



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00094

Matrícula: 2183806593

Efecto de la temperatura en la calidad espermática de la lagartija *Sceloporus megalepidurus*.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 16 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. FAUSTO ROBERTO MENDEZ DE LA CRUZ  
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA  
DRA. MARIA DEL CARMEN URIBE ARANZABAL  
DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: DANIEL URIOSTEGUI ESCOTO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

## APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

  
DANIEL URIOSTEGUI ESCOTO  
ALUMNO

REVISÓ

  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

  
DR. FAUSTO ROBERTO MENDEZ DE LA CRUZ

VOCAL

  
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL

  
DRA. MARIA DEL CARMEN URIBE ARANZABAL

SECRETARIA

  
DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

## Declaración de originalidad

El que suscribe, Daniel Uriostegui Escoto, alumno del posgrado Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada:

“Efecto de la temperatura en la calidad espermática de la lagartija *Sceloporus megalepidurus*”

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el Jurado asignado y la Comisión Académica del Posgrado para la obtención del grado de “Maestría en Biología de la Reproducción Animal” es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si esta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 9 de marzo de 2021.

Atentamente



Daniel Uriostegui Escoto



**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE LA  
LAGARTIJA *Sceloporus megalepidurus*”**

## **T E S I S**

Que para obtener el grado de Maestro en Biología de la  
Reproducción Animal

## **P R E S E N T A**

**Biól. Exp. Daniel Uriostegui Escoto**

COMITÉ TUTORAL:

Codirectora: Dra. Edith Arenas Ríos

Codirector: Dr. Mario García Lorenzana

Asesor: Dr. Fausto Méndez de la Cruz

## COMITÉ TUTORAL

### **Codirectora**

#### **Dra. Edith Arenas Ríos**

Profesora-Investigadora. Titular "C" T.C.  
Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide (Caseta 7B).  
Área de Reproducción Animal Asistida.  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.  
[editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)

### **Codirector**

#### **Dr. Mario García Lorenzana**

Profesor-Investigador. Titular "C" T.C.  
Laboratorio de Biología e Ingeniería Tisular Neuroinmunoendocrina (AI-107, W214 A).  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.  
[mglo@xanum.uam.mx](mailto:mglo@xanum.uam.mx)

### **Asesor**

#### **Dr. Fausto Méndez de la Cruz**

Investigador Asociado "C", SIN nivel 2.  
Departamento de Zoología.  
Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología.  
[faustor@ib.unam.mx](mailto:faustor@ib.unam.mx)

## **JURADO DE EXAMEN**

### **Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos.**

Profesor-Investigador. Titular "C" T.C. Departamento de Biología de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana.

[mrtc@xanum.uam.mx](mailto:mrtc@xanum.uam.mx)

### **Dr. Fausto Roberto Méndez de la Cruz.**

Investigador Asociado "C", SNI nivel 2. Departamento de Zoología, Universidad Nacional Autónoma de México. [faustor@ib.unam.mx](mailto:faustor@ib.unam.mx)

### **Dra. Reyna del Carmen Fierro Pastrana.**

Profesor-Investigador. Titular "C" T.C. Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana. [reyna@xanum.uam.mx](mailto:reyna@xanum.uam.mx)

### **Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal.**

Profesora de carrera Titular C, Departamento de Biología comparada, Universidad Nacional Autónoma de México. [mari3uribe3@gmail.com](mailto:mari3uribe3@gmail.com)



**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL del alumno DANIEL URIOSTEGUI ESCOTO, matrícula 2183806593, quien cumplió con los 188 créditos correspondientes a las unidades de enseñanzas aprendizaje del plan de estudio. Con fecha dieciséis de marzo del 2021 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

Efecto de la temperatura en la calidad espermática de la lagartija *Sceloporus megalapidurus*.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 228 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

**APROBADO**

**JURADO**

Presidente

DR. FAUSTO ROBERTO MENDEZ DE LA CRUZ

Secretaria

DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS

Vocal

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

Vocal

DRA. MARIA DEL CARMEN URIBE ARANZABAL

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	7
<b>2. Abstract</b> .....	8
<b>3. Introducción</b> .....	9
3.1 Índice de termorregulación en reptiles .....	9
3.2 Espermatogénesis y control.....	10
3.2.1 Estructura y función del epidídimo.....	11
3.3 <i>Sceloporus megalepidurus</i> como modelo de estudio de hipertermia testicular.....	12
<b>4. Antecedentes</b> .....	17
4.1 Aspectos morfofisiológicos de diferenciación y madurez sexual en reptiles.....	17
4.2 Hipertermia testicular en lacértidos y su relación con el cambio climático.....	19
4.3 Similitudes entre clases: Efectos de la hipertermia testicular en mamíferos .....	20
<b>5. Justificación</b> .....	22
<b>6. Pregunta de investigación</b> .....	24
<b>7. Objetivo general</b> .....	24
<b>8. Objetivos particulares</b> .....	24
<b>9. Hipótesis</b> .....	24
<b>10. Diseño experimental</b> .....	25
10.1 Fase 1: Determinación de la temperatura preferida.....	25
10.2 Fase 2: Análisis espermático e inclusión en parafina .....	26
<b>11. Material y métodos</b> .....	27
11.1 Reactivos y soluciones .....	27
11.2 Criterios de inclusión fase 1 del experimento .....	27
11.2.1 Determinación de temperaturas preferidas.....	28
11.3 Criterios de inclusión. Fase 2 del experimento.....	29
11.3.1 Inclusión de ejemplares.....	29
11.4 Obtención del material biológico .....	30
11.5 Procedimientos para el análisis espermático.....	30
11.5.1 Análisis espermático .....	31
11.6 Análisis estadístico .....	32
<b>12 Resultados y Discusión</b> .....	32

<b>12.1 Fase 1</b> .....	32
1.1.1 Determinación de temperaturas preferidas .....	32
<b>12.2 Fase 2</b> .....	37
12.2.1 Obtención de órganos de interés.....	37
12.2.2 Tamaño y peso gonadales. ....	38
12.2.3 Concentración espermática .....	43
12.2.4 Viabilidad espermática .....	44
12.2.5 Porcentaje de gota citoplásmica (GC) .....	47
12.2.6 Integridad de ADN.....	51
<b>13. Conclusiones</b> .....	55
<b>14. Perspectivas</b> .....	55
<b>15. Referencias</b> .....	56
<b>16. Abreviaturas</b> .....	67



## 1. Resumen

Además de diferentes reacciones químicas y fisiológicas, ejercer un óptimo control de la temperatura es importante para la correcta síntesis, diferenciación y maduración espermática. En organismos ectotermos, este factor térmico depende mayormente del entorno en el que el organismo se encuentre y desarrolle, mismo que se ha visto afectado a lo largo de los años, mostrando un incremento considerable, teniendo como consecuencia aspectos que van desde cambios en la distribución hasta la extinción de dichas especies. Estos resultantes han permitido inferir que la reproducción es uno de los aspectos afectados por el aumento de la temperatura, conllevando a defectos en los procesos que intervienen en la calidad espermática de los organismos, sin embargo, la investigación en estos caracteres ha sido mayormente enfocada en mamíferos, por lo que resulta importante conocer qué es lo que ocurre con los reptiles y si es considerable enfocar este punto en la mira para la comprensión y esfuerzo por la conservación de estas especies.

El presente estudio se enfoca en evaluar el efecto de la temperatura en la calidad espermática en una población de la especie *Sceloporus megalepidurus* en los alrededores de la Laguna de Tecocomulco, Hidalgo. Los individuos fueron colectados durante el mes de octubre de 2020, donde se examinaron un total de 22 animales (15 machos y 7 hembras), de los cuales posteriormente se utilizaron sólo machos para la investigación correspondiente. Se determinó la temperatura preferida ( $T_{sel}$ ) de la especie, se evaluó la anatomía de testículos y epidídimos, además del análisis de los parámetros espermáticos. Las observaciones en campo y gradiente de *S. megalepidurus* manifiestan un aspecto de termoconformidad en la especie ( $T_s = 33.64 \pm 3.20$ ;  $T_c$  machos =  $32.19 \pm 1.37$ ;  $T_c$  Hembras =  $31.77 \pm 1.33$ ). Así mismo, los individuos sometidos a temperatura preferida promedio y su límite superior ( $33.64 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente) presentaron efectos negativos en parámetros anatómicos y espermáticos, destacando una disminución en el tamaño gonadal (no significativo) así como en la viabilidad, concentración (no significativo) e integridad de ADN espermáticos, además de la retención en el porcentaje de gota citoplásmica (GC), comparados con los tratamientos a temperaturas inferiores ( $28 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

## 2. Abstract

In addition to different chemical and physiological reactions, exercising optimal temperature control is important for correct sperm synthesis, differentiation and maturation. In ectothermic organisms, this thermal factor depends mainly on the environment in which the organism is found and develops, which has been affected over the years, showing a considerable increase, resulting in aspects ranging from changes in distribution until the extinction of these species. These results have allowed to infer that reproduction is one of the aspects affected by the increase in temperature, leading to defects in the processes that intervene in the sperm quality of organisms, however, research on these characters has been mostly focused on mammals, so it is important to know what is happening with reptiles and whether it is important to focus on this point in order to understand and endeavor to conserve these species.

The present study focuses on evaluating the effect of temperature on sperm quality in a population of the species *Sceloporus megalepidurus* in the surroundings of Laguna de Tecocomulco, Hidalgo. The individuals were collected during the month of October 2020, where a total of 22 animals (15 males and 7 females) were examined, of which only males were subsequently used for the corresponding investigation. The preferred temperature ( $T_{sel}$ ) of the species was determined, the anatomy of testes and epididymis was evaluated, in addition to the analysis of sperm parameters. Field and gradient observations of *S. megalepidurus* show an aspect of thermoconformity in the species ( $T_s = 33.64 \pm 3.20$ ;  $T_c$  males =  $32.19 \pm 1.37$ ;  $T_c$  females =  $31.77 \pm 1.33$ ). Likewise, the individuals subjected to the preferred temperature and its upper limit ( $33.6^\circ\text{C}$  and  $36^\circ\text{C}$  respectively) presented negative effects on anatomical and sperm parameters, highlighting a decrease in gonadal size (not significant) as well as in viability, concentration (not significant) and integrity of sperm DNA, in addition to the retention in the percentage of cytoplasmic droplet (GC), compared with the treatments at lower temperatures ( $28^\circ\text{C}$  and  $30^\circ\text{C}$ ).

### 3. Introducción

El control de la temperatura corporal es conocido como termorregulación, este es posible por medio de ajustes fisiológicos, etológicos y/o morfológicos. Dicho control ejerce un papel sumamente importante para la eficacia de procesos que permiten la realización de actividades tales como la búsqueda de alimento, refugio, estrategias de escape, cortejo y apareamiento, reproducción entre otras; determinados por la cantidad energética proveniente de la temperatura (Adolph y Porter, 1993).

#### 3.1 Índice de termorregulación en reptiles

La obtención y eliminación de calor corporal se lleva a cabo por medio de 3 mecanismos: Convección, radiación directa del sol y conducción. En el primer caso, los individuos tienden a colocarse en sitios con corrientes de aire caliente; el segundo es referido concretamente a la exposición directa del organismo al sol y, por último, el mecanismo de conducción se entiende como el proceso en el cual el sujeto entra en contacto con algún sustrato cuya temperatura sea mayor a su temperatura corporal (Vicenzi et al., 2017). Estos ámbitos de termorregulación suelen caracterizar la eficacia y necesidad de cada población en el entorno energético disponible en su nicho. Se le conoce como termorregulador activo a aquel que puede mantener su temperatura corporal óptima a pesar de la fluctuación térmica ambiental, mientras que, los reptiles termoconformes mantienen la temperatura corporal equivalente a la ambiental, sin ocupar alguna actividad termorreguladora (González-Ruíz, 1991).

En 1993, Hertz y colaboradores elaboraron un protocolo para la evaluación de la eficiencia de la termorregulación en reptiles pequeños, mismo que requiere de tres variables esenciales las cuales son:

- **Temperaturas seleccionadas** (Tsel): También llamado intervalo de temperaturas preferidas, se refiere a aquellas temperaturas corporales ( $T_c$ ) que el individuo prefiere en ausencia de su ambiente natural, suele registrarse en un entorno controlado en laboratorio, también conocido como “gradiente de temperatura”.

- **Temperaturas operativas (To):** Son aquellas temperaturas que puede obtener un organismo en campo sin ejercer actividad alguna. Se obtienen por medio de modelos físicos elaborados de cobre o plástico con el tamaño del individuo a los cuales se les coloca un dispositivo encargado de registrar la temperatura del recipiente.
- **Temperaturas corporales de actividad de una muestra de la población del individuo de interés en un entorno controlado:** Algunos estudios de interés en lagartijas del género *Sceloporus* que abordan el tópico de la termorregulación refieren en su mayoría trabajos en el ámbito de la ecología, evolución, cambio climático y fisiología térmica, mientras que ha sido poco analizada su influencia sobre la fisiología de la reproducción.

### 3.2 Espermatogénesis y control

La formación de los espermatozoides, se lleva a cabo en los testículos, a través de un proceso conocido como espermatogénesis, proceso mediante el cual, a partir de células redondas diploides (espermatogonias) ubicadas adyacentes a la membrana basal, las cuales van diferenciándose hasta formar los espermatozoides, avanzando hacia la luz del tubo seminífero.

Para la producción de gametos viables, es importante controlar el número y calidad de las células germinales, para lo cual, en el testículo ocurre un proceso de muerte celular programada (apoptosis), a través del cual, un organismo elimina las células anómalas, sin provocar una respuesta inflamatoria. Esto con el fin de conservar la homeostasis de los tejidos mediante un balance entre la proliferación, diferenciación y muerte celular (Fink y Cookson, 2005).

Sin embargo, aun cuando la diferenciación morfológica de los espermatozoides, culmina en el testículo, cuando los espermatozoides son liberados del mismo, aún no han adquirido la capacidad para fertilizar al ovocito, por lo que necesitan pasar por el epidídimo, donde adquieren esa capacidad, proceso conocido como: maduración espermática epididimaria.

### 3.2.1 Estructura y función del epidídimo

El epidídimo es un órgano que se caracteriza por un único conducto tubular súper enrollado, con una longitud estimada de 5-7 m dependiendo de la especie (Sullivan, 2004; O'Hara et al., 2011), ubicado entre los conductos eferentes y los conductos deferentes.

Regularmente, el epidídimo puede dividirse en las siguientes regiones anatómicas: segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda* (Dacheux et al., 2005). Mismas que están compuestas de un epitelio polarizado donde se encuentran, principalmente, células principales y basales (Lasserre et al., 2001). Si bien estas regiones anatómicas del epidídimo han sido mayormente identificadas en mamíferos, existen estudios enfocados en la caracterización de esta segmentación histológica en otros vertebrados.

Por ejemplo, en el caso de reptiles, se han identificado las regiones anterior, media y posterior, como homología a *caput corpus* y *cauda*, en especies *Lacerta vivipara* (Dacheux, 1985) y *Hemidactylus flaviviridis* (Rai, 1987), donde las células epiteliales de cada región muestran variaciones en la producción de secreciones, un factor que se considera importante para la maduración de los espermatozoides (Ferreira et al., 2009; Dacheux y Dacheux, 2014). La maduración espermática es un proceso que permite a los espermatozoides, adquirir la capacidad para fertilizar al ovocito, por medio de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos a través de su paso por el epidídimo (Arrotéia et al., 2012).

Uno de los aspectos importantes de la maduración espermática, es la pérdida de la gota citoplásmica (GC) que es un remanente citoplasmático localizado en la pieza media del espermatozoide y que permanece después de la liberación del epitelio germinal. La mayoría del citoplasma es fagocitado por la célula de Sertoli, la GC es removida a su paso por el epidídimo (Cooper, 2010).

Otra de las características de un espermatozoide maduro es la hipercompactación de la cromatina, ya que, cuando los espermatozoides pasan por la región cefálica del epidídimo, los residuos de cisteína de las protaminas, forman múltiples

entrecruzamientos con los puentes disulfuro, hipercompactando la cromatina; aspectos importantes para la estabilidad de la cromatina, lo cual mantendrá la integridad del DNA (Ashok y Tamer, 2004).

Si bien existe poca información sobre la maduración espermática en reptiles, se ha encontrado información suficiente para corroborar que hay cambios en los espermatozoides a medida que recorren el epidídimo, sugiriendo un proceso de maduración espermática, que incluso, puede verse afectado por el cambio de temperatura (Retana, 2016).

La mayor parte de la información sobre el tema ha sido desarrollada en mamíferos. En reptiles se asume que el proceso de maduración no es requerido (Sever et al., 2002), por lo que es importante realizar estudios que validen o corrijan esta propuesta. Méndez et al. (2014) mencionan que se requieren temperaturas más bajas que las temperaturas preferidas para que la maduración se lleve a cabo. Por lo tanto, aún quedan por investigar un gran número de preguntas con respecto a los reptiles.

### 3.3 *Sceloporus megalepidurus* como modelo de estudio de hipertermia testicular

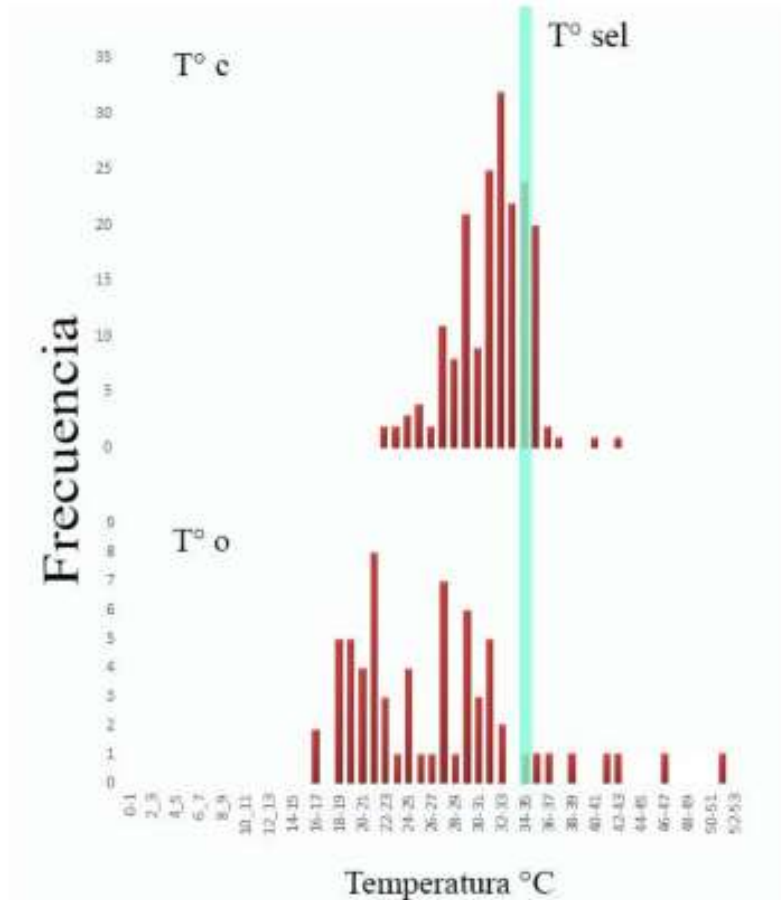
También conocida como lagartija espinosa de escamas grandes, *Sceloporus megalepidurus* es una especie endémica de México, cuyo hábitat abarca bosques de pino y encino, pastizales y matorral xerófilo y rosetófilo, con estrato subarbustivo, espinoso y perennifolio denso, entre los elementos encontrados en este tipo de vegetación son *Agave*, *Nolina* y *Dasyllirion* en altitudes que oscilan entre los 2100 a 2600 msnm. Su distribución abarca Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Godínez-Cano, 1985).

Es una lagartija vivípara de talla pequeña, de alrededor de 55 mm (hocico-cloaca). Presenta dos líneas claras dorsolaterales perimetrales a un área oscura que se extiende a ambos lados del abdomen. El individuo adulto tiende a presentar de 54 a

62 escamas dorsales con escamas laterales en filas oblicuas; 4-8 escamas entre los 13-18 poros femorales y un par de escamas post-anales agrandadas (González-Ruíz, 1991).

De acuerdo con la lista roja de la UICN de Especies Amenazadas (2010), se encuentra en la categoría de vulnerable (VU), entre otras razones, se encuentra amenazada por la pérdida de hábitat a través de la conversión de la tierra al cultivo de agave, así como el ambiente térmico desfavorable a causa de alteraciones en la termorregulación del organismo y el cambio climático.

En ámbitos de Ecología térmica, Hernández-Márquez (2016), registró que *S. megalepidurus* tiende a presentar una temperatura corporal de hasta 3 grados centígrados por arriba de la registrada a nivel sustrato y aire, ejerciendo una óptima eficiencia térmica (0.7), consiguiendo así, regular su temperatura dependiendo de las condiciones en las que se encuentran de manera efectiva. Además, en el mismo estudio se muestra que los individuos ejercen actividades por debajo de su temperatura preferida tal como se muestra en la figura 1. Cabe mencionar que la misma denota datos de manera anual en general, por lo que los registros que superan los 35°C pueden haber sido tomados en los meses de primavera y verano.



**Figura 1.** Distribución de la temperatura corporal ( $T_c$ ); temperatura operativa ( $T_o$ ) e intervalo de temperatura preferida ( $T_{sel}$ ) para la población de *S. megalepidurus* (Godínez-Cano, 1985)

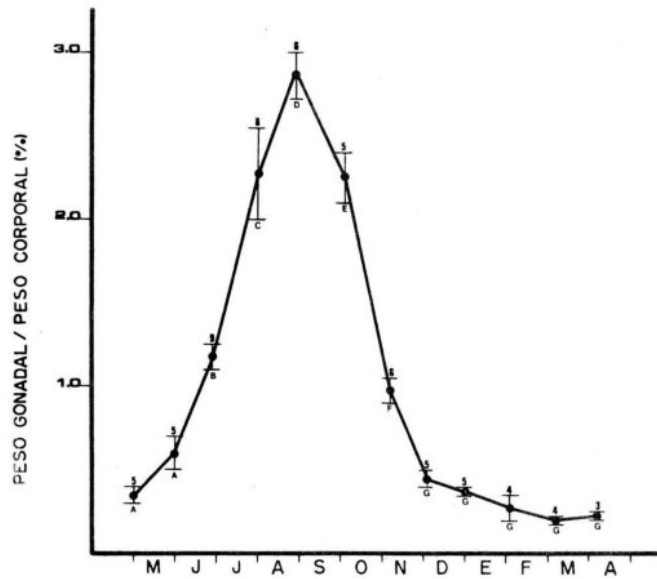
La  $T_{sel}$ . de *S. megalepidurus* es de  $34.65^{\circ}\text{C}$ , intervalo similar al de otras especies de *Sceloporus*. La razón por la cual los individuos tienden a realizar sus actividades por debajo de su temperatura óptima puede darse durante los tiempos de reposo que es cuando su temperatura desciende por debajo de la temperatura preferida.

*S. megalepidurus* muestra un ciclo reproductivo estacional sincrónico, específicamente en los meses que abarcan la temporada otoñal, comenzando su recrudescencia gonadal durante el verano. Su periodo de cópulas se lleva a cabo entre los meses de noviembre y diciembre, teniendo periodos de gestación de hasta 6 meses, dando una sola camada a principios de primavera (Godínez-Cano, 1985).

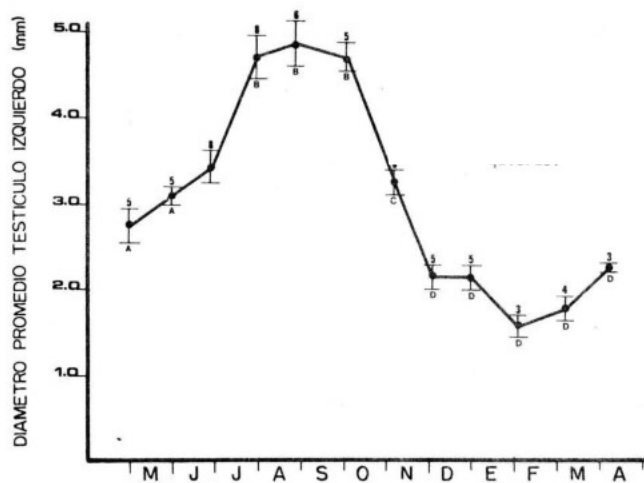
Así mismo, de acuerdo con medidas de diámetro y peso de las gónadas masculinas, permiten relacionar el incremento de éstas con el inicio de la temporada reproductiva (Fig. 2,3,4), así, apoyado con los análisis histológicos, la espermatogénesis de la



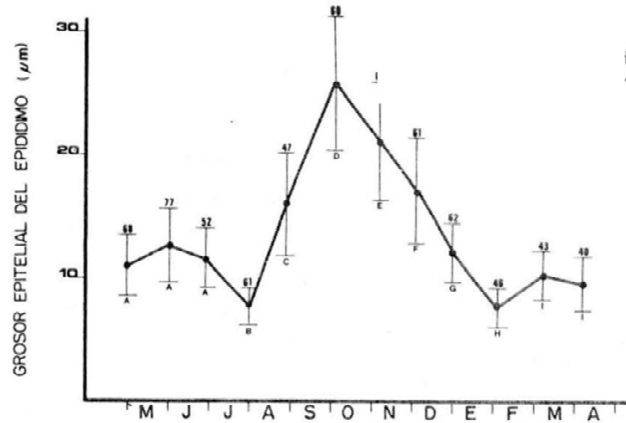
especie da inicio en los meses de mayo para dar lugar a la síntesis y diferenciación de espermatozoides a finales de julio y hasta los primeros días de noviembre (Fig 5.). Como consecuencia, la presencia de los mismos es evidente en el epidídimo desde julio hasta diciembre.



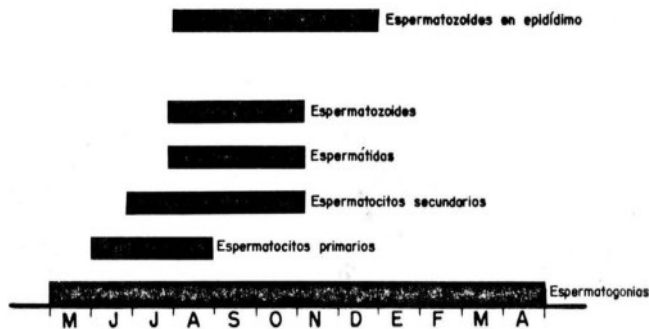
**Figura 2.** Variación anual en el peso gonadal promedio del testículo de *S. megalopidurus*. (Godínez-Cano, 1985).



**Figura 3.** Variación anual en el peso diámetro promedio del testículo de *S. megalepidurus*. (Godínez-Cano, 1985).



**Figura 4.** Variación anual en el grosor epitelial promedio del epidídimo de *S. megalepidurus*. (Godínez-Cano, 1985).



**Figura 5.** Resumen observacional de las variaciones de las células germinales masculinas de *S. megalepidurus* (Godínez-Cano, 1985).

Los principales eventos que conllevan a la temporada reproductiva se llevan a cabo durante los primeros 6 meses del año, mismos que se ven relacionados con la temperatura ambiental característica de primavera y verano, la cual favorece a los animales ectotermos la realización de actividades que involucran la búsqueda de refugio, caza, alimentación y almacenamiento de grasa, por mencionar algunas; Otro aspecto a considerar es que, si bien las crías nacen en la época favorable para la

alimentación y crecimiento, también son más vulnerables al cambio de temperatura, diversos estudios han mostrado que los individuos de tamaño pequeño tienen menor efectividad termorreguladora que aquellos de mayor proporción, por lo que es igualmente importante ahondar a este respecto (Beal et al., 2015).

La variación estacional en la reproducción es común entre los lagartos de las zonas templadas (Fitch, 1970). La temperatura y el fotoperiodo son factores determinantes de la actividad reproductiva de las lagartijas en zonas templadas (Licht, 1973), por ejemplo, Depeiges et al. (1985) y Ravet et al. (1987), estudiaron las características bioquímicas e histoquímicas de las secreciones epididimarias en lagartos, observando un aumento de la actividad secretora del epidídimo durante el período de actividad reproductiva correlacionándose con el desarrollo cíclico de los testículos y del epidídimo.

#### **4. Antecedentes**

##### **4.1 Aspectos morfofisiológicos de diferenciación y madurez sexual en reptiles**

Los estudios relacionados con el estrés por temperatura en reptiles abarcan desde aspectos celulares, hasta aspectos del dimorfismo sexual. En este caso, características dimórficas importantes son sustentadas en el tamaño y la coloración de las especies en su temporada reproductiva y edad adulta, por ejemplo, el registro de un tamaño reducido de los machos con respecto a las hembras, debido a la presencia de cantidades mayores de testosterona en los primeros, que, si bien podría promover el crecimiento muscular, también podría inhibir la talla (Cox *et al.*, 2005). En el segundo caso, el cambio de coloración en algunos reptiles machos muestra la entrada al periodo reproductivo de la especie al momento del incremento de la testosterona y corticosterona, siendo significativamente mayor (Eikenaar *et al.*, 2012). Esto se relaciona con el cambio de coloración basada en carotenoides (Cote et al., 2010), que muestra un efecto negativo en la pigmentación en ejemplares sometidos a estrés oxidativo, involucrando así la disminución de síntesis de testosterona en células de Leydig (Kanter y Aktas, 2009), acompañado de una mayor actividad de enzimas

antioxidantes por el aumento de la actividad de corticosterona y ocasionando la pérdida de coloración, indicativo de mala salud y un mal funcionamiento del sistema inmune (Fitze et al., 2009).

En el caso de *S. megalepidurus*, el dimorfismo sexual característico de los machos en etapa reproductiva se caracteriza por la presencia de puntos con tonalidades azules-verdes en la región dorsal, mismas que pueden pasar desapercibidas a distancia. En cuanto a la región ventral suelen presentar ligeras tonalidades naranjas (Fig. 6) (González-Ruíz, 2014).



**Figura 6.** Coloración de vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de machos *S. megalepidurus* adultos. (González-Ruíz, 2014).

## 4.2 Hipertermia testicular en lacértidos y su relación con el cambio climático

Los registros sobre la susceptibilidad de daño de células germinales ante los cambios bruscos de temperatura en lacértidos datan de los años 40's, donde Cowles y Burleson (1945) mostraron que la alta temperatura ocasionaba esterilidad en la lagartija de talla pequeña *Xantusia vigilis* incluso a temperaturas preferidas de la especie si se mantenía el tratamiento por un tiempo diferente al común. Posteriormente, Licht en 1965 respaldó éstos hallazgos con el estudio realizado por primera vez en *Sceloporus*, asegurando que hay mayor sensibilidad de las células germinales con respecto a las somáticas en condiciones de estrés por temperatura sin descartar la reversibilidad de las gónadas masculinas para recuperar su peso y tamaño.

Las relaciones ecológicas, fisiológicas, así como ámbitos de índole de madurez sexual, crecimiento y longevidad, son factores sensibles y dependientes de cambios térmicos (Adolph y Porter, 1993). Con ello, sus patrones de actividad forman parte del fenómeno adaptativo a la dinámica estacional en ámbitos de temperatura que es altamente inestable ante cambios repentinos en el ambiente, limitando el estado físico y distribución del individuo, impactando incluso el ciclo anual reproductivo derivado de la condición energética dependiente de alimento, calor y momentos de actividad y descanso (Vicenzi et al., 2017).

Si bien el principal efecto negativo es el calentamiento (Powers y Jetz, 2019), los cambios provenientes de la alteración climática también son propiciados por periodos más largos de frío, pues son las épocas en las que la mayoría de los ectotermos restringen actividades a cambio de la conservación de la temperatura corporal, afectando la escala estacional característica de una especie (Wallace et al., 2014).

Un estudio en *Sceloporus siniferus*, reveló la posibilidad de un efecto negativo en la maduración espermática epididimaria debido a la retención de GC ya que, en la colecta de machos entre el año 2015 y 2016 se presentaba un porcentaje de espermatozoides con GC significativamente diferentes. Donde se observa que el porcentaje de

espermatozoides con GC en el epidídimo en el año 2015 fue de aproximadamente 10%; en el año 2016 permanecía el porcentaje alrededor del 40%.

Mediante los registros de temperatura realizados, se observó que los ejemplares colectados en el año 2015 presentaron una temperatura cloacal de 28 °C, mientras que los colectados en 2016 presentaban una temperatura de 34 °C. Esto sugirió una posible relación entre la temperatura alta y su influencia sobre la maduración espermática en reptiles. (Retana, 2016).

#### 4.3 Similitudes entre clases: Efectos de la hipertermia testicular en mamíferos

Estos antecedentes en la especie se relacionan con estudios espermatobioscópicos que tratan los efectos de la hipertermia testicular en mamíferos. Entre ellos, los estudios realizados en hombres con estilo de vida sedentario, que indican un alto porcentaje de GC, siendo este un factor de infertilidad, derivado de la exposición a la alta temperatura escrotal. (Durairajanayagam, 2014).

Se ha mostrado también que, a través de estudios de estrés crónico por hipertermia testicular, se torna una disminución en el peso gonadal derivado de la degeneración de células espermáticas, desde espermátocitos primarios, hasta el resto del linaje, derivado de un mecanismo de apoptosis incluso desde el primer día de exposición al tratamiento (Lue et al., 1999).

El estrés crónico por hipertemia puede causar alteraciones en la espermatogénesis y el desarrollo embrionario (Cooper, 2013), tal como se ha mostrado también en especies de mamíferos como ratas (Setchel et al., 1998) y ovinos (Mieusset et al., 1991).

Otros reportes han relacionado el decremento del tamaño testicular con la disminución de la concentración, movilidad y morfología anómala de espermatozoides con la fragmentación del ADN de dicha célula, siendo un factor a considerar para el análisis de fertilidad. Este rompimiento del material genético puede ser visto como una consecuencia del proceso de muerte celular por apoptosis, comprobado así por la

evidencia de la activación de caspasa 3 en muestras seminales con alto índice de fragmentación de ADN (Manente et al., 2015).

Otros factores pueden influir en las condiciones reproductivas desde el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, inducidas por el estrés crónico por condiciones externas y desnutrición, los cuales propician el incremento de glucocorticoides que reprimen la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Gao et al., 2002). Como consecuencia, la cascada de eventos posteriores tales como la síntesis de hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH) y su papel para la producción de testosterona y estimulación para promoción de espermatogénesis no se lleva a cabo de forma adecuada. Esta relación hormonal glucocorticoide-LH también presenta una relación estrecha en el ámbito de la apoptosis, propiciando la reducción en el número de células de Leydig, así como espermatogonias en el túbulo seminífero (Whirledge y Cidlowski, 2010).

Otros estudios realizados por Kanter y Aktas (2009) mostraron un aumento en la apoptosis de células de Leydig, generando directamente atrofia epididimaria en ratas, sometidas a alta temperatura escrotal.

Se ha demostrado, además, que las células de Sertoli *in vitro* sometidas a altas temperaturas, presentan un incremento en los niveles de triacilglicerol y una acumulación de gotas lipídicas. Esto alteró la función metabólica mitocondrial, con un incremento significativo en el intervalo de despolarización de la membrana y producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Vallés et al., 2014).

En ratas sometidas a baño escrotal con temperatura alta (43°C), durante 6 días consecutivos, presentaron apoptosis en células germinales. Esta exposición disminuyó la actividad del sistema endógeno antioxidante testicular de la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, además de la degeneración de mitocondrias y dilatación del retículo endoplásmico liso, asociado a un bajo conteo espermático debido a la apoptosis celular (Kanter et al., 2011; Hansen, 2009).

Además de estas causas, otros elementos han estado asociados con el daño al ADN y apoptosis, tal es el caso de la sobreproducción de ERO derivadas del estrés oxidante (Zini et al., 1993;Quintero et al., 2015); mismas que provocan peroxidación lipídica en la membrana plasmática del espermatozoide, alterando su función y su capacidad fertilizante (Twigg et al., 1998), además de promover el rompimiento de la cadena doble y sencilla de ADN, alterando la compactación de la cromatina, contribuyendo así a las causas de infertilidad masculina, sin embargo, el proceso por el cual la apoptosis no se lleva a cabo completamente en los espermatozoides sigue sin estar claro (Moustafa et al., 2004).

La evaluación de este proceso de muerte celular puede ser evaluado a través de biomarcadores que actúan a través de diferentes procesos de identificación que van desde la adición de anticuerpos, inmunofluorescencia, tinciones y marcadores celulares, algunos ejemplos son el marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL), ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA), ensayo Cometa y citometría de flujo (Colin et al., 2010; Štiblar-Martincic, 2009).

Por tal motivo, es de nuestro interés determinar si el aumento de la temperatura registrada pudiera ser causa de la alteración en algunos parámetros espermáticos en testículo y/o en epidídimo, así como la afectación en la migración de GC en espermatozoides de la lagartija *Sceloporus megalepidurus*.

## **5. Justificación**

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en riqueza de reptiles, los cuales están siendo amenazados por el tráfico de especies, la destrucción de su hábitat y actualmente por el cambio climático. Este último pudiera estar relacionado con la extinción masiva de las lagartijas en diferentes partes del mundo, debido a que los cambios extremos en la temperatura, acompañado de los diferentes fenómenos



meteorológicos generados por este, alteran de manera directa el hábitat y los patrones de actividad y fisiológicos de estos reptiles.

A nivel nacional, en los últimos cincuenta años, el incremento promedio de la temperatura fue de 0.85°C, valor similar al registrado a nivel mundial para el periodo 1880-2012 (Semarnat, 2014). En México, desde el año 2005 los registros anuales de temperatura han estado por arriba de los 21.4°C (con excepción del año 2010), cifras por arriba del promedio anual de temperatura registrado en el periodo 1971-2011 que alcanzó 20.9°C, siendo las regiones del noroeste y el centro del país las que han presentado mayores incrementos de temperatura en el territorio nacional (INECC, Semarnat, 2012).

En México, la NOM-059-SEMARNAT-2010 enlista a las especies y subespecies de flora y fauna silvestres que se encuentran en alguna categoría de riesgo. De acuerdo a ella, el 54.4% de especies de reptiles conocidas en el país se encuentran en riesgo (alrededor de 437 especies), mientras que el 6.18% de las mismas se hayan en peligro de extinción, siendo así, el grupo taxonómico más amenazado.

Si bien no se conocen las causas por las cuales el aumento de la temperatura pudiera estar afectando los parámetros reproductivos de la especie, nuestra hipótesis es que, la alta temperatura está ligada con los defectos en la maduración espermiática testicular o epididimaria de los reptiles, en este caso *S. megalepidurus*. Por tal motivo y dado que, se requiere tener la prueba que muestre que este proceso de maduración está siendo afectado directamente por la alta temperatura, es indispensable realizar estudios enfocados en la apoptosis en testículo y epidídimo, así como en la calidad espermiática y su relación con la temperatura, para determinar si se pudiera afectar el proceso de maduración espermiática.

## **6. Pregunta de investigación**

¿Las temperaturas preferidas afectarán la calidad espermática de *Sceloporus megalepidurus*?

## **7. Objetivo general**

Determinar si la temperatura preferida provoca alteraciones en la calidad espermática de la lagartija *S. megalepidurus*

## **8. Objetivos particulares**

En *Sceloporus megalepidurus*:

Determinar modelos de distribución térmica

Establecer gradiente térmico de los horarios de actividad de la especie

Establecer la temperatura preferida de la especie

Determinar si la concentración de espermatozoides disminuye con el aumento de la temperatura ambiental/corporal.

Evaluar si el porcentaje de viabilidad y la integridad de ADN disminuyen con el aumento de la temperatura ambiental/corporal.

Evaluar si la presencia de GC aumenta con la temperatura ambiental/corporal

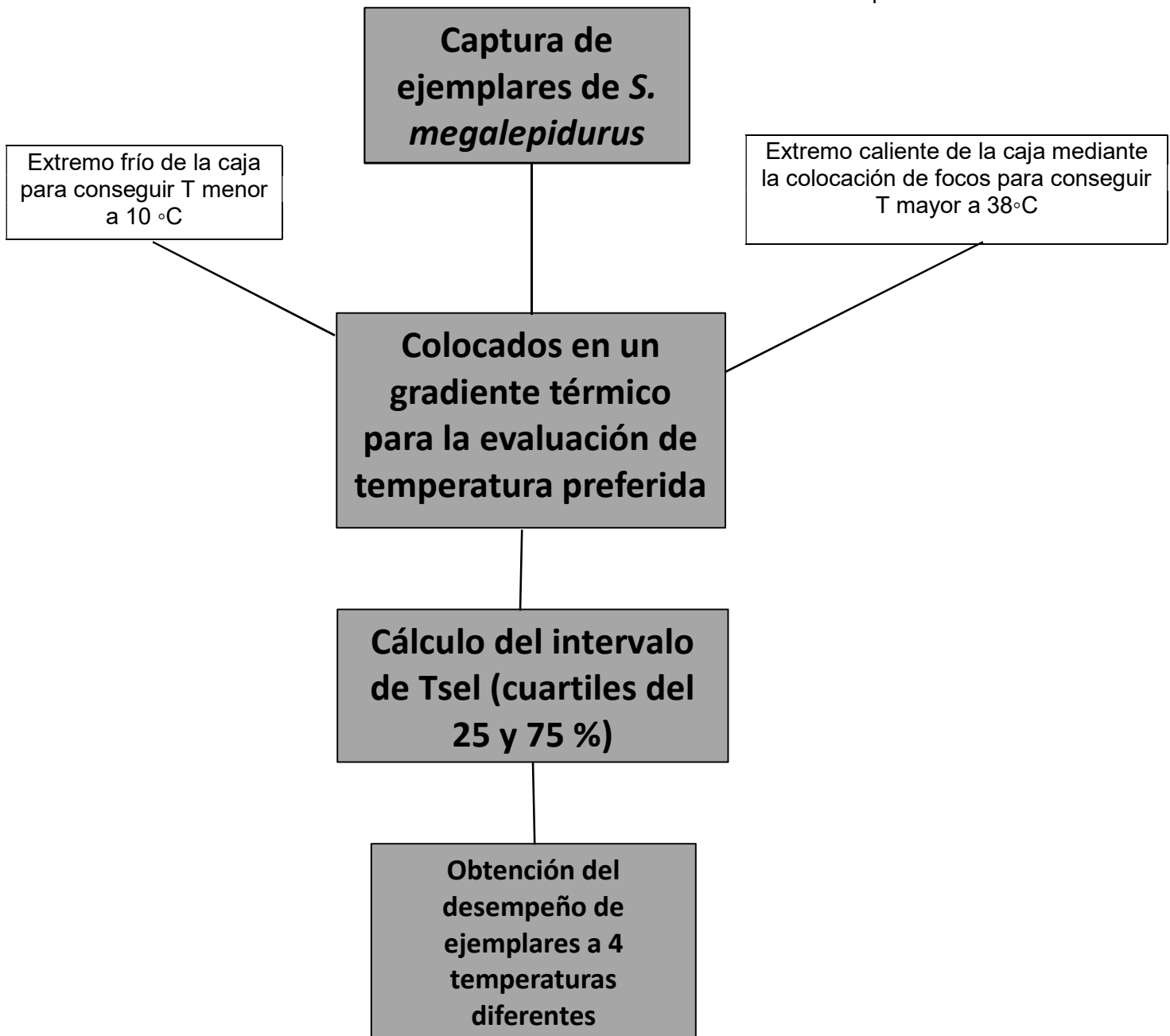
## **9. Hipótesis**

Las temperaturas preferidas afectan negativamente la anatomía del testículo y epidídimo, así como la viabilidad, morfología, concentración e integridad de ADN espermáticos.

## 10. Diseño experimental

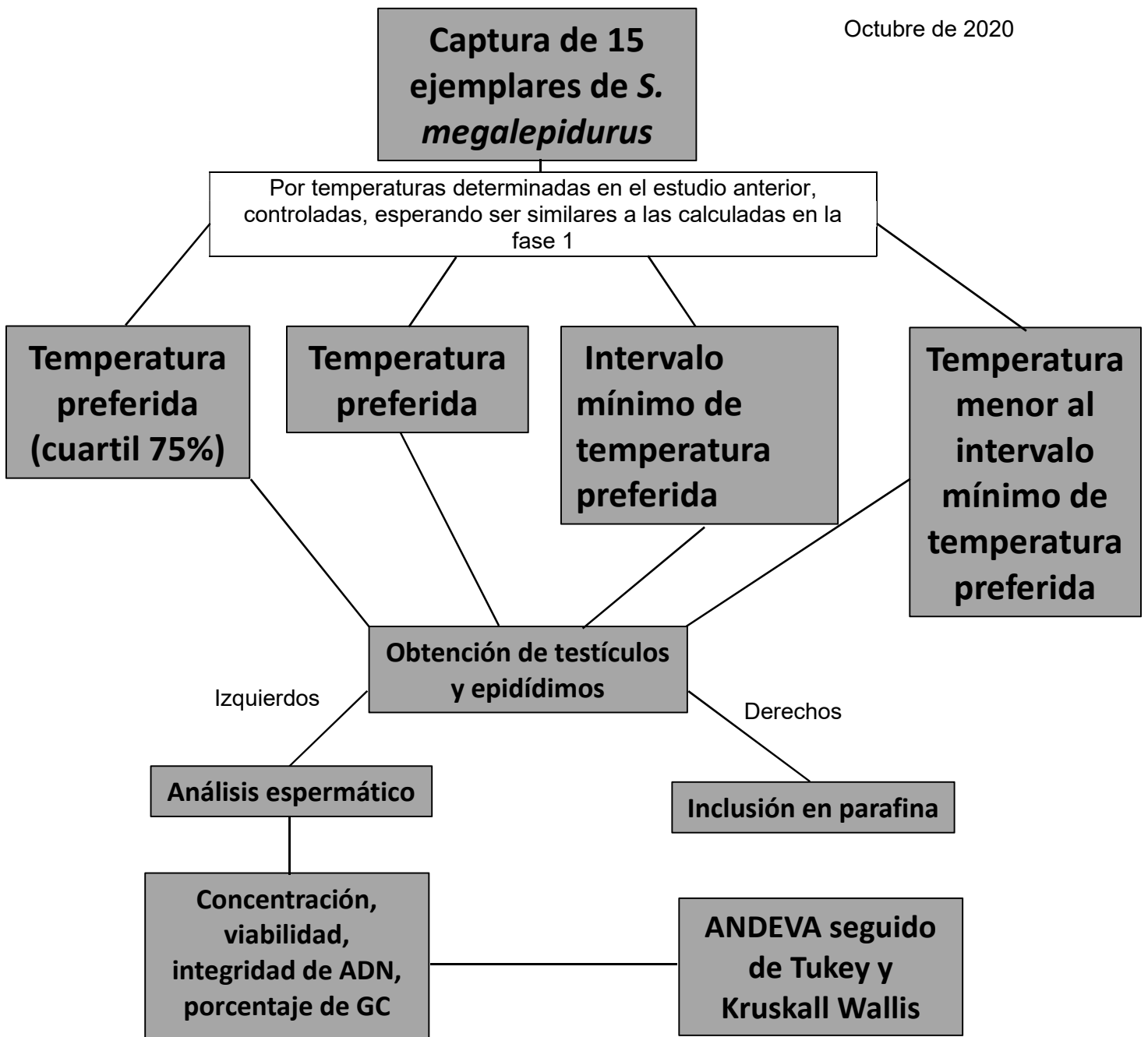
### 10.1 Fase 1: Determinación de la temperatura preferida

Septiembre 2020



## 10.2 Fase 2: Análisis espermático e inclusión en parafina

Octubre de 2020



## 11. Material y métodos

### 11.1 Reactivos y soluciones

NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , formaldehído, Carnoy's y lidocaína (solución inyectable), solución fisiológica Ringer ajustado a pH 7.2. y buffer de fosfatos (PBS) para disoluciones.

Para la fijación de los órganos se utilizó paraformaldehído 4% p/v y solución Carnoy's, esta última preparada con etanol 60mL; cloroformo 30mL y ácido acético 10mL. En cuanto a la inclusión en parafina, previamente se sometieron los tejidos en alcoholes de gradación creciente (50°, 70°, 80, °96° y 100°), xileno y Paraplast X-tra.

### 11.2 Criterios de inclusión fase 1 del experimento

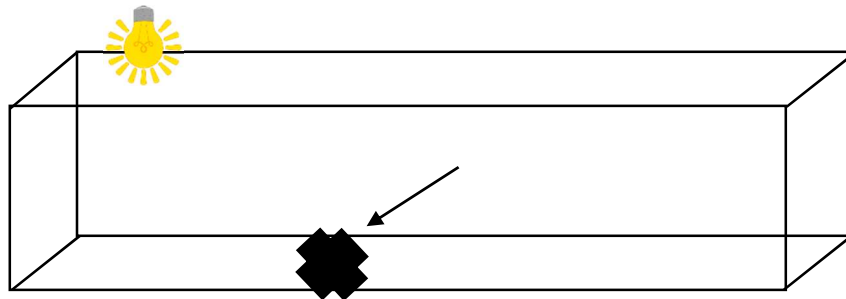
Se capturaron 22 ejemplares adultos de *S. megalepidurus* en los alrededores de Laguna de Tecocomulco, Hidalgo (19°52'32.9" N, 098°23'54.5" W; 2625 de altitud) en el mes de octubre de 2020. Se contó con el permiso de colecta SGPA/DGVS/ 02523 /19 otorgado al Dr. Fausto Roberto Méndez de la Cruz por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental y la Dirección General de Vida Silvestre, dependencia de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

Las características físicas y geográficas de los sitios de estudio para la determinación de temperaturas de las zonas de encuentro de los animales fueron determinadas a través de registradores de temperatura y humedad conocidos como "ibuttons ®" los cuales son insertados dentro de un tubo de PVC, mismo que tiene como función registrar la temperatura de las perchas cada hora, emulando las temperaturas en el que la especie podría obtener de forma inerte.

### 11.2.1 Determinación de temperaturas preferidas

A continuación, se fabricó un gradiente de temperatura para la determinación de temperaturas preferidas (Díaz *et al.*, 2013), Los machos se colocaron en el gradiente que constó de 8 canaletas de madera de 100 cm de longitud X 24 cm de ancho X 28 cm de alto, siendo colocados 3 ejemplares en cada una y la lagartija restante en la última de estas.

El gradiente térmico fue generado por medio de la colocación de un foco de 100 w en un extremo de cada canaleta a una altura de 28 cm de la base, además de una bolsa de hielo en el otro extremo tal como se muestra en el siguiente modelo y se ilustra mejor por medio del siguiente modelo:



Modelo de gradiente térmico para determinación de temperatura preferida de la especie. El ejemplar es colocado en la canaleta provista de un generador calorífico el cual se encargará de proporcionar la energía en forma de calor al individuo (representado por **X**), mismo que se posicionará en un punto de la canaleta. La flecha representa el punto de medición de la temperatura corporal y a nivel sustrato.

Las mediciones de temperatura se realizaron por medio de la utilización de un termómetro digital “FLUKE 51 II” durante el horario de actividad de los organismos, que va desde las 10:00 hrs hasta las 17:00 hrs, dando un total de 7 mediciones por

ejemplar, mismas que constaban de la colocación de la termocupla del termómetro en la zona de la cloaca de los individuos.

Por último, la suma de los datos registrados fue dividida entre el número total de mediciones (7 mediciones x 15 ejemplares).

### 11.3 Criterios de inclusión. Fase 2 del experimento.

Se capturaron 15 ejemplares machos adultos de *S. megalepidurus* en los alrededores de Laguna de Tecocomulco, Hidalgo (19°52'32.9" N, 098°23'54.5" W; 2625 de altitud) en el mes de octubre de 2020.

Para la selección de las lagartijas macho se emplearon las características descritas por Godínez-Cano (1985) que son:

- Longitud hocico- cloaca mayor de 45 mm.
- Abultamiento visible en la región ventral por la presencia de hemipenes al interior de la cloaca.
- Ancho de la cabeza de alrededor de 10 mm.

Los ejemplares capturados fueron depositados en sacos de manta y transportados a las inmediaciones del laboratorio de Herpetología 2, en el Instituto de Biología, UNAM.

#### 11.3.1 Inclusión de ejemplares

Las lagartijas fueron separadas en 4 grupos, colocados en incubadoras Hova Bator 1602N, se revisaron diariamente y se mantuvieron con disponibilidad de agua y alimento vivo *ad libitum*. Los cuatro grupos fueron sometidos a temperatura controlada: el primero expuesto dos grados abajo del límite inferior de la temperatura preferida, el segundo a esta última mencionada, el tercero a la temperatura preferida y el cuarto

grupo al límite superior de la temperatura preferida, por determinar en la primera fase del experimento.

La temperatura se controló por medio de las incubadoras que mantenían el nivel requerido durante el horario de actividad de las lagartijas, desde las 10 hasta las 17 horas para posteriormente ser mantenidos a la temperatura ambiente del lugar con el fin de simular el periodo de actividad y reposo de los lacértidos en condiciones naturales.

#### 11.4 Obtención del material biológico

Con el fin de obtener la mayor concentración de espermatozoides por ejemplar se sacrificaron los ejemplares mediante inyección intraperitoneal con 0.10 mL de Lidocaína después de 14 días de tratamiento, con apego a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, 1996).

Se extrajeron ambos testículos y epidídimos, de los cuales, se utilizaron los del lado izquierdo, mientras que los del lado derecho fueron fijados en paraformaldehído 4% e incluidos en parafina (Paraplast X-tra), para estudios posteriores.

De los órganos obtenidos se tomaron las siguientes medidas:

- Diámetros y longitudes con un calibrador digital (precisión= $\pm 0.5$ mm)
- Peso fresco con una balanza METTLER TOLEDO AB204-S (precisión = $\pm 0.1$ mg).

#### 11.5 Procedimientos para el análisis espermático

Se seccionó cada epidídimo en tres regiones con proporciones semejantes: *caput*, *corpus* y *cauda*.

Los órganos se colocaron en una caja Petri de cuatro pozos con 250  $\mu$ L de solución fisiológica Ringer y se realizó un picado de acuerdo a lo descrito por Arenas *et al.*,



2016, con la finalidad de obtener la mayor cantidad posible de espermatozoides, posteriormente se trasladó el material biológico a un tubo Eppendorf de 1.5ml (Arenas *et al.*, 2016). Para finalizar, el material se centrifugó a 250 G por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el botón celular se disgregó con 250  $\mu$ L de solución Ringer dos veces. Así el resultante fue de “espermatozoides lavados”.

### 11.5.1 Análisis espermático

Los espermatozoides obtenidos se evaluaron de acuerdo a las especificaciones de la Organización Mundial de la Salud para la evaluación del semen humano (WHO, 2010) con ajustes necesarios para las células obtenidas de los diferentes órganos. Las variables y métodos para su obtención fueron los siguientes:

Número total de espermatozoides por órgano ( $n$  spz  $\times 10^6$ / órgano): el cual se obtiene contando los espermatozoides con la cámara de Neubauer, realizando una dilución dependiendo de la densidad de espermatozoides que se identifiquen a un campo de 40x, llenando ambas cámaras con 10  $\mu$ L de la dilución.

Para obtener la concentración espermática se utilizó la fórmula:  $N/n \times (1/20) \times$  factor de dilución, siendo N el número total de espermatozoides contados en ambas cámaras y n los cuadros contados.

Para el cálculo del porcentaje de viabilidad se colocó una alícuota de 5  $\mu$ L de la suspensión de espermatozoides en un portaobjetos y se mezcló con una alícuota de igual volumen de tinción supravital Spermavit para posteriormente realizar un frotis y observar a microscopía de campo claro para realizar el conteo.

Porcentaje de integridad de ADN: Se colocó una alícuota de 10  $\mu$ L de la suspensión de espermatozoides en un portaobjetos para realizar un frotis y dejar secar a temperatura ambiente, después se incluyó en solución Carnoy's durante aproximadamente 24 hrs en un lugar frío y oscuro, posteriormente se retiró el fijador y se incluyó en la solución de naranja de acridina por 5 minutos, luego, se retiró el

sobrante de colorante y se dejó secar aislado de la luz, por último, se analizaron las laminillas con ayuda de microscopía de fluorescencia a 40x.

Porcentaje de gota citoplásmica (GC): Se colocó una alícuota de 5  $\mu$ L de la suspensión de espermatozoides en un portaobjetos y se mezcló con una alícuota de igual volumen de Spermavit para realizar un frotis y observar a microscopía de campo claro para realizar el conteo.

### 11.6 Análisis estadístico

Se utilizó para identificar la existencia de diferencias significativas entre los grupos, realizando análisis paramétricos mediante un análisis de varianza “ANDEVA” para la evaluación de los tres tratamientos, así como para evaluar la variabilidad y errores aleatorios de manera que los posibles efectos ambientales y temporales se vayan distribuyendo equitativamente entre los tratamientos, seguido de una prueba post-hoc de “Tukey” y un análisis no paramétrico “Kruskal-Wallis” para medias significativamente diferentes. Los datos fueron analizados previamente para que cumplieran los supuestos de la prueba paramétrica utilizada (normalidad y homoscedasticidad) considerando como independencia los datos provenientes de los diferentes organismos analizados.

## 12 Resultados y Discusión

### 12.1 Fase 1

#### 1.1.1 Determinación de temperaturas preferidas

Se lograron coleccionar 22 ejemplares de *S. megalepidurus* en la expedición, de los cuales 15 individuos fueron machos y 7 hembras, todos adultos de acuerdo a los criterios descritos por Smith et al. (2006), tal como muestra la tabla 1. observándose una media mayor a 45 mm ( $50.13 \pm 4.68$ ). Así también, el peso de los machos coleccionados representó un registro confiable, conforme a la talla de cada uno de ellos ( $3.68 \pm 0.83$ ).

Resulta interesante que al menos en 1 de cada 2 avistamientos y colectas, se encontraban un macho y una hembra juntos, lo cual es un índice probable de la etapa reproductiva de la especie (Godínez-Cano, 1985).

El primer desafío que se tuvo para la realización del cautiverio fue conseguir que todos los ejemplares presentaran características típicas de la entrada al ciclo reproductivo, así como los intervalos de luz y oscuridad y su relación con el fotoperiodo, presentes para que la especie pudiera ser estudiada en el tiempo requerido de su aclimatación en las incubadoras, esto, a partir de observaciones en el cambio de coloración en las escamas de la región dorsal (Fig. 7), indicativo de presencia de niveles altos de testosterona en el torrente sanguíneo (Cox et al., 2005), importantes para la producción de espermatozoides y para la función del epidídimo, y por ende, el ejemplar sea apto para reproducirse (Cox et al., 2005; Pianka y Vitt, 2006).



**Figura 7.** Coloración de vista dorsal de *S. megalepidurus*. Se muestran pequeños puntos en tonalidades azules-verdes en la zona mencionada, indicativo de machos en etapa reproductiva. Barra = 10 mm.

Se realizó el registro de la temperatura cloacal ( $T_c$ ) de cada uno de los ejemplares inmediato a la captura, así como la temperatura a nivel del sustrato ( $T_s$ ) donde se

encontraban perchando y la temperatura ambiental ( $T_a$ ) (Tabla 2), para poder realizar la comparación entre la  $T_o$ , índice de termorregulación y eficiencia de los ejemplares. Misma que arrojó una  $T_c$  más alta en machos ( $32.19 \pm 1.37$ ) que en hembras ( $31.77 \pm 1.33$ ). Caso contrario a lo ocurrido con la  $T_s$  y  $T_a$ , donde los registros favorecen a los proporcionados con la captura de las hembras ( $T_s$ :  $23.62 \pm 5.19$ ;  $T_a$ :  $21.34 \pm 3.48$ ), sin embargo, ninguno de los registros proporcionó diferencias significativas entre individuos.

En relación al registro de la  $T_{sel}$ , se realizó el tratamiento de gradiente de temperatura a los individuos machos (Fig. 8), imitando el horario de actividad con 8 repeticiones (10:00 hrs – 17:00 hrs), cuyo dato promedio arrojó un número similar ( $33.64 \pm 3.20$ ) a la media encontrada en las mediciones anteriores de las  $T_c$ . De esta manera, para conseguir un intervalo efectivo para la posterior aclimatación de los individuos a temperaturas controladas, se obtuvieron los cuartiles del 25% y 75%, mismos que permitieron establecer un intervalo para la temperatura más alta para el experimento, ajustada a  $36^\circ\text{C}$  ( $T_{sel}$  cuartil 75%: 35.7) y el dato mínimo de la desviación estándar de la  $T_{sel}$  ( $30^\circ\text{C}$ ). De esta manera, 3 de las temperaturas controladas en los grupos quedaron establecidas, adjuntando un cuarto grupo cuyo intervalo térmico fue ajustado por la distancia entre grupos ( $2^\circ\text{C}$  aproximadamente) a  $28^\circ\text{C}$ .

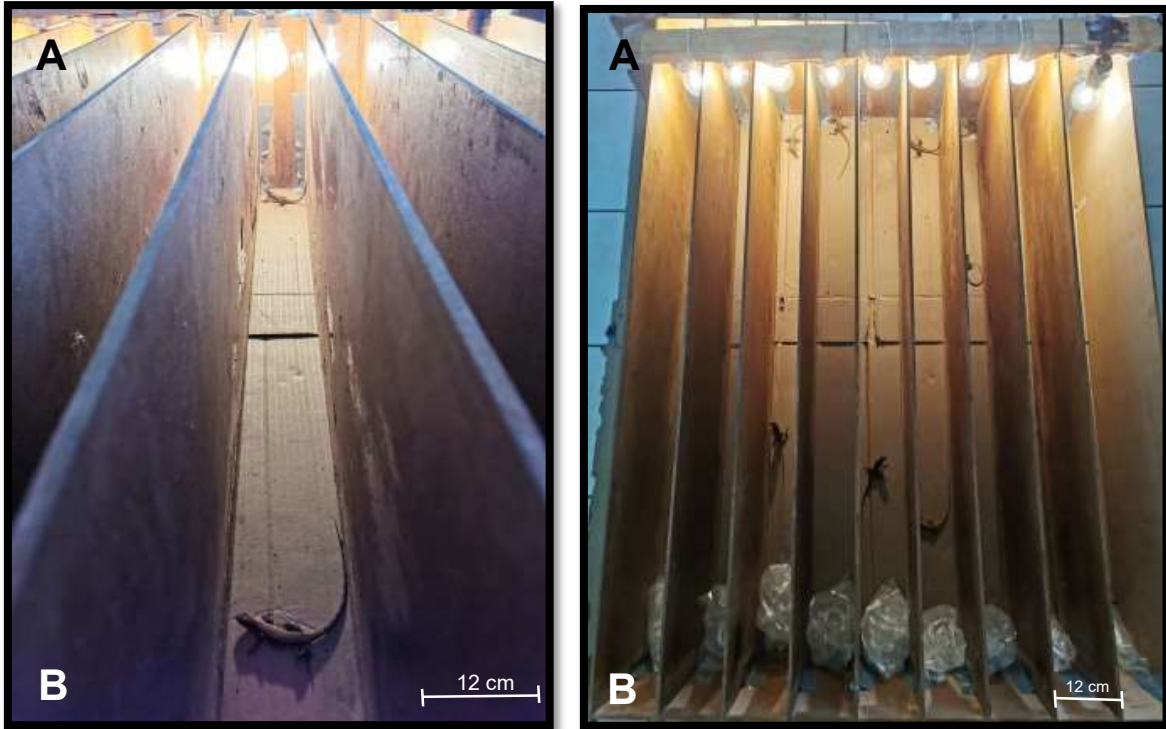
En 2016, Hernández-Márquez estableció la  $T_{sel}$  de *S. megalepidurus* en  $34.04 \pm 0.4$ , misma que coincide con el presente estudio. Además, otros estudios en *Sceloporus* han coincidido con este intervalo (Lara-Reséndiz R, y Díaz de la Vega, 2013; Jiménez-Arcos, 2008; Lara-Resendiz y García-Vázquez, 2013; Valdéz, 2013; Lara-Resendiz et al., 2014).

Individuos	LHC (mm)	Peso (gr)
<i>S. megalepidurus</i> machos	50.13 ± 4.68	3.68 ± 0.83

**Tabla 1.** Registro de tallas y pesos de *S. megalepidurus* machos en el lugar de colecta anterior al comienzo del gradiente de temperatura. Se muestra la longitud promedio que comprueba el aparente estado de un macho adulto.

Población	n	Tc	Ts	Ta
Machos	15	32.19 ± 1.37	22.89 ± 4.79	19.9 ± 3.44
Hembras	7	31.77 ± 1.33	23.62 ± 5.19	21.34 ± 3.48

**Tabla 2.** Registro de temperaturas obtenidas en el lugar de colecta de *S. megalepidurus*. Se muestra el sexo y cantidad de ejemplares capturados (n), seguido de la media de temperatura corporal (Tc), temperatura del sustrato (Ts) y temperatura ambiental (Ta).



**Figura 8.** Composición del modelo de gradiente de temperatura para *S. megalepidurus*, visto a diferentes perspectivas, en el que se muestra **A:** Extremo cálido del gradiente, ajustado a una altura máxima de 20 cm. **B:** Extremo frío del gradiente, con temperaturas de hasta 2°C. 2 ejemplares colocados por carril, con revisión constante con registro de temperatura cloacal cada 60 minutos. Barra = 12 cm.

n	Tsel (°C)	Tsel Cuart 25% (°C)	Tsel Cuartil 75% (°C)	LHC (mm)	Peso (gr)
15	33.64 ± 3.20	32.075	35.7	50.13 ± 4.68	3.97 ± 0.83

**Tabla 3.** Registro de los datos obtenidos del cálculo del gradiente de temperaturas en horario de actividad de *S. megalepidurus* machos. Se muestra la temperatura preferida de la especie (T sel) con cuartiles del 25 y 75% así como la longitud hocico-cloaca (LHC) y peso de los individuos . Los datos permiten determinar la temperatura de cautiverio para los ejemplares, derivado del dato más bajo de la desviación estándar de la T sel y el cuartil del 75% del mismo registro.

## 12.2 Fase 2

### 12.2.1 Obtención de órganos de interés

Una vez ocurridas las dos semanas de tratamiento, la obtención de los órganos de interés fue llevada a cabo, encontrando rasgos poco esperados. En primer lugar, 14 de los 15 individuos presentaron espermatozoides en testículo y las 3 regiones del epidídimo. Esto puede deberse a que el individuo aún se encontraba en etapa juvenil, mismo que mostró una LHC de 45mm, siendo menor a la registrada para un organismo adulto, de acuerdo a Godínez Cano, (1985), peso testicular de 0.0043 gr y epididimario de 0.0045, así como una longitud testicular y epididimaria de 0.3 y 0.8 unidades respectivamente.

Otro aspecto a resaltar se dio por el hallazgo de una aparente disminución espermática a nivel del *caput* en todos los epidídimos restantes (Figura 9B), mismo que fue evidenciado posteriormente en el análisis de concentración espermática (Tabla 5). La evidencia que se tiene como prueba proviene de Godínez-Cano, 1985 donde muestra

la presencia de espermatozoides en testículo y las 3 regiones del epidídimo en el mes de octubre.

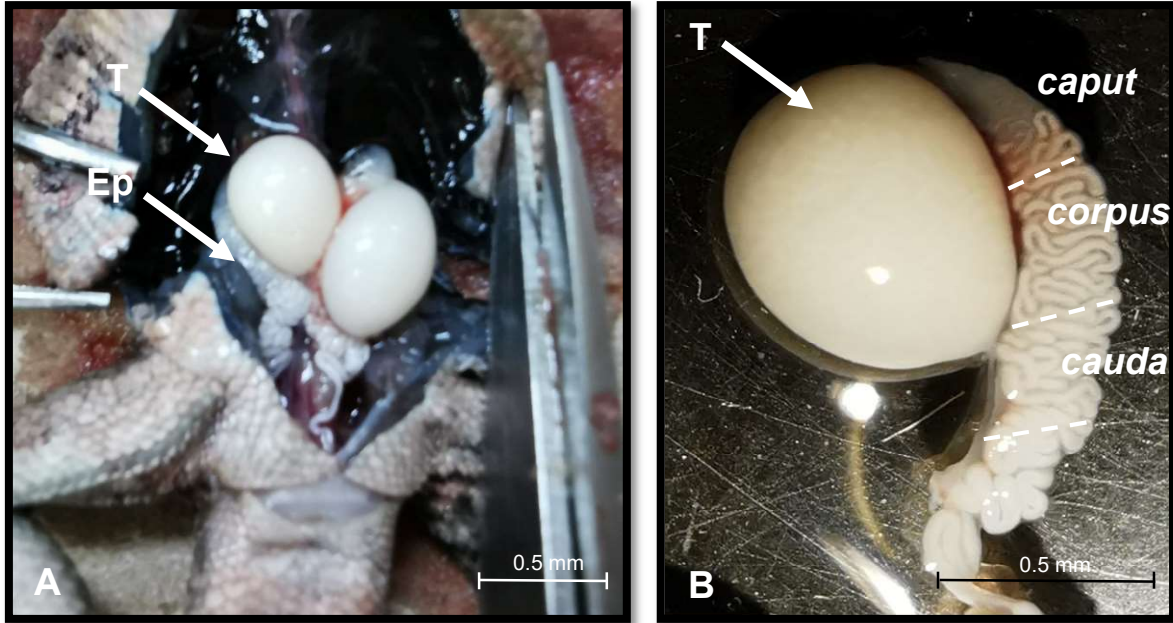
#### 12.2.2 Tamaño y peso gonadales.

Si bien los datos obtenidos muestran una disminución en cuanto al peso (Gráfica 1) testicular en los grupos cuyos tratamientos constaron de 33.6 y 36°C ( $0.028 \pm 0.011$  y  $0.025 \pm 0.015$  respectivamente), así como su tamaño (Gráfica 2) ( $0.56 \pm 0.11$  y  $0.47 \pm 0.11$  respectivamente), el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los grupos (Tabla 4). El ensayo de TUNEL podría proporcionar información adicional relacionada a la disminución del tamaño testicular entre grupos.

También se encontraron 3 ejemplares con diferente tamaño testicular entre ellos, siendo halladas en los grupos de 30°C, 33.6°C y 36°C (Figura 10), cuyos pesos y longitudes de los órganos más grandes, de acuerdo al orden mencionado, fueron los siguientes: 0.0422 gr, 0.0387 gr y 0.0388 gr y longitud de 0.68 mm, 0.67mm y 0.58 mm; siendo su par más pequeño, con medidas que oscilan entre los 0.032 gr y 0.50 mm. Además, la variación de la longitud epididimaria se encontraba entre 0.4 mm y 1 mm, siendo específicamente 0.56 mm, 0.86 mm y 0.5 mm de acuerdo al orden anteriormente mencionado.

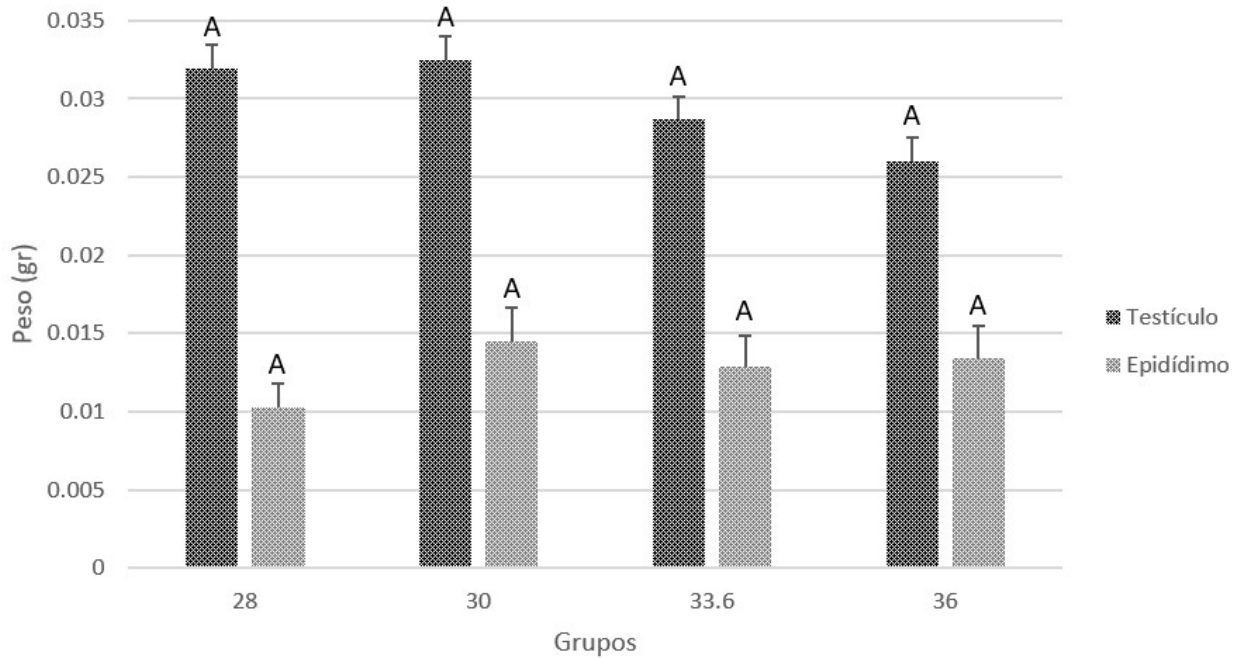
Estas características no han sido descritas en reptiles, por lo que la razón de la disparidad de tamaño entre gónadas de un mismo individuo es, hasta el momento desconocida. Hay que tener en cuenta que este fenómeno ya ha sido documentado en mamíferos, sobre todo en humanos, donde las causas principales de esta característica van desde varicocele (Taha *et al.*, 2011) e hidrocele (Aldoah y Ramaswamy, 2020), hasta atrofia testicular derivada de alteraciones endocrinas, tales como el mal funcionamiento de la producción de testosterona por las células de Leydig.





**Figura 9.** Posición y regionalización de gónadas masculinas de *S. megalepidurus* en etapa reproductiva. En **A**: Ubicación de la posición gonadal. Las flechas muestran al testículo (T) y epidídimo (Ep) del ejemplar. En **B**: Testículo y epidídimo con regionalización para identificar la zona del *caput*, *corpus* y *cauda*. Barra = 0.5 mm

Comparación de pesos de testículo y epidídimo de ejemplares de *S. megalepidurus* sometidos a diferentes temperaturas

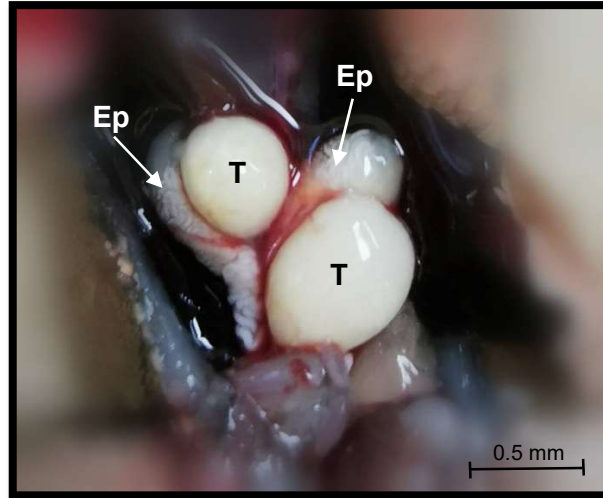


**Gráfica 1.** Peso (gr) de testículos y epidídimos de ejemplares de *S. megalepidurus* posteriores al tratamiento a diferentes temperaturas. Las barras indican la distribución del valor medio de los datos obtenidos de cada tratamiento y región.

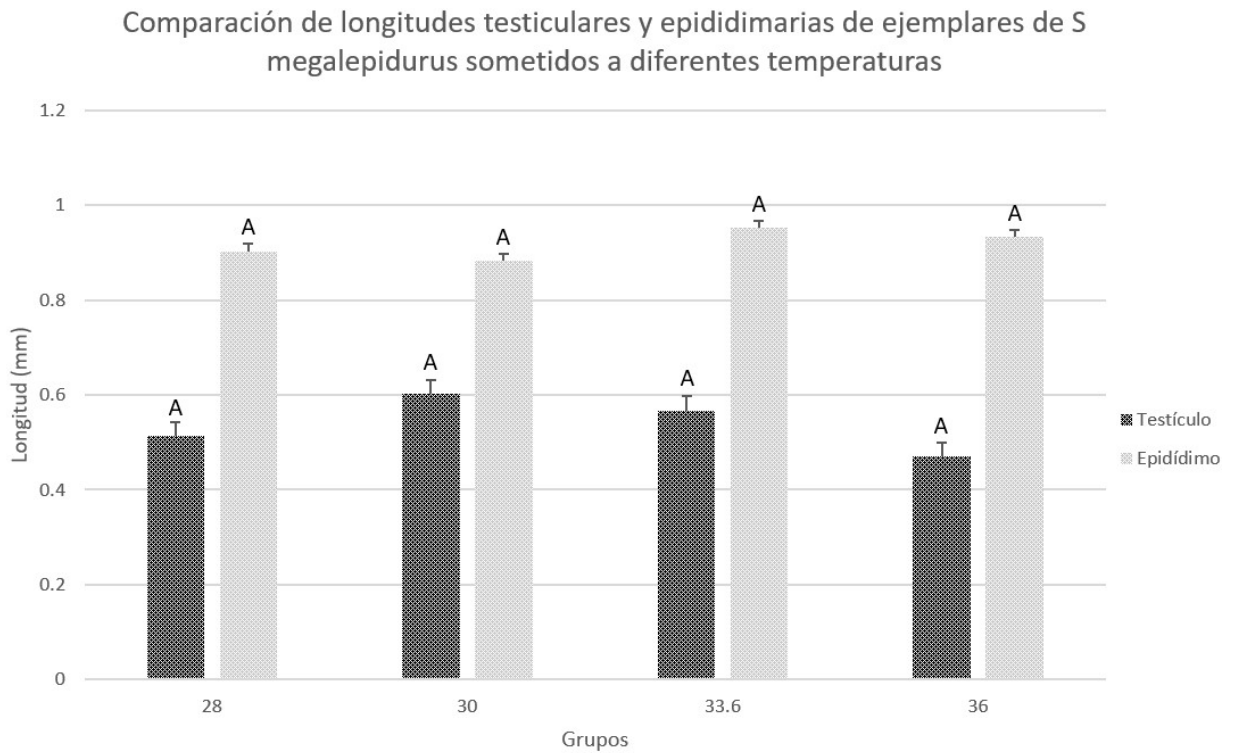
Las letras diferentes indican diferencias significativas entre la comparación de grupos, de acuerdo al análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba post hoc de Tukey y Kruskal-Wallis, con un valor  $p < 0.05$ .

**Nota:** 3 ejemplares mostraron tamaños diferentes entre cada testículo, siendo el testículo derecho el de mayor tamaño, mismos que se encontraron en el grupo de 30°C, 33.6°C y 36°C.

Así también la aparente disminución de tamaño y longitud en el grupo de 36°C se debe al hallazgo de un ejemplar juvenil, mismo que no inició su ciclo reproductivo y, posterior a estas mediciones fue descartado.



**Figura 10.** Evidencias de diferencia de tamaño de testículos encontrados en los tratamientos de 30°C, 33.6°C y 36°C. Un ejemplar encontrado por cada grupo. Barra = 0.5 mm.



**Gráfica 2.** Longitudes testiculares y epididimarias de ejemplares de *S. megalepidurus* sometidos a diferentes temperaturas. Las barras indican la distribución del valor medio de los datos obtenidos de cada tratamiento y región.

Las letras diferentes indican diferencias significativas entre la comparación de grupos, de acuerdo al análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba post hoc de Tukey y Kruskal-Wallis dadas con un valor  $p < 0.05$ .

**Nota:** 3 ejemplares mostraron tamaños diferentes entre cada testículo, siendo el testículo derecho el de mayor tamaño, mismos que se encontraron en el grupo de 30°C, 33.6°C y 36°C.

Así también la aparente disminución de tamaño y longitud en el grupo de 36°C se debe al hallazgo de un ejemplar juvenil, mismo que no inició su ciclo reproductivo y, después de estas mediciones fue descartado.

Grupo	Peso T (gr)	Peso Ep (gr)	Long T (mm)	Long Ep (mm)
28	0.031 ± 0.003	0.010 ± 0.003	0.513 ± 0.051	0.903 ± 0.005
30	0.032 ± 0.007	0.014 ± 0.004	0.602 ± 0.054	0.882 ± 0.158
33.6	0.028 ± 0.011	0.012 ± 0.004	0.567 ± 0.116	0.922 ± 0.051
36	0.025 ± 0.015	0.013 ± 0.008	0.47 ± 0.119	1 ± 0.163

**Tabla 4.** Comparación de pesos y longitudes testiculares y epididimarias de *S. megalepidurus* sometidas a diferentes temperaturas.

No existen diferencias significativas entre la comparación de grupos, de acuerdo al análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba post hoc de Tukey y Kruskal-Wallis con un valor  $p < 0.05$ .

### 12.2.3 Concentración espermática

En relación aparente con el tamaño y peso gonadales, la concentración de espermatozoides no presentó diferencias significativas entre grupos, información que puede indicar que el proceso de producción de espermatozoides se lleva a cabo de igual manera en los 4 grupos, además de que permite cuestionar que el proceso de apoptosis celular es también similar entre estos. Cabe mencionar que la desviación estándar de los grupos sometidos a 30 °C, 33.6 °C y 36 °C es alta a nivel testicular, por lo que limita la suposición de disminución significativa en esta región.

En relación a la especie, el presente estudio sería el primero en manifestar un análisis cuantitativo en cuanto a la concentración espermática aproximada de la misma en etapa reproductiva, en los meses que presentan este tipo celular en testículo y epidídimo (agosto-diciembre) (Godínez-Cano, 1985). Si bien, Godínez-Cano (1985) demuestra la presencia celular en estas regiones, el análisis realizado es meramente histológico.

Con base a lo registrado por Retana (2016), y permitiendo una comparación entre especies cercanas, la concentración espermática es similar en *S. siniferus* y *S. megalepidurus*, siendo, en la primera mencionada,  $50.20 \pm 13.1$  en testículo hasta  $10.12 \pm 6.2$  en *cauda*.

Grupo	Testículo	Caput	Corpus	Cauda
28	51.66 ± 8.32	7.33 ± 4.04	16.66 ± 8.08	21.5 ± 7.37
30	45.25 ± 14.30	8.75 ± 2.87	25 ± 9.84	15 ± 9.48
33.6	41.25 ± 11.92	9 ± 3.55	20.25 ± 3.30	16 ± 5.47
36	35.66 ± 10.01	13.33 ± 8.02	22 ± 1.73	19.33 ± 4.16

**Tabla 5.** Concentración espermática de *S. megalapidurus* sometidas a diferentes temperaturas. Los datos representan  $n10^6$  espermatozoides / mL.

No existen diferencias significativas entre la comparación de grupos, de acuerdo al análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba post hoc de Tukey y Kruskal-Wallis dadas con un valor  $p < 0.05$ .

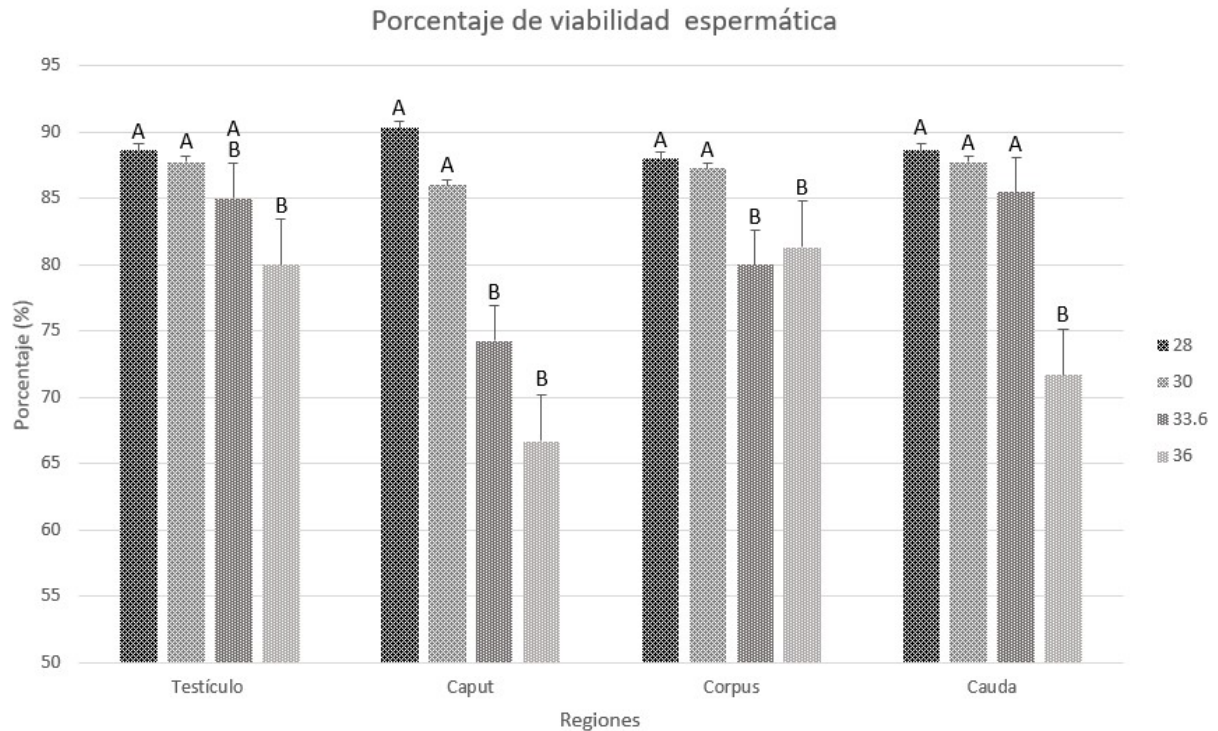
#### 12.2.4 Viabilidad espermática

El análisis de viabilidad espermática (Gráfica 3), obtenido por el método de tinción de eosina-nigrosina (Figura 11) fue crucial para determinar el efecto de la temperatura sobre estos parámetros, mostrando de manera contundente la afectación a nivel celular reproductivo, apoyado del análisis de integridad de ADN. En el primer caso se encontró una bipolaridad marcada en las tres primeras regiones de estudio (Testículo, *caput*, *corpus* y *cauda*), dada por las diferencias significativas entre grupos, mismas que resaltan una disminución en la viabilidad de espermatozoides en los grupos tratados a 33.6 °C y 36 °C, siendo más evidentes en la zona *caput*. Es importante mencionar que los grupos tratado a 28 °C y 30 °C mostraron un porcentaje de viabilidad constante, del 85% al 92% en las cuatro regiones evaluadas. Si bien el grupo tratado a 33.6 °C en principio mostraba similitud a los dos anteriores (85%), su porcentaje bajó considerablemente en la zona del *caput* (74.25%), aumentando gradualmente en *corpus* (80%) y finalizando en similitud a los tratados a 28 °C y 30 °C, indicativo de

problemas de maduración espermática a nivel epididimario al igual que el grupo tratado a 36 °C, cuyo valor mínimo fue de 66% en *caput*, finalizando en 71% en zona de *cauda*.

Es importante mencionar, que uno de los aspectos principales para considerar a un espermatozoide viable, se basa en la integridad de su membrana (Simón-Salvador *et al.*, 2016), donde la evaluación con el colorante eosina-nigrosina hace evidente la presencia de estrés osmótico en el medio en el que se encuentran las células de interés, mismo que deriva en el hinchamiento de flagelo y cabeza del espermatozoide y, en otros casos, el rompimiento de la membrana en la cabeza (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2015).

Se sabe bien que si una de las funciones de las células del epidídimo se basa en la absorción de espermatozoides no viables, la clave puede estar en el incorrecto funcionamiento de éstas a nivel del *corpus*, donde pueden hallarse células principales, que poseen dicha capacidad endocítica (Kempinas y Klinefelter, 2014; Ramos-Ibeas, 2013), entonces, si los espermatozoides no viables permanecen en la *cauda* y se realiza el conteo espermático, no se encontrará un aumento en el porcentaje de espermatozoides viables, si bien, las células del epidídimo son andrógeno-dependientes (Ramos-Ibeas, 2013), aún no se puede adjudicar una falla celular debido a la concentración de testosterona ya que en los cuatro grupos se observaron cambios morfológicos característicos de la presencia de esta hormona, así como la producción de espermatozoides de manera normal, a pesar de ello se requiere de estudios enfocados a la concentración hormonal y sobre todo a la histología en los órganos de estudio de la especie.



**Gráfica 3.** Porcentaje de viabilidad espermática de *S. megalepidurus* sometidos a diferentes temperaturas. Las barras indican la distribución del valor medio de los datos obtenidos de cada tratamiento y región. Se hace evidente el mantenimiento del porcentaje de viabilidad en los grupos con tratamiento de temperatura de 28°C y 30°C a comparación de los grupos restantes, cuyos valores disminuyen notablemente en la región del *caput* para posteriormente incrementar de manera mínima en las regiones restantes.

Las letras diferentes indican diferencias significativas entre la comparación de grupos, de acuerdo al análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba post hoc de Tukey y Kruskal-Wallis dadas con un valor  $p < 0.05$ .





**Figura 11.** Fotomicrográficas de espermatozoides de *S. megalepidurus* teñidos con eosina-nigrosina para la evaluación de viabilidad con el método de penetración de colorante en membrana plasmática, obtenidas mediante microscopía de campo claro en los que se muestra **A:** espermatozoide viable. **B:** espermatozoide no viable. Aumento original X400. Barra = 10 µm.

#### 12.2.5 Porcentaje de gota citoplásmica (GC)

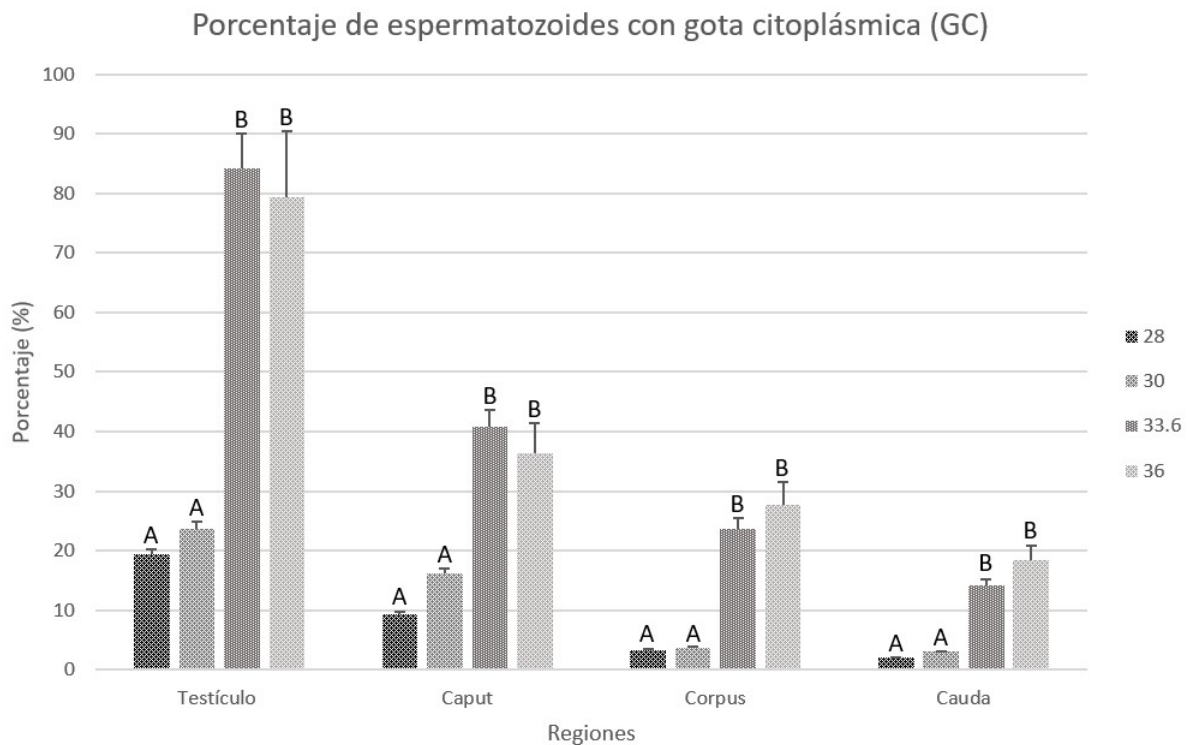
La evaluación de GC en los espermatozoides obtenidos de testículo, se realizó considerando únicamente las células germinales que presentaban la forma de un espermatozoide completamente formado y sin exceso de residuos citoplasmáticos en la cabeza de este (figura 12). De esta manera, el criterio de conteo de espermatozoides con GC en todas las regiones constó del hallazgo de esta última en el cuello de la célula. De acuerdo al análisis presentado (Gráfica 4), los grupos sometidos a 28 °C y 30 °C presentaron un porcentaje de espermatozoides con GC significativamente menor desde el testículo (figura 13), con valores de entre el 19.33% y 23.75%, llegando hasta el 2% a nivel de *cauda*. Si bien los grupos restantes también presentaron disminución en el porcentaje de retención de GC, el intervalo es considerablemente mayor desde la región testicular hasta caudal, teniendo como porcentaje final de 15% a 22% mostrando cierto grado de ineficiencia a nivel de maduración espermática epididimaria comparado con los grupos tratados a una temperatura por debajo de la preferida.

Estos resultados corroboran lo encontrado por Retana, 2016, donde se desconocía si el factor temperatura podía ser el causante de dicha retención y dio pie al presente trabajo, incluso teniendo como referencia a los estudios realizados en mamíferos donde muestran que la hipertermia aumenta la retención de la GC (Durairajanayagam, 2014).

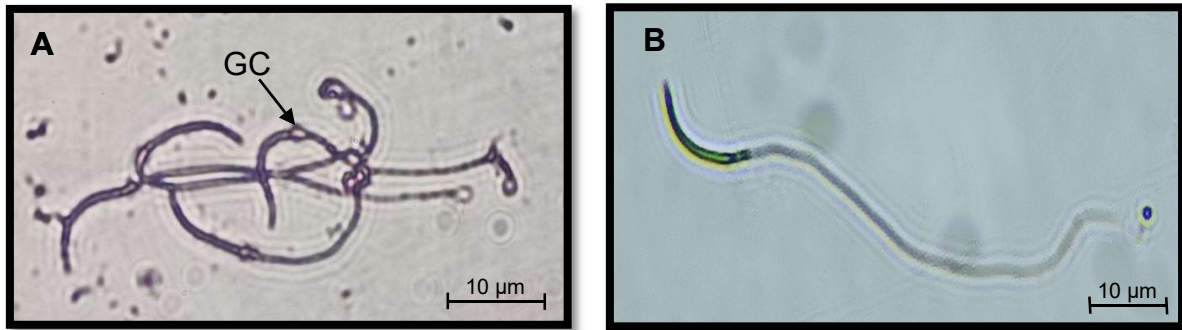
Otro aspecto interesante en esta parte del estudio es que se encontraron espermatozoides sin GC a nivel testicular en los grupos 28 y 30 °C conllevando a un porcentaje de retención de GC de 26% en testículo. Una vez más, este aspecto de remoción de la GC a nivel testicular no ha sido estudiado en reptiles, por lo que los datos más cercanos que podrían tenerse a partir de esta cuestión datan de experimentos realizados por Kato et al. (1984), donde estipula que la remoción de la GC de algunos espermatozoides puede darse por las tensiones no fisiológicas del método de centrifugación, misma que hace que estas gotículas se desplacen a través del flagelo y finalmente sean removidas, siendo así asociado a un efecto mecánico y no a uno fisiológico.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que todas las repeticiones de centrifugado para obtención de espermatozoides se realizaron bajo las mismas condiciones en los grupos, razón suficiente para descartar la teoría anteriormente mencionada. En 2011, Cooper menciona que la remoción de GC a través del paso del epidídimo puede deberse a cambios en la osmolaridad del ambiente, siendo adjudicados a moléculas conocidas como osmolitos, estos se encargan incluso de estabilizar estructuras celulares y/o proteínas, además de mantener la turgencia celular mediante un mecanismo de óxido-reducción o cambios en la osmolaridad del medio (Janska et al., 2010), este fenómeno ha sido mayormente estudiado en plantas, donde se ha visto que los osmolitos suelen actuar ante situaciones de estrés por temperatura como el incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Nelofer et al., 2018), colaborando a mantener la homeostasis celular junto a enzimas antioxidantes.

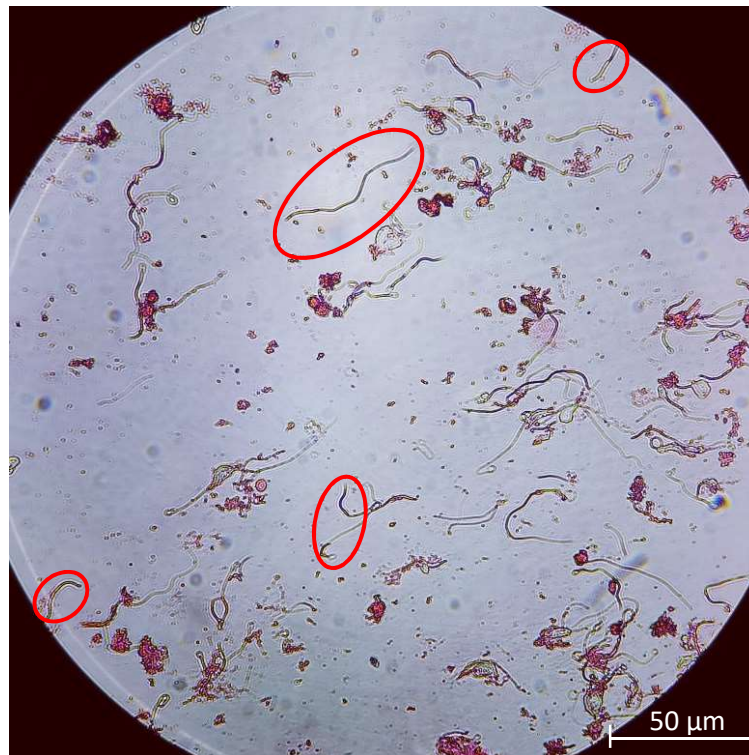
Ante estas similitudes y permitiendo extrapolar las evidencias, se podría comentar que a falta de evidencias contundentes que demuestren lo contrario, la retención de GC en espermatozoides se debe no sólo a defectos en el funcionamiento celular epididimario y testicular, sino también al ambiente osmótico, la pérdida o disminución osmolítica derivada incluso de la disminución del sistema antioxidante y el incremento de ERO en el microambiente.



**Gráfica 4.** Porcentaje de espermatozoides con gota citoplásmica (GC) de *S. megalepidurus* sometidos a diferentes temperaturas. Las barras indican la distribución del valor medio de los datos obtenidos de cada tratamiento y región. Se muestra evidencia de remoción de GC a nivel testicular en los grupos con tratamiento de temperatura de 28°C y 30 °C a diferencia de los grupos restantes. Todos los grupos mostraron disminución de GC a medida del recorrido hasta la zona del *caput*, con diferencia en el porcentaje de espermatozoides encontrados con esta característica. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre la comparación de grupos, de acuerdo al análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba post hoc de Tukey y Kruskal-Wallis dadas con un valor  $p < 0.05$ .



**Figura 12.** Fotomicrografías de espermatozoides de *S. megalepidurus* teñidos con eosina nigrosina para la evaluación de presencia de gota citoplásmica (GC) mediante microscopía de campo claro. **A:** Espermatozoides con GC. La flecha señala la presencia de GC. **B:** Espermatozoides sin GC. Aumento original X400. Barra = 10 µm.



**Figura 13.** Fotomicrografía que evidencia la presencia de espermatozoides de *S. megalepidurus* sin GC a nivel testicular mediante microscopía de campo claro. Círculos

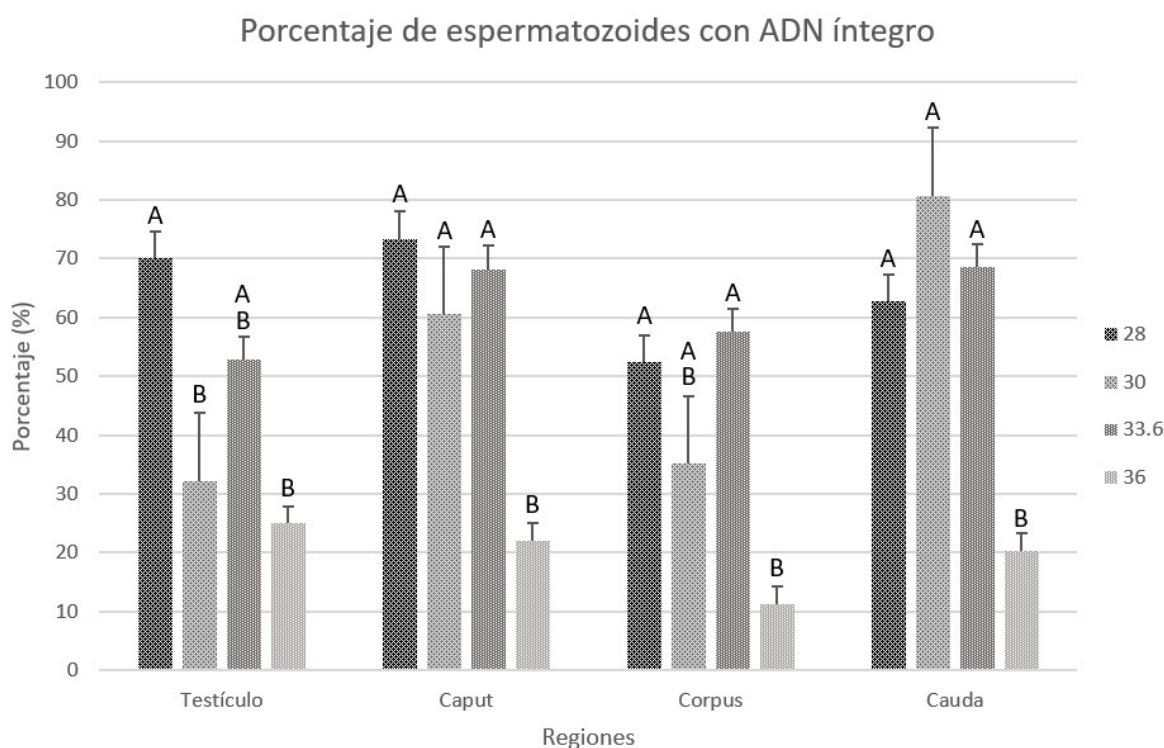
rojos señalan algunas de las células encontradas con dicha condición. Aumento original X400. Barra = 50  $\mu$ m.

#### 12.2.6 Integridad de ADN

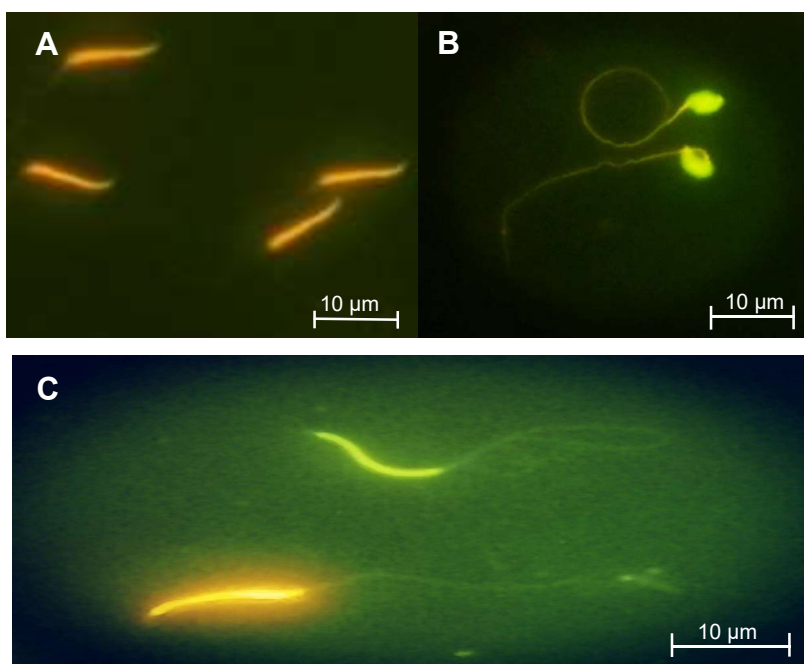
El criterio para determinar el estado del material genético de los espermatozoides fue dado de acuerdo con la coloración proyectada después del tratamiento con naranja de acridina, donde se cataloga a los espermatozoides con ADN íntegro si manifiestan una tonalidad verde a nivel de la cabeza de la célula, mientras que los que presenten un tono naranja fueron contados como células con ADN fragmentado (Figura 14). Así pues, los diferentes grupos demostraron algunas diferencias en cuanto al comportamiento del porcentaje entre regiones (Gráfica 5). En caso del grupo tratado a 28 °C se mantuvo a un intervalo de entre el 50% y 75%, siendo los espermatozoides, obtenidos de la zona del *corpus* donde se encontró un menor porcentaje de integridad, en las tres regiones restantes, parece simular una constante. El grupo tratado a 30 °C pareció comportarse mejor en el incremento de integridad del material genético pues, si bien en principio manifestaba un porcentaje de 32% en promedio, para la zona del *caput* fue el grupo con mayor índice de integridad, llegando hasta el 92%, caso de crecimiento similar en el grupo tratado a 33.6 °C, pero a menor grado. Por último, el grupo tratado a 36 °C fue el que mostró un porcentaje menor en todas las zonas, sin mejorar en el mismo en ninguna de las 4 regiones evaluadas, iniciando con un 28% de porcentaje de integridad y finalizando con 25% en *cauda*. Es importante destacar que todos los grupos presentaron una disminución en su porcentaje en la zona del *corpus*.

En mamíferos se ha visto también que la temperatura elevada y la administración de metales pesados provoca el aumento de ERO a nivel epididimario, lo cual provoca lipoperoxidación de la membrana plasmática de los espermatozoides, la ruptura de los puentes disulfuro implicados en la compactación del ADN (Xu et al., 2013; Taha et al., 2011; Akinloye et al., 2006; Quintero et al., 2015; Agarwal y Tamer, 2004) siendo probablemente estas moléculas las causantes de la alteración en el porcentaje de viabilidad y fragmentación de ADN a nivel epididimario en los ejemplares sometidos a

temperatura de 36 °C que incluso se vio en el grupo sometido a 33.6 °C aunque a menor porcentaje comparado con los otros grupos de temperatura controlada.



**Gráfica 5.** Porcentaje de integridad de ADN de espermatozoides de *S. megalepidurus* sometidos a diferentes temperaturas. Las barras indican la distribución del valor medio de los datos obtenidos de cada tratamiento y región. Se muestra el aumento gradual del porcentaje de espermatozoides con ADN íntegro, siendo más evidente en el grupo con tratamiento de 30°C de temperatura, en contraste al grupo con tratamiento de 36°C cuyos valores continuaron disminuyendo. Todos los grupos mostraron una disminución en el porcentaje de integridad en la zona del *corpus* del epidídimo. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre la comparación de grupos, de acuerdo al análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba post hoc de Tukey y Kruskal-Wallis dadas con un valor  $p < 0.05$ .



**Figura 14.** Fotomicrografías de espermatozoides de *S. megalepidurus* teñidos con naranja de acridina para la evaluación de integridad de ADN mediante microscopía de fluorescencia. La coloración observada en el microscopio de fluorescencia manifiesta el estado del material genético, donde se muestran **A:** Espermatozoides con ADN fragmentado. **B:** Espermatozoides con ADN íntegro. **C:** Indica la bipolaridad de la coloración encontrada en las muestras celulares. Aumento original X400. Barra = 10 μm.

El objetivo principal del estudio fue evaluar el efecto de la temperatura sobre la calidad espermática de la lagartija *S. megalepidurus* para encontrar la relación que pudiera tener el cambio climático sobre ámbitos reproductivos en animales ectotermos, así mismo, obtener un buen modelo que pueda ser apto para realizar estudios sobre hipertermia en reptiles, puesto que es un hecho de que la temperatura a nivel mundial ha ido en aumento desde 1980 con 0.5°C y casi 1°C si se compara con la segunda mitad del siglo XIX debido al CO<sub>2</sub> atmosférico, derivado de la acción humana (Caballero et al., 2007; SMN, 2019).

Se logró demostrar el efecto negativo de la temperatura preferida e hipertermia sobre la calidad espermática de *S. megalepidurus*, resultados que se basan principalmente en el hallazgo de las alteraciones de los parámetros evaluados. Razón que indica la necesidad de los organismos a exponerse a un intervalo de temperaturas por debajo de las preferidas.

Es decir, que la temperatura a la que el animal pueda encontrar un ambiente favorable para realizar sus actividades fisiológicas y metabólicas no implica estrictamente el buen funcionamiento de su actividad reproductora.

De esta manera, un ambiente térmico en equilibrio entre la termoconformidad nocturna y crepuscular y la necesidad termorregulatoria ante un ambiente desfavorable, es crucial para mantener un estado de homeostasis en todas sus funciones, mismo que podría encontrar a partir de las temperaturas de 28 y 30 ° C como lo indica el presente estudio, a falta de más grupos por debajo del límite inferior de la temperatura preferida.

Además de este factor se encontró un índice relativamente alto de ectoparásitos encontrados en la región gular a medida que los ejemplares presentaban estos cambios físicos, mismos que fueron retirados, esto puede ser derivado de la llamada "inmunosupresión" donde el aumento de la testosterona inhibe al sistema inmune del organismo, siendo propenso al ataque por estos ectoparásitos (Salvador et al., 1996) Si bien, es un mecanismo que de cierta medida da la oportunidad a la especie para reproducirse también es un riesgo para la vida del mismo.



### **13. Conclusiones**

- *Sceloporus megalepidurus* es un buen modelo para estudios relacionados con hipertermia testicular, además de aportar información relevante para concientizar, crear estrategias y mecanismos en pro de su conservación y la de otros lacértidos y reptiles en general ante el cambio climático.
- La Tsel de la especie es similar a la registrada en otros individuos del género *Sceloporus*.
- Las temperaturas por debajo de la Tsel de la especie favorecen la viabilidad y maduración espermática.
- La viabilidad espermática de la especie es alta, encontrándose arriba del 80% a nivel testicular y epididimario en condiciones favorables
- El epidídimo interviene en la maduración espermática mediante la remoción de la GC y el incremento en la integridad de ADN de esta célula en condiciones favorables.
- Las temperaturas preferidas y altas provocan el aumento de espermatozoides con ADN fragmentado a nivel epididimario a medida que recorre este órgano, así como afectar la migración de la GC.

### **14. Perspectivas**

Evaluar más características que demuestren el papel del epidídimo en la maduración espermática de la especie.

Complementar el presente análisis con el estudio del efecto de la temperatura en el índice apoptótico testicular y epididimario mediante prácticas histológicas y técnicas de tinción.

Investigar la interacción de mecanismos de respuesta ante estrés por temperatura, desde el nivel de enzimas antioxidantes, hasta proteínas de choque térmico (HSP).

Continuar con la investigación relacionada al ámbito reproductor en lacértidos, no sólo conductual, sino también fisiológico y bioquímico.

## 15. Referencias

Adolph S, Porter W. "Temperature, Activity and Lizard Life Histories", *Animal Nature*, vol. 142: pp. 273-295, 1993.

Akinloye O, Arowojolu A, Shittu O, Anetor I. "Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria". *Reproductive Biology*. (6) 17-30, 2006.

Aldoah B, Ramaswamy R. "Effects of Hydrocele on Morphology and Function of Testis". *Annals of Medical and Health Sciences Research*. Vol. 10:764-770, 2020.

Agarwal A., Tamer M., "Sperm Chromatin Assessment", *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, 2004.

Arenas E, Rosado A, Barberena E, Konigsberg M. Reactive Oxygen Species Production and Antioxidant Enzyme Activity During Epididymal Sperm Maturation in *Corynorhinus Mexicanus* Bats. *Reproductive Biology*. Vol. 183, pp. 1-9. 2016.

Arrotéia K., Vianna P., Ferreira M., Lopes M. y Violin L., "The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility", *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics*, Prof. Luis Violin Pereira, Eds. InTech. pp. 41-66, 2012.

Ashok A., Tamer M., "Sperm chromatin assessment", *Textbook of assisted reproductive techniques*, pp. 65–87, 2004.

Canseco L., García A., "*Sceloporus siniferus*", *The IUCN Red List of Threatened Species*. 2013.

Cooper T., Yeung C., "Sperm maturation in the human epididymis", *The Sperm Cell*. Chapter 4, pp. 72-107, 2010.

Cooper T., "The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility" *Asian Journal of Andrology*, vol. 13, pp. 130-138, 2011.

Cooper, J., "Wildlife Forensic Investigation, Principles and Practice". Capítulo 8. *Working with Live Animals*. Ed. Taylor & Francis Group. EEUU. pp 229, 2013.

Cote J., Meylan S., Clobert J., Voituren Y. Carotenoid-based coloration, oxidative stress and corticosterone in common lizards. *The Journal of Experimental Biology*, vol. 213, pp. 2116-2124, 2010.

Cristofolini A, Merkis C., Barroso F., Vaquer V., Allende F., Chanique A., Koncurat M., "Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas BCL-2 y BAX durante la placentación porcina", *Revista Argentina de reproducción animal*, vol. 30, pp. 43-49, 2010.

Colin A, Barroso G, Gómez-López N, Duran E, Oehninger S. "The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa", *Fertility and Sterility*, vol. 94(7), pp. 2609–2614, 2010.

Cox R. "Integrating proximate and ultimate causes of sexual size dimorphism in lizards". PhD thesis, Rutgers, University of New Jersey, New Brunswick, 2005.

Cox R, Skelly L, Leo A, John H. "Testosterone regulates sexually dimorphic coloration in the eastern fence lizard, *Sceloporus undulatus*". *Copeia*, (3) 597-608, 2005.

Cowles R, Burleson G, "The Sterilizing Effect of High Temperature on The Male Germ-Plasm of The Yucca Night Lizard, *Xantusia vigilis*", *The American Naturalist*, vol. 79, pp. 417-435, 1945.

Dacheux, J.L.; Castella, S.; Gatti, L.J. & Dacheux, F. "Epididymal cell secretory activities and the role of the proteins in boar sperm epididymis". *Theriogenology*, Vol. 63, No. 2, pp. 319-341, 2005.

Dacheux J., Dacheux F., "New insights into epididymal functions in relation to sperm maturation" *Reproduction*, vol. 147, pp. 27-42, 2014.

Depeiges, A., Betail, G., Coulet, M., Dufaure, J, "Histochemical Study of Epididymal Secretions in The Lizard, *Lacerta vivipara*: localization of lectin-binding sites". *Cell Tissue Research*, vol. 239, no. 2, pp. 463-466, 1985.

Díaz H, Jiménez V, Manríquez N, Méndez-De la Cruz R. "Conservatism of thermal preferences between parthenogenetic *Aspidoscelis cozumela* complex (Squamata: Teiidae) and their parental species". *Herpetological Journal* 23:93-104, 2013.

Depeiges A, Dacheux JL. "Acquisition of sperm motility and its maintenance during storage in the lizard *Lacerta vivipara*". *Journal of Reproduction and Fertility*. 74:23-27, 1985.

DOF. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. 2010.

Durairajanayagam D, Agarwal A., Ong C., "Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress", *Reproductive Healthcare Ltd*. pp. 1472-6483, 2014.

Eikenaar C., Husak J., Escallón C., Moore I. Variation in Testosterone and Corticosterone in Amphibians and Reptiles: Relationships with Latitude, Elevation, and Breeding Season Length. *The American Naturalist*, vol. 180, pp. 642–654, 2012.

Ferreira A, Silva D, Van-Sluys M, Dolder H. "Seasonal changes in testicular and epididymal histology of the tropical lizard, *Tropidurus itambere* (Rodrigues, 1987), during its reproductive cycle". *Brazilian Journal of Biology*. 69(2): 429-435, 2009.

Fitch, H. "Reproductive cycles in lizards and snakes. University of Kansas. Museum of Natural History". *Miscellaneous publication*, vol. 52, pp.1-247, 1970.

Fink S., Cookson B. "Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, vol. 73, pp. 1907-1916, 2005.

Fitze P., Cote J., San-Jose L., Meylan S., Isaksson C., Andersson S., Rossi J., Clobert J., Carotenoid-Based Colours Reflect the Stress Response in the Common Lizard. *PLoS ONE*, vol. 4, e5111, 2009.

Fuentes-Mascorro, G, Simón-Salvador P, Tamayo-Martínez H, Álvarez T, "Osmolaridad del espermatozoide de los reptiles". *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, vol. 6, pp: 218-225, 2015.

Gvozdik L, Castilla A. "A comparative study of preferred body temperatures and critical thermal tolerance limits among populations of *Zootoca vivipara* (Squamata: Lacertidae) along an altitudinal gradient". *Journal of Herpetology* 35:486-492, 2001.

Gao HB, Tong MH, Hu YQ, Guo QS, Ge R, Hardy M. "Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells". *Endocrinology*, vol. 143(1): pp. 130-138, 2002.

Godínez-Cano, E., "Ciclo Reproductivo de *Sceloporus megalepidurus megalepidurus* (Reptilia: Sauria: Iguanidae), en la parte oriental de Tlaxcala México". Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala, UNAM. Estado de México, 1985.

González-Ruíz, A., “Aspectos de la Ecología Poblacional de *Sceloporus megalepidurus* Smith (Reptilia; Sauria; Iguanidae) en el Oriente de Tlaxcala, México”, Tesis de Licenciatura, Departamento de Biología Experimental, Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Unidad Iztacala, UNAM. Estado de México, 1991.

González-Ruíz, M., “Dimorfismo sexual en una población de la lagartija *Sceloporus megalepidurus* (Squamata: Phrynosomatidae) que habita en una comunidad de matorral Xerófilo al este de Puebla”, Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.

Haider S, Rai U. “Epididymis of the Indian wall lizard (*Hemidactylus flaviviridis*) during the sexual cycle and in response to mammalian pituitary gonadotropins and testosterone”. *Journal of Morphology* 191 :151-160, 1987.

Hansen P., “Effects of heat stress on mammalian reproduction”, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. vol. 364, pp. 3341–3350, 2009.

Hernández-Márquez E, “Ecología Térmica y Uso de Hábitat de una Población de *Sceloporus megalepidurus* (SQUAMATA: PHRYNOSOMATIDAE) Que Ocurre en los Alrededores de la Laguna de Atexcac, Puebla”, Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. Ciudad de México, 2016.

Hertz P. E., Huey, R. B. y Stevenson, R. D., “Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question”, *The American Naturalist*, vol. 142, pp. 796-818, 1993.

Hertz, P. E., “Adaptation to altitude in two West Island anoles (Reptilia: Iguanidae): Field thermal biology and physiological ecology”, *Journal of Zoology*, vol. 195: pp. 25-37, 1981.

Huey, R. B., "Temperature, physiology and ecology of reptiles". Páginas en 25-91 en C. Gans y F. H. Pough, eds. *Biology of the Reptilia*. Vol. 12. Physiology C. Physiological ecology. Academic Press, New York, 1982.

INECC, Semarnat. México Quinta Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. México. 2012.

Janska A, Marsik P, Zelenkova S, Ovesna J. "Cold stress and acclimation: what is important for metabolic adjustment?" *Plant Biology*. 12:395–405. 2010.

Jiménez-Arcos, "Biología térmica de la lagartija vivípara *Sceloporus torquatus* (Squamata: Phrynosomatidae) del Pedregal de San Ángel, D. F. México". Tesis, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F., 2008.

Kanter M., Aktas C., "Effects of scrotal hyperthermia on Leydig cells in long-term: a histological, immunohistochemical and ultrastructural study in rats", *Journal of Molecular Histology*, vol. 40, pp. 123–130, 2009.

Kanter M., Aktas C., Erboga M., "Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study", *Toxicology and Industrial Health*. vol.2, pp. 99–113, 2011.

Kempinas W, Klinefelter G. "Interpreting histopathology in the epididymis". *Spermatogenesis*. Vol. 4:2, e979114. 2014.

Lara-Reséndiz R, y Díaz de la Vega A, "Sceloporus grammicus (Mesquite Lizard). Selected body temperature". *Herpetological Review*, vol. 44, pp: 328-329, 2013.

Lara-Reséndiz R, y García-Vázquez U. "Sceloporus anahuacus (Anahuacan Graphic Lizard). Selected body temperature". Herpetological Review, vol. 44, pp: 682-683, 2013.

Lara-Resendiz R, Díaz de la Vega A, Jiménez-Arcos V, Gadsden H, Méndez-De la Cruz F, "Termorregulación de dos poblaciones de lagartijas simpátricas: *Sceloporus lineolateralis* y *Sceloporus poinsettii* (Squamata: Phrynosomatidae) en Durango, México", Revista Mexicana de Biodiversidad, Vol. 85: (3), pp: 875-884, 2014.

Lasserre, A.; Barrozo, S.; Tezón, J.G.; Miranda, P, Vazquez-Levin, M. "Human epididymal proteins and sperm function during fertilization: an update". Biological Research, Vol. 34, No. 3-4, pp. 165-178, 2001.

Licht, P., "The relation between preferred body temperatures and testicular heat sensitivity in lizards", Copeia, pp. 428-436, 1965.

Licht, P. Gorman, G. "Reproductive and fat cycles in Caribbean Anolis lizards", University of California, Publications in Zoology, vol. 95, pp. 1-52, 1970.

Lemos-Espinal, J. y Ballinger R., "Comparative thermal ecology of the high altitude lizard *Sceloporus grammicus* of the eastern slope of the Iztaccihuatl Volcano, Puebla, México". Canadian Journal of Zoology, vol. 73: pp. 2148-2191, 1995.

Lemos-Espinal, J., Smith G, Ballinger R., "Thermal ecology of the lizard *Sceloporus gadoviae*, in an arid tropical scrub forest". Journal of Arid Environments, vol. 35, pp. 311-319, 1997.

Lemos J., Smith A., Ballinger R., "Sexual dimorphism and body temperatures of *Sceloporus siniferus* from Guerrero, México, Western North American Naturalist, vol. 4, pp. 498–500, 2001.



Lue Y, Hikim A, Swerdloff R, Im P, Taing K, Bui T, Leung A, Wang C., "Single exposure to heat induces stage specific germ cell apoptosis in rats: Role of intratesticular testosterone on stage specificity", *Endocrinology*, vol. 140, pp. 1709-1717, 1999.

Manente L, Pecoraro S, Picillo E, Gargiulo U, Gargiulo P, De Luca A, Politano L. "Molecular Evidence of Apoptotic Pathway Activation in Semen Samples, with High DNA Fragmentation". *In vivo*; Vol. 29: pp. 289-294, 2015.

Méndez-De La Cruz F, Manríquez N, Arenas-Ríos E, Ibargüengoytía N, "Male Reproductive Cycles in Lizards", *Reproductive Biology and Phylogeny*, vol. 10, pp: 303-339, 2014.

Mieusset R, Quintana-Casares P, Sánchez L, Sowerbutts S, Zupp J, Setchell B., "Effects of heating the testes and epididymes of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen", *Journal Of Fertility*. Vol. 94, pp. 337-343, 1991.

Montalvo C., "Técnica histológica", Facultad de medicina UNAM, 2010.

Moustafa M, Sharma R, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez M, Thomas A, Agarwal A. "Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility". *Human Reproduction*; Vol. 19: 1, pp.129-138, 2004.

Nelofer J, Umer M; Khurshid A, Riffat J. "Cold stress modulates osmolytes and antioxidant system in *Calendula officinalis*". *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 40(4), pp: 73, 2018.

O'Hara, L.; Welsh, M.; Saunders, P.T.K. & Smith, L.B. "Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment

and epididymal spermatozoa transit". *Endocrinology*, Vol. 152, No. 2, pp. 718-729, 2011.

Pianka, E. R., y Vitt, L. J. "Lizards: windows to the evolution of diversity". University of California Press. Vol. 5, pp: 333. 2003.

Powers R, Jetz W. "Global habitat loss and extinction risk of terrestrial vertebrates under future land-use-change scenarios". *Natural Climatic Change*. Springer US, vol. 9: pp. 323–329, 2009.

Quintero G., Bermúdez R., Castillo J., "Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: Un problema actual", *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 18, pp. 144-151, 2015.

Ramos-Ibeas, P., Pericuesta, E., Fernandez-Gonzalez, R., Ramirez, M. A., & Gutierrez-Adan, A. "Most regions of mouse epididymis are able to phagocytose immature germ cells". *Reproduction*, 146(5), 481–489, 2013.

Ravet, V, Courty, Y, Depeiges, A, Dufaure, J, "Changes in epididymal protein synthesis during the sexual cycle of the lizard, *Lacerta vivipara*", *Biology of Reproduction*, vol. 37, pp. 901-907, 1987.

Retana F., "Determinación de indicadores de maduración epididimaria en espermatozoides de la lagartija *Sceloporus siniferus* (Sauria: Phrynosomatidae)", *Molecular Reproduction and Development*, vol. 1, pp. 40-7, 2016.

Salvador A., Veiga J., Martín J., López P., "Testosterone supplementation in subordinate, small male lizards: consequences for aggressiveness, color development, and parasite load", *Behavioral Ecology*, vol. 2, pp. 135-139, 1996.

Semarnat. Programa Especial de Cambio Climático 2014 – 2018 (PECC). México. 2014.

Setchell B, D'occhio M, Hall M, Laurie M, Tucker M, Zupp J., "Is embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile males?", *Journal of Reproduction Fertility*, vol. 82, pp. 567-574, 1998.

Simón-Salvador P, Álvarez T, Fuentes-Mascorro, G, "Choque hipoosmótico en espermatozoides de víbora de cascabel". *Revista Iberoamericana de Ciencias*, vol. 3(3), pp: 52-57, 2016.

Smith, H. M., E. A. Liner, D. Chiszar, G. Pérez-Higareda and F. Mendoza-Quijano., "*Sceloporus megalepidurus*", *Catalogue of American Amphibians and Reptiles* vol. 837, pp.1-5, 2006.

Štiblar-Martincic D. Morphometrical. "Evaluation of Germ Cell Apoptosis in Infertile Men", *Folia Biologica (Praha)*, vol. 55, pp. 233-237, 2009.

Sullivan, R. "Male fertility markers, myth or reality". *Animal reproduction science*, Vol. 82- 83, pp. 341- 347, 2004.

Taha, E, Wahed R, Abdel M. "Varicocele impact on testicular size of infertile men in unilateral or bilateral associated cases". *Human Andrology*, 1(3), 76–78, 2011.

Twigg J, Fulton N, Gomez E. "Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and the effectiveness of antioxidants". *Human Reproduction*. Vol.13, pp.1429–1436, 1998.

Tijani, K.H.; Oyende, B.O.; Awosanya, G.O.; Ojewola, R.W.; Yusuf, A.O. "Assessment of testicular volume: A comparison of fertile and sub-fertile West African men". African Journal of Urology, Vol. 20(3), 136–140, 2014.

Valdéz J, "Ecología Térmica y Uso de Microhábitat de *Sceloporus hunsakeri* y *Sceloporus licki* (SAURIA: PHRYNOSOMATIDAE) En La Región del Cabo Baja California Sur, Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, Baja California Sur, 2013.

Vallés A., Aveldaño M., Furland N., "Altered Lipid Homeostasis in Sertoli Cells Stressed by Mild Hyperthermia", PLoS ONE, 2014.

Vicenzi N, Corbalán V, Miles D, Sinervo B, Ibargüengoytía N, "Range increment or range detriment? Predicting potential changes in distribution caused by climate change for the endemic High-Andean lizard *Phymaturus palluma*", Biology of Conservation, Elsevier Ltd; vol. 206: pp. 151–160, 2007.

Wallace J, Held I, Thompson D, Trenberth K, Walsh J. "Global Warming and Winter Weather". Science, vol. 343: pp. 729–730, 2014.

Whirledge S, Cidlowski J. "Glucocorticoids, Stress, and Fertility". Minerva Endocrinology. Vol. 35(2): pp. 109-125, 2010.

Xu D, Shen H, Zhu Q, Chua L, Wang Q, Taha S, Sayed S, Ghandour N, Mahran A, Saleh M, Amin M, Shamloul R. "Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males". Central European Journal of Urology. Vol 1 (66):84-92, 2013.

## **16. Abreviaturas**

**Tsel:** Temperatura seleccionada (preferida)

**To:** Temperatura operativa

**Tc:** Temperatura corporal

**Ts:** Temperatura de sustrato

**Ta:** Temperatura del aire

**GC:** Gota citoplásmica

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas

**LH:** Hormona luteinizante

**FSH:** Hormona foliculoestimulante

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**ANDEVA:** Análisis de varianza

**NaCl:** Cloruro de sodio

**KCl:** Cloruro de potasio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato de potasio monobásico

**CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O:** Cloruro de calcio dihidratado