

XXVII JORNADAS DE JOVENS PESQUISADORES

**A ciência e a tecnologia na produção
de inovação e transformação social**

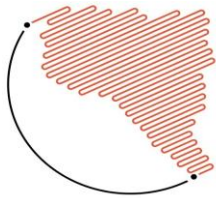
23 A 25 DE OUTUBRO DE 2019

UFSCar | Brasil | 2019

ISBN: 978-85-94099-11-2



**Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO**



24. Medio Ambiente

Espermatogénesis extragonadal en *Philodryas patagoniensis* (Serpentes, Colubridae).

Nuevas estrategias reproductivas particulares del macho

Autor: Aguirre, Fernando David; e.mail david_aguirre89@yahoo.com.ar

Co-autor(es): Marangoni, Federico; e-mail fedemarangoni@gmail.com; Olea, Gabriela;

e.mail gbolea@gmail.com; Ortiz, Martín; e-mail maortiz143@gmail.com.

Orientador: Lombardo, Daniel; e.mail: dmlombard@fvet.uba.ar

Departamento de Biología / Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Universidad Nacional del Nordeste

Resumen

En reptiles, y otros amniotas, el testículo contiene túbulos seminíferos internamente tapizados por un epitelio constituido por células de Sertoli y germinales involucradas en la espermatogénesis. Todos los cambios en las células germinales durante este proceso ocurren en dicho epitelio y son muy conservados entre los vertebrados. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren la existencia de agrupaciones celulares extragonadales con potencial espermiogénico en tres especies de culebras asiáticas. Estas estructuras, denominadas esférulas seminíferas, se hallaron en el conducto deferente y están constituidas por espermátidas con capacidad para diferenciarse a espermatozoides. En este trabajo se describe la actividad espermatogénica de *Philodryas patagoniensis* que habita la provincia de Corrientes, Argentina (27°47'52"S, 58°45'40"O, 65 msnm). Las muestras se procesaron según la técnica histológica de rutina para hematoxilina y eosina, e inmunohistoquímica para la expresión de Oct-4, caspasa 3 activa y PCNA, con el fin de determinar el potencial funcional de las células. *Philodryas patagoniensis* presentó un ciclo espermatogénico continuo, con almacenamiento de esperma en el conducto deferente. Asimismo, se registraron espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas, además de espermatozoides, en epidídimo y conducto deferente, pudiendo presentarse aislados y/o agrupados constituyendo esférulas seminíferas. La inmunomarcación positiva de Oct-4, caspasa 3 activa y PCNA confirmó la naturaleza germinal y el potencial espermatogénico de esas células. Se presentan aquí las primeras evidencias de actividad espermatogénica extragonadal completa en una especie de vertebrado.

Palavras chave: espermatogénesis, culebras, *Philodryas*

Introducción

Diversos factores pueden influir en el desarrollo de las estrategias reproductivas de los reptiles escamados, como las condiciones ambientales locales, la filogenia, el modo de alimentación, el tamaño corporal y la forma del cuerpo, según la selección del hábitat (revisado en Vitt, 1992, Shine, 2003). Las serpientes se encuentran entre los reptiles más exitosos, como lo demuestra su distribución y ocupación generalizada de una amplia gama de latitudes, altitudes y hábitats (Mathies, 2011). Dada la variedad de entornos que habitan y los diversos linajes evolutivos, no es sorprendente que presenten una considerable diversidad y plasticidad en sus tácticas reproductivas (Shine, 2003; Mathies, 2011).

Un problema generalizado en los estudios de biología reproductiva de las serpientes, es el análisis incompleto del estado reproductivo de los individuos, principalmente en la espermatogénesis masculina (Mathies, 2011). Está ampliamente aceptado que durante la espermatogénesis, las células germinales progresan a través de las fases espermatogénicas dentro del epitelio seminífero y los cambios que sufren en el proceso son muy conservados en los vertebrados (Gribbins, 2011). Sin embargo, Liang et al. (2011) reportaron la existencia de estructuras que se movilizan fuera del testículo, permitiendo el desarrollo de

caspasa 3 activa (Fig. 3 B y C, respectivamente) sugiere que dichas células conservan su potencial proliferativo y espermatogénico, aún fuera del epitelio seminífero.

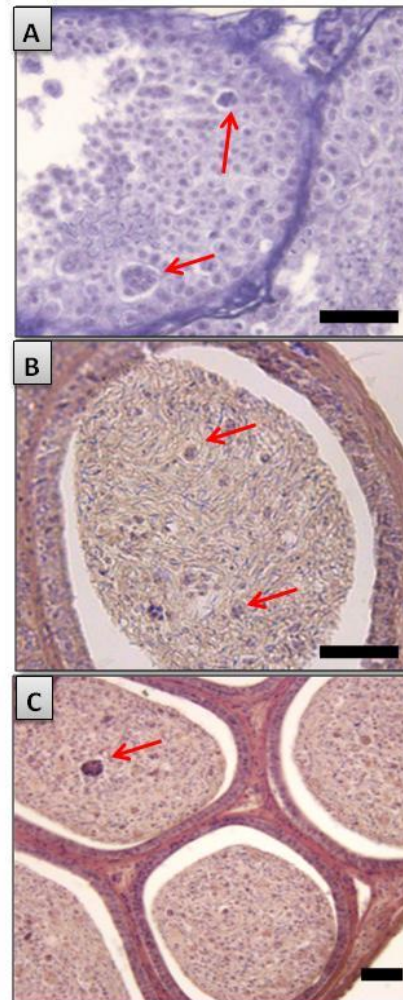


Fig. 2 – Esférulas seminíferas (flechas rojas) en *Philodryas patagoniensis*. A: testículo; B: epidídimo; C: conducto deferente. Tinción H-E. Escala de la

espermiogénesis extragonadal en tres especies de culebras de China: *Zaocys dhumnades*, *Elaphe taeniura* y *Dinodon rufozonatum* (Colubridae). Estas estructuras, denominadas “esférulas seminíferas”, consisten en agregados esferoidales de espermátidas hallados en los conductos deferentes y se determinó que sus células poseen la misma potencialidad para diferenciarse a espermatozoides que aquellas presentes en el testículo (Liang *et al.*, 2011). En un análisis preliminar de los testículos y vías espermáticas de *P. patagoniensis* se observaron estructuras similares a las descritas por Liang *et al.* (2011) (Aguirre, datos no publicados). Por lo tanto, en este trabajo se propuso estudiar las esférulas seminíferas de *P. patagoniensis* utilizando la técnica histológica convencional para una descripción general de estas estructuras, y mediante la identificación inmunohistoquímica de marcadores moleculares que permiten la tipificación celular de la línea gametogénica de manera precisa y el análisis funcional de cada tipo celular a través de marcadores de potencialidad.

Objetivos

- Describir la actividad espermatogénica de *P. patagoniensis*.
- Determinar la constitución celular de las esférulas seminíferas de *P. patagoniensis*, así como su localización en el tracto

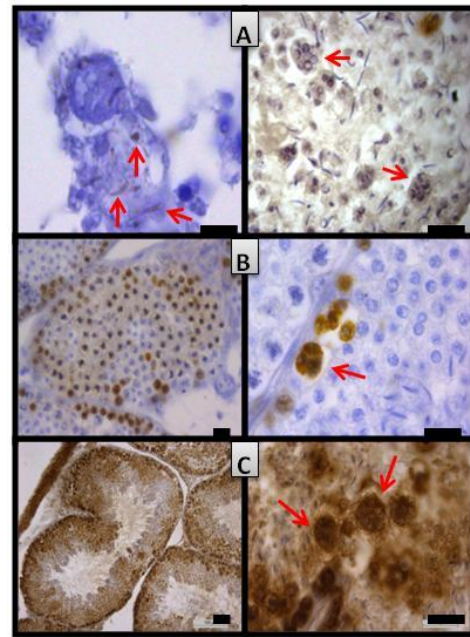
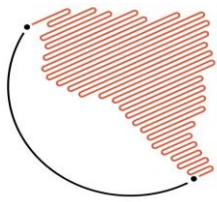


Fig. 3: Expresión de Oct-4 en las células de las esférulas seminíferas del testículo y conducto deferente de *Philodryas patagoniensis* (A). Expresión de PCNA (B) y caspasa 3 activa (C) en las esférulas del testículo. Escala de la barra: 20 μ m.

Mientras que, en otras especies de serpientes, las esférulas seminíferas se habían registrado sólo en el conducto deferente y sólo formadas por espermátidas (Liang *et al.*, 2011), en *P. patagoniensis* la presencia de estas estructuras, que contienen células germinales en diferentes fases de la espermatogénesis, y están localizadas también en los testículos, indica que las células que las componen se agrupan ya en el epitelio seminífero. Asimismo, en *P. patagoniensis* las esférulas contienen células germinales en diferentes fases de la espermatogénesis. La ocurrencia de estas esférulas seminíferas podría estar vinculada a la competencia



reproductivo masculino.

- Avaliar a atividade espermatogénica de
las esferulas seminíferas.

Materiais y Métodos

Se analizaron 22 machos de *P. patagoniensis* colectados durante las cuatro estaciones en la localidad de Empedrado (Corrientes, Argentina; 27°47'52"S, 58°45'40"O, 65 msnm), en el periodo enero 2014 – enero 2016. El sistema reproductor fue procesado según el protocolo histológico convencional para tinción con hematoxilina y eosina a fin de determinar el ciclo testicular.

Para describir la actividad espermatogénica se consideraron los estadios propuestos por Mayhew y Wright (1970) con modificaciones: (1) sólo espermatogonias, (2) espermatocitos primarios y/o secundarios, (3) espermátidas en distintos grados de diferenciación, (4) espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos y (5) regresión inicial con restos celulares y escasos espermatozoides en el lumen tubular.

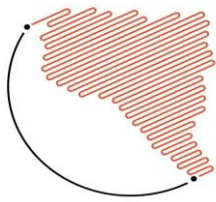
Para el estudio de la actividad espermatogénica, a través de técnicas inmunohistoquímicas, se reveló la expresión de la proteína Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4) que confirma la naturaleza germinal de las células y de la caspasa 3 activa y PCNA (proliferating cell nuclear antigen) que determinan su potencial proliferativo y espermatogénico.

intrasexual entre machos, es decir, a la necesidad de contar con una mayor producción de espermatozoides para fecundar a un mayor número de hembras (Liang *et al.*, 2011). Otra hipótesis es que dichas esferulas constituyen una estrategia reproductiva particular que permitiría a los machos culminar la espermatogénesis en el conducto deferente, mientras los túbulos seminíferos se encuentran en regresión parcial, extendiendo así el tiempo de producción espermática y, consecuentemente, el período de cópula. En definitiva, estas adaptaciones incrementarían la tasa de éxito reproductivo, constituyendo una estrategia valiosa para estas serpientes durante su historia evolutiva (Liang *et al.*, 2011).

Además de presentarse el primer registro de actividad espermatogénica extragonal en una especie de vertebrado, en este trabajo se enfatiza la importancia del enfoque microscópico en los estudios de los ciclos reproductivos y de la incorporación de técnicas inmunohistoquímicas para la determinación de los tipos celulares y su potencial funcional.

Conclusiones

- *Philodryas patagoniensis* presenta un ciclo espermatogénico continuo con



Resultados y Discusión

Los análisis histológicos indican que todos los machos estudiados fueron adultos. La longitud hocico-cloaca (LHC) varió entre 420 y 840 mm (media= 595.72 ± 90.18 mm). Hubo relación positiva entre el volumen testicular y la LHC ($R^2 = 0.38$, $F_{1,20} = 12.21$, $p = 0.002$, $n = 22$). No hubo relación entre el volumen testicular ajustado y los estadios espermatogénicos ($R^2 = 0.03$, $F_{1,20} = 0.53$, $p = 0.473$, $n = 22$). Esto evidencia la importancia de la aplicación de técnicas histológicas para la descripción de la actividad espermatogénica, ya que, como se ha demostrado, la determinación de la actividad reproductiva masculina basada en la variación del peso y/o volumen testicular puede llevar a conclusiones erróneas (Hernández-Gallegos *et al.*, 2002).

No se encontraron estadios I, II o regresión testicular total. Todas las muestras analizadas mostraron uno de sólo tres estadios espermatogénicos. Los machos con espermátidas en el epitelio seminífero (estadio 3, $n = 7$) se observaron en febrero, julio, noviembre y diciembre (verano, invierno y primavera). Los ejemplares con espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos (estadio 4, $n = 12$) se registraron en febrero, marzo, mayo, julio, agosto, octubre y noviembre (en todas las estaciones), y machos con regresión testicular inicial (estadio 5, $n = 3$) se encontraron en enero y marzo (verano y

almacenamiento de esperma en los conductos deferentes.

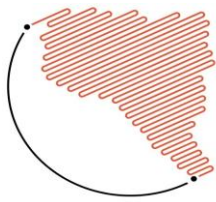
- Las esférulas seminíferas de *P. patagoniensis* se encuentran en todo el tracto reproductivo masculino (testículos, epidídimos y conductos deferentes) y están constituidas por células de la línea germinal en diferentes fases de La espermatogénesis.

- Las células germinales, diferentes a espermatozoides, halladas en los conductos espermáticos están involucradas en todo el proceso espermatogénico, siendo éste el primer registro de espermatogénesis extragonadal en una especie de vertebrado.

- Brindamos evidencia que soportan la importancia del uso de técnicas específicas, como la histológica e inmunohistoquímica, en los estudios de biología reproductiva.

Referencias Bibliográficas

- Gribbins, K. M. (2011). Reptilian spermatogenesis: A histological and ultrastructural perspective. *Spermatogenesis*, 1, 250-69.
- Liang, G., Liu, Q-Q., Yu, H-H., & Wang, Q-X. (2011). Histological and immunocytochemical study of deferens ducts in the Chinese rat snake (*Zaocys dhumnades*). *Zoological Research*, 32(6),



comienzos de otoño). No se reconoció regresión testicular completa en ningún macho y todos presentaron los conductos deferentes cargados de esperma. Por lo tanto, el ciclo reproductivo masculino en esta población de *Philodryas patagoniensis* es continuo y asíncrono entre individuos, con almacenamiento de esperma durante todo el año, pero sin un reposo completo de los testículos. La regresión testicular total se describió a fines del otoño (mayo) en una población de *P. patagoniensis* del sureste de Brasil (Loebens *et al.*, 2016). En esta población brasileña, los machos mostraron una reproducción discontinua a nivel individual, pero a nivel poblacional, el ciclo reproductivo es estacional y semisincrónico, con la mayoría de los individuos mostrando un pico reproductivo en primavera-verano (octubre-marzo; Loebens *et al.*, 2016). Según Mathies (2011), la mayoría de las especies de serpientes exhiben una reproducción estacional, y las pocas especies que parecen exhibir una reproducción continua, sin excepción, están todas confinadas a áreas tropicales y ecuatoriales. Entonces, la aparición de un ciclo continuo en machos de *P. patagoniensis* en el clima subtropical de Corrientes (Argentina) sería una excepción entre las serpientes, y es una evidencia de que esta especie tiene el potencial de modificar su patrón reproductivo en diferentes ambientes.

663–669.

- Shine, R. (2003). Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270, 995-1004.
- Mathies, T. (2011). Reproductive cycles of tropical snakes. En Aldridge, R. D., & Sever, D. M. (Eds.), *Reproductive biology and phylogeny of snakes* (pp. 511-550). Enfield, New Hampshire: Science Publishers.
- Loebens, L., Cechin, S. Z., Theis, T. F., Moura, L. B., & Almeida-Santos, S. M. (2016). Reproductive biology of *Philodryas patagoniensis* (Snakes: Dipsadidae) in south Brazil: male reproductive cycle. *Acta Zoologica*, 1, 1-11.
- Hernández-Gallegos, O., Méndez de la Cruz, F. R., Villagrán Santa Cruz, M., & Andrews, R. M. (2002). Continuous spermatogenesis in the lizard *Sceloporus bicanthalis* (Sauria: Phrynosomatidae) from high elevation habitat of Central México. *Herpetologica*, 58, 415–421.

Agradecimientos

Se agradece a Aguirre, V. y Gutiérrez, G. por su colaboración en el trabajo de campo. También a Aguirre, R. por su ayuda con la manipulación de los ejemplares en el laboratorio.

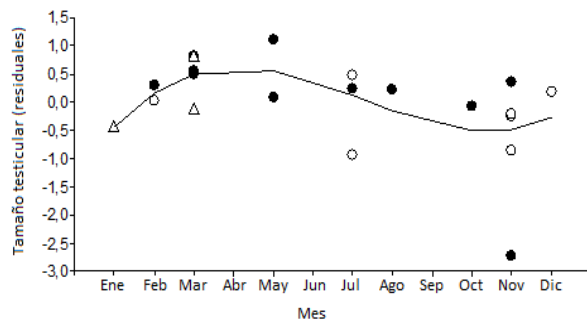
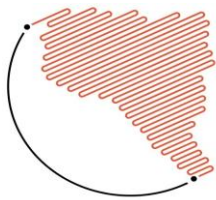


Fig. 1 – Variação mensal do volumen testicular y estadios espermatogénicos en *Philodryas patagoniensis*. Testículos en estadio espermatogénico 3 (círculos blancos), estadio 4 (círculos negros) y estadio 5 (triángulos). La línea muestra los cambios en el volumen testicular ajustado a lo largo del año, correspondiente a una ecuación polinomial de tercer orden.

La presencia de machos con diferentes estadios espermatogénicos en el epitelio seminífero, pero con espermatozoides en el conducto deferente durante todo el año, indica que existe almacenamiento de esperma, en coincidencia con la población brasileña estudiada por Loebens *et al.*, 2016. El almacenamiento de esperma en los machos o en las hembras es una parte esencial del ciclo reproductivo de muchas serpientes en las que el apareamiento y la ovulación ocurren en momentos diferentes (Shine, 2003).

El análisis histológico permitió identificar en el testículo, epidídimo y conducto deferente agrupaciones celulares o esférulas seminíferas constituidas por espermatogonias, espermatoцитos y/o espermátidas (Fig. 2 A, B y C). El revelado de la expresión de la proteína Oct-4 en esas células, confirmó su naturaleza germinal (Fig. 3 A). Además, la inmunomarcación positiva para PCNA y

Financiamiento

El presente trabajo fue financiado por el proyecto “Desarrollo gonadal y biología reproductiva de vertebrados del Nordeste de Argentina. SGCyT – UNNE (PI 16F-011, Res. N° 970/16)”, y por una beca cofinanciada entre la Universidad Nacional del Nordeste y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).