



ARTÍCULO ORIGINAL

## Características de la espermatogénesis en una serpiente endémica de Cuba: *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae)

*Characteristics of the spermatogenesis on a Cuban endemic snake: Caraiba andreae andreae (Squamata: Dipsadidae)*

Ana Clara Sanz Ochotorena<sup>1\*</sup>, Yamilka Rodríguez Gómez<sup>1</sup>, María de Lourdes Segura-Valdés<sup>2</sup>, Reyna Lara-Martínez<sup>2</sup>, Luis Felipe Jiménez-García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, México

\* Autor para correspondencia:  
anita@fbio.uh.cu

### RESUMEN

*Caraiba andreae andreae* es una serpiente abundante y exclusiva de Cuba. Se desconocen aspectos de su biología reproductiva y de sus células sexuales, por lo cual el objetivo de este trabajo fue caracterizar su espermatogénesis. Se colectaron cinco machos durante el verano, en la región occidental del país. Se extrajeron las gónadas y sus fragmentos se procesaron mediante técnicas de histología clásica y Microscopía Electrónica de Transmisión. Se detectó que todos estaban espermatogénicos. En los túbulos seminíferos había células de Sertoli y, asociadas a estas, estaban las células espermatógenas y los espermatozoides dispuestos en disposición radial. Se describieron espermatogonias de tipo A y B, espermatocitos primarios y secundarios, así como espermátidas en diferentes grados de diferenciación. El espermatozoide mostró la cabeza alargada y cónica, acorde al acrosoma. Al Microscopio Electrónico de Transmisión el núcleo tiene un *rostrum* y la cromatina compactada. Se observaron hasta 10 mitocondrias. Los resultados relativos a la ultraestructura de los espermatozoides en reptiles, pueden tener implicaciones filogenéticas.

**Palabras clave:** reproducción, células sexuales, espermiogénesis, espermatozoides

### ABSTRACT

*Caraiba andreae andreae* is an abundant and exclusive snake from Cuba. Aspects of its reproductive biology and sexual cells are unknown, so the aim of this research was to characterize its spermatogenesis. Five males were collected during the summer, in the western region of the country. The gonads were extracted and its fragments were processed by classical histology and Transmission Electron Microscopy techniques. As a result, it was detected that all were spermatogenic. In the seminiferous tubules there were Sertoli cells and, associated with these, were the spermatogenic cells and the sperm arranged in radial arrangement. Spermatogonias of type A and B, primary and secondary spermatocytes and spermatids in

Recibido: 2018-11-30

Aceptado: 2019-05-06

different degrees of differentiation were described. The spermatozoon showed the elongated and conical head, according to the acrosome. At the Transmission Electron Microscope the nucleus has a rostrum and compacted chromatin. Up to 10 mitochondria were observed. The results regarding the ultrastructure of sperm in reptiles may have phylogenetic implications.

**Keywords:** reproduction, sexual cells, spermatogenesis, sperm

## INTRODUCCIÓN

La serpiente *Caraiba andreae* pertenece a un género monotípico endémico de Cuba (Henderson y Powell, 2009). Esta especie se ubicó en la familia Dipsadidae (Zaher *et al.*, 2009) y comprende seis subespecies distribuidas a lo largo de la Isla de Cuba, Isla de la Juventud y algunos cayos adyacentes (Rodríguez-Schettino *et al.*, 2013). *Caraiba andreae andreae* (Reinhardt & Lütken, 1862), el llamado "jubito Magdalena", es de rápidos movimientos, de actividad diurna, los adultos miden alrededor de 45-50 cm y tiene una distribución pancubana (Torres *et al.*, 2014; O'Shea, 2018).

Existen pocos datos de la biología reproductiva de esta especie y solo en cautiverio (Tavares-Bastos *et al.*, 2008; Rodríguez-Cabrera *et al.*, 2015). Ninguno aborda aspectos de la morfología de sus gónadas. Históricamente, las serpientes se han ignorado en estudios acerca de la arquitectura testicular y la espermatogénesis. En las últimas dos décadas se han aportado algunos datos sobre la información ultraestructural de espermatozoides de algunas especies, que se han utilizado para construir árboles filogenéticos preliminares (Oliver *et al.*, 1996, Zaher *et al.*, 2009). Sin embargo, estos estudios no incluyen serpientes de Cuba. A causa de esta ausencia de datos, la comprensión de los mecanismos de la estacionalidad, implicaciones evolutivas y estrategias reproductivas de la espermatogénesis en reptiles es incompleta. Por ejemplo, las aves y los mamíferos al alcanzar la madurez sexual, exhiben una estrategia de desarrollo de sus células germinales, que se encuentran organizadas espacialmente dentro de los túbulos seminíferos. Esta estrategia posibilita que cada tipo de célula germinal en desarrollo esté siempre presente y significa que todas las células son al mismo tiempo parte de la misma generación (Gribbins, 2011).

Los reptiles tienen un desarrollo de sus células germinales más similar a los anamniotas que a otros amniotas (Gribbins *et al.*, 2005). En reptiles se producen diferentes fases en diferentes épocas del año, mien-

tras que en aves y mamíferos todas las etapas están siempre presentes y la posición de una célula en el túbulo seminífero determina su estadio espermatogénico. Cuanto más cerca está una célula de la luz, más avanzada es su etapa (Konvalina *et al.*, 2018).

La identificación del polimorfismo de la ultraestructura del espermatozoide de los reptiles escamosos es vital para mejorar la precisión de los análisis filogenéticos. Se han realizado múltiples estudios para distinguir las similitudes y diferencias entre los espermatozoides de los reptiles escamosos, pero estos estudios se han centrado principalmente en los lagartos. Por lo tanto, es importante actualizar la base de datos de la ultraestructura de los espermatozoides de serpientes (Faghiri *et al.*, 2017).

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar aspectos de la espermatogénesis en la serpiente endémica de Cuba *Caraiba andreae andreae*, lo cual puede contribuir a un mejor entendimiento de su biología reproductiva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron cinco machos de *Caraiba andreae andreae* en la región occidental de Cuba, durante la época de cría en el verano. Los individuos fueron sacrificados éticamente y se siguieron los protocolos establecidos (Romero-Fernández *et al.*, 2016).

Se extrajeron los testículos, varios fragmentos de estos se fijaron en paraformaldehído al 4% y se procesaron a través del método de inclusión en parafina (Aguilar *et al.*, 1996). Los bloques se cortaron en un micrótomos de rotación manual entre 5 µm y 7 µm. Los cortes obtenidos se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. Las preparaciones histológicas se observaron en un microscopio óptico Nikon E 800, con objetivos de 20, 40, 60 y 100X. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio con el programa *FlashPoint* 3D FPG.

Otros fragmentos de testículos se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,6. Después, la muestra de tejido gonadal se procesó y se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión (Vázquez-Nin y Echevarría, 2000). Se obtuvieron cortes semifinos (que se tiñeron con azul de toluidina), cortes de 200-400  $\mu\text{m}$  y ultrafinos de 40-60  $\mu\text{m}$  (contrastados con acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo al 0,3%), los cuales se observaron bajo un microscopio JEOL JEM 1010.

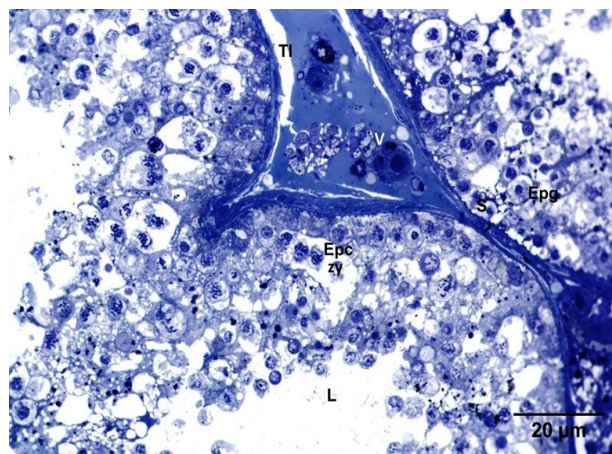
## RESULTADOS

Los testículos examinados de todos los machos de *Caraiba andreae andreae* se encontraban en espermatogénesis. Las células sexuales en desarrollo se encuentran en el interior de túbulos seminíferos y se aprecia la progresión de estas células espermatógenas en ellos asociadas al citoplasma de las células de Sertoli (Fig. 1). Un núcleo de Sertoli también se aprecia en las figura 2. Se destaca en las observaciones al microscopio óptico tejido intersticial abundante y vascularizado, así como numerosos espermatozoides hacia el lumen de los túbulos (Fig. 2 - 4).



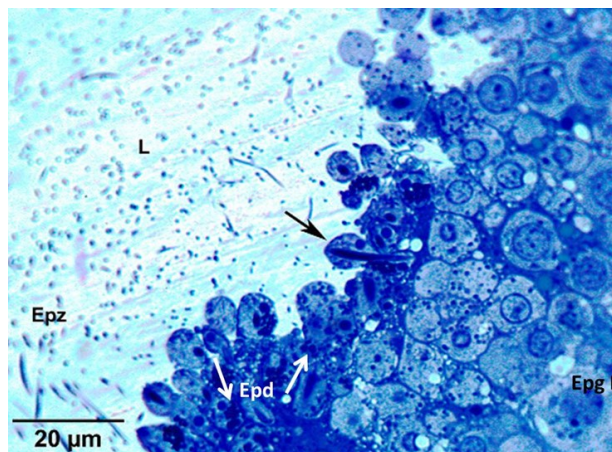
**Figura 1.** Corte transversal de testículo de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). Se observa la espermatogénesis en meses reproductivos. TI= tejido intersticial. Epz= espermatozoides. La flecha señala una célula de Sertoli Hematoxilina-Eosina 400X

**Figure 1.** Cross section of testicle of *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). Spermatogenesis is observed in reproductive months. TI = interstitial tissue. Epz = sperm. The arrow points to a Sertoli cell Hematoxylin-Eosin 400X



**Figura 2.** Secciones de tres túbulos seminíferos y tejido intersticial de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) TI= tejido intersticial, V= vaso sanguíneo, L=lumen, S= núcleo de Sertoli, Epg= espermatogonias en un segundo nivel del túbulo, Epc zy= espermatoцитos en zigoteno. Azul de toluidina.

**Figure 2:** Sections of three seminiferous tubules and interstitial tissue of *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) TI = interstitial tissue, V = blood vessel, L = lumen, S = Sertoli nucleus Epg = spermatogonia in a second level of the tubule, Epc zy = spermatocytes in zygotene. Toluidine blue.



**Figura 3.** Túbulo seminífero en espermatogénesis de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). L=lumen, Epg a= espermatogonia tipo A, Epd = espermatoideas y las flechas blancas las señalan. La flecha negra → = proceso de espermiación, y se observa un espermatozoide mientras está siendo liberado del citoplasma de Sertoli. Epz= espermatozoides. Azul de toluidina.

**Figure 3.** Seminiferous tubule in spermatogenesis in *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). L = lumen, Epg a = spermatogonia type A, Epd = spermatoids and the white arrows indicate them. The black arrow → = process of spermiation, and a sperm is observed while being released from the cytoplasm of Sertoli. Epz = sperm. Toluidine blue.

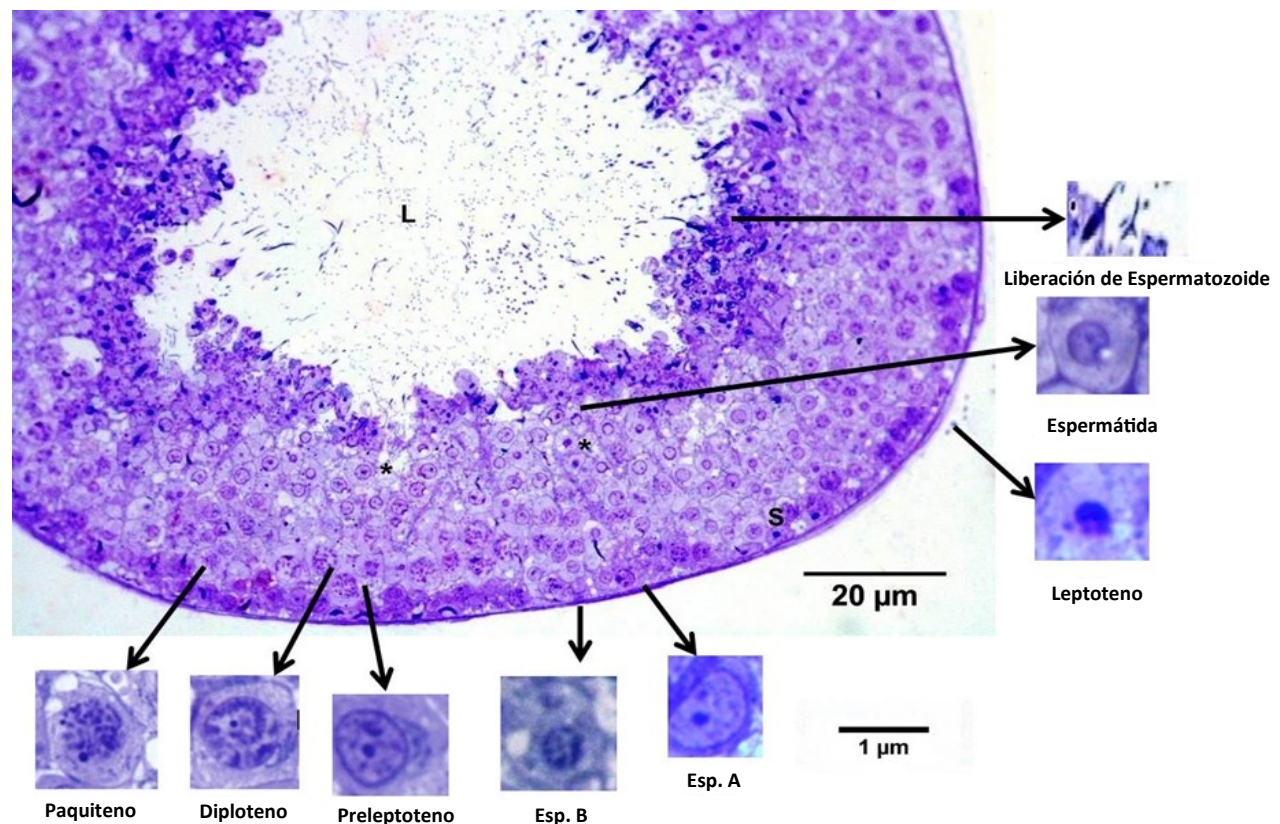


Se observaron gotas de grasa en el interior de los túbulos seminíferos, asociadas al proceso temprano de espermatogénesis de *C. a. andreae* (Fig. 5 y 6).

En esta especie se encontró que la primera etapa o etapa proliferativa de la espermatogénesis comprende dos tipos de células: espermatogonia tipo A y espermatogonia tipo B. Estas son las células progenitoras que se dividen mitóticamente para producir espermátocitos preleptotenos. Las espermatogonias se hallan adosadas a la membrana basal de los túbulos seminíferos (Fig. 4 y 5). Sin embargo, en algunos cortes, como se muestra en la figura 2, se observó que pueden extenderse en varias capas de espesor hacia el lumen.

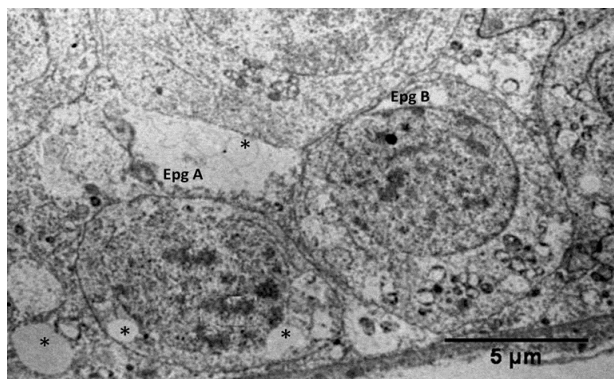
Las espermatogonias tipo A (Fig. 4 y 5) tienen forma ovalada y se alinean en la membrana basal de túbulos seminíferos. Están llenas de cromatina difusa o laxa y se observan uno o más nucléolos dentro del núcleo. La espermatogonia tipo B (Fig. 3 y 4), es más redondeada que la espermatogonia tipo A y muestra también algo más condensada la heterocromatina (Fig. 5).

La etapa meiótica de la espermatogénesis se evidencia por condensación de la cromatina en preparación para la división celular. Los espermátocitos preleptotenos son producto de la división mitótica de la espermatogonia del tipo B pero se pueden distinguir por su menor tamaño. Una característica diagnóstica importante de las células de preleptoteno en esta especie es la presencia de varios nucléolos (Fig 4).



**Figura 4.** Figura combinada donde se muestra un túbulo seminífero de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) y ampliados diferentes tipos celulares en el desarrollo de la espermatogénesis de este dipsárido L=lumen. Esp A= Espermatogonia tipo A. Esp. B= Espermatogonia tipo B. Se muestran también estadios de la Profase I (preleptoteno, leptoteno, paquiteno y diploteno), una espermátida media y un espermatozoide que está siendo liberado del citoplasma de la célula de Sertoli. Los asteriscos indican espermátocitos secundarios. Azul de toluidina.

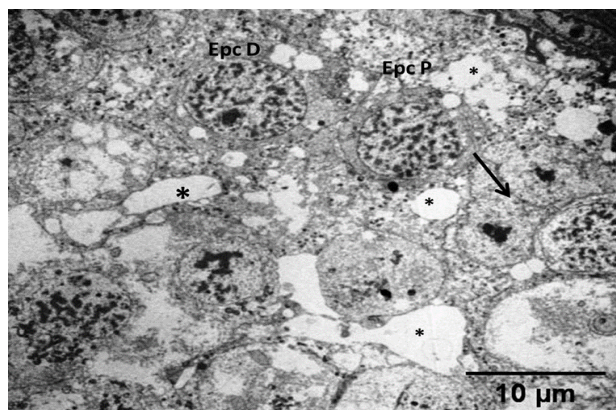
**Figure 4.** Combined figure showing a seminiferous tubule of *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) and increased different cell types in the development of spermatogenesis of this dipsadid L= lumen. Esp A= Type A spermatogonia. Esp. B= Type B spermatogonia. Stages of Prophase I (preleptotene, leptotene, pachytene and diplotene), a medium spermatid and a sperm that is being released from the cytoplasm of the Sertoli cell are also shown. Asteriks indicate secondary spermatocytes. Toluidine blue.



**Figura 5.** Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) donde se muestran dos espermatogonias. Epg A= Espermatogonia tipo A. Epg B=Espermatogonia tipo B. Los asteriscos señalan gotas de grasa.

**Figure 5:** Photomicrograph to the Electronic Transmission Microscope from *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) showing two spermatogonia. Epg A=Type A spermatogony. Epg B=Type B spermatogonia. Asterisks indicate fat drops.

En la fase zigoteno la heterocromatina se condensa en hilos de cromosomas. Los espermatocitos aumentan en el tamaño celular y las fibras cromosómicas engrosan (Fig. 2). Esto conduce al emparejamiento de los cromosomas homólogos en tétradas. En la fase paquitenio, donde están presentes los complejos sinaptonémicos, se observan fibras cromosómicas gruesas separadas por áreas de nucleoplasma (Fig. 4 y 6).



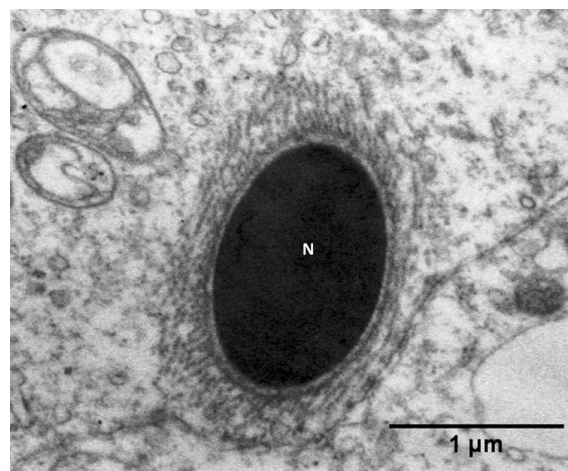
**Figura 6.** Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión de la Sección de un túbulo seminífero de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) donde se observan espermatocitos en diferentes fases EpcP=Espermatocito en paquitenio. EpcD=Espermatocito en diploteno. La flecha señala espermatocitos secundarios en metafase. Los asteriscos señalan gotas de grasa.

**Figure 6:** Photomicrograph to the Transmission Electron Microscope (of the Section of a seminiferous tubule from *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). Spermatocytes were observed in different phases EpcP = Spermatocyte in pachytene. EpcD = Spermatocyte in diplotene. Arrow indicates secondary spermatocytes in metaphase. Asterisks indicate drops of fat.

La fase de diploteno se caracteriza por una membrana nuclear como en degeneración y un patrón de radios de fibras cromosómicas condensadas dispuestas en un círculo. Estas células se someten a metafase I en la que los cromosomas se alinean a lo largo de la placa metafásica (Fig. 6).

Después de la anafase I y la telofase I, se forman dos espermatocitos secundarios haploides (Fig. 6). Las características de los espermatocitos secundarios incluyen una visible membrana nuclear. Estos espermatocitos secundarios sufren la meiosis II. Las células en metafase II se caracterizan por cromosomas alineados en la placa metafásica, pero son la mitad del tamaño de las células en metafase I y tienen la mitad de la cantidad de cromatina.

Al concluir la meiosis de cada espermatogonia que transitó todo el proceso se obtienen cuatro espermátidas haploides que pasarán la etapa de espermiogénesis (Fig. 3). Durante la espermiogénesis en la diferenciación de las espermátidas a espermatozoide ocurren varios procesos visibles al Microscopio Electrónico de Trasmisión. En el núcleo se compacta la cromatina (Fig. 7) y se aprecia el acrosoma en formación (Fig. 8).



**Figura 7.** Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión de la espermiogénesis de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) donde se muestra una espermátida avanzada. Nótese los microtúbulos del manchete que contribuye al alargamiento de la cabeza del espermatozoide y a la compactación de la cromatina. N=Núcleo

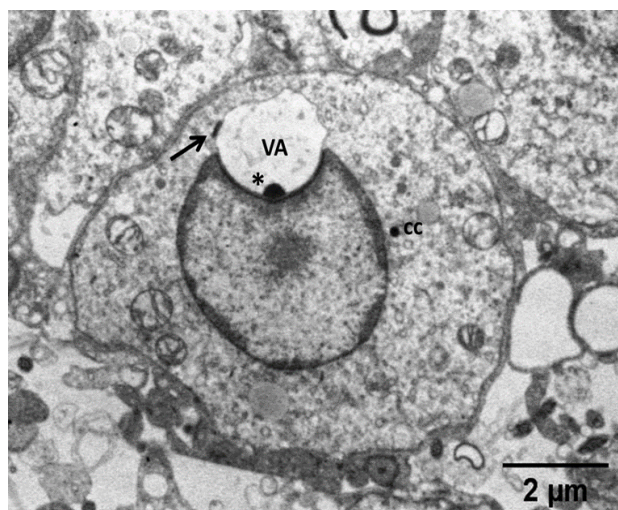
**Figure 7.** Photomicrograph to the Electronic Transmission Microscope of spermiogenesis in *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) showing an advanced spermatid. Note the microtubules of the manchete that contribute to the lengthening of the sperm head and to the chromatin compaction. N = Nucleus



También se forma la cola en que el axonema recorre toda su longitud (Fig. 9). El axonema o filamento axial presenta el patrón típico (9+2) de dobletes de microtúbulos y con estos se asocian estructuras similares a brazos de dineína. En la pieza media se observaron nueve mitocondrias, fibras densas, así como cuerpos intermitocondriales (Fig. 10).

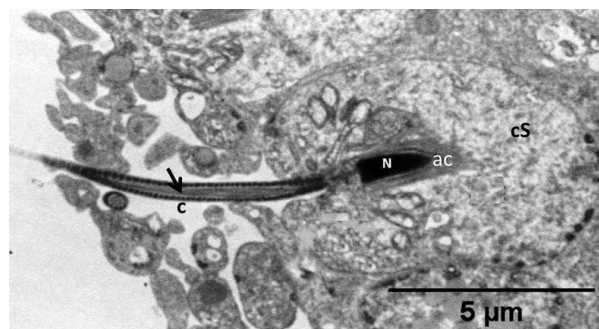
En la espermiogénesis avanzada que se observa sobre el citoplasma de una célula de Sertoli, se aprecian microtúbulos que forman el manchete a ambos lados del núcleo en alargamiento (Fig. 9).

El espermatozoide de *C. a. andreae* en las preparaciones histológicas tiene la cabeza muy alargada y cónica al final debido a la forma del acrosoma (Fig. 11).



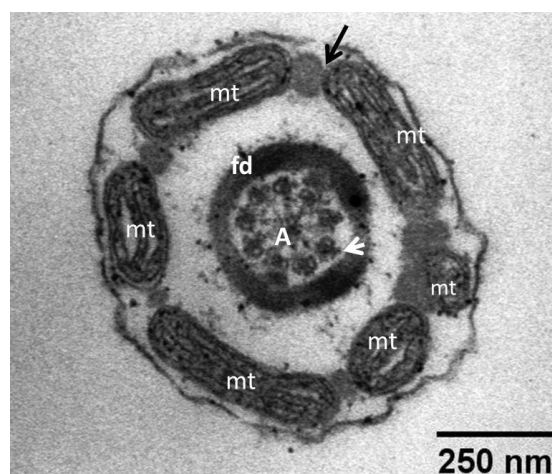
**Figura 8.** Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) de la formación del acrosoma durante la espermiogénesis en *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). VA=vesícula acrosómica. Cc= Cuerpo cromatoide. El asterisco señala el gránulo acrosómico. La flecha señala el aparato de Golgi.

**Figure 8.** Photomicrograph to the Transmission Electron Microscope (TEM) of the acrosome formation during spermiogenesis in *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). VA = acrosome vesicle. Cc = Chromatoid body. The asterisk indicates the acrosomal granule. The arrow points to the Golgi apparatus.



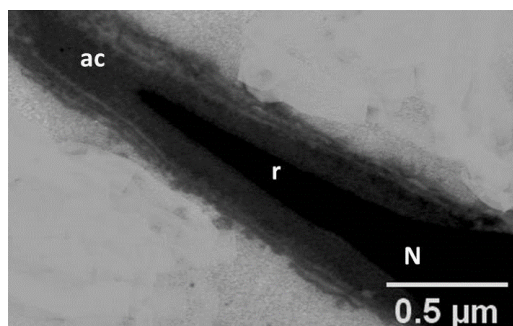
**Figura 9.** Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) de otro momento avanzado de la espermiogénesis sobre el citoplasma de una célula de Sertoli en *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) N= núcleo. C=cola. ac= Acrosoma. cS= citoplasma de Sertoli. La flecha indica al Axonema o Filamento Axial que recorre la cola.

**Figure 9** Photomicrograph to the Electronic Transmission Microscope (TEM) of another advanced moment of spermiogenesis on the cytoplasm of a Sertoli cell in *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) N = Nucleus. C = tail. ac = Acrosome. cS = cytoplasm of Sertoli. The arrow indicates the Axonema or Axial Filament running along the tail.



**Figura 10.** Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión donde se observa un corte transversal de la pieza media de la cola del espermatozoide de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) C. a. andreae. Mt= Mitocondrias. A= Axonema (se aprecia el patrón microtubular 9+2). fd= Fibras densas. La punta de flecha blanca señala un brazo de dineína. La flecha negra señala uno de los cuerpos intermitocondriales.

**Figure 10.** Photomicrograph to the Transmission Electron Microscope showing a cross section of the middle part of the sperm tail of *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). Mt = Mitochondria. A = Axonema (the microtubular pattern 9 + 2 can be seen). fd = dense fibers. The white arrowhead points a dynein arm. The black arrow points one of the inter-mitochondrial bodies.



**Figura 11.** Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión donde se muestra la parte anterior de un espermatozoide de *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae). N= núcleo. r= Rostrum. ac= acrosoma.

**Figure 11.** Photomicrograph to the Transmission Electron Microscope showing the anterior part of a sperm of *Caraiba andreae andreae* (Squamata: Dipsadidae) N=Nucleus. r=Rostrum. ac = acrosome.

## DISCUSIÓN

Los testículos examinados de todos los machos de *Caraiba andreae andreae* se encontraban en espermatogénesis, acorde a la época en la cual fueron obtenidos, que coincide con el verano en Cuba o época de lluvias.

La espermatogénesis es un proceso complejo en el cual las células progenitoras se multiplican por mitosis, después sufren meiosis y entonces se diferencian en una de las pocas células móviles del cuerpo de los vertebrados: los espermatozoides. En la serpiente objeto de estudio, se observaron los principales cambios morfológicos de la espermatogénesis. Entre estos encuentran cambios nucleares durante la mitosis y la meiosis, formación del gránulo y vesícula acrosómicas, condensación de la cromatina del núcleo y alargamiento de este en las espermátidas (Konvalina *et al.*, 2018).

La ultraestructura de las espermatogonias A y B, halladas en los túbulos espermatogénicos de *C. a. andreae* es parecida a la que se informa para la serpiente *Seminatrix pygaea* (Gribbins *et al.*, 2005). La espermatogonia A parece en reposo como parte de la población que garantiza la sucesión de la espermatogénesis. La espermatogonia B en reptiles parece ser similar en función y morfología a aquellas descritas en mamíferos (Gilbert, 2015). Estas espermatogonias son conocidas como proliferativas y en reptiles proveen el poder mitótico al túbulo seminífero. Tienen más heterocromatina y un nucléolo, son células activas (Gribbins *et al.*, 2011).

Los espermatoцитos primarios trascurren por las etapas de la profase I de la meiosis y esto se refleja en su morfología. Las características de ellos en paquitenio y diploteno, etapa en la cual es frecuente encontrarlos, no difieren de las descritas para otros reptiles (Gribbins, 2011). Los espermatoцитos secundarios según las investigaciones de Gribbins *et al.* (2008, 2011) son difíciles de encontrar durante la espermatogénesis de reptiles. En el presente trabajo los espermatoцитos secundarios se encontraron en metafase, no obstante no se halló en su citoplasma el nuage o cuerpo cromatoide que sí se encontró para *C. a. andreae* en las espermátidas. El cuerpo cromatoide parece ser un gránulo germinal de función importante en el establecimiento de la línea germinal pero aún queda mucho por dilucidar sobre sus características y función (Oliver *et al.*, 2011).

Las espermátidas haploides sufren una extraordinaria transformación durante la espermiogénesis. El núcleo se condensa y alarga y el manchete de microtúbulos esculpe la forma del núcleo y la cabeza de una manera especie-específica (Gilbert, 2015). El montaje del componente central del flagelo del espermato, conocido como axonema, comienza temprano en la espermiogénesis, finalmente se produce la espermiación, cuando ya los espermatozoides se alinean a lo largo del borde luminal, desprenden su citoplasma residual y son finalmente liberados en el lumen desde el citoplasma de las células de Sertoli. Durante la espermiogénesis la formación de la vesícula acrosómica y el acrosoma en general es clara y bien definida en *C. a. andreae* y según (Gribbins *et al.*, 2010; Gribbins, 2011 y Konvalina *et al.*, 2018), la progresión del desarrollo del acrosoma en los *taxa* de reptiles muestra similitudes en su morfología.

Los reptiles tienen una permanente población de células de Sertoli y una más estable barrera hemato-testicular que los anamniotas (Gribbins, 2011). Las células de Sertoli están presentes asociadas a un continuo suplemento de espermatogonias, y a las células espermatógenas en desarrollo como se describe en el presente trabajo. Hay pocos estudios que brinden información sobre la ultraestructura de las células de Sertoli en reptiles del orden Squamata y en Ophidia en particular. Existe una investigación a modo de compendio y muy detallada (França *et al.*, 2016) la cual describe detalles de su morfología a nivel ultraestructural e incluso informan e ilustran sobre los complejos de unión entre ellas.

La estructura y ultraestructura del espermatozoide de *C. a. andrae* es en general similar a la de otras serpientes (Oliver *et al.*, 1996; Gribbins y Rheubert, 2011). Los cuerpos intermitocondriales hallados en la pieza media pudieran ser derivados de los cuerpos densos intramitocondriales presentes en otros reptiles (Al-Dokhi *et al.*, 2007 y Gribbins *et al.*, 2008). No se observaron otros detalles de la ultraestructura en la cabeza del espermatozoide como la zona epinuclear y el perforatorio, descritos por Gribbins *et al.* (2010) y Gribbins (2011).

En el presente estudio se encontraron gotas de grasa, en las células espermatógenas en sus diferentes etapas (desde espermatogonias). Se conoce que en el epitelio seminífero de algunas especies de serpientes pueden ser frecuentes pequeñas gotas de lípidos durante la espermatogénesis, incluso en las células de Sertoli. Además, el periodo de quiescencia hay una rápida acumulación de lípidos ricos en colesterol el cual parece ser utilizado en el proceso espermatogénico (Elich *et al.*, 1994, Konvalina *et al.*, 2018). Sin embargo, no hay criterios concluyentes de su presencia y función.

Actualmente se argumenta que la espermatogénesis de reptiles, como siempre tiene una fase de reposo durante la recrudescencia, no es exactamente radial, sino una especie de transición entre la cística de los anfibios y la realmente radial del resto de los amniotas endotermos, aves y mamíferos activos todo el año (Gribbins, 2011 y Gribbins y Rheubert, 2011).

El análisis de la morfología espermática, especialmente cuando incluye datos de ultraestructura, es necesario para la comprensión de los ciclos reproductivos de muchas especies de serpientes, sin embargo, existen pocos estudios de espermatogénesis en ofidios. Además, la ultraestructura de todos los estadios de la espermatogénesis no se ha explorado bien en toda la Clase Reptilia (Gribbins, 2011).

Por otra parte, los resultados de este trabajo se hallaron en el verano. Es necesario establecer si existe ciclo reproductivo de esta y otros ofidios de Cuba, como ya se ha determinado en especies similares de otras latitudes (Quintela *et al.*, 2017).

Las serpientes tienen numerosas características que las distinguen de otros amniotas y una rica historia de la evolución del genoma que todavía no se conoce (Hao y Zhang, 2018). En este sentido, los resultados del presente estudio pueden ser beneficiosos para la

deducción filogenética debido a que la ultraestructura del gameto se considera una fuente importante de matrices de caracteres no tradicionales (Yin *et al.*, 2016). Las diferencias de carácter morfológico a nivel ultraestructural entre los espermatozoides pueden ser fuentes no tradicionales valiosas que, junto con las fuentes más tradicionales como el ADN mitocondrial, pueden ayudar a dilucidar las relaciones filogenéticas entre ofidios y escamosos en general, consideradas polémicas históricamente, (Gribbins *et al.*, 2016).

Se puede concluir que la espermatogénesis en *Caraiba andrae andrae* es similar a la del resto de los reptiles. El espermatozoide de esta especie exhibe una estructura general parecida a la de ofidios de otras latitudes y su ultraestructura muestra características propias y con valor taxonómico, como la presencia de cuerpos intermitocondriales y la ausencia de la zona epinuclear y el perforatorio. Otro aspecto que pudiera ser importante es la presencia, única entre los reptiles, de grasa en las células masculinas en desarrollo y en las células de Sertoli, que pudiera ser una característica común de las serpientes. La espermatogénesis difiere mucho entre las especies de reptiles, lo que justifica un estudio adicional dentro de los ofidios. Los resultados sugieren la importancia evolutiva de las variaciones en los aspectos específicos de la morfología de los espermatozoides con implicaciones filogenéticas en la correcta ubicación de los lagartos y serpientes del orden Squamata.

### Agradecimientos

A la Dirección General de Cooperación e Internalización y a la Facultad de Ciencias de la UNAM por su apoyo para la realización de esta investigación. Al Licenciado Karel Mederos Perugorría por su ayuda con el procesamiento histológico de las muestras.

### LITERATURA CITADA

- Aguilar, M., B. Coutiño y P. Salinas (1996) Manual de técnicas histológicas e histoquímicas. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 130 pp.
- Al-Dokhi, O. A., Al-Onazee, Y.Z. y Mubarak, M (2007) Fine structure of sperm of the snake *Eryx jayakari* (Squamata, Reptilia). Int. J. Zool. Res. 3 (1): 1-13.



- Elich, H., K. Masamichi, T. Michihisa, y Y. Hayashi (1994) Seasonal changes in spermatogenesis and ultrastructure of developing spermatids in the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. J. Vet. Med. Sci. 56: 835–840.
- Faghiri A., A. Shiravi, V. Hojati y H.G. Kami (2017) Observations on the Spermatogenic Cycle of the Grass Snake, *Natrix natrix* (Serpentes: Colubridae) in Northern Iran. Asian Herpetol. Res. 2(1): 55-59
- França, A., L. R. A. Hess, J. M. Dufour, M. C. Hofmann, y M. D. Griswold (2016) The Sertoli cell: one hundred years of beauty and plasticity. Andrology 4:189–212.
- Gilbert, S (2015) Developmental Biology, Sinauer Associates, 13a edición, Sunderland, Massachusetts. 984 pp
- Gibbins, K. M (2011) Reptilian spermatogenesis. A histological and ultrastructural perspective. Spermatogenesis 1(3): 250-269.
- Gibbins, K. M. y J.L. Rheubert (2011) The Ophidian Testis, Spermatogenesis, and Mature Spermatozoa. En: Reproductive Biology and Phylogeny of snakes. 183-264. CRC Press.
- Gibbins, K. M., J.L. Rheubert, M. Anzalone, D.S. Siegel, D.M. Sever (2010). The ultrastructure of spermiogenesis in the Western Cottonmouth, *Agkistrodon piscivorus*. J. Morphol. 271: 293-304.
- Gibbins, K.M., J.L. Rheubert, M. Collier y Siegel D.S (2008) Histological analysis of spermatogenesis and the germ cell development strategy within the testis of the male Western Cottonmouth Snake, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*. Ann. Anat. 190: 461-476.
- Gibbins, K.M., C.S. Happ y D.M. Sever (2005) Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). V. The temporal germ cell development strategy of the testis. Acta Zool. 86: 223–230.
- Gibbins, K. M., L. R. Freeborn y D.M. Sever (2016) Ultrastructure of spermatid development within the testis of the Yellow-Bellied Sea Snake, *Pelamis platurus* (Squamata: Elapidae). Spermatogenesis 6 (3):126-666.
- Hao, S.L y Y.P. Zhang (2018). Ultrastructure of the spermatozoon of the Chinese water snake, *Myrrophis (Enhydis) chinensis* (Reptilia: Homalopsidae), Eur. Zool. J. 85:1, 349-361.
- Henderson, R.W. y R. Powell (2009) Natural History of West Indian Reptiles and Amphibians. University Press of Florida, Gainesville. 520pp
- Konvalina, J.D., E.S. Trauth y M.V. Plummer (2018) Spermatogenesis and Testicular Cycle in Rough Greensnakes, *Opheodrys aestivus*, from Arkansas. J. Herpetol. 52(2): 185–192
- O'Shea, M (2018) The Book of Snakes: A Life-Size Guide to Six Hundred Species from around the world.) Gebundenes Buch, USA. 190 pp.
- Oliver, M., M. Da Ros, H. Korhonen y N. Kotaja (2011) Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. Reproduction 142: 195–209.
- Oliver, S. C., Jamieson, B. G. M. y Scheltinga, D. M (1996) The ultrastructure of the spermatozoa of Squamata. II. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae (Reptilia). Herpetologica 52: 216-241.
- Quintela, F. M., W. C. Marques y D. Loebmann (2017) Reproductive biology of the Green Ground Snake *Erythrolamprus poecilogyrus sublineatus* (Serpentes: Dipsadidae) in Subtropical Brazil. An. Acad. Bras. Ciênc. 89(3): 2189-2197
- Rodríguez-Schettino, L., C. A. Mancina, y V. Rivalta (2013) Reptiles of Cuba: Checklist and geographic distributions. Smithsonian Herpetological Information Service 144:1–96.
- Rodríguez-Cabrera, T., A. Arango, E. Morell, J. Torres y R. Marrero (2015) Notes on Reproduction of the Cuban Lesser Racer, *Caraiba andreae* (Squamata: Dipsadidae) Cuba. IRCF Reptiles & Amphibians 22(1):1–7
- Romero-Fernández, W. Z. Batista-Castro, M. De Lucca, A. Ruano, M. García-Barceló, M. Rivera-Cervantes, J. García-Rodríguez y S. Sánchez-Mateos. (2016) El 1, 2, 3 de la experimentación con animales en el laboratorio. Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública. 33 (2): 288-299
- Tavares-Bastos, L., G. R. Colli y S. N. Bao (2008) The evolution of sperm ultrastructure among Boidae (Serpentes). Zoomorphology 8: 62-68.
- Torres J., R. Marrero y O. J. Torres (2014) Hypermelanism in the Cuban Lesser Racer (*Caraiba andreae*: Dipsadidae) from Western Cuba. IRCF Reptiles & Amphibians 21(1):28–29
- Vázquez-Nin, G. H. y O. M. Echevarría. (2000) Introducción a la Microscopía Aplicada a las Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 179pp
- Yin, W., Zong-ji W., Qi-ye L., Jin-ming L. et al. (2016) Evolutionary trajectories of snake genes and genomes revealed by comparative analyses of five-pacer viper Nat. Com. 7: 13107.
- Zaher, H., F.G. Grazziotin, J.E. Cadle, R.W. Murphy, J.C. de Moura-Leite, y S.L. Bonatto (2009) Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and description of new taxa. Pap. Avulsos de Zool. 49(11): 115-153.