

Detección inmunohistoquímica de progesterona y receptores de la progesterona en la placenta de *Mabuya* sp. (Squamata: Scincidae)

Melissa Duarte Méndez

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

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios y mis padres por brindarme la vida y la oportunidad de llegar hasta aquí. A mi hermano, abuela y amigos ya que con ellos encuentro el apoyo para no rendirme. A mí querida amiga y compañera Jennifer Quintero por la gran ayuda y compañía durante el proyecto. A Ezequiel González y Elson Meneses por la ayuda prestada en la colecta de los individuos. A todos los profesores que han participado en mi formación académica, especialmente quiero agradecerle a Martha Patricia Ramírez Pinilla por permitirme hacer parte de un excelente grupo de trabajo y laboratorio.

Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Marco teórico	16
1.1 Viviparidad en lagartos	16
1.2 Progesterona y receptores de progesterona.....	16
1.3 Placenta	19
1.4 <i>Mabuya sp.</i>	22
1.5 Ovario de <i>Mabuya sp.</i>	23
1.6 Detección de Progesterona.....	24
1.7 Inmunolocalización.....	25
2. Materiales y métodos	26
2.1 Extracción de muestras	26
2.2 Inmunohistoquímica	27
2.3 Western blot	28
3. Resultados.....	29
3.1 Inicio de la gestación (Huevos oviductales, n=3)	32
3.2. Gestación temprana (Néurula-Farínula, n=2)	36
3.3. Gestación media (Estados 34-35, n=3)	42
3.4. Gestación tardía (estados 39-40, n=3)	49
3.5. <i>Westernblot</i> (3 β HSD)	56

4. Discusión.....	61
5. Conclusiones.....	67
Bibliografía.....	69

Lista de figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Cortes de tejido hepático de <i>Hemidactylus frenatus</i> con controles negativos para AB.	30
<i>Figura 2.</i> Fotografías al estereoscopio de las cámaras embrionarias de <i>Mabuya</i> sp. desde gestación temprana al estado pre-parto.	31
<i>Figura 3.</i> Diagrama de un huevo oviductal de <i>Mabuya</i> sp.	33
<i>Figura 4.</i> Huevo oviductal de <i>Mabuya</i> sp.	34
<i>Figura 5.</i> Corte de huevo oviductal de <i>Mabuya</i> sp. positivo para PR.	35
<i>Figura 6.</i> Diagrama modificado de Jerez y Ramírez-Pinilla (2003), de una cámara embrionaria en estado del desarrollo néurula de <i>Mabuya</i> sp.	37
<i>Figura 7.</i> Cortes histológicos de la placenta de un embrión de <i>Mabuya</i> sp. en néurula, tratada con inmunohistoquímica de AB para presencia de 3 β HSD, el resultado es negativo.	38
<i>Figura 8.</i> Cortes histológicos de la placenta de un embrión de <i>Mabuya</i> sp. en néurula, tratada con inmunohistoquímica de AB (A-D) y FITC (E y F) para presencia de PR, el resultado es positivo.	39
<i>Figura 9.</i> Diagrama de una cámara embrionaria en estado del desarrollo faríngrula de <i>Mabuya</i> sp.	40
<i>Figura 10.</i> Cortes histológicos de placenta de un embrión en faríngrula de <i>Mabuya</i> sp., tratada con inmunohistoquímica de AB y FITC; resultado negativo para presencia de 3 β HSD.	41
<i>Figura 11.</i> Diagrama de una cámara embrionaria en gestación media (estados 34-36) <i>Mabuya</i> sp.	45
<i>Figura 12.</i> Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación media de <i>Mabuya</i> sp. (estados 34-36), tratada con inmunohistoquímica de AB para presencia de 3 β HSD.	46
<i>Figura 13.</i> Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación media de <i>Mabuya</i> sp. (estados 34-36), tratada con inmunohistoquímica de FITC para presencia de 3 β HSD.	47

<i>Figura 14.</i> Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación media de <i>Mabuya sp.</i> (estados 34-36), tratados con inmunohistoquímica de AB para presencia de PR.	48
<i>Figura 15.</i> Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación media de <i>Mabuya sp.</i> (estados 34-36), tratada con inmunohistoquímica de FITC para presencia de PR.	49
<i>Figura 16.</i> Diagrama de una cámara embrionaria en gestación tardía de <i>Mabuya sp.</i>	52
<i>Figura 17.</i> Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación tardía y final de <i>Mabuya sp.</i> (estados 39 y 40), tratados con inmunohistoquímica de AB para presencia de 3 β HSD.	53
<i>Figura 18.</i> Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación tardía de <i>Mabuya sp.</i> (estados 39 y 40), tratados con inmunohistoquímica de FITC para presencia de 3 β HSD.....	54
<i>Figura 19.</i> Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación tardía y final de <i>Mabuya sp.</i> (estados 39 y 40), tratados con inmunohistoquímica de AB y FITC para presencia de PR.....	55
<i>Figura 20.</i> Western blot con anticuerpo monoclonal para 3 β HSD y anticuerpo secundario FITC en los extractos de placenta y ovario en <i>Mabuya sp.</i>	57
<i>Figura 21.</i> Picos de intensidad de las bandas del western blot con anticuerpo monoclonal para 3 β HSD y anticuerpo secundario FITC en los extractos de placenta y ovario de <i>Mabuya sp.</i>	58
<i>Figura 22.</i> Histograma de intensidad de las bandas del <i>Western blot</i> para 3 β HSD en los extractos de placenta y ovario de <i>Mabuya sp.</i> en diferentes etapas de la gestación.	59

Lista de tablas**Pág.**

Tabla 1. <i>Resumen de los elementos uterino y embrionarios presencia (+) o ausencia (-) de enzima 3β HSD y receptores de progesterona PR en Mabuya sp. (++) Mayor concentración, (+) Menor concentración.</i>	60
--	----

Resumen

Título: Detección inmunohistoquímica de progesterona y receptores de la progesterona en la placenta de *Mabuya* sp. (Squamata: Scincidae)*

Autor: Melissa Duarte Méndez**

Palabras claves: Inmunohistoquímica, Anticuerpos, Viviparidad, Placenta, Progesterona.

Descripción

En la transición oviparidad-viviparidad la progesterona (P4) tiene un rol fundamental en la retención de los embriones en el oviducto, participando en la inhibición de la movilidad uterina. El cuerpo lúteo es el tejido encargado de la producción de P4, sin embargo se ha visto que existe luteólisis temprana en una especie vivípara matrotrofica del género *Mabuya*, se ha hipotetizado la existencia de una fuente alterna de P4 que permite el mantenimiento de la gestación. Este estudio localiza la producción de P4 (mediante la detección de la enzima 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa-3 β HSD) y sus receptores (PR) en la placenta de hembras en diferentes estados de gestación. Para la detección de P4 y PR se obtuvieron cortes al micrótopo de los tejidos embebidos en parafina y fueron incubados con el anticuerpo primario de ratón específico para cada uno, se usaron secciones control y blanco. Para determinar y cuantificar la presencia de la enzima 3 β HSD en la placenta se evaluaron muestras en diferentes estados de gestación utilizando la técnica de *Western blot* con un anticuerpo primario monoclonal específico para 3 β HSD y un anticuerpo secundario fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína-FITC). Se encontró que la placenta produce P4 en el epitelio uterino y las células coriónicas del placentoma, paraplacentoma, areolas coriónicas y las placas absortivas laterales en la alantoplacenta desde la gestación media y hasta el final de la gestación. Se localizaron los PR en tejido conectivo y epitelial del útero durante toda la gestación. Se concluye que hay producción placentaria de P4, ésta ocurre en tejidos específicos de ambos componentes de la placenta, de manera similar y convergente con algunos mamíferos euterios.

* Trabajo de grado

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

Abstract

Title: Immunohistochemical detection of progesterone and progesterone receptors in the placenta of *Mabuya* sp. (Squamata: Scincidae)*

Author: Melissa Duarte Méndez**

Key words: Immunohistochemistry, Antibodies, Viviparity, Placenta, Progesterone.

Description

On the oviparity-viviparity transition, progesterone (P4) plays a key role in the retention of embryos in the oviduct, taking part in the inhibition of uterine mobility. The corpus luteum is the tissue responsible for the production of P4, however it has been seen that there is early luteolysis in a highly matrotrophic viviparous species of the genus *Mabuya*, therefore the existence of an alternative source of P4 has been hypothesized that allows the maintenance of gestation. This study determines and localizes the production of P4 and its receptors (PR) in the placenta of females in different stages of gestation by immunohistochemistry. For the detection of P4 and PR it were obtained microtome sections from the tissues embeded in paraffin and incubated with the mouse primary antibody specific for each, control and target sections were used. To determine and quantify the presence of the enzyme in the placenta, samples were evaluated in three stages of gestation (early, middle, late) using the Western blot technique with a primary monoclonal antibody specific for 3 β HSD and a fluorescent secondary antibody (FITC) which discloses the antibody-antigen binding. It was found that placenta produces P4 in the uterine epithelium and the chorionic giant cells of placentoma, paraplacentoma, chorionic areolas, and lateral absorptive plaques in the allantoplacenta from mid-gestation to the end of gestation. PR were localized in connective and epithelial tissue of the uterine component during early, middle and, to a lesser extent, late gestation. It is concluded that there is placental production of P4, this occurs in specific tissues of both components of the placenta, similarly and convergent with some eutherian mammals.

* Degree Work.

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

Introducción

El incremento en circulación de los esteroides sexuales primarios, estradiol (E), testosterona (T) y progesterona (P4) se ha relacionado con la actividad reproductiva en hembras (Callard *et al.*, 1991). El ovario es la glándula endocrina primaria que secreta los esteroides sexuales en hembras de reptiles; en el caso de la P4 esta puede ser secretada en otros tejidos como la glándula adrenal y el útero (Norris y López, 2010).

Se cree que la viviparidad ha evolucionado independientemente alrededor de 108 veces en reptiles escamados y no se puede asumir que los mecanismos que mantienen la gestación sean los mismos en cada caso (Blackburn, 2006). Callard *et al.* (1992) han sugerido que la P4 tiene un rol dual asociado con la evolución de la viviparidad, 1) inhibición de la movilidad uterina asociada a la retención del huevo, embriogénesis y desarrollo de la placenta, 2) inhibición de la síntesis de vitelogenina hepática asociada con la disminución del proceso de vitelogénesis, matrotrofia y evolución de la placentación.

El cuerpo lúteo en reptiles es el principal tejido encargado de la producción de P4 (Niswender *et al.*, 2000). Numerosos estudios han encontrado una relación directa entre el desarrollo del cuerpo lúteo y los niveles de P4 o entre su degeneración y la disminución de la P4 en plasma (Callard *et al.*, 1972; Highfill y Mead, 1975; Xavier, 1987). Los folículos post-ovulatorios que forman los cuerpos lúteos deben continuar la secreción de P4 después de la ovulación; así, éste parece ser el principal factor de inducción a la retención de

huevos/embriones en la preñez. De la misma manera, durante la luteólisis, la pérdida de esta habilidad conduce a la oviposición (Rothchild, 1981; Guarino *et al.*, 1998).

El rol del cuerpo lúteo parece ser más complejo en algunos reptiles vivíparos, por ejemplo en especies como *Sceloporus jarrovi* el cuerpo lúteo se degenera durante la preñez pero los niveles de P4 en plasma permanecen altos o incluso aumentan sin que se conozca la fuente de esta P4 extraluteal (Guillette *et al.*, 1981). Para otras especies vivíparas se ha sugerido que puede ser producida en el tejido intertecal o en los folículos atrésicos (Al-Amri *et al.*, 2012). La producción de P4 que no sea a nivel ovárico sólo se ha evidenciado para *Chalcides chalcides*, una especie vivípara con una placenta relativamente compleja y transferencia maternal de nutrientes. En esta especie se ha detectado que los niveles en plasma de P4, evidenciados por radio-inmunoensayo, se mantienen constantes después de la luteólisis y se ha localizado su producción en los tejidos placentales con reacciones histoquímicas para la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β -HSD) (Guarino *et al.*, 1998).

En este trabajo se pretende estudiar si hay producción de P4 en los tejidos placentarios de una población de *Mabuya* (Scincidae), que corresponde a una especie aún no descrita presente en los valles interandinos colombianos. Las lagartijas del género *Mabuya* son de distribución neotropical y uno de los pocos linajes de reptiles que han desarrollado una placenta que provee la mayoría de los nutrientes para el desarrollo embrionario ya que ovulan huevos microlecitos (Blackburn y Vitt, 1992; Ramírez-Pinilla, 2006, Ramírez-Pinilla *et al.*, 2011) y tienen un período extenso de gestación de 8-10 meses (Ramírez-Pinilla *et al.*, 2002; Vrcibradic y Rocha, 2011). En esta especie de *Mabuya* el cuerpo lúteo muestra claros signos de regresión durante la gástrula y

néurula del desarrollo embrionario, cuando la corioplacenta está activa en los procesos histotróficos. Esta temprana luteólisis sugiere que la corioplacenta y alantoplacenta pueden tener una función endocrina necesaria para mantener la gestación de las etapas faríngea a parto (Gómez y Ramírez-Pinilla 2004). Para probar esta hipótesis, en este trabajo se pretende localizar indirectamente la producción de P4 en tejidos placentarios, así como de los receptores de P4 (PR) en hembras en diferentes estados de gestación de *Mabuya* sp.

1. Marco teórico

1.1 Viviparidad en lagartos

La mayoría de los escamados ponen huevos, sin embargo hay un apreciable número de éstos que son vivíparos. Se ha estimado que la viviparidad se ha originado independientemente 108 veces en reptiles (Blackburn, 2006). Es probable que la viviparidad en reptiles evolucionara a partir del incremento en la retención de huevos dentro del oviducto y que aquellos mecanismos que controlan la retención de los huevos sean fundamentales para la transición de ovíparos a vivíparos (Wooding *et al.*, 2010).

1.2 Progesterona y receptores de progesterona

Varios estudios han demostrado el papel que desempeña la P4 durante la gestación en vertebrados ovíparos y vivíparos (Yaron, 1972; Graham y Clarke, 1997; Mulac-Jericevic y Conneely, 2004), participando en la inhibición de la movilidad uterina asociada a la retención del huevo, embriogénesis, desarrollo de placenta y la inhibición de la síntesis de vitelogenina hepática relacionada con la disminución de la vitelogénesis y evolución de la placentación (Callard *et al.*, 1992). Por ejemplo Callard y Hirsch (1976) encontraron que el tratamiento con P4 a la tortuga *Chrysemys picta* disminuyó la actividad miometrial, facilitando la retención del huevo y la secreción de las membranas secundarias y terciarias (Custodia-Lora y Callard, 2002).

El cuerpo lúteo de los reptiles es el encargado de la producción de P4 (Callard *et al.*, 1972a, 1972b; Highfill y Mead, 1975; Xavier, 1987). Sin embargo la producción de P4 durante la gestación varía ampliamente entre especies de escamados vivíparos (Jones y Baxter, 1991) y en algunas especies las concentraciones en plasma de P4 permanecen altas, incluso después de la regresión del cuerpo lúteo (p. ej. *Sceloporus jarrovi*, Guillette *et al.*, 1991).

En mamíferos el mecanismo que regula el ambiente hormonal durante la gestación ha sido estudiado extensivamente y se ha documentado que la P4 proviene de una o dos fuentes durante la preñez, el tejido luteal y la placenta (Niswender *et al.*, 2000; Miller y Auchus, 2010). Guillette *et al.* (1981) sugirieron que en el lagarto *Sceloporus jarrovi* la producción de P4 por el cuerpo lúteo puede ser reemplazada por los folículos atrésicos a nivel ovárico, ya que el diámetro de éstos está correlacionado positivamente con los niveles de progesterona en plasma. En el lagarto scíncido *Chalcides chalcides* han localizado su producción en los tejidos placentales mediante pruebas con dehidroepiandrosterona (DHA - Sigma) disuelto en dimetiloformamida (DMF - Sigma) que mostraron la presencia de gránulos de formazán que indican la actividad de la enzima 3β -HSD en la placenta (Guarino *et al.*, 1998); también, se encontró por medio de cultivos de tejido in vitro que en el scíncido vivíparo australiano *Niveoscincus microlepidotus* las glándulas adrenales contribuyen a la producción de progesterona durante la gestación (Girling y Jones, 2003).

Las funciones que cumple la P4 requieren de una regulación fisiológica en los tejidos blancos primarios tales como el tracto reproductivo y el hígado (Schrader y O'Malley, 1978). Los efectos fisiológicos de la P4 están mediados por interacciones de la hormona con dos

receptores de progesterona específicos (PR) llamados PR-A y PR-B (Power *et al.*, 1992). La P4 es el competidor más efectivo para ambos sitios, la afinidad para los andrógenos es baja, el estrógeno y los cortico-esteroides son débiles competidores para los sitios de afinidad. Los receptores nucleares regulan la transcripción de genes por la unión discriminativa a secuencias regulatorias de ADN así como por interacciones específicas con co-activadores y/o co-represores (McKenna y O'Malley 2002).

Se ha demostrado que las isoformas de los PR fluctúan durante el ciclo reproductivo anual en la tortuga *Chrysemys picta*, siendo más abundante en la fase luteal (Giannoukos y Callard, 1995). Estudios inmunocitoquímicos del oviducto de tortuga e hígado demostraron una localización nuclear del PR (Giannoukos y Callard, 1995). La expresión intracelular del PR en el ovario ha sido reportada en mamíferos, incluyendo humanos (Suzuki *et al.*, 1994), también en pollos (Pasanen *et al.*, 1997). Utilizando análisis de *Western blot* se ha identificado PR en varias especies de reptiles (*Anolis carolinensis*, Tokarz *et al.*, 1981; *Chelydra serpentina*, Mahmoud *et al.*, 1986; *Chrysemys picta*, Riley *et al.*, 1988; *Aspidozelis inornatus* y *Aspidozelis uniparens*, Young *et al.*, 1994; *Alligator mississippiensis*, Vonier *et al.*, 1997). En *Hemidactylus flaviviridis* se ha detectado por medio de inmunohistoquímica que durante la previtelogénesis y vitelogénesis los PR se expresan en el folículo ovárico en las células de la granulosa y la teca interna tanto en el núcleo como en el citoplasma, también se encontraron en el núcleo y citoplasma de las células del cuerpo lúteo y en las capas epiteliales y las glandulares del oviducto durante el proceso de formación de la cáscara (Al-Amri *et al.*, 2012). En el lagarto scíncido *Pseudemoia entrecasteauxii* usando inmunohistoquímica se detectaron los PR distribuidos en el epitelio uterino variando su distribución con el estado reproductivo (Blazik *et al.*, 2012).

1.3 Placenta

En los reptiles vivíparos se han descrito diferentes tipos de placentas de acuerdo con las membranas extraembrionarias que participan en su formación y con las características del epitelio coriónico (Stewart, 1993; Blackburn, 1993). Las membranas extraembrionarias se desarrollan en todos los amniotas y contribuyen al intercambio del embrión con el ambiente; el corión permite el intercambio de gases y agua, el amnios establece un ambiente específico para el desarrollo embrionario, el alantoides permite el almacenamiento de desechos y por último el saco de la yema en amniotas lecitotróficos permite la transferencia de los nutrientes al embrión a partir de la yema (Thompson *et al.*, 2002). Los diferentes tipos de placentas en lagartos y serpientes se formaron durante la evolución de la viviparidad a partir de la unión de las membranas extraembrionarias al oviducto, por ejemplo la alantoplacenta (o placenta corioalantoica) se forma con la aposición del corion con el alantoides sobre el epitelio uterino, las onfaloplasentas se derivan de la conjunción del saco de la yema y el corion en el hemisferio abembriónico y el epitelio uterino; por último, en algunas especies el alantoides invade la yema y esta membrana adosada al epitelio uterino forma la placenta onfaloalantoica (Blackburn, 1993; Ramírez-Pinilla, 2014).

Para la placenta corioalantoica Weekes (1935) reconoció tres morfotipos que fueron definidos por dos características principales, el grado de plegamiento e interdigitación entre el útero y el corion, y la anatomía celular y tisular de las interfaces maternal-fetal; ambas afectan la naturaleza fisiológica y el intercambio a través de la placenta. Un cuarto tipo definido por Blackburn (1993) es la alantoplacenta tipo IV que está presente en el clado neotropical de

lagartijas del género *Mabuya*. Esta placenta es la más especializada y presenta aréolas coriónicas y un placentoma distintivo altamente elaborado con una fuerte interdigitación de los tejidos maternos y fetales (Blackburn, 1993). Adicionalmente se ha descrito un paraplacentoma especializado en intercambio de lípidos y en el lado antimesometrial la presencia de placas de absorción con diferentes grados de interdigitación de los tejidos maternos y fetales (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2001; Leal y Ramírez Pinilla, 2008). Por lo tanto la alantoplacenta de *Mabuya* es la placenta morfológica y fisiológicamente más especializada conocida entre reptiles; ésta provee la mayoría de nutrientes para el desarrollo embrionario (Ramírez-Pinilla 2006; Ramírez-Pinilla *et al.*, 2011) y converge en el grado de complejidad y de placentotrofía con la conocida en los mamíferos euterios (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2001; Ramírez-Pinilla, 2014).

Las funciones que se le atribuyen a la placenta en escamados vivíparos son diversas, destacando las siguientes: a) intercambio gaseoso, b) transporte de agua, c) transporte de nutrientes, d) síntesis de hormonas (fundamentalmente esteroides), y e) síntesis de factores inmunorreguladores (Martínez-Torres, 1997). Martínez-Torres *et al.* (2006) usando reacciones histoquímicas de la enzima 3β -HSD encontraron que la onfaloplacenta de la especie de lagarto ánguido vivíparo lecitotrófico *Barisia imbricata* tiene capacidad esteroideogénica, ya sea para producir hormonas como la P4, o bien para depurar esteroides producidos por la hembra gestante. Hasta el momento solamente se ha demostrado que la placenta corioalantoica de la lagartija scíncida *Chalcides chalcides* tiene capacidad esteroideogénica (Guarino *et al.*, 1998) y existen evidencias indirectas de que la alantoplacenta del lagarto Phrynosomátido *Sceloporus jarrovi* puede metabolizar los esteroides sexuales producidos por la hembra gestante (Painter y Moore, 2005).

Jerez y Ramírez-Pinilla (2003) estudiaron la secuencia de desarrollo de la membranas extraembrionarios de *Mabuya* sp y encontraron que en gástrulas tempranas se desarrolla una placenta bilaminar del saco de la yema formada por la aposición del onfalopleura bilaminar (ectodermo y endodermo extraembrionario del saco de la yema) y el epitelio uterino. Durante la gastrulación el mesodermo se expande entre ecto y endodermo del saco de la yema formando la placenta trilaminar del saco de la yema, que es temporal ya que el mesodermo se delamina formando el corion (ectodermo extraembrionario y mesodermo extraembrionario) que se enfrenta al epitelio uterino formando la corioplacenta en gástrulas tardías y néurulas tempranas. Esta corioplacenta es altamente especializada, con estructuras de absorción en ambos hemisferios (una placa de absorción dorsal en el lado mesometrial y varias placas de absorción en la zona antimesometrial).

En la neurulación tardía ocurre la expansión del alantoides por debajo del corion formando la membrana corioalantoica que se enfrenta al epitelio uterino. Esta es la placenta corioalantoica que ocurre durante la faríngrula hasta el parto. La placenta corioalantoica madura de *Mabuya* sp tiene especializaciones morfológicas complejas exclusivas de este clado: un placentoma altamente elaborado con una fuerte interdigitación de los tejidos maternos y fetales, con un arreglo sincitial del epitelio uterino y un epitelio coriónico biestratificado (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2001; Vieira *et al.*, 2007). El placentoma está rodeado por una zona denominada paraplacentoma, aquí no se observa interdigitación, y se delimita por el pliegue coriónico, cerca al pliegue paraplacentomal se encuentran areolas coriónicas que reciben materiales nutritivos del epitelio uterino a partir especialmente de glándulas endometriales, y las secretan hacia la cavidad coriónica (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2001; Ramírez-Pinilla *et al.*, 2006; Leal y Ramírez-Pinilla,

2008). En el hemisferio abembriónico de la cámara de incubación se encuentran numerosas placas de absorción, en ellas se observa que epitelio coriónico y uterino están en cercana asociación, se destacan dos tipos celulares en el epitelio coriónico, las células gigantes y las células intersticiales. Los segmentos respiratorios son áreas de abundante vascularización subepitelial y una asociación muy cercana entre el epitelio uterino y coriónico, los cuales son epitelios planos muy delgados y permiten el intercambio de gases (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2003; Ramírez-Pinilla *et al.*, 2006).

1.4 Mabuya sp.

La viviparidad se conoce en el 20% de las especies de escamados (Sites *et al.*, 2011) y ha evolucionado más veces en scíncidos que en cualquier otra familia de lagartos (Thompson *et al.*, 2001). Los scíncidos contienen especies ovíparas, especies vivíparas con placentas simples y un rango de especies con placentas más y más especializadas (Stewart y Thompson, 2000).

Mabuya es un género de la familia Scincidae, tiene distribución neotropical en Suramérica, Centro América, y el Caribe (Avila-Pires, 1995; Mausfeld *et al.*, 2002; Miralles *et al.*, 2009). Este género es destacable entre reptiles por sus peculiaridades reproductivas: Ovulan ovocitos pequeños con muy poca yema, tienen largos períodos de gestación y su nutrición fetal es mayormente suplida de madre a embrión a través de una placenta corioalantoica que se asemeja a la de los mamíferos eutherios (Vitty Blackburn 1983; Blackburn y Vitt 1992, 2002; Jerez and Ramírez-Pinilla 2001; Ramírez-Pinilla *et al.* 2002; Hernández-Franyutti *et al.* 2005). Además, todas las especies de *Mabuya* estudiadas hasta ahora son sexualmente dimórficas en talla, con

hembras más grandes que los machos (Vitt y Blackburn 1983, 1991; Stevaux 1993; Vrcibradic y Rocha 1998; Rocha and Vrcibradic 1999; Ramírez-Pinilla *et al.* 2002; Teixeira *et al.*, 2003).

Las hembras del género *Mabuya* maduran a los 6 meses de edad, y para las especies brasileñas sus períodos de parto tienen un patrón unimodal, concentrados en la estación seca, húmeda, o la transición de seca-húmeda (Vrcibradic y Rocha 2011). En la especie colombiana estudiada *Mabuya* sp, hay un régimen de parto bimodal que coincide con los dos períodos de baja precipitación en su hábitat (Ramírez-Pinilla *et al.*, 2002). A pesar de las diferencias en los patrones de parto cada hembra da a luz una sola vez al año, dado su largo período de gestación (Vrcibradic y Rocha 2011).

1.5 Ovario de *Mabuya* sp

Aunque la histología general del ovario y los folículos de *Mabuya* sp es comparable a las descritas para otras especies de lagartos por Guraya (1989), tiene características específicas que difieren de otros escamados, por ejemplo la oogénesis en esta especie involucra la etapa inicial de crecimiento pre-vitelogénico, pero difiere en la pequeña talla de los oocitos y la ausencia de plaquetas de yema en el ooplasma de los folículos pre-ovulatorios, características que están relacionadas con una vitelogénesis corta (Gómez y Ramírez-Pinilla, 2004; Hernández-Franyutti *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2010). Estas y otras características son similares a las encontradas en los oocitos maduros de marsupiales (Vieira *et al.*, 2010). También se ha encontrado que en *Mabuya* sp los cambios en la morfología del cuerpo lúteo a través de la gestación son similares a los descritos en otras especies como *Trachylepis brevicollis* (Frag, 1983) y *Chalcides chalcides*

(Guarino *et al.*, 1998), sin embargo en *Mabuya sp* sucede una luteólisis temprana (Gómez y Ramírez-Pinilla, 2004).

Durante la evolución de marsupiales el incremento de la provisión de nutrientes a través de la placenta y la lactancia puede haber resultado en una reducción en las reservas de yema en el ovocito (Brawand *et al.*, 2008). Asimismo para las especies de *Mabuya*, pueden existir cambios genéticos y endocrinos relacionados al control de la vitelogénesis (por ejemplo la producción extendida de P4) y por ello mostrar una convergencia evolutiva con mamíferos.

1.6 Detección de Progesterona

El rol de la P4 en la reproducción y la ubicación de su producción en los tejidos de los lagartos han sido estudiados con diferentes metodologías. Por ejemplo Girling y Jones (2003) encontraron por medio de radioinmunoensayo que en *Niveoscincus microlepidotus* después de la luteólisis la P4 no es producida por ningún otro tejido estudiado (placenta, ovario y glándulas adrenales); Martínez-Torres *et al.* (2014) encontraron igualmente por radioinmunoensayo evidencia de la participación del feto en la regulación de la P4 en el lagarto vivíparo *Barisia imbricata imbricata*. Para ello, extirparon el cuerpo lúteo y los embriones durante varias fases de la preñez y midieron la P4. Guarino *et al.* (1998) encontraron que la progesterona se produce en el cuerpo lúteo y tejidos placentales de *Chalcides chalcides* usando histoquímica para la enzima 3 β -HSD. No es extraño encontrar esta enzima que cataliza la producción de P4 en lagartos ya que ésta se detectó asimismo en la membrana corioalantoica (CAM) de *Gallus gallus*. Albergotti *et al.* (2009) cuantificaron la expresión del ARNm de 3 β -HSD en CAM, también realizaron

cultivos de explantes que demostraron la producción de P4 in vitro en presencia de un precursor de esteroides. Con inmunolocalización del PR encontraron que la CAM además de producir progesterona tiene la capacidad de recibir la señalización de la misma. Por último Paolucci y Di Cristo (2002) por medio de inmunohistoquímica de los PR encontraron que la P4 puede afectar las funciones fisiológicas del oviducto y el hígado de la especie ovípara *Podarcis sicula* en relación con la reproducción.

1.7 Inmunolocalización

Para localizar la enzima 3β -HSD y los receptores de P4 en tejidos un método muy utilizado es la inmunohistoquímica (IHC); esta técnica consiste en la localización de un antígeno dentro de cortes de tejidos por medio de anticuerpos específicos (Ramos-Vara, 2014). La unión antígeno-anticuerpos se revela por medio de una reacción histoquímica visible al microscopio de luz, en otras palabras el principio básico de la IHC es la localización visual de moléculas en tejidos o células basado en una satisfactoria señal antígeno-anticuerpo (Ramos-Vara, 2005).

Aunque su primeras aplicaciones fueron la caracterización de neoplasma, la inmunohistoquímica actualmente tiene aplicaciones más amplias, en la investigación, diagnosis y decisión terapéutica del cáncer (Leong y Leong, 2006). Esta técnica también se ha usado en la detección de P4 y/o sus receptores en mamíferos, anfibios (Mensah-Nyagan *et al.*, 1994), aves (Albergotti *et al.*, 2009) y lagartos; por ejemplo Al-Amri *et al.* (2012) detectaron los PR en la células de la granulosa, de la teca y el cuerpo lúteo de los ovarios de *Hemidactylus flaviviridis* mediante inmunohistoquímica.

2. Materiales y métodos

Las poblaciones Andinas colombianas del género *Mabuya* han sido analizadas filogenéticamente en Pinto-Sánchez *et al.* (2015) y han sido asignadas a una especie candidata, *Mabuya* sp IV.

2.1 Extracción de muestras

Se colectaron 13 hembras en diferentes etapas de gestación en 3 municipios de Santander (Zapatoca, Curití y Bucaramanga). En el laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander, se fotografiaron y midieron (longitud rostro cloacal). Las hembras se introdujeron en el refrigerador por 15 minutos para disminuir su actividad y posteriormente se eutanzaron con una inyección de lidocaína al 10%. Se realizó una disección en bolsillo en la cavidad abdominal para exponer los oviductos y de allí observar el estado de actividad reproductiva y gestación. En las hembras preñadas se observaron y fotografiaron las cámaras embrionarias, y para aquellas en estados desde farínula en adelante se separaron las cámaras embrionarias en placentas y embriones. Para los estados tempranos en donde es imposible separar el embrión de las membranas extraembrionarias se disecaron las cámaras embrionarias completas. Las placentas y las cámaras embrionarias se fijaron en paraformaldehído (PFA) amortiguado al 4% a una temperatura de $\sim -4^{\circ}\text{C}$. Los embriones se fijaron en formaldehído amortiguado por un día y luego se almacenaron en etanol al 70%. Para la determinación de los estados de desarrollo embrionario se siguió la tabla de desarrollo para embriones de *Lacerta vivipara* de Dufaure y Hubert (1961).

2.2 Inmunohistoquímica

Para la detección de la enzima 3β HSD y los PR las muestras de placenta y cámaras embrionarias se deshidrataron en una serie de etanol, fueron luego embebidas en parafina y seccionadas a 6 micras en un micrótopo rotatorio (Leica Biosystems). Las secciones de tejido se fijaron en láminas provistas de gelatina y se desparafinaron y se rehidrataron en un gradiente de concentración de etanol. Las láminas fueron separadas en tres grupos para ser luego incubadas con 1) una disolución de anticuerpo monoclonal para receptor de progesterona alpha PR-22 (Thermo Scientific, diluido a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 2) para la enzima 3β HSD (Santa Cruz Biotechnology, diluido a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 3) Secciones tratadas con suero de bloqueo provisto en el ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology) sin el anticuerpo primario como blanco. Para el control positivo de PR se preparó secciones de hígado de *Hemidactylus frenatus*, donde se encuentran receptores de progesterona. Para el control positivo de la enzima 3β HSD se usó secciones de ovarios con cuerpos lúteos activos de *Hemidactylus frenatus*.

Una vez incubadas las láminas con anticuerpos primarios se usó dos métodos para visualizar la unión de los anticuerpos al antígeno, uno de ellos es 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. Las láminas fueron teñidas con hematoxilina contrastante. El otro método que se usó para visualizar PR y la enzima 3β -HSD fue el anticuerpo secundario FITC (Isotiocianato de fluoresceína; anti-ratón IgG de conejo 3 FITC diluido a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.) que emite fluorescencia. Una vez listas las láminas se observaron bajo el

microscopio de luz NIKON ECLIPSE 55i® con cámara adaptada (CANON DS126191®) y Microscopio de Fluorescencia con cámara Axio Scope A1®, respectivamente.

2.3 Western blot

Para determinar y cuantificar la presencia de la enzima en la placenta de *Mabuya* sp. se utilizó asimismo la técnica de *Western blot*. Las muestras de placenta en tres estados de desarrollo embrionario fueron pesadas y lavadas con una solución de buffer fosfato salino 10 Mm pH 7.4. Cada muestra se lisó utilizando un procesador de ultrasonido (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, anfólitos 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. Después 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 la corrida electroforética, 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 µl 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 el anticuerpos primarios monoclonales específico para: 3 β -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

Para validar la técnica se realizaron controles con tejidos hepáticos de *H. frenatus*, estos se muestran en la Figura 1. Para un mejor entendimiento de los resultados se puede encontrar un resumen de los resultados en la Tabla 1 al final de la sección.

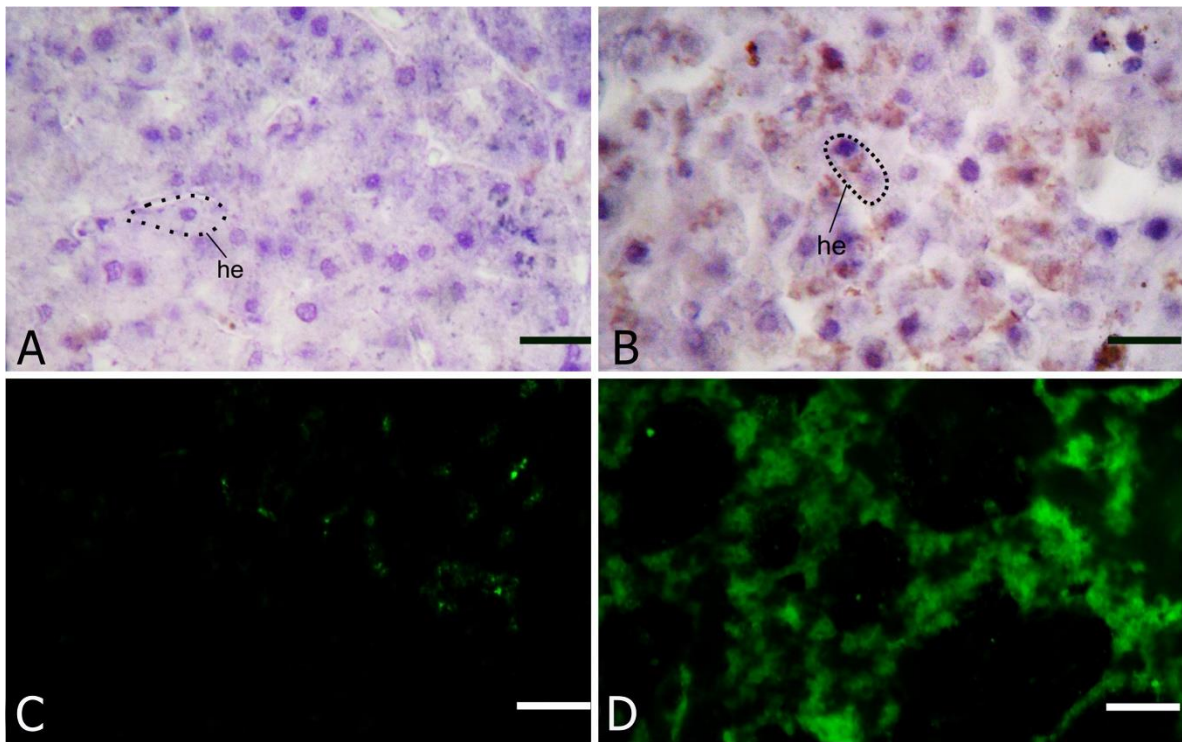


Figura 1. Cortes de tejido hepático de *Hemidactylus frenatus* con controles negativos para AB.

Nota: (A) y FITC (C) y controles positivos para AB (B) y FITC (D). he: células hepáticas. Barras de escala: (A) y (B) 40 μ m; (C) y (D) 20 μ m.

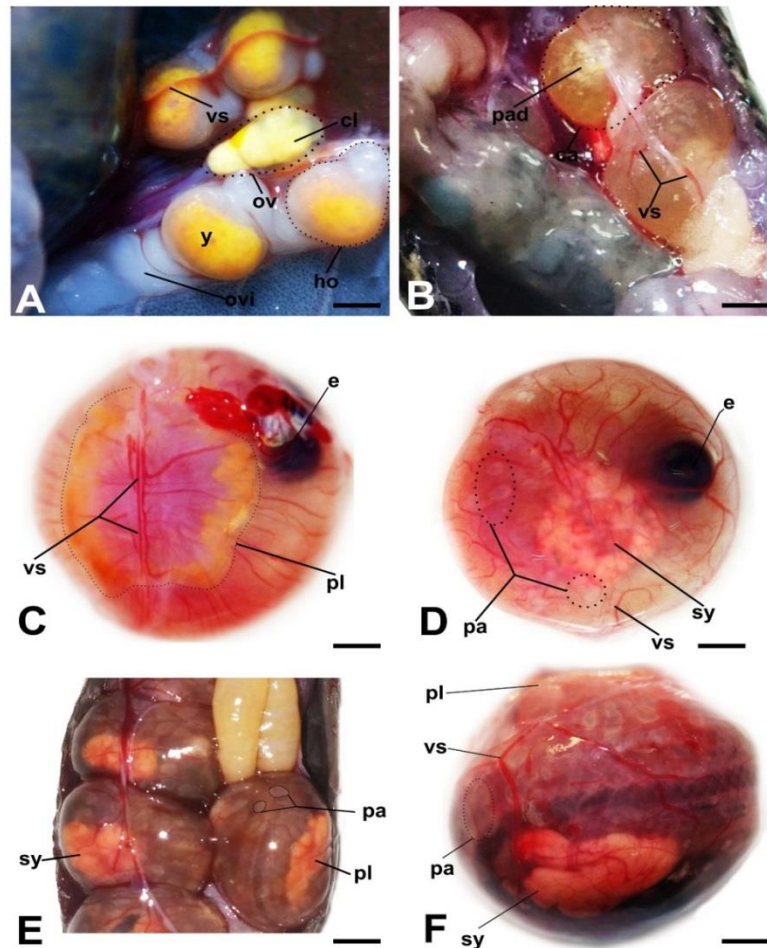


Figura 2. Fotografías al estereoscopio de las cámaras embrionarias de *Mabuya* sp. desde gestación temprana al estado pre-parto.

Nota: (A). Huevos oviductales (B). Cámara embrionaria en gestación temprana (C). Vista dorsal de una cámara embrionaria, gestación media se observa el placentoma y vasos sanguíneos. (D). Vista ventral de una cámara embrionaria, gestación media, se observa el saco de la yema y las placas absortivas. (E). Cámaras embrionarias, gestación tardía. (F). Cámara embrionaria, gestación tardía, se observa saco de la yema, placas absortiva y vasos sanguíneos, a través de la placenta se nota que el embrión ya tiene pigmentación. ca: cámara embrionaria; cl: cuerpo lúteo; e: ojo; ho: huevo oviductal; ov: ovario; ovi: oviducto; pad: placa absortiva dorsal; pa: placa absortiva; pl: placentoma; sy: saco de la yema; y: yema; vs: vasos sanguíneos. Barras de escala: (A – D y F) 1 mm; (E): 3 mm.

3.1 Inicio de la gestación (Huevos oviductales, n=3)

Se encontraron hembras con huevos oviductales en estados muy tempranos del desarrollo, posiblemente durante la segmentación, que median alrededor de 2 mm (Fig.2. A). Al microscopio se observaron los huevos rodeados por una capa fibrosa acelular, la membrana de la cáscara que varía de 3-11 μm de grosor. Bajo la membrana de la cáscara se observaron vesículas de lípidos de diferentes tamaños restringidos a la periferia y un espacio aparentemente vacío hacia el centro. El útero que contiene al huevo se encontró distendido, pero con el endometrio muy plegado en la parte dorsal o mesometrial; el epitelio uterino luminal es columnar, con células con núcleos redondos y prominentes. Se observan también abundantes glándulas uterinas y tejido conectivo denso (Fig.3.).

La enzima 3β HSD no se localizó en ningún tejido en esta etapa de la gestación, (Fig.4.). Para los PR la reacción fue muy evidente en las células columnares del epitelio uterino y en el tejido conectivo (Fig.5.); en la tinción de fluorescencia se localizó la reacción fluorescente sólo en el citoplasma de las células epiteliales y con menos intensidad en el tejido conectivo de la lámina propia uterina (Fig.5.E y F).

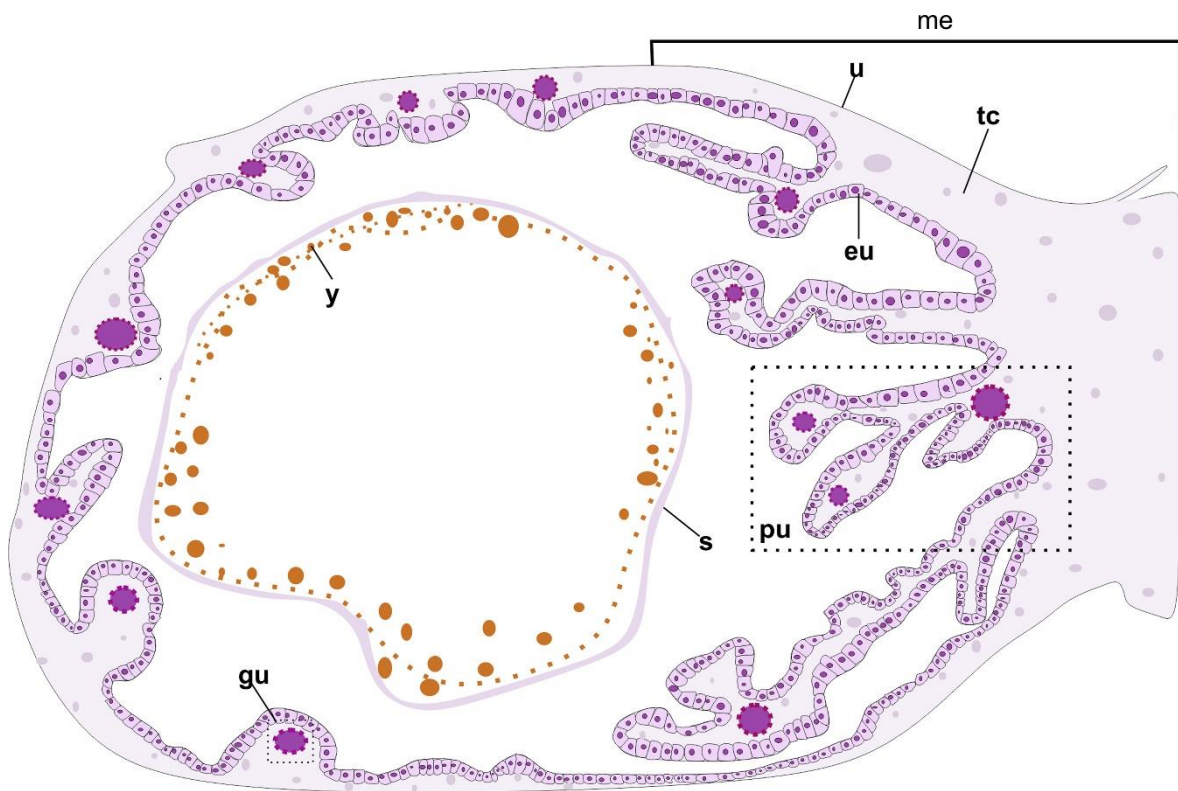


Figura 3. Diagrama de un huevo oviductal de *Mabuya* sp.

Nota: se observa un útero muy plegado con un epitelio uterino columnar con núcleos redondos y prominentes y abundantes glándulas uterinas, una membrana de la cáscara fibrosa, y diminutos gránulos de yema en el ooplasma. eu: epitelio uterino; gu: glándulas uterinas; me: zona mesometrial; pu: pliegues uterinos; s: membrana de la cáscara; tc: tejido conectivo; u: útero; y: gránulos de yema.

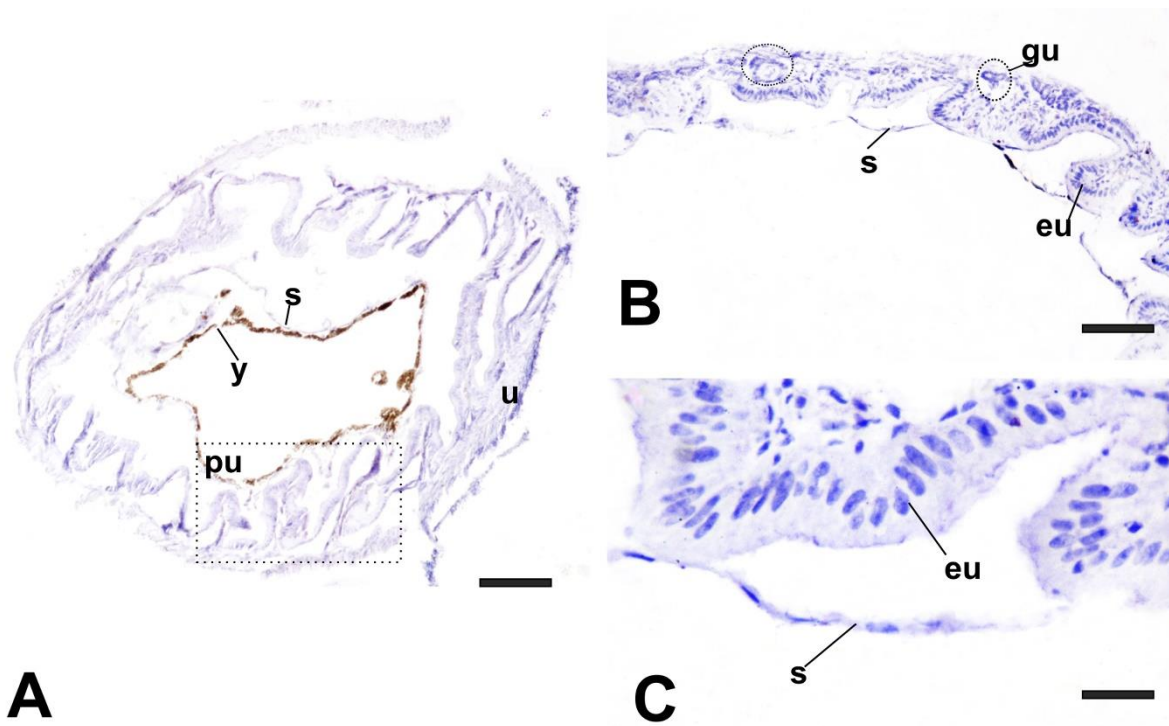


Figura 4. Huevo oviductal de *Mabuya* sp.

Nota: (A). Corte de huevo oviductal negativo para 3β HSD, los gránulos de yema presentan una coloración marrón debido a la oxidación en el tratamiento histológico. (B) y (C) Detalles de los pliegues uterinos (pu); eu: epitelio uterino; s: membrana de la cáscara; u: útero; y: gránulos de yema; gu: glándulas uterinas. Barras de escala: (A). 200 μ m. (B). 100 μ m. (C). 30 μ m.

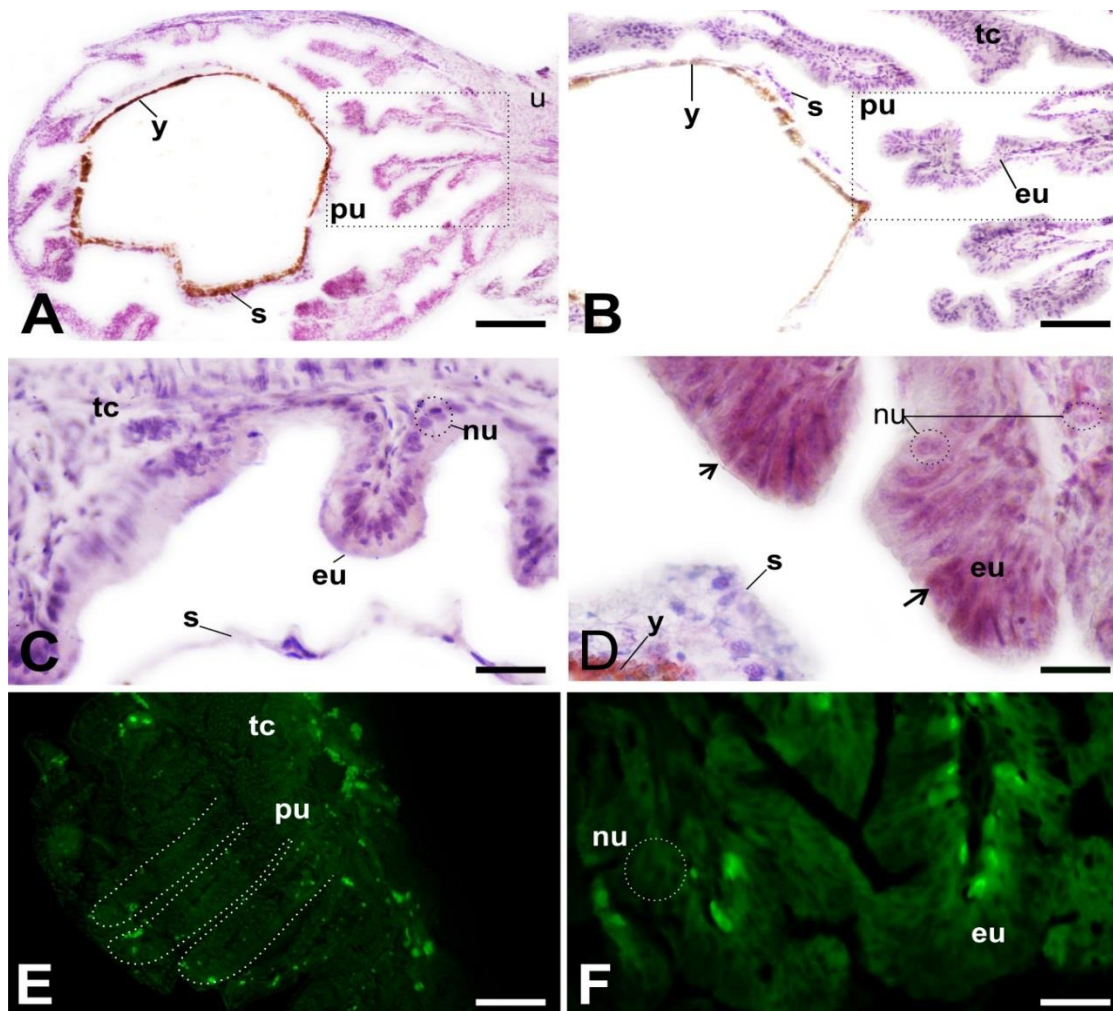


Figura 5. Corte de huevo oviductal de *Mabuya* sp. positivo para PR.

Nota: (A). Vista general de un corte histológico de huevo oviductal tratado con AB para detectar PR. (B). Detalle del hemisferio mesometrial se observa el pu: pliegue uterino (C). Detalle del pliegue uterino se observa la tinción marrón en citoplasma del eu: epitelio uterino. (D). Detalle del pliegue uterino las flechas marcan una zona fuertemente marcada tanto en citoplasma como en los núcleos. (E) y (F). Cortes de huevo oviductal tratados con FICT para PR. (E). Zona mesometrial; la línea punteada delimita los pu. (F). Detalle de un pu, se pueden observar espacios redondos de algunos núcleos no marcados. eu; epitelio uterino, nu: núcleo; s: membrana de la cáscara, pu; pliegues uterinos; y: gránulos de yema; tc: tejido conectivo. Barras de escala: (A): 180 μ m; (B): 130 μ m. (C y D): 30 μ m. (E): 80 μ m. (F): 20 μ m.

3.2. Gestación temprana (Néurula-Faríngula, n=2)

En las cámaras embrionarias con néurulas en el hemisferio embrionario se encuentra el corion que en conjunción a los pliegues uterinos forman la corioplacenta. Se observan varias placas de absorción de diferentes tamaños, siendo la placa dorsal la más grande, ésta incluso se puede observar macroscópicamente (Fig. 2. B). El epitelio uterino de las placas de absorción es columnar con núcleos centrales muy prominentes; el ectodermo coriónico tiene una capa externa de células columnares binucleadas con núcleos globoides y células intersticiales delgadas que se encuentran entre las columnares. Las regiones de la placenta que separan a las placas de absorción son largos segmentos en los que el epitelio uterino es columnar sin plegamientos y el ectodermo coriónico es de cuboidal a escamoso (Fig. 6).

Durante el estado de faríngula se observa la salida y extensión del alantoides invadiendo el exoceloma dorsal y lateral debajo del tejido coriónico vascularizándolo, formando el corioalantoides. Dorsalmente esta membrana forma una red amplia, mientras lateramente es más delgada. El ectodermo coriónico en la placa absorptiva dorsal está compuesto de las mismas células descritas para la néurula, con células columnares muy altas. Esta es la contribución coriónica del futuro placentoma, delimitado periféricamente por segmentos de células epiteliales uterinas y coriónicas escamosas. La mucosa uterina muestra pliegues en la zona dorsal, y es menos plegado en la región lateral, el epitelio uterino es columnar y el tejido conectivo es grueso albergando abundantes glándulas activas (Fig.9).

Los ensayos inmunohistoquímicos para la enzima 3β HSD fueron negativos para todos los tejidos de la placenta en estos estados (Fig.7; Fig.10.); para los PR fueron positivas las células columnares del epitelio y el tejido conectivo de los elementos uterinos de toda la placenta, siendo más intensa en la zona dorsal y en las placas de absorción laterales (Fig.8.).

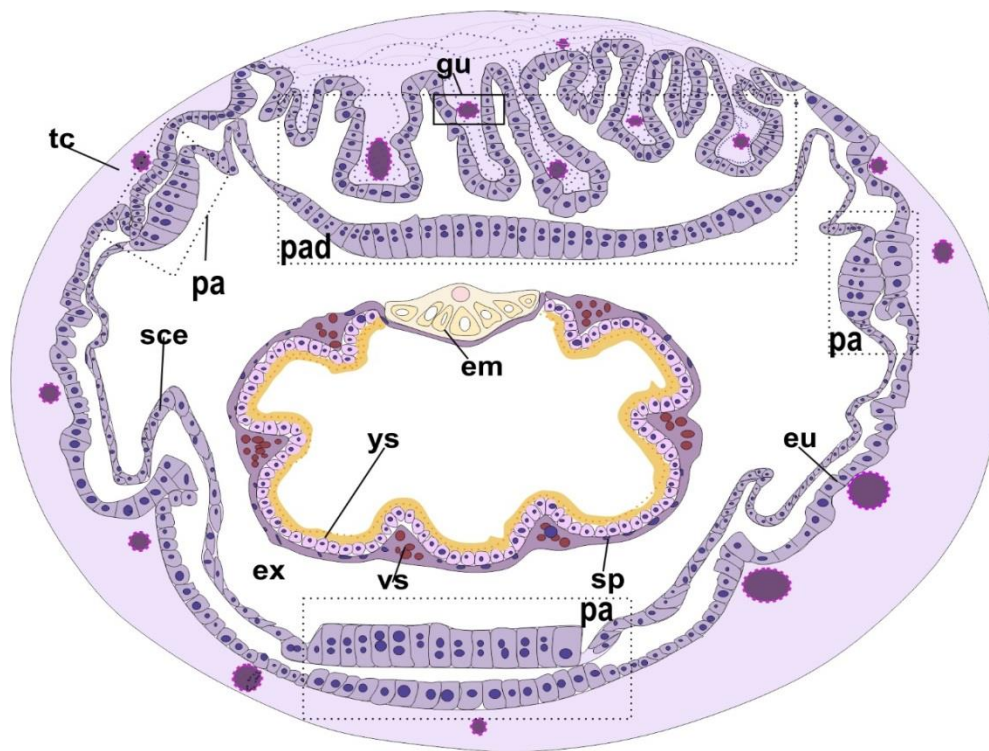


Figura 6. Diagrama modificado de Jerez y Ramírez-Pinilla (2003), de una cámara embrionaria en estado del desarrollo néurula de *Mabuya* sp.

Nota: En este estado de gestación las membranas extraembionarias y el epitelio uterino forman la corioplacenta. pu: pliegues uterinos, cc; células coriónicas columnares binucleadas; eu; epitelio uterino; gu; glándulas uterinas; pad; placa absorbente dorsal; pa; placa absorbente lateral; ce; células coriónicas escamosas; tc: tejido conectivo; u; útero; sp: splanopleura; vs: vasos sanguíneos; ex: exoceloma; sce: segmentos coriónicos de células escamosas; ys: saco de la yema; em: embrión.

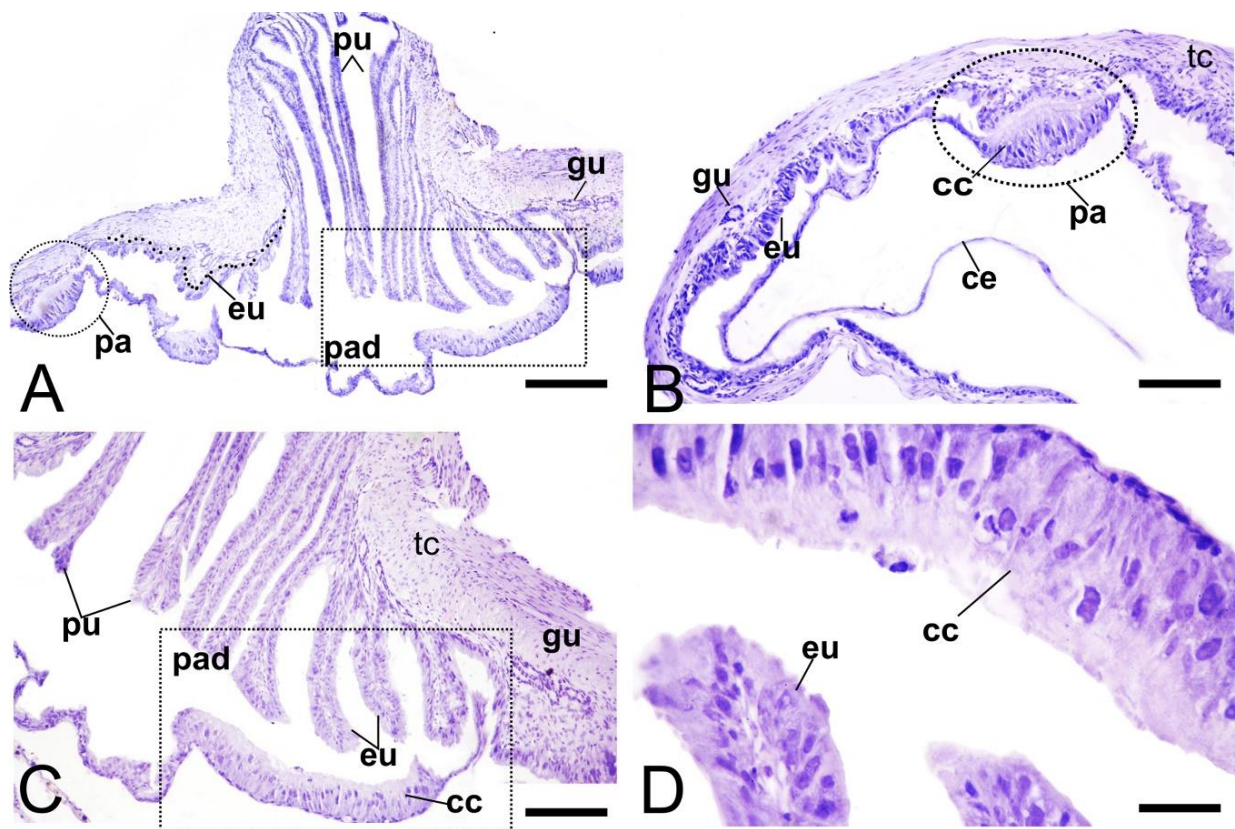


Figura 7. Cortes histológicos de la placenta de un embrión de *Mabuya* sp. en néurula, tratada con inmunohistoquímica de AB para presencia de 3β HSD, el resultado es negativo.

Nota: (A). Polo embriónico, donde se observan largos pliegues uterinos y el corión hipertrófico formando la placa absortiva dorsal (pad). (B). Detalle de la concavidad coriónica, se observa una placa absortiva lateral y la transición de las células coriónicas de columnares a escamosas (C). Detalle de la placa absortiva dorsal, el recuadro encierra la zona de contacto de lo elemento uterinos y embrionarios. (D). Detalle de placa absortiva dorsal. cc: células coriónicas columnares binucleadas; ce; células coriónicas escamosas; pad: placa absortiva dorsal; eu; epitelio uterino; gu; glándulas uterinas; pa; placa absortiva lateral; pu: pliegues uterinos; b; bolsa coriónica, tc: tejido conectivo; u; útero. Barras de escala: (A): 250 μ m; (B y C): 160 μ m; (D): 40 μ m.

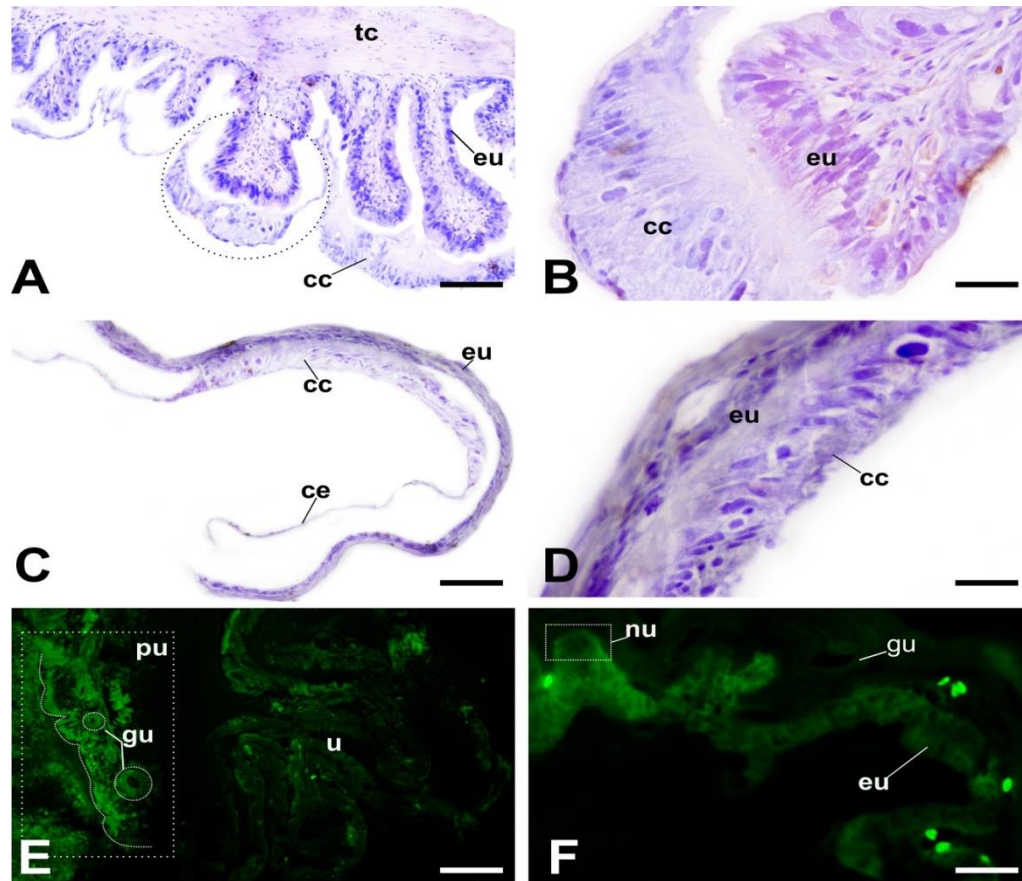


Figura 8. Cortes histológicos de la placenta de un embrión de *Mabuya* sp. en néurula, tratada con inmunohistoquímica de AB (A-D) y FITC (E y F) para presencia de PR, el resultado es positivo.

Nota: (A). Placa absortiva dorsal, la zona encerrada muestra el contacto entre un pliegue uterino y la células coriónicas. (B). Detalle de placa absortiva dorsal, la reacción marrón se observa en el citoplasma del epitelio uterino. (C). Placa absortiva lateral, tinción positiva en el epitelio uterino. (D). Detalle de una placa absortiva dorsal. (E). Zona dorsal, el cuadro encierra los pliegues uterinos, la línea punteada delimita la zona de contacto de los pliegues uterinos con las células coriónicas que forman la placa absortiva dorsal, en el tejido coriónico no se observa tinción. (F). Detalle de los pliegues uterinos, se encontraron zonas sin tinción, de núcleo no marcados por el anticuerpo. cc: células coriónicas; ce: células coriónicas escamosas; eu: epitelio uterino; gu: glándulas uterinas; pu: pliegue uterino; tc: tejido conectivo; u: útero; un: núcleos del epitelio uterino. Barras de escala: (A): 100 μ m; (B): 30 μ m; (C): 100 μ m; (D): 30 μ m. (E): 60 μ m; (F): 20 μ m.

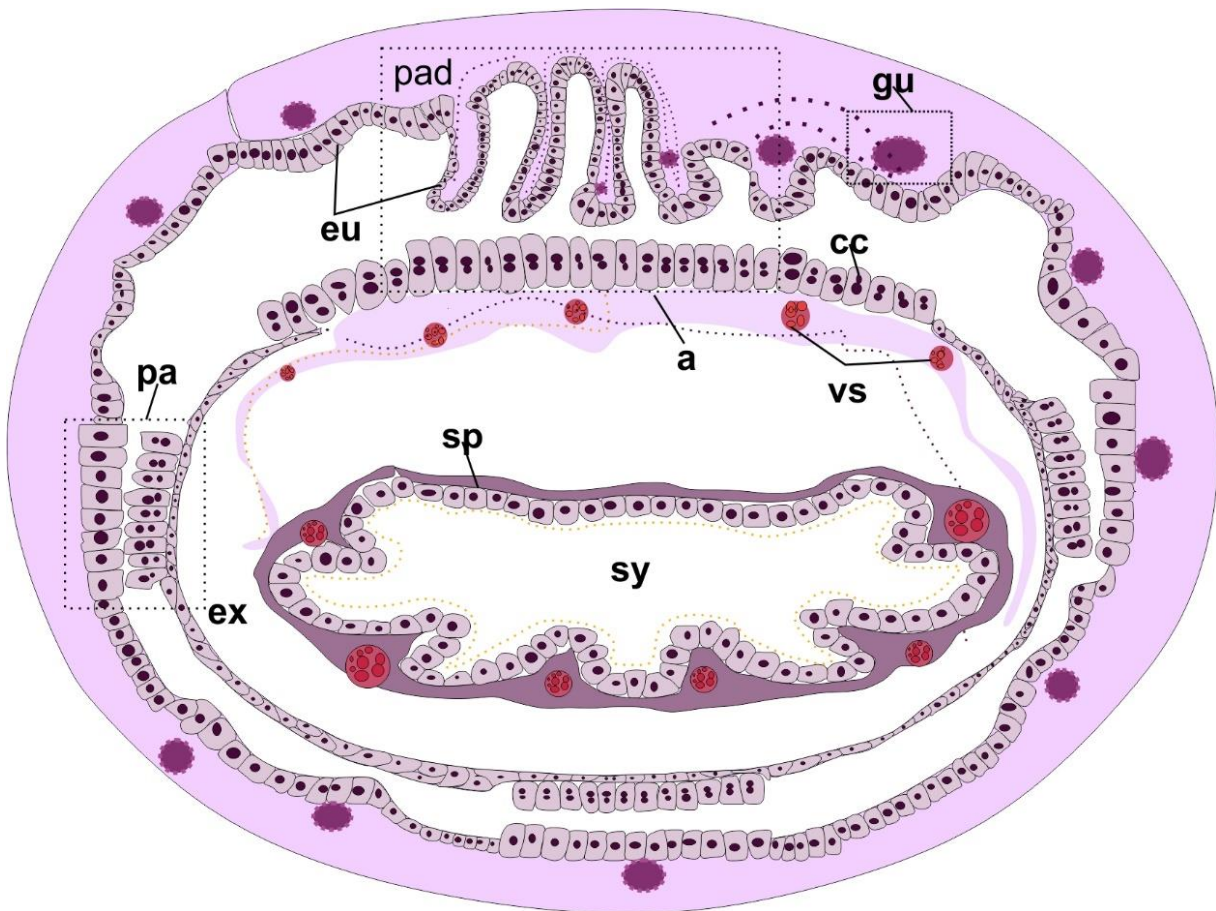


Figura 9. Diagrama de una cámara embrionaria en estado del desarrollo farínge de *Mabuya* sp.

Nota: En este estado de gestación se inicia la aparición del alantoides bajo el tejido coriónico, formándose así el corioalantoides; no se muestra el embrión en la figura. a: alantoides; cc; células coriónicas columnares binucleadas; ce; células coriónicas escamosas; vs: vasos; pad; placa absortiva dorsal; eu; epitelio uterino; ex: exoceloma; gu; glándulas uterinas; pa; placa absortiva lateral; sp: esplacnopleura; tc: tejido conectivo; ys: saco de la yema.

3.3. Gestación media (Estados 34-35, n=3)

Durante estos estados de desarrollo embrionario el embrión está casi completamente formado; se caracterizan por el desarrollo progresivo de los miembros.

Durante la gestación media se observó que el alantoides ha invadido el exoceloma dorsal y lateral bajo el tejido coriónico. El alantoides es más amplio en el polo embrionario y se une al corion formando así el corioalantoides, que en conjunción a los pliegues que forman el epitelio uterino en la zona embrionaria forma una extensa placa absorbente dorsal (PAD), que dará origen más adelante al placentoma. En esta zona el corioalantoides es plegado, el ectodermo coriónico es bilaminar, la capa más externa está compuesta de células gigantes columnares con núcleos muy prominentes ubicados en el centro y células delgadas intersticiales dispersas entre las columnares. En el componente uterino la mucosa en su región dorsal forma igualmente pliegues que se interdigitan con los coriónicos, el epitelio es columnar y en la lámina propia se encuentran abundantes glándulas uterinas. Lateral y ventralmente a la placa de absorción dorsal, el ectodermo coriónico y el epitelio uterino al que se enfrentan forman segmentos de células escamosas a cuboidales. Estos segmentos corresponden a las áreas de intercambio de gases o segmentos respiratorios. Intercalados con estos segmentos se encuentran regiones similares a la placa de absorción dorsal pero mucho más cortas, en donde el ectodermo coriónico con células columnares e intersticiales se enfrenta con células columnares del epitelio uterino, estas corresponden a las placas de absorción laterales (Fig. 11).

La expresión de la enzima 3β HSD se localizó en las células columnares del epitelio uterino y en las glándulas uterinas en la PAD y las placas absorción lateral; en los elementos embrionarios, se localizó en las células gigantes del corioalantoides en la placa absorción dorsal, y en las placas de absorción laterales (Fig.12. C y E); en los segmentos respiratorios no se observó tinción (Fig.12.F).

Los PR se localizaron en el epitelio y el tejido conjuntivo del útero de todos los elementos placentarios, en la PAD, en las placas de absorción laterales y en los segmentos respiratorios (Fig.15. A-C). No se observó tinción en ningún elemento embrionario (Fig.15. D). La reacción para PR es más intensa que en la gestación temprana pero igualmente fue específica al citoplasma del epitelio luminal uterino.

Estado 36 (n=2)

Las cámaras de este estado mostraron embriones con las extremidades ya formadas, se puede observar al estereoscopio el placentoma en la zona dorsal, las placas absorción y el saco de la yema en la zona ventral (Fig. 2. B y C). Al microscopio se observó un placentoma mesometrial, de forma elipsoidal, presenta pliegues uterinos que irradian hacia las invaginaciones del corioalantoides, mostrando una fuerte interdigitación entre ambos tejidos. Los pliegues uterinos consisten de mucosa uterina con ramificaciones, primarias y secundarias, poseen tejido conectivo altamente vascularizado y epitelio sincitial, en el resto de la placenta el epitelio uterino está formado por células columnares (excepto en los segmentos respiratorios) y la lámina propia contiene abundantes glándulas uterinas. Los pliegues corioalantóicos están formados por epitelio coriónico bilaminar con una capa basal de células planas y una capa apical

formada de dos tipos celulares, las polimórficas binucleadas o gigantes y las intersticiales, este epitelio coriónico yace sobre un alantoides amplio y vascularizado. Hacia la periferia del placentoma, se encuentra una zona corta no plegada que delimita al resto de la cámara embrionaria, el paraplacentoma, aquí el epitelio coriónico es bajo, y polimórfico. En el resto de la cámara embrionaria se alternan segmentos sin pliegues y con epitelios coriónico y uterino escamosos, con las placas de absorción laterales (Fig. 11).

La producción de 3β HSD se localizó en las células de epitelio uterino, las glándulas uterinas y en el epitelio coriónico del placentoma y paraplacentoma en la zona embrionaria (Fig.12. A y B; Fig.13. A-C) y en placas de absorción laterales (Fig. 13. D); en los segmentos respiratorios no se observó reacción (Fig. 12. F). Los PR se observaron en las células columnares del epitelio uterino del placentoma y paraplacentoma, en las células planas y escamosas de los segmentos respiratorios, en el epitelio uterino de las placas de absorción laterales y en el tejido conectivo uterino (Fig.15.).

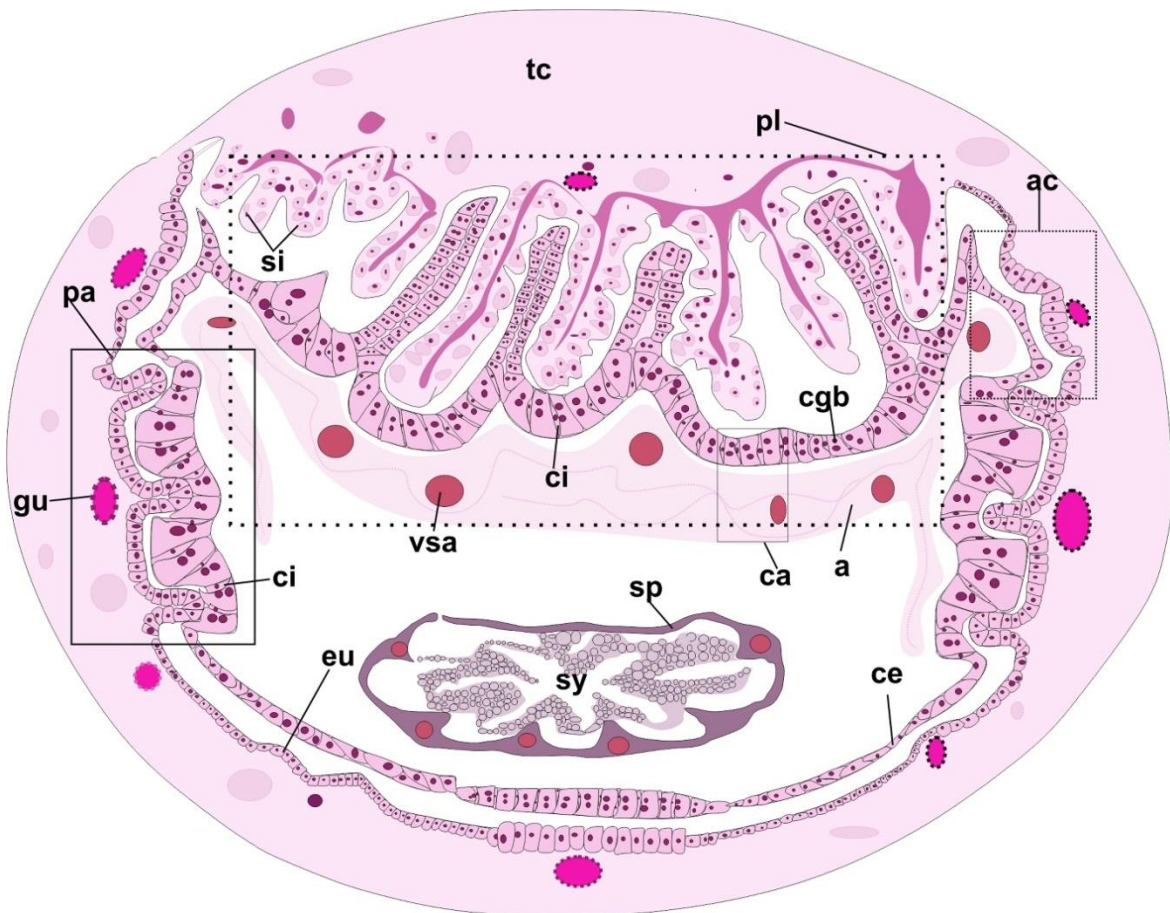


Figura 11. Diagrama de una cámara embrionaria en gestación media (estados 34-36) *Mabuya* sp.

Nota: En este estado de gestación las membranas extraembrionarias y el epitelio uterino forman la placenta corioalantoica, la placa absortiva dorsal muestra muchas características del placentoma, considerándose así en el estado 36 del desarrollo; no se muestra el embrión en la figura. a: alantoides; ac: areolas coriónicas; ce; células coriónicas escamosas; ci: células coriónicas intersticiales; cgb; células coriónicas gigantes binucleadas; eu; epitelio uterino; gu; glándulas uterinas; pl: placentoma en formación; si: sincitio uterino; pa; placa absortiva; tc: tejido conectivo; sp: splacnopleura; vsa: vasos sanguíneos del alantoides; ys: saco de la yema.

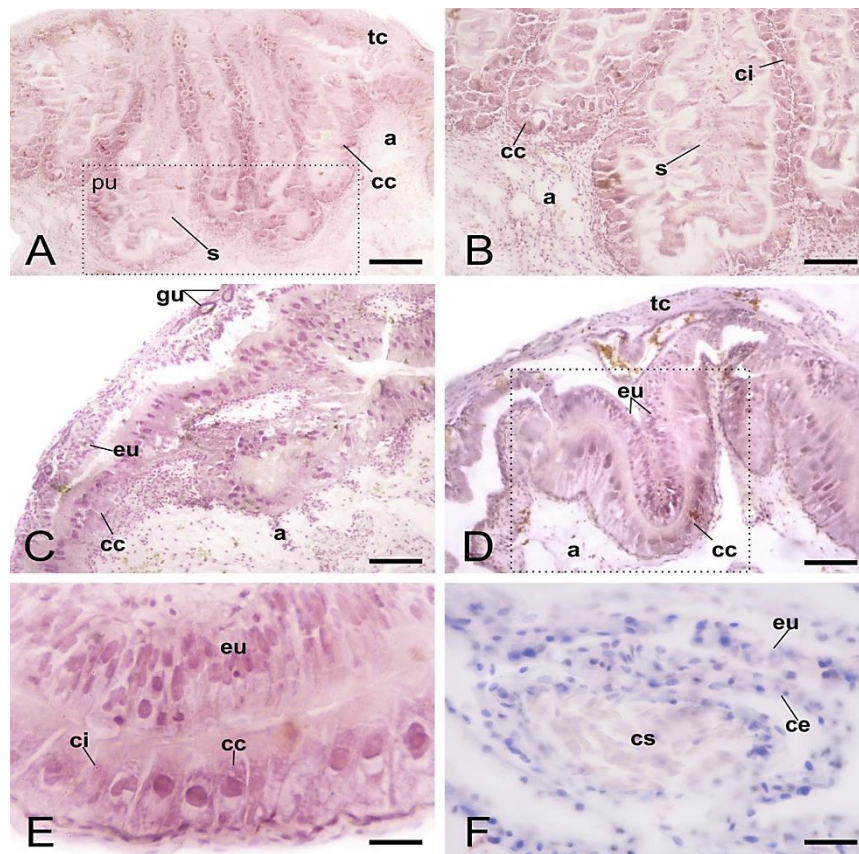


Figura 12. Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación media de *Mabuya* sp. (estados 34-36), tratada con inmunohistoquímica de AB para presencia de 3β HSD.

Nota: El resultado es positivo en el placentoma, areolas coriónicas y placas absortivas, no se encontró tinción en los fragmentos respiratorios (A). Placentoma, el cuadro delimita la zona de contacto entre los pliegues uterinos y el corioalantoides, la tinción marrón (3β HSD-AB) se observa en el epitelio uterino y la células coriónicas, el alantoides no marca. (B).Detalle del placentoma. (C). Placa absortiva dorsal. (D). Areola coriónica, el cuadro encierra la zona de contacto del epitelio uterino y el corioalantoides. (E). Detalle de una placa absortiva. (F). Fragmento respiratorio, no se observa tinción (3β HSD-AB), por lo tanto en esta zona el resultado es negativo. a: alantoides, cc: células coriónicas binucleadas; ci: células coriónicas intersticiales; cs: capilar sanguíneo; eu: epitelio uterino, ec: epitelio coriónico; gu: glándulas uterinas; pu: pliegue uterino; s: sincitio uterino; tc: tejido conectivo. Barra de escala: (A y C): 170 μ m; (B): 80 μ m; (D): 100 μ m; (E y F): 30 μ m.

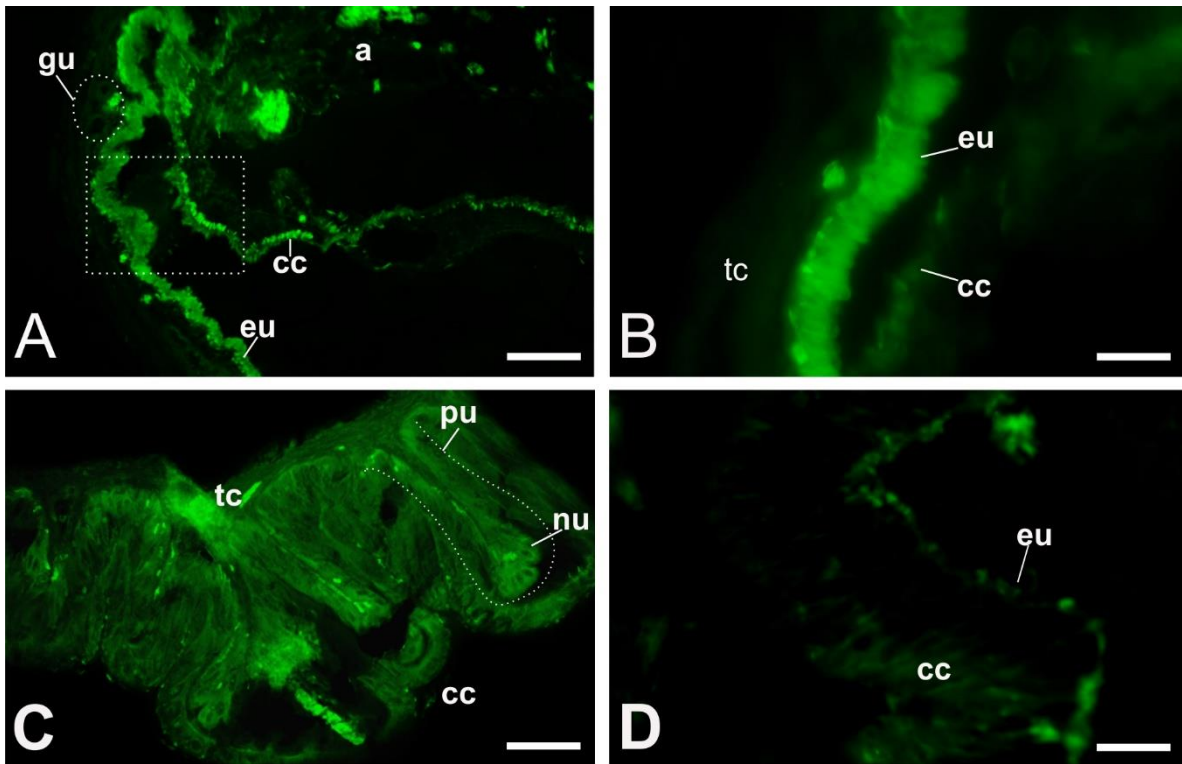


Figura 13. Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación media de *Mabuya* sp.

(estados 34-36), tratada con inmunohistoquímica de FITC para presencia de 3β HSD

Nota: (A). Paraplacentoma, el cuadro delimita la zona de acercamiento del epitelio uterino y el corioalantoides (B). Detalle del paraplacentoma. (C). Placentoma, la línea punteada señala la zona de contacto entre pliegue uterino y las células coriónicas. (D). Placa absortiva. pu: pliegue uterino; tc: tejido conectivo; cc: células coriónicas; eu: epitelio uterino; a: alantoides; gu: glándulas uterinas; nu: núcleos. Barra de escala: (A): 60 μ m. (B y D): 20 μ m (C): 100 μ m.

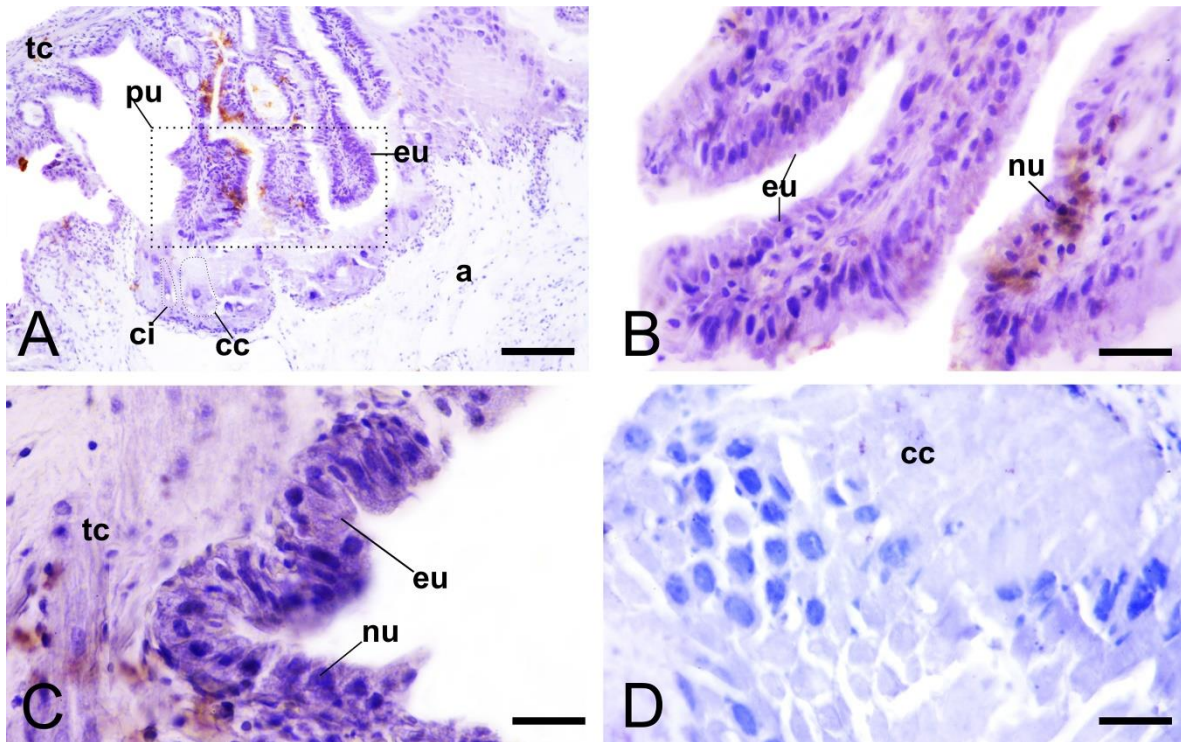


Figura 14. Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación media de *Mabuya* sp. (estados 34-36), tratados con inmunohistoquímica de AB para presencia de PR.

Nota: El resultado es positivo solo para el epitelio uterino y tejido conectivo. (A). Placa absortiva dorsal, el cuadro delimita la zona de contacto entre los pliegues uterinos y el corioalantoides. (B). Detalle de pliegues uterinos. (C). Epitelio uterino del paraplacentoma. (D). Detalle de las células coriónicas del placentoma, no se observa tinción (PR-AB). a: alantoides; cc: células coriónicas; ci: células coriónicas intersticiales; eu: epitelio uterino; nu: núcleos; pu: pliegue uterino tc: tejido conectivo. Barra escala: (A). 100 μ m; (B-D): 30 μ m.

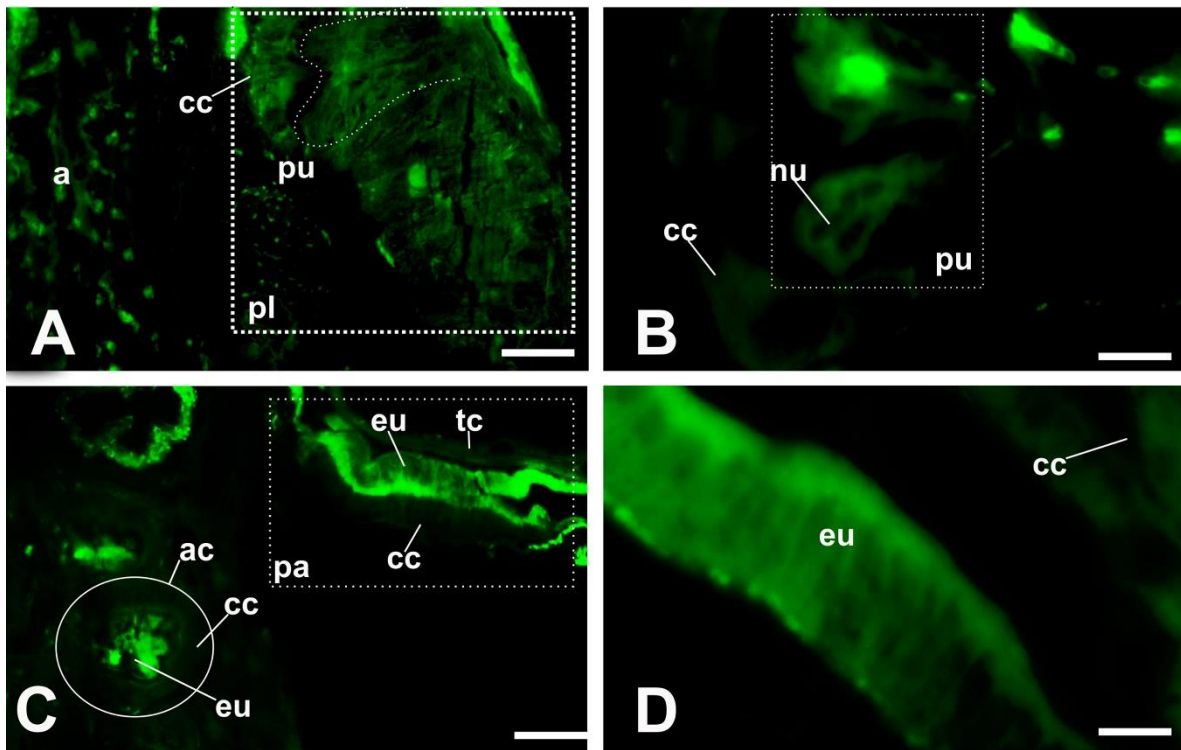


Figura 15. Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación media de *Mabuya* sp. (estados 34-36), tratada con inmunohistoquímica de FITC para presencia de PR.

Nota: el resultado es positivo solo para el epitelio uterino y tejido conectivo. (A). Placentoma, el cuadro delimita la zona de contacto entre los pliegues uterinos y el corioalantoides. (B). Detalle del placentoma, el cuadro delimita un pliegue uterino. (C). Areola coriónica encerrada en el círculo, el cuadro encierra una placa absortiva. (D). Detalle una placa absortiva, las células coriónicas no muestran tinción de evidente (PR-FITC). a: alantoides; ac: areola corónica; cc: células coriónicas; eu: epitelio uterino; nu: núcleos; pa: placa absortiva; pl: placentoma; pu: pliegue uterino; tc: tejido conectivo. Barra de escala: (A): 100 μ m; (B): 30 μ m; (C): 30 μ m; (D): 30 μ m.

3.4. Gestación tardía (estados 39-40, n=3)

Estos últimos estados los embriones están completamente formados y con un tamaño similar al del nacimiento, presentan pigmentación corporal y extremidades completamente formadas con uñas. En las cámaras embrionarias se pudo observar el placentoma, las placas

absortivas y el saco de la yema y alta irrigación sanguínea (Fig.2. E y F). Microscópicamente se observa un placentoma maduro con fuerte interdigitación entre el epitelio uterino y coriónico, los pliegues son profundos. El epitelio luminal forma un sincitio, el útero en esta zona posee abundantes glándulas activas. Los pliegues corioalantóicos están formados por epitelio coriónico bilaminar con una capa basal de células planas y una capa apical formada por las células gigantes binucleadas y las intersticiales, muy delgadas con uno o dos núcleos. El epitelio coriónico descansa sobre un alantoides amplio y vascularizado. En la periferia, rodeando al placentoma se localizó el paraplacentoma; esta es una zona corta no plegada, que delimita al resto de la cámara embrionaria; aquí el epitelio coriónico es bajo, y polimórfico, el epitelio uterino luminal posee células columnares, hay abundantes glándulas uterinas. El paraplacentoma está delimitado del resto de la cámara embrionaria por una invaginación profunda, el pliegue paraplacentomal, aquí el epitelio coriónico es más bajo, y polimórfico, éste subyace sobre un alantoides amplio. A cada lado de la invaginación paraplacentomal, en el segmento que la separa del resto de la cámara embrionaria se observaron segmentos de corión con células externas escamosas y cuboidales, enseguida a este segmento se encontraron las aréolas coriónicas que son pequeñas concavidades de epitelio coriónico columnar mononuclear y células intersticiales delgadas muy similares al del paraplacentoma y con un alantoides subyacente delgado; el epitelio uterino en esta zona es más bajo y permite la salida de glándulas secretoras uterinas activas. En la zona lateral y el hemisferio abembriónico, la placenta se compone de segmentos respiratorios (con epitelios uterino y coriónicos escamosos) alternados con placas de absorción con epitelios coriónico y uterino columnares (Fig. 16).

La producción de progesterona 3β HSD se localizó en el epitelio uterino, en las glándulas uterinas y en las células gigantes del corioalantoides en las regiones del placentoma, paraplacentoma (Fig. 17. A, B y C; Fig. 18.) y en las areolas coriónicas (Fig. 17. E), es decir en el hemisferio embriónico de la placenta, en los elementos del hemisferio abembriónico se observó positivo en las placas de absorción (Fig. 17. D. y F; Fig. 18. B.); los segmentos respiratorios no mostraron reacción positiva.

Los PR se localizaron en el tejido epitelial y conectivo de todos los elementos uterinos de la placenta corioalantoica en los hemisferios embriónico y abembriónico, en esta última etapa de la gestación la intensidad fue menor comparada con los estados anteriores (Fig. 19.).

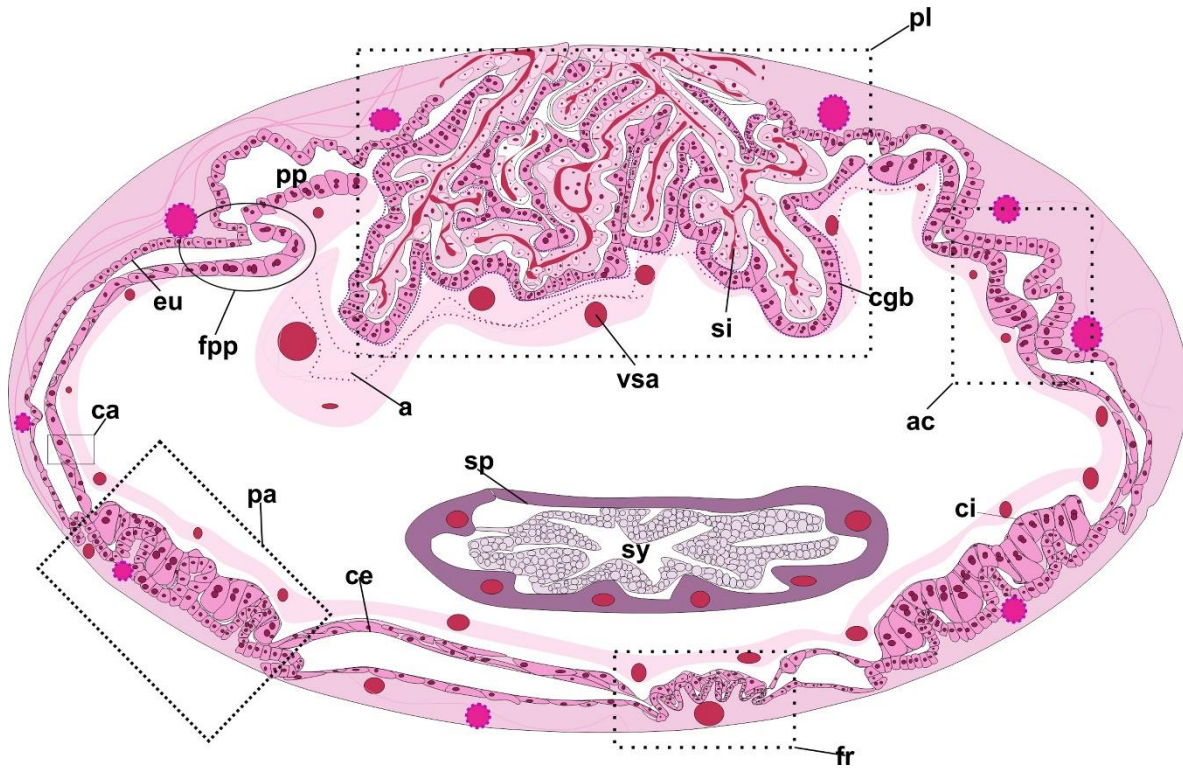


Figura 16. Diagrama de una cámara embrionaria en gestación tardía de *Mabuya sp.*

Nota: En este estado de gestación está presente la placenta corioalantoica, el placentoma maduro, delimitado por una zona no plegada el paraplacentoma; no se muestra el embrión en la figura. a: alantoides; ac: areolas coriónicas; ca: corioalantoides; ce: células coriónicas escamosas; ci: células coriónicas intersticiales; cgb: células coriónicas gigantes binucleadas; eu: epitelio uterino; fpp: pliegue paraplacentomal; pa: placa absortiva lateral; pl: placentoma; si: sincitio uterino; sp: splacnopleura; tc: tejido conectivo; vsa: vasos sanguíneos del alantoides; ys: saco de la yema; pp: paraplacentoma; fr: fragmentos respiratorios.

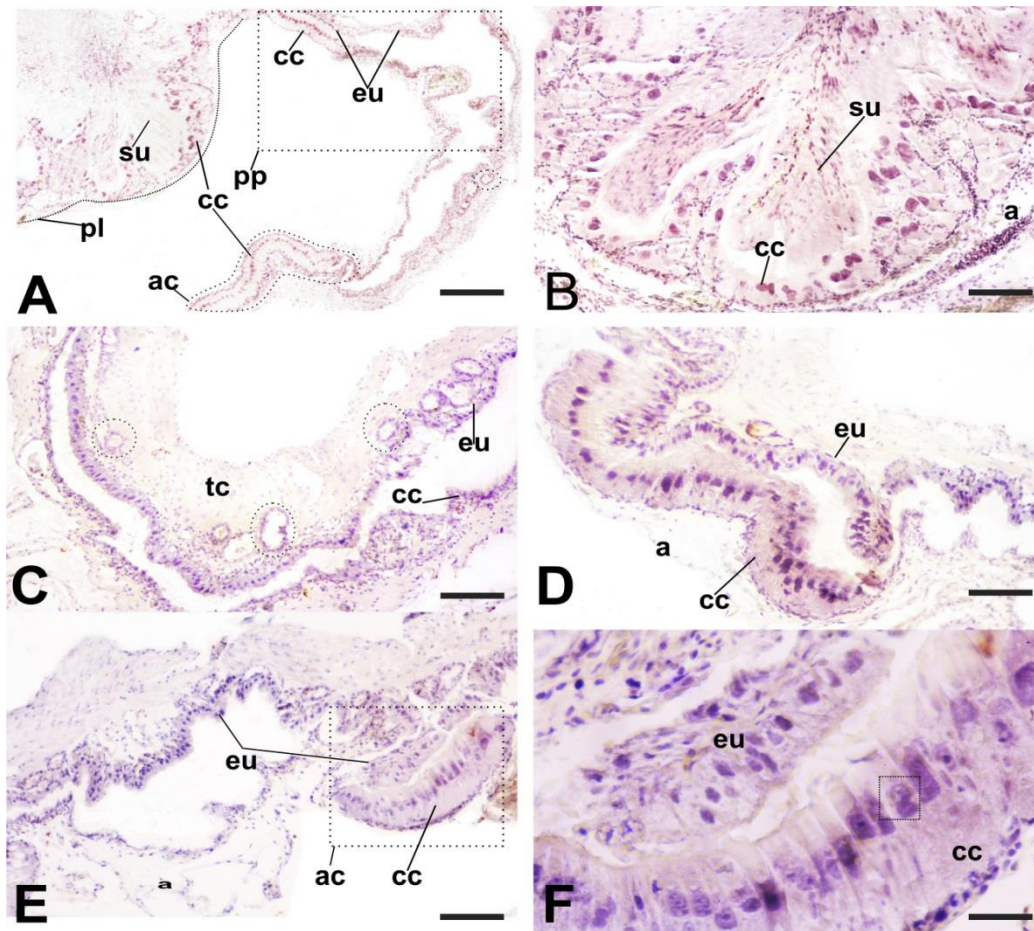


Figura 17. Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación tardía y final de *Mabuya* sp. (estados 39 y 40), tratados con inmunohistoquímica de AB para presencia de 3β HSD.

Nota: (A) Zona mesometrial, la línea punteada señala el placentoma y una areola coriónica, el cuadro encierra el paraplacentoma. (B). Acercamiento del placentoma; se observa un detalle del pliegue uterino y el corioalantoides. (C). Paraplacentoma. (D). Placa absortiva. (E). Areola coriónica. (F). Detalle de la areola coriónica, el cuadro encierra dos núcleos en una célula coriónica. a; alantoides; ac; areola coriónica; cc; células coriónicas columnares; eu; epitelio uterino; gu: glándulas uterinas; pl; placentoma; pp; paraplacentoma; su: sincitio uterino; tc: tejido conectivo. Barras de escala: (A): 230 μ m; (B-C y E): 100 μ m; (D): 80 μ m; (F): 30 μ m.

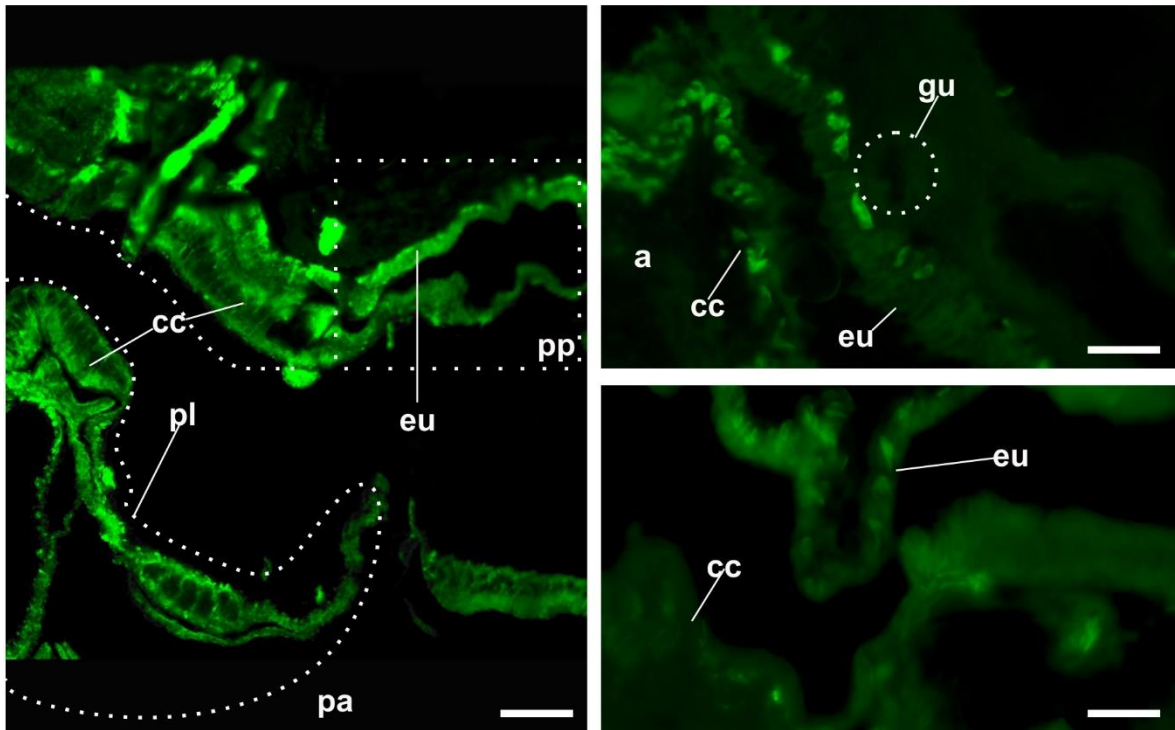


Figura 18. Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación tardía de *Mabuya* sp (estados 39 y 40), tratados con inmunohistoquímica de FITC para presencia de 3β HSD.

Nota: (A). Paraplacentoma, areola coriónica y placa absortiva (B). Detalle de la zona mesometrial, la zona encerrada es una glándula uterina. (C). Acercamiento paraplacentoma. a: alantoides; cc: células coriónicas; eu: epitelio uterino; gu: glándulas uterinas; pa: placa absortiva; pp: paraplacentoma. Barras de escala: (A): 80 μ m; (B y C): 20 μ m.

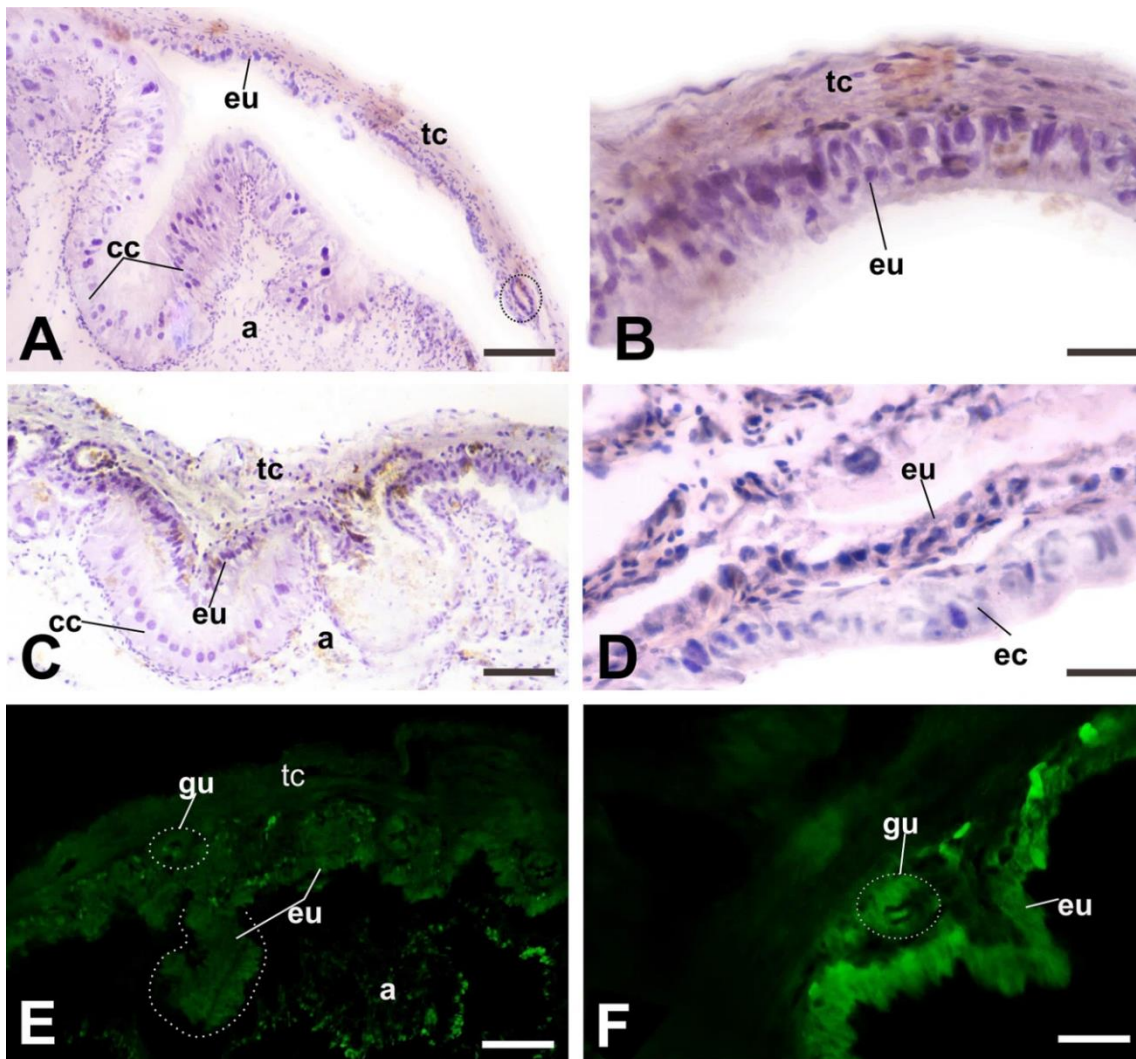


Figura 19. Cortes histológicos de placenta de un embrión en gestación tardía y final de *Mabuya* sp (estados 39 y 40), tratados con inmunohistoquímica de AB y FITC para presencia de PR.

Nota: La reacción solo se observa en los tejidos uterinos. (A). Paraplacentoma. (B). Detalle de los elementos uterinos en el paraplacentoma. (C). Areola coriónica. (D). Detalle de un fragmento respiratorio. (E). Placentoma, la línea punteada delimita un pliegue uterino. (F). Detalle de los elementos uterinos en el paraplacentoma. a: alantoides; eu: epitelio uterino; ec: epitelio coriónico; cc: células coriónicas; gu: glándulas uterinas; tc: tejido conectivo. Barra de escala: (A):100 μ m; (B, D y F): 30 μ m; (C y E): 80 μ m.

3.5. *Western blot* (3 β HSD)

El análisis de *Western blot* con anticuerpo monoclonal para 3 β HSD y anticuerpo secundario FITC en los extractos de placenta mostraron los siguientes resultados (Fig. 20.). La placenta de embrión en estado de gestación media (Fig. 20. Línea 2) presentó una banda muy intensa de peso molecular 47,3 KDa (correspondiente al pm de la enzima), con un volumen de intensidad alto (Fig. 21). En el estado de gestación tardía (Fig. 20. Línea 3) se observó una disminución de aproximadamente tres veces el volumen de intensidad comparada con la gestación media (Fig. 21) y en el estado de gestación temprana (Fig. 20. Línea 4), se observó una banda muy tenue, con un volumen muy bajo, que podría tomarse como el inicio de la aparición de la enzima (3 β HSD) y por tanto el inicio de la producción de progesterona (Fig. 21). La fig. 22 muestra los cambios de intensidad (pixel/saturación) arrojados por el software de análisis Image Lab v.5.2.1. en la placenta y el ovario en los diferentes estados de la gestación. En este caso no se usó un control de Background, por tanto se encontró algunas bandas inespecíficas.

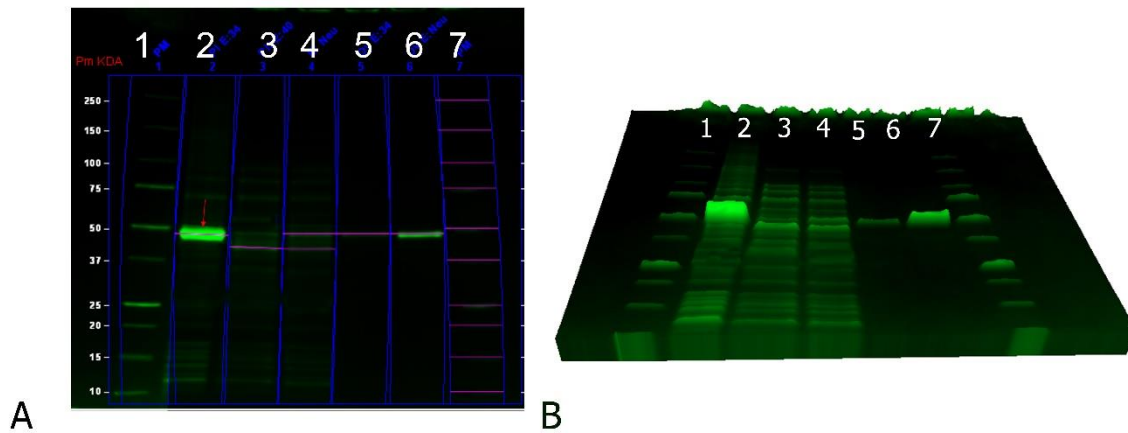


Figura 20. Western blot con anticuerpo monoclonal para 3β HSD y anticuerpo secundario

FITC en los extractos de placenta y ovario en *Mabuya* sp.

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

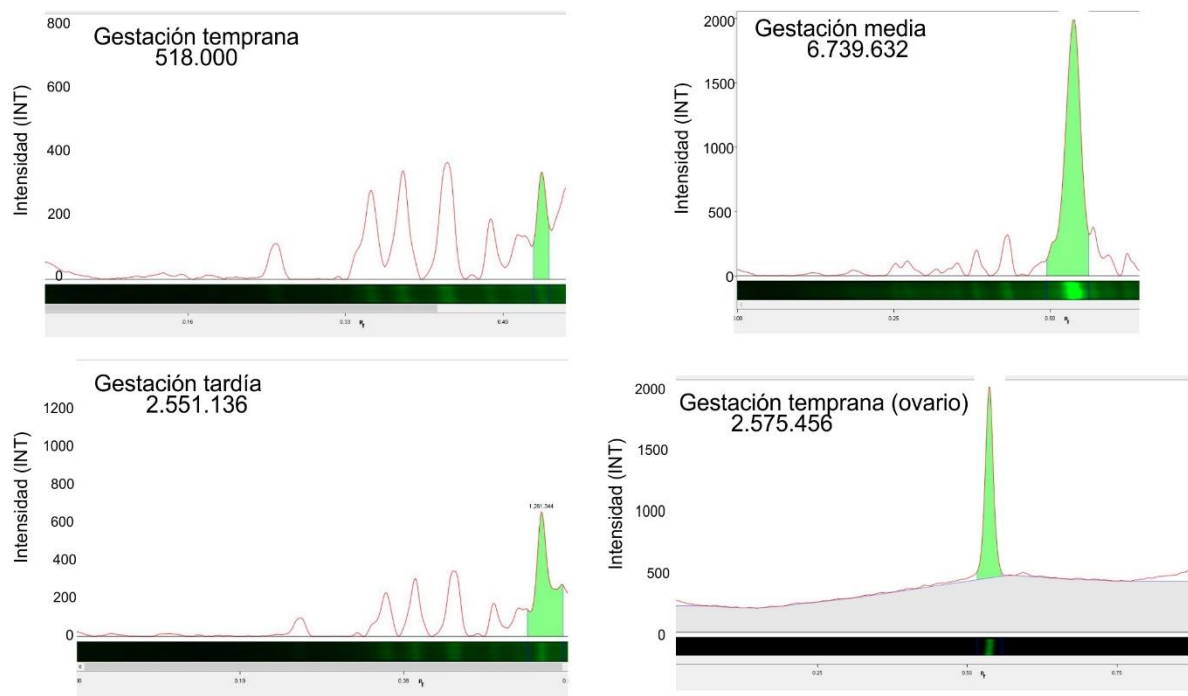


Figura 21. Picos de intensidad de las bandas del western blot con anticuerpo monoclonal para 3β HSD y anticuerpo secundario FITC en los extractos de placenta y ovario de *Mabuya sp.*

Nota: Los valores representan el volumen de intensidad (píxeles/saturación).

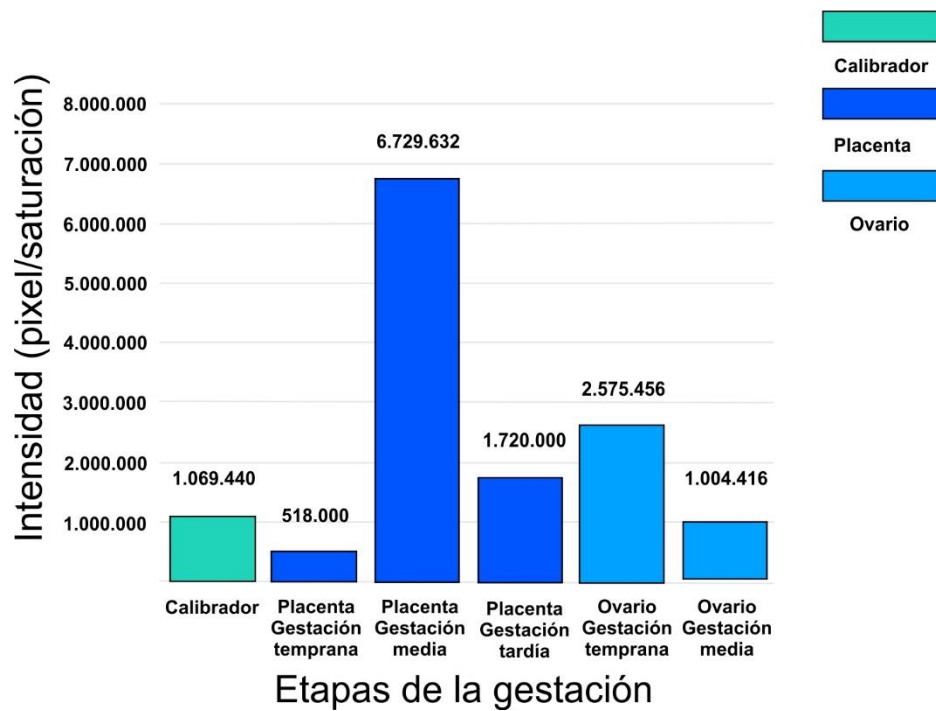


Figura 22. Histograma de intensidad de las bandas del *Western blot* para 3β HSD en los extractos de placenta y ovario de *Mabuya* sp. en diferentes etapas de la gestación.

Nota: Se usó la misma concentración de proteínas en cada carril, se usó un calibrador de peso molecular (Bio-Rad, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards).

Tabla 1. Resumen de los elementos uterino y embrionarios presencia (+) o ausencia (-) de enzima 3β HSD y receptores de progesterona PR en *Mabuya* sp. (++) Mayor concentración, (+) Menor concentración.

Etapa de la gestación/ estado	Elementos de la placenta		HSD	PR
Huevos oviductales	Elementos uterinos	Epitelio uterino	-	++
		Glándulas uterinas	-	-
		Tejido conectivo	-	+
	Elementos embrionarios	Membrana de la cáscara	-	-
		Epitelio uterino	-	++
		Glándulas uterinas	-	-
Temprana/Néurula-Faríngrula	Elementos uterinos	Tejido conectivo	-	+
		Células coriónicas	-	-
		Epitelio uterino	++	++
	Elementos embrionarios	Glándulas uterinas	++	-
		Tejido conectivo	-	++
		Células coriónicas	++	-
Media (Estados 34-36)	Elementos uterinos	Epitelio uterino	++	++
		Glándulas uterinas	++	-
		Tejido conectivo	-	++
	Elementos embrionarios	Células coriónicas	++	-
		Epitelio uterino	++	+
		Glándulas uterinas	+	-
Tardía (Estados 39-40)	Elementos uterinos	Tejido conectivo	-	+
		Células coriónicas	++	-
		Epitelio uterino	++	+
	Elementos embrionarios	Glándulas uterinas	+	-
		Tejido conectivo	-	+
		Células coriónicas	++	-

4. Discusión

El presente estudio permite evidenciar la producción de progesterona por los tejidos uterinos y embrionarios de la alantoplacenta de *Mabuya* sp. La producción de P4 por parte de la placenta inicia entonces en los estados posteriores a la faríngrula y se mantiene hasta el final de la gestación. Esta producción ocurre simultáneamente con la degeneración del cuerpo lúteo a nivel ovárico.

La placenta de otras especies de lagartos vivíparos ha demostrado también tener actividad estereidogénica relacionada con el proceso de luteólisis, por ejemplo en *Sceloporus jarrovi* la luteólisis inicia hacia la mitad de la gestación (Guillette *et al.*, 1981) y la producción de P4 por parte de la placenta está activa al final de la gestación (Painter y Moore, 2005), la alantoplacenta de *S. jarrovi* es de las más simples en los lagartos vivíparos (tipo I, Weekes, 1935).

En *Barisia imbricata imbricata*, una lagartija ánguیدا vivípara que posee una placenta igualmente simple (en la región mesometrial una placenta corioalantoica altamente vascularizada y plegada, mientras que en el polo antimesometrial tiene una onfaloplacenta), el cuerpo lúteo sufre regresión al finalizar la primera mitad de la gestación. En la segunda mitad hay actividad esteroidogénica a partir de la onfaloplacenta, ya sea para producir hormonas como la progesterona, o bien para depurar esteroides producidos por la hembra gestante (Martínez-Torres *et al.*, 2006; Martínez-Torres *et al.*, 2006).

En *Chalcides chalcides*, un scincido vivíparo con una placenta especializada y placentotrofia substancial, que provee nutrientes para el desarrollo fetal (Tipo III; Weekes 1935; Blackburn y Callard, 1997), se encontró que la localización de la 3β HSD es exclusiva del componente materno e inicia hacia el final de la gestación, la luteólisis en esta especie inicia durante la mitad de la gestación, por lo que la producción de P4 por la placenta al final de la gestación relevaría la producida en el cuerpo lúteo que se ha degenerado en esta fase (Guarino *et al.*, 1998).

Así, las especies de lagartijas vivíparas muestran variación en la vida útil del cuerpo lúteo y en si es necesario o no para el mantenimiento de la gestación a término, al ser relevada su función por la placenta (Blackburn, 2015). Por otro lado la producción de la progesterona por parte de la placenta puede ser tan frecuente en especies con placentas simples como en aquellas con mayor complejidad (Painter y Moore, 2005). Demostrando así que esta función no depende de la complejidad estructural de la placenta, más bien que la presencia o ausencia de esta característica puede estar relacionada con otros aspectos gestacionales como puede ser el tiempo en el que inicia la luteólisis y/o la duración gestacional.

Para mamíferos se ha visto por ejemplo que en el perro doméstico, la enzima 3β HSD se encontró en el CL hasta el día 40 (gestación aprox. 60 días) en las zonas marginales, su producción permanece baja hasta el final de la gestación; sin embargo, no se confirmó ninguna reacción en los tejidos placentarios (Nishiyama *et al.*, 1999). En la cabra japonesa *Capra aegagrus hircus* se encontraron resultados similares, la fuente principal de progesterona durante la gestación es el CL y no la placenta (Weng *et al.*, 2005). En mamíferos con periodos de gestación largos como la vaca se ha encontrado que la placenta toma el rol de productor de P4

tras la luteólisis, durante el último tercio de la gestación, esta especie tiene un periodo largo de gestación de 283 días (8 meses) (Schuler *et al.*, 1994); en el caballo se encontró que la placenta produce progesterona a partir de la mitad hasta finalizada la gestación, su periodo de gestación dura alrededor de 335 días (10 meses) (Han *et al.*, 1995). Por tanto, se ha observado que en mamíferos eutherios con cortos periodos de gestación, es el cuerpo lúteo y no la placenta, el principal tejido productor de P4, por el contrario cuando la gestación es más larga que la fase luteal es necesario un mecanismo que permita la continuidad de producción de progesterona, en el caso de *Mabuya* sp. así como en los mamíferos antes mencionados es la placenta (Ryan, 1971).

En *Mabuya* sp. la producción de progesterona se concentra en sitios específicos de la placenta, donde la unión de los elementos maternos y embrionarios es estrecha y sus células son más grandes y tienen características especiales a las observadas en otras partes de la placenta. Por ejemplo durante la gestación media se produce en el epitelio uterino (las células son cúbicas con un amplio citoplasma) y coriónico de la PAD, en el placentoma y en las placas de absorción laterales; y en la tardía, en las células del epitelio uterino y en las células coriónicas gigantes binucleadas en el placentoma, en el paraplacentoma, en las areolas coriónicas y en las placas absortivas.

Aunque en otros reptiles no se ha evaluado la producción de P4 en estructuras similares, este resultado sí es similar a lo encontrado en algunos mamíferos euterios. En bovinos, los sitios primarios de estereidogénesis en la gestación tardía, son los cotiledones fetales (representado por células coriónicas) y los carúnculos (componente uterino), estos forman sitios múltiples de

interdigitación materno-fetal, llamados también placentomas; la producción de progesterona se observó específicamente en la células gigantes binucleadas del trofoblasto (similares a las encontradas en *Mabuya* sp.) y en menos concentración en el epitelio caruncular (epitelio uterino) (Schuler *et al.*, 2008; Schuler *et al.*, 1999). En los equinos la actividad de la enzima 3 β HSD a partir de la mitad de la gestación, fue localizada en las células del trofoblasto, de unas estructuras esparcidas por toda la placenta, los microcotiledones; en éstos el epitelio uterino (cripta) y el corioalantoides forman interdigitaciones similares al placentoma de *Mabuya* sp (Arai *et al.*, 2006).

En otros mamíferos euterios (con alantoplacentas regionalmente diferenciadas) como en la oveja, la producción de progesterona inicia en la gestación media por las células del trofoblasto (Ricketts y Flint, 1980). Para placentas difusas y no regionalmente diferenciadas, en el caso de la ballena antártica *Balaenoptera bonaerensis*, se detectó actividad estereidogénica (P450_{scc}) durante la gestación media, en las células del trofoblasto alrededor de toda la placenta, en la región supranuclear de la células, la cual entra en contacto con el epitelio endometrial, en las células de las interdigitaciones con el endometrio, que se especializan en el intercambio de gases y la síntesis de hormonas (Sasaki *et al.*, 2013; Sasaki *et al.*, 2014). Aunque se han encontrado variaciones, por ejemplo en el gato doméstico la producción de P4 proviene de las células deciduales (uterinas) de la placenta y en muy baja cantidad en la células del trofoblasto en las zonas de máxima interdigitación; así el componente materno por tanto es la fuente principal de P4 y difiere de lo encontrado en los demás mamíferos estudiados hasta ahora (Siemieniuch *et al.*, 2012).

Esta información indica que en la mayoría de los casos estudiados (escamados vivíparos y mamíferos euterios) hay actividad estereoidogénica placentaria, y específicamente producción de progesterona que se localiza preferencial pero no exclusivamente en las células coriónicas, las cuales poseen gran tamaño, amplio citoplasma y en su mayoría son binucleadas (Hoffman y Wooding, 1993; Jerez y Ramírez-Pinilla, 2001), Estas características más la cercanía e interrelación con los tejidos maternos, parecen ser comunes y favorables para la síntesis de esta hormona durante la gestación.

Los resultados del *Western blot* en los tejidos placentarios de *Mabuya* sp. confirmaron que en estados muy tempranos la expresión de la enzima es nula, en estados embrionarios medios es máxima, y en la gestación tardía disminuye un poco más de la mitad, probablemente para dar paso a los movimientos uterinos que permiten el parto. En gatos domésticos se han encontrado resultados similares; al realizar perfiles de concentración de la progesterona en tejidos placentarios las concentraciones de progesterona fueron bajas en gestación temprana, aumentaron en gestación media y disminuyeron de nuevo en gestación tardía (Braun *et al.*, 2012). Estos cambios en la expresión de 3β HSD a lo largo de la gestación, podrían explicarse primero por el rol que toma la placenta al reemplazar el cuerpo lúteo en la producción de P4 hacia la mitad de la gestación, y al final por la reducción del suministro de sustrato, un mayor metabolismo dentro del tejido y/o menos acceso a esteroides externos y por tanto una disminución en la producción de P4; esto indicaría la posible co-expresión de varias enzimas involucradas en el metabolismo de los esteroides en la placenta, que confieren un mecanismo regulatorio para el mantenimiento de las diferentes concentraciones P4, necesarias para la progresión y término de la gestación (Li *et al.*, 2005).

La expresión de PR en la placenta de *Mabuya* sp. se observó durante todos los estados de gestación, localizada en el tejido conectivo y el epitelio uterino de toda la placenta. En algunas zonas la reacción se limitaba al citoplasma principalmente durante la gestación temprana, mientras que durante la gestación media y tardía se encontraban tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células epiteliales uterinas. Estos tejidos son los principales blancos de la acción de la P4, induciendo la inmovilidad uterina durante la gestación (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004). Además, se ha visto que un buen número de genes en el útero de mamíferos como roedores, humanos y primates están directamente regulados por la progesterona, sin embargo, su control y función no han sido esclarecidos todavía (Graham y Clarke, 1997). El receptor de progesterona no solo usa sus funciones nucleares clásicas, también participa como señalizador no genómico en la membrana celular, además de su habilidad de unirse al ligando en el citoplasma, dimerizándose y entrando al núcleo para unirse al ADN resultando en la activación de los genes blanco, de modo que se puede encontrar tanto en el citoplasma como en el núcleo, y esto depende de la función que esté realizando en el momento (Wetendorf y DeMayo, 2014).

La expresión de PR ha sido descrita en tejidos conocidos por responder a estas señales de la P4, principalmente el útero, el ovario y el hígado, y por lo tanto los resultados confirman el papel autorregulador de la P4 durante la gestación (Al-Amri *et al.*, 2012).

En *Mabuya* sp. la expresión de los PR disminuyó al final de la gestación. Así mismo, en el cerdo los PR se localizan en el epitelio uterino, el miometrio y las glándulas uterinas, desde la gestación temprana hasta poco antes del parto, disminuyendo su expresión hacia final de la

gestación expresándose solo en el miometrio y las células del estroma uterino. Durante el último tercio de la gestación no se observaron PR evidentes (Steinhauser *et al.*, 2016), sin embargo es probable que se deba a una muy baja concentración de estos para la permitir la movilidad uterina y dar paso al parto.

En la mayoría de mamíferos domésticos el estroma uterino y las células miometriales siempre expresan PR y pueden responder a la progesterona por la producción de factores paracrinos que regulan la proliferación y las diferentes funciones de los componentes uterinos durante la preñez (Spencer *et al.*, 2004). En bovinos los PR se expresan en la células del estroma caruncular de los placentomas, donde se puede observar proximidad del sitio de producción del ligando (P4). Esto puede reforzar la idea de P4 placentar como un factor paracrino envuelto en la regulación y el mantenimiento de la gestación (Schuler *et al.*, 1999; Schuler *et al.*, 1999).

5. Conclusiones

Basados en la detección de la enzima 3β HSD y los PR se concluye que la placenta corioalantoica de *Mabuya sp* es un órgano endocrino con la capacidad de producir progesterona en reemplazo del cuerpo lúteo. Este papel endocrino en la producción de la P4 se asocia con su complejidad y converge con el de mamíferos euterios.

Los cambios de concentración de P4 y la presencia de PR en el útero, señalan la capacidad que tienen los elementos uterinos de la placenta para responder a la presencia o ausencia de P4, y

muestran el papel autorregulador que tiene este tejido y su importancia en el mantenimiento y fin de la gestación.

La presencia de los PR en citoplasma y núcleo de las células confirman su papel dual como receptor nuclear y también señalizador no genómico en la membrana celular.

Bibliografía

- Albergotti, L. C., Hamlin, H. J., McCoy, M. W. y Guillette Maabu, L. J. (2009). Endocrine activity of extraembryonic membranes extends beyond placental amniotes. *Plos One*, 4(5), 5452.
- Al-Amri, I. S., Mahmoud, I. Y., Waring, C. P., Alkindi, A. Y., Khan, T. y 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(1), 46-54.
- Arai, K. Y., Tanaka, Y., Taniyama, H., Tsunoda, N., Nambo, Y., Nagamine, N. y Taya, K. (2006). Expression of inhibins, activins, insulin-like growth factor-I and steroidogenic enzymes in the equine placenta. *Domestic animal endocrinology*, 31(1), 19-34.
- Avila-Pires, T. S. C. (1995). Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata) reproductive activity of. *Mabuya mabouya*. *Zoologische Verhände*, 299(1), 1-706.
- Biazik, J. M., Parker, S. L., Murphy, C. R., y Thompson, M. B. (2012). Uterine Epithelial Morphology and Progesterone Receptors in a Mifepristone-treated Viviparous Lizard *Pseudemoia entrecasteauxii* (Squamata: Scincidae) During Gestation. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 318(2), 148-158.

- Blackburn, D. G. (1993). Chorioallantoic placentation in squamate reptiles: structure, function, development, and evolution. *Journal of Experimental Zoology*, 266(5), 414-430.
- Blackburn, D. G. (2006). Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs*, 20(1), 131-146.
- Blackburn, D. G. y Vitt, L. J. (1992). Reproduction in viviparous South American lizards of the genus *Mabuya*. En *Reproductive biology of South American vertebrates*. Springer New York. 150-164.
- Blackburn, D. G. (2015). Evolution of viviparity in squamate reptiles: Reversibility reconsidered. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 324(6), 473-486.
- Blackburn, D. G. y Callard, I. P. (1997). Morphogenesis of placental membranes in the viviparous, placentotrophic lizard *Chalcides chalcides* (Squamata: Scincidae). *Journal of Morphology*, 232(1), 35-55.
- Braun, B. C., Zschockelt, L., Dehnhard, M. y Jewgenow, K. (2012). Progesterone and estradiol in cat placenta—biosynthesis and tissue concentration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 132(3), 295-302.

- Brawand, D., Wahli, W., y Kaessmann, H. (2008). Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. *Plos Biology*, 6(3), e63.
- Callard, I. P., Bayne, C. G. y McConnell, W. F. (1972). Hormones and reproduction in the female lizard *Sceloporus cyanogenys*. *General and Comparative Endocrinology*, 18(1), 175-194.
- Callard, I. P., Fileti, L. A., Perez, L. E., Sorbera, L. A., Giannoukos, G., Klosterman, L. L. y McCracken, J. A. (1992). Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. *American Zoologist*, 32(2), 264-275.
- Callard, I. P., Etheridge, K., Giannoukos, G., Lamb, T. y Perez, L. (1991). The role of steroids in reproduction in female elasmobranchs and reptiles. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(4), 571-575.
- Callard, I. P. y Hirsch, M. (1976). The influence of estradiol-17 β and progesterone on the contractility of the oviduct of the turtle, *Chrysemys picta* in vitro. *Journal of Endocrinology*, 68, 147-152.
- Centlow, M., Hansson, S. R. y Welinder, C. (2009). Differential proteome analysis of the preeclamptic placenta using optimized protein extraction. *BioMed Research International*, 2010.

Custodia-Lora, N. y Callard, I. P. (2002). Progesterone and progesterone receptors in reptiles.

General and Comparative Endocrinology, 127(1), 1-7.

Dufaure, J. P. y Hubert, J. (1961). Table de development du lezard vivipare: *Lacerta (Zootoca)*

vivipara Jaquin. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 50, 309–328.

Farag, A. (1983). Histology of the ovary of the viviparous Wiegmann's skink *Mabuya*

brevicollis during its gestation period. *Annals of Zoology (Agra)*, 20, 147-165.

Giannoukos, G. y Callard, I. P. (1995). Reptilian (*Chrysemys picta*) hepatic progesterone

receptors: Relationship to plasma steroids and the vitellogenic cycle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 55, 93–106.

Girling, J. E. y 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(1), 100-108.

Gómez, D. y Ramírez-Pinilla, M. P. (2004). Ovarian histology of the placentotrophic *Mabuya*

mabouya (Squamata, Scincidae). *Journal of morphology*, 259(1), 90-105.

Graham, J. D. y Clarke, C. L. (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues 1.

Endocrine reviews, 18(4), 502-519.

- Guarino, F. M., Paulesu, L., Cardone, A., Bellini, L., Ghiara, G. y 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., DeMarco, V. y Palmer, B. D. (1991). Exogenous progesterone or indomethacin delays parturition in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. *General and Comparative Endocrinology*, 81(1), 105-112.
- Guillette, Jr, L. J., Spielvogel, S. y 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.
- Guraya, S. S. (1989). Follicular atresia. In *Ovarian Follicles in Reptiles and Birds*. Springer Berlin Heidelberg, 201-238.
- Han, X., Rossdale, P. D., Ousey, J., Holdstock, N., Allen, W. R., Silver, M. y Ensor, C. M. (1995). Localisation of 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase (PGDH) and steroidogenic enzymes in the equine placenta. *Equine veterinary journal*, 27(5), 334-339.
- Highfill, D. R. y Mead, R. A. (1975). Sources and levels of progesterone during pregnancy in the garter snake, *Thamnophis elegans*. *General and Comparative endocrinology*, 27(3), 389-400.

- Hernández-Franyutti, A, Aranzábal, M. C. U. y Guillette, Jr, L. J. (2005). Oogenesis in the viviparous matrotrophic lizard *Mabuya brachypoda*. *Journal of Morphology*, 265:152–164.
- Hoffman, L. H. y Wooding, F. B. P. (1993). Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *Journal of Experimental Zoology*, 266(6), 559-577.
- Jerez, A. y Ramírez-Pinilla, M. P. (2001). The allantoplacenta of *Mabuya mabouya* (Sauria, Scincidae). *Journal of Morphology*, 249(2), 132-146.
- Jerez, A. y Ramírez-Pinilla, M. P. (2003). Morphogenesis of extraembryonic membranes and placentation in *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology*, 258(2), 158-178.
- Jones, R. E. y 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.
- Leal, F. y Ramírez-Pinilla, M. P. (2008). Morphological variation in the allantoplacenta within the genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). *The Anatomical Record*, 291(9), 1124-1139.
- Laemmli, U- K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:280–285.

- Leong, A. S. y Leong, T. Y. (2006). Newer developments in immunohistology. *Journal of Clinical Pathology*, 59(11), 1117-1126.
- Li, Y., Isomaa, V., Pulkka, A., Herva, R., Peltoketo, H. y Vihko, P. (2005). Expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas. *Placenta*, 26(5), 387-392.
- Mahmoud, I. Y., Colas, A. E., Woller, M. J. y Cyrus, R. V. (1986). Cytoplasmic progesterone receptors in uterine tissue of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Endocrinology*, 109, 385–392.
- Martínez-Torres, M. (1997). Placentación y participación del cuerpo lúteo en el mantenimiento de la gestación de *Barisia imbricata imbricata*—una perspectiva evolutiva-(Reptilia: Anguidae). Tesis de Maestría, FES Iztacala UNAM, México.
- Martínez-Torres, M., Álvarez-Rodríguez, C. y 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 Herpetológica de México*, 51, 401-406.

- Martínez-Torres, M., Salcedo-Álvarez, M., Álvarez-Rodríguez, C., Cárdenas-León, M., Luis, J. y Moreno-Fierros, L. (2014). Does the conceptus of the viviparous lizard *Barisia imbricata imbricata* participates in the regulation of progesterone production and the control of luteolysis?. *Animal Reproduction Science*, 148(3), 212-220.
- Mausfeld, P., Schmitz, A., Böhme, W., Misof, B., Vrcibradic, D. y Rocha, C. F. D. (2002). Phylogenetic affinities of *Mabuya atlántica* (Schmidt, 1945), endemic to the Atlantic Ocean Archipelago of Fernando de Noronha (Brazil): Necessity of partitioning the genus *Mabuya* (Fitzinger, 1826) (Scincidae: Lygosominae). *Zoologischer Anzeiger*, 241: 281–293.
- McKenna, N. J. y O'Malley, B. W. (2002). Minireview: nuclear receptor coactivators—an update. *Endocrinology*, 143(7), 2461-2465.
- Mensah-Nyagan, A. G., Feuilloley, M., DuPont, E., Do-Rego, J. L., Leboulenger, F., Pelletier, G. y Vaudry, H. (1994). Immunocytochemical localization and biological activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *The Journal of Neuroscience*, 14(12), 7306-7318.
- Miller, W. L., y Auchus, R. J. (2010). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*, 32(1), 81-151.

- Miralles, A., Fuenmayor, G. R., Bonillo, C., Schargel, W. E., Barros, T., García-Perez, J. E. y 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.
- Mulac-Jericevic, B. y Conneely, O. M. (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*, 128(2), 139-146.
- Nishiyama, T., Tsumagari, S., Ito, M., Kimura, J., Watanabe, G., Taya, K. y 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.
- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K. y McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, 80(1), 1-29.
- Norris, D. O. y Lopez, K. H. (Eds.). (2010). Hormones and reproduction of vertebrates (Vol. 1). *Academic Press*.
- Painter, D. L. y 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.

- Paolucci, M. y Di Cristo, C. (2002). Progesterone receptor in the liver and oviduct of the lizard *Podarcis sicula*. *Life Sciences*, 71(12), 1417-1427.
- Pasanen, S., Ylikomi, T., Syvala, H. y Tuohimaa, P. (1997). Distribution of progesterone receptor in chicken: Novel target organs for progesterone and estrogen action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 135, 79-91.
- Pinto-Sánchez, N. R., Calderón-Espinosa, M. L., Miralles, A., Crawford, A. J. y 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.
- Power, R. F., Conneely, O. M. y O'Malley, B. W. (1992). New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 318-323.
- Ramírez-Pinilla, M. P., Serrano, V. H. y Galeano, J. C. (2002). Annual reproductive activity of *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Herpetology*, 36(4), 667-677.
- 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(1), 194-204.

- Ramírez-Pinilla, M. P., De Pérez, G., y 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., y 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.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology Online*, 42(4), 405-426.
- Ramos-Vara, J. A. y Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology Online*, 51(1), 42-87.
- Riley, D., Reese, J. C. y Callard, I. P. (1988). Hepatic progesterone receptors: Characterization in the turtle *Chrysemys picta*. *Endocrinology*, 123, 1195–1201.

- Ricketts, A. P. y Flint, A. P. F. (1980). Onset of synthesis of progesterone by ovine placenta. *Journal of Endocrinology*, 86(2), 337-347.
- Ryan, K. J. (1971). Endocrine control of gestational length: a time to be born. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 109(2), 299-306.
- Rocha, C. F. D. y Vrcibradic, D. (1999). Reproductive traits of two sympatric viviparous skinks (*Mabuya macrorhyncha* and *Mabuya agilis*) in a Brazilian restinga habitat. *Journal of Herpetology*, 9:43–53.
- Rothchild, I. (1981). The regulation of mammalian corpus luteum. *Recent Progress in Hormone Research*, 37, 183–298.
- Sasaki, M., Amano, Y., Hayakawa, D., Tsubota, T., Ishikawa, H., Mogoe, T. y Budipitojo, T. (2013). Structure and steroidogenesis of the placenta in the Antarctic minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*). *Journal of Reproduction and Development*, 59(2), 159-167.
- Sasaki, M., Amano, Y., Hayakawa, D., Tsubota, T., Ishikawa, H., Mogoe, T. y Budipitojo, T. (2014). Areolae of the placenta in the Antarctic minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*). *Journal of Reproduction and Development*, 60(1), 62-67.
- Schrader, W. T., y O'Malley, B. W. (1978). Molecular structure and analysis of progesterone receptors. *Receptors and hormone action*, 2, 189-224.

- Schuler, G., Hartung, F., y Hoffmann, B. (1994). Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. *Experimental and Clinical Endocrinology y Diabetes*, 102(03), 169-174.
- Schuler, G., Wirth, C., Klisch, K., Pfarrer, C., Leiser, R. y Hoffmann, B. (1999). Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biology of Reproduction*, 61(3), 797-801.
- Schuler, G., Greven, H., Kowalewski, M. P., Döring, B., Özalp, G. R. y Hoffmann, B. (2008). Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation? *Experimental and Clinical Endocrinology y Diabetes*, 116(07), 429-436.
- Siemieniuch, M. J., Jursza, E., Szostek, A. Z., Skarzynski, D. J., Boos, A. y Kowalewski, M. P. (2012). Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1.
- Sites, Jr, J. W., Reeder, T. W. y 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.

- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C. y Bazer, F. W. (2004). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction*, 71(1), 2-10.
- Steinhauser, C. B., Bazer, F. W., Burghardt, R. C. y Johnson, G. A. (2016). Expression of progesterone receptor in the porcine uterus and placenta throughout gestation: correlation with expression of uteroferrin and osteopontin. *Domestic Animal Endocrinology*, 58, 19-29.
- Stevaux, M. N. (1993). Estrategía reproductiva de *Mabuya* sp. (Sauria: Scincidae): um padrão geral de reprodução para o gênero na região neotropical. *Revista Nordestina de Biologia*, 8, 61-86.
- Stewart, J. R. (1993). Yolk sac placentation in the reptiles: structural innovation in a fundamental vertebrate fetal nutrition system. *Journal Experimental Zoology*, 266, 430-449.
- Stewart, J. R. y Thompson, M. B. (2000). Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, 127(4), 411-431.

- Suzuki, T., Sasano, H., Kimura, N., Tamura, M., Fukaya, T., Yajima, A. y Nagura, H. (1994). Immunohistochemical distribution of progesterone androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: Relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Human Reproduction*, *91*, 589–595.
- Teixeira, R. L., Rocha, C. F. D., Vrcibradic, D. y Cuzzuol, M. G. T. (2003). Ecology of *Mabuya agilis* (Squamata: Scincidae) from a montane Atlantic Rainforest area in southeastern Brazil. *Cuaderno de herpetologia*, *17*, 101–109.
- Thompson, M. B., Speake, B. K., Stewart, J. R., Russell, K. J. y McCartney, R. J. (2001). Placental nutrition in the Tasmanian skink, *Niveoscincus ocellatus*. *Journal of Comparative Physiology B*, *171*(2), 155-160.
- Thompson, M. B., Stewart, J. R., Speake, B. K., Hosie, M. J., y Murphy, C. R. (2002). Evolution of viviparity: what can Australian lizards tell us?. *Biochemistry and Molecular Biology*, *131*(4), 631-643.
- Tokarz, R. R., Crews, D. y McEwen, B. S., (1981). Estrogen-sensitive progestin binding sites in the brain of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Brain Research*, *220*, 95–105.
- Vieira, S., de Pérez, G. R. y 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*(6), 738-749.

- Vitt, L. J. y Blackburn, D. G. (1983). Reproduction in the lizard *Mabuya heathi* (Scincidae): a commentary on viviparity in new world *Mabuya*. *Canadian Journal of Zoology*, 61(12), 2798-2806.
- Vitt, L. J. y Blackburn, D. G. (1991). Ecology and life history of the viviparous lizard *Mabuya bistrriata* (Scincidae) in the Brazilian Amazon. *Copeia*, 916-927.
- Vonier, P. M., Guillette, Jr., L. J., McLachlan, J. A. y Arnold, S. F. (1997). Identification and characterization of estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232, 308–312.
- Vrcibradic, D. y 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.
- Vrcibradic, D. y Rocha, C. F. D. (1998). Reproductive cycle and life-history traits of the viviparous skink *Mabuya frenata* in southeastern Brazil. *Copeia*, 612-619.
- Weekes, H. C. (1935, September). A Review of Placentation among Reptiles with, particular regard to the Function and Evolution of the Placenta. In Proceedings of the Zoological Society of London (Vol. 105, No. 3, pp. 625-645). Blackwell Publishing Ltd.

- Wetendorf, M. y DeMayo, F. J. (2014). Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. *The International Journal of Developmental Biology*, 58, 95.
- Weng, Q., Medan, M. S., Ren, L., Watanabe, G., Tsubota, T. y Taya, K. (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.
- Wooding, F. B. P., Ramirez-Pinilla, M. P. y Forhead, A. S. (2010). Functional studies of the placenta of the lizard *Mabuya* sp. (Scincidae) using immunocytochemistry. *Placenta*, 31(8), 675-685.
- 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.
- Yaron, Z. (1972). Endocrine aspects of gestation in viviparous reptiles. *General and Comparative Endocrinology*, 3, 663-674.
- Young, L. J., Lopreato, G. F., Horan, K. y Crews, D. (1994). Cloning and in situ hybridization analysis of estrogen receptor, progesterone receptor, and androgen receptor expression in the brain of whiptail lizards (*Cnemidophorus uniparens* y *C. inornatus*). *Journal of Comparative Neurology*, 347, 288-300.

- Wooding, F. B. P., Ramirez-Pinilla, M. P. y Forhead, A. S. (2010). Functional studies of the placenta of the lizard *Mabuya sp.* (Scincidae) using immunocytochemistry. *Placenta*, 31(8), 675-685.
- 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.
- Yaron, Z. (1972). Endocrine aspects of gestation in viviparous reptiles. *General and Comparative Endocrinology*, 3, 663-674.
- Young, L. J., Lopreato, G. F., Horan, K. y Crews, D. (1994). Cloning and in situ hybridization analysis of estrogen receptor, progesterone receptor, and androgen receptor expression in the brain of whiptail lizards (*Cnemidophorus uniparens* y *C. inornatus*). *J. Comp. Neurol.*, 347, 288-300.
- Thompson, M. B., Speake, B. K., Stewart, J. R., Russell, K. J. y McCartney, R. J. (2001). Placental nutrition in the Tasmanian skink, *Niveoscincus ocellatus*. *Journal of Comparative Physiology B*, 171(2), 155-160.
- Tokarz, R. R., Crews, D. y McEwen, B. S., (1981). Estrogen-sensitive progestin binding sites in the brain of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Brain Res.*, 220, 95-105.

- Vieira, S., de Pérez, G. R. y 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(6), 738-749.
- Vitt, L. J. y Blackburn, D. G. (1983). Reproduction in the lizard *Mabuya heathi* (Scincidae): a commentary on viviparity in new world *Mabuya*. *Canadian journal of zoology*, 61(12), 2798-2806.
- Vitt, L. J. y Blackburn, D. G. (1991). Ecology and life history of the viviparous lizard *Mabuya bistrriata* (Scincidae) in the Brazilian Amazon. *Copeia*, 916-927.
- Vonier, P. M., Guillette, Jr., L. J., McLachlan, J. A. y Arnold, S. F. (1997). Identification and characterization of estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232, 308-312.
- Vrcibradic, D. y 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.
- Vrcibradic, D. y Rocha, C. F. D. (1998). Reproductive cycle and life-history traits of the viviparous skink *Mabuya frenata* in southeastern Brazil. *Copeia*, 612-619.

- Weekes, H. C. (1935, September). A Review of Placentation among Reptiles with, particular regard to the Function and Evolution of the Placenta. In Proceedings of the Zoological Society of London (Vol. 105, No. 3, pp. 625-645). Blackwell Publishing Ltd.
- Wetendorf, M. y DeMayo, F. J. (2014). Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. *The International journal of developmental biology*, 58, 95.
- Weng, Q., Medan, M. S., Ren, L., Watanabe, G., Tsubota, T. y Taya, K. (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.