

FOLICULOGENESIS EN SEIS ESPECIES DE LAGARTOS Y SERPIENTES DEL ORDEN SQUAMATA (REPTILIA)

Y. Rodríguez-Gómez^{a*}, A. Sanz-Ochotorena^a, J. Torres-López^a, R. Lara-Martínez^b, M. de L. Segura-Valdés^b,
L.F. Jiménez-García^b.

^aDepartamento de Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

^bDepartamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, México.

*Autor de correspondencia, email: yami@fbio.uh.cu. Calle 25 No.455, Vedado, Ciudad de La Habana, CP 10400.
Cuba. Tlf: 537-8365779, Fax: 537-8321321

Recibido: Noviembre 2017. Aprobado: Diciembre 2018.

Publicado: Diciembre 2018.

RESUMEN

El orden Squamata es el más amplio y diverso entre los vertebrados y las especies que lo integran son importantes en las tramas tróficas, por lo que su protección y conservación se hace imprescindible. Esto ha motivado un interés en sus modos de reproducción, siendo los cambios morfológicos y ultraestructurales que acompañan al ovocito durante la vitelogenénesis, muy útiles para comprender el proceso de acumulación de vitelo y sus implicaciones en el desarrollo de los embriones. El objetivo de este trabajo es describir las células foliculares que acompañan al ovocito en las etapas de la vitelogenénesis en seis especies de reptiles cubanos, tres lagartos: *Anolis homolechis*, *Leiocephalus carinatus* y *Hemidactylus mabouia*, y tres serpientes: *Cubophis cantherigerus*, *Caraiba andreae* y *Tropidophis melanurus*. Se analizaron los ovarios de hembras adultas mediante microscopía óptica de campo claro y electrónica de transmisión. Los resultados muestran que en los lagartos los folículos previtelogénicos presentan un epitelio folicular estratificado o capa granulosa con tres tipos celulares: pequeñas, intermedias y grandes, propio de otras hembras de Squamata. Las células grandes son piramidales, con mitocondrias y núcleo prominente con uno o dos nucléolos, visibles al MET. Las intermedias son ovaladas con núcleo grande, igual que en las pequeñas, que presentan cromatina muy condensada. El ovario de las serpientes al MET revela presencia de grasa y pigmentos. Esto pudiera ser una estrategia ante la ausencia de cuerpos grasos más grandes debido a lo alargado de su cuerpo. Las células foliculares se aplanan al final de la vitelogenénesis.

Palabras clave: Squamata, ovocitos, células foliculares, ultraestructura.

FOLICULOGENESIS IN SIX SPECIES OF LIZARDS AND SNAKES OF THE SQUAMATA ORDER (REPTILIA).

ABSTRACT

The Squamata order is the widest and most diverse among vertebrates and their species are important in the food chain, so its protection and conservation is essential. This has motivated an interest in their modes of reproduction, being the morphological and ultrastructural changes that accompany the oocyte during vitellogenesis, very useful for understanding the process of accumulation of yolk and its implications in the development of embryos. The main goal of this work is to describe the follicular cells that accompany the oocyte in the stages of vitellogenesis in six species of Cuban reptiles, three lizards: *Anolis homolechis*, *Leiocephalus carinatus* and *Hemidactylus mabouia*, and three snakes: *Cubophis cantherigerus*, *Caraiba andreae* and *Tropidophis melanurus*. The ovaries of adult females were analyzed by light field optical microscopy and transmission electron. The results show that in lizards the previtellogenic follicles have a stratified follicular epithelium or granular layer with three cell types: small, intermediate and large, typical of other Squamata females. The large cells are pyramidal, with mitochondria and a prominent nucleus with one or two nucleoli, visible to the MET. The intermediates are oval with large nuclei, as in the small ones, which have very condensed chromatin. The ovary of the snakes at the MET reveals the presence of fat and pigments. This could be a strategy in the absence of larger fatty bodies due to the length of its body. Follicular cells flatten at the end of vitellogenesis.

Key words: Squamata, oocytes, follicular cells, ultrastructure.

INTRODUCCIÓN

El orden Squamata incluye a los reptiles que tienen como característica común la presencia de escamas cubriendo todo el cuerpo, como los lagartos y serpientes. Es el más amplio y diverso entre los vertebrados y las especies que lo integran desempeñan un papel importante en las tramas tróficas. En Cuba hay un total de 160 especies de reptiles registradas, algunas de ellas exhiben una gran distribución por toda la isla [1]. Su protección y conservación en los ecosistemas naturales se hace imprescindible lo cual ha suscitado un creciente interés en el estudio de sus modos de reproducción en general y en la morfología del aparato reproductor en particular. En este último aspecto, los cambios morfológicos y ultraestructurales que acompañan al ovocito durante las etapas de la vitelogenénesis, son muy peculiares en los reptiles y resultan útiles para comprender, no solo el proceso de acumulación de vitelo, sino también sus implicaciones en el desarrollo de los embriones [2, 3]. Por ello, la atención de los ecólogos e histólogos se centra en relacionar los cambios estructurales que se observan a nivel de las células sexuales con las variaciones de su ciclo reproductor. Estas células transitan por una etapa de previtelogenénesis y luego una vitelogenénesis propiamente dicha que concluye con una fase de postvitelogenénesis ampliamente descritas para numerosos vertebrados [4] pero con particularidades específicas en los distintos grupos. De ahí que el objetivo de este trabajo es describir las células foliculares que acompañan al ovocito en las etapas de la vitelogenénesis en seis especies de reptiles cubanos mediante microscopía de campo claro y electrónica de transmisión. Se han incluido en el estudio seis especies de reptiles cubanos como los lagartos *Anolis homolechis*, *Leiocephalus carinatus* y *Hemidactylus mabouia*, además, de tres especies de pequeñas serpientes *Cubophis cantherigerus*, *Caraiba andreae* y *Tropidophis melanurus*.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron tres hembras adultas de cada una de las especies en localidades del occidente de Cuba, que incluyen las provincias de Pinar del Río, Artemisa y La Habana. Las recolectas durante su período reproductivo correspondiente con los meses de verano en la isla, de mayo a septiembre. En el laboratorio se anestesiaron y se extrajeron ambas gónadas. El ovario izquierdo de cada ejemplar fue fijado en paraformaldehído al 4 % (Panreac) y el derecho, en glutaraldehído al 2.5 % en buffer fosfato a pH 7.4 (Applichem).

Procesamiento del ovario izquierdo:

Las muestras fueron procesadas por la técnica clásica de inclusión en parafina (Paraplast). Las preparaciones obtenidas se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) y 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.

Procesamiento del ovario derecho:

Las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión (MET) [5]. La inclusión se llevó a cabo con resina epóxica (Merck) y se obtuvieron cortes semifinos, teñidos con azul de toluidina y ultrafinos, con la ayuda de un micrótopo modelo Ultracut de Leica. Las rejillas se contrastaron y se observaron en un microscopio JEOL JEM 1010.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ovocitos en los ovarios de las seis especies analizadas muestran algunos caracteres comunes, pero también algunas particularidades que los diferencian por lo que serán descritos primero los de los lagartos y a continuación los de las serpientes. Todos los ejemplares recolectados durante la etapa seleccionada, correspondiente a los meses de verano, estaban en estado reproductivo y mostraban ovocitos en los diferentes estadios de la vitelogenénesis.

Dilucidar si esas especies muestran un patrón reproductivo continuo o discontinuo, como ocurre en otros reptiles [6], aún en un clima tropical deberá ser objeto de futuros estudios.

Ovocitos de las tres especies de lagartos

Los resultados muestran que en los lagartos los folículos previtelogénicos son transparentes al inicio de la vitelogenénesis y de color blanquecino los más desarrollados. Están rodeados por un epitelio folicular estratificado o capa granulosa (Fig. 1, 2) con tres tipos de células: pequeñas, intermedias y grandes, propio de otras hembras de Squamata [4].

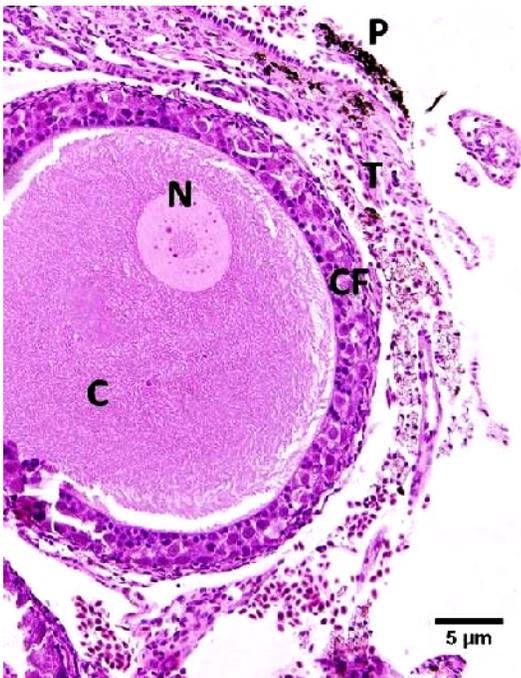


Fig. 1. Ovocito previtelogénico de *Anolis homolechis* donde se aprecia el citoplasma (C), la teca (T), la capa granulosa (CF) y el núcleo (N) con nucléolos del ovocito. En el extremo derecho se observan pigmentos (P). H-E.

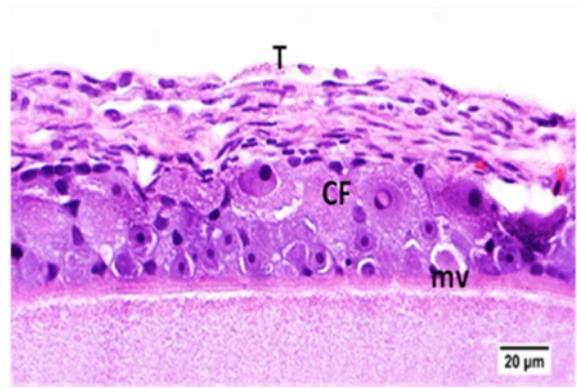


Fig. 2. Periferia de un folículo previtelogénico de *Leiocephalus carinatus* con la membrana vitelina (mv), las células foliculares (CF) y la teca (T). H-E

Las células grandes se encuentran hacia la membrana basal y las pequeñas hacia la membrana vitelina o zona pelúcida, la cual muestra interrelaciones entre la membrana plasmática del ovocito y las prolongaciones citoplasmáticas de las células foliculares. Esta interrelación evidencia una intensa actividad de síntesis durante el proceso de formación del vitelo [7].

Las células que rodean a los ovocitos previtelogénicos presentan inclusiones citoplasmáticas. Las células de forma piramidal, con numerosas mitocondrias, presentan un núcleo grande y uno o dos nucléolos, visibles al MET. Las intermedias son ovaladas, y poseen un núcleo igualmente grande, característica también presente en las pequeñas, aunque estas últimas son redondeadas y presentan cromatina muy condensada (Fig. 3). La teca externa se observa gruesa. Está formada por fibroblastos abundantes y fibras colágenas, similar a lo encontrado en otros reptiles y vertebrados en general [4, 8]. El grosor de la cubierta se considera resultado de una hipertrofia de los tejidos anteriormente descritos [7] lo cual pudiera deberse, entre otros factores no dilucidados, al incremento de la vascularización, necesaria durante el proceso de formación del vitelo.

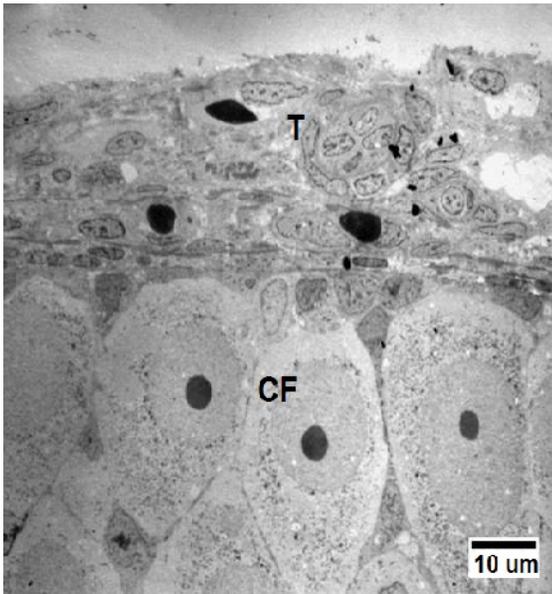


Fig. 3. Células foliculares (CF) de ovocito previtelogénico de *Anolis homolechis* al MET con la teca (T) al exterior.

Entre las células foliculares es posible distinguir uniones estrechas (Fig. 4), lo cual pudiera considerarse la evidencia estructural de la cohesión entre estos tipos celulares y su implicación en la selección de sustancias para la formación del vitelo [4].

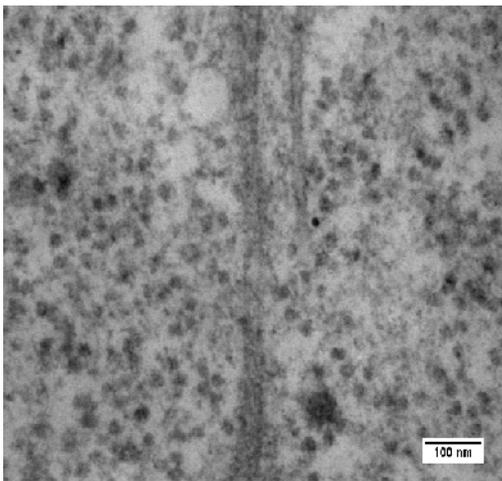


Fig. 4. Unión estrecha entre dos células foliculares de la periferia de un ovocito previtelogénico de *Hemidactylus mabouia* al MET.

Ya en la vitelogénesis el ovocito aumenta su diámetro y las capas de células foliculares disminuyen, hasta solamente quedar la de células grandes. En cortes semifinos se puede apreciar en la periferia células foliculares grandes o

piramidales y la teca, mucho más engrosada, con fibroblastos y vasos sanguíneos (Fig. 5). La etapa de vitelogénesis con sus cambios en la morfología de las células somáticas y la acumulación progresiva de vitelo, marca el inicio de un ciclo reproductor en estas especies [7].

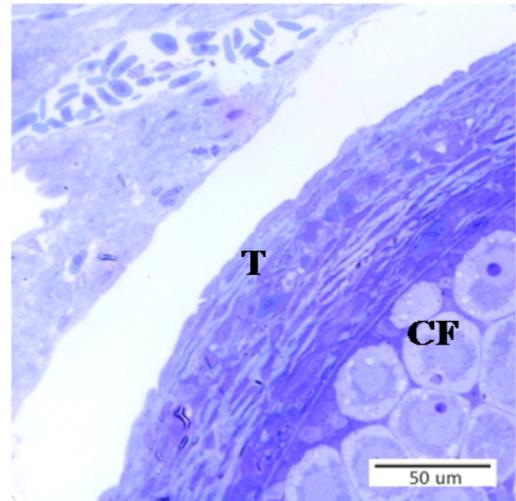


Fig. 5. Periferia de un ovocito vitelogénico de *Leiocephalus carinatus*, se observa la capa granulosa con células foliculares (CF) y la teca (T). Nótese también la vascularización de la cubierta del ovario en la esquina superior izquierda. Azul de toluidina.

Las células foliculares que se observaron en los ovocitos vitelogénicos se aprecian aplanadas hacia el final de la vitelogénesis (Fig. 6) [9]. Esto pudiera considerarse una estrategia durante el proceso de acumulación de vitelo, el cual es considerable, por lo que el notable aumento de tamaño de la célula va acompañado del reordenamiento de las células somáticas que lo rodean. Se refieren en otras especies de reptiles un aumento de hasta 30 veces más [10]. Por otra parte, no se muestran indicios en el citoplasma o en el núcleo que pudieran sugerir muerte celular programada durante la transición descrita del epitelio folicular estratificado a plano. No obstante, se requerirían otros análisis para determinar que es la apoptosis el proceso involucrado en estos cambios [10].

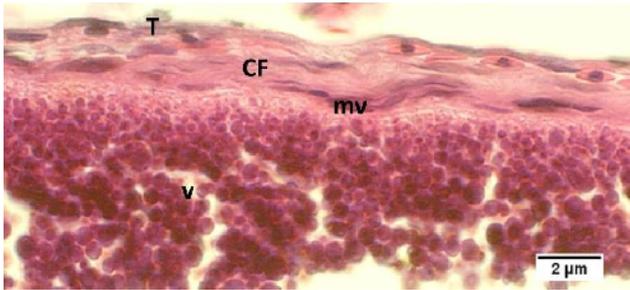


Fig. 6. Ovocito vitelogénico de *Hemidactylus mabouia*. Las células foliculares (CF) van disminuyendo su tamaño. Se observan además la teca (T), la membrana vitelina (mv) y el vitelo (v). H-E

Ovocitos de las tres especies de serpientes

Los cortes histológicos del ovario muestran un abundante estroma vascularizado y en etapa reproductiva, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y postvitelogénicos. Las células foliculares también se encuentran organizadas en tres estratos, como en los lagartos (Fig. 7).



Fig. 7. Periferia de un ovocito previtelogénico de *Tropicodphis melanurus*. Se observan las células foliculares (CF) características y la teca (T). H-E

Al MET se puede apreciar la presencia de abundante grasa, además de pigmentos (Fig. 8). Esto pudiera ser una variante ante la ausencia de cuerpos grasos bien organizados, debido a la anatomía alargada del cuerpo de las serpientes, los cuales proveerían de nutrientes al embrión. Este hallazgo representa una diferencia a lo encontrado en otros reptiles, donde están descritos cuerpos grasos grandes, muy evidentes al inicio de la etapa

reproductiva, los cuales son consumidos durante este período [11, 12, 13].

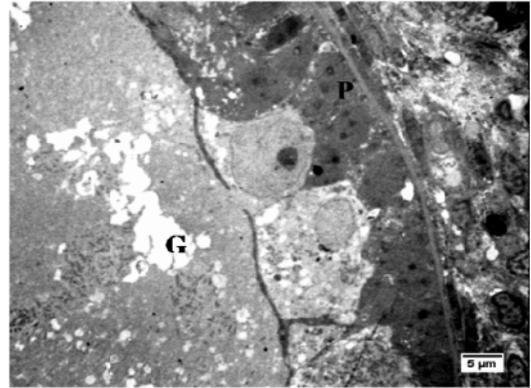


Fig. 8. Periferia de un ovocito de *Caraiba andreae* al MET donde se observa grasa (G) y pigmentos (P).

Los ovocitos previtelogénicos están rodeados también de tres estratos de células foliculares (Fig. 9).

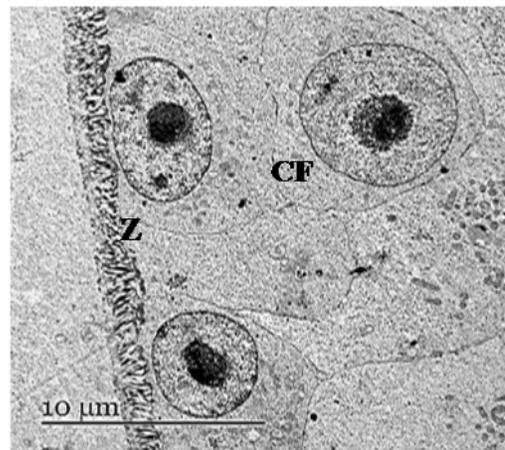


Fig. 9. Periferia de un ovocito previtelogénico de *Cubophis cantherigerus* al MET donde se observan las células foliculares (CF) y la zona de contacto con el ovocito.

Se observan células grandes, intermedias y pequeñas en la capa granulosa de los folículos previtelogénicos y una zona de relación estrecha entre la membrana del ovocito y las células foliculares del primer estrato (Fig. 10), de la misma manera a la que se observó en lagartos.

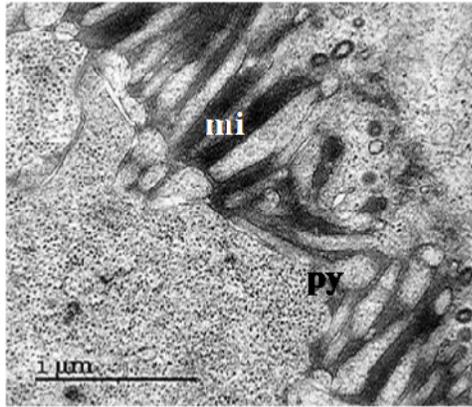


Fig. 10. Relación entre un ovocito y las células foliculares que lo rodean en *Caraiba andreae* al MET. Nótese las proyecciones (py) de las células foliculares y las microvellosidades (mi) desde el ovocito.

Los ovocitos vitelogénicos también muestran las células foliculares aplanadas, al igual que en los lagartos (Fig. 11), hasta llegar a una sola en los postvitelogénicos.

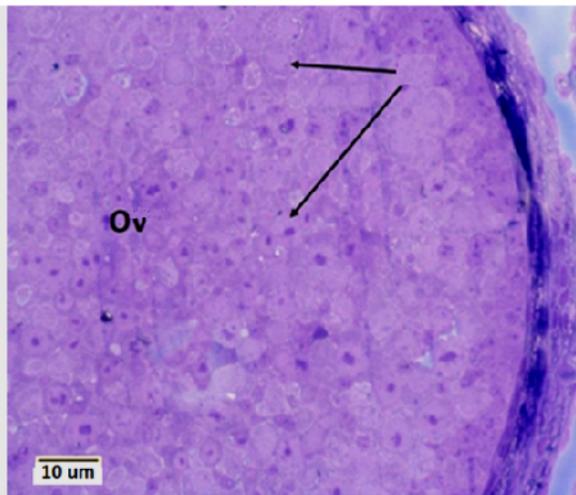


Fig. 11. Ovocito vitelogénico (Ov) de *Tropidophis melanurus*, con plaquetas vitelinas en su citoplasma (flechas). Azul de toluidina.

Es de destacar que en ninguno de los ovarios analizados se observaron folículos atrésicos, pues si bien algunos autores relacionan la atresia a factores externos que puedan afectar el proceso de vitelogénesis, otros lo consideran una fase normal del desarrollo folicular [7]. Otro aspecto a considerar es que las recolectas se realizaron en los meses de verano, cuando estas especies están en pleno apogeo reproductivo y es la etapa en la que es menos frecuente

encontrar atresia folicular. Esta aparece mayormente en los meses de invierno [10].

CONCLUSIONES

Durante el proceso de vitelogénesis se observa un tipo de foliculogénesis especial en estos reptiles a partir de una estratificación en tres capas con diferenciación entre los tipos celulares que las componen, que se hace evidente desde la previtelogénesis. Con el avance de la vitelogénesis las células foliculares se van aplanando, hasta quedar una sola en la postvitelogénesis. Esta variación descrita a lo largo del ciclo reproductivo constituye un elemento esencial para el análisis de la dinámica ovárica en los reptiles escamosos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Dirección General de Cooperación e Internacionalización de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo financiero para esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] Rodríguez-Schettino L., Mancina C. A., Rivalta V. (2013) *Reptiles of Cuba: checklist and geographic distribution*, Smithsonian Herpetological Information Service, pp. 144.
- [2] Manes M. E., Noriega T., Casal F. C., Apichela S. (2007) "Ovarian changes during the reproductive cycle of the *Tupinambis merianae* lizard raised in a temperate environment" *Cuad. Herpetol.* 21: 21-29.
- [3] Uribe M. C., Portales G. L., Guillete L. J. (1996) "Ovarian folliculogenesis in the oviparous mexican lizard *Ctenosaura pectinata*" *J. Morphol.* 230: 99-112.
- [4] Estrada E., Uribe M.C. (2002) *Atlas de histología de vertebrados*, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Ciudad de México, pp. 149-171.
- [5] Vázquez-Nin G., Echevarría O. (2000) *Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las Ciencias*

- Biológicas*. UNAM-Fondo de Cultura Económica, México D. F, 168 pp.
- [6] Albuquerque R. L., Dos Santos Protázio A., Barbosa de Queiroga Cavalcanti L., Serramo Lopez L. C., Oliveira Mesquita D. (2018) "Geographical Ecology of *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) and *Cnemidophorus ocellifer* (Squamata: Teiidae) in a Neotropical Region: A Comparison among Atlantic Forest, Caatinga, and Coastal Populations" *J. Herpetol.* 52 (2) 145- 155
- [7] Santos H. S., Santos J. M. S., Matos M.H. T., Silva N. B., Freire E. M. X., Ribeiro L. B. (2015) "Ovarian follicular cycle of *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata: Tropiduridae) in a semiarid region of Brazil" *Zoologia* 32 (1): 86–9.
- [8] Uribe-Aranzábal M.C., Hernández-Franyutti A. A., Sanz-Ochotorena A., González-Porter G. (2010) *Reproducción en reptiles: morfología, ecología y evolución*, Estado de México, Universidad Autónoma del Estado de México, pp. 167-201.
- [9] Meshaka Jr. W. E., Smith H. T., Dean C. L. (2006) "Gonadal cycle and growth of a West Indian Lizard, the Northern Curlytail Lizard (*Leiocephalus carinatus armouri*), in southern Florida" *Herpetol. Conserv. Biol.* 1(2): 109-115.
- [10] Arrieta M. B., Sandoval M. T., Álvarez B. B. (2017) "Estructura ovárica y dinámica folicular de *Liolaemus azarai* (Squamata: Liolaemidae)" *Caldasia* 39(2): 247-259.
- [11] Dominguez M., Sanz A., Chavez J., Almaguer N. (2010) "Cyclical Reproduction in Females of the Cuban Lizard *Anolis lucius* (Polychrotidae)" *Herpetologica* 66 (4): 443-450.
- [12] Ribeiro L.B., Silva N. B., Freire E. M. X. (2012) "Reproductive and fat body cycles of *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata, Tropiduridae) in a caatinga area of northeastern Brazil" *Rev. Chil. Hist. Nat.* 85: 307-320.
- [13] Velazco K., Sanz A. (2016) "Dinámica estacional de la morfología ovárica y de los cuerpos grasos del lagarto invasor *Hemidactylus mabouia* (Sauria: Gekkonidae) en La Habana, Cuba" *RCCB* 5(1): 43-6.