

# OSMOLARIDAD DEL ESPERMATOZOIDE DE LOS REPTILES

Fuentes-Mascorro G.<sup>1\*</sup>, Simón-Salvador P. R.<sup>1</sup>, Tamayo-Martínez H.D.<sup>1</sup>,  
Álvarez T. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia,

Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México. \*lirauabjo@gmail.com

<sup>2</sup>Herpetario Reptilium. Estado de México, México.

---

## RESUMEN

---

México es un país megadiverso, posee 8.7% de los reptiles del mundo, siendo el segundo país con mayor biodiversidad de reptiles, de las cuales 393 son serpientes, este grupo es utilizado desde la época prehispánica por diferentes culturas como recurso zoogenético, haciendo uso de partes como la carne, grasa, piel, hiel y el cascabel. Lamentablemente sus poblaciones están siendo mermadas por actividades antropogénicas lo que hace importante el realizar estudios reproductivos en este grupo. Este estudio tuvo como objetivo determinar el rango de osmolaridad del espermatozoide en ofidios, lo que permitirá mantener la viabilidad y morfología del espermatozoide, ya que al utilizar diluyentes comerciales para conservar dichos espermatozoides no han sido efectivos, al provocarles alteraciones morfológicas. Se utilizaron 4 géneros de serpientes (*Boa*, *Crotalus*, *Morelia* y *Pituophis*) de las cuales se obtuvieron eyaculados por estimulación manual, colectadas por impronta y colocados en soluciones a osmolaridades de 420, 440, 460 y 480 mOsm/L. Los espermatozoides de serpientes, presentan rangos de osmolaridad en el rango de 420 a 480 mOsm/L. La respuesta al choque osmótico, se visualiza en el hinchamiento de la membrana plasmática en la región de la cabeza, pieza media y flagelo, probablemente por la presencia de membrana redundante en estos ejemplares, en la región acrosomal no se visualizan cambios membranales en las diferentes osmolaridades, indicando una importante regionalización de los dominios membranales.

---

**Palabras clave:** Biodiversidad; Hipoosmótico; Serpiente de cascabel; Zoogenético.

---

### ABSTRACT

Mexico is a diverse country, has 8.7% of reptiles in the world, being the second highest biodiversity of reptiles, of which 393 are snakes, this group is used since pre-Hispanic times by different cultures as a genetic resource, using parts such as meat, fat, skin, gall and rattle. Unfortunately their populations are being depleted by human activities pressing are reproductive studies in this group. This study aimed to determine the range of osmolarity of sperm in snakes, which will maintain the viability and morphology of sperm, because by using commercial extenders to keep those sperm have not been enough, to maintain morphological structure. Four males *Boa*, *Crotalus*, *Morelia* and *Pituophis* was stimulated by manual method semen extraction. Semen was collected and mix solution of 420, 440, 460 and 480 mOsm/L. Sperm snake have a proper range at 420-480 mOsm / L. Plasmatic membrane the head, midpiece and flagella region respond to osmotic shock, probably by the presence of redundant membrane in these specimens, acrosomal membrane not respond to osmotic shock, showing a regionalization of membrane domains.

---

**Keywords:** Biodiversity; Hipoosmotic; Rattlesnakes; Zoogenetic.

---

### INTRODUCCIÓN

México es el país que cuenta con la mayor diversidad reptiles en América, posee 864 especies de las cuales 417 son lagartijas, 393 serpientes, 48 tortugas, 3 anfisbénidos y 3 cocodrilos (Flores-Villela & García-Vázquez, 2014). La presencia de esta diversidad ha sido utilizada por las culturas prehispánicas en su arquitectura (Bueno, 2000 y Ojeda, 2004), como parte de las creencias místicas y fundamental para la medicina tradicional (Fuentes-Mascorro, 2014). Su empleo como en este último rubro, trasciende hasta la época actual en la que se expende como remedio para padecimientos de la piel, cáncer, Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (Gómez *et al.*, 2005). La riqueza herpetofaunística de México, genera la interacción entre serpientes y humanos, las cuales terminan generalmente con la muerte de alguno de los dos organismos en el mejor de los casos y en el peor con la defunción de los dos, por lo que la producción de faboterápicos para el tratamiento de las mordeduras, requiere mantener ejemplares en cautiverio, muchos de los cuales provienen del comercio ilegal y son decomisados en México por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2014). Estos ejemplares son resguardados en los

Institutos que producen los faboterápicos y en los zoológicos, por lo que es común encontrar que el macho y la hembra de la misma especie, se encuentran a kilómetros de distancia. Con la finalidad de poder emplear técnicas de reproducción asistida en estos ejemplares se han empleado diluyentes comerciales como el Tyrode en el cual ha sido posible, mantenerlos viables hasta por seis horas (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2014). A pesar de esto se ha observado, la persistencia de choque hipoosmótico, en los espermatozoides de estos ejemplares, por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar el rango de osmolaridad del espermatozoide en ofidios

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Muestra biológica: Se emplearon machos de *Boa constrictor*, *Crotalus molossus*, *Crotalus culminatus*, *Morelia spilota* y *Pituophis deppei*, los cuales fueron manejados por el personal del herpetario, utilizando los protocolos de seguridad adecuados, el semen se extrajo empleando la técnica no invasiva descrita por (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2014).

Soluciones de trabajo: En el laboratorio se prepararon soluciones de fructosa a 420, 440, 460 y 480mOsm/L, en agua tridestilada.

Muestra experimental: en tubos eppendorf, se colocaron 200 $\mu$ L, de cada solución, con una pipeta de 5 $\mu$ L, se fueron tomando gotas para traspasar el eyaculado del portaobjetos en que se colecta al tubo eppendorf, quedando resuspendidos donde permanecieron en incubación a 28°C.

Tiempos: se considera tiempo cero al semen del portaobjetos donde se realizó la colecta, se realizó un frotis de las muestras 12, 24 y 48 horas, posteriores a su obtención.

Laminillas para evaluación: se realizaron frotis colocando 5  $\mu$ l de la tinción supravital eosina-nigrosina (Edition, 2010) y 5  $\mu$ L de la muestra a evaluar.

Evaluación choque hipoosmótico: se emplearon los criterios descritos por Jeyendran *et al.*, 1984, los frotis se observaron en un microscopio fotónico a 400 aumentos, se contaron 200 espermatozoides en al menos cinco campos, agrupándose de acuerdo con el tipo de hinchamiento que presentaron, calculándose el porcentaje para cada grupo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El semen obtenido de las serpientes por estimulación manual, se colecta por impronta debido a su viscosidad y los pequeños volúmenes que representa, se ha podido conservar a estos en diluyentes comerciales (alrededor de 300mOsm/L), por periodos de hasta seis horas, pero se ha observado que presentan hinchamiento en flagelo y cabeza (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2014), respuesta que se presenta en

espermatozoides con membrana funcional, ante un choque hipoosmótico. Ante la presencia de este fenómeno, se realizó un estudio piloto con osmolaridades de 200, 300, 400 y 500 mOsm/L, encontrando que entre 400 y 500 mOsm/L, disminuía el número de espermatozoide hinchados. Por lo que se probaron las osmolaridades de 420, 440, 460 y 480 mOsm/L.

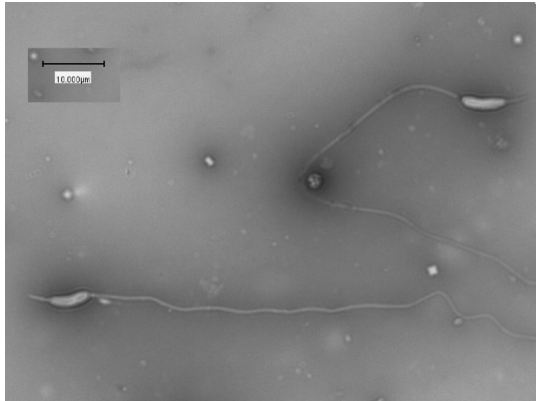
**Tabla I.** Resultados de diferentes osmolaridades en espermatozoides de *Boa constrictor*, *Crotalus culminatus*, *Crotalus molossus*, *Morelia spilota* y *Pituophis deppei* (Different osmolarities results on sperm to *Boa constrictor*, *Crotalus culminatus*, *Crotalus molossus*, *Morelia spilota* and *Pituophis deppei*)

		<i>Boa constrictor</i>				<i>Crotalus culminatus</i>				
		Osmolaridad mOsm/L				Osmolaridad mOsm/L				
		420	440	460	480	420	440	460	480	
Tiempo (horas)	(%) hinchamiento					Tiempo (horas)	(%) hinchamiento			
0	0	0	0	0	0	17	78	15	10	
12	0	12	45,5	54	12	30	9	10	10	
24	30	24	1,32	59	24	81	45	9	40	
48	0	48	10	5	48	86	2	2	5	
		<i>Crotalus molossus</i>				<i>Morelia spilota</i>				
		Osmolaridad mOsm/L				Osmolaridad mOsm/L				
		420	440	460	480	420	440	460	480	
Tiempo (horas)	(%) hinchamiento					Tiempo (horas)	(%) hinchamiento			
0	49	0	21	20	0	8	60	4	30	
12	9	12	2	0	12	9	50	1	56	
24	9	24	2	0	24	2	58	0	44	
48	0	48	0	1	48	0	51	0	42	
		<i>Pituophis deppei</i>								
		Osmolaridad mOsm/L								
		420	440	460	480					
Tiempo (horas)	(%) hinchamiento									
0	57	0	0	0						
12	53	12	0	11						
24	53	24	0	14						
48	46	48	0	13						

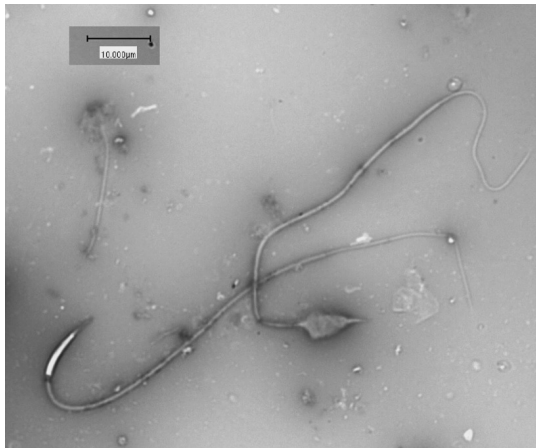
Los resultados de la tabla I, de *Boa constrictor*, indican que si el semen se emplea en fresco se deberían utilizar diluyentes entre 420 a 480 mOsm/L y para un uso de hasta doce horas lo conveniente serían soluciones de 420 a 440mOsm/L. Para *Crotalus culminatus*, el empleo de semen puede hacerse en un rango de osmolaridades de 460 a 480 mOsm/L, en periodos de tiempo desde semen en fresco hasta conservado por 48 horas, a 28°C, que es la temperatura cloacal de los reptiles del herpetario *Reptilium*, que mantiene controlado el clima. *Crotalus molossus*, presenta datos que indican un rango de osmolaridad, de 420 a 480

mOsm/L, mayor rango que el de *culminatus*, pero con periodos de 12 a 48 horas, que son más cortos. *Morelis spilota*, a 420 y 460 mOsm/L, parecen ser las osmolaridades más cercanas a las de este espermatozoide, sin embargo en la osmolaridad de 440 que es intermedia, se incrementan el porcentaje de espermatozoides con choque hipoosmótico, dificultando la interpretación de este resultado, en esta especie en particular, las muestras se tomaron hacia el final de la temporada reproductiva. Para *Pituophis deppei*, en el momento de la obtención los rango de 460 a 480 mOsm/l, se presentaron los mayores porcentajes de hinchamiento y en 460mOsm/L, se mantuvieron de 0 a 48 horas.

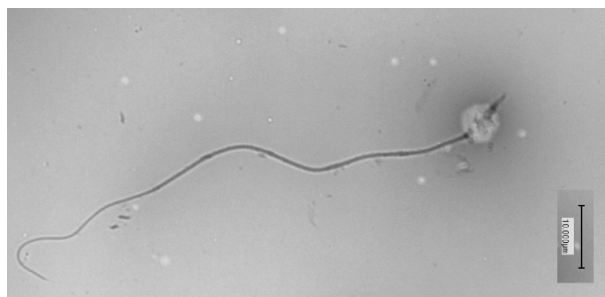
En las familias *Colubridae*, *Elapidae*, *Boide*, *Leptotyphlopidae*, *Typhlopidae* y *Anomalepididae*, se encuentra reportada la existencia de membrana redundante en la cabeza del espermatozoide, en *Viperidae* se encuentran dos excepciones a esta sinapomorfía que son *Bothrops alternatus* y *Bothrops diporus*, que no la presentan, contrastando con los *Crotalus* y *Vipera aspis* (Cunha *et al.*, 2008), que pertenecen a la misma familia (Gribbins & Rheubert, 2011), los ejemplares del presente estudios, por tanto presentan esta característica, por lo que los datos no se pueden interpretar de manera tan sencilla como en los mamíferos, en los cuales el estrés hipoosmótico se refleja en el enrollamiento del flagelo (Jeyendran *et al.*, 1984). Los porcentajes presentados en las tablas, corresponden a todos los cambios, que el choque hipoosmótico, causo en los espermatozoides de los reptiles. En la figura 1, se presentan dos espermatozoides con la forma típica del espermatozoide reptiliano (Jamieson, 1995), con un incremento en el ancho de la cabeza, que indica la respuesta a el cambio de osmolaridad, muy probablemente se presenta primero en la cabeza, por la presencia de la membrana redundante. En la figura 2 del lado izquierdo se aprecia un espermatozoide normal y el de la derecha presentan una claro incremento del ancho de la cabeza, conservándose la integridad de la membrana del acrosoma, contrastando fuertemente con el espermatozoide de los mamíferos en el que esta estructura es la primera en sufrir cambios membranales. La figura 3 muestra un espermatozoide con la cabeza totalmente distendida, que conserva la continuidad de la membrana celular en la región del núcleo y en la zona acrosomal, no presenta cambios. En la figura 4 se muestran diversas formas de enrollamiento del flagelo, que involucran a la pieza media, contrastando con los de mamíferos en los cuales solo la cola del flagelo sufre enrollamiento, en la pieza media del espermatozoide de las serpientes también se ha reportado la presencia de membrana redundante (Gribbins & Rheubert, 2011).



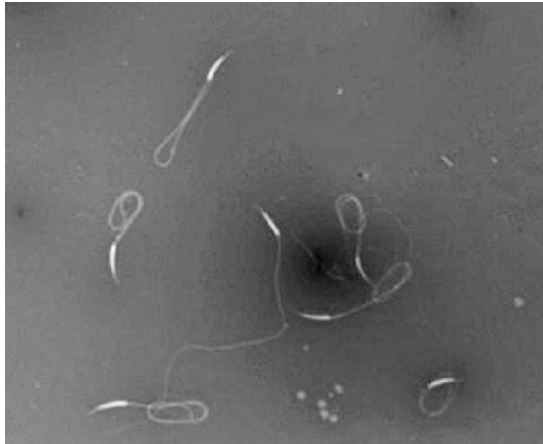
**Figura 1.** Espermatozoides de *Crotalus* 1000 X, la barra indica 10 μm. (*Crotalus spermatozoa at 1000X, bar indicator 10 μm*).



**Figura 2.** Espermatozoides de *Crotalus* a 1000X. La barra indica 10 μm. (*Crotalus spermatozoa at 1000X, bar indicator 10 μm*)



**Figura 3.** Espermatozoide de *Crotalus* 1000X. La barra indica 10 μm. (*Crotalus spermatozoa at 1000X, bar indicator 10 μm*)



**Figura 4.** Espermatozoides de *Crotalus* 400X. (*Crotalus spermatozoa at 400X*).

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el semen obtenido de las serpientes, presenta heterogeneidad espermática, que podría explicar la elevación y disminución de los porcentajes de hinchamiento a pesar de que las osmolaridades son ascendentes. La respuesta de los espermatozoide de serpientes a el choque hipoosmótico, incluye enrollamiento de pieza media y flagelo e hinchamiento de cabeza y pieza media, muy probablemente debidos a la presencia de la membrana redundante en estos ejemplares. La membrana celular de la región acrosomal, se mantiene sin presentar cambios, en todas las osmolaridades evaluadas. Las respuestas observadas indican una regionalización altamente especializada de la membrana celular del espermatozoide.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la invaluable colaboración del personal del Herpetario Reptilium, por el manejo y contención de los ejemplares.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almeida-Santos S.M., Laporta-Ferreira I.L., Antoniazzi M.M. & Jared C. 2004. Sperm Storage in Males of the Snake *Crotalus Durissus Terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in Southeastern Brazil. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 139(2):169–74. Retrieved January 13, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643304002375>).
- Amorim E.M., Torres C., Graham J.K., Amorim L.S. & Santos L.V.L. 2009. The Hypoosmotic Swelling Test in Fresh Rabbit Spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 111(2-4):338–43.

- Bueno S. 2000. La geometría como categoría analítica en el arte . Recuperado Enero 1, 2014.(Disponible en <http://201.147.150.252:8080/jspui/bitstream/123456789/1135/1/LaGeometr%C3%ADa-Como-categor%C3%ADaanal%C3%ADtica-en-el-Arte.pdf>).
- Cunha L. D., Tavares-Bastos L & Bão S.N. 2008. Ultrastructural Description and Cytochemical Study of the Spermatozoon of *Crotallus Durissus* (Squamata, Serpentes). *Micron* (Oxford, England : 1993) 39(7):915–25. Retrieved January 13, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432807001965>).
- Edition, Fifth. 2010. Examination and Processing of Human Semen. World Health Edition, F(10):286. Retrieved ([http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf)).
- Flores-Villela O., García-Vázquez U.O. 2014. Biodiversidad de Reptiles En México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85 (SUPPL.): 467–75.
- Fuentes-Mascorro G. 2014. La serpiente de cascabel como recurso zoogenético. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 4,303-304.
- Fuentes-Mascorro G., Alvarez T.A., Bautista M., Giron D. & Ramirez L.M. 2014. Diluciones como método de conservación de semen del género *Crotalus*. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 4,97-99.
- Gomez A.G., Reyes G.S.R., Tehutli G.G. & Valadez A.R. 2005. La medicina tradicional prehispánica, vertebrados terrestres y productos medicinales de tres mercados del Valle de México. *Etnobiología* 5,86-98.
- Gribbins K. M. & Rheubert J. M. 2011. The ophidian testis, spermatogenesis, and mature spermatozoa. . In: R. D. Aldridge & D. M. Sever. *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*. Science Publishers. Pp. 183-264.
- Jamieson B.G.M. 1995. The ultrastructure of spermatozoa of the Squamata (Reptilia) with phylogenetic considerations. 359-383. In B. G. M. Jamieson, J. Ausio and J.-L. Justin (eds), *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle
- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G. & Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journals of Reproduction Fertility*. 70,219-228.
- Ojeda U., 2004. Las serpientes en la religión:cristianismo y culturas prehispánicas. Recuperado Febrero 8, 2014 (Disponible en <http://www.biologia-en-internet.com/uriojeda/>).