palabra muy pequeña para expresar todo lo que siento en este momento, han sido más de 5 años aprendiendo, cometiendo errores, corrigiendo y creciendo como futura bióloga. Todo este camino lo he recorrido junto a mi familia, amigas, amigos, compañeros de laboratorio y profesores, sin todos ellos no hubiera podido ser posible aprender todo lo que sé hoy en día.

Realmente me siento muy agradecida con la vida por haberme ayudado a elegir esta carrera, creo que no habría sido mejor la experiencia de pregrado si hubiera estado en otra. Gracias y mil gracias a todos los profesores y profesoras que contribuyeron con mi formación profesional. Gracias por todas esas salidas de campo en las que aprendí a ver el lado mágico de cada cosa, porque sí, como lo acabo de decir, la biología te enseña a ver lo magnífico de cada ente que te rodea.

Gracias a mis padres por estar siempre conmigo -a pesar de la distancia- por ayudarme a persistir y no desistir, por apoyarme en todo lo que necesité, por hacerme caer en cuenta de mis errores y sobre todo por guiarme por este largo transitar que estoy terminando de recorrer.

Gracias a mi hermana por su compañía, por sus sorpresas, por sus locuras, por las alegrías que me regaló en esta ciudad y por hacerme caer en cuenta de lo positivo en cada situación.

Gracias a todos mis amigos y amigas que estuvieron siempre, sin su compañía, enseñanzas, apoyo e incondicionalidad no hubiera sido lo mismo. En especial a Juli, Ley, Richi y María por ayudarme a muestrear.

Gracias a la profesora Martha Patricia Ramírez Pinilla por su constancia en querer enseñarme y corregirme, por dejarme hacer parte del laboratorio de Biología Reproductiva y por la excelente ayuda brindada en mi proyecto de grado. Igualmente, agradezco a mi tutor Heriberto Barbosa, por las enseñanzas y por su contribución en la realización de este trabajo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Nathaly Díaz y Elson Meneses porque me colaboraron durante las disecciones y me enseñaron a hacerlas, gracias a los colectores de las *Mabuya* y al grupo de investigación “Inmunología y Epidemiología Molecular” de la Facultad de Salud por el préstamo de los equipos para lograr realizar los ensayos inmunoenzimáticos.

Por último, quiero dejar plasmada una de mis frases favoritas de Marie Curie: “Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo”. Nunca dejen sus objetivos a un lado, todos podemos lograr lo que nos propongamos. Muchas gracias Universidad Industrial de Santander.

Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos	12
1.1 General	12
1.2 Específicos	12
2. Marco Teórico.....	13
2.1 Viviparidad en lagartos	13
2.2 <i>Mabuya</i>	13
2.3 Hormonas esteroides en lagartos	14
2.3.1 Estradiol (E ₂).....	14
2.3.2 Progesterona (P ₄)	15
2.3.3 Testosterona	17
3. Materiales y métodos	17
3.1 Área de estudio	17
3.2 Individuos y toma de sangre	18
3.3 Determinación de estados reproductivos	18
3.4 Inmunoensayo enzimático (ELISA)	19
3.5 Análisis estadísticos	20
4. Resultados	21

5. Discusión..... 25

6. Conclusiones 30

Referencias Bibliográficas 31

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estados reproductivos de las hembras de Mabuya sp.	22
Figura 2. Gestación avanzada y tardía en las hembras de Mabuya sp.	23
Figura 3. Concentraciones plasmáticas hormonales de estradiol y progesterona en hembras en diferentes estados reproductivos de Mabuya sp.	24
Figura 4. Concentraciones plasmáticas hormonales de testosterona	24

Resumen

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES EN PLASMA DE HEMBRAS DE *Mabuya* sp. EN DIFERENTES ESTADOS DE ACTIVIDAD REPRODUCTIVA*

AUTOR: SALOMÉ RODRÍGUEZ CHAPARRO**

PALABRAS CLAVES: Viviparidad, hormonas esteroides sexuales (testosterona, estradiol, progesterona), ensayo inmunoenzimático.

Estudios han demostrado que la variación de hormonas esteroides sexuales, principalmente estradiol (E₂), progesterona (P₄) y testosterona (T) regulan el ciclo reproductivo de los vertebrados, presentándose diferencias en el tiempo y en las concentraciones de producción entre especies. Esta investigación determina mediante ensayo inmunoenzimático las concentraciones de estas tres hormonas en el ciclo reproductivo de una especie vivípara matrotrofica del género *Mabuya*. La cuantificación de los niveles hormonales se realizó a partir de muestras de plasma y el estado reproductivo de los individuos se determinó mediante disección ventral. Los estados evaluados dentro del ciclo de las hembras de esta especie incluyeron hembras previtelogénicas, vitelogénicas, recién preñadas, en gestación temprana, media y avanzada. Las concentraciones plasmáticas de E₂, P₄ y T fueron comparadas entre los estados reproductivos del total de hembras evaluadas de *Mabuya* sp. y posteriormente se compararon con niveles hormonales reportados para otras especies ovíparas y vivíparas de reptiles y con mamíferos euterios. Se encontró que el E₂ tiene las concentraciones más altas en las hembras vitelogénicas en relación con su función básica relacionada con la maduración de los folículos ováricos; su concentración disminuye durante la gestación, pero se incrementa en su última fase cuando se inicia un nuevo evento de vitelogénesis. La P₄ se encuentra en concentraciones altas durante la gestación y tiene un pico en las hembras en gestación temprana, este resultado se relaciona con su función de inhibir la motilidad del miometrio para el mantenimiento de los embriones en desarrollo en el oviducto materno. La T se encuentra en concentraciones mucho más bajas que en los machos, sin embargo, aumenta cuando las hembras están en gestación temprana. Los resultados de las concentraciones de hormonas esteroides sexuales en plasma obtenidos para *Mabuya* sp. se asemejan a la fisiología conocida y reportada en vertebrados, incluyendo reptiles y mamíferos.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias Basicas. Escuela de Biología Directora: Martha Patricia Ramírez Pinilla Tutor Heriberto Barbosa Moyano

Abstract

TITLE: DETERMINATION OF THE LEVELS OF SEXUAL STEROID HORMONES IN PLASMA OF *Mabuya* sp. FEMALE IN DIFFERENT STATES OF REPRODUCTIVE ACTIVITY*

AUTHOR: SALOMÉ RODRÍGUEZ CHAPARRO**

KEYWORDS: Viviparity, sex steroid hormones, testosterone, estradiol, progesterone, immunoenzymatic assay.

Studies have shown that the variation of sex steroid hormones, mainly estradiol (E₂), progesterone (P₄) and testosterone (T) regulate the reproductive cycle of vertebrates, showing differences in time and in production of concentrations between species. Through an enzyme-linked immunoenzymatic assay (ELISA) this study determines the concentrations of these three hormones throughout the reproductive cycle of a matrotrophic viviparous species of a lizard of the genus *Mabuya*. The quantification of the hormonal levels was made from plasma samples and the reproductive status of the individuals was determined by ventral dissection and observation at the macroscopic level. The reproductive stages evaluated within the reproductive cycle of the females of this species included previtellogenic, vitellogenic, newly pregnant females, and in early, middle and advanced gestation. Plasma concentrations of E₂, P₄ and T were compared between the reproductive stages of the total females evaluated from *Mabuya* sp. and then they were compared with hormonal levels found in other oviparous and viviparous species of reptiles and eutherian mammals. E₂ has the highest concentrations in vitellogenic females in relation to its basic function related to the maturation of ovarian follicles; its concentration decreases during gestation but increases in its last phase when a new vitellogenesis event begins. P₄ is found in high concentrations during pregnancy and has a peak in females at early gestation; this result is related to its function of inhibit myometrial motility for the maintenance of developing embryos in the maternal oviduct. The T is found in concentrations much lower than in males, however, it increases when the females are at early pregnancy. The results of plasma sex steroid hormone concentrations obtained for *Mabuya* sp. are similar to known and reported physiology in vertebrates, including lizards and mammals.

* Project of grade

** Faculty of Sciences Basics. School of Biology. Directora: Martha Patricia Ramírez Pinilla Tutor Heriberto Barbosa Moyano

Introducción

Mabuya es un género de lagartos neotropicales perteneciente a la familia Scincidae; el género exhibe características reproductivas únicas dentro de los escamados que convergen con los mamíferos euterios, y que incluyen: viviparidad con una gestación prolongada (entre 9 y 10 meses), un ovocito microlecito y la existencia de transferencia maternal de todos los nutrientes durante el desarrollo embrionario intrauterino (matrotrofia) a través de la formación de una placenta (placentotrofia obligada) que es morfológica y fisiológicamente la más compleja conocida dentro de los reptiles (Blackburn & Beuchat, 1984, Blackburn & Vitt 1992, Jerez & Ramírez-Pinilla 2001, 2003; Ramírez-Pinilla *et al.*, 2006, 2011).

Las hormonas sexuales, testosterona (T), estradiol (E2) y progesterona (P4), son las encargadas de regular la actividad reproductiva en vertebrados y pueden ser cuantificadas a partir de muestras de sangre, proporcionando una medida de las concentraciones de esteroides sexuales circulantes en plasma (Norris & Carr, 2013). Para reptiles se han realizado estudios de cuantificación de dichas hormonas en especies ovíparas (p. ej. en *Hemidactylus flaviviridis*, *Pogona barbata*, *Sphenodon punctatus punctatus*, *Anolis carolinensis*, *Eublepharis macularius*, Al-Amri *et al.*, 2013; Amey & Whittier, 2000; Brown *et al.*, 1994; Lovern & Wade, 2003; Rhen *et al.*, 2000) y en especies vivíparas lecitotróficas (p. ej. en *Tiliqua nigrolutea* y *Sceloporus jarrovi*, Edwards *et al.*, 2002; Painter *et al.*, 2005). Sin embargo, se desconocen estudios sobre la estimación de los niveles de hormonas esteroides sexuales y su relación con la actividad reproductiva en hembras de especies de *Mabuya*. En este trabajo se analiza la variación de la concentración de hormonas esteroides

sexuales circulantes en plasma durante el ciclo reproductivo de las hembras de una población de este clado.

1. Objetivos

1.1 General

- Determinar los niveles hormonales plasmáticos de testosterona (T), estradiol (E₂) y progesterona (P₄) en diferentes estados reproductivos de hembras de *Mabuya* sp.

1.2 Específicos

- Determinar los estados reproductivos de los individuos colectados.
- Cuantificar las concentraciones a nivel plasmático de estradiol (E₂), progesterona (P₄) y testosterona (T) en cada uno de los estados reproductivos de las hembras de *Mabuya* sp.
- Comparar las concentraciones encontradas en cada estado reproductivo de las hembras de *Mabuya* sp. con patrones conocidos para otros vertebrados vivíparos.

2. Marco Teórico

2.1 Viviparidad en lagartos

Existe un número considerable de escamados vivíparos, a pesar de que la mayoría ponen huevos. La viviparidad se ha originado independientemente 108 veces en reptiles (Blackburn, 2006), asociándose la evolución de este modo reproductivo con la retención del huevo y la pérdida gradual de la cáscara. Para unas pocas especies además, hay reducción de la cantidad de yema del huevo que se asocia con la transferencia de nutrientes para el desarrollo embrionario a través de la placenta (Wooding *et al.*, 2010).

2.2 *Mabuya*

El género *Mabuya* comprende lagartos vivíparos con una alta complejidad placentaria que permite la transferencia masiva, desde el oviducto materno, de todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de los embriones durante los 9-10 meses de gestación (Blackburn & Vitt, 1992).

En Colombia, se conocen diez especies para el género *Mabuya*, 2 insulares y 8 continentales; mediante análisis moleculares, se ha descubierto que existen al menos 4 candidatas a nuevas especies de *Mabuya* (Pinto *et al.*, 2015), por ello, estas últimas se mantienen bajo la nominación de *Mabuya* sp. Para las poblaciones del valle del Magdalena (candidata a especie IV, Pinto *et al.*, 2015), en todos los meses del año se encuentran hembras preñadas con embriones en diferentes

estados de desarrollo, por tanto, se considera que su reproducción es continua y asincrónica (Ramírez-Pinilla, 2014).

2.3 Hormonas esteroides en lagartos

Los lagartos constituyen un modelo interesante de investigación para endocrinólogos comparativos. Los estudios en ellos han conducido con frecuencia a nuevos conocimientos sobre las vías de regulación hormonal y asociaciones entre las variables fisiológicas de tipo endocrina y comportamental (Lovern, 2011).

Varios estudios se han realizado para cuantificar las hormonas esteroides en lagartos hembras a lo largo del ciclo reproductivo (Al-Amri *et al.*, 2012; Amey & Whittier, 2000; Brown *et al.*, 1994; Girling & Jones, 2003; Rhen *et al.*, 2000; Shanbhag *et al.*, 2001). Los cerebros de reptiles contienen muchas variantes de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) aunque todavía no se ha identificado una hormona inhibidora de la liberación de la misma. Se ha sugerido que los escamados parecen tener sólo una única gonadotropina (GTH) que combina la actividad de las hormonas folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH), lo que representa una divergencia del patrón típico en los vertebrados tetrápodos (Jones, 2011).

2.3.1 Estradiol (E₂) Todos los reptiles, vivíparos u ovíparos, desarrollan verdaderos cuerpos lúteos secretorios. Por lo tanto, la ovulación marca una transición de la fase vitelogénica dominada por estrógenos a la fase luteínica dominada por la progesterona (Albergotti & Guillette, 2011).

El desarrollo folicular implica típicamente la deposición de grandes cantidades de yema para la nutrición embrionaria. En los reptiles ovíparos, el estradiol (E₂) producido por el folículo maduro

estimula la vitelogénesis y la actividad de las glándulas de la cáscara en el oviducto. Por lo tanto, se registran concentraciones plasmáticas altas de esta hormona durante la fase vitelogénica del ciclo reproductivo (Jones, 2011; Ramírez-Pinilla *et al.*, 2015).

Estudios comparativos entre hembras de *Zootoca vivipara* y *Zootoca vivipara carniolica*, representantes de especies vivíparas y ovíparas, respectivamente, no han encontrado diferencias significativas en la concentración de estradiol, esta hormona durante la vitelogénesis tardía es mayor que durante la gestación temprana (Heulin *et al.*, 2008).

La mayoría de los lagartos vivíparos son lecitotróficos, producen huevos con gran cantidad de yema que sustenta el desarrollo embrionario durante la gestación. Sin embargo, en *Mabuya*, la cantidad de yema acumulada durante la vitelogénesis es mínima (Vieira *et al.*, 2010), produciéndose un huevo microlecito de manera que casi el 100% de los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario son provistos por la madre gestante a través de la placenta (Ramírez-Pinilla, 2006, Ramírez Pinilla *et al.*, 2011). En los reptiles vivíparos, la vitelogénesis se caracteriza por el aumento de las concentraciones plasmáticas de E₂. La vitelogénesis en *Mabuya* es muy corta, lo que sugeriría que las concentraciones de E₂ son menores o se producen asimismo en un corto periodo de tiempo durante su ciclo reproductivo.

2.3.2 Progesterona (P₄) El papel que desempeña la progesterona (P₄) está relacionado con la inhibición de la movilidad uterina que permite la retención del huevo/embrión durante la gravidez/gestación y, para algunas especies, la inhibición de la síntesis de vitelogenina hepática asociada con la disminución de la vitelogénesis y evolución de la placentación. También induce la ovulación y se relaciona con la embriogénesis y el desarrollo de la placenta (Callard *et al.*, 1992).

Los niveles altos de P₄ plasmática generalmente se relacionan con la actividad de los cuerpos lúteos (Bennett & Jones, 2002; Fergusson & Bradshaw, 1991; Fleming, 1994), sin embargo, la producción de P₄ puede darse también por el tejido ovárico no luteal. Los folículos ováricos están limitados por la disponibilidad de precursores esteroides y los cuerpos lúteos, por su duración (inicio del proceso de luteólisis) que varía entre especies. En ciertas especies vivíparas, la producción de esta hormona por los tejidos placentarios puede reemplazar a la de los cuerpos lúteos (Guillette *et al.*, 1981).

Después de la ovulación en los escamados vivíparos, la gestación es soportada por la P₄, y los cuerpos lúteos permanecen activos durante más tiempo que en los ovíparos (Albergotti & Guillette, 2011). Los escamados ovíparos presentan característicamente un pico post ovulatorio de corta duración en las concentraciones plasmáticas de P₄. Las concentraciones disminuyen después de la luteólisis y la oviposición, que ocurre típicamente después de que aproximadamente un tercio o la mitad del desarrollo embrionario haya tenido lugar en el útero (Albergotti & Guillette, 2011).

En *Calotes versicolor* se observó que después de la ovulación, cuando los huevos tienen cáscara, la concentración de P₄ obtiene los valores más altos comparados con los demás estados. Adicionalmente, al tiempo de oviposición la concentración de P₄ cae para facilitar el crecimiento de un segundo conjunto de folículos vitelogénicos y la postura (Shanbhag *et al.*, 2001).

Para los escamados vivíparos se ha demostrado que los picos de concentración plasmática de P₄ en las hembras permanecen altos durante la gestación temprana (Girling & Jones 2003). Sin embargo, la producción de P₄ durante la gestación varía ampliamente entre especies vivíparas de escamados (Jones & Baxter, 1991). En *Niveoscincus metallicus* (Jones & Swain, 1996) y *Niveoscincus ocellatus* (Jones *et al.*, 1997) la concentración plasmática de P₄ es alta durante la gestación temprana, disminuyendo a medida que se completa el desarrollo embrionario. En

especies como *Sceloporus jarrovi* las concentraciones plasmáticas de P₄ permanecen altas, incluso después de la regresión del cuerpo lúteo (Guillette *et al.*, 1991), sugiriendo una fuente alternativa de la hormona que sustenta el resto de la gestación.

Ensayos *in vitro* han demostrado la producción de P₄ en presencia de pregnenolona en tejidos uterinos, oviductales y en membranas extraembrionarias, sugiriendo la capacidad de estos tejidos como fuentes alternativas para la producción de P₄ (Girling & Jones, 2003).

2.3.3 Testosterona La vitelogénesis tardía y la ovulación se asocian con concentraciones plasmáticas altas de testosterona (T) en las hembras de escamados (Jones, 2011). Esta hormona es sintetizada en el ovario de los reptiles (Edwards *et al.*, 2001), y sus concentraciones plasmáticas varían significativamente a través del ciclo reproductivo femenino (Callard & Ryan, 1978; Edwards & Jones, 2001), proporcionando evidencia circunstancial de un papel fisiológico para esta hormona.

3. Materiales y métodos

3.1 Área de estudio

Se colectaron 26 hembras de *Mabuya* sp (candidata especie IV de Pinto *et al.*, 2015) en diferentes estados reproductivos en los municipios de Floridablanca, Piedecuesta, Guapotá, El Hato y San

Vicente de Chucurí (todos ubicados en el departamento Santander) mediante el método “Búsqueda por encuentro visual” (Crump & Scott, 1994), entre los meses de enero y diciembre de 2017.

3.2 Individuos y toma de sangre

Los individuos se atraparon con la mano y se guardaron en bolsas de tela para ser transportados al laboratorio. Los lagartos se midieron con un calibrador (0,02 mm de precisión) para determinar la longitud rostro-cloacal (LRC). Posteriormente, se les administró una inyección con dosis letal de roxicaina al 2% en la cavidad ubicada entre las escamas parietales. Se extrajeron las muestras de sangre mediante decapitación, de acuerdo con la metodología de extracción de Al-Amri (com. pers.), que permite la obtención de un mayor volumen de sangre. Las muestras de sangre se almacenaron en tubos microcapilares heparinizados; se realizó la centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga de capilares de marca *Aotucrit Ultra3*, de esta forma se obtuvo la fracción del plasma. Este último se guardó en 2 tubos Eppendorf por hembra (uno con 200 µl para los ensayos inmunoenzimáticos y el otro con 20 µl para liofilizar). Las muestras de plasma se mantuvieron en una nevera a -70°C para conservarlas hasta el momento de su uso.

3.3 Determinación de estados reproductivos

Luego de la extracción de sangre se procedió a realizar disección ventral en forma de bolsillo para determinar a nivel macroscópico el estado del ciclo reproductivo en el que se encontraban (siguiendo la clasificación de Vrcibradic & Rocha, 1998). Se tomaron registros fotográficos y se

contaron y midieron las cámaras de incubación. El estado de desarrollo embrionario en estas cámaras se determinó siguiendo la tabla de desarrollo de Dufaure y Hubert (1961).

Las hembras se clasificaron como sigue: (1) no reproductivas o inmaduras, (2) vitelogénicas, con folículos con yema y sin huevos establecidos en los oviductos, (3) recién preñadas, huevos oviductales (1-2 mm de diámetro), (4) gestación temprana, cámaras embrionarias que miden entre 2 y 5 mm de diámetro (5) gestación avanzada, sacos embrionarios de más de 5 mm, con embriones en desarrollo avanzado y (6) gestantes parto, fetos bien formados (variación de la clasificación de Vrcibradic & Rocha, 1998).

Posteriormente, los cuerpos de las madres fueron fijados en formol 10% y preservados en etanol 70% e ingresaron a la Colección Herpetológica de la Universidad Industrial de Santander. Los embriones, los ovarios y el resto de los tractos reproductivos se guardaron en paraformaldehído, en RNAlater o fueron congelados para la realización de otros estudios.

3.4 Inmunoensayo enzimático (ELISA)

El kit con el que se hizo el ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) fue el Accu-Bind ELISA Microwells (relaciona la absorbancia de forma inversamente proporcional a la concentración hormonal y tiene anticuerpos monoclonales de ratón IgG) para cada una de las hormonas a evaluar.

Se siguieron los pasos que se presentan en cada uno de sus manuales (ver referencias). Se utilizaron 7 calibradores con concentración conocida para cada una de las hormonas a evaluar con el fin de hacer la curva de concentración y extrapolarla con las absorbancias procedentes de las muestras. Para cada pozo, se leyeron las absorbancias con una longitud de onda entre 450 y 595

nm con el Microplate Reader (iMark™ Bio-Rad) del Laboratorio Central de Investigaciones de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Se calculó la concentración hormonal en unidades de ng/ml de cada muestra.

Con las absorbancias y concentraciones de los calibradores obtenidas en cada pozo, se realizaron gráficas punto a punto para las tres hormonas, hallando sus respectivas ecuaciones lineales para poder calcular la concentración de las muestras. Después de ello, se reemplazó la absorbancia de cada una de las muestras en la ecuación en la que representara el valor de los dos puntos dentro de los cuales estuviera el valor de la absorbancia a reemplazar.

Para hallar la concentración hormonal de T, E₂ y P₄ en cada estado reproductivo, se realizaron tres ensayos inmunoenzimáticos para cada hormona por individuo. Adicionalmente, se hicieron ensayos de testosterona en machos juveniles y adultos para después comparar esos resultados con los obtenidos en hembras para la misma hormona.

3.5 Análisis estadísticos

Los valores de las concentraciones hormonales en unidades de ng/ml de P₄, E₂ y T determinados por el método ELISA para cada estado reproductivo fueron expresados en valores de media con su respectiva desviación estándar (σ).

Para cada hormona, se evaluó si existían diferencias entre las medias de las concentraciones obtenidas entre estados reproductivos mediante una prueba de Kruskal-Wallis a través del software *R studio V: 0.98.1103*, seguidas por el test de Dunn que determinó entre cuales grupos era que existían las diferencias de las medias.

Para los machos, las diferencias entre las medias de las concentraciones obtenidas entre estados reproductivos, se obtuvieron mediante una prueba de t de Student a través del mismo software.

4. Resultados

Los estados reproductivos de las hembras de *Mabuya* sp. se observan en las figuras 1 y 2. Las concentraciones de hormonas sexuales esteroideas por estado reproductivo se observan en las figuras 3 y 4.

Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de E₂ entre estados reproductivos evidenciándose el nivel más alto en las hembras vitelogénicas. La concentración de esta hormona en plasma aumenta con el transcurso de la gestación, siendo alta al final de esta (Fig. 3a).

Existen diferencias significativas en las concentraciones de P₄ entre los estados reproductivos de las hembras (Fig. 3b). En las inmaduras y vitelogénicas el nivel de P₄ es muy bajo, el pico en la concentración de esta hormona ocurre en la gestación temprana, pero se mantienen concentraciones durante toda la gestación.

Los niveles de testosterona son muy bajos en las hembras durante todo el ciclo reproductivo (menos de 1 ng/mL); sin embargo, se observan diferencias significativas entre los estados reproductivos (Fig. 4a). Observando las concentraciones de T en machos se encuentra que éstas son sustancialmente mayores a las de las hembras y que hay una diferencia significativa entre las concentraciones plasmáticas de T entre machos inmaduros y maduros (Fig. 4b).

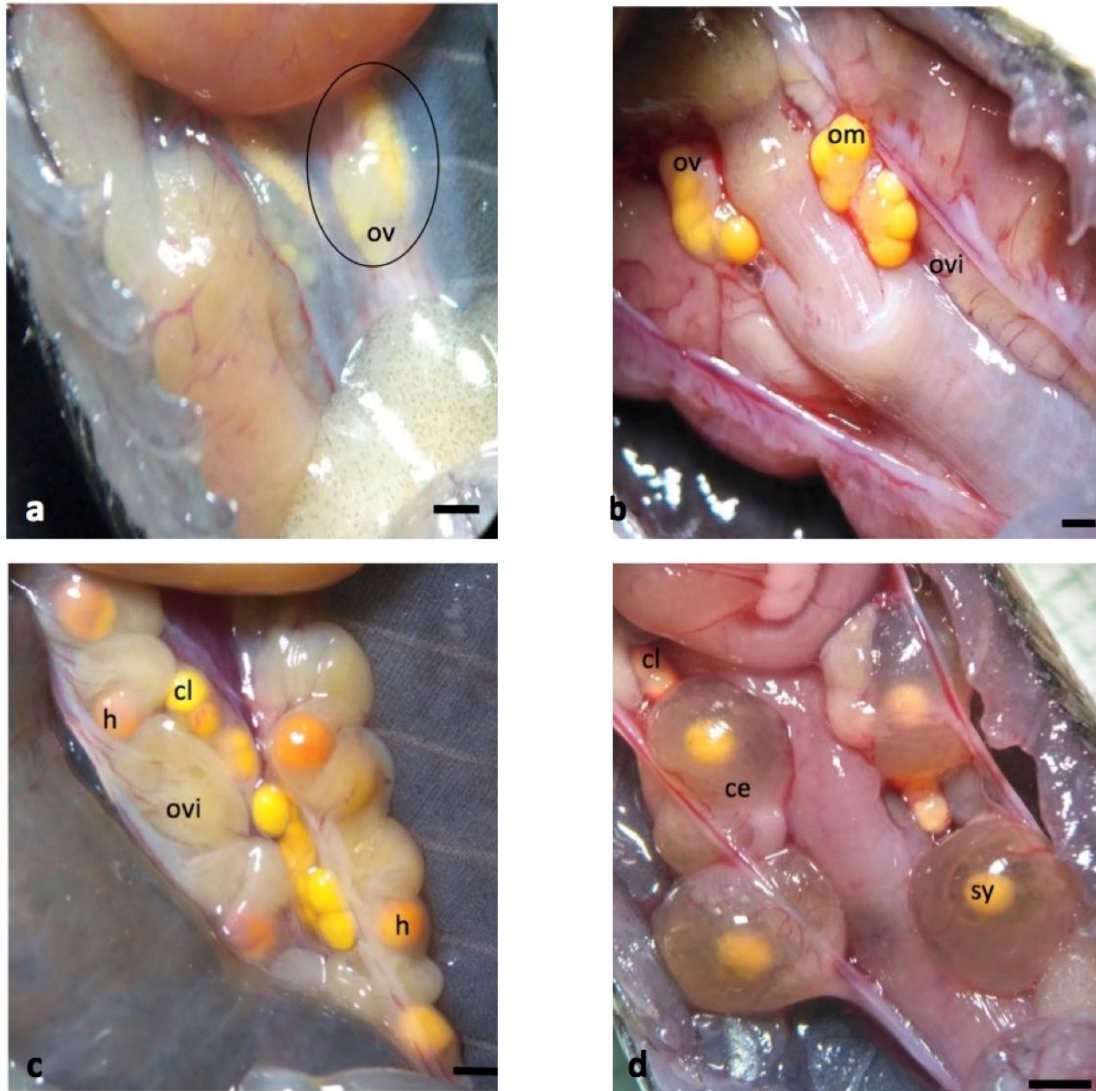


Figura 1. Estados reproductivos de las hembras de *Mabuya* sp.

a. Hembra inmadura, los folículos ováricos no tienen yema y no existen huevos establecidos en los oviductos. (ov) Ovario. Barra de escala: 1 mm; b. Hembra vitelogénica, los folículos son amarillos por la presencia de yema, tienen un diámetro entre 0,8 y 2 mm. No existen huevos establecidos en los oviductos (ov) ovario, (om) ovocitos microlecitos de aprox. 2 mm, (ovi) oviducto. Barra de escala: 2 mm; c. Hembra recién preñada, en los ovarios los folículos ováricos son pequeños y se observan cuerpos lúteos, en los oviductos se encuentran los huevos oviductales de 2 mm aproximadamente. (cl) cuerpos lúteos, (h) huevos oviductales (ovi) oviducto. Barra de escala: 2 mm. d. Hembra en gestación temprana. Las cámaras embrionarias que miden entre 3 y 5 mm de diámetro, contienen embriones en faríngrula y hasta el estado 29 de desarrollo embrionario. (cl) cuerpo lúteo, (ce) cámaras embrionarias de aprox. 2.5 mm, (sy) gotas de lípidos en el saco de la yema. Barra de escala: 1 mm.

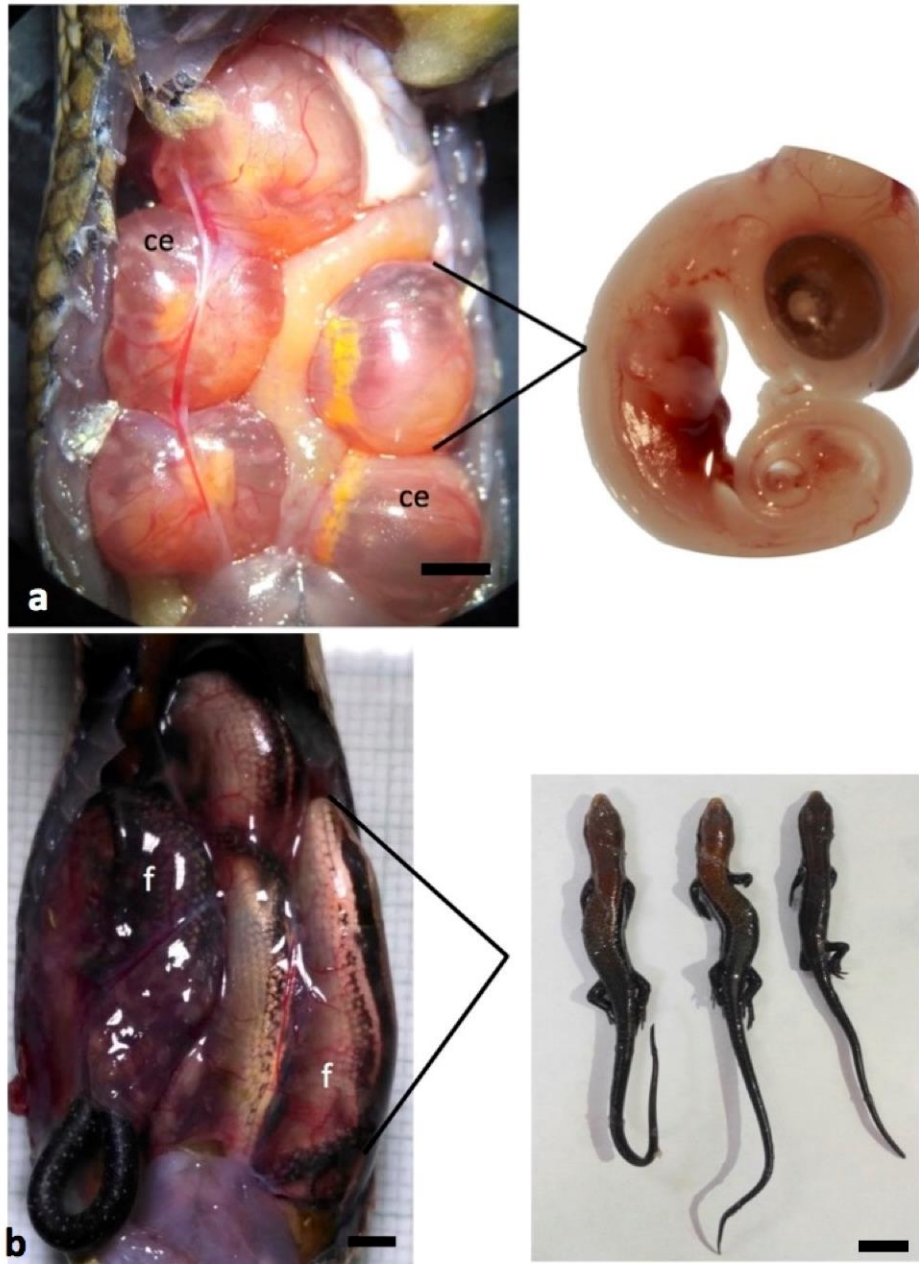


Figura 2. Gestación avanzada y tardía en las hembras de *Mabuya* sp.

a. Hembra en gestación media, las cámaras embrionarias tienen más de 5 mm de diámetro, con embriones en avanzado desarrollo embrionario (30-38). (ce) cámaras embrionarias. Barra de escala: 1 mm. A la derecha, embrión en estado 33 de desarrollo. **b.** Hembra en gestación tardía. Los fetos se encuentran en las últimas etapas de desarrollo, poseen pigmentación, escamas y todas sus extremidades bien formadas. (f) Fetos en estado 40 de desarrollo embrionario. Barra de escala: 50 mm. A la derecha, fetos extraídos de sus cámaras embrionarias. Barra de escala: 1 mm.

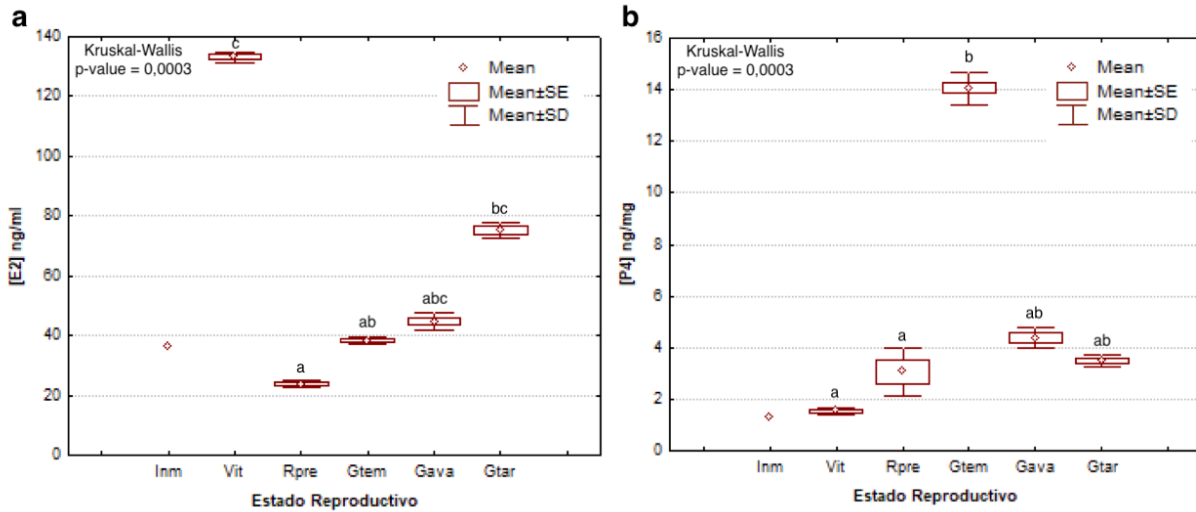


Figura 3. Concentraciones plasmáticas hormonales de estradiol y progesterona en hembras en diferentes estados reproductivos de *Mabuya* sp.

(a) Estradiol; (b) Progesterona. Inm, inmadura; Vit, vitelogénica; Rpre; recién preñada; Gtem, gestación temprana; Gava, gestación avanzada; Gtar, gestación tardía. Se muestra el valor de *p* obtenido en el test de Kruskal-Wallis. Las distintas letras de cada caja indican las diferencias entre estados halladas con el test de Dunn.

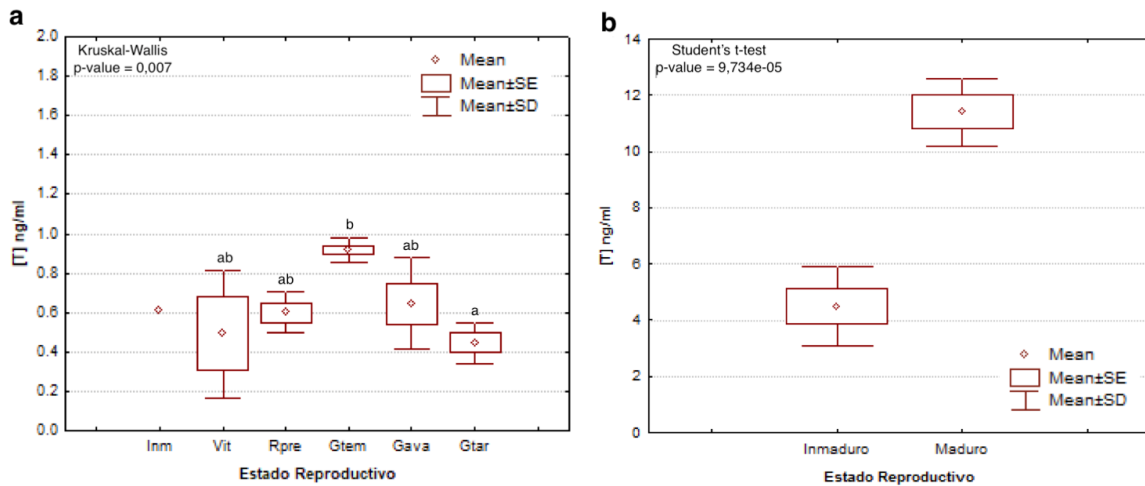


Figura 4. Concentraciones plasmáticas hormonales de testosterona

En (a) hembras en diferentes estados reproductivos: Inm, inmadura; Vit, vitelogénica; Rpre; recién preñada; Gtem, gestación temprana; Gava, gestación avanzada; Gtar, gestación tardía; y en (b) machos inmaduros y maduros de *Mabuya* sp. **a.** Se muestra el valor de *p* obtenido en el test de Kruskal-Wallis. Las distintas letras de cada caja indican las diferencias entre estados halladas con el test de Dunn; **b.** Se muestra el valor de *p* obtenido en la prueba t de Student.

5. Discusión

Las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides sexuales (E_2 , P_4 y T) varían entre los diferentes estados reproductivos de las hembras de *Mabuya* sp. reflejando un patrón común a otros vertebrados.

La concentración más alta de E_2 se evidencia en las hembras vitelogénicas, esta hormona está relacionada con el crecimiento folicular y precisamente es la encargada de estimular la vitelogénesis (Bona-Gallo *et al.*, 1980; Joss, 1985; Moore & Crews, 1986; Van Wyk, 1994; Jones & Swain, 1997). A lo largo de la gestación la concentración de E_2 va aumentando, debido a que en esta especie ocurre una vitelogénesis nuevamente durante la gestación tardía (Ramírez-Pinilla *et al.*, 2002) quizá inducida por los niveles de esta hormona, indicando así, que después de que las hembras paren ya están listas para la siguiente ovulación (Fig 3a). La vitelogénesis en *Mabuya* sp. es muy corta, lo que revela que las concentraciones de E_2 se producen en un periodo de tiempo corto durante su ciclo reproductivo, para luego disminuir drásticamente cuando empieza el periodo de gestación.

Resultados similares se encontraron en el lagarto vivíparo *Tiliqua nigrolutea*, especie en la que se evidencia que durante el periodo vitelogénico la concentración de estrógenos aumenta y alcanza su punto máximo antes de la ovulación (Edwards & Jones, 2001). Para esta especie, también se ha postulado que existe un estrógeno alternativo, lo que sugiere que se necesita más trabajo sobre formas variantes de estrógenos plasmáticos en lagartos hembras (Edwards & Davies, 2002). Así por ejemplo, en *Pogona barbata*, lagarto ovíparo, no se ha detectado E_2 en ninguna de las hembras,

lo que quiere decir que la vitelogénesis no está regulada por esta hormona en esta especie sino por un estrógeno alternativo que aún no se ha identificado (Amey & Whittier, 2000). En *Uromastix hardwicki*, las concentraciones de estradiol son más altas en el tejido lúteo que en los tejidos foliculares, lo que sugiere que los niveles plasmáticos de esteroides durante la gravidez se deben principalmente a la actividad esteroideogénica del cuerpo lúteo (Arslan *et al.*, 1978).

Asimismo, en serpientes la concentración de E₂ aumenta durante la fase vitelogénica y después de la ovulación disminuye (en la cobra *Naja naja*, Bona-Gallo *et al.*, 1980 y en la serpiente *Vipera aspis*, Bonnet *et al.*, 1994).

La concentración de progesterona en los dos primeros estados reproductivos (inmaduro y vitelogénico) en *Mabuya* sp. es muy baja porque esta hormona aunque es producida en los ovarios por los folículos, es mayormente sintetizada en los cuerpos lúteos, y por tanto aumenta a partir de la ovulación, cuando inicia la preñez. Su función es la retención oviductal de los huevos/embriones al inhibir la contracción de la musculatura del oviducto (Guillette *et al.*, 1981; Guillette & Jones, 1985). En *Mabuya* sp. el pico hormonal se observa en la gestación temprana cuando los cuerpos lúteos están activos o iniciando la luteólisis. La concentración de P₄ se mantiene durante la gestación (Fig 3b) aunque los cuerpos lúteos se degraden a partir de la gastrulación (Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004), lo que sugiere un recurso alternativo de esta hormona, posiblemente placentario como recientemente se ha evidenciado (Duarte *et al.*, 2018).

Para escamados se ha observado que además de los folículos ováricos, la P₄ es principalmente producida por el cuerpo lúteo (Callard & Ryan, 1978, Chan *et al.*, 1973, Klicka & Mahmoud, 1977; Callard *et al.*, 1992; Xavier, 1987), sin embargo, en algunas especies las concentraciones plasmáticas de esta hormona permanecen altas incluso después de la regresión de los cuerpos lúteos (*Sceloporus jarrovi*, Guillette *et al.*, 1981) por lo cual, se postulan fuentes alternativas de

esta hormona. En *Sceloporus jarrovi* se cree que la fuente alternativa son los folículos atrésicos o los tejidos placentales (Guillette *et al.*, 1981) y en *Chalcides chalcides* se detectó a la placenta como productora de progesterona en las últimas etapas de gestación (Guarino *et al.*, 1998).

Los patrones de concentraciones plasmáticas de P₄ asociados con la gestación varían ampliamente entre las especies de escamados vivíparos (Jones & Baxter, 1991). En los lagartos *Tiliqua rugosa* (Fergusson & Bradshaw, 1991; Bourne *et al.*, 1986) y *Tiliqua nigrolutea* (Edwards & Jones, 2001), los niveles de esta hormona son más altos durante la gestación media, sin embargo, en *Sceloporus jarrovi*, el pico mayor de P₄ ocurre al final de la gestación, después de la degradación del cuerpo lúteo (Guillette *et al.*, 1981); mientras que en *Niveoscincus microlepidotus*, la concentración plasmática de P₄ alcanza su nivel máximo en las hembras preovulatorias y permanece alta durante la gestación temprana (Girling, 2003). En *Niveoscincus metallicus*, las concentraciones plasmáticas aumentan marcadamente después de la ovulación y se mantienen altas a través de las etapas embrionarias cercanas al parto (Stewart & Thompson, 1994; Swain & Jones, 1997).

En cuanto a las serpientes vivíparas, en *Natrix sipedon pictiventris*, esta hormona alcanza niveles máximos al principio de la gestación, cuando los folículos están pequeños (Chan *et al.*, 1973), mientras que en *Thamnophis sirtalis parietalis*, las concentraciones de P₄ se mantienen bajas o no detectables durante la gestación (Whittier *et al.*, 1987).

En mamíferos con gestación prolongada, como la vaca (gestación de 283 días en promedio), se ha encontrado que la placenta empieza a producir P₄ después de la degradación del cuerpo lúteo, durante el final de la gestación tardía (Schuler & Hoffmann, 1994). Igualmente, en el caballo (gestación de 335 días en promedio), la placenta produce esta hormona desde la mitad de la gestación hasta su final (Han *et al.*, 1995). Sin embargo, para la cabra *Capra aegagrus hircus*

(gestación de 150 días en promedio), la fuente principal de progesterona durante la gestación es el cuerpo lúteo y no la placenta (Weng *et al.*, 2005). Por lo que se podría decir que, en mamíferos euterios con periodos de gestación cortos, el cuerpo lúteo es el principal tejido productor de P₄ y no la placenta. Paralelamente, cuando la gestación es más larga que la fase luteal, se necesita una fuente alternativa que produzca la progesterona, la placenta es la que se encarga de esta función en los mamíferos (Ryan, 1971) y en *Mabuya* sp. (Duarte *et al.*, 2018).

Igualmente, en algunos lagartos ovíparos, como *Uromastix hardwicki*, se ha encontrado que el contenido de progesterona de los cuerpos lúteos presentes en los ovarios de las hembras grávidas fue varias veces mayor que la concentración de esta hormona en el tejido folicular preovulatorio (Arslan *et al.*, 1978). En cambio, en *Pogona barbata*, existe mayor concentración de P₄ en las hembras vitelogénicas, comparadas con las hembras en gestación, lo que evidencia la función de esta hormona en la maduración folicular y la ovulación para esta especie (Amey & Whittier, 2000).

La T plasmática no sólo es de origen ovárico, también se origina de las glándulas suprarrenales (Wade, 1997) o su equivalente en reptiles (glándula interrenal). La testosterona es precursora en la síntesis de estrógenos (Staub & De Beer, 1997). Se observó en *Mabuya* sp. que la concentración de testosterona es muy baja y variable significativamente entre estados reproductivos; es durante la vitelogénesis cuando se elevan sustancialmente los niveles plasmáticos. Esto sugiere la transformación catalítica de la testosterona folicular en E₂. Esta hormona aumenta sus concentraciones después de la ovulación y disminuye nuevamente al final de la gestación cuando inicia una nueva vitelogénesis sugiriendo de nuevo su transformación en E₂. De cualquier manera, en todos los estados del ciclo reproductivo de las hembras de *Mabuya* sp. la concentración de esta hormona es muy baja en comparación con la de los machos, tanto de los inmaduros como de los maduros y reproductivamente activos (Fig 4).

En *Tiliqua nigrolutea* la concentración de testosterona plasmática en las hembras activas reproductivamente alcanza su punto máximo en el período preovulatorio y vuelve a las concentraciones basales dos semanas después (Edwards & Jones, 2001). Esta misma hormona, aumenta durante el período de apareamiento en la serpiente vivípara *Vipera aspis* (Saint Girons *et al.*, 1993) y ocurre coincidiendo con la vitelogénesis tardía y el período de cortejo en los caimanes, *Alligator mississippiensis* (Guillette *et al.*, 1997). Adicionalmente, se sabe que la T actúa de forma sinérgica con la P₄ para inhibir la vitelogénesis inducida por el E₂ en reptiles (Ho *et al.*, 1982; Ho, 1987), de manera que las concentraciones elevadas de T plasmática pueden causar el cese de la vitelogénesis (Ho *et al.*, 1981).

En *Naja naja*, serpiente ovípara, el aumento de la concentración de testosterona plasmática se evidencia durante la fase vitelogénica, luego, esta hormona se mantiene parcialmente elevada hasta después de la oviposición. Sus niveles indican que el cuerpo lúteo permanece funcional hasta que ocurre la oviposición (Bona-Gallo *et al.*, 1980).

La concentración de T en machos de *Mabuya* sp. es mayor que en las hembras porque esta hormona es la que induce su actividad reproductiva. Los machos sexualmente inmaduros tienen una concentración menor de T al compararse con los machos maduros y reproductivamente activos, en estos la T es producida en los testículos estimulando la espermatogénesis y el crecimiento testicular.

Los datos endocrinos encontrados en reptiles vivíparos y en este caso particular en *Mabuya* sp., han demostrado un control hormonal en la reproducción similar en muchos aspectos al de los mamíferos euterios exclusivamente vivíparos (Callard & Ryan, 1978; Callard & Lance, 1977; Klicka & Mahmoud, 1977). Por lo cual, se concluye que las observaciones de esta investigación

son consistentes y siguen los patrones conocidos del control fisiológico hormonal para otros vertebrados y especies vivíparas.

6. Conclusiones

Apoyados en los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) realizados a partir de plasma de *Mabuya* sp. se encontró que el estradiol tiene sus concentraciones más altas en las hembras vitelogénicas, lo que confirma su función en el estímulo de la vitelogénesis y preparación del oviducto para recibir al huevo durante la ovulación.

La progesterona muestra su pico más alto de concentración plasmática en las hembras que se encuentran en gestación temprana, cuando se inicia la luteólisis y el relevo en su función por parte de la placenta. La función endocrina en la producción de esta hormona por parte de la placenta una vez se da la luteólisis converge con la de mamíferos euterios de gestación prolongada.

La testosterona tiene baja concentración a lo largo del ciclo reproductivo en hembras de esta especie, sin embargo, se encuentra que su variación está relacionada con su papel como precursora de la síntesis de estradiol. Adicionalmente, se demuestra que los machos poseen mayor concentración de T en cualquiera de sus estados reproductivos, comparados con las hembras.

Los resultados obtenidos en esta investigación se asemejan a los patrones conocidos de variación y función de las hormonas esteroideas sexuales (E_2 , P_4 y T) durante el ciclo reproductivo de las hembras de otros reptiles y otros vertebrados vivíparas, como los mamíferos.

Referencias Bibliográficas

- 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 Oman. *General and Comparative Endocrinology*, 177, 46-54.
- Al-Amri, I. S., Mahmoud, I. Y., Waring, C. P., Alkindi, A. Y., Khan, T., Bakheit, C., & Al-Mawali, K. M. (2013). The reproductive cycle of the male house gecko, *Hemidactylus flaviviridis*, in relation to plasma steroid concentrations, progesterone receptors, and steroidogenic ultrastructural features, in Oman. *General and Comparative Endocrinology*, 187, 23-31.
- Albergotti, L. C., & Guillette Jr, L. J. (2011). Viviparity in reptiles: evolution and reproductive endocrinology. *Hormones and Reproduction of Vertebrates: Reptiles* (pp. 247-275).
- Amey, A. P., & Whittier, J. M. (2000). Seasonal patterns of plasma steroid hormones in males and females of the bearded dragon lizard, *Pogona Barbata*. *General and Comparative Endocrinology*, 117, 335-342.
- Arslan, M., Zaidi, P., Lobo, J., Zaidi, A. A., & Qazi, M. H. (1978). Steroid levels in preovulatory and gravid lizards (*Uromastix hardwicki*). *General and Comparative Endocrinology*, 34, 300-303.
- 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, 647-656.
- Blackburn DG, Vitt LJ & Beuchat A. (1984). Eutherian like reproductive specializations in a viviparous reptile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 4860-4863.
- Blackburn, D. G., & Vitt, L. J. (1992). Reproduction in viviparous South American lizards of the genus *Mabuya*. *Reproductive biology of South American vertebrates* (pp. 150-164).

- Blackburn, D. G. (2006). Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs*, 20, 131-146.
- Bona-Gallo, A., Licht, P., MacKenzie, D. S., & Lofts, B. (1980). Annual cycles in levels of pituitary and plasma gonadotropin, gonadal steroid, and thyroid activity in the Chinese cobra (*Naja naja*). *General and Comparative Endocrinology*, 42, 477-493.
- Bonnet, X., Naulleau, G., & Mauget, R. (1994). The influence of body condition on 17 β -estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). *General and Comparative Endocrinology*, 93, 424-437.
- Bourne, A. R., Stewart, B. J., & Watson, T. G. (1986). Changes in blood progesterone concentration in the lizard *Tiliqua* (Trachydosaurus) *rugosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 84, 581-583.
- Brown, M. A., Cree, A., Daugherty, C. H., Dawkins, B. P., & Chambers, G. K. (1994). Plasma concentrations of vitellogenin and sex steroids in female tuatara (*Sphenodon punctatus punctatus*) from northern New Zealand. *General and Comparative Endocrinology*, 95, 201-212.
- Callard, I. P., & Lance, V. (1977). The control of reptilian follicular cycles. *Reproduction and evolution*, 199-210.
- Callard, G.V. & Ryan, K.J., (1978). Conversion of androgen to estrogen and other steroids in the vertebrate brain. *American Zoologist*, 18, 511-523.
- 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, 264-275.
- Chan, W. C., Zeigel, S., & Callard, I. (1973). Plasma progesterone in snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 44, 631-638.
- Crump, M. L., & Scott Jr, N. J. (1994). Visual encounter surveys. *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*, pp. 84-92.

- Duarte-Méndez, M., Quintero-Silva, J. & Ramírez-Pinilla, M.P. (2018). Immunohistochemical localization of 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase and progesterone receptors in the ovary and placenta during gestation of the placentotrophic lizard *Mabuya* sp. (Squamata: Scincidae). *General and Comparative Endocrinology* (en prensa).
- Dufaure JP & Hubert J. (1961). Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara jacquin*. *Archives D Anatomie Microscopique Et De Morphologie Experimentale* 50, 309-328.
- Edwards, A. & Jones, S.M., (2001). Changes in plasma progesterone, estrogen, and testosterone concentrations throughout the reproductive cycle in female viviparous blue-tongued skinks, *Tiliqua nigrolutea* (Scincidae), in Tasmania. *General and Comparative Endocrinology*, 122, 260-269.
- Edwards, A., Jones, S. M., & Davies, N. W. (2002). A possible alternative to 17 β -estradiol in a viviparous lizard, *Tiliqua nigrolutea*. *General and Comparative Endocrinology*, 129, 114-121.
- 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, 140-151.
- Flemming, A. F. (1994). Seasonal variation in plasma and corpus luteum oestradiol-17 β and progesterone concentrations of the lizard *Cordylus p. polyzonus* (Sauria: Cordylidae). *African Zoology*, 29, 87-92.
- Girling, J. E., & Jones, S. M. (2003). In vitro progesterone production by maternal and embryonic tissues during gestation in the southern snow skink (*Niveoscincus microlepidotus*). *General and Comparative Endocrinology*, 133, 100-108.
- Gómez, D. & Ramírez-Pinilla, MP. (2004) Ovarian histology of the placentotrophic *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal Morphology*, 259, 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, 261-270.

- Guillette, Jr., L. J., Spielvogel, S., & Moore, F. L. (1981). Luteal development, placentation, and plasma progesterone concentration in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. *General and Comparative Endocrinology*, *43*, 20-29.
- Guillette, L. J., Jr., & Jones, R. E. (1985). Ovarian, oviducal, and placental morphology of the reproductively bimodal lizard, *Sceloporus aeneus*. *Journal Morphology*, *184*, 85-98.
- Guillette, L. J., DeMarco, V., & Palmer, B. D. (1991). Exogenous progesterone or indomethacin delays parturition in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. *General and Comparative Endocrinology*, *81*, 105-112.
- Guillette, L. J., Jr., Woodward, A. R., Crain, D. A., Masson, G. R., Palmer, B. D., Cox, S. M., You-Xiang, Q., & Orlando, E. F. (1997). The reproductive cycle of the female American alligator (*Alligator mississippiensis*). *General and Comparative Endocrinology*, *108*, 87-101.
- Han, X., Rossdale, P. D., Ousey, J., Holdstock, N., Allen, W. R., Silver, M. & Ensor, C. M. (1995). Localisation of 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase (PGDH) and steroidogenic enzymes in the equine placenta. *Equine veterinary journal*, *27*, 334-339.
- Heulin, B., Garnier, D., Surget-Groba, Y., & Deunff, J. (2008). Plasma levels of estradiol during vitellogenesis and early gestation in oviparous and viviparous *Lacerta* (*Zootoca*) *vivipara*. *Amphibia-Reptilia*, *29*, 135-139.
- Ho, S.-M., Danko, D., & Callard, I. P. (1981). Effects of exogenous estradiol-17 β on plasma vitellogenin levels in male and female *Chrysemys* and its modulation by testosterone and progesterone. *General and Comparative Endocrinology*. *43*, 413-421.
- Ho, S.-M., Kleis, S., McPherson, R., Heisermann, G. J., & Callard, I. P. (1982). Regulation of vitellogenesis in reptiles. *Herpetologica*, *38*, 40-50.
- Ho, S. M. (1987). Endocrinology of vitellogenesis. *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles*, pp. 145-169.
- Jerez A. & Ramírez-Pinilla MP. (2001). The allantoplacenta of *Mabuya mabouya* (Sauria, Scincidae). *Journal of Morphology*, *249*, 132-146.

- Jones, R. E., & Baxter, D. C. (1991). Gestation, with emphasis on corpus luteum biology, placentation, and parturition. *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications*, 4, 205-302.
- Jones, S. M., & Swain, R. (1996). Annual reproductive cycle and annual cycles of reproductive hormones in plasma of female *Niveoscincus metallicus* (Scincidae) from Tasmania. *Journal of Herpetology*, 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, 271-281.
- Jones, S. M. (2011). Hormonal regulation of ovarian function in reptiles. *Hormones and Reproduction of Vertebrates: Reptiles*, pp. 89-115.
- Joss, J. M. (1985). Ovarian steroid production in oviparous lizards of the genus *Lampropholis* (Scincidae). *Biology of Australasian Frogs and Reptiles*, pp. 319-326.
- Klicka, J. & Mahmoud, I.Y. (1977). The effects of hormones on the reproductive physiology of the painted turtle, *Chrysemys picta*. *General and Comparative Endocrinology*, 31, 407-413.
- Lovern, M. B., & Wade, J. (2003). Sex steroids in green anoles (*Anolis carolinensis*): uncoupled maternal plasma and yolking follicle concentrations, potential embryonic steroidogenesis, and evolutionary implications. *General and Comparative Endocrinology*, 134, 109-115.
- Lovern, M. B. (2011). Hormones and reproductive cycles in lizards. *Hormones and reproduction of vertebrates: reptiles*, pp. 321-353.
- Moore, M. C., & Crews, D. (1986). Sex steroid hormones in natural populations of a sexual whiptail lizard *Cnemidophorus inornatus*, a direct evolutionary ancestor of a unisexual parthenogen. *General and Comparative Endocrinology*, 63, 424-430.
- Norris, D. O., & Carr, J. A. (2013). *Vertebrate endocrinology*, pp. 41-85.

- 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, 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.
- Ramírez-Pinilla, M. P. (2006). Placental transfer of nutrients during gestation in an Andean population of the highly matrotrophic lizard genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). *Herpetological Monographs*, 20, 194-204.
- 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.
- Ramírez-Pinilla, M. P., Serrano, V. H., & Galeano, J. C. (2002). Annual reproductive activity of *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Herpetology*, 36, 667-677.
- 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, 249-268.
- Ramírez-Pinilla, M.P., de Pérez, G.R. & Alvarado-Ramírez, C. (2015). Oogenesis and the ovarian cycle. *Reproductive Biology and Phylogeny of Lizards and Tuatara*, 213-252.
- Rhen, T., Sakata, J. T., Zeller, M., & Crews, D. (2000). Sex steroid levels across the reproductive cycle of female leopard geckos, *Eublepharis macularius*, from different incubation temperatures. *General and Comparative Endocrinology*, 118, 322-331.
- Ryan, K. J. (1971). Endocrine control of gestational length: a time to be born. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 109, 299-306.

- Saint Girons, H., Bradshaw, S. D., & Bradshaw, F. J. (1993). Sexual activity and plasma levels of sex steroids in the aspic viper *Vipera aspis* L. (Reptilia, Viperidae). *General and Comparative Endocrinology*, *91*, 287-297.
- Shanbhag, B. A., Radder, R. S., & Saidapur, S. K. (2001). Plasma progesterone levels and luteal activity during gestation and prolonged oviductal egg retention in a tropical lizard, *Calotes versicolor*. *General and Comparative Endocrinology*, *123*, 73-79.
- Schuler, G., Hartung, F., & Hoffmann, B. (1994). Investigations on the use of C-21- steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *102*, 169-174.
- Sistema de Prueba Estradiol (E2) Accu-Bind ELISA Microwells, disponible en internet:[http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/endocrinologia/Estradiol%20\(E2\)%20ELISA%20AccuBind-4925300.pdf](http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/endocrinologia/Estradiol%20(E2)%20ELISA%20AccuBind-4925300.pdf) Visto el 01/06/2017.
- Sistema de Prueba Progesterona Accu-Bind ELISA Microwells, disponible en internet:<http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/endocrinologia/Progesterona%20ELISA%20AccuBind-4825300.pdf> Visto el 01/06/2017.
- Sistema de Prueba Testosterona Accu-Bind ELISA Microwells, disponible en internet:<http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/endocrinologia/Testosterona%20ELISA%20AccuBind-3725300.pdf> Visto el 01/06/2017.
- Staub, N. L., & De Beer, M. (1997). The role of androgens in female vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, *108*, 1-24.
- Stewart, J.R. & Thompson, M.B. (1994). Placental structure of the Australian lizard, *Niveoscincus metallicus* (Squamata: Scincidae). *Journal of Morphology*, *220*, 223-236.
- Swain, R. & Jones, S.M. (1997). Maternal-fetal transfer of H-3-labelled leucine in the viviparous lizard *Niveoscincus metallicus* (Scincidae: Lygosominae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *277*, 139-145.
- Tripathy, M., & Rai, U. (2017). Temporal expression and gonadotropic regulation of aromatase and estrogen receptors in the ovary of wall lizard, *Hemidactylus flaviviridis*: Correlation with plasma estradiol and ovarian follicular development. *Steroids*, *128*, 23-31.

- Van Wyk, J. H. (1994). Physiological changes during the female reproductive cycle of the viviparous lizard *Cordylus giganteus* (Sauria: Cordylidae). *Herpetologica*, 50, 480-493.
- Vieira, S., de Pérez, G. R. & Ramírez-Pinilla, M. P. (2010). Ultrastructure of the ovarian follicles in the placentotrophic andean lizard of the genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). *Journal of Morphology*, 271, 738-749.
- Vrcibradic, D., & Rocha, C. F. D. (1998). Reproductive cycle and life-history traits of the viviparous skink *Mabuya frenata* in southeastern Brazil. *Copeia*, 3, 612-619.
- Wade, J. (1997). Androgen metabolism in the brain of the green anole lizard (*Anolis carolinensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 106, 127-137.
- Weng, Q., Medan, M. S., Ren, L., Watanabe, G., Tsubota, T. & Taya, K. (2005). Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the corpus luteum and placenta of the Japanese Shiba goat. *Journal of Reproduction and Development*, 51, 247-252.
- Whittier, J.M., Mason, R.T. & Crews, D., (1987). Plasma steroid hormone levels of female red-sided garter snakes, *Thamnophis sirtalis parietalis*: relationship to mating and gestation. *General and Comparative Endocrinology*, 67, 33-43.
- Wooding, F. B. P., Ramirez-Pinilla, M. P., & Forhead, A. S. (2010). Functional studies of the placenta of the lizard *Mabuya sp.* (Scincidae) using immunocytochemistry. *Placenta*, 31, 675-685.
- Xavier, F. (1987). Functional morphology and regulation of the corpus luteum. *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles*, pp. 241-282.