

## MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Anolis* (SAURIA: POLYCHROTIDAE) EN CUBA

Yamilka Rodríguez-Gómez y Ana Sanz-Ochotorena

Depto. de Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 No. 455, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: yami@fbio.uh.cu, anita@fbio.uh.cu

### RESUMEN

En el presente trabajo se describe la morfología de los espermatozoides de dos especies de lagartos cubanos, *Anolis sagrei* y *Anolis porcatius*, abordando también aspectos ultraestructurales. Para ello se colectaron tres ejemplares machos adultos en la provincia de Ciudad de La Habana, y se les extrajeron ambos testículos. Se realizaron preparaciones permanentes de cortes de túbulos seminíferos teñidos con hematoxilina-eosina y frotis de suspensiones de espermatozoides en solución Ringer. Un troceado de los testículos de ambas especies fue procesado para microscopía electrónica de transmisión. En los cortes de testículo se observaron los túbulos seminíferos redondeados u ovoides en sección transversal, en su interior las células sexuales se disponen desde la base al lumen, en diferentes grados de desarrollo. La cabeza de los espermatozoides es alargada. Al microscopio electrónico de transmisión se observa el acrosoma y el núcleo, los centríolos de la región del cuello, y la cola con pieza media, pieza principal y pieza final. El axonema, en su interior, presenta el patrón de microtúbulos de 9+2. Los resultados arrojaron que la morfología de los espermatozoides, en los caracteres analizados, no muestra diferencias entre las dos especies analizadas, aun a nivel ultraestructural.

**Palabras Clave:** *Anolis*, espermatozoide, morfología, túbulos seminíferos, ultraestructura.

### ABSTRACT

The present paper describes the morphology and ultrastructural aspects of the sperm of two species of Cuban lizards, *Anolis sagrei* and *Anolis porcatius*. Three adult males were collected in Havana province, and both testicles were extracted. Permanent cuts of seminiferous tubules stained with hematoxiline-eosine were made; smears of sperm from suspensions in Ringer's solution were also prepared. A cutting from the testes of both species was processed for transmission electron microscopy. Testes have seminiferous tubules which appear rounded or oval in a cross section view; the interior of the tubules contains sexual cells, in varying degrees of development, disposed from the base to the lumen. The head of the sperm is elongated. By transmission electron microscope, the acrosome and the nucleus are observed, and also the centrioles in the region of the neck, as well as the tail with its midpiece, principal piece and endpiece. The axoneme, internally, shows the 9+2 microtubule pattern. The results revealed that the morphology of sperm, in the analyzed features, shows no difference between the two species tested, even at the ultrastructural level.

**Key words:** *Anolis*, sperm, morphology, seminiferous tubules, ultrastructure.

## INTRODUCCIÓN

Los lagartos del género *Anolis* son notables por su abundancia numérica y diversidad de especies. En Cuba, este género presenta un endemismo del 94,1%<sup>1</sup> y es, además, el género de mayor diversidad morfológica entre los lagartos cubanos<sup>2</sup>.

Numerosos trabajos relacionados con la reproducción de los lagartos demuestran que su apogeo reproductivo coincide con la época de lluvia, en el verano, durante la cual encuentran más alimento y mejores sitios para ubicarse<sup>2,3</sup>.

En esta línea, se ha sugerido que un aspecto relacionado con el modo reproductivo de un grupo animal dado, era la morfología del espermatozoide<sup>4</sup>, aspecto en el cual numerosos investigadores han puesto un gran interés<sup>3,5-9</sup>. Con este fin, la espermiogénesis de un lagarto del género *Anolis* fue estudiada por primera vez en *A. carolinensis* por Clark<sup>10</sup> y la descripción de espermatozoides de algunos miembros de la familia Polychrotidae, la realizó Furieri en la década de los 70<sup>11,12</sup>.

Recientemente, la espermatogénesis y la ultraestructura del espermatozoide de los reptiles han tenido una considerable atención<sup>5,6,13,14</sup>. Por una parte, estos estudios han ampliado los conocimientos acerca de los organelos responsables de la movilidad de los espermatozoides y las adaptaciones responsables de la fertilización y activación del huevo; por otra, estos trabajos proporcionan información preliminar acerca de las transformaciones ocurridas durante la evolución de los espermatozoides, a partir de un estadio ancestral acuático hasta la condición derivada encontrada en vertebrados terrestres superiores.

Además, estudios más detallados de la ultraestructura de los espermatozoides de reptiles han brindado una fuente alternativa de caracteres para los análisis filogenéticos<sup>15</sup>.

En Cuba, existen referencias de trabajos similares realizados por Ramos en 1970<sup>16</sup>, el cual describió los espermatozoides de tres especies de reptiles cubanos, y donde incluyó a *Anolis porcatius*. Además, Rodríguez en 1994<sup>17</sup>, realizó la morfometría de los espermatozoides de seis especies de lagartos del género *Anolis*, con microscopía de campo claro. También Sanz en 1999, describió la morfología y la ultraestructura de dos especies de *Anolis* y realizó una caracterización de sus ciclos reproductivos<sup>3</sup>, atendiendo a diferentes parámetros gonadales, así como Domínguez en el 2006 describió el ciclo reproductivo de *Anolis lucius*<sup>18</sup>.

No obstante, las características morfológicas y ultraestructurales de los espermatozoides de los lagartos cubanos, uno de los grupos zoológicos más importantes del país, están apenas tratadas, por lo que en el presente trabajo nos proponemos describir la morfología de los espermatozoides de dos especies

del género *Anolis* (*A. sagrei* y *A. porcatius*), haciendo una particular referencia a su ultraestructura.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Material biológico

Se utilizaron seis ejemplares machos adultos de las especies *Anolis sagrei* y *Anolis porcatius* colectados en los meses de junio, julio y agosto, en el municipio Boyeros, provincia Ciudad de La Habana; coincidiendo con la época reproductiva informada para estas especies<sup>3</sup>.

### Procesamiento de las muestras

1. Preparaciones permanentes de cortes de testículos para microscopio de campo claro.

Se sacrificaron tres animales de cada especie en atmósfera de éter, se colocaron en una bandeja de disección con parafina y se fijaron con alfileres entomológicos. Mediante una incisión abdominal se extrajo el testículo izquierdo, se cortó en fragmentos pequeños y se fijó en líquido de Bouin. Luego se procedió al procesamiento histológico del material para microscopía de campo claro, deshidratando en etanol a concentraciones graduales e incluyendo en parafina. Posteriormente se tiñeron los cortes según la técnica de hematoxilina-eosina y se observaron utilizando el sistema Motic Images 2000, Versión 1.2 sobre Windows en una computadora Pentium IV, marca Acer. Las imágenes se capturaron con objetivo de 40X y se digitalizaron.

2. Preparaciones de espermatozoides para microscopio electrónico de transmisión.

De los animales sacrificados, se extrajo el testículo derecho de cada uno, los cuales fueron troceados en fragmentos pequeños y fijados en glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato 0.1 M a pH 7.6. Las muestras se lavaron con buffer fosfato y se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1%. Luego de varias horas se enjuagaron y se deshidrataron en etanol a concentraciones graduales hasta terminar con óxido de propileno. Se realizó la preinclusión en una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica (1:1). Por último, se incluyeron las muestras en resina epóxica y se dejaron en una estufa a 60°C hasta su polimerización. Los cortes ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB a 40 nm, como contrastantes se utilizaron el citrato de plomo y el acetato de uranilo. Posteriormente, se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2000 EX, a 80 kV.

3. Preparaciones permanentes de frotis de espermatozoides a partir de una suspensión.

Para ello se utilizaron los tres ejemplares restantes de las dos especies analizadas. En el laboratorio se anestesiaron en atmósfera de éter y se fijaron con alfileres en una placa de Petri

con parafina. Se procedió a la extracción de ambos testículos de cada animal mediante una incisión abdominal. En todos los casos se eliminaron los epidídimos y los conductos deferentes. Para realizar la suspensión se utilizó solución Ringer, preparada de la forma siguiente:

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| NaCl                           | 137mM |
| KCl                            | 4mM   |
| MgCl <sub>2</sub>              | 1.8mM |
| CaCl <sub>2</sub>              | 2mM   |
| Glucosa                        | 5mM   |
| Tris (hidroximetilaminometano) | 5mM   |
| pH 7.4 con HCl                 |       |

Se procedió a colocar un testículo, derecho o izquierdo, en 3 ml de la solución Ringer y mediante unas tijeras se cortaron en fragmentos pequeños hasta formar una suspensión.

Posteriormente, se colocaron 30 µl de la suspensión en el centro de un portaobjetos, se extendió la gota y se procedió con la técnica descrita por Gueimundi<sup>19</sup>.

Las preparaciones se procesaron utilizando el sistema Motic Images 2000, Versión 1.2 sobre Windows en una computadora Pentium IV, marca Acer. Las imágenes se capturaron con objetivo de 100X y se digitalizaron.

## RESULTADOS

### I. Descripción morfológica de los espermatozoides.

En los cortes de testículo de las especies de *Anolis* estudiadas, se observa la presencia de un gran número de túbulos seminíferos que en sección transversal se aprecian redondeados u ovoides. En el interior de esos túbulos seminíferos se encuentran las células sexuales en diferente grado de desarrollo: desde las espermatogonias, que se disponen en la base de las células de Sertoli o entre éstas y la membrana basal del túbulo seminífero; luego los espermatocitos primarios y secundarios; a continuación las espermátidas ubicadas en las criptas y depresiones de las células de Sertoli, las cuales en el borde del lumen pierden sus conexiones citoplasmáticas y se diferencian en espermatozoides, células más diferenciadas muy cercanas al lumen.

Las células resultantes de cada división meiótica se van alejando de la membrana basal y se van acercando al lumen del túbulo seminífero, en una disposición característica de reptiles, así como de aves y mamíferos, que se denomina espermatogénesis radial. Esta disposición se observa en las figuras 1 y 2 para las especies analizadas.

Al microscopio óptico los espermatozoides maduros de las dos

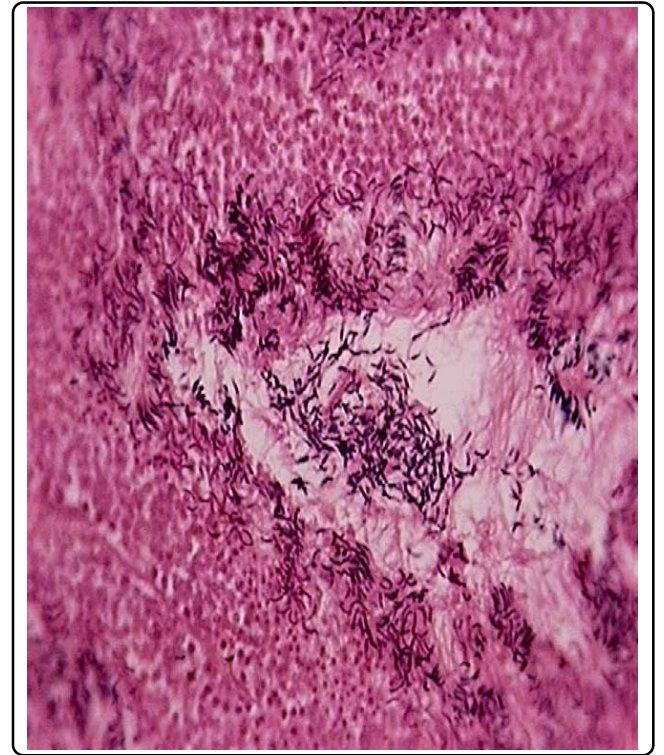


Figura 1. Corte transversal donde se muestra un túbulo seminífero en el testículo de *Anolis sagrei*. Hematoxilina-eosina (400X).

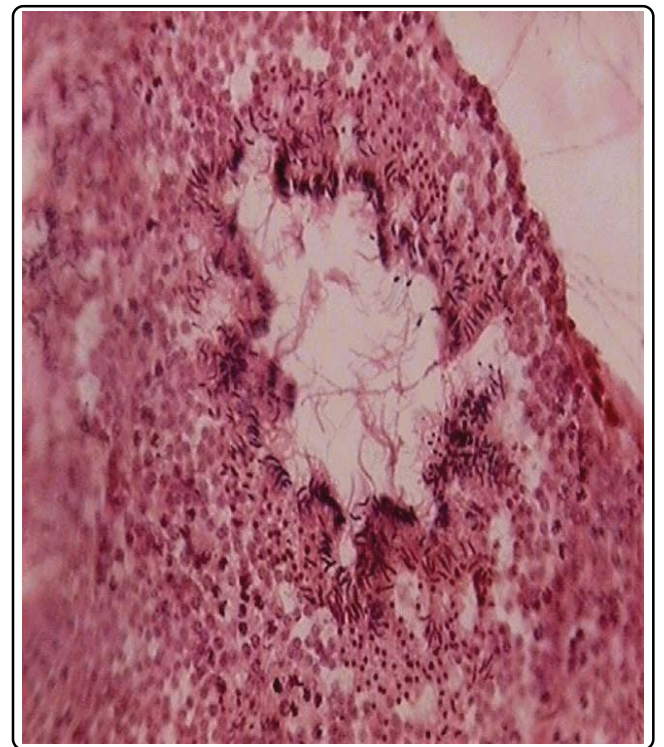


Figura 2. Corte transversal donde se muestra un túbulo seminífero en el testículo de *Anolis porcatius*. Hematoxilina-eosina (400X).



especies presentan una cabeza en forma alargada, una región estrecha que se corresponde con el cuello, después una zona engrosada donde continúa la cola, larga y fina en toda su extensión; como aparece en las figuras 3 y 4. La cola se puede observar enrollada con la de otros espermatozoides maduros, ocupando el lumen del túbulo.

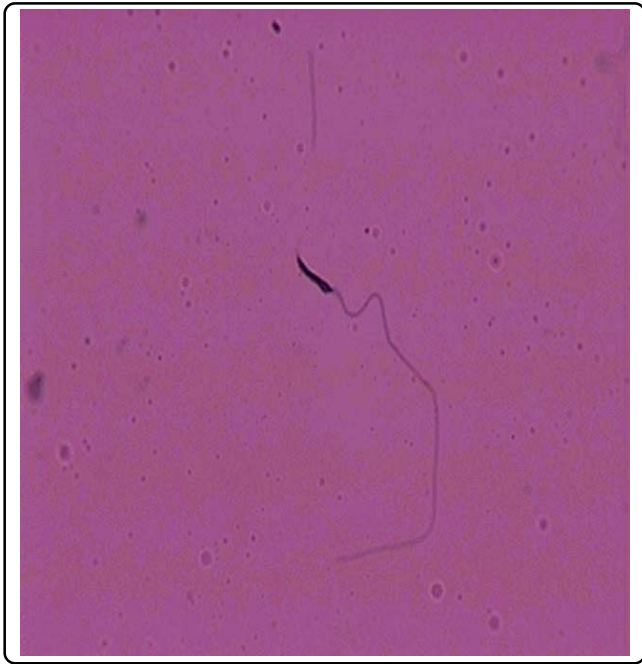


Figura 3. Espermatozoide de *Anolis sagrei* en un frotis. Tinción hematoxilina de Harris. (1000X).

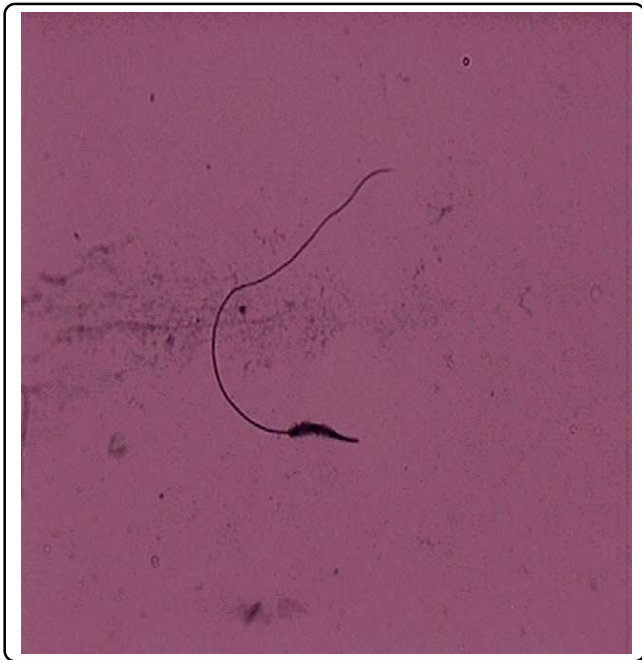


Figura 4. Espermatozoide de *Anolis porcatus* en un frotis. Hematoxilina de Harris. (1000X).

## II. Descripción de la ultraestructura de los espermatozoides.

La ultraestructura general de los espermatozoides de *A. sagrei* y *A. porcatus* es muy similar, por lo que procederemos a describirlos juntos.

Al microscopio electrónico de transmisión se observa que el espermatozoide es filiforme. En la cabeza puede observarse el acrosoma con sus membranas acrosomales externa e interna, esto se aprecia en un corte sagital, y también en un corte transversal, exteriormente se ve la membrana plasmática. El núcleo muestra la cromatina muy compactada (Figuras 5 y 6). Cerca del núcleo hay microtúbulos que alargan la cabeza del espermatozoide y ayudan a compactar la cromatina, los que reciben el nombre de manchete (Figura 7).

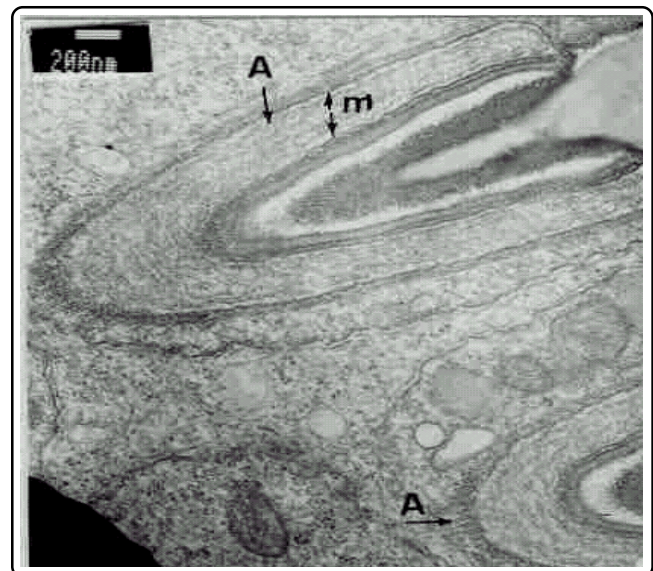


Figura 5. Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión del espermatozoide de *Anolis sagrei*. Acrosoma, en corte sagital en la parte superior y en corte transversal en la inferior. A: acrosoma, m: membrana acrosomal. Escala = 200 nm.

La región del cuello incluye los centríolos proximal y distal, y además el primero de los cuerpos densos de la pieza media. La fosa nuclear contiene la mitad anterior del centríolo proximal, el cual está compuesto por nueve tripletes cortos de microtúbulos. El centríolo distal, ubicado a continuación, ensambla el axonema, actuando como centro organizador de microtúbulos (Figura 5).

La cola es alargada y presenta pieza media, pieza principal y pieza final. La pieza media comienza con el primero de los anillos incompletos de los cuerpos densos y termina en un anulus o anillo de Hensen pequeño. El axonema se observa formado por nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central. El miembro externo de los dobletes periféricos no cierra completamente y envía prolongaciones en forma lineal hacia el

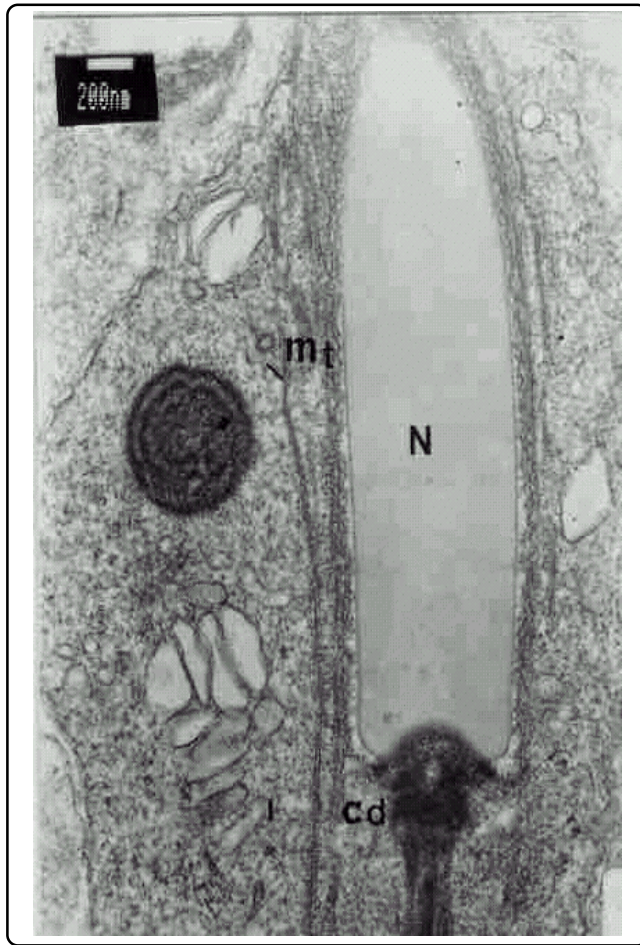


Figura 6. Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión del espermatozoide de *Anolis sagrei*. Corte de la región de la cabeza, donde se distingue el núcleo, así como la concavidad posterior o fosa nuclear con el centríolo distal. N: núcleo, mt: microtúbulos, cd: centríolo distal. Escala = 200 nm.

miembro cerrado del par adyacente. En sección transversal se observan ocho mitocondrias. Se ven también alrededor de los microtúbulos las fibras externas y, por fuera de éstas, la membrana plasmática (Figuras 7 y 8).

En la pieza principal, la vaina fibrosa continúa rodeando al axonema, observándose ausencia de mitocondrias (Figura 9).

Ya en la pieza final sólo aparece el axonema rodeado de la membrana plasmática y el patrón de microtúbulos del axonema de 9+2 se pierde (Figuras 8 y 10).

## DISCUSIÓN

### I. Descripción morfológica de los espermatozoides.

Entre las especies analizadas (*A. sagrei* y *A. porcatius*), no se observaron diferencias en cuanto a la morfología de la cabeza de los espermatozoides, siendo alargada en ambos casos. La

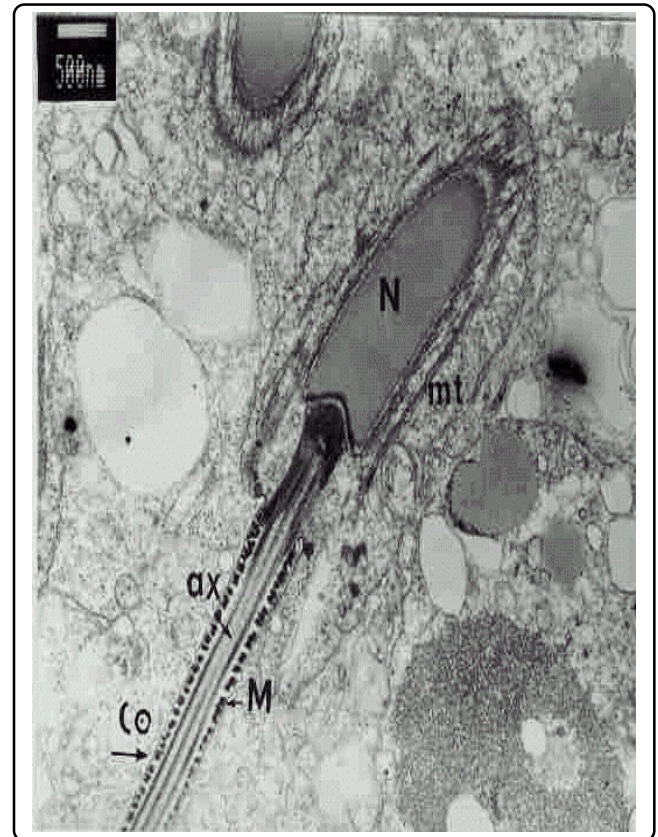


Figura 7. Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión del espermatozoide de *Anolis porcatius*. Cabeza, cuello y pieza media del espermatozoide. N: núcleo, mt: microtúbulos, Co: cola, ax: axonema, M: mitocondrias. Escala = 500 nm.

forma de la cabeza de los espermatozoides descrita en estas especies es similar a la encontrada por Rodríguez<sup>17</sup> en la descripción que realizó de los espermatozoides de seis lagartos del género *Anolis* en Cuba y también con los de Ramos<sup>16</sup> en su investigación sobre este aspecto en *A. porcatius*, *Crocodylus rhombifer* y *Pseudemys decussata*, al afirmar que estas especies presentan la cabeza de los espermatozoides “candeliforme”. No ocurre así con lo informado por Sanz<sup>3</sup>, quien observó una diferencia entre estas dos especies en cuanto a la forma de la cabeza, siendo alargada en *A. porcatius* pero cónica en *A. sagrei*.

### II. Descripción de la ultraestructura del espermatozoide.

Las características descritas en los espermatozoides de *A. sagrei* y *A. porcatius* coinciden en gran medida con los resultados informados por varios autores, al apreciar que entre especies de un mismo género no se encuentran diferencias notables en su ultraestructura, lo que no permite ninguna consideración filogenética apoyada en este aspecto.

Con respecto a la cabeza, Sanz<sup>3</sup> describe en estas especies un acrosoma con membranas acrosomales externa e interna,



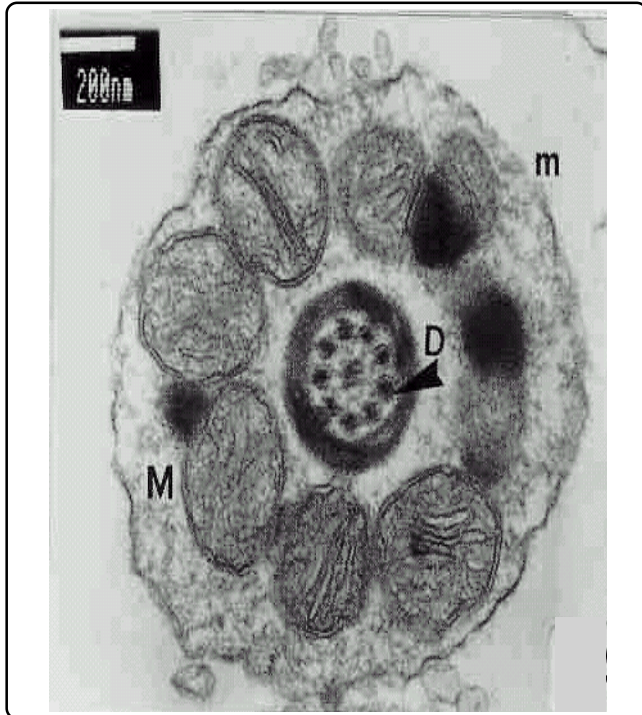


Figura 8. Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión del espermatozoide de *Anolis porcatus*. Corte transversal de la cola del espermatozoide correspondiente a la pieza media. Se observa el axonema al centro. M: mitocondrias, m: membrana, D: dobletes de microtúbulos. Escala = 200 nm.

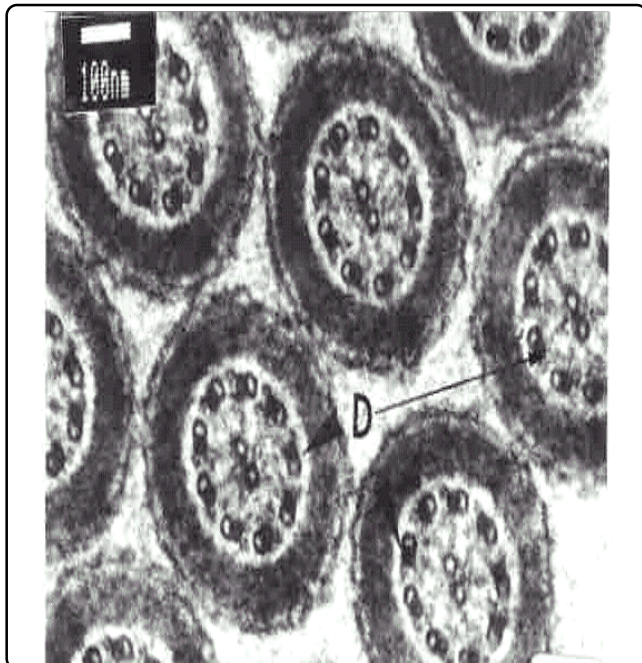


Figura 9. Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión del espermatozoide de *Anolis sagrei*. Cortes transversales de varias colas correspondientes a la pieza principal. Se observa el axonema central, la vaina fibrosa y la membrana plasmática externa. D: dobletes de microtúbulos. Escala = 100 nm.

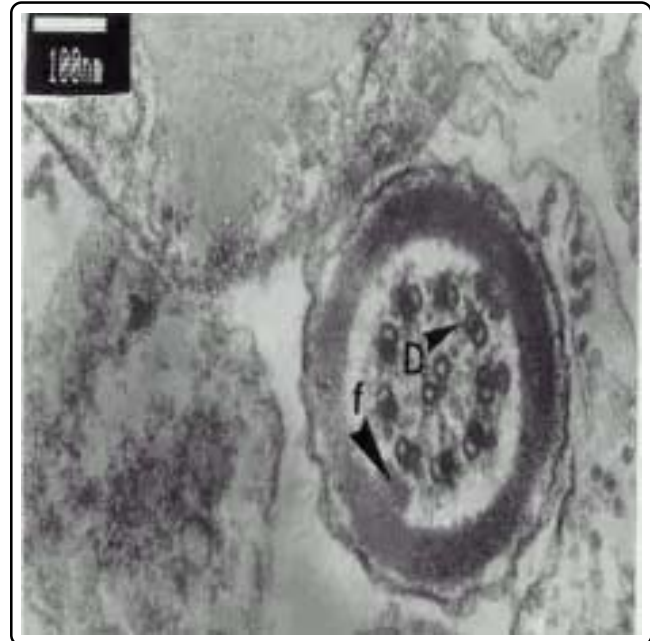


Figura 10. Fotomicrografía al Microscopio Electrónico de Transmisión del espermatozoide de *Anolis porcatus*. Corte transversal de la cola del espermatozoide correspondiente a la pieza principal. Se observa el axonema al centro. D: dobletes de microtúbulos, f: fibras. Escala = 100 nm

distinguibles. Scheltinga *et al.*<sup>9</sup> realizaron un análisis de la ultraestructura del espermatozoide en otro lagarto del mismo género, *A. carolinensis*, y describen la presencia de un perforatorio o filamento acrosómico con un extremo anterior redondeado.

Teixeira *et al.*<sup>15</sup> describen en *Polychrus acutirostris*, un lagarto perteneciente a la familia Polychrotidae, la presencia de un núcleo alargado y una cabeza curva. Furieri<sup>12</sup> reporta un acrosoma circular en sección transversal en *Pristidactylus (Cupiguanus) scapulatus*, otro lagarto de la misma familia, y sugiere que la forma del acrosoma en sección transversal puede ser variable dentro de los miembros de la familia Polychrotidae.

La estructura de la cabeza está relacionada con la forma del acrosoma, este último participa en la atracción especie-específica entre espermatozoide y ovocito, en la penetración de las membranas ovulares y en la reacción cortical, de ahí su importancia.

En cuanto a la pieza media, Scheltinga *et al.*<sup>9</sup> describen los cuerpos densos formando anillos incompletos interrumpidos por mitocondrias, observando un máximo de ocho o nueve de estas mitocondrias en sección transversal. Teixeira *et al.*<sup>15</sup> encuentran nueve mitocondrias en la pieza media dispuestas en espiral. Ambos resultados se asemejan a los obtenidos en este trabajo, donde se observa la presencia de ocho mitocondrias.

Los resultados obtenidos en esta investigación en cuanto a la ultraestructura de la pieza principal y la pieza final, coinciden con los de estos autores, así como la del axonema. Phillips<sup>20</sup> sugiere que la relación de las fibras densas y la vaina fibrosa al patrón de microtúbulos de 9+2 del axonema, puede ser una consecuencia específica de su modo de formación y/o un prerrequisito importante para la fertilización exitosa. Esto se comprueba al encontrar algunos organismos con espermatozoides que de manera excepcional muestran una desviación del patrón general de microtúbulos de "9+2" y poseen un movimiento natatorio atípico<sup>21</sup>, indicando que esta disposición de los microtúbulos es esencial para generar el movimiento estereotípico de cilios y flagelos.

### CONCLUSIONES

La morfología de los espermatozoides de las especies *Anolis sagrei* y *Anolis porcatus* no muestra diferencias, aun cuando se analizan a nivel ultraestructural.

### AGRADECIMIENTOS

A la Técnico Nilda Almaguer de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana; al Dr. Carlos Domínguez y a la Lic. Clara Melendi, del Depto. de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras" y a la Dra. Viviana Falcón, del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología; por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

### REFERENCIAS

- Rodríguez, L. Morfología, distribución geográfica y uso del microhabitat de los lagartos cubanos del género *Anolis* (Lepidosauria: Iguania). Inédito, Tesis Doctoral, La Habana (1999). 100 págs.
- Rodríguez, L. Generalidades. En: Anfibios y Reptiles de Cuba (ed. Rodríguez Schettino, L.) 2-16 (UPC Print, Vaasa, Finlandia, 2003).
- Sanz, A. Morfología de las gónadas de *Anolis sagrei* y *Anolis porcatus* (Sauria) y su relación con factores ambientales. Inédito, Tesis Doctoral, La Habana (1999). 100 págs.
- Franzén, A. Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **77**, 123-138 (1977).
- Jamieson, B.G.M. Evolution of tetrapod spermatozoa with particular reference to amniotes. In: Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy (eds. Jamieson, B.G.M., Austio, J. & Justine, J.) 343-358 (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, 1995).
- Jamieson, B.G.M. The ultrastructure of spermatozoa of the Squamata (Reptilia) with phylogenetic considerations. In: Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy (eds. Jamieson, B.G.M., Austio, J. & Justine, J.) 359-383 (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, 1995).
- Oliver, S.C., Jamieson, B.G.M. & Scheltinga, D.M. The ultrastructure of spermatozoa of Squamata. II. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae y Boidae (Reptilia). *Herpetologica* **52** (2), 216-241 (1996).
- Scheltinga, D.M., Jamieson, B.G.M., Trauth, S.E. & McAllister, C.T. Morphology of the spermatozoa of the iguanian lizards *Uta stansburiana* and *Urosaurus ornatus* (Squamata, Phrynosomatidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **32** (2), 261-271 (2000).
- Scheltinga, D.M., Jamieson, B.J.M., Espinoza, R.E. & Orrell, K.S. Descriptions of the mature spermatozoa of the lizards *Crotaphytus bicinctores*, *Gambelia wislizenii* (Crotaphytidae), and *Anolis carolinensis* (Polychrotidae) (Reptilia, Squamata, Iguania). *Journal of Morphology* **247**, 160-171 (2001).
- Clark, A.W. Some aspects of spermiogenesis in a lizard. *Am. J. Anat.* **121**, 369-400 (1967).
- Furieri, P. Sperm morphology of some reptiles: Squamata and Chelonia. In: Comparative Spermatology. (ed. Baccetti, B) 115-131 (Accademia Nazionale dei Lincei, Rome, Italy, 1970).
- Furieri, P. Sperm e spermatogenesis en alcuni iguanidi argentini. *Riv. Biol.* **67**, 233-279 (1974).
- Tavares-Bastos, L., Teixeira, R.D., Colli, G.R. & Báó, S.N. Polymorphism in the sperm ultrastructure among four species of lizards in the genus *Tupinambis* (Squamata: Teiidae). *Acta Zoologica* **83**(4), 297-307 (2002).
- Colli, G.R. *et al.* Comparative study of sperm ultrastructure of five species of teiid lizards (Teiidae, Squamata), and *Cercosaura ocellata* (Gymnophthalmidae, Squamata). *Tissue & Cell* **39**(1), 59-78 (2007).
- Teixeira, R.D., Colli, G.R. & Báó, S.N. The ultrastructure of spermatozoa of the lizard *Polychrus acutirostris* (Squamata, Polychrotidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **31**(3), 387-395 (1999).
- Ramos, M. Estudio métrico-morfológico del nemaspermo de *Crocodylus rhombifer* Cuvier. Reporte preliminar. En: Tercera Jornada Técnica Nacional CAN. La Habana (1970).
- Rodríguez, L. Descripción de los nemaspermos de seis especies cubanas del género *Anolis* (Iguania; Polychrotidae). *Cien. Biol.* **26**, 112-114 (1994).
- Domínguez, M., Sanz, A., Almaguer, N. & Chávez, J. Seasonal reproduction in males of the Cuban lizard *Anolis lucius* (Polychrotidae). *Bol. Soc. Herpetol. Mex.* **14**(1), 1-9 (2006).
- Gueimundi, J. Manual de prácticas de laboratorio de embriología (Pueblo y Educación, La Habana, 1985).
- Phillips, D.M. Ultrastructure of spermatozoa of the woolly opossum *Caluromys philander*. *J. Ultrastruct. Res.* **33**, 381-397 (1970).
- Phillips, D.M. Analysis of sperm motility. *J. Submicrosc. Cytol.* **15**, 29-35 (1983).