



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.

ESCUELA DE BIOLOGÍA.

“MORFOGÉNESIS GONADAL Y DIFERENCIACIÓN DE LA
LÍNEA GERMINAL DE LA LAGARTIJA ESCAMOSA
Sceloporus aeneus”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA:
ALBERTO SANTOS VÁZQUEZ

Tutora: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA



PUEBLA, PUE.

FEBRERO 2014

Agradecimientos

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la escuela de Biología por ayudar a formarme como profesionista.
- Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y al departamento de Biología y Fisiología Celular, lugar que ha contribuido en mi crecimiento profesional y personal.
- A PAPIIT-UNAM No. IN205011
- A los miembros del comité revisor:
Dra. Norma A. Moreno Mendoza.
Dra. Rosalina Reyes Luna.
Dr. Ubaldo Quiroz López.

Agradecimientos

- A la **Dra. Norma A. Moreno Mendoza** por la dirección de este proyecto y la oportunidad de ser parte de su equipo. Agradezco de manera particular su confianza y paciencia.
- A la **Dra. Nivia Rocio Antonio Rubio** por el material biológico proporcionado.
- A la **Dra. Marisela Villagrán Santa-Cruz** por sus revisiones y uso de sus equipos e instalaciones.
- Al **Dr. Horacio Merchant Larios** por las facilidades del uso de sus equipos e instalaciones.
- Al **M.C. Alejandro J. Marmolejo Valencia** por las enseñanzas y el apoyo técnico en la microscopia.
- Al **Dr. Héctor M. Rodríguez Magadán** por las opiniones críticas y sugerencias tan valiosas realizadas al proyecto.
- A mis compañeros de laboratorio Alma, Lupita, Tania, Crycel, Adriana e Israel por darme su apoyo, amistad y por ser extraordinarios en todo lo que emprenden.

Para mi madre

Por ser la mejor guía que he tenido en mi vida, su cariño y fortaleza me inspira a continuar mi camino; sus valiosas enseñanzas me han ayudado a superar todos los obstáculos.

Para mi padre

Que vive en mis recuerdos y que me enseñó lo valioso del trabajo duro y la satisfacción de siempre querer superarse.

Para Maritza

Por enseñarme a nunca rendirme y demostrarme que siempre existen oportunidades para todos.

Para Gabriel

Por enseñarme las virtudes de la constancia y la decisión, así como por todos sus cuidados.

Para Brenda

Por ser una fuente de inspiración y de motivación en mi vida, te agradezco todos los lindos momentos que hemos pasado juntos, tu amor incondicional y tu constante apoyo.

Las verdades de la ciencia y las bellezas del arte están tan amalgamadas en la histología que es imposible conocer si el histólogo tiene pasión por la ciencia o por sus adornos; por la belleza de la verdad o por la verdad de la belleza.

Pío del Rio-Hortega

INDICE	Pag.
Lista de figuras y cuadros	
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
1.- Diferenciación sexual en vertebrados	4
2.- Diferenciación sexual en reptiles	8
2.1.- Células germinales primordiales (CGPs)	9
2.2.- Factores moleculares de las CGPs	10
2.3.- Desarrollo de la gónada indiferenciada	11
2.4.- Factores moleculares involucrados en el desarrollo de la gónada indiferenciada	12
2.5.- Diferenciación de la línea germinal	13
2.6.- Diferenciación ovárica	14
2.7.- Diferenciación testicular	15
2.8.- Factores moleculares involucrados en la diferenciación ovárica y testicular	15
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPOTESIS	20
V. OBJETIVOS	20
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	21
1.- <i>Sceloporus aeneus</i>	21
2.- Zona de colecta	22
3.- Captura y mantenimiento	23
4.- Obtención de las muestras	24
5.- Microscopia de campo claro y electrónica	24

VII. RESULTADOS	26
1.- Morfogénesis gonadal	26
1.1.- Ubicación del complejo urogenital	27
1.2.- Gónada indiferenciada	29
1.3.- Gónada en diferenciación	30
1.4.- Gónada diferenciada	33
1.5.- Ultraestructura de la gónada	39
2.- Estadios de desarrollo embrionario	42
3.- Correlación entre morfogénesis gonadal y desarrollo de la extremidad anterior derecha	49
VIII. DISCUSIÓN	52
1.- Morfogénesis gonadal	52
1.1.- Gónada indiferenciada	53
1.2.- Gónada en diferenciación	54
1.3.- Gónada diferenciada	55
1.3.1.- Diferenciación ovárica	55
1.3.2.- Diferenciación testicular	56
IX. CONCLUSIÓN	57
X. BIBLIOGRAFÍA	58

Lista de figuras y cuadros	Pag.
Figura 1. Diferenciación gonadal en un modelo de reptil.	18
Figura 2. Esquema general de los materiales y métodos empleados en este estudio.	21
Figura 3. Hembra grávida de <i>Sceloporus aeneus</i> .	21
Figura 4. Mapa de distribución y zona de colecta de <i>S. aeneus</i>	23
Figura 5. Gráfica de distribución de los individuos de <i>S. aeneus</i> con gónada diferenciada.	26
Figura 6. Ubicación del complejo urogenital de <i>S. aeneus</i> .	27
Figura 7. Descripción anatómica e histológica de la gónada de <i>S. aeneus</i> .	28
Figura 8. Gónadas de <i>S. aeneus</i> en estadio (E) 31-32.	29
Figura 9. Gónadas de <i>S. aeneus</i> en E33.	31
Figura 10. Gónada de <i>S. aeneus</i> en E34.	32
Figura 11. Gónada masculina y femenina de <i>S. aeneus</i> en E35.	33
Figura 12. Gónada masculina y femenina de <i>S. aeneus</i> en E36.	34
Figura 13. Gónada masculina y femenina de <i>S. aeneus</i> en E37.	35
Figura 14. Gónada masculina y femenina de <i>S. aeneus</i> en E38.	36
Figura 15. Gónada masculina y femenina de <i>S. aeneus</i> en E39.	37
Figura 16. Gónada masculina y femenina de <i>S. aeneus</i> en E40.	38
Figura 17. Ultraestructura de gónada indiferenciada de <i>S. aeneus</i> en estadio 33.	39
Figura 18. Ultraestructura de gónada femenina de <i>S. aeneus</i> en estadio 40.	40
Figura 19. Ultraestructura de gónada masculina de <i>S. aeneus</i> en estadio 40.	41
Figura 17. Estadios de desarrollo de la lagartija <i>S. aeneus</i> .	46
Figura 18. Correlación entre el desarrollo gonadal y la extremidad anterior derecha de <i>S. aeneus</i> .	49
Cuadro 1. Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en reptiles.	17
Cuadro 2. Criterios de los estadios de desarrollo (E) y características gonadales para <i>S. aeneus</i> .	26

Resumen

La determinación del sexo es un evento fundamental que se manifiesta durante el desarrollo embrionario y que involucra una compleja cascada de señales a nivel molecular, celular y hormonal que conducen a la diferenciación sexual de los organismos. El proceso de diferenciación sexual involucra tres aspectos fundamentales: la determinación del sexo genético, el establecimiento del sexo gonadal y finalmente la consolidación del sexo fenotípico. Los reptiles son uno de los grupos más diversos dentro de los amniotas y poseen una gran variedad de mecanismos de determinación y diferenciación sexual. En lagartos escamosos, el establecimiento de una gónada bipotencial y su diferenciación hacia un testículo o un ovario son procesos poco estudiados, en comparación con especies ovíparas. Debido a lo anterior el objetivo principal del presente estudio fue realizar una descripción del proceso de morfogénesis gonadal en la lagartija escamosa *Sceloporus aeneus* y correlacionarlo con sus estadios del desarrollo embrionario. Se analizaron un total de 119 embriones para establecer los estadios de desarrollo (E) y la descripción morfológica de la gónada. Encontramos que la gónada indiferenciada se establece entre los E31-E33, donde se observan células germinales (CG) interactuando con células somáticas de tipo epitelial, formando los primeros cordones sexuales. El punto crítico de la diferenciación gonadal se suscita al inicio del E34, cuando la gónada indiferenciada sufre una regionalización medular o cortical y se convierte en un testículo o un ovario respectivamente. A partir del E35 hay un aumento progresivo del tamaño de la gónada; en la corteza de los ovarios se observa un incremento en la cantidad de capas de CG, se incrementa la vascularización y se diferencian las células de la granulosa. En el caso de los testículos, las CG se incluyen en cordones testiculares localizados en la región medular e interactúan con células de Sertoli. Por fuera de los cordones, se diferencian las células de Leydig importantes por su actividad esteroidogénica. En conclusión, las descripciones realizadas de la gónada y otras estructuras corporales asemejan a los modelos clásicos de desarrollo en lacertilios, en específico para las de la familia Phrynosomatidae.

I. Introducción

La determinación del sexo en los vertebrados es un evento fundamental que se manifiesta durante el desarrollo embrionario y que además involucra una compleja red de señales a nivel molecular, celular y hormonal que interactúan entre sí. Este proceso se divide en: la determinación del sexo cromosómico, el establecimiento del sexo gonadal y finalmente la consolidación del sexo fenotípico. Los procesos de formación y desarrollo de la gónada, así como el de diferenciación sexual constituyen aspectos trascendentales de la biología reproductiva de los organismos. De acuerdo con Hayes (1998), la diferenciación sexual de la gónada hace referencia al proceso de desarrollo de la misma una vez que el sexo se ha determinado, esto es, que la gónada bipotencial sigue el camino hacia la diferenciación ovárica o testicular.

En los vertebrados, el establecimiento del sexo puede llevarse a cabo por un mecanismo genético o ambiental (Bull, 1980); el primero acontece durante la fertilización, y es característico en especies de mamíferos, aves y algunos peces donde existe la participación de cromosomas sexuales heteromórficos; sin embargo para un gran número de especies de peces, anfibios y reptiles no existen cromosomas sexuales distinguibles, y por lo tanto el sexo se puede determinar a partir de factores ambientales, siendo el más común la temperatura, y uno de los más reportados en reptiles (Bull, 1985).

La conservación de muchas especies depende del desarrollo de órganos reproductivos especializados que puedan mantener la diferenciación del linaje de las células germinales y la herencia del sexo. Por tanto, la manifestación oportuna de cada una de las señales que participan en la diferenciación sexual gonadal dan como resultado la expresión del fenotipo masculino o femenino cuyas gónadas tendrán procesos de maduración, y que al finalizar estas serán las encargadas de la producción de gametos sexuales, espermatozoides u ovocitos respectivamente, y cuyo material genético es indispensable para la sobrevivencia de la especie y la continuidad de la vida.

El grupo de los reptiles exhiben una extensa variedad de morfotipos y estrategias ecológicas que les han permitido distribuirse en un gran número de ambientes por el mundo. Dentro de la clase reptilia encontramos a tuataras, tortugas, cocodrilos y squamata (serpientes y lagartos o lagartijas escamosas); los lagartos escamosos se componen de un promedio de 4560 especies (spp.) las cuales presentan variantes en su determinación sexual (Halliday y Adler, 2007).

En la Determinación Sexual Genética (DSG) encontramos al menos dos patrones de heterogametos en ambos sexos XX/XY o ZW/ZZ y también se han encontrado cromosomas sexuales morfológicamente indiferenciados u homogametos (Olmo, 1986). Para el caso de la Determinación del Sexo Ambiental (DSA) y en específico por la Temperatura (DST) se sugiere que la temperatura de incubación es el factor crítico que afecta la diferenciación gonadal de los reptiles, este parámetro ambiental ha sido estudiado en tortugas, cocodrilos, tuataras y algunos lagartos, mientras que todas las especies de serpientes y anfisbénidos han mostrado solo DSG (Janzen y Paukstis, 1991).

Entre las familias de lagartos los mecanismos de determinación sexual son difusos, es decir la DSG y la DST han sido estudiadas por igual entre los grupos Agamidae, Eublepharidae, Gekkonidae y Lacertidae, sin embargo para el caso de Iguánidos y Varánidos la coexistencia de los dos mecanismos de determinación sexual es aún incierta (Viets *et al.*, 1994). La recurrencia de la DSG en estas taxa podría ser en parte debido a la presencia de especies vivíparas o partenogénicas, cuyos mecanismos reproductivos requieran el aporte genético para su determinación (Bull, 1980). La cascada de señales que regula ambos mecanismos de determinación sexual es una compleja red de interacciones moleculares y celulares que guían la formación de un ovario o un testículo (Shoemaker y Crews, 2009). Estos procesos moleculares en la gonadogénesis se han estudiado mejor en aves y mamíferos; sin embargo algunos estudios han realizado aportes acerca de los genes que se ven involucrados en la determinación y diferenciación sexual de especies de peces y reptiles con DST.

Por consiguiente se conoce que algunas moléculas mantienen una función conservada en estos procesos, mientras que otras han divergido en el grupo de vertebrados (McLaren, 1988). Estos aportes comparativos nos ayudan a entender la evolución en las vías de señalización, funciones moleculares e interacciones y comportamientos celulares del proceso de gonadogénesis a través de los taxa.

Los Squamata al representar casi un tercio de los amniotas conocidos constituyen uno de los grupos que sufrieron mayormente el fenómeno de radiación. Pese a que su especiación y diversidad morfológica son bastas, están muy pobremente representadas en estudios de desarrollo embrionario en general, y en específico de gonadogénesis (Wise *et al.*, 2009). Realizar estos tipos de estudios nos permite indagar en cuestiones de origen y evolución en los linajes de los reptiles.

Sceloporus aeneus, es el modelo de vida silvestre que se empleó para la realización de nuestro estudio, el cual es un lagarto ovíparo que forma parte de la familia Phrynosomatidae, que contiene a los lagartos morfológica y ecológicamente más diversos del continente americano. Estos poseen una gran variedad de hábitos, los hay terrestres, arborícolas y saxícolas. Se distribuyen desde el sur de Canadá hasta Panamá; Contiene nueve géneros con más de 136 spp. (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayen, 2010). Al interior de la familia se encuentra el género *Sceloporus* cuyos representantes se han diversificado en modos de reproducción tanto ovípara como vivípara, además, presentan DSG que comúnmente se ha asociado con cromosomas sexuales heterogaméticos, sin embargo algunas especies presentan cromosomas homogaméticos (Ciofi y Swingland, 1997). Dentro del mismo género existen algunas características reproductivas interesantes como: 1. Dimorfismo sexual muy evidente, sobre todo en los patrones de coloración y presencia de hemipenes en los machos; 2. Retención de huevos en las hembras de algunas especies, ovopositando huevos con embriones en estadios de desarrollo avanzados, esta característica en particular se asocia a especies en transición que han dado pautas para la ovoviviparidad y la evolución de las estrategias reproductivas; 3. Su periodo de

actividad reproductiva es en primavera (Mayo-Julio), con dos puestas por año y pequeños huevos ovulados o una camada por año de máximo ocho crías en especies vivíparas, finalmente; 4. Los machos presentan un pico de actividad testicular de Febrero-Junio con un ciclo espermatogénico continuo y desconocido en asociaciones celulares (Guillette, 1981; Guillette *et al.*, 1980).

II. Antecedentes

1. - Diferenciación sexual en vertebrados

En todos los vertebrados, los testículos y los ovarios se desarrollan a partir de una gónada embrionaria, que es inicialmente bipotencial y la cual se origina del mesodermo intermedio e inicia su desarrollo como un engrosamiento del epitelio que reviste la cavidad celómica justo en la parte ventromedial de los mesonefros. En el proceso de diferenciación de la gónada existen tres etapas fundamentales: 1) migración y colonización de la cresta genital por parte de las células germinales primordiales (CGP); 2) establecimiento de la gónada indiferenciada y; 3) diferenciación de la gónada en un ovario o testículo (Wilhelm, 2007).

La formación de la cresta genital se está llevando a cabo al unísono del arribo de las CGP, las cuales son de origen extragonadal y por lo tanto tienen que migrar desde la base del alantoides por el mesenterio dorsal del intestino (mamíferos) o a través del torrente sanguíneo (aves) (Eynard *et al.*, 2008; Kunawa, 1993; Pieau *et al.*, 1999; Risley, 1933; Tsunekawa *et al.*, 2000).

Al inicio del proceso de diferenciación de la gónada existe una compleja comunicación y organización entre dos linajes celulares, las células somáticas y las CGP que conforman el primordio gonadal. El primordio gonadal es una estructura bipotencial morfológicamente similar en machos y en hembras, pero molecularmente dimórfica, es decir, el sexo genético ha sido establecido desde el momento de la fertilización (De Falco y Capel, 2009).

Una vez que la gónada bipotencial indiferenciada ha sido establecida, se inicia la etapa de diferenciación sexual gonadal cuyo fin último es la de demarcar el fenotipo adecuado del organismo dependiendo del sexo determinado en etapas tempranas del desarrollo; la producción de hormonas por parte de los testículos u ovarios influencia el desarrollo de las características sexuales secundarias de machos y hembras respectivamente, como conductos sexuales internos, genitales externos y otras características sexuales secundarias como la pigmentación y la talla corporal (De Falco y Capel, 2009).

De manera general, tanto la estructura como la función del ovario y del testículo son similares entre todos los vertebrados (De Falco y Capel, 2009). Las células que conforman las gónadas en los vertebrados se reacomodan para formar dos compartimentos: la corteza y la médula. El desarrollo de una u otra zona define morfológicamente el sexo del individuo; los testículos desarrollan en la médula cordones testiculares organizados por células somáticas que rodean a las CGP, mientras que en el estroma entre los cordones se diferencia el linaje de células esteroidogénicas, denominadas células de Leydig (Park y Jameson, 2005). En el caso de la diferenciación ovárica, en la gónada se desarrolla la corteza, existiendo una proliferación de células germinales rodeadas por células de la granulosa y células esteroidogénicas (De Falco y Capel, 2009).

a) En mamíferos un solo gen ligado al cromosoma Y conocido como el factor determinante del testículo (FDT), es el responsable de definir la ruta de diferenciación del primordio gonadal hacia un testículo; en la actualidad dicho gen se ha identificado en el brazo corto del cromosoma Y, y reúne todas las características esperadas del FDT. Este gen se denomina *Sry* (Koopman *et al.*, 1990) y se ha observado que en su ausencia el sexo gonadal es dirigido hacia un ovario. Por lo tanto en mamíferos la determinación testicular es equivalente a la determinación sexual genética (GSD). *Sry* activa la expresión de otros genes como *Sox9* y *FGF9* en las células somáticas de la gónada, conocidas como células de Sertoli.

Las células de Sertoli envuelven a las CGP's formando los cordones testiculares en la región medular de la gónada. Posteriormente, los cordones testiculares se reorganizarán en túbulos seminíferos delimitados por una lámina basal (Piprek, 2010). Las CGP en el interior de los cordones testiculares darán origen a las espermatogonias, las cuales entrarán en arresto mitótico hasta el momento de la pubertad, momento en el cual iniciaran el proceso de meiosis (Wilhelm, 2007). Por fuera de los cordones testiculares, las células estromáticas se diferenciarán en células mioides, fibroblastos y células de Leydig (De Falco y Capel, 2009). Por otra parte, en la gónada femenina las CGP se alojan en la porción cortical del ovario en formación, donde entran en íntima asociación con otros tipos celulares somáticos que las rodean, formando los folículos primordiales (De Falco y Capel, 2009).

b) En aves, las gónadas se forman temprano durante el desarrollo y surgen como un engrosamiento a través de la superficie ventromedial de los mesonefros (Hamburger y Hamilton, 1951). Previamente a la diferenciación sexual, las gónadas de ambos sexos se componen de una capa de células epiteliales y otra de células germinales dispuestas en distintas posiciones del primordio. Al inicio de la diferenciación sexual gonadal, en los embriones ZZ existe un condensamiento de células en la región medular cuya asociación con las CGP promueve la aparición de los cordones sexuales y la regresión del epitelio cortical. En los embriones ZW, solo la gónada izquierda se desarrolla como un ovario, y esto se debe a una fragmentación medular e hipertrofia del epitelio germinal de la gónada derecha (Carlton y Stahl, 1985). En la gónada femenina izquierda, a diferencia de la gónada masculina, existe una extensa proliferación celular y un aumento de tamaño del compartimiento cortical, mientras que los cordones medulares se vuelven huecos y forman lagunas (De Falco y Capel, 2009).

c) En el caso de los anfibios podrían existir las dos variantes de determinación sexual: la genética a partir de los sistemas (XX/XY o ZZ/ZW) y la ambiental, esta última influenciada por el factor temperatura como en algunas especies de reptiles y algunas otras de peces; sin embargo en experimentos recientes se ha

demostrado que este grupo es aún más susceptible a hormonas aplicadas de manera exógena en cuanto al cambio en las proporciones de los sexos. La mayoría de los anfibios son gonocoristas y siguen el mismo patrón de desarrollo que muchas ranas y salamandras. El primordio gonadal es una estructura sólida con un cortex y una medula intacta; en hembras este cortex se desarrolla y crece, mientras que la región medular sufre regresión y se ahueca quedando vesículas ováricas. Las células del cortex se convierten en folículos alargados y los ovocitos se encuentran en etapas tempranas de la diferenciación. El desarrollo masculino es caracterizado por un desarrollo medular y una regresión de la región cortical. La gónada de machos se caracteriza por tener una menor densidad en los paquetes celulares (Hayes, 1998).

d) Las especies de peces exhiben una gran variedad de mecanismos determinantes del sexo y de morfogénesis gonadal. Hay peces gonocoristas o hermafroditas, y muchos otros pueden cambiar su sexo en repetidas ocasiones (De Falco y Capel, 2009). En contraste con los mamíferos y aves, los cuales poseen cromosomas sexuales heteromórficos, en los peces aún no han sido claramente identificados, sin embargo no hay duda de que existen componentes genéticos en su determinación sexual al igual que factores epigenéticos como la temperatura, el pH y el ámbito social en que se encuentren (Sola y Gormung, 2001). En general, las crestas gonadales se forman en sus sitios presuntivos solo después de la llegada de las CGP, las cuales incrementan su número por mitosis (Nakamura *et al.*, 1998). Una vez establecida la gónada indiferenciada bipotencial, compuesta por células germinales y somáticas, se inicia el proceso de diferenciación hacia un ovario o un testículo (Devlin y Nagahama, 2002). La diferenciación sexual gonadal en especies de peces gonocoristas puede ser primaria o secundaria. En el primer caso, la gónada indiferenciada bipotencial se desarrolla directamente como un ovario o un testículo; mientras que en las especies de peces gonocoristas con diferenciación secundaria todos los individuos desarrollan inicialmente una gónada parecida a un ovario que posteriormente se puede diferenciar como un testículo o permanecer como ovario, fenómeno

denominado hermafroditismo juvenil. Por otro lado, el fenómeno de hermafroditismo ocurre de manera natural en los peces teleostos y este puede ser simultáneo o secuencial, es decir, en las especies simultáneas los individuos poseen tejido testicular y ovárico funcional al mismo tiempo; mientras que en las especies secuenciales algunos individuos pueden madurar inicialmente como machos y virar hacia hembras (Protandria) o viceversa, madurar como hembras y convertirse a machos (Proginia) (Devlin y Nagahama, 2002; Munday *et al.*, 2006). Cualquiera que sea el caso de diferenciación sexual en los peces, es indudable que se encuentran involucrados cambios similares de los diferentes tipos celulares que conforman la gónada (Devlin y Nagahama, 2002). Los componentes de la gónada son de origen unitario y solo provienen de la corteza o pared peritoneal, de manera que en la gónada temprana no hay un componente medular que provenga del mesonefros como en otros vertebrados (Devlin y Nagahama, 2002; Hoar, 1969). Durante la formación de la gónada femenina, las células germinales (CG) inician la meiosis, y junto con las células somáticas se inicia el proceso de foliculogénesis y la formación de una cavidad ovárica (Nakamura *et al.*, 1998). En la gónada masculina, las CG permanecen quiescentes, en un estado de reposo mitótico, formando los lóbulos testiculares.

2. Diferenciación sexual en reptiles

Los reptiles son vertebrados que exhiben una amplia gama de tipos y arreglos celulares en el proceso de diferenciación sexual. Las descripciones morfológicas a partir de técnicas histológicas del desarrollo gonadal se han estudiado principalmente en especies ovíparas de tortugas, cocodrilos, tuátara y en menor medida en lagartos (Janzen y Paukstis, 1991).

La mayoría de los estudios relacionados con el desarrollo embrionario en reptiles, incluyendo los mecanismos de determinación y diferenciación sexual gonadal, involucran a especies ovíparas. Este hecho se debe a que es más fácil calcular el tiempo de desarrollo embrionario en huevos ovopositados y por lo tanto más fácil de manipularlos; además es ampliamente conocido que las estrategias de

determinación sexual son más diversas en animales ovíparos que en taxas vivíparos, en donde no serían compatibles con la DSA/DST (Bull, 1980).

En especies de cocodrilos existen trabajos con *Alligator mississippiensis* (Forbes, 1940; Moore *et al.*, 2008) y *Caiman crocodilus* (Calderon *et al.*, 2004); mientras que en tortugas se han realizado estudios con *Emys orbicularis* y *Testudo graeca* (Pieau, 1972), *Chelydra serpentina* (Yntema, 1976), *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989) y *Traechemys scripta* (Wibbels, 1993). Específicamente en trabajos realizados con lagartos tenemos los de las especies ovíparas de *Sceloporus undulatus* (Austin, 1988), *Calotes versicolor* (Doddamani, 2006), *Anolis carolinensis* (Forbes, 1956) y *Agama agama* (Charnier, 1966); mientras que para especies vivíparas tenemos a lagartos síncidos como *Niveoscincus ocellatus* (Neaves *et al.*, 2006) y *Eulamprus tympanum* (Robert y Thompson, 2001). Sin duda las descripciones histológicas del desarrollo de la gónada son de suma importancia para entender los procesos de diferenciación sexual en reptiles, así como las relaciones evolutivas con respecto a los demás grupos de vertebrados.

2.1 Células Germinales Primordiales

En reptiles, las células germinales primordiales (CGP), al igual que en otros vertebrados, son consideradas de origen extraembrionario ya que estas derivan de células epiblasticas que se localizan en la región central del área pelúcida y posteriormente se ubican en una región en forma de semiluna en el hipoblasto, en el borde anterior del área pelúcida. Esta región extraembrionaria es denominada como creyente germinal posterior y es allí donde ocurre la multiplicación de estas células (Gilbert, 2005). Una vez diferenciadas y multiplicadas las CGP ocurre el fenómeno de migración que aún no ha sido bien documentado para todos los órdenes de reptiles; sin embargo en el caso particular de las tortugas se sabe que las CGP migran a través del mesenterio dorsal del intestino, como en el caso de los mamíferos, hasta colonizar el primordio gonadal (Pieau, 1999).

La migración de las CGP ocurre por movimientos activos, donde primero se desplazan por movimientos semejantes al ameboide, denominado como diapédesis, y en segunda instancia existe un movimiento mediante filopodios y pseudopodios, empleado para migrar sobre las células del intestino posterior, este movimiento es debido a un cambio conformacional en el citoesqueleto de las células, el cual está compuesto por proteínas como cadherinas e integrinas que hacen posible este evento (Pieau *et al.*, 1999; Risley, 1933; *Tsunekawa et al.*, 2000). La direccionalidad de esta migración ocurre de alguna manera hasta hoy desconocida, sin embargo se sugieren procesos de quimiotaxis en donde las CGP son atraídas hacia la cresta gonadal (Kunawa *et al.*, 1986).

Las CGPs de lagartos son fácilmente distinguibles por su gran tamaño y apariencia ovalada o redondeada, su citoplasma es pálido y granular, además la mayoría de las veces pueden contener gotas lipídicas en su interior. Su núcleo es oscuro y relativamente granular, comúnmente contiene un solo nucléolo. Una vez diferenciada la gónada, las CGP se consideraran como ovogonias o espermatogonias (Austin, 1988).

2.2 Factores moleculares de las CGPs

Las bases moleculares que han sido descritas y estudiadas en las CGP, corresponden usualmente a trabajos realizados en vertebrados amniotas. Dentro de los principales factores estudiados hasta el momento encontramos al gen *C-kit* y su ligando Steel. Este gen codifica para un receptor de membrana con actividad tirosin-cinasa que tiene una función muy importante en la sobrevivencia de las CGP. La mutación de este gen detiene la proliferación y genera problemas en la migración, ya que se ha demostrado que este ligando-receptor en colaboración con el Factor de Células Madre (SCF) provocan un efecto anti-apoptótico sobre las CGPs, las ovogonias y los ovocitos, además de estar involucrado en la iniciación del crecimiento de folículos primordiales y su desarrollo a través de estadios de los folículos primarios, incluyendo la diferenciación de células de la teca y la cavidad antral de la lagartija *Podarcis s. sicula* (Raucci y Di Fiore, 2011).

El gen *Oct4* es un factor de transcripción cuya proteína se une a motivos octaméricos y se expresa en las CGP, así como también en los ovocitos maduros no fertilizados de las hembras y cuya expresión en machos es reprimida durante la proliferación y maduración de las espermatogonias. Aún no es clara la función de este factor y ha sido muy discutido con base al mantenimiento de la pluripotencialidad de las células, así como de la sobrevivencia y migración de las CGP (Yeom *et al.*, 1996).

Por otra parte las CGP expresan una gran cantidad de moléculas cuya presencia está relacionada a procesos celulares muy específicos, por lo que la expresión temporal de estos marcadores aun no es precisa en cuanto a su función en el grupo de los reptiles; sin embargo en general se sabe que los genes *Fragilis* y *Stela* se expresan en las CGP durante la migración que estas llevan a cabo hacia el primordio gonadal; una vez finalizada las etapas de migración y colonización de la gónada por parte de las CGP, comienza un reacomodo de los componentes celulares, estableciéndose la gónada indiferenciada, lo que conlleva a otra etapa del desarrollo que corresponde a la diferenciación morfológica de la gónada hacia un ovario o testículo (Molyneaux y Wylie, 2004; Saitou *et al.*, 2002).

2.3 Desarrollo de la gónada indiferenciada

En reptiles así como en la mayoría de los vertebrados, los cambios morfológicos que llevan al establecimiento de una gónada indiferenciada bipotencial son semejantes. Durante las primeras etapas de la morfogénesis gonadal, la cresta genital se desarrolla como un engrosamiento del epitelio celómico sobre la superficie ventromedial de los mesonefros sobre cada lado del mesenterio dorsal. El engrosamiento del epitelio se da por la invasión de células mesenquimáticas en la parte más interna de las gónadas (médula). Estas células epiteliales provienen del epitelio externo de la cápsula de Bowman, de los corpúsculos de Malpighi y del epitelio celómico que rodea a los mesonefros. Las células que provienen de los corpúsculos de Malpighi y del epitelio celómico son generalmente pequeñas de coloración oscura que se organizaran en delgados

cordones en la parte dorsal del primordio. Estos cordones son los esbozos de la “rete testis” y la “rete ovaris”. Al mismo tiempo que se da el engrosamiento del epitelio, las CGP ingresan dentro de otros cordones formados de células epiteliales, estos cordones penetran entre la capa inicial de células del mesénquima de la gónada, formando los cordones sexuales, los cuales son delimitados por una membrana basal compuesta principalmente de laminina, la cual también incluye a numerosas y pequeñas células somáticas de forma irregular que son consideradas células de pre-Sertoli, en el caso de los machos o células pre-foliculares en el caso de las hembras (Pieau, 1999).

De manera general durante este estado indiferenciado de la gónada se da la colonización de la cresta genital por parte de las CGP las cuales son rodeadas por células somáticas que darán origen al tejido epitelial y estromático que permitirán la diferenciación de la gónada en un ovario o en un testículo (Ver figura 1).

2.4 Factores moleculares involucrados en el desarrollo de la gónada indiferenciada

Actualmente existen estudios donde se mencionan un número considerable de genes que participan en el establecimiento de la gónada indiferenciada de mamíferos (Shoemaker *et al.*, 2009). Sin embargo, para el caso de otros grupos de vertebrados, se conoce muy poco sobre este nivel de expresión genética, aunque se puede considerar que muchos de los genes involucrados en estos procesos se mantienen conservados entre los vertebrados; en específico para los reptiles tenemos la expresión de *Sf-1*, *Wt1* y *Sox9* (Cuadro 1) (Moreno *et al.*, 1999; Murdock *et al.*, 2003; Spotila *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2002.).

El *Sf1* (gen que codifica para el factor esteroideogénico-1) es un receptor nuclear que en la gonadogénesis modula la proliferación celular y previene la apoptosis celular. Sus niveles de expresión son monomórficos en ambos sexos, hasta antes del periodo termosensible (PTS), después la cantidad de mRNA se incrementa en machos significativamente en las células epiteliales que rodean a las CGP. Esta

regulación de *Sf-1* ha sido descrita para tres especies de tortugas (*Traechemys scripta*, *Chrysemys picta* y *Chelydra serpentina*), sugiriendo que este gen podría jugar un papel importante durante el desarrollo de la gónada y posteriormente en la diferenciación de la gónada masculina (Fleming *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1994).

Wt1 (gen supresor del tumor de Wilms 1) es un gen que codifica para un factor de transcripción nuclear con cuatro dominios de dedos de zinc y regiones ricas en prolinas y glutaminas; este gen se expresa a inicios de la formación del primordio gonadal en células somáticas de los cordones sexuales (células corticales y pre-Sertoli, respectivamente). En reptiles, se ha observado que para el caso de dos especies de tortugas (*Traechemys scripta* y *Chrysemys picta*), así como en el lagarto *Alligator mississippiensis*, este gen previene la apoptosis de las células y regula positivamente a *Sf-1* (Kreidberg *et al.*, 1993; Western *et al.*, 2000).

El gen *Sox9* (Gen 9 con región HMG relacionado con *SrY*) se expresa primero en la cresta genital de ambos sexos y después es regulado negativamente en hembras. Su habilidad para “reemplazar” la acción del gen *SrY* de mamíferos, lo convierte en un candidato obvio para el rol crítico de regular positivamente el desarrollo de los testículos en organismos con DST. En experimentos con la tortuga golfina *Lepidochelys olivácea* se sugiere que la diferenciación del ovario involucra un mecanismo común, el cual presumiblemente requiere la represión de *Sox9* en todos los vertebrados; es poco probable que las células mesonéfricas que expresan la proteína de este gen jueguen un rol en la determinación del sexo de la tortuga ya que su cantidad y distribución es similar tanto en hembras como en machos, por lo que aún se desconoce la función de este gen en estadios tempranos en el desarrollo de reptiles (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999; Shoemaker y Crews, 2009).

2.5 Diferenciación de la línea germinal

Una vez establecidas las CGP en machos y/o hembras se da el inicio de la meiosis como parte del proceso de gametogénesis; la meiosis es un proceso que

consta de dos divisiones celulares, cada una compuesta por cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase; dentro de la primera división se presenta una profase prolongada que se encuentra subdividida en cuatro estadios: leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno (Gilbert, 2005).

Con respecto a la línea germinal de reptiles, se sabe que las células germinales primordiales en machos quedan en arresto mitótico, posteriormente inician la meiosis y espermatogénesis hasta que los individuos alcanzan madurez sexual (Pudney, 1995). En hembras, las células germinales inician la meiosis y quedan en arresto en profase I en etapas tardías del desarrollo embrionario o en etapas perinatales (Ditewig y Yao, 2005; Moore *et al.*, 2008).

2.6 Diferenciación ovárica

En reptiles, el patrón de diferenciación del ovario se caracteriza porque el epitelio germinal sufre un engrosamiento en relación a la proliferación *in situ* de células epiteliales y células germinales que dan origen a nidos de ovogonias, que forman la corteza ovárica. Durante este engrosamiento algunas de las células de la línea germinal han entrado en meiosis. El crecimiento del ovario es menos significativo que en el caso de los testículos, ya que la medula del ovario está fuertemente reducida, sin embargo su corteza tiene un desarrollo más proliferativo. Una vez diferenciado el ovario y que las CGP han iniciado la meiosis, da inicio el proceso de foliculogénesis, es decir la formación de folículos primordiales que contienen ovocitos en crecimiento (Pieau *et al.*, 1999; Merchant, 1989; Wibbels *et al.*, 1991).

En embriones de reptiles ovíparos el desarrollo del ovario está incompleto al momento de la puesta; sin embargo, el proceso de ovogénesis dará inicio en la corteza de la gónada en los meses siguientes, observándose un epitelio germinal bien desarrollado compuesto de ovogonias y células somáticas. Estas ovogonias acomodadas en camas germinales entran en la primera división meiótica dando como resultado ovocitos primarios; durante este proceso en el estadio de diploteno

los puentes celulares formados por los ovocitos se rompen por acción de células pre-foliculares, originando primordios foliculares. Además en este punto del desarrollo se inicia el primer control meiótico, en el cual las células germinales entran en un arresto meiótico donde solo aumentan de tamaño hasta que el individuo alcanza la madurez sexual (Moore *et al.*, 2008).

2.7 Diferenciación testicular

En la diferenciación del testículo de los reptiles, el epitelio germinal se aplana debido a que las células germinales dejan este epitelio y ocurre una migración hacia las células epiteliales de los cordones medulares. Una vez establecidas las CGP dentro de estos cordones, las células epiteliales que las rodean se diferencian como células de Sertoli. De esta manera los cordones medulares forman los esbozos de los túbulos seminíferos con un contorno redondeado y bien definido por una membrana basal. Durante el periodo termosensible, el crecimiento de los testículos es gradual y es en relación al desarrollo de los túbulos seminíferos en la medula. Al final del PTS, las células que conforman el intersticio se diferencian como células de Leydig, importantes por su actividad esteroidogénica. (Pieau *et al.*, 1999).

2.8 Factores moleculares involucrados en la diferenciación testicular y ovárica

Sox9 es un miembro de la familia de genes relacionados con *SrY* por su caja HMG (High Mobility Group) y que codifica para una proteína con dominios característicos de otros factores de transcripción. *Sox9* se expresa en células somáticas de la gónada, durante las etapas tempranas del desarrollo y durante el PTS. A diferencia de los mamíferos, este gen no está involucrado en los pasos iniciales de la determinación sexual, pero si juega un papel importante en la diferenciación de la gónada de acuerdo a estudios realizados en tres reptiles: *Lepidochelys olivacea*, *T. scripta* y la lagartija *Eublepharis macularius* (Cuadro1). Al principio del PTS la expresión de este gen se da en embriones de ambos sexos en el mesenterio dorsal, mientras que al final del periodo solo está presente en las

células de pre-Sertoli y finalmente en las células de Sertoli (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999).

Vasa es un gen que codifica para una RNA helicasa dependiente de adenosin trifosfato (ATP), la cual es un determinante de la línea germinal conservado en todos los linajes de vertebrados. *Vasa* pertenece a la familia de proteínas DEAD box, cuya expresión se da en las células germinales y durante la maduración del ovocito. En reptiles esta proteína también se encuentra presente en las células somáticas de la corteza del ovario denominadas como células pirimiformes de acuerdo a un estudio en la lagartija *Podarcis s. sicula* (Cuadro1) (Maurizii, 2009).

La hormona anti-Mülleriana (*AMH*) ó también conocida como *MIS* es un gen miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes; este factor se expresa en las células de Sertoli diferenciadas en los testículos durante el PTS y causa la regresión de los ductos Müllerianos, de acuerdo a lo observado en la tortuga *T. scripta* y en el cocodrilo *A. mississippiensis* (Shoemaker *et al.*, 2007).

Dax1, es un receptor nuclear huérfano también conocido como *NrOb1* ó *Ahch* que se expresa de manera homogénea en células somáticas de los cordones sexuales, en la región cortical y en los ductos de Wolff y Müller en ambos sexos. Se ha sugerido que este gen opera en distintos tiempos en la gónada de ambos sexos, como un regulador del desarrollo de ésta; sin embargo, las funciones específicas de esta molécula aun no son claras en los reptiles (Torres-Maldonado *et al.*, 2002).

El marcador *Wnt4* es importante en el desarrollo del sistema reproductivo de los mamíferos debido a que su expresión en ambos sexos media la formación inicial de los conductos de Müller y regula la migración de las células esteroideogénicas mesonéfricas durante el desarrollo de la gónada. Para el caso de reptiles este gen se expresa en el PTS y aumenta en la diferenciación ovárica, siendo los mismos sitios de expresión que *Dax1* (Cuadro 1) (Shoemaker y Crews, 2009).

Dmrt1 es un gen que codifica para un factor de transcripción con un dominio DM; el cual podría estar actuando como un posible regulador de la determinación sexual y diferenciación de la gónada. En la tortuga *T. scripta* la expresión de este gen es constante en el complejo urogenital, riñón y gónada, en específico en las células somáticas de la cresta urogenital, tanto en hembras como en machos; sin embargo, a medida que avanza el desarrollo existe un aumento de esta expresión solo en la gónada masculina (Cuadro 1) (Shoemaker y Crews, 2009).

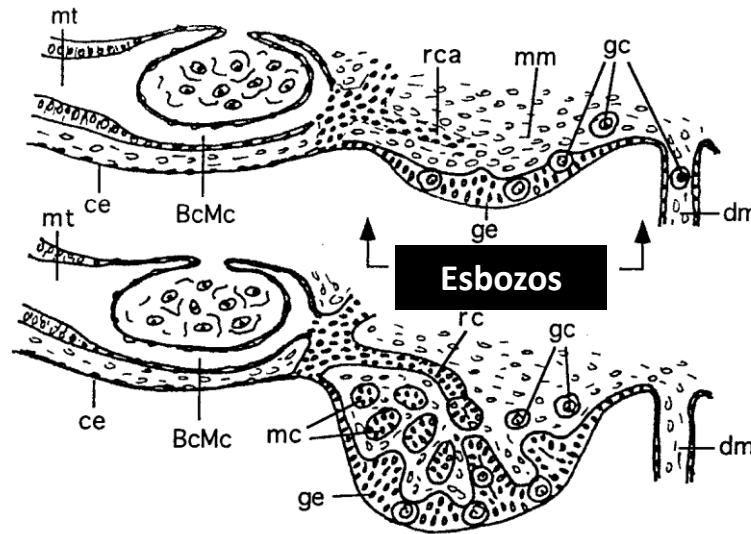
FoxL2 es un gen que se expresa al inicio del PTS en reptiles, de manera similar y ambos sexos en la tortuga *T. scripta*, sin embargo durante este periodo se nota un incremento de éste factor en gónadas sometidas a temperaturas feminizantes, en células somáticas que se ubican cerca de la corteza ovárica. Por lo tanto se cree que este factor es indispensable para la diferenciación del ovario (Cuadro 1) (Shoemaker y Crews, 2009).

Gen	Reptil	Tejido/Célula	Referencia
<i>C-Kit</i>	<i>Podarcis s. sicula</i>	Células germinales	Rucci y Di Fiore, 2011
<i>Sf-1</i>	<i>A. mississippiensis</i>	Primordio gonadal	Western <i>et al.</i> , 2000
<i>Wt1</i>	<i>C. picta</i>	Primordio gonadal	Valenzuela, 2008
<i>Sox9</i>	<i>L. olivácea</i>	Gónada indiferenciada y regulación positiva en machos	Moreno-Mendoza <i>et al.</i> , 1999
<i>Vasa</i>	<i>Podarcis s. sicula</i>	Células germinales y somáticas de ovario	Maurizii, 2009
<i>AMH</i>	<i>T. scripta</i>	Gónada masculina	Shoemaker <i>et al.</i> , 2007
<i>Wnt4</i>	<i>T. scripta</i>	Primordio gonadal y regulación positiva en hembras	Shoemaker <i>et al.</i> , 2007
<i>Dmrt1</i>	<i>T. scripta</i>	Complejo urogenital y regulación positiva en machos	Shoemaker y Crews, 2009
<i>FoxL2</i>	<i>T. scripta</i>	Gónada femenina	Shoemaker y Crews, 2009

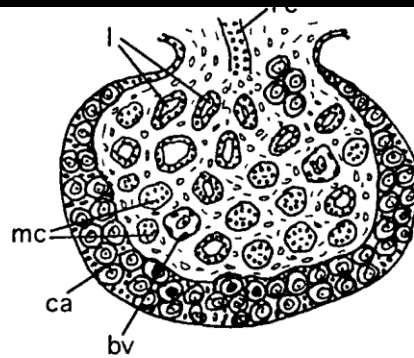
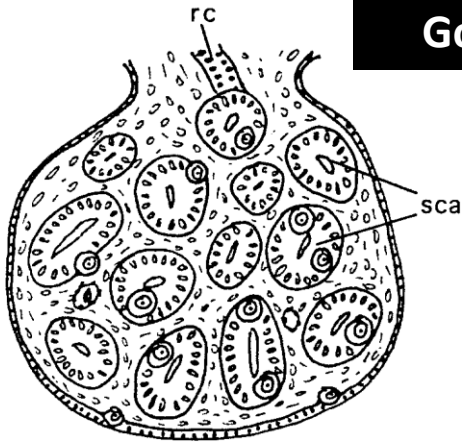
Cuadro 1. Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en reptiles.

Cresta Genital

Blastema Gonadal



Gónada indiferenciada



Testículo

Ovario

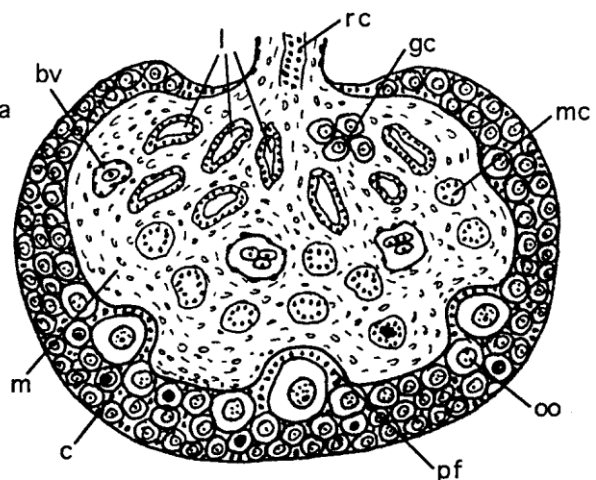
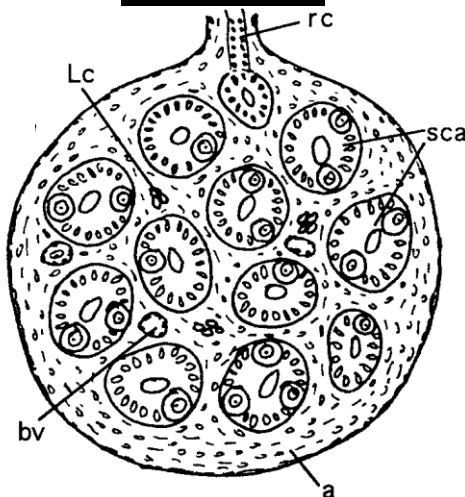


Figura 1. Diferenciación gonadal en un modelo de reptil. a, albugínea; BcMc, cápsula de Bowman de los corpúsculos Malpighianos; bv, vaso sanguíneo; c, cortex; ca, primordio del cortex; ce, epitelio celómico; dm, mesenterio dorsal; gc, células germinales; ge, epitelio germinal; l, laguna; Lc, células de Leydig; m, médula; mc cordones medulares; mm, mesénquima mesonéfrica; mtm, tubo mesonéfrica; oo, ovocito; pf, folículo primordial; rc, "rete cord"; rca, primordio de la "rete cord"; sca, primordio de los cordones seminíferos (Tomado y modificado de Pieau, 1999).

III. Justificación

Los lagartos escamosos al ser uno de los taxa pertenecientes al clado de los Squamata y cuyos integrantes son los más diversificados y mayormente distribuidos por el mundo, proveen características interesantes en cuanto a sus mecanismos de determinación y diferenciación sexual. Los estudios realizados en estos rubros se han enfocado en especies con DST, dejando a un lado a las especies que determinan su sexo genéticamente y particularmente a las familias Phrynosomatidae y Teiidae, cuyas estrategias reproductivas van desde individuos ovíparos y vivíparos hasta especies que se consideran como eslabones intermedios en la evolución de la oviparidad, como es el caso del lagarto *S. aeneus*. La familia de lagartos Phrynosomatidae es un grupo endémico de América que forma parte de la diversidad herpetofaunística del país. *S aeneus*, es un miembro de esta familia y posee ciertas ventajas como su fácil colecta en campo, acoplamiento al cautiverio sin alteraciones en su ciclo reproductivo, así como ser una especie con un estatus de preocupación menor de acuerdo a la IUCN.

Los trabajos de Biología de la Reproducción que involucran la relación de los estadios de desarrollo de los organismos con respecto al desarrollo gonadal son escasos en el grupo de reptiles; sin embargo, son herramientas de gran utilidad que ayudan a entender mejor el funcionamiento de los sistemas reproductivos en la clase Reptilia, así como también permitirá realizar extrapolaciones con los demás grupos de vertebrados. En específico los estudios sobre los mecanismos de gonadogénesis en lagartos pueden contribuir al conocimiento sobre los aspectos de determinación y diferenciación sexual en vertebrados desde un punto de vista comparativo.

En especies de lagartos ovíparos no se han reportado las características ultraestructurales de la gónada durante el proceso de gonadogénesis, así como tampoco su correlación específica con el estadio de desarrollo del organismo por lo que nuestro estudio pretende contribuir con información en este campo.

IV. Hipótesis

Los tipos y arreglos celulares que se establecen durante los procesos de formación de la gónada y su eventual diferenciación en el grupo de los vertebrados son mecanismos que se mantienen conservados en el grupo de los reptiles y por lo tanto también se encontrarán en la lagartija escamosa *Sceloporus aeneus*.

V. Objetivos

General

- Describir el proceso de morfogénesis gonadal en la lagartija escamosa *Sceloporus aeneus* y correlacionarlo con sus estadios de desarrollo embrionario.

Particulares

- Describir los cambios estructurales y ultraestructurales de las células somáticas y de la línea germinal.
- Determinar el periodo de establecimiento de la gónada indiferenciada.
- Establecer la etapa de la diferenciación morfológica de la gónada en un testículo o en un ovario.
- Correlacionar el estadio del desarrollo embrionario y fetal con los cambios morfológicos que llevan a la diferenciación sexual gonadal.

VI. Material y Métodos

Se realizó la siguiente metodología para el cumplimiento de los objetivos planteados en el estudio:



Figura 2. Esquema general de los materiales y métodos empleados en este estudio.

1. *Sceloporus aeneus*

La especie de lagartija *Sceloporus aeneus* fue descrita por Wiegmann en 1928 y su posición taxonómica se establece de la siguiente manera:

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Clase: Sauropsida

Subclase: Reptilia

Orden: Squamata

Suborden: Lacertilia

Infraorden: Iguania

Familia: Phrynosomatidae

Género: *Sceloporus*

Especie: *Sceloporus aeneus*



Figura 3. Hembra grávida de *Sceloporus aeneus*.

Sceloporus aeneus es una especie de lagartija endémica de México cuyos rangos de distribución se encuentran desde la parte oeste de Puebla hasta los estados de Michoacán y Jalisco, abarcando algunas áreas del Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato y Querétaro. Comúnmente habita en los pastizales de los bosques de pino y pino-encino ubicados a gran altitud de la Sierra Madre Occidental en el eje Neovolcánico Transversal de México. (Canseco-Márquez *et al.*, 2007). El tamaño promedio de los organismos adultos es de 50.7 ± 3.53 mm de longitud hocico-cloaca y con un peso promedio de 3 gr. Las hembras poseen un cuerpo más alargado que los machos (Rodríguez-Romero *et al.*, 2002). En el dorso presentan una coloración que puede variar del café al verde olivo con dos franjas blanquecinas que se extienden desde el cuello hasta la base de la cola, en cada hombro se extiende una mancha negra ovalada. Las escamas del cuerpo son quilladas y las de la cabeza rugosas, presentan una escama cantal y dos parietales sobre el cráneo (Castro-Franco, 2003). Smith en 1937 describió dos subespecies de *S. aeneus* que presentan diferencias marcadas en cuanto a modos de reproducción: *Sceloporus aeneus aeneus* (Ovípara) y *Sceloporus aeneus bicanthalis* (Vivípara). Nuestros individuos de estudio ponen de 4 a 9 huevos cada hembra y presentan retención de huevos, el tiempo de incubación hasta la eclosión es de 51-60 días dependiendo de las condiciones del medio ambiente y pueden producir dos puestas por año (Hernández, 1995; Rodríguez-Romero, 2002).

2. Zona de colecta

La colecta de los especímenes se realizó en la delegación de Milpa Alta al suroeste del Distrito Federal, en las coordenadas 19° 12' 2" latitud norte y 99° 2' 3" longitud oeste (Robles, 1958), presenta una altitud promedio de 2400 msnm; la zona posee un clima semifrío y subhúmedo con abundantes lluvias en verano (INEGI, 2005) y una vegetación predominante de *Pinus* y *Quercus* con un sustrato inferior de zacatones como *Festuca*, *Muhlenbergia* y *Agrostis* (Rzedowski, 1981).

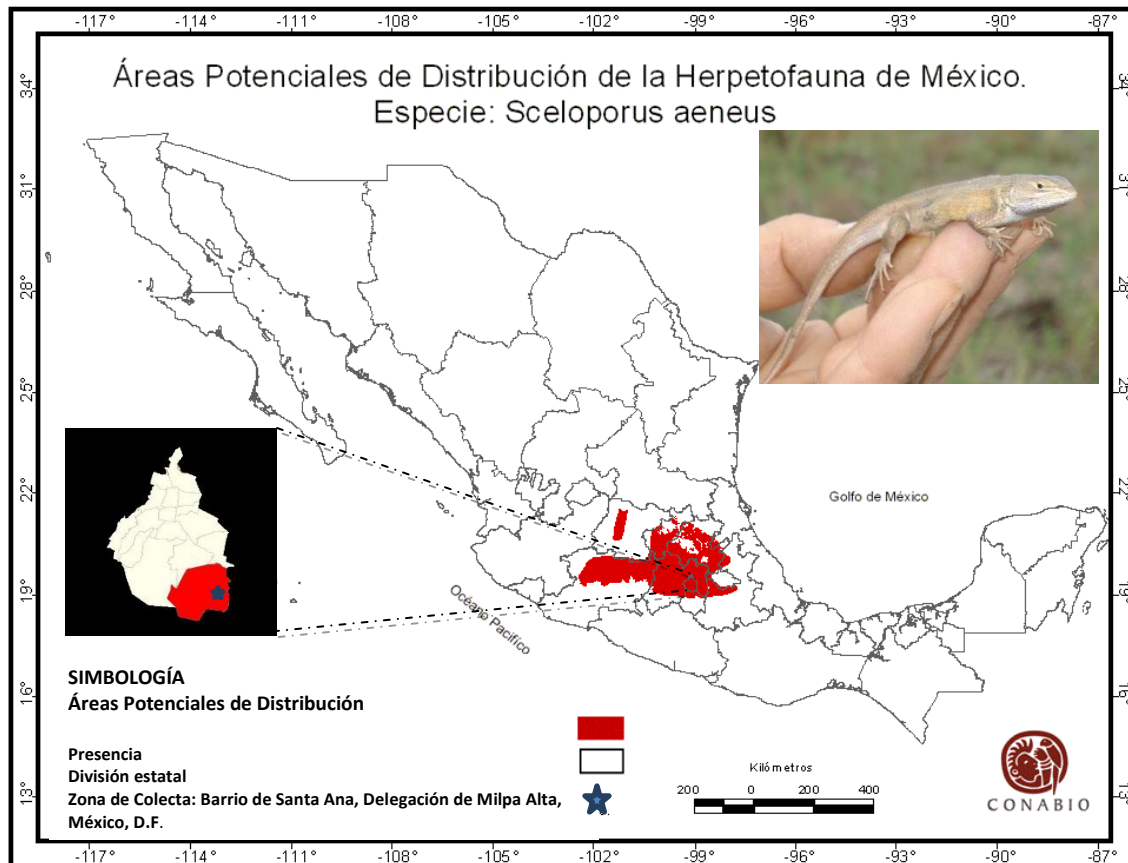


Figura 4. Mapa de distribución y zona de colecta de *Sceloporus aeneus* (Tomado y modificado de Ochoa-Ochoa, 2006).

3. Captura y mantenimiento

Se colectaron 15 hembras grávidas de *S. aeneus* durante la estación de primavera del año 2012 y cinco más durante la primavera del año 2013, mediante la técnica de la vara con lazada y capturas manuales. Los individuos colectados se transportaron en sacos herpetológicos hasta el laboratorio de Biología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias, UNAM, donde se mantuvieron en cautiverio hasta la ovoposición, en pequeños encierros provistos de hojarasca como sustrato, además se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Cada hembra tuvo un promedio de 6 a 7 huevos, los cuales se incubaron en contenedores con sustrato de la zona de colecta y se mantuvieron a una temperatura aproximada de 30° C y con una humedad relativa del 62%.

4. Obtención de las muestras

Se realizó el muestreo al azar de los huevos de *S. aeneus* en diferentes tiempos. Se capturaron imágenes de los embriones con una cámara Sony Cybershot 3.3 Megapixeles acoplada a un microscopio estereoscopio Zeiss stemi 2000-C. Con este último, se procedió a la observación de estructuras anatómicas como cabeza, extremidades anteriores, posteriores y cola para la posterior determinación del estadio de desarrollo en el cual se encontraban los organismos de acuerdo con la tabla de desarrollo descrita por Defaure y Hubert (1961) para el lacertilio *Lacerta vivípara*.

Posteriormente se sacrificaron los embriones y se les disectó el complejo mesonefro-gónada-adrenal, el cual se depositó en tubos Eppendorf con fijador de Karnovsky (Paraformaldehído 1% Glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4) (Karnovsky, 1965) para su procesamiento histológico. Por otro lado, conservamos las cabezas y colas de los embriones en paraformaldehído al 4%; así como las extremidades anteriores y posteriores se guardaron en alcohol 70%, para la posterior captura de imágenes individuales de cada estructura y la realización de la tabla de desarrollo.

5. Microscopía de campo claro y electrónica

Previamente colocados los tejidos en tubos Eppendorf (1ml) con fijador Karnovsky durante 12 horas a 4°C, se procedió a lavar las muestras en buffer de cacodilatos (0.1 M pH 7.3). Las gónadas se post-fijaron en tetróxido de Osmio (OsO_4) en amortiguador de Zetterqvist durante una hora; se efectuó una deshidratación del tejido a partir de alcohol 60% y hasta llegar a alcohol absoluto. Una vez realizado esto, las muestras se trataron con acetonitrilo (óxido de propileno) dos cambios de 20 minutos cada uno; finalmente se realizó una infiltración en mezclas de Epon-acetonitrilo; la primera fue en una proporción 1:1 durante una hora, después 2:1 durante una hora y finalmente un cambio a Epon puro durante 24 hrs. El montaje y la orientación de las muestras se hicieron en las

cápsulas de inclusión con Epon para su posterior polimerización en la estufa a 60° C durante 24 hrs.

Empleando el uso de un ultramicrotomo LKB Leica Bromma Ultratome Nova con hoja de vidrio o diamante se procedió a realizar cortes semifinos de 1µm de grosor, los cuales fueron teñidas con azul de Toluidina 0.5% y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. La descripción estructural y ultraestructural de las gónadas procesadas fueron hechas empleando un microscopio de campo claro Nikon Eclipse E200, donde se capturaron imágenes a aumentos de 10x, 40x y 100x. Para Microscopia Electrónica de Transmisión (MET JEOL) se obtuvieron cortes finos de 35 a 50 nm. de espesor aproximadamente los cuáles fueron montados en rejillas de cobre y tratados con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación y captura de imágenes.

VII. Resultados

1. Morfogénesis gonadal

Se analizaron un total de 119 embriones para el establecimiento de los estadios de desarrollo y la obtención de imágenes para la tabla de desarrollo de la lagartija *S. aeneus*; así mismo para el análisis de la gónada se consideraron 40 individuos, de los cuales 11 se encontraban en estadios indiferenciados mientras que 29 estaban diferenciados (cuadro 2), de los cuales 12 resultaron machos y 17 hembras (figura 5).

Estadio de Desarrollo (Hubert y Dufaure, 1961)	Tipo de Gónada	N° de Individuos
E31	Indiferenciada	2
E32		4
E33		4
E34	En diferenciación	1
E35	Diferenciada	4
E36		2
E37		4
E38		3
E39		5
E40		8
Post-eclosión		3
Total		40

Cuadro 2. Criterios de los estadios de desarrollo (E) y características gonadales para *S.aeneus*.

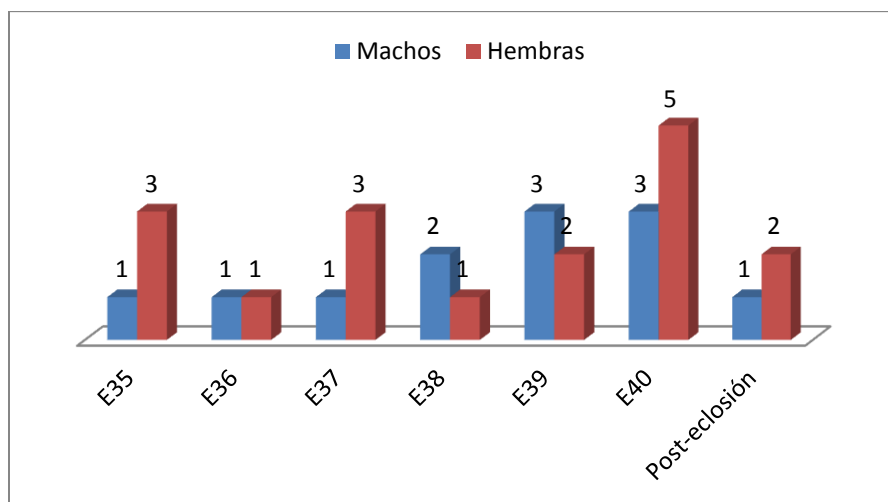


Figura 5. Gráfica de distribución de los individuos de *S. aeneus* con gónada diferenciada.

1.1 Ubicación del complejo urogenital

En todas las etapas del proceso de morfogénesis (E31-E40), las gónadas de la lagartija *S. aeneus* se presentan como estructuras pareadas y de forma ovalada, éstas se sitúan a ambos lados del mesenterio dorsal, justo en la zona ventromedial de cada mesonefro, las cuales se proyectan directamente hacia la cavidad celómica del embrión (Figura 6).

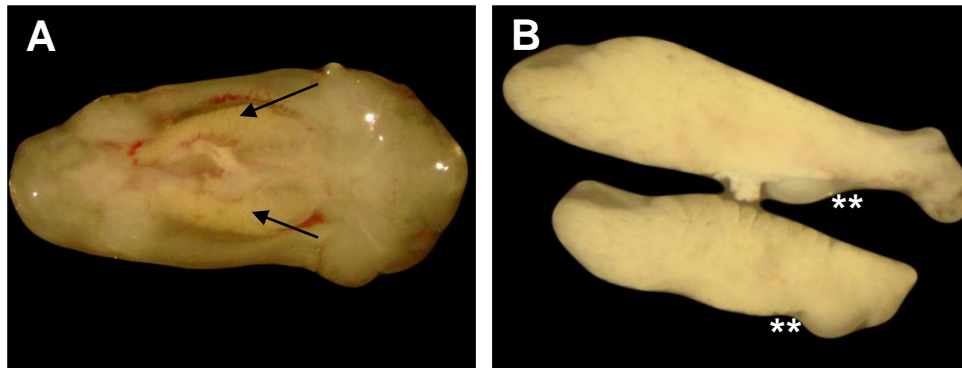


Figura 6. Ubicación del complejo urogenital. A) Región caudal de embrión de *S. aeneus*. Mesonefros (Flechas). B) Mesonefros aislados de *S. aeneus*. Gónadas(**).

La estructura de la gónada se encuentra revestida por un epitelio cúbico simple en su parte más distal y de un epitelio plano simple en las zonas más proximales al hilio; al interior de la estructura encontramos células germinales (CG) redondeadas y algunas otras de tipo epitelial de forma más bien ovalada, también hay algunos espacios intersticiales que contienen un conjunto de células mesenquimales. Las células germinales son distinguibles desde el estadio 31 de desarrollo y se caracterizan por ser de gran tamaño en comparación con los otros tipos celulares, además poseen un citoplasma pálido y sin gránulos, tienen un núcleo oscuro y solo un nucleolo, usualmente las CG se pueden encontrar en algunas de las fases de la división mitótica a lo largo del periodo de indiferenciación. Las células epiteliales son de menor tamaño, poseen un citoplasma pálido, un núcleo oscuro y además poseen una membrana celular más teñida que las CG (Figura 7A-B-C).

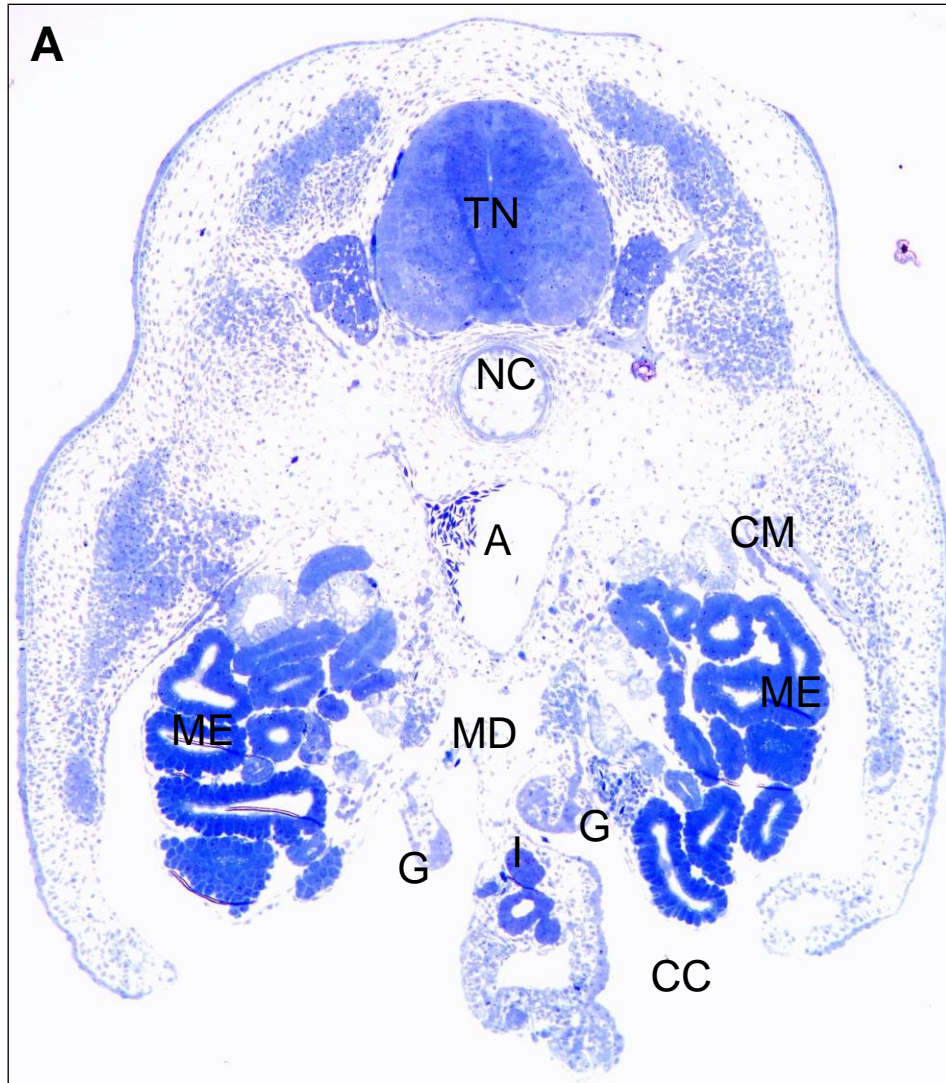


Figura 7. Descripción anatómica e histológica de la gónada de *S. aeneus*. A) Corte transversal de la región caudal de un embrión de *S. aeneus*. A: Aorta; CC: Cavidad celómica; CM: Conducto paramesonefrico o de Müller; G: Gónada; I: Intestino; MD: Mesenterio dorsal; ME: Mesonefros; NC: Notocorda; TN: Tubo neural.

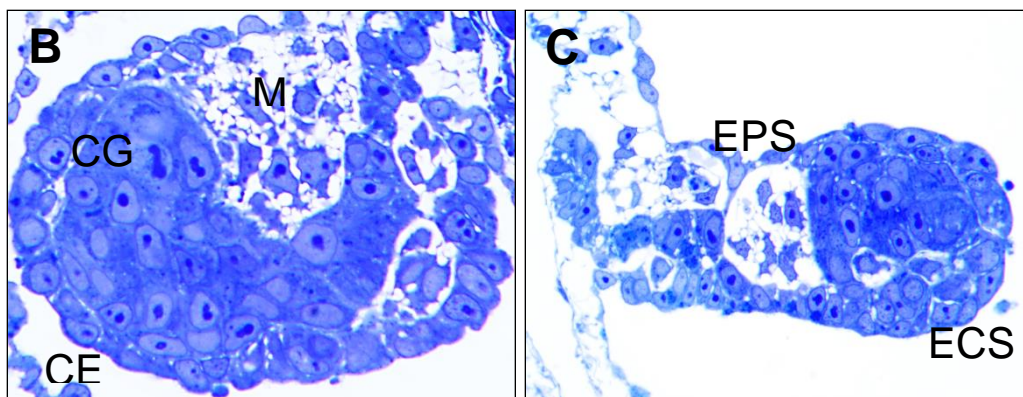


Figura 7. B-C) Gónadas de *S. aeneus*. CE: Células epiteliales; CG: Células germinales; ECS: Epitelio cúbico simple; EPS: Epitelio plano simple; M: Mesénquima.

1.2 Gónada indiferenciada

- **Estadio 31**

En la gónada indiferenciada correspondiente al estadio 31 se observan empaquetamientos celulares con CG de gran tamaño con respecto a las epiteliales, ambas componen el estroma de la gónada el cual se encuentra rodeado por un epitelio simple de células aplanadas que se encuentran en contacto directo con las paredes del mesenterio y los mesonefros (Figura 8 A-B).

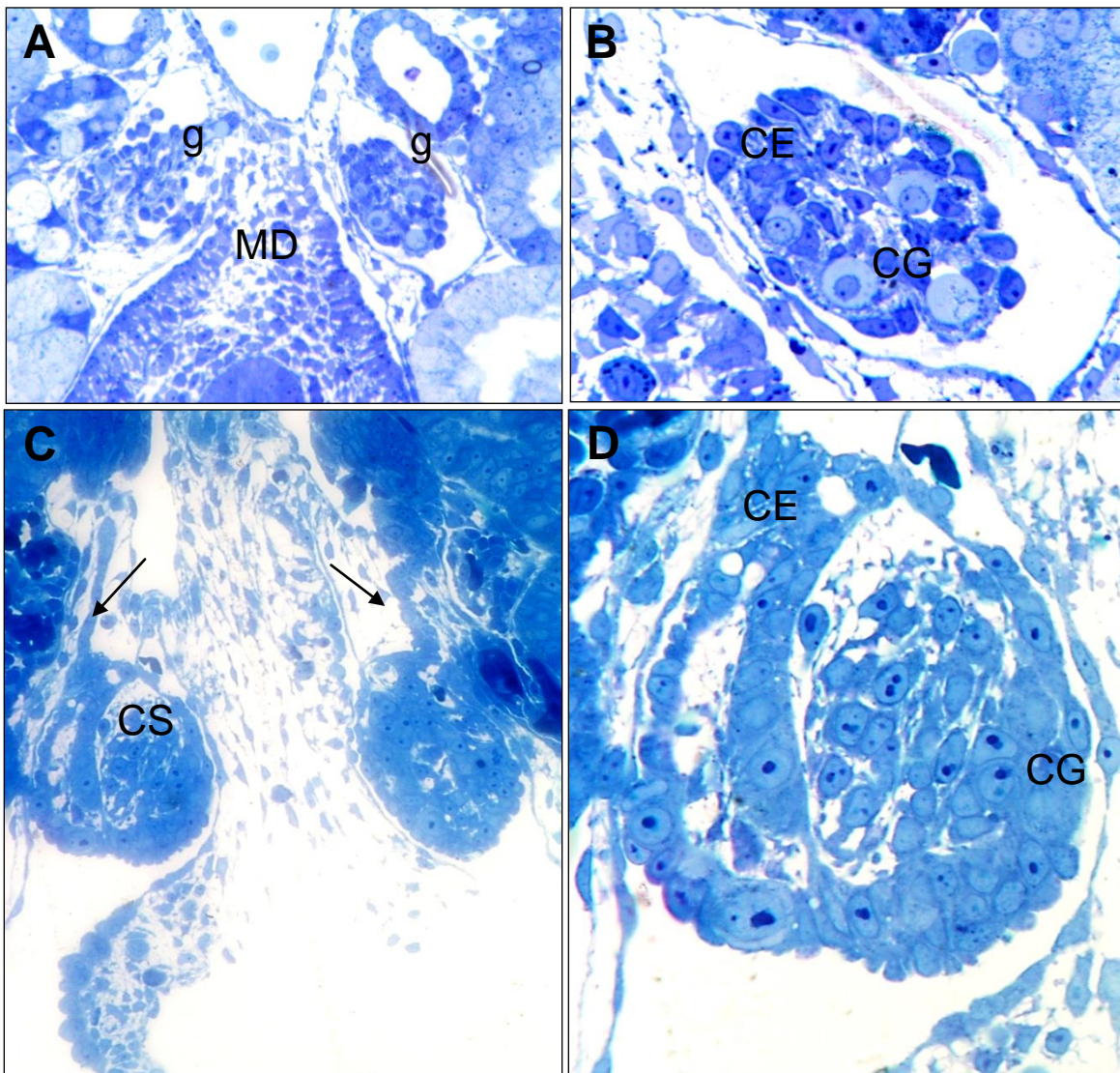


Figura 8. Gónadas de *S. aeneus* en estadio 31 y 32. A) Gónadas en E31 que se encuentran pareadas a ambos lados del mesenterio dorsal. **B)** Detalle de gónada derecha en E31 que muestra algunas células germinales en proceso de mitosis. **C-D)** Gónadas en E32 con CS: cordones sexuales y precursores de la “rete testis u ovaris” (Flechas); CG: Células germinales y CE: Células epiteliales incluidas en cordones sexuales.

- **Estadio 32**

En este estadio el primordio gonadal se observa como una estructura más redondeada que ha aumentado de tamaño debido al agregado celular proveniente de tejidos adyacentes, lo cual es evidente por la íntima conexión que se mantiene con los mesonefros, además es evidente la formación de cordones sexuales en los cuales se observa que algunas CG y células epiteliales han sido incluidas dentro de estos (Figura 8 C-D).

- **Estadio 33**

Durante el E33 la gónada comienza a adquirir una forma más ovalada y existe una mayor presencia de CG con actividad mitótica que se encuentran localizadas dentro de los cordones sexuales. En esta etapa son más evidentes cambios morfológicos, donde ya es posible distinguir la formación de una región cortical y una región medular; sin embargo, aún la separación no es completa ya que se observan varias zonas aún adyacentes entre estas regiones. También se observan la presencia de tejido estromático localizado entre los cordones sexuales los cuales están conformados por células epiteliales y CG (Figura 9 A-B-C).

1.3 Gónada en diferenciación

- **Estadio 34**

El estadio 34 es el momento de la transición de las gónadas indiferenciadas hacia una consolidación en las diferencias morfológicas que existen entre una gónada masculina respecto de una femenina. En este periodo podemos observar a la gónada como una estructura compacta de forma ovoide y es evidente un incremento significativo en cuanto al número de CG en divisiones mitóticas. Al inicio del E34 estas se encuentran presentes en distintas regiones de la gónada, sin embargo al finalizar esta etapa encontramos una regionalización más definida que en el estadio anterior ya que es en este momento de la morfogénesis gonadal que las CG se han establecido en la región cortical o medular de las gónadas femeninas o masculinas respectivamente (Figura 10 A-B-C).

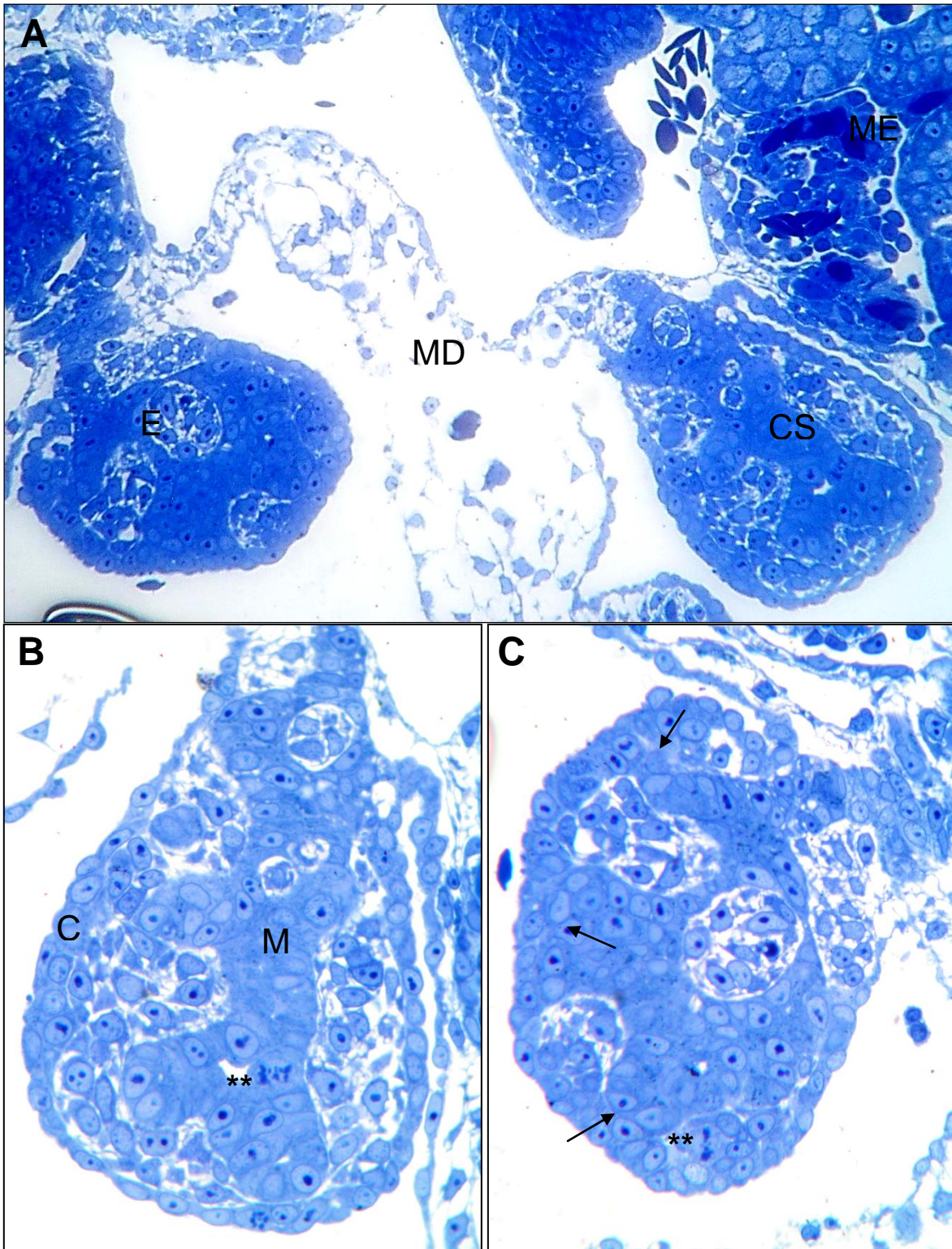


Figura 9. Gónadas de *S. aeneus* en estadio 33. A) Gónadas pareadas en E33. E: estroma; CS: cordones sexuales; MD: Mesenterio dorsal; ME: Mesonefros. **B)** Gónada en E33 regionalizada; Corteza: C; Médula: M. **C)** Gónada con célula germinal en mitosis (**); Conexiones entre la corteza y Médula (Flechas).

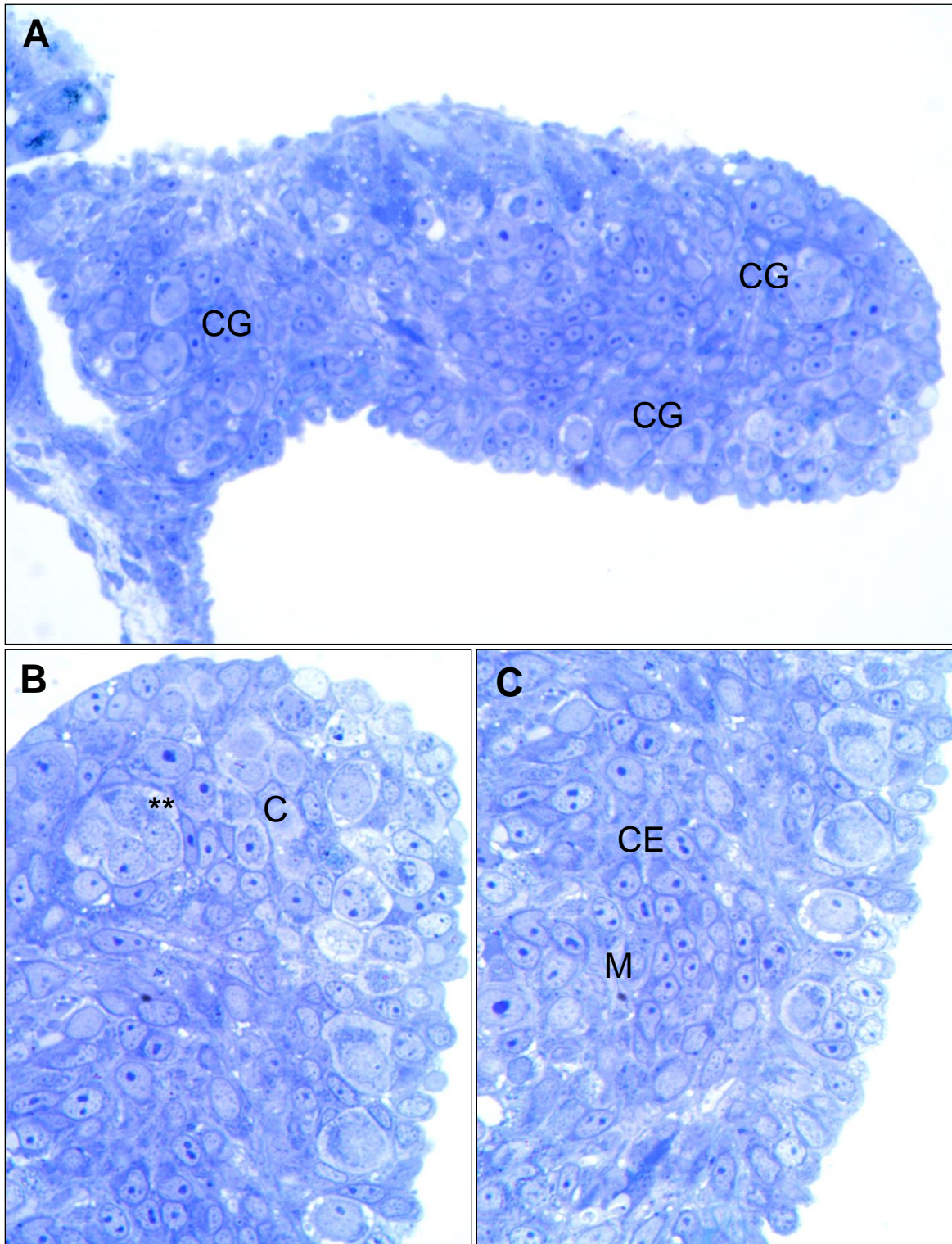


Figura 10. Gónada de *S. aeneus* en E34. A) Finalizando el E34 la gónada se observa con un desarrollo más prominente de la región cortical con un gran número de células germinales: CG y muy pocas en la médula. **B)** Región cortical (C) en desarrollo con un incremento de CG evidenciado por algunas figuras mitóticas (**). **C)** Región medular (M) con gran cantidad de CE: células epiteliales y muy pocas CG.

1.4 Gónada diferenciada

- **Estadio 35**

Gónada femenina y masculina:

La gónada morfológicamente diferenciada como un ovario presenta una forma ovalada con dos zonas claramente regionalizadas: una corteza con 2 o 3 capas de células que se encuentra bien delimitada por tejido conjuntivo y posee una gran cantidad de ovogonias y algunos ovocitos; mientras que la zona medular es reducida y compuesta en su mayoría de células epiteliales y mesénquima (Figura 11 A-B). La gónada masculina presenta una reorganización y proliferación medular de espermatogonias y células epiteliales que se encuentran incluidas en cordones testiculares elongados y bien delimitados por los esbozos de una lámina basal, los cuales a su vez se encuentran embebidos en una matriz de células mesenquimales y otras de tipo epitelial (Figura 11 C-D).

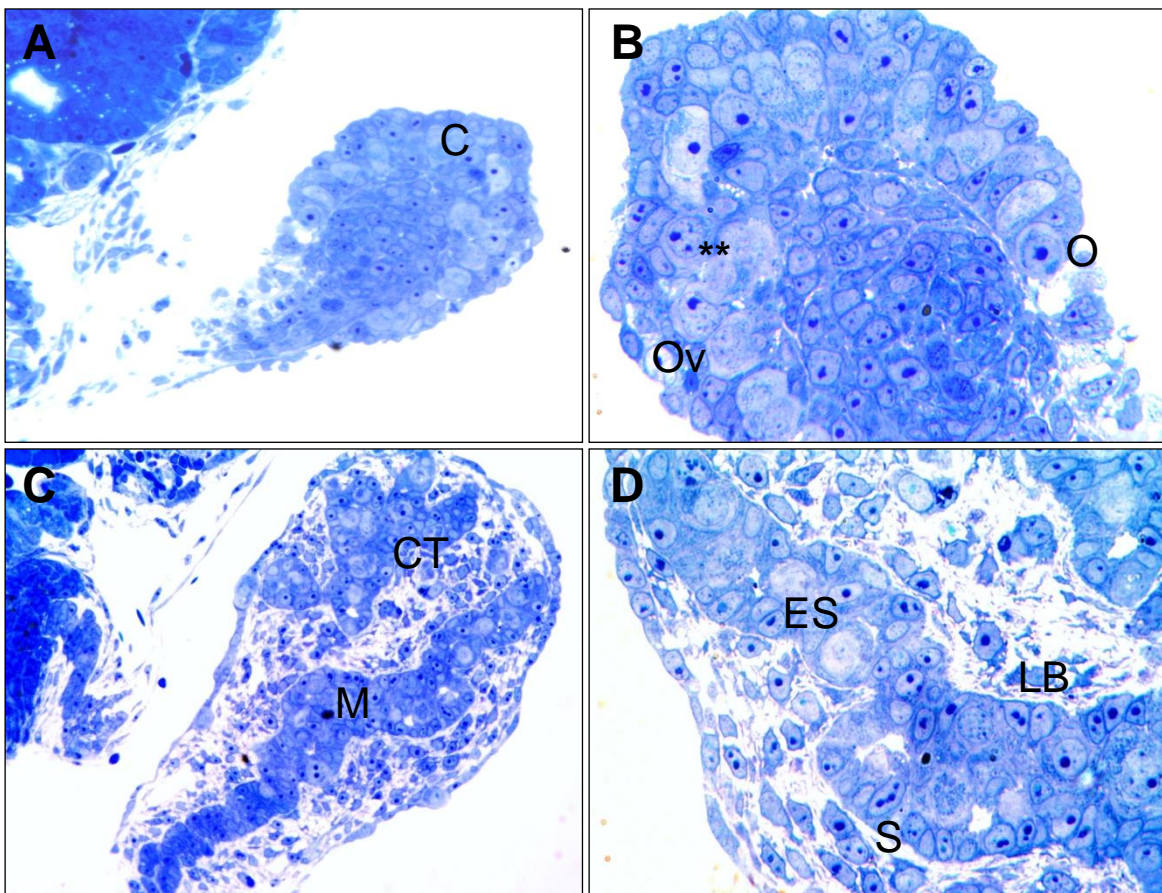


Figura 11. Gónadas de *S. aeneus* en estadio 35. A-B) Gónada femenina en E35. C: Corteza; O: Ovocito; Ov: Ovogonia y (): Ovogonias en división celular. C-D) Gónada masculina en E35. M: Médula; ES: Espermatogonia; LB: lámina basal; CT: Cordones testiculares; S: Células de Sertoli.**

- **Estadio 36**

Gónada femenina y masculina:

La morfología de la gónada femenina en el E36 es similar a la observada en el E35; sin embargo, la región cortical es más gruesa y es evidente que en esta zona la mayoría de las ovogonias han iniciado la meiosis transformándose en ovocitos. (Figura 12 A-B). La gónada masculina en forma de mazo presenta una mayor formación de cordones testiculares localizados en la región medular; Prácticamente, la mayoría de las espermatogonias han sido empaquetadas dentro de los cordones testiculares y se observan interactuando con células de Sertoli. El compartimento estromático se observa laxo, ya que en este se localizan una gran cantidad de vasos sanguíneos; Al interior de este compartimento se localizan células mioides adyacentes a la membrana plasmática de los cordones, así como la diferenciación de las primeras células de Leydig (Figura 12 C-D).

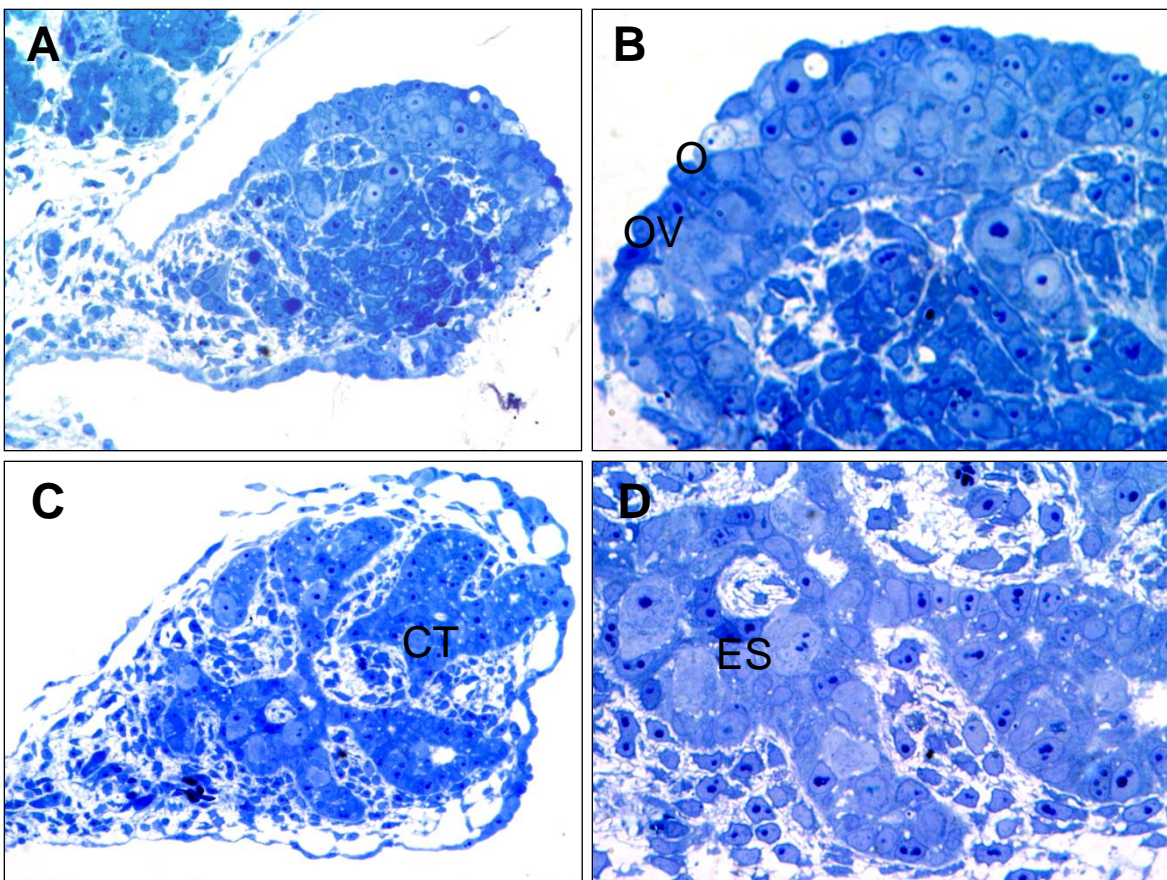


Figura 12. Gónadas de *S. aeneus* en estadio 36. .A-B) Gónada femenina en E36. O: Ovocito; OV: Ovogonia. C-D) Gónada masculina en E36. ES: Espermatogonias. CT: Cordones testiculares.

- **Estadio 37**

Gónada femenina y masculina:

En el E37 la gónada femenina comienza a esbozar una segunda zona de proliferación de ovogonias y ovocitos en la parte dorsal anterior de la misma, conocida como lecho o cama germinal; la corteza por su parte ha alcanzado un grosor de 4 a 5 capas de células, además comienzan algunas asociaciones entre ovocitos en divisiones meióticas (Figura 13 A-B). En la gónada masculina del E37 comienza una proliferación de espermatogonias y asociaciones de éstas con células de Sertoli, ambas incluidas dentro de los cordones testiculares, los cuales son más abundantes en la región medular y algunos tienen una forma menos elongada y más circular (Figura 13 C-D).

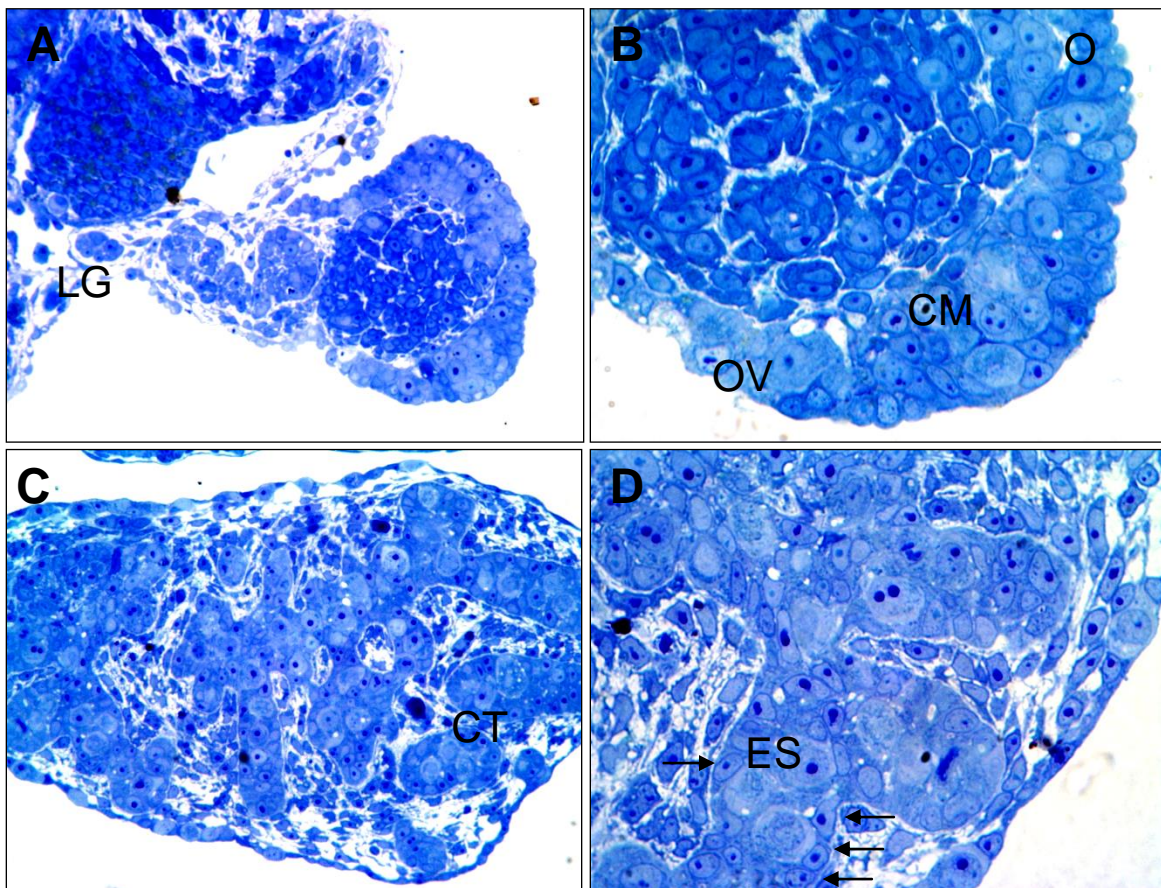


Figura 13. Gónadas de *S. aeneus* en estadio 37. A-B) Gónada femenina en E37. L: Lecho o cama germinal; O: Ovocito; OV: Ovogonia; CM: Células en meiosis. **C-D)** Gónada masculina en E37. CT: Cordones testiculares; ES: Espermatogonias y células de Sertoli asociadas a espermatogonias y dispuestas en la periferia del cordón testicular (Flechas).

- **Estadio 38**

Gónada femenina y masculina:

La gónada femenina en el E38 consta de un número mayor de ovocitos en divisiones meióticas y algunas asociaciones con células epiteliales alrededor de estos (Figura 14 A-B). En la gónada masculina del E38 se observa una mayor disposición de las células de Sertoli en contacto directo con la pared interna de la lámina basal y se reconocen espermatogonias ubicadas en una posición más céntrica del cordón testicular. Además, algunas células miodes fusiformes aparecen delineando la periferia de los cordones testiculares (Figura 14 C-D).

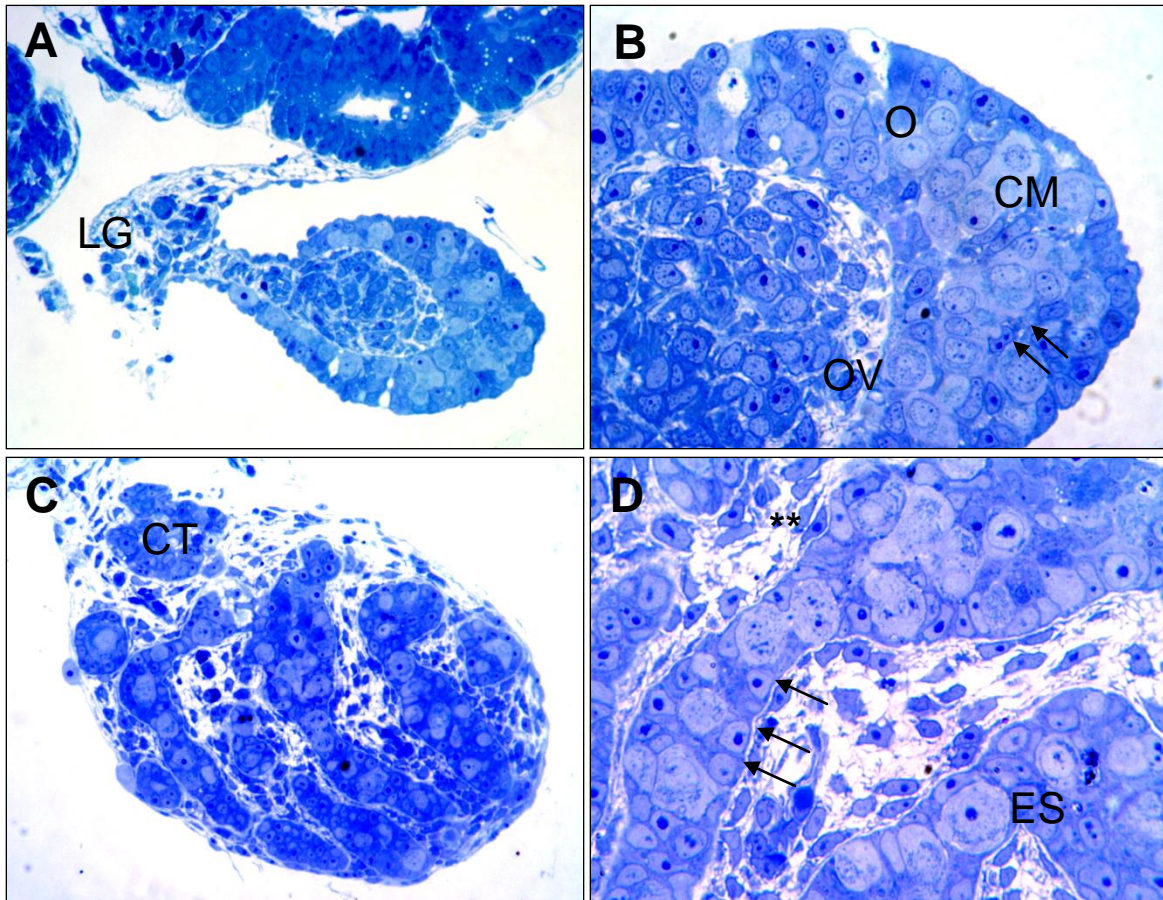


Figura 14. Gónadas de *S. aeneus* en estadio 38. A-B) Gónada femenina en E38. L: Lecho o cama germinal; O: Ovocito; OV: Ovogonia; CM: Células en meiosis; Células epiteliales asociadas a ovocitos (Flechas). **C-D)** Gónada masculina en E38. CT: Cordones testiculares; ES: Espermatogonias; Células de Sertoli (Flechas); Células miodes (**).

- **Estadio 39**

Gónada femenina y masculina:

La gónada femenina en el E39 presenta una corteza con un grosor de 6 a 7 capas de células, además es evidente el crecimiento del lecho germinal. Se denota a la perfección el estroma de la médula compuesto por células fusiformes y fibras de tejido conjuntivo. Algunas células de la línea germinal se encuentran en división (Figura 15 A-B). En cuanto a la gónada masculina del E39 se distingue un arreglo más definido de cordones testiculares redondeados con células miodes y células de Leydig de forma triangular dispuestas en el estroma entre los cordones (Figura 15 C-D).

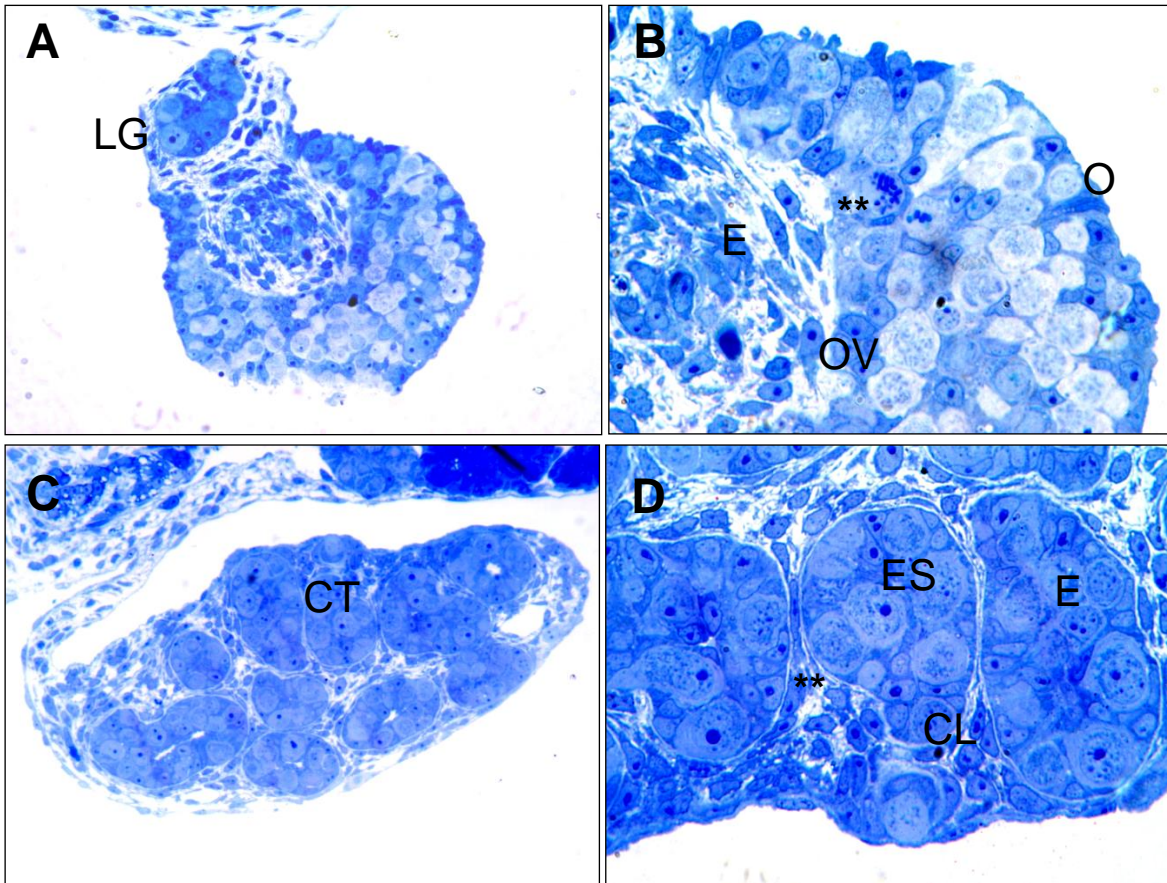


Figura 15. Gónadas de *S. aeneus* en estadio 39. A-B) Gónada femenina en E39. LG: Lecho o cama germinal; O: Ovocito; OV: Ovogonia; Células de la línea germinal en división (). C-D) Gónada masculina en E39. CT: Cordones testiculares; E: Espermatocitos; ES: Espermatogonias; CL: Células de Leydig; Células miodes (**).**

- **Estadio 40**

Gónada femenina y masculina:

La gónada femenina del E40 presenta una corteza engrosada, con ocho o más capas de células, en su mayoría ovocitos primarios, que envuelve totalmente a la región medular, la cual ha adquirido la conformación de estroma con algunas células epiteliales incluidas en esta región. Aún no existe formación de folículos primordiales (Figura 16 A-B). Por otra parte en la gónada masculina del E40 los cordones testiculares se han fragmentado, formando cordones con una apariencia más circular y delimitados por una lámina basal engrosada. En este estadio es más evidente la diferenciación de las células de Leydig localizadas en el compartimento estromático, así como de células mioides adyacentes a la membrana basal de los cordones testiculares (Figura 16 C-D). En la periferia de la gónada se detecta un epitelio simple plano interconectado por la túnica albugínea.

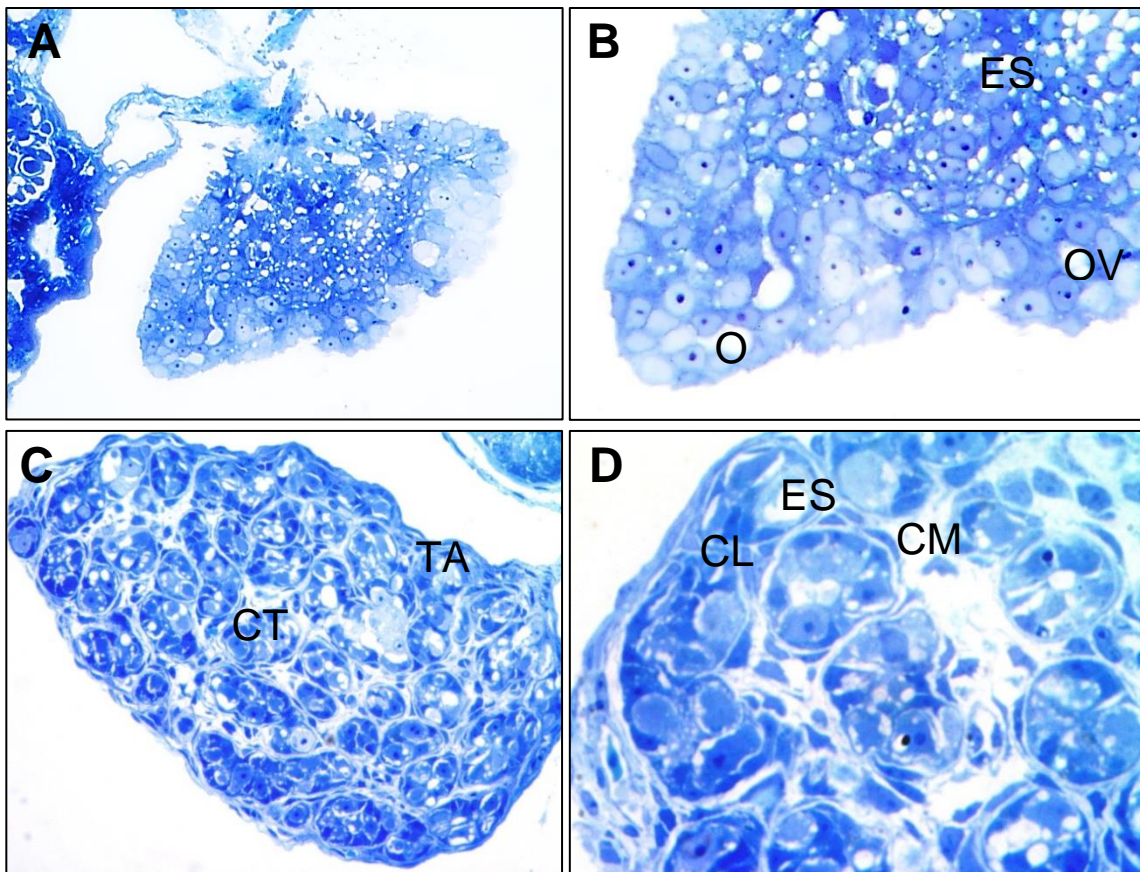


Figura 16. Gónadas de *S. aeneus* en estadio 40. A-B) Gónada femenina en E40. ES: Estroma; O: Ovocito; OV: Ovogonia. **C-D)** Gónada masculina en E40. ES: Espermatogonias; CT: Cordones testiculares; CL: Células de Leydig; CM: Células mioides; TA: Túnica albugínea.

1.5 Ultraestructura de la gónada

Gónada indiferenciada

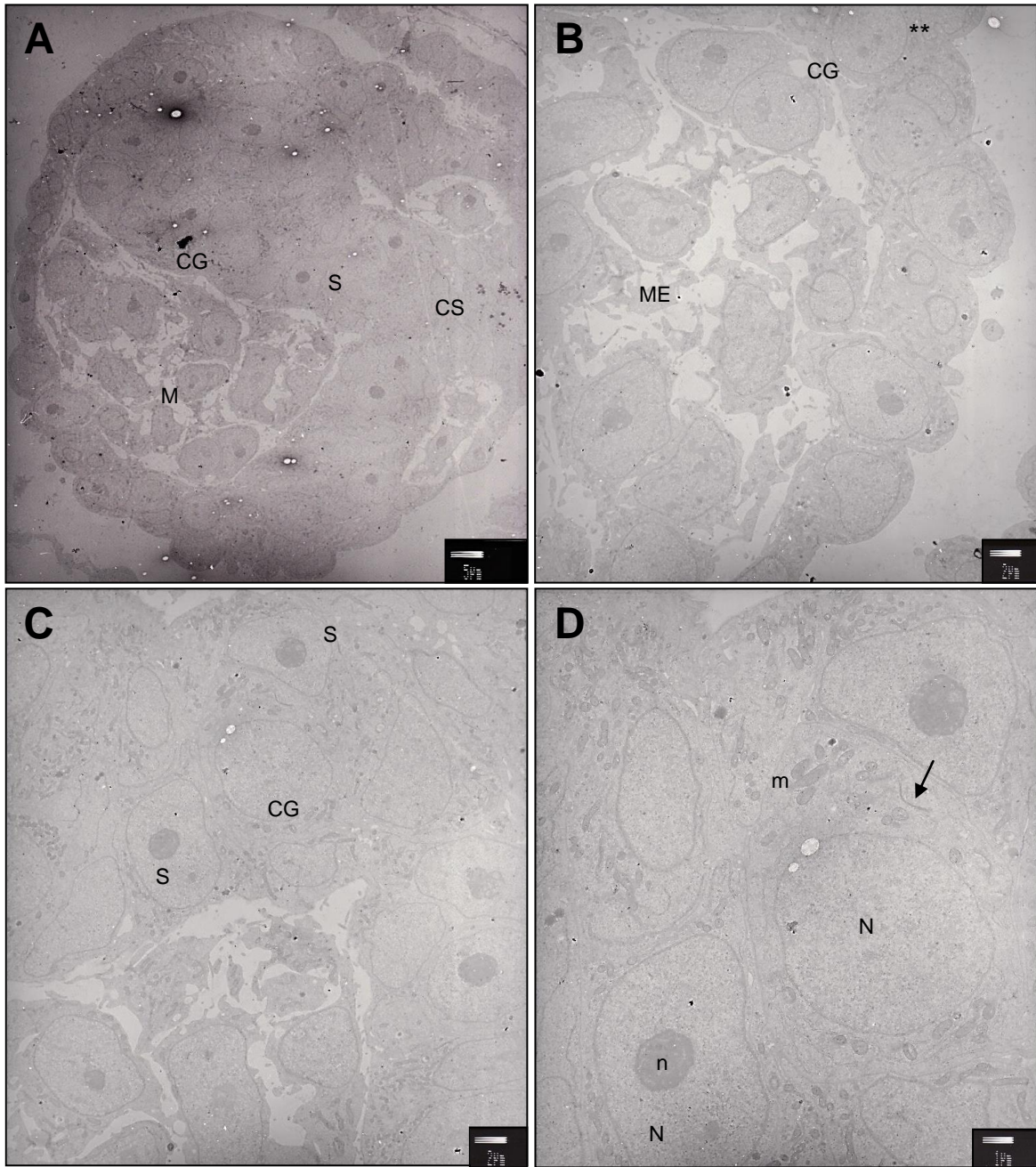


Figura 17. Ultraestructura de gónada indiferenciada de *S. aeneus* en estadio 33. A) Vista panorámica de una gónada con un cordón sexual compuesto de células germinales (CG) y células somáticas (s), rodeadas por células de mesénquima (M). **B-C)** Zona periférica y central de la gónada que muestra a CG con y sin nucléolo (**) en asociaciones con células somáticas pleomorfas (s), también se observa una gran cantidad de matriz extracelular (ME). **D)** Acercamiento de C) que muestra a una CG rodeada por células somáticas, las CG tienen un núcleo redondo (N) a diferencia de las células somáticas, y en su citoplasma se observa un grupo de mitocondrias tubulares y redondas (m) así como un complejo de Golgi (Flecha).

Gónada femenina

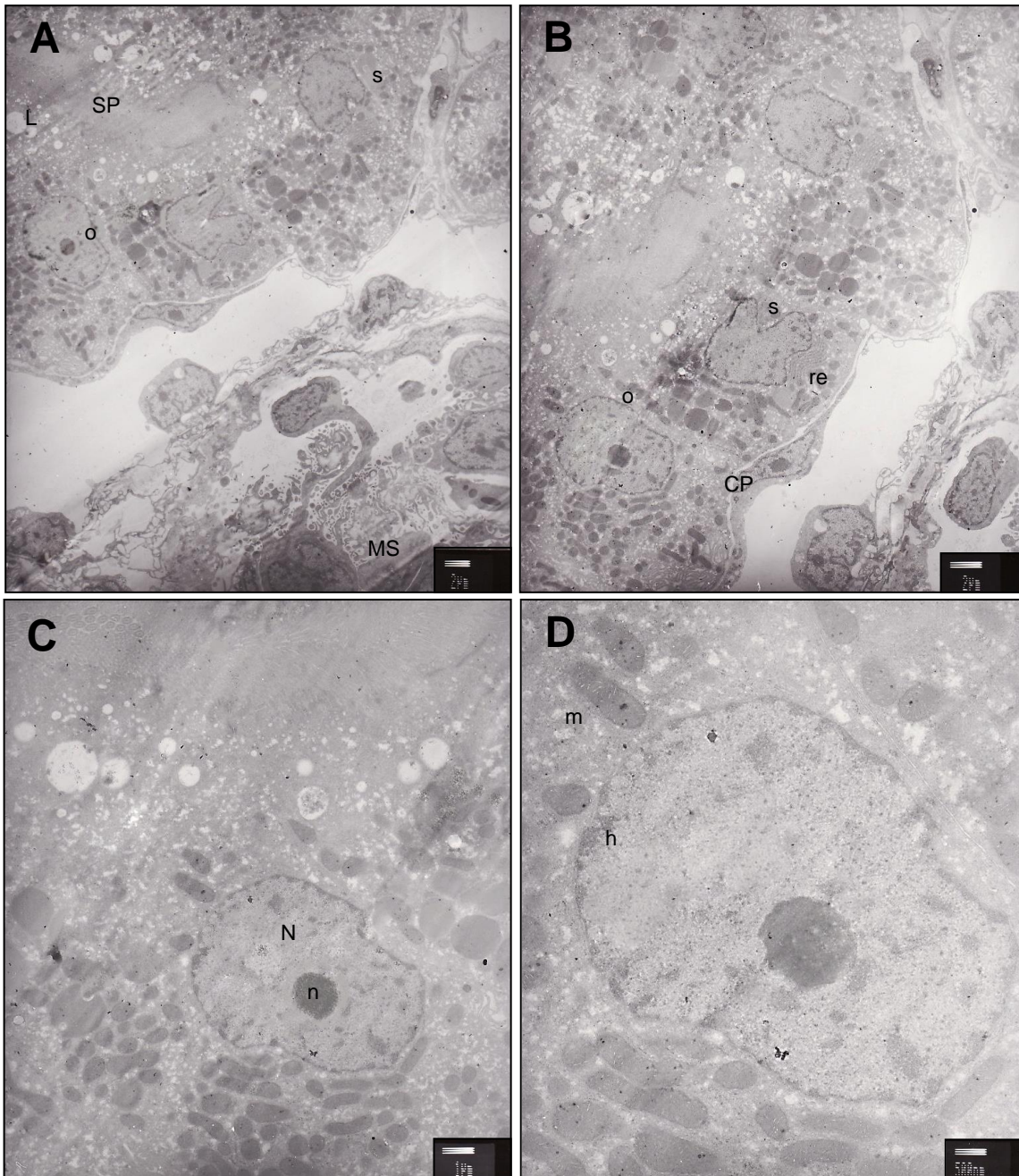


Figura 18. Ultraestructura de gónada femenina de *S.aeneus* en estadio 40. A) El ovario presenta un septo de fibras de elastina (SP) que separa el compartimento estomático de la corteza, en esta última se observa un ovocito (o) y células somáticas o pre-granulosa (s) embebidas en una matriz extracelular con abundantes gotas lipídicas (L). **B)** Acercamiento de A) donde se denota una célula plana migrando por medio de prolongaciones citoplasmáticas debajo del epitelio cortical. En la célula somática se aprecia el retículo endoplásmico (re). **C)** Ovocito en interfase con nucléolo bien definido. **D)** Aumento de C) donde se observan paquetes de heterocromática (h) dispersos al margen de la membrana nuclear del ovocito, por fuera del núcleo observamos mitocondrias tubulares (m).

Gónada masculina

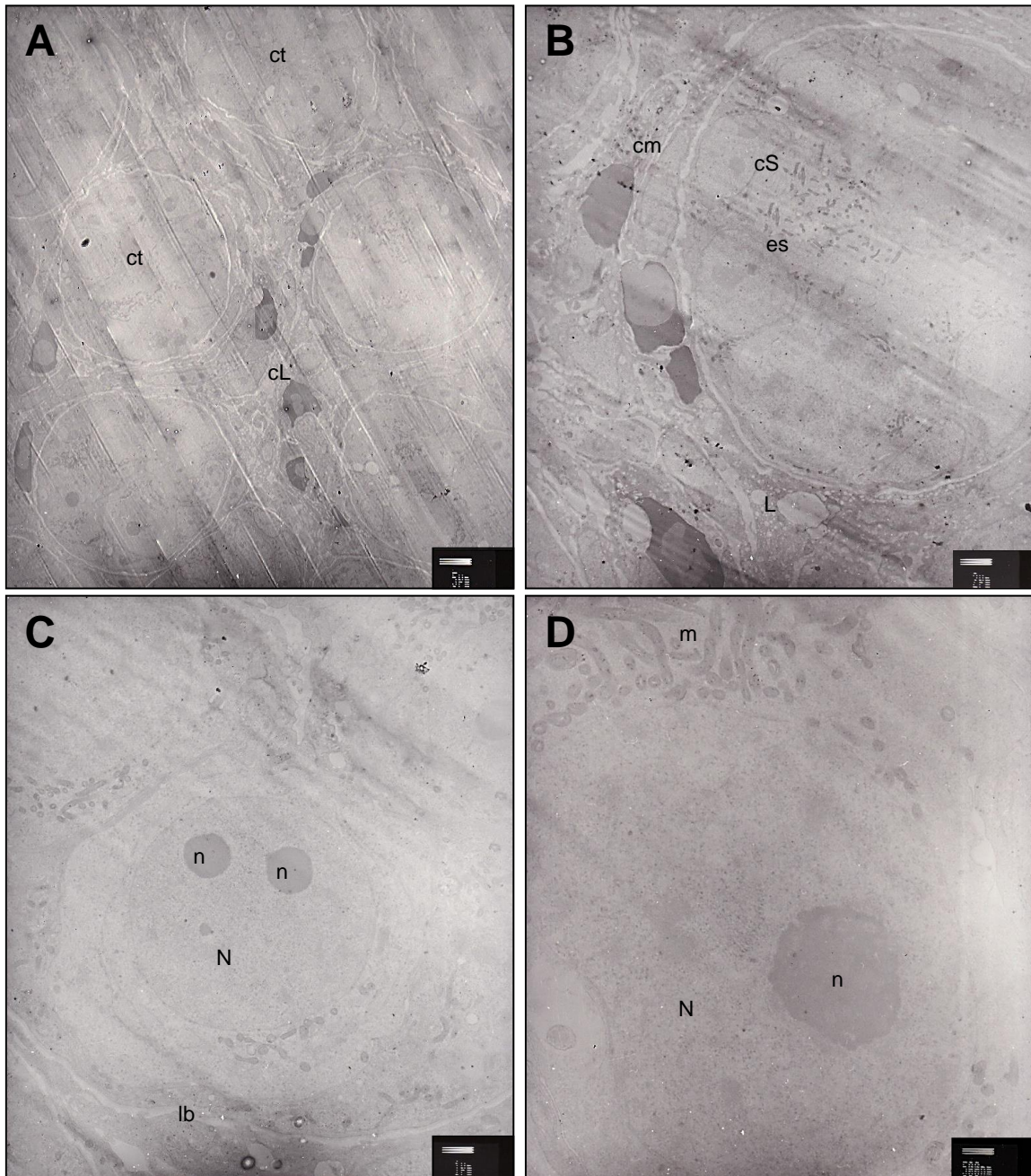


Figura 19. Ultraestructura de gónada masculina de *S. aeneus* en estadio 40. A) Cordones testiculares organizados dentro de la medula del testículo, se observan células de Leydig (L) en el compartimento estromático. **B)** Cordón testicular con células de Sertoli cerca de la lámina basal y espermatogonias, alrededor del cordón células miodes de forma alargada. **C)** Espermatogonia quiescente con dos nucléolos (n), localizada cerca de la lámina basal. **D)** Espermatogonia quiescente con núcleo (N) y nucléolo (n) bien definido, con un grupo de mitocondrias (m) por encima de estos.

2. Estadios de desarrollo embrionario

De acuerdo con la tabla de desarrollo descrita por Defaure y Hubert (1961) para el lacertilio *Lacerta vivípara*, en el presente estudio se tomaron en cuenta los cambios morfológicos de la cabeza, cuerpo y extremidades para establecer los estadios de desarrollo para *Sceloporus aeneus*.

Estadio 31

- Cabeza. Tiene una forma muy angular debido a la protuberancia del mesencéfalo que se encuentra por encima de ésta; posee ojos prominentes y redondos con un poco de pigmentación en ellos (Fig. 17C).
- Extremidades. Las extremidades anteriores y posteriores miden menos de 1mm. y tienen una forma de muñón cuyo margen final se encuentra redondeado (Fig. 17B).

Estadio 32

- Cabeza. Presenta un aspecto más redondeado que en el estadio anterior, tiene una mandíbula superior en forma de pico y se observan los esbozos de la mandíbula inferior (Fig. 17F).
- Cuerpo y extremidades. Las extremidades tienen una longitud de 1 mm.; estas se encuentran divididas en tres segmentos distintivos: el estilopodio, zeugopodio y autopodio; en este último se observan márgenes de la palma y condensaciones de los dígitos. En el cuerpo se denota el corazón, que asemeja a un bulto en el vientre (Fig. 17E).

Estadio 33

- Cabeza. Posee ojos bien pigmentados y sobre estos aparece un parpado superior de forma semilunar. La mandíbula inferior es más notoria; en el mesencéfalo el ojo pineal es evidente por poseer coloración (Fig. 17I).
- Cuerpo y extremidades. Cada una de las extremidades tiene una longitud de 1.5 mm.; el esbozo de la palma tiene meandros o curvaturas en los márgenes, además una condensación de tres dígitos comienza a aparecer en el autopodio. En la posición ventral de la base de la cola aparecen los hemipenes para el caso de los machos (Fig. 17H).

Estadio 34

- Cabeza. El mesencéfalo es menos prominente y se observa una clara división entre la región occipital y parietal, esta última comienza a proyectar algunos esbozos de escamas. El ojo tiene una forma ovalada (Fig. 17L).
- Extremidades. Poseen una longitud de 2 y 2.5 mm. en las extremidades. Cada uno de los cinco dígitos de las palmas y plantas están diferenciados y se encuentran unidos por una membrana interdigital (Fig. 17K).

Estadio 35

- Cabeza. Tiene 5mm. de longitud y en ella se esbozan las narinas y las cavidades óticas. En el extremo del ojo aparece el párpado inferior como un pequeño pliegue (Fig. 17Ñ).
- Extremidades. Las extremidades anteriores miden 2.5 mm., mientras que las posteriores 3.5 mm.; la membrana interdigital de palmas y plantas comienza a retirarse hacia la base de los dedos, liberando a cada uno de los dígitos (Fig. 17N).

Estadio 36

- Cabeza. La cabeza con una forma mayormente angulada de la parte superior, tiene una longitud de 5 mm.; el ojo pineal es muy evidente en región frontal la cual comienza a ser menos prominente así como la región parietal; son más reconocibles las cavidades nasales y óticas, por un aumento de tamaño y una ligera invaginación del tejido, además el pequeño párpado superior aún no recubre el globo ocular de forma ovalada. La diferencia entre la distancia de la mandíbula superior e inferior es menor que en el estadio anterior, sin embargo aún se percibe incompleto el desarrollo de la mandíbula inferior (Fig. 17Q).
- Extremidades. Las extremidades anteriores con una longitud de 4 mm poseen palmas que se encuentran bien formadas y ausentes de la membrana interdigital; los dígitos de estas son más definidos y agudos que los de las posteriores, estas últimas miden 5 mm. de largo; también se pueden notar esbozos de uñas con algunos puntos de pigmentos en los dígitos junto con un adelgazamiento de los mismo (Fig. 17P).

Estadio 37

- Cabeza. Tiene una longitud de 5 mm. y una forma lobulada en la parte superior; aún es muy evidente el ojo pineal y es más notoria la presencia del párpado superior que recubre cerca de la mitad del globo ocular de forma ligeramente oval y además el párpado inferior comienza a cubrir la parte inferior. Las cavidades óticas se ubican en el mismo plano que la mandíbula superior; así mismo las fosas nasales comienzan a ser más protuberantes en la parte superior del hocico y se muestran ciertos puntos de pigmentos; mientras tanto por debajo de la mandíbula inferior, la cual está completa, se nota una pequeña concentración de escamas acromáticas (Fig. 17T).
- Extremidades. Las extremidades anteriores y posteriores poseen un tamaño de entre 4 y 5 mm respectivamente; algunas regiones poseen escamas en la parte dorsal de las mismas y cada uno de los dígitos son de forma achatada con uñas bien diferenciadas y pigmentadas (Fig. 17S).

Estadio 38

- Cabeza. Tiene una longitud de 5 mm y se observa en forma de domo con notorias estructuras como el cerebelo y el ojo pineal sobre el cerebro lobular. La presencia de escamas diferenciadas es mayormente en la zona sub-mandibular y más concentraciones de puntos pigmentados comienzan a aparecer en la parte superior del hocico. Los ojos son prominentes y ovalados, los cuales se encuentran recubiertos por los párpados superior e inferior hasta poco más de la mitad del globo, los cuales se ven como una membrana transparente y delgada. Las cavidades óticas son más evidentes al igual que los orificios nasales (Fig. 17W).
- Extremidades. Las extremidades anteriores y las posteriores llegan a medir entre 5 y 7 mm respectivamente. Algunas zonas internas de las extremidades carecen de escamas, mientras que en el resto de las extremidades se observa un recubrimiento casi total, además aún no hay pigmento sobre estas, con excepción de las uñas las cuales tienen una coloración café-dorada (Fig. 17V).

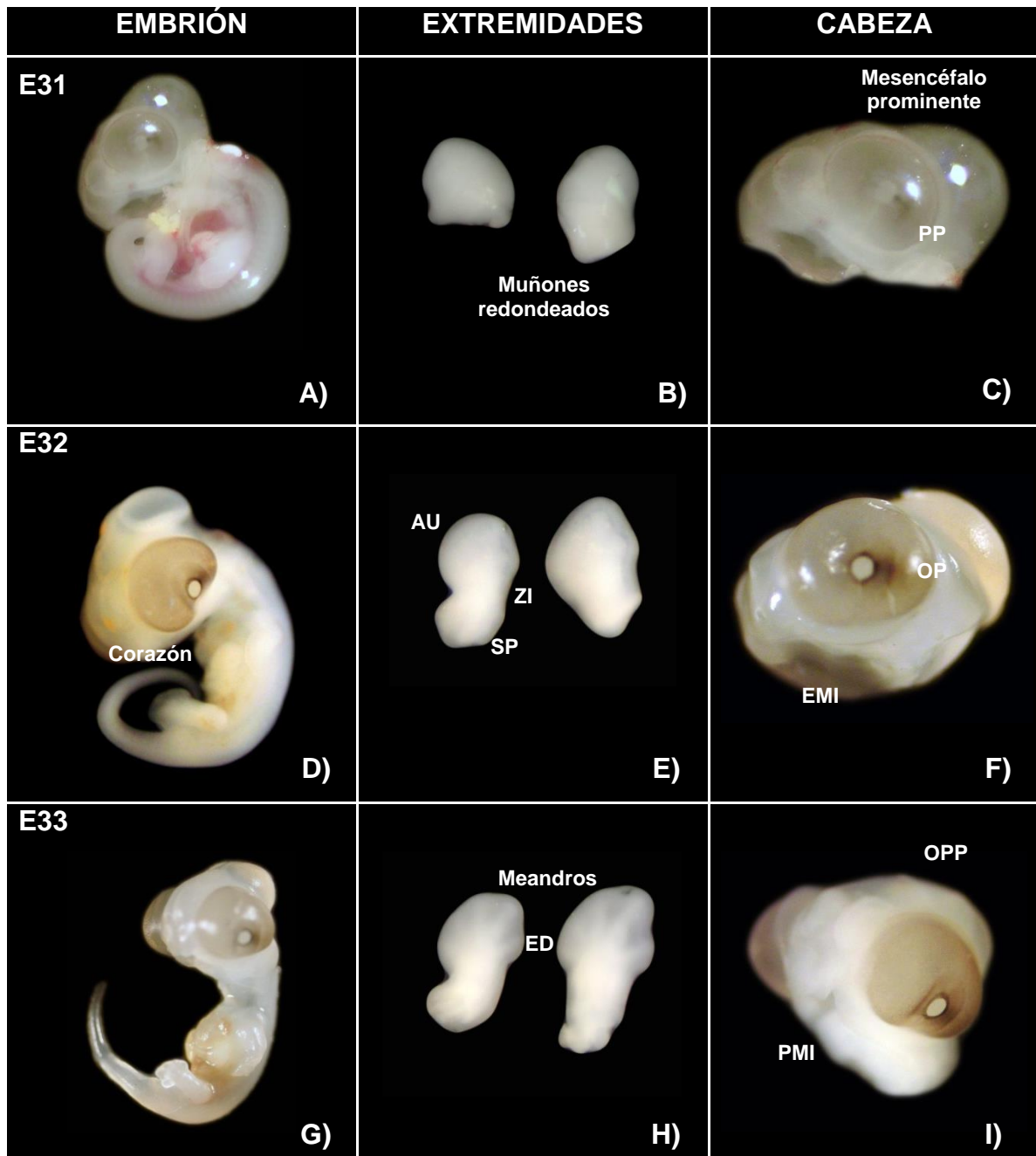
Estadio 39

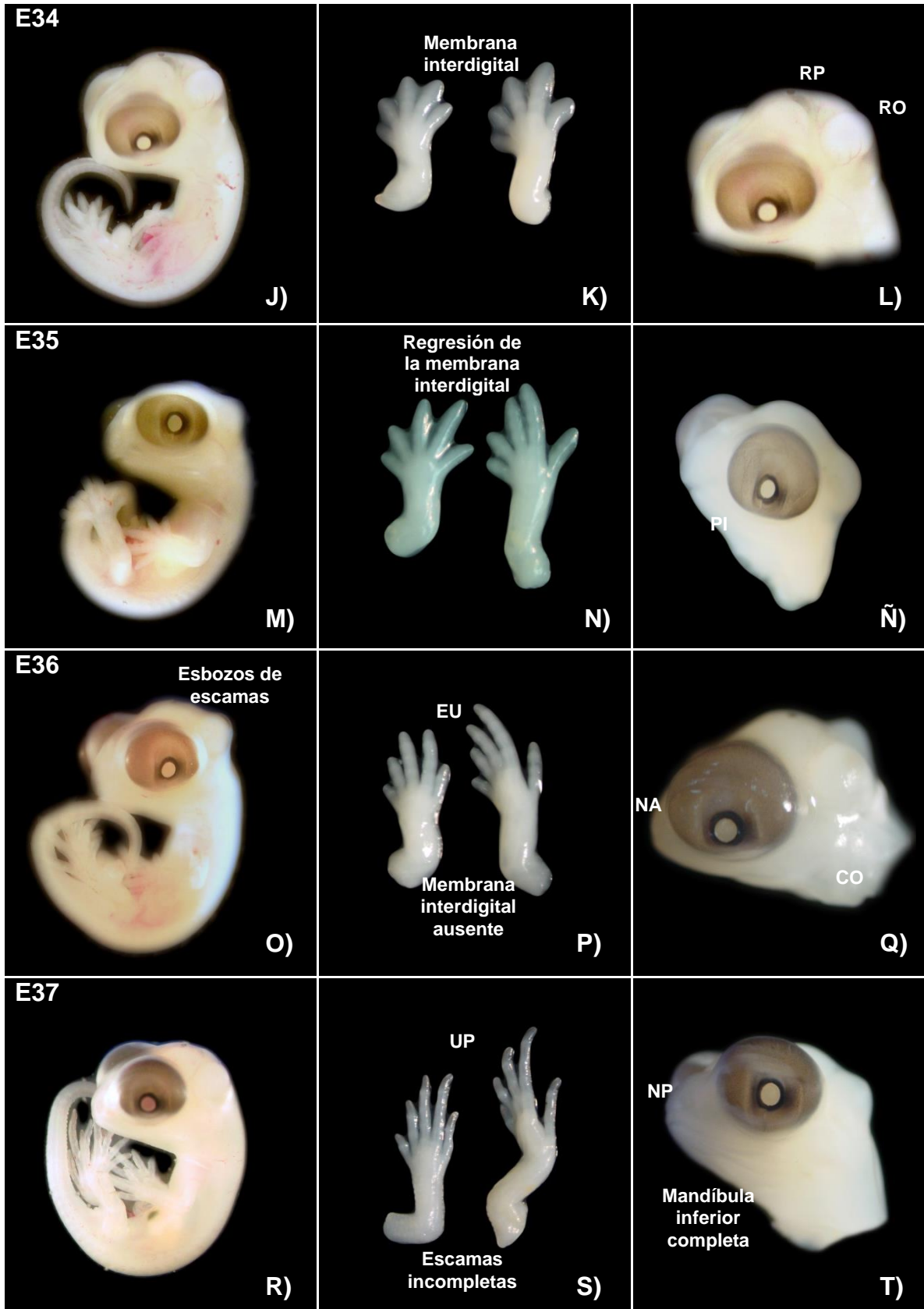
- **Cabeza.** Con una longitud de aproximadamente 7 mm, la cabeza ha adquirido una forma de domo alargado y se encuentra recubierta en su mayoría por escamas que aún están fusionadas en algunas zonas, además la mayoría de ellas poseen poca pigmentación o carecen de la misma, lo cual permite que sean visibles estructuras internas de la mandíbula inferior y el cerebelo en la parte posterior de la cabeza. El ojo es menos prominente que en el estadio anterior ya que se encuentra depositado en la depresión de la cavidad ocular. El párpado está engrosado y pigmentado y le da una apariencia rasgada al ojo. Sobre la mandíbula superior las narinas son prominentes y aún están cerradas además la cavidad ótica ha incrementado su tamaño a casi el doble que en el estadio 36 y la membrana timpánica no posee pigmentación (Fig. 17Z).
- **Extremidades.** Las extremidades anteriores tienen una medida de 6 mm. mientras que las posteriores miden 8mm, están totalmente cubiertas por escamas bien diferenciadas y algunas de ellas presentan pigmentación. Los dígitos están adelgazados y son anulados y las uñas son largas y poco afiladas, casi toda la extremidad alcanzan la forma final que tendrán al momento de la eclosión (Fig. 17Y).

Estadio 40

- **Cabeza.** La cabeza con una longitud de 8 a 9 mm está achatada de la parte superior y es muy prominente el hocico; presenta escamas de diferentes tamaños las cuales están completamente diferenciadas y pigmentadas. El patrón de coloración y los adornos de quillas en las escamas de la cabeza y el cuello que se observan serán los definitivos al momento de la eclosión. El párpado es granular y las cavidades nasales se encuentran abiertas. La cavidad ótica es grande y distinguible con algunos puntos de pigmento color café sobre la membrana timpánica. En la mandíbula están presentes las escamas supralabiales e infralabiales y además se esbozan algunos dientes a lo largo de la mandíbula superior (Fig. 17AC).

- **Extremidades.** Las extremidades anteriores tienen una longitud de 8 mm. y las posteriores de 10 mm. Las escamas están completamente pigmentadas y sobresalen por estar sobrepuestas unas con otras. Tanto las extremidades anteriores como posteriores se observan engrosados, mientras que los dígitos están adelgazados y anulados al final, los bordes de los dedos se fusionan con las uñas puntiagudas (Fig 17AB).





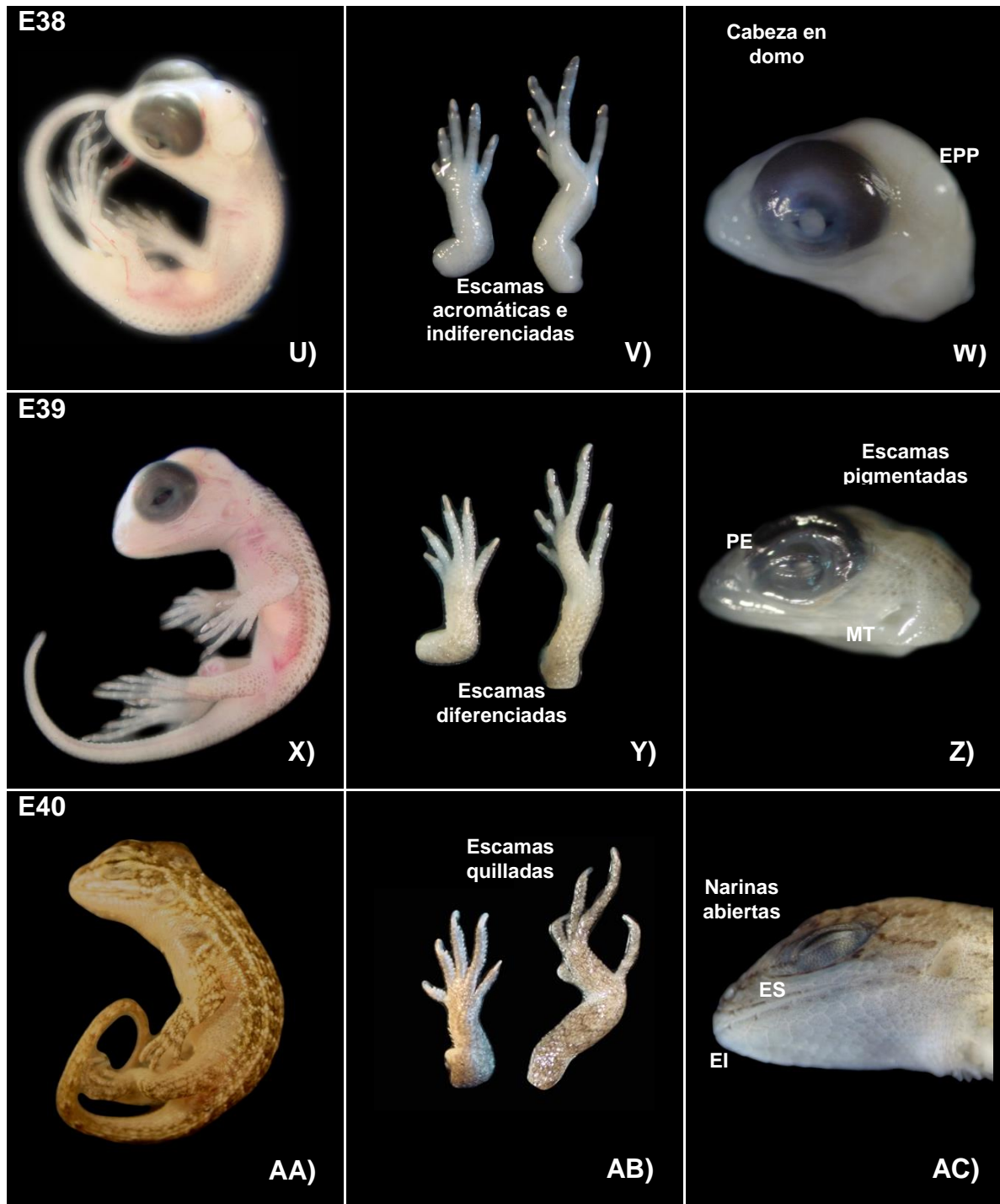
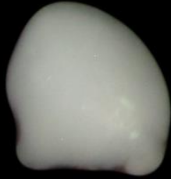
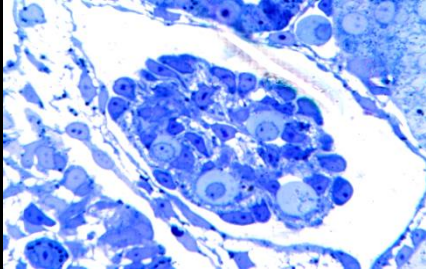

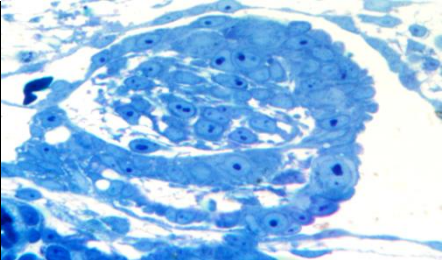

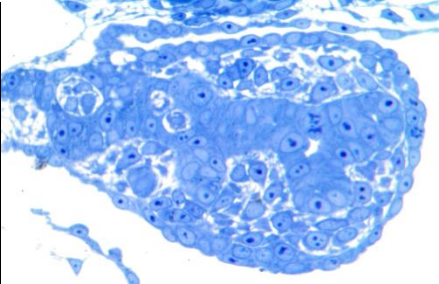
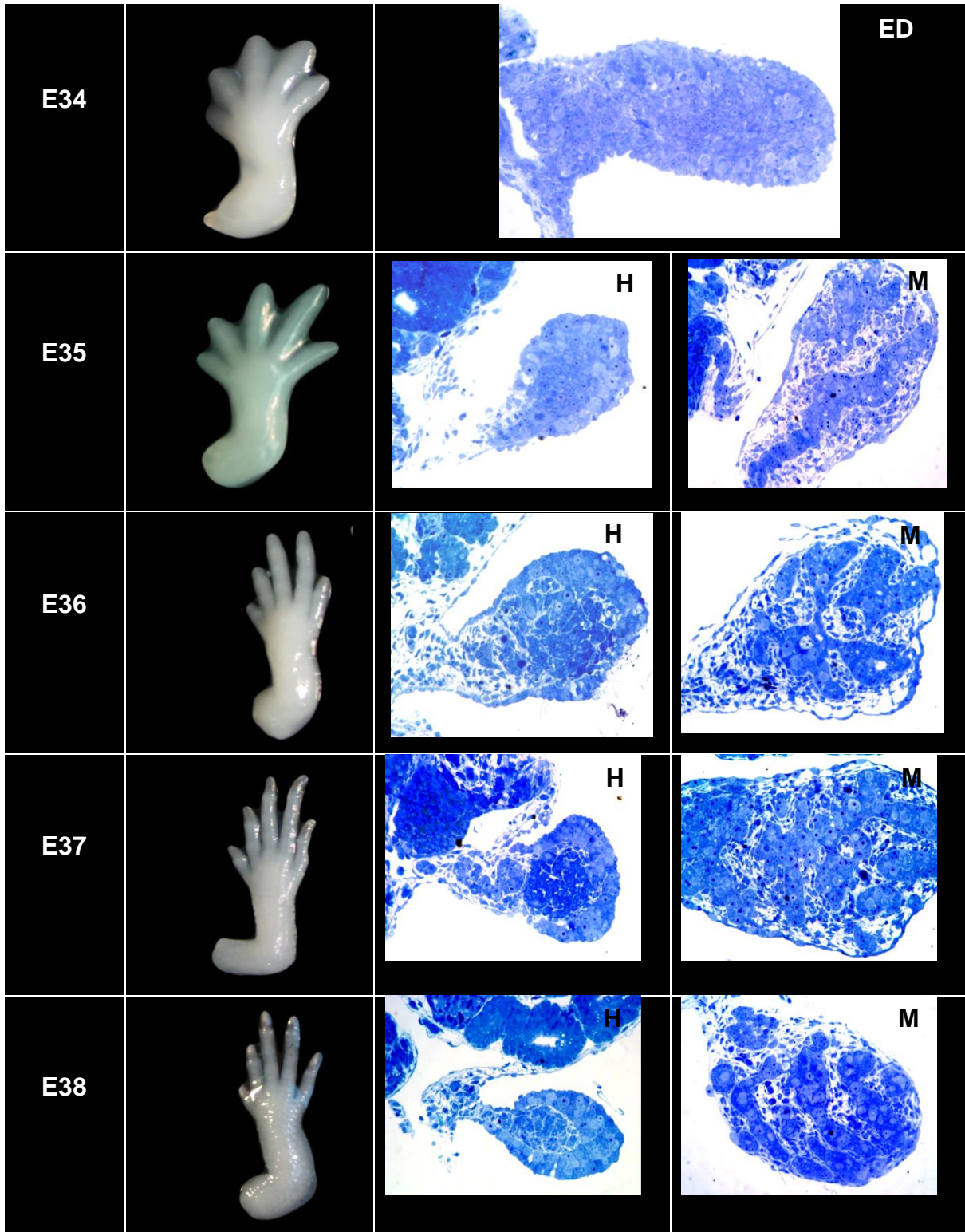


Figura 20. Estadios de desarrollo de la lagartija *S. aeneus*. AU: Autopodio; CO: Cavidad ótica; ED: Esbozos de dedos; EI: Escamas infralabiales; EMI: Esbozo de la mandíbula inferior; EP: Escamas pigmentadas; EPP: Escamas con puntos de pigmento; ES: Escamas supralabiales; EU: Esbozos de uñas; MT: Membrana timpánica sin pigmento; NA: Narinas; NP: Narinas protuberantes; OPP: Ojo pineal pigmentado; PE: Párpado escamoso; PI: Párpado inferior desarrollado; PMI: Progreso de la mandíbula inferior; PP: Puntos de Pigmento; RO: Región occipital; RP: Región parietal; SP: Estlipodio; UP: Uñas pigmentadas; ZI: Zigopodio.

3. Correlación entre morfogénesis gonadal y desarrollo de la extremidad anterior derecha

En los estadios de desarrollo 31 al 33 de la lagartija *S. aeneus* la extremidad anterior derecha se presenta como un muñón o esbozo carente de dígitos, así mismo la gónada se encuentra en etapas indiferenciadas con cordones sexuales elongados y presencia de células germinales y somáticas dentro y fuera de los mismos. Durante el estadio 34 comienza la diferenciación de la gónada y las CG comienzan a ubicarse en una región cortical o medular, al mismo tiempo la palma de la extremidad se encuentra estructurada por cinco dígitos unidos por una membrana interdigital engrosada. A partir del estadio 35 la membrana interdigital de la palma retrocede liberando a los dígitos, que comienzan a formar uñas y a poseer escamas, la gónada por su parte se encuentra morfológicamente diferenciada en un ovario o un testículo (Figura 18).

Estadio	Estructura diagnóstica	Gónada	
E31			IN
E32			IN
E33			IN



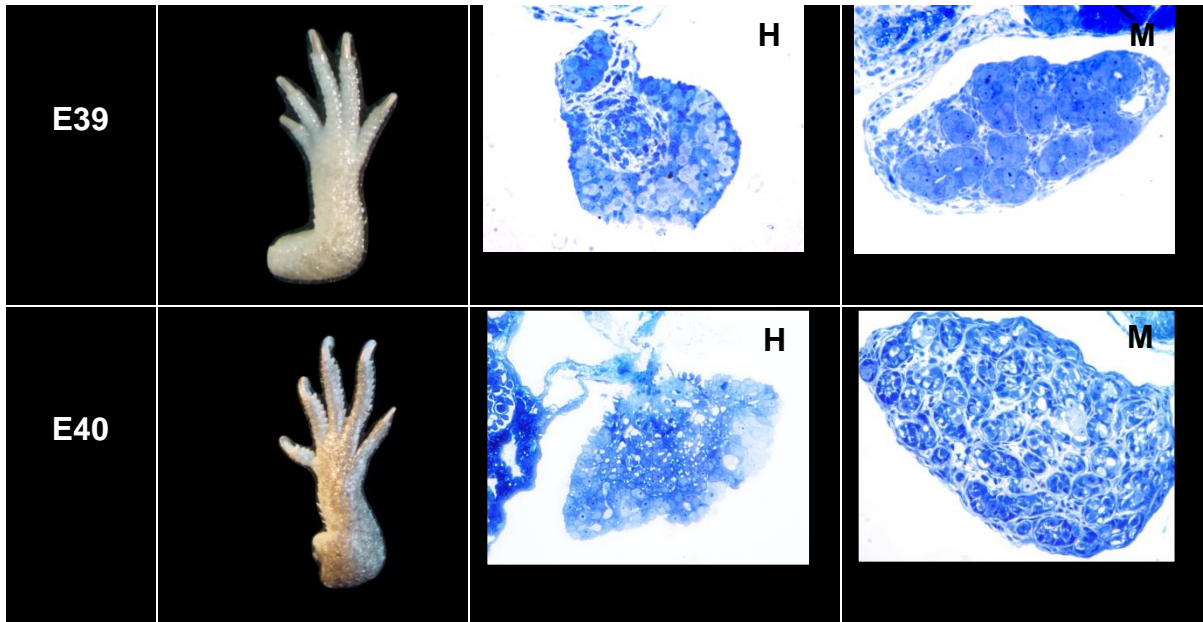


Figura 21. Correlación entre morfogénesis gonadal y estadio de desarrollo de *S. aeneus*. En la tabla se muestra una correlación entre el desarrollo gonadal y la extremidad anterior derecha como estructura diagnóstica del estadio de desarrollo en el que se encuentran los embriones de la lagartija *S. aeneus*. (IN: Gónada indiferenciada; ED: Gónada en diferenciación; H: Gónada femenina; M: Gónada masculina).

VIII. Discusión

1. Morfogénesis gonadal

En *Sceloporus aeneus*, así como en otras especies de reptiles y vertebrados las gónadas son estructuras pareadas que se desarrollan en el epitelio celómico sobre la superficie ventromedial de los mesonefros (Pieau *et al.*, 1999). De la misma manera, las gónadas indiferenciadas y de carácter bipotencial se compone de dos linajes celulares: células somáticas y células germinales primordiales. El linaje somático se ha propuesto que puede derivar del epitelio celómico, del mesénquima subyacente o bien del blastema mesonéfrico; mientras que las CGP tienen un origen extra gonadal, especificándose la línea germinal muy temprano en el desarrollo embrionario (Forbes, 1956; Hoar, 1969; Raynaud y Pieau, 1885). Si bien, en todos los vertebrados las CGP provienen de diferentes lugares para colonizar la cresta gonadal, es un hecho que todas poseen las mismas características morfológicas, específicas de la línea germinal como forma y tamaño. En *S. aeneus*, las CGP poseen características similares a las de otros reptiles como un tamaño particularmente grande, debido a la gran cantidad de citoplasma y gotas lipídicas presentes en este, además de una forma muy redondeada, también poseen núcleos altamente susceptibles a las tinciones debido a la cromatina, esto concuerda con otras descripciones hechas en otras lagartijas como *Calotes versicolor* (Doddamani, 2006), *Sceloporus undulatus* (Austin, 1988) y *Anolis carolinensis* (Forbes, 1956). El proceso de morfogénesis gonadal de *S. aeneus* puede dividirse en tres etapas principales: la aparición de la gónada indiferenciada, el proceso de transición de la gónada bipotencial hacia un testículo o un ovario y el desarrollo de la diferenciación ovárica o testicular. Estas mismas etapas han sido reconocidas y descritas en el lacertilio *S. undulatus*, las cuales coinciden en etapas de desarrollo y características histológicas, sin embargo, para otros reptiles estos periodos pueden ser variables, debido a la duración del desarrollo de cada organismo, tal es el caso de la tortuga dulceacuícola *Trachemys scripta* (Greenbaum, 2002) o el cocodrilo *Alligator mississippiensis* (Smith y Joss, 1993) cuyos tiempos son más prolongados.

1.1 Gónada indiferenciada

En reptiles, la gónada indiferenciada también se denomina como gónada bipotencial, la cual es una estructura conformada por células mesenquimáticas y algunas CGP distribuidas en la corteza y la médula. Las CGP de la gónada bipotencial de *S. aeneus* presentan por igual una gran actividad mitótica durante los estadios del 31 al 33 correspondiente al periodo indiferenciado al igual que en otros tipos de reptiles como la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989), la lagartija vivípara *Niveoscincus ocellatus* (Neaves *et al.*, 2006) y en *alligator mississippiensis* (Forbes, 1940).

En *S. aeneus* a finales del periodo indiferenciado (E33) es distinguible la estructura de la "rete cord" que se extiende desde los mesonefros hasta la porción media de la gónada, así como también la presencia de un solo cordón sexual con algunas células de la línea germinal rodeadas por abundantes células somáticas, estos cordones a su vez se encuentran rodeados de mesénquima; éstas descripciones coinciden con el desarrollo de la gónada de *Selaporus undulatus*, sin embargo, difiere con la lagartija *Calotes versicolor*, debido a que en el E33 ya existe una diferenciación más temprana de la gónada, evidenciada por un mayor número de cordones sexuales y la proliferación de la corteza o la médula en hembras y machos respectivamente.

La gónada indiferenciada de todos los vertebrados posee una gran plasticidad (De Falco y Capel, 2009). Las CGP permanecen indiferenciadas hasta que son sometidas a un ambiente hormonal determinante. La teoría hormonal de la diferenciación sexual sostiene que el genotipo influye directamente en la producción de ovarios o testículos pero la confirmación del desarrollo sexual procede independientemente de los efectos genéticos directos, por tanto el compromiso del fenotipo es proporcionado por las hormonas y algunos genes diferenciales que actúan en reptiles y otros vertebrados (Jost, 1953).

1.2 Gónada en diferenciación

Los principales cambios morfológicos ocurren durante el periodo en que la gónada se encuentra en el proceso de diferenciación, el cual en *S. aeneus* acontece en el E34. Continuando con el desarrollo gonadal, la región de la corteza durante el desarrollo testicular entra en regresión, mientras que los cordones seminíferos se comienzan a formar. En el desarrollo del ovario, ocurre lo contrario, la médula empieza a degenerar y la corteza se engrosa. Para el final de este estadio tenemos a las estructuras diferenciadas de hembras y machos, es decir ovarios y testículos.

En *S. aeneus* al inicio del E34 se denota una distribución de CGP tanto en la región medular como la cortical; a finales de este estadio tenemos las primeras señales de la diferenciación ovárica o testicular. El primer signo del desarrollo ovárico es un engrosamiento de la superficie epitelial, debido a que las CG se encuentran ubicadas en esta región; los testículos por su parte son reconocidos por la formación de los cordones testiculares en la médula, los cuales engloban en su interior células somáticas y germinales. Estas descripciones son similares a las reportadas por Austin en 1988 para la lagartija ovípara *S. undulatus* y para la lagartija vivípara *Niveoscincus ocellatus* (Neaves *et al.*, 2006).

De acuerdo con Wartenburg (1981) algunas de las células pre-granulosa y de la teca en hembras o pre-Sertoli en machos de mamíferos se originan de la cápsula de Bowman y los podocitos del glomérulo; estas células epiteliales migran al interior de la gónada por el camino de la “rete ovarii” o de la “rete testis” según sea el caso. Claramente tanto en mamíferos como en reptiles, la estructura de la “rete cord” juega algún papel en la formación de la gónada, dicho fenómeno descrito por Austin (1988) para la lagartija del mismo género que la nuestra *S. undulatus* también fue observado en los estadios indiferenciados y en diferenciación de *S. aeneus* (E31-E34).

1.3 Gónada diferenciada

En *S. aeneus* a partir del E35 y hasta el E40 la gónada ya se encuentra consolidada como un ovario o un testículo. Las CGP se encuentran en procesos de división celular que finalmente formaran parte del proceso de diferenciación de la línea germinal, en cuyo caso es diferente para hembras y machos, ya que para el caso de hembras, la entrada a la meiosis es el indicador de la diferenciación; no siendo el caso para machos cuyas CGP entran en meiosis después de la eclosión como es el caso de *Calotes versicolor* (Doddamani, 2006). Sin embargo, algunos autores reconocen que en los estadios de pre-eclosión los testículos ya se encuentran en condiciones de madurez para el inicio de la diferenciación de la línea germinal masculina.

1.3.1 Diferenciación ovárica

La lagartija *S. aeneus* inicia el proceso de diferenciación de las células de la línea germinal femenina en el estadio de desarrollo 35, justo después de la diferenciación morfológica del ovario en el E34; al igual que en otros grupos de reptiles, este fenómeno es evidenciado por la presencia de CGP en división meiótica y algunos ovocitos circundantes en la corteza del ovario. En esta etapa, también las células epiteliales ya denominadas como pre-granulosa se encuentran en proliferación, dichas descripciones se han realizado para *Anolis carolinensis* (Forbes, 1956) y *Sceloporus undulatus* (Austin, 1988). Además de la entrada a meiosis como indicador de la diferenciación de la línea germinal femenina, también existe una gran proliferación de CGP y de células somáticas que incrementan el grosor de la corteza de acuerdo a los estudios realizados en el *Alligator mississippiensis* por Ditewig y Yao (2005). Durante el E36 en *S. aeneus* comienza la formación del lecho o cama germinal en la región antero-dorsal del ovario, esta región contiene una alta proliferación celular, la cual es una característica observada en algunas otras lagartijas del mismo género, pero no en otros géneros de lagartijas como *Eumeces*, ni otros órdenes de reptiles como cocodrilos y tortugas.

Entre el E36 y E40 existe un aumento en el grosor de la corteza con una mayor presencia de ovocitos y una menor de ovogonias, durante este periodo hasta antes de la eclosión los principales cambios que se suscitan en el ovario son a nivel estructural y ultraestructural de las células de la línea germinal. En *Alligator mississippiensis* se realiza una descripción detallada de la etapa de meiosis en la que los ovocitos presentan como característica principal la disposición y apariencia de los cromosomas. En *S. aeneus* también son perceptibles los arreglos cromosómicos que aparecen durante la meiosis.

1.3.2 Diferenciación testicular

A diferencia de otros reptiles y lagartijas cuya entrada a meiosis ocurre después de la eclosión del organismo, en *S. aeneus* inicia el proceso de diferenciación de las células de la línea germinal masculina durante los últimos estadios de desarrollo, es decir, entre el E39 y el E40, hasta antes de estos estadios no hay ninguna división reduccionista. Sin embargo, el componente somático conformado por las células de Sertoli ya se encuentra bien establecido dentro de los cordones testiculares. Este linaje se encuentran morfológicamente bien diferenciado desde el E37 y todo el desarrollo del túbulo seminífero es apreciable en el E39. Esta secuencia de eventos en el desarrollo de la gónada masculina ha sido descrita para lagartijas como *Xantusia vigilis* (Miller, 1963), *Anguis fragilis* (Raynaud *et al.*, 1970) y *Sceloporus undulatus* (Austin, 1988). Mientras tanto en el componente estromático se observan células miodes redondeando a los cordones testiculares y para el E39 se detectan células de Leydig en el compartimento estromático organizadas entre los túbulos seminíferos (Fox, 1977). Finalmente un engrosamiento de la túnica albugínea evidencia el E40 de desarrollo en el que se encuentra el testículo; dichas observaciones también fueron descritas en la lagartija *Calotes versicolor* (Doddamani, 2006) y coinciden con el grado de diferenciación observado en *S.aeneus*.

IX. Conclusiones

Los procesos de morfogénesis y diferenciación sexual gonadal en *Sceloporus aeneus* ocurren durante el desarrollo embrionario y finalizan al momento del nacimiento, cuando la gónada está completamente diferenciada en un ovario o en un testículo.

En los estadios de desarrollo 31-33 ocurre el establecimiento de una gónada indiferenciada bipotencial; en el estadio 34 ocurre la transición de la gónada bipotencial a una gónada diferenciada debido al desarrollo proliferativo de células en la corteza para el caso de hembras o en la médula para los machos; en los estadios 35-40 se observa el desarrollo morfológico de la gónada diferenciada.

La diferenciación ovárica ocurre en el estadio 35 la cual se inicia en la línea germinal y es evidenciada por el proceso de meiosis, en cuyo caso se observa por la presencia de ovocitos en la región cortical de la gónada femenina; mientras que la diferenciación testicular se observa en el estadio 39 por los arreglos del componente celular somático, con la formación de los cordones testiculares.

Las descripciones realizadas de la gónada y otras estructuras del cuerpo concuerdan con los modelos clásicos de desarrollo en lacertilios, en específico para las de la familia Phrynosomatidae.

IX. Bibliografía

- **Austin H. B.** 1988. Differentiation and development of the reproductive system in the iguanid lizard, *Sceloporus undulatus*. *General and Comparative Endocrinology* 12:351-363.
- **Bull J.J.** 1980. Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology* 55:3-21.
- **Bull J.J.** 1985. Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. *Experientia* 41:1285-1296.
- **Calderon M.L., De Pérez G.R. y M.P.R. Pinilla.** 2004. Morphology of the ovary of *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Alligatoridae). *Annals of Anatomy Anatomischer. Anzeiger.* 186:13–24.
- **Canseco-Márquez L. y M.G. Gutiérrez-Mayen.** 2010. Anfibios y reptiles del valle de Tehuacán-Cuicatlán. CONABIO. Mexico, DF. 302 pp.
- **Canseco-Márquez L., Mendoza-Quijano F. y P. Ponce Campos.** 2007. *Sceloporus aeneus*. In: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>
- **Carlson N. y A. Stahl.** 1985. Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale* 74:52–59.
- **Castro-Franco R. y M. Bustos.** 2003. Lagartijas de Morelos, México: Distribución, hábitat y conservación. *Acta Zoológica Mexicana (n.s)* 88:123-142.
- **Ciofi C. y I. R. Swingland.** 1997. Environmental sex determination in reptiles. *Applied Animal Behaviour Science* 51:25 I-265.
- **Charnier M.** 1966. Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertilien). *Société de. Biologie. Paris.* 160:620–622.

- **De Falco T. y B. Capel.** 2009. Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25:457-482.
- **Devlin R.H. y Y. Nagahama.** 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- **Ditewig A.C. y H.H.C. Yao.** 2005. Organogenesis of the ovary: A comparative review on vertebrate ovary formation. *Organogenesis* 2:36–41.
- **Doddamani L.S.** 2006. Differentiation and Development of Testis in the Oviparous Lizard, *Calotes versicolor* (Daud). *Journal of Experimental Zoology* 305(A):299-308.
- **Dufaure J.P. y J. Huber.** 1961. Table de développement du Lézard vivipara: *Lacerta* (*Zootoca*) *vivipara* Jacquin. *Archives d'Anatomie. Microscopique et de Morphologie Expérimentale* 50:309-328.
- **Eynard A., Valentich M. y R. Rovasio.** 2008. *Histología y Embriología del Ser Humano, bases moleculares y celulares.* Médica Panamericana. 696 pp.
- **Fleming A., Wibbels T., Skipper J.K. y D. Crews.** 1999. .Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative. Endocrinology* 116:336–46.
- **Forbes T. R. 1940.** Studies on the reproductive system of the alligator. IV. Observations on the development of the gonad, the adrenal cortex and the Müllerian duct. *Carnegie Control Embryology* 28:129–156.
- **Forbes T. R.** 1956. The development of the reproductive system of a lizard, *Anolis carolinensis*. *American Journal of Anatomy* 98:139-157.
- **Fox H.** 1977. The urogenital system of reptiles. In: Gans C., Parsons T.S., editors. *Biology of the reptilia*, Vol. 6. Ney York: Academic Press. p 1–37.

- **Gilbert Scott F.** 2005. *Biología del Desarrollo*. Ed. Médica Panamericana. 7ª edición. 881 pp.
- **Greenbaum E. A.** 2002. Standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology* 80:1350–70.
- **Guillette, L. J. Jr.** 1981. On the occurrence of oviparous and viviparous forms of the Mexican lizard *Sceloporus aeneus*. *Herpetologica* 37:11-15.
- **Guillette L. J. Jr., Jones R. E., Fitzgerald K. T. y H. M. Smith.** 1980. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus* *Herpetologica* 36(3):201-215.
- **Halliday T. y K. Adler.** 2007. *La gran enciclopedia de los anfibios y reptiles*. Editorial Libsa. Alcobendas, Madrid. 240 pp.
- **Hamburger V. y H.L. Hamilton.** 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88:49–92.
- **Hayes T.B.** 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibian: genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology* 281:373-399.
- **Hernández G.O.** 1995. Estudio comparativo del patrón reproductor de los machos de dos especies de lagartijas emparentadas con distinto modo reproductor: *Sceloporus aeneus* y *Sceloporus bicanthalis*. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 86 pp.
- **Hoar W. S.** 1969. Reproduction. In: *Fish Physiology* (Hoar W.S and D.J. Randall, eds). New York, NY: Academic Press. 1-72 pp.
- **INEGI.** 2005. Milpa Alta, Distrito Federal. Cuaderno estadístico delegacional.
- **Janzen F.J. y G.L. Paukstis.** 1991. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution and experimental design. *The Quarterly Review of Biology* 66:149-179.

- **Jost A.** 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Progress in. Hormone Research* 8:379-418.
- **Karnovsky M.J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in Electron Microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137.
- **Koopman P., Münsterberg A., Capel B., Vivian N, y R. Lovell-Badge.** 1990. Expression of a candidate sex determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.
- **Kreidberg J.A., Sariola H., Loring J.M., Maeda M., Pelletier J. y D. Housman.** 1993. *WT-1* is required for early kidney development. *Cell* 74:679–91.
- **Kunawa T.** 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Development. Growth Differentiation* 35:237-243.
- **Kunawa T., Maeda-Suga H. y T. Fujimoto.** 1986. Attraction of chick primordial germ cells by gonadal enlage in vitro. *The Anatomical Record* 215:403-406.
- **Luo X., Ikeda Y., y K.L. Parker.** 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481–490.
- **Maurizii M. G., Cavaliere V., Gamberi C., Lasko P., Gargiulo G. y C. Taddei.** 2009. *Vasa* protein is localized in the germ cells and in the oocyte-associated pyriform follicle cells during early oogenesis in the lizard *Podarcis sicula*. *Development Genes and Evolution* 219:361–367.
- **McLaren A.** 1988. Sex determination in mammals. *Trends in Genetic* 4(6):153–7.
- **Merchant-Larios H., Fierro I. V. y B. C. Urruiza.** 1989. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs.* 3:43–61.
- **Miller M. R.** 1963. The histogenesis of the endocrine organs of the viviparous lizard *Xantusia vigilis*. *General and Comparative Endocrinology* 3:579-605.

- **Molyneaux K. y C. Wylie.** 2004. Primordial germ cell migration. *The International Journal of Developmental Biology* 48:537-544.
- **Moore B.C., Uribe-Aranzábal M.C., Boggs A.S.P. y L.J. Jr. Guillette.** 2008. Developmental morphology of the neonatal alligator (*Alligator mississippiensis*) ovary. *Journal of Morphology* 269:302–312.
- **Moreno-Mendoza N., Harley V.R. y H. Merchant-Larios.** 1999. Differential expression of *Sox9* in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivácea* at male or female-promoting temperatures. *Journal of Experimental Zoology* 284:705-710.
- **Munday P. L., White J. W. y R.R. Warner.** 2006. A social basis for the development of primary males in a sex changing fish. *Proceedings in Royal Society* 273:2845-2851.
- **Murdock C. y T. Wibbels.** 2003. Expression of *Dmrt* in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenetic and Genome Research* 101:302–308.
- **Nakamura M., Kobayashi T., Chang X.T. y Y. Nagahama.** 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Biology* 281:362-372.
- **Neaves L., Wapstra E., Birch D., Girling J. E. y J. M. P. Joss.** 2006. Embryonic Gonadal and Sexual Organ Development in a Small Viviparous Skink, *Niveoscincus ocellatus*. *Journal of Experimental Zoology* 305(a):74–82.
- **Ochoa-Ochoa L., Flores-Villela O., García-Vázquez U., Correa-Cano M. y L. Canseco-Márquez.** 2006. Áreas potenciales de distribución de la herpetofauna de México. Especie: *Sceloporus aeneus* (recortes). “Extraído del proyecto D S009: Áreas potenciales de distribución y GAP análisis de la herpetofauna de México”. Museo de Zoología Alfonso L. Herrera. Facultad de Ciencias. UNAM. Financiado por CONABIO.
- **Olmo E.** 1986. A. Reptilia. In: B. John (Editor), *Animal Cytogenetics*, Vol. 4: Chordata 3. Gebmder. Bomtraeger. Berlin. I - 100 pp.

- **Park S. Y. y L. Jameson.** 2005. Minireview: Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 146(3):1035-1042.
- **Pieau C.** 1972. Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Chéloniens, *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 274:719–722.
- **Pieau C., Dorizzi M. y N. Richard-Mercier.** 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55:887–900.
- **Piprek P. R.** 2010. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *The International Journal of Developmental Biology* 54:779-786.
- **Rauci F. y M. M. Di Fiore.** 2011. Localization of *c-kit* and stem cell factor (SCF) in ovarian follicular epithelium of a lizard, *Podarcis s. sicula*. *Acta Histochemica* 113:647– 655.
- **Raynaud A. y C. Pieau.** 1985. Embryonic development of the genital system. In: *Biology of the Reptilia*, vol. 15, Development B, , Gans C. and Billett F. (eds), Wiley, New York. 149–300 pp.
- **Raynaud A., Pieau, C., y J. Raynaud.** 1970. Etude histologique comparative de l'allongement des canaux de Müller, de l'arrêt de leur progression en direction caudale et de leur destruction chez les embryons mâles de diverses espèces de reptiles. *Annals of Embryology and Morphology*. 3:21-47.
- **Risley P. L.** 1933. Contributions on the development of the reproductive system in the musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 18 (4):493–543.
- **Robert K. A. y M. B. Thompson.** 2001. Viviparous lizard selects sex of embryos. *Nature* 412:698–699.

- **Rodríguez-Romero F., Méndez F. R., García-Collazo R. y M. Villagrán-Santa Cruz.** 2002. Comparación del esfuerzo reproductor en dos especies hermanas del genero *Sceloporus* (Sauria: Phrynosomatidae) con diferente modo reproductor. *Acta Zoológica Mexicana* 85:181-188.
- **Robles R. J.** 1958. Estudio geográfico de la delegación de Milpa Alta, D.F. Tesis de Maestría en Geografía. Escuela Normal Superior.
- **Rzedowsky J.** 1981. *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México.
- **Saitou M., Barton S. C. y M. A. Surani.** 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418:293-300.
- **Shoemaker C. y D. Crews.** 2009. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:293–303.
- **Shoemaker C., Ramsey M., Queen J. y D. Crews.** 2007. Expression of *Sox9*, *Mis*, and *Dmrt1* in the Gonad of species with Temperature-Dependent Sex Determination. *Developmental Dynamics* 236:1055–1063.
- **Smith C.A. y J.M.P. Joss.** 1993. Gonadal sex differentiation in *Alligator mississippiensis*, a species with temperature-dependent sex determination. *Cell Tissue Research* 273:149–62.
- **Smith H. M.** 1937. A synopsis of the scalaris group of the lizard genus *Sceloporus*. Occasional Paper of Museum of Zoology of University of Michigan. 361 pp.
- **Sola L. y E. Gornung.** 2001. Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview. *Genetica* 111:397–412.

- **Spotila L.D., Spotila J.R. y S.E. Hall.** 1998. Sequence and expression analysis of *WT-1* and *Sox9* in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Zoology* 281:417–427.
- **Torres-Maldonado L.C., Landa-Piedra A., Moreno-Mendoza N., Marmolejo-Valencia A., Meza-Martínez A., y H. Merchant-Larios.** 2002. Expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology* 129:20–26.
- **Tsunekawa N., Naito M., Nidhida T. y T. Noce.** 2000. Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127:2741-2750.
- **Valenzuela N.** 2008. Relic thermosensitive gene expression in a turtle with genotypic sex determination. *Evolution* 62:234–240.
- **Viets B.E., Ewert M.A., Talent L.C. y C.E. Nelson.** 1994. Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology* 270:45-56.
- **Wartenburg H.** 1981. Differentiation and development of the testis. In “The Testis” (H. Burger and D. de Kretser, Eds.), Raven Press, New York. 39-80 pp.
- **Western P.S., Harry J.L., Graves J.A.M. y A.H. Sinclair.** 2000. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of *SF1*, *WT1* and *DAX1* during gonadogenesis. *Gene* 241:223–32.
- **Wibbels T, Bull J.J. y D. Crews.** 1991 Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology* 260:371–381.
- **Wibbels T., Gideon P., Bull J. J. y D. Crews.** 1993. Estrogen and temperature-induced medullary cord regression during gonadal differentiation in a turtle. *Differentiation* 53:149–154.

- **Wiegmann.** 1828. *Sceloporus aeneus*. Isis (oken) 21:364-383.
- **Wilhem D., Palmer S. y P. Koopman.** 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews* 87:1-28.
- **Wise P.A.D., Vickaryous M. K. y A. P. Russell.** 2009. An embryonic staging table for In Ovo development of *Eublepharis macularius*, the Leopard Gecko. *The Anatomical Record* 292:1198-1212.
- **Yeom Y. I., Fuhrmann G., Ovitt C. E., Brehm A., Ohbo K., Gross M., Hübner K. y H. R. Schöler.** 1996. The totipotential stem cells of the pregastrulation mouse Germline regulatory element of *Oct-4* specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122:881-894.
- **Yntema C. L.** 1976. Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology* 150:453–462.