

Caracterización seminal de *Boa imperator* (Sauropsida: Squamata: Boidae)

Marco Antonio Meza Manriquez¹, Alejandro Ávalos Rodríguez², Gisela Fuentes Mascorro³, Jorge Antonio González Santos² & José Antonio Herrera Barragán*²

Resumen

La *Boa imperator* es conservada como animal de compañía no convencional y muchos de los ejemplares tienen su origen del tráfico ilegal, lo que pone en riesgo las poblaciones de la especie en vida libre colocándola en amenaza de extinción. La reproducción asistida en cautiverio, es utilizada en los programas de conservación de especies; sin embargo, para implementarse se requiere conocimiento de las características reproductivas de cada especie. La obtención y caracterización espermática permitirá realizar posteriores trabajos sobre el almacenamiento en fresco y refrigerado.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la morfometría espermática en *Boa imperator*. El semen se colectó de 24 ejemplares durante noviembre del 2015 a enero del 2016. Los ejemplares se mantuvieron en cautiverio, el semen fue obtenido realizando masaje cráneo-caudal del último tercio del ejemplar. Se obtuvieron 25 eyaculados con volumen promedio de 3,62 μ l, concentración espermática promedio 1.22×10^6 espermatozoides/ml y porcentaje de viabilidad del 91.04%. También se realizó la morfometría espermática, determinando longitudes promedio ($n=1000$) de 10.34 ± 0.20 μ m para la cabeza, 54.45 ± 1.56 μ m para parte media, 34.58 ± 1.47 μ m para cola con un largo total de 99.38 ± 1.62 . Con nuestros resultados se tienen las bases para posteriores trabajos de reproducción asistida como conservación *in vitro* de espermatozoides y la inseminación artificial en la especie *Boa imperator*, lo cual ofrecería alternativas para su conservación y uso sustentable.

Palabras clave: Conservación, espermatozoide, morfometría, reproducción.

Abstract

The *Boa imperator*, is a highly popular pet and many of them come from the illegal traffic, which jeopardizes the population in wildlife of these snakes and is even considered an endangered species. Assisted reproduction in captivity is used in conservation programs but in order to use these techniques, is required to know about the reproductive characteristics of each species. Obtaining and characterizing the sperm of these boas, allow further studies about appropriate storage and artificial insemination in different species. The main goal of this work was performed semen collection, evaluation and morphometric characterization seminal sperm of the specie *Boa imperator*. Semen was collected from 24 individuals kept in captivity during November 2015 to January 2016; it was obtained by massaging the last third of each individual, obtaining 25 samples of semen with an average volume of 3,62 μ l, and an average spermatic concentration of 1.22×10^6 sperm/ml and an average viability of 91.04%. The sperm morphometry data obtained showed an average total length of 99.38 ± 1.62 , for the head 10.34 ± 0.20 μ m, 54.45 ± 1.56 for the middle part and, 34.58 ± 1.47 μ m for the tail. Results, can set the foundation for further studies in the field of assisted reproduction and *in vitro* conservation of sperms of *Boa imperator*, which can help in the conservation of these specimens of the wildlife.

Key words: Conservation, sperm, boa, morphometry, reproduction.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Ciudad de México, México. CP. 0496.

¹Maestría en Ciencia Agropecuarias,

²Departamento de producción Agrícola y Animal

³Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México.

*Autor de correspondencia: jherrera@correo.xoc.uam.mx

Introducción

México ocupa el segundo lugar en número de especies de reptiles, contando con 864 de las cuales 417 son lagartos, 393 serpientes, 48 tortugas, 3 cocodrilos y 3 anfisbénidos, que en conjunto conforman el 8.7% de las especies de reptiles del mundo (Flores & García 2014). Esta diversidad se ve amenazada por modificaciones del ambiente, actividades agropecuarias y la urbanización (Collins & Sturfer 2003; García 2006; Gardner *et al.* 2007), combinados con la falta de educación ambiental referida a la conservación además de que la depredación de especies con fines extractivos, causas que deterioran las poblaciones de las especies animales (Alvarez-Buylla 2008; SEMARNAT 2010).

La *Boa imperator* en México es una de las más traficadas, con exportaciones en el año 2012 de 3.4 millones de serpientes con costo de 20 mil pesos por ejemplar (SEMARNAT 2012). Lo anterior evidencia el impacto que puede tener su reproducción en cautiverio, logrando evitar la extracción de ejemplares silvestres y llevando a cabo un uso sustentable mediante la reproducción en cautiverio. Gran parte de la conservación de especies se lleva a cabo en condiciones de cautiverio (Mengden *et al.* 1980; Alberts *et al.* 1998; Gibbons *et al.* 2000; Tourmente *et al.* 2007) con técnicas de reproducción asistida (Mengden *et al.* 1980; Platz *et al.* 1980; Quinn *et al.* 1989; Langlada *et al.* 1994; Fahrig *et al.* 2007; Mattson *et al.* 2007) como la obtención de semen, inseminación artificial y la congelación de material genético para la formación de bancos de germoplasma (Wildt 1989). La reproducción en cautiverio principalmente se lleva a cabo de manera natural, es decir, se permite que los animales tengan un cortejo y cópula natural y la única interacción del hombre es la manipulación de las condiciones de mantenimiento de los ejemplares. La selección de organismos que presentan un valor biológico, económico o científico dio la pauta a desarrollar programas de reproducción asistida en especies como, *Crotalus durissus terrificus* (Zacariotti 2007) y la serpiente de maíz *Pantherophis guttatus* (Fahrig *et al.* 2007). Sin embargo; el desconocimiento de la biología reproductiva de la especie llega a ser uno

de los principales problemas (Ross & Marzec 1990), así como la identificación correcta de las especies presentes (Card *et al.* 2016).

Ya que en muchas especies se desconoce si los factores ambientales interfieren en la reproducción, así como rituales de apareamiento y tipo de alimentación, muchos de estos factores son muy difíciles de llevar a cabo en mantenimiento en cautiverio ya sea por falta de infraestructura o carencia de organismos de una especie. Para poder llevar a cabo estas metodologías es necesario realizar estudios previos para implementar de manera específica los procedimientos de reproducción asistida en cautiverio. Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar la colecta de semen, evaluación seminal y caracterización morfométrica de los espermatozoides de la especie *Boa imperator*.

Material y métodos

Ejemplares: Se incluyeron 25 ejemplares de *Boa imperator*, adultos con edad de 2 a 5 años, con fertilidad probada, todos fueron criados en cautiverio, alojados de manera individual en contenedores de 1.20 m de largo por 1.0 m de ancho y 70 cm de altura con base de sustrato de papel en el contenedor y sobre ella sustrato aspen, con área de resguardo y agua *ad libitum*, con temperatura de 25 a 29 °C, humedad de un 70% y fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de obscuridad. La alimentación fue con base en ratas.

Recolección seminal: Se realizó de noviembre de 2015 a marzo del 2016. Se utilizó la técnica descrita por Mengden *et al.* (1980) y utilizada por Zacariotti *et al.* (2007), mediante un manejo cuidadoso de los ejemplares, sujetando su cabeza y un masaje intenso craneo caudal en el último tercio del ejemplar. Después de presentarse la expulsión y erección del hemipene, el semen presente se aspiró con una micropipeta graduada para determinar el volumen de cada eyaculado. El volumen colectado se depositó en 30µl del medio Tyrode que contiene: 8.18 g/l NaCl, 0.24 g/l KCl, 0.04 g/l NaH₂PO₄, 2.18 g/l NaHCO₃, 0.08 g/l MgCl₂ 6H₂O, 0.31 g/l CaCl₂ 2H₂O, 0.94 g/l glucosa, 2.48 HEPES

g/l, (Barati *et al.* 2011) para su manipulación *in vitro* y que también se ha utilizado en otro tipo de ofidios como lo son algunas especies de *Crotalus* sp (Mascorro *et al.* 2014). Se tomó 13µl de la muestra para contar en la cámara de Neubauer y determinar la densidad espermática en cada eyaculado.

Evaluación espermática: De cada eyaculado, se estimó el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, a 28 °C con objetivo 40 X. En una preparación sobre portaobjetos, teñida con eosina-nigrosina, se observó el porcentaje de espermatozoides vivos, también se determinó el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, contando al menos 200 espermatozoides. En la misma tinción, se realizó la medición de las estructuras espermáticas como fueron: longitud de la cabeza, cuello y flagelo del espermatozoide y se analizó con un Microscopio Olympus BX51 con software Image-Pro 6.2, (100X).

Análisis estadístico: Se estimó el coeficiente de correlación entre las características físicas de los ejemplares y sus parámetros seminales. También, se realizó la descripción estadística de los parámetros determinados, presentando los resultados como promedio (X) ± error estándar (EE).

Resultados

Después de un periodo de un mes de adaptación a las condiciones de manipulación, se logró la obtención de al menos un eyaculado de cada ejemplar, logrando obtener en total 25 eyaculados. Los eyaculados lograron ser obtenidos después de al menos haber realizado manejo de ejemplares dos semanas previas a la colecta. Se encontró un amplio rango en las características físicas de los ejemplares (Tabla I), sin embargo; no se encontró que estos parámetros estuvieran correlacionados con sus características seminales como volumen eyaculado/concentración espermática (R=0.27), talla/concentración (R=0.20), peso/concentración (R=0.19), peso/volumen (R=-0.04), talla/volumen (R=-0.08), respectivamente. Los parámetros espermáticos determinados se describen en la Tabla II. Los parámetros morfométricos determinados se presentan en la Tabla III, destacando una gran amplitud en el rango de longitud de cada segmento, aunque este es menor al considerar la longitud total (Figura 1).

Discusión

Es posible la obtención de eyaculados de ejemplares en cautiverio de *Boa imperator*, por medio de una técnica de masaje que es poco

Tabla I. Características de los especímenes de *Boa imperator* (n=25) evaluados.

Longitud (cm)	Peso (grs)	Edad (meses)
X ± EE	X ± EE	X ± EE
(Rango)	(Rango)	(Rango)
214.5 ± 16.20	3790 ± 430	49.12 ± 3.84
(85-364)	(600-710)	(24-60)

Tabla II. Parámetros seminales obtenidos en los ejemplares de estudio, de *Boa imperator* (n=25).

Volumen eyaculado (µl)	X10 ⁶ sperm/µl	Vivos (%)	Muertos (%)	Movilidad (%)	Morfología normal (%)	Morfología anormal (%)
X ± EE	X ± EE	X ± EE	X ± EE	X ± EE	X ± EE	X ± EE
(Rango)	(Rango)	(Rango)	(Rango)	(Rango)	(Rango)	(Rango)
3.5 ± 0.3	122.4 ± 6.2	91.0 ± 1.2	8.9 ± 1.2	80 ± 0.2	98.2 ± 0.2	1.8 ± 0.3
(2 - 5 µl)	(74 - 189)	(77-99)	(1-23)	(70-90)	(1.38-100)	(0-5)

Tabla III. Indicadores de la morfometría espermática de *Boa imperator* (n=1000).

Longitud total (µm)	Cabeza (µm)	Parte media (µm)	Flagelo (µm)
X ± EE (Rango)	X ± EE (Rango)	X ± EE (Rango)	X ± EE (Rango)
99.4 ± 1.6 (94.1-99.4)	10.3 ± 0.2 (7.5-11.2)	54.5 ± 1.6 (40.2-71.1)	34.6 ± 1.5 (22.3-52.5)

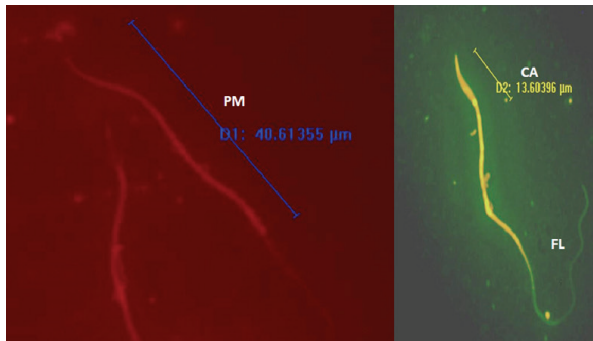


Figura 1. Morfometría espermática de *Boa imperator*, espermatozoides teñidos con técnica Mitotracker. Muestra las imágenes obtenidas con Microscopio Olympus, y Software Image Pro 6.2. (100X). CA= cabeza, PM= parte media y FL= flagelo.

invasiva bajo las condiciones ambientales proporcionadas, sin necesidad de realizar un manejo invasivo de los organismos como el bloqueo de la papila genital con la utilización de anestésicos locales como es propuesto por Zacariotti *et al.* (2007). En el caso de especies constrictoras como en este caso lo es la *Boa imperator*, el masaje debe de ir acompañado de una mayor presión tratando de simular las contracciones que llevan a cabo los ejemplares uno sobre otro durante el proceso de apareamiento.

La utilización de tubos de manejo mejora considerablemente la manipulación de los ejemplares ya que al ser organismos constrictores su gran fuerza dificulta la sujeción. Por lo que la utilización de los tubos como medios de contención ayuda a que los ejemplares no traten de escapar y delimita la zona a manipular.

El volumen obtenido de los eyaculados obtenidos, fue similar al reportado por

Mattson *et al.* (2007) con la especie *Elaphe guttata* obteniendo 2 a 5 µl, Zacariotti (2008) con serpientes *Crotalus sp* obteniendo de 0.5 - 13 µl, Fahrig *et al.* (2007) con *Pantherophis guttatus* obteniendo 0.1 µl. Solo se observa una diferencia en volumen con los volúmenes obtenidos por Zacariotti *et al.* (2007) con *Crotalus durissus terrificus* con 18.52 µl. Sin embargo, en su estudio, los ejemplares fueron parcialmente anestesiados con bloqueos locales y relajación de la papila genital, por lo cual es posible explicar un mayor volumen de eyaculado.

Para obtener un eyaculado no es necesaria la exposición de hemipenes, en nuestro estudio en solo dos ejemplares hubo exposición de los mismos. Es fácil establecer el momento del eyaculado ya que todos los machos presentaron contracciones en cloaca segundos antes de la eyaculación. El semen es fácilmente distinguible gracias a su viscosidad y coloración lechosa y homogénea a diferencia de los uratos que pueden confundirse ya que suelen salir un poco de ellos al momento del masaje, siendo estos uratos más líquidos y si bien son de coloración blanquecina es bastante perceptible una textura granulada.

La concentración espermática determinada en este estudio para *Boa imperator*, fue de 0.74 a 1.8 espermatozoides/ml X10⁶ para *Boa imperator* mientras que se reporta para *Pantherophis guttatus* de 3.4 a 18 espermatozoides/ml x10⁶ (Mattson *et al.* 2007), para *Nerodia sipeton* es de 3.34 espermatozoides/mlX10⁶ (Schultt-hostedde 2005), en *Crotalus durissus* se reportan concentraciones de 1.38 espermatozoides/mlX10⁶ (Zacariotti *et al.* 2007).

Con respecto a los parámetros de movilidad espermática que fueron determinados, estos son de un promedio de 80% con un rango de 70%- 90%. En comparación con *Pantherophis guttatus* en los cuales se ha reportado 95% -88.9% (Mattson *et al.* 2007), en *Crotalus durissus* se reporta una movilidad espermática de 63.88 en media con un rango de 5%-90%.

La medida de las estructuras cabeza 10.34 µm, parte media 54.45 µm, cola 34.58 µm, largo total 99.38 µm, son bastantes parecidas

a las reportadas por Tourmente *et al.* (2011). En comparación con *Boa constrictor occidentalis*, que es una especie de boa del sur del continente americano con medidas de cabeza 12.48µm, parte media 40.5 µm, cola 44.01 µm y largo total de 90- 100 µm. Schultte-hostedde (2005) solo reporta el largo total del espermatozoide de la especie *Nerodia sipeton* siendo este de 112 µm mas no reporta la talla de cada una de las estructuras sin embargo se habla de un espermatozoide un poco más largo.

Conclusión

Es posible obtener semen de ejemplares de la especie *Boa imperator* mediante la realización de un masaje cráneo caudal en el tercer tercio del cuerpo del animal.

La eyaculación va acompañada de contracciones fácilmente apreciables y la expulsión es llevada a cabo por medio de la papila genital. No siendo necesaria la exposición de los hemipenes para poder llevar a cabo la eyaculación.

El volumen eyaculado es escaso, sin embargo; es posible recolectarlo con micro pipetas graduadas, que permiten determinar su volumen.

Los espermatozoides presentan una estructura filiforme, con presencia de *perforatum* similar a los espermatozoides de aves.

Destaca de manera evidente la longitud de la parte media del espermatozoide que es aproximadamente el 50% del total de su longitud, que es mucho mayor en comparación con otras especies de aves y mamíferos.

Agradecimientos

Al laboratorio de Bioquímica de la reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- México, por la beca de maestría otorgada a MAMM.

Referencias

Alberts, A.C; Oliva, M.L; Worley, M.B; Teldord J.R; Morris, O.J; Janssen, D.L. 1998. The need for pre-release health screening in animal translocation: a case study of the Cuban iguana (*Cyclura nubila*).

Animal Conservation 1(3):165-172.

Álvarez-Buylla R. 2008. La extinción de especies causas demográficas. Un ejemplo del neotrópico. Centro de ecología, UNAM.

Baena, M.L., G. Halffter. 2008. Extinción de especies, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 263-282.

Card, C. Daren; Schield, R. Drew; Adams, H. Richard; Corbin, B. Andrew; Perry, W. Blair; Andrew, L. Audra; Pasquesi, Giulia I.M; Smith, N. Eric; Jezkova, B. Jezoba; Boback, M. Scott; Warren, D. Booth & Castoe A. Todd. 2016. Phylogeographic and population genetic analyses reveal multiple species of *Boa* and independent origins of insular dwarfism. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 102:104-116.

Collins, J.P. y A. Storfer. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypothesis. *Diversity and distributions* 9:89-98.

Correa S.F. 1995. Aspectos de mantenimiento y reproducción en cautiverio de *Boa constrictor imperator*. Daudin (reptilia: serpientes: boidae). Universidad Autónoma de México.

Fahrig B.M, Mitchell M.A, Eilts E.B. 2007. Characterization and cooled storage of semen from corn snake (*Elaphe guttata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38:7-12.

Flores-Villela O, García-Vázquez O.U. 2014. Biodiversidad de reptiles en México. Revista mexicana de biodiversidad. Museo de zoología, Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. Supl.85:S467- S475, 2014.

García, A. (2006). Using ecological niche modelling to identify diversity hotspots for the herpetofauna of pacific lowlands and adjacent interior valleys of México. *Biological conservation* 130:25-46.

Gardner, T.A; Barlow, J; Peres, C.A. 2007. Paradox, presumption and pitfalls in conservation biology: the importance of habitat change for amphibians and reptiles. *Biological conservation* 138:166-179.

Gibbons, J.W; Scott, D.E; Ryan, T.J; Buhlmann, K.A; Tuberville, T.D; Metts, B.S; Greene, J.L; Mills, T; Leiden, Y; Poppy, S; Winne, C.T. 2000. The global decline of reptiles, deja vu amphibians. *BioScience* 50:653-666.

Langlada, F.G; Santos, S; Ferreira, I.L. 1994. Techniques of artificial insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae-Crotalinae). *Brazilian journal of veterinary research animal and science* 31:141-144.

Mascorro, F.G; Simón, S.P; Tamayo, M.H; Álvarez, T.A. 2015. Osmolaridad del espermatozoide de los reptiles. *Actas iberoamericanas de conservación animal* 6:218-225.

Mattson J.K; Uris A.D; Mc Guiro S.M; Krebs J; Louis E.E,

- Loskutoff N.M. 2007. Successful artificial insemination in the corn snake *Elaphe gutattus* using fresh and cooled semen. *Zoo Biology* 26:363-369.
- Mengden AG, Platz CG, Hubbard R, Quinn H. 1980. Semen collection, freezing and artificial insemination in snakes. Contribution to herpetology reproductive biology and diseases of captive reptiles. St. Louis: St. Louis Univesity.
- Platz, C.C; Mengden, G; Quinn, H; Wood, F; Wood, J. 1980. Semen collection, evaluation and freezing in the green sea turtle, galapagos tortoise, and red-eared pond turtle. In: the annual meeting of american association of zoo veterinarians. Washington DC. Pp. 47-54.
- Quinn, H.; Blasedel, T.; Platz, C.C. 1989. Successful artificial insemination in the checkered garter snake. *International Zoo Yearbook*. 28:177-183.
- Ross, R.A; Marzec, G. 1990. Reproductive husbandry of pythons and boas. Stanford: Institute for herpetological research.
- Sahatrakul, K; Dhanarun, K; Sujaritthanyatrakul, C; Sakorncharun, P; Tanasanti, M; Manawatthana, S; Sanyathitiseree, P; Sirinarumitr, K. 2008. Semen evaluation in olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*). Proceedings of the 46th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart, 29 January - 1 February.
- SEMARNAT, 2010. Norma oficial mexicana NOM059 SEMARNAT 2010. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo.
- SEMARNAT, 2012. Tráfico ilegal de especies silvestres y sus impactos. Seminario de divulgación tráfico ilegal de especies: una amenaza para la biodiversidad.
- Swanson, W. 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cat. *Theriogenology* 66:49-58.
- Tourmente M, Cardozo G, Bertona M, Guidobandi A, Giojalas L, Chiaraviglio M. 2006. The ultrastructure of the spermatozoa of *Boa constrictor occidentalis*, with considerations on its mating system and sperm competition theories. *Acta zoológica* 87:25-29.
- Wildt, D.E. 1989. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. *Zoo Biology* 1(supplement):17-20.
- Zacariotti R.L; Grego K.F; Fernandez W; Sant Anna S.S; Vaz Guimarcas A.B. 2007. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). *Symp art conserve genet manag wildl. Zoo Biology* 26:155-160.

Recibido: 21 de marzo de 2016

Aceptado: 03 de agosto de 2017