



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN SEMINAL Y CARACTERÍSTICAS
ESPERMÁTICAS DE *Pituophis deppei deppei* (Squamata: Colubridae) EN
CAUTIVERIO.**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

Alpízar Nava Brian

Directora: Mtra. BEATRIZ RUBIO MORALES

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mi papá Oscar Alpizar Morales (mi panzón):

Gracias por todos esos regaños y esa dura disciplina que me inculcaste a tu manera, la manera de un excelente papá quien me apoyo en todo momento y sé que lo seguirá haciendo siempre. Hoy soy un Biólogo gracias a ti que nunca me dejaste abandonar este duro camino.

A mi abuelita y a la vez mamá Cristina Morales (mi chaparrita hermosa):

El solo pensar en ti me provoca lágrimas de felicidad al recordar todo lo que has hecho por mí, muchas gracias. TE AMO abuelita.

A mi tutora y amiga Beatriz Rubio:

Profesora yo no sé si algún otro tutor pudiera haber aguantado a este chivo en vidriería, y usted me ha transformado en un puma de la UNAM. Me forjo con el mejor acero del mundo y ahora me toca salir a poner en alto nuestros nombres y la institución a la que pertenecemos. Muchas Gracias por ser mi guía en este largo viaje llamado tesis.

A mi FESI y su Laboratorio de Herpetología "Vivarío".

Agradecimientos

A mi amigo y asesor Antonio Sandoval Zarate:

Este proyecto fue tu idea y hoy es una tesis, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y brindarme un espacio de trabajo.

A mis asesores:

Dr. Gersenowies, M. en ciencias Felipe correa Sanches y al Medico Zootecnista Eduardo Cid Mendez, gracias por tanta ayuda para hacer posible esta investigación.

Al biólogo Alfonso Delgadillo:

Gracias por ayudarme tanto en este proyecto y estar disponible, dejando todo a un lado para poder trabajar conmigo.

A mi novia Ingrid Yáñez Jiménez:

Quien me apoyo en la recta final y la más difícil etapa de esta tesis. Gracias, siempre me alentaste a seguir adelante y no rendirme.

Índice

Resumen	5
Introducción	6
Hipótesis	11
Objetivo general.....	11
Objetivos particulares	11
Sujeto de estudio	12
Antecedentes.....	13
Materiales y Métodos.....	15
RESULTADOS y DISCUSION	22
Análisis de resultados	42
Conclusión:.....	43
Referencias.....	43

Resumen

Pituophis deppei deppei es un colúbrido originario de México que se encuentra dentro de la NOM- 059 como especie en peligro de extinción. Las investigaciones realizadas en temas de reproducción en cautiverio para la conservación de este ofidio son escasas, por lo cual es necesario conocer que estación del año es la adecuada para la copula de este ofidio haciendo uso de análisis espermatozoides. Se usaron 9 ejemplares machos a los cuales se les extrajo líquido seminal mediante estimulación manual una vez al mes durante un año. Los eyaculados se analizaron para conocer las variables de: volumen de líquido seminal, concentración espermática, movilidad, anormalidades primarias y anormalidades secundarias. Se obtuvieron como resultados que el volumen de líquido seminal y la concentración espermática fueron más abundantes a finales de Invierno y principios de Primavera, la movilidad fue progresiva durante todo el año y las anormalidades de tipo 1 y tipo 2 fueron escasas. *Pituophis deppei deppei* genera eyaculados óptimos para una buena reproducción en cautiverio durante todo el año a excepción del otoño.

Introducción

Generalidades de Reptiles

Los reptiles son organismos ectotérmicos, por lo que pueden controlar su temperatura corporal cambiando de lugar. Actualmente están constituidos por cuatro órdenes los cuales son: Testudines (tortugas), Crocodylia (cocodrilos), Rhynchocephalia (tuátaras) y Squamata (lagartijas y serpientes) (Fontanillas et al., 2000). La mayoría de los reptiles se han adaptado a la vida terrestre y algunos viven en el agua, poseen una piel resistente y escamosa casi desprovista de glándulas lo que los protege de la desecación, pero al mismo tiempo los hace relativamente impermeables al agua y gases, la cual es una de sus adaptaciones. Otras cualidades que han contribuido al éxito de los reptiles en tierra firme son los pulmones bien desarrollados, un sistema circulatorio de doble circuito, un sistema excretor metanefrítico que conserva el agua, así como fuertes extremidades, la capa superior de la piel (epidermis) se cambia (muda) a intervalos regulares para permitir el crecimiento (Laňka y Vit, 1991; Mengden et al., 1980), posee fertilización interna y huevos amnióticos con cascarón.

Diversidad de reptiles

Existen 9,547 especies de reptiles distribuidos en el mundo a excepción de la Antártida de las cuales 3,000 son ofidios. México posee 8.7% de los reptiles del mundo, considerada como la segunda nación con diversidad más alta de este grupo después de Australia (Ramírez-Bautista y Hernandez-Ibarra, 2004).

Los ofidios están subdivididos en las familias: Viperidae, Boideae y Colubridae. Dentro de estos últimos se encuentra el género *Pituophis* con las especies: *Pituophis lineaticollis*, *Pituophis insulanus*, *Pituophis melanoleucus*, *Pituophis vertebralis*, *Pituophis ruthveni*, *Pituophis catenifer*, *Pituophis deppei jani* y *Pituophis deppei deppei* (Flores-Villela y García-Vázquez, 2013).

Maduración de ofidios

Muchas serpientes tienen estacionalidad reproductiva, la cual está condicionada por varios estímulos ambientales, el más conocido es la temperatura. Por lo anterior los organismos que habitan en zonas más frías, generalmente se aparean a finales de la primavera y el verano, mientras que los que viven en zonas tropicales se ha observado que pueden copular durante todo el año (Burnie, 2003). Las investigaciones realizadas en reptiles, se han inclinado sobre aspectos morfométricos que contemplan la identificación de su patrón reproductivo, utilizando para esto, el peso y tamaño de las gónadas, así como su histología. Sin embargo, el tema de la fisiología reproductiva, en especial la espermatogénesis es uno de los menos estudiados, dejando huecos para la comprensión de los fenómenos que involucran la estructuración y funcionalidad del espermatozoide, así como la capacidad de

fertilizar al ovocito (Burbrink y Crothe, 2011). El organismo madurará con rapidez si se alimenta bien y su hábitat posee temperatura y humedad favorables, ayudando a una pronta reproducción (Burbrink y Crothe, 2011). Si los factores antes mencionados están presentes, la glándula pineal produce melatonina que es la encargada de modular los patrones del sueño, ritmos circadianos y estacionales; y entonces se dará una óptima espermatogénesis; de lo contrario, si el organismo recibe poca luz y hay baja temperatura la producción espermiática se inhibirá (Urbina y Reynoso, 2002). Un factor más con el cual la reproducción puede verse afectada es por la falta de reservas energéticas (RE) especialmente en las serpientes, donde la energía necesaria para su reproducción proviene de los carbohidratos almacenados en cuerpos grasos más no en la ingesta de alimentos. En los machos se consideraron maduros a aquellos que presentan vasos deferentes enrollados, lo que indica la presencia de actividad espermiática (Aguiar & Di-Bernardo 2005). En el caso de las hembras si no tienen suficiente reserva de grasa pierden la oportunidad de aparearse (Zug y Caldwell, 2001).

Aparato Genital de Ofidios

El aparato genital de los ofidios machos se compone de: testículos localizados cranealmente a los riñones, donde se lleva a cabo la espermatogénesis. El epidídimo, el cual es un tubo estrecho alargado situado posteriormente, que se encarga de retener los espermatozoides para continuar con su maduración y aumentar los niveles de fertilidad, posteriormente se conecta a los tubos deferentes encargados de transportar rápidamente el semen durante la eyaculación (Fig.1).

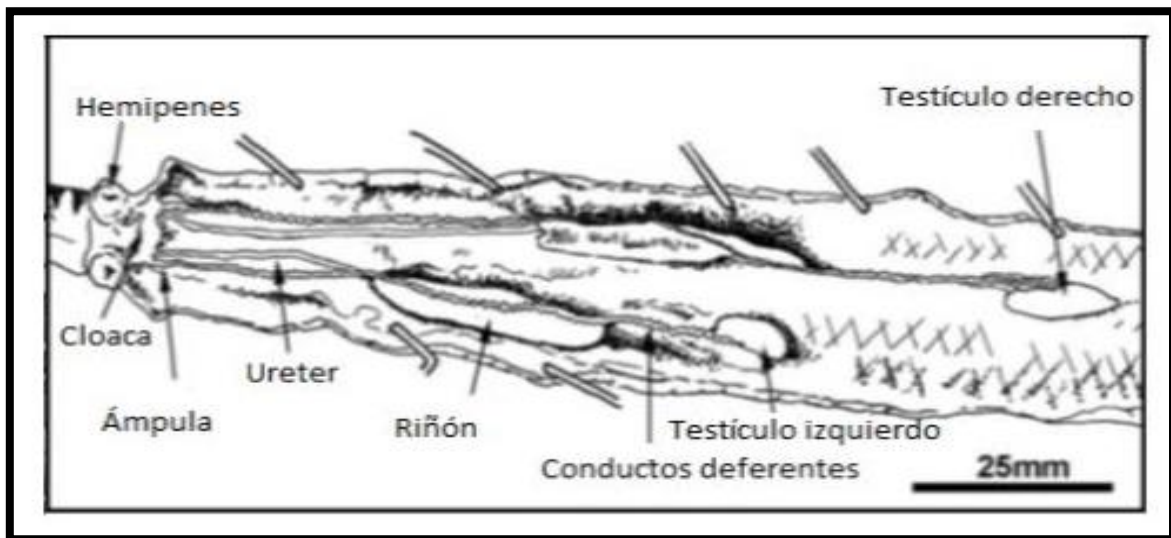


Figura 1. Descripción genital de la anatomía gonadal de una serpiente macho. Tomado de Gribbins y Rheubert, 2011.

Los machos presentan hemipenes extensibles con un surco seminal compuesto de tejido eréctil vascular fibroso, elástico y muscular, está tapizado por un epitelio cilíndrico bajo o epitelio escamoso poco queratinizado y donde este es cilíndrico existen numerosas células

caliciformes que tienen como función lubricar (Graves, 2005). Cuando los hemipenes no están erectos se sitúan ventrolateralmente sobre el suelo del surco hemipenial (Derivaux, 2000). Posteriormente está el epidídimo, tapizado por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con estereocilios, este da capacidad de motilidad progresiva a los espermatozoides; la gota citoplasmática migra a una posición distal de la pieza media, además de realizar reabsorción y fagocitosis de espermatozoides deficientes (Graves, 2005). También existe el estroma que consta de tejido conectivo con algunas fibras musculares lisas, el conducto deferente que está tapizado por un epitelio cilíndrico simple con estereocilios y el segmento sexual que es representado por los túbulos del conducto colector hipertrófico secundario y terciario del riñón, este órgano es secretor de fosfolípidos cuando los testículos están espermatogénicamente activos y cuando se lleva a cabo la cópula, estas secreciones se mezclan con los espermatozoides para ser liberados en el tracto genital masculino para que posteriormente los espermatozoides usen los fosfolípidos. Los testículos constan de numerosos túbulos seminíferos, cada túbulo presenta una membrana basal sobre la que se observan espermatogonias y ocasionalmente células de Sertoli, separadas por tejido conectivo intersticial fibrovascular. En el tejido intersticial se encuentran las células intersticiales de Leydig, caracterizadas por poseer un núcleo grande, redondo, con nucléolo distintivo y citoplasma finamente granular, estas células presentan cambios estacionales (Fig.2) (Prasad y Reddy, 2016).

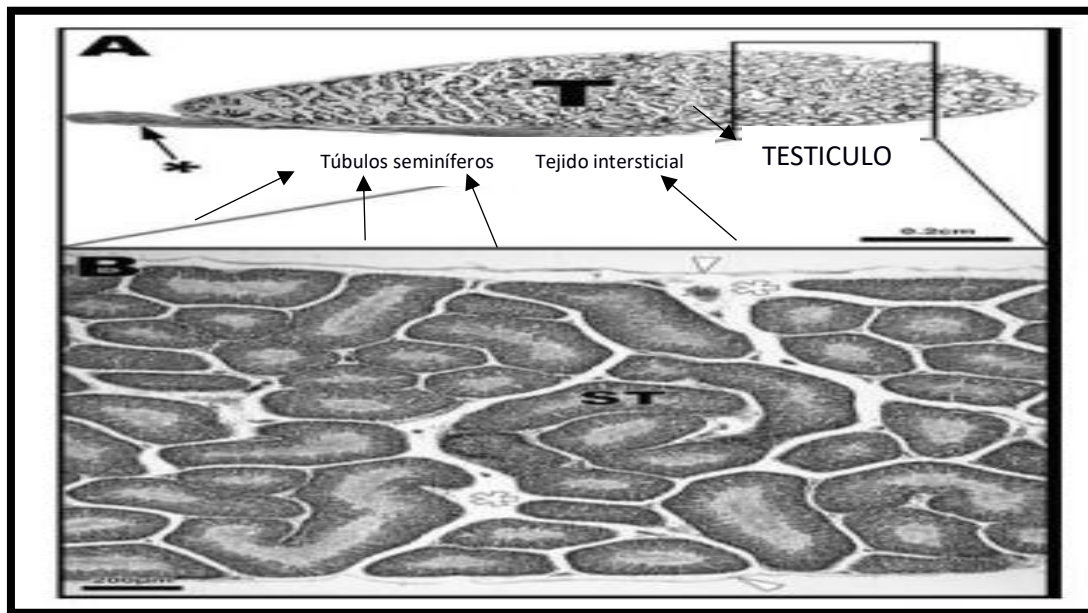


Figura 2. En la sección "A" se aprecia un testículo de serpiente. En la sección "B" se observa el interior del testículo formado por túbulos seminíferos separados del tejido intersticial. Tomado de Gribbins y Rheubert, 2011.

Espermatogénesis

Las células germinales de los testículos producen células madres, que a su vez originan espermatogonias tipo 1 por mitosis. Estas espermatogonias llevan a cabo mitosis y generan espermatogonias de tipo 2, las cuales se reproducen a través de múltiples divisiones y posterior a esto se da lugar a espermatocitos primarios también diploides pero de tamaño mayor. Cada espermatocito primario sufre una primera división por meiosis 1 y genera dos espermatocitos secundarios haploides, es decir, con la mitad de la dotación cromosómica de la especie, a su vez, estos pasan por la meiosis 2 y producen cuatro células haploides llamadas espermatídes, las cuales pasan por una espermiogénesis donde sufren transformaciones como: reducción total del volumen citoplasmático, alargamiento del núcleo que se ubica en la zona anterior (cabeza) del espermatozoide, ubicación de las mitocondrias en la parte posterior de la cabeza y la formación de un largo flagelo a partir de los centriolos de la espermatíde (Fig. 3) (Urbina y Reynoso, 2002).

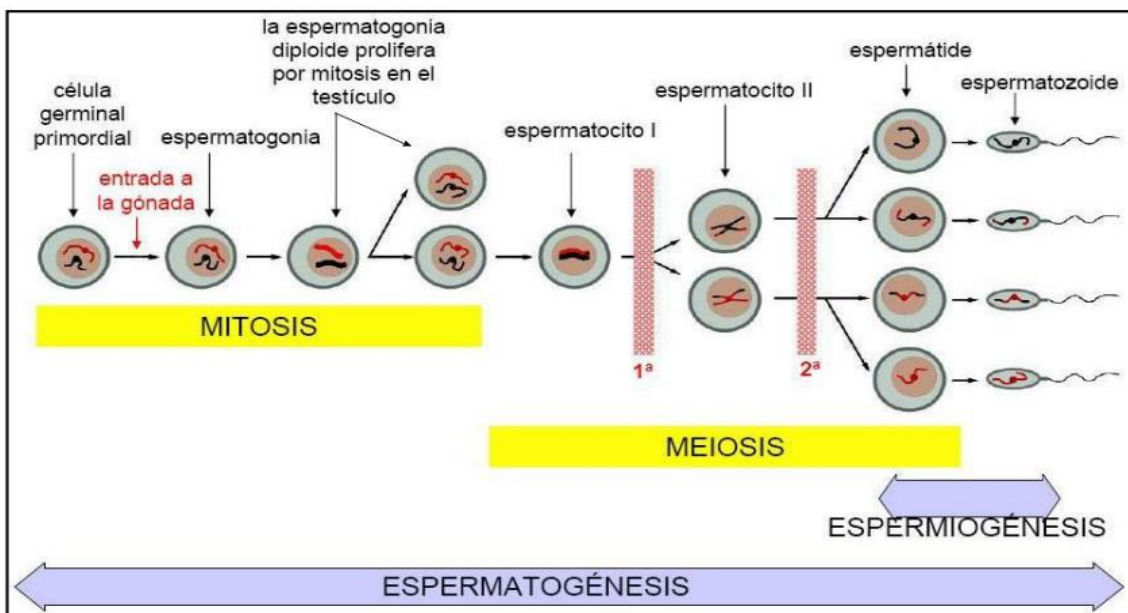


Figura 3. En el esquema se muestra el como la Célula germinal primordial (diploide) pasa por un proceso de mitosis hasta convertirse en un espermatocito primario (diploide) este pasa por meiosis 1 para formar dos espermatocitos secundarios (haploides) los cuales pasaran por meiosis 2, transformándose en espermatídes, los cuales sufrirán una espermiogénesis para finalmente ser espermatozoides. Tomado de www.espermedhub.mx.

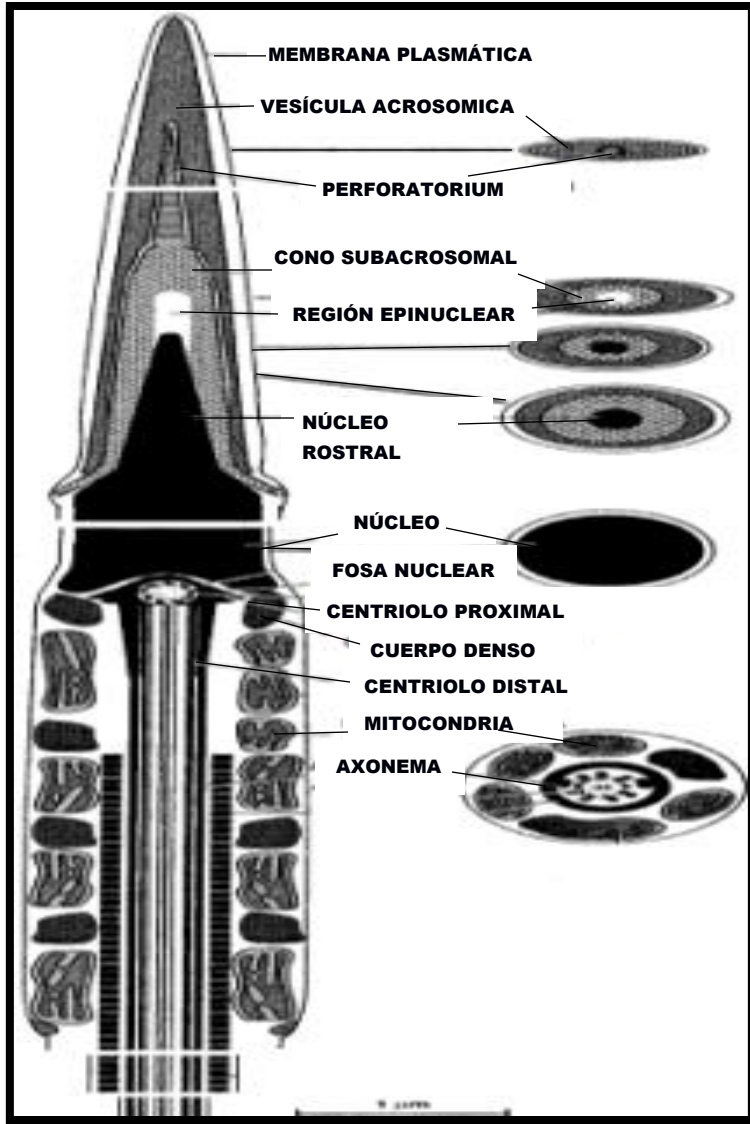


Figura 4. Se muestra la anatomía espermática de un ofidio, refiriendo las estructuras que conforman al espermatozoide. Tomado de Urbina y Reynoso, 2002.

Teniendo al final de la transformación las características de las células haploides (espermatozoides), que constituyen al gameto masculino (Fig.4), el cual consta de una cabeza que contiene el material genético que será heredado a los hijos y la cola o flagelo que dará movilidad (Urbina y Reynoso, 2002).

La información referente a los aspectos morfológicos de espermatozoides y producción de los mismos en *Pituophis deppei* es muy escasa, razón por la cual es necesario realizar estudios haciendo uso de técnicas que no pongan en riesgo la integridad de los ejemplares empleados, aportando conocimiento para el desarrollo de dinámicas de reproducción asistida y así contribuir con la conservación de esta especie.

Hipótesis

La producción seminal de *Pituophis deppei deppei* será más abundante en la estación de primavera ya que al ser organismos ectotérmicos, las elevadas temperaturas de esta estación del año serán favorables para la espermatogénesis, así mismo las características espermáticas serán mejores en comparación con el resto del año.

Objetivo general

Evaluar características del semen de *Pituophis deppei deppei* en cautiverio a fin de conocer las variantes presentadas a lo largo de un año.

Objetivos particulares

Determinar el volumen del eyaculado producido periódicamente durante el estudio.

Determinar la concentración y movilidad espermática periódicamente durante el estudio.

Determinar las anomalías primarias y secundarias de *Pituophis deppei deppei* en esta investigación.

Sujeto de estudio

Pituophis deppei deppei (Fig.5) conocido como: cincuate, alicante ó serpiente de maíz, es descrita por Hiatt, en 1998, como un organismo carnívoro, ya que su dieta se basa en: roedores, crías de conejos, aves y lagartijas. Está catalogada como una especie amenazada según la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Ramírez-Bautista y Hernández- Ibarra, 2004) y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza coloca a *Pituophis deppei deppei* como una especie en peligro de extinción (IUCN, 2007).



Figura 5. En la imagen se muestra a un colúbrido de la especie *Pituophis deppei deppei* (Alpizar, 2018).

Es una serpiente que requiere de temperaturas elevadas para copular, sin embargo, se han habituado a una amplia variedad de climas. Su reproducción ocurre en la primavera, colocando sus huevos en verano para que sus crías nazcan en otoño, depositando en su medio natural de 4 a 24 huevos. Viven bajo rocas y en madrigueras, asoleándose durante el día en espacios abiertos (Ramírez-Bautista y Hernández-Ibarra, 2004).

Las características más evidentes de esta especie son: cabeza semipuntiaguda robusta y relativamente grande, con una longitud hocico cloaca (LHC) promedio de 936.6 ± 161 mm y una longitud de cola promedio (LC) de 143.2 ± 23.6 mm. La coloración dorsal del cuerpo es amarillo pálido con manchas de color negras, las escamas de la cabeza son grandes y lisas; presentan dos prefrontales y ocho supralabiales, la cuarta y la quinta entran en órbita con cuatro temporales anteriores. Las escamas del cuerpo son quilladas y las laterales son lisas y se ordenan en hileras longitudinales paralelas: 27 en la región anterior, 29 en la media y 21 en la preanal. El número medio de escamas ventrales es de 219 y 60 subcaudales (Uribe-Peña et al., 1999).

Su distribución dentro de la República Mexicana abarca una amplia variedad de climas, desde el árido en los estados de: Baja California, Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Durango, Coahuila, San Luis Potosí, Nuevo León, Zacatecas y Tamaulipas, los tropicales en: Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Morelos, Puebla, Veracruz, Tabasco hasta

el clima templado, localizado en la parte sur de la Mesa Central (Fig.6) (Uribe-Peña et al., 1999). La principal amenaza para *Pituophis deppei deppei* es la destrucción de los hábitats donde se distribuye (SEMARNAT, 2001), ya que estas zonas naturales son sumamente susceptibles a la alteración y degradación debido a la urbanización, fragmentación por la construcción de autopistas, agricultura, pastoreo intensivo, quema y deforestación, así como actividades turísticas (CONABIO, 2001).



Figura 6. Mapa de la República Mexicana, resaltando la zona donde puede ser ubicada la especie *Pituophis deppei deppei*. Tomado de (Zlayer, 2010).

Antecedentes

Mendgen y colaboradores en 1980, realizaron un estudio para caracterizar los parámetros del semen de la serpiente de maíz (*Elaphe guttata*), incluyendo: apariencia, volumen, concentración, movilidad y morfología espermática, determinando la longevidad de la motilidad espermática almacenada a 4°C. Obtuvieron como resultado que los espermatozoides inicialmente exhibieron una motilidad media del 92.5% y produjeron eyaculados con un volumen promedio de 0.01 ml, sin embargo, la concentración del eyaculado fue alta ($\bar{x} = 852 \times 10^6 \pm 585 \times 10^6$ espermatozoides / ml), en donde comentan que una media de $75.7 \pm 9.3\%$ de las células de esperma eyaculado son normales. La eyaculación con apariencia blanca tenía concentraciones de espermatozoides significativamente mayores que los eyaculados de color canela.

Depeiges y Dacheux en 1985, realizaron un estudio con *Lacerta vivípara*, mencionan que la adición de cafeína, induce la movilidad progresiva en espermatozoides obtenidos de la cabeza del epidídimo y la velocidad aumenta en la parte distal del mismo, mientras que en los espermatozoides testiculares, la cafeína no tuvo efecto alguno sobre la movilidad; por lo que dichos autores sugieren que en lagartos, como en mamíferos, el epidídimo puede desempeñar un papel importante en la maduración de los espermatozoides; donde la concentración de iones parece ser fundamental para la adquisición de la movilidad.

Víllagrán y colaboradores en 1994 reportan en su estudio “Ciclo espermatogénico del lacertilio *Sceloporus mucronatus* (Reptilia: Phrynosomatidae), el cambio en la actividad reproductora que es evidente por cambios morfológicos a nivel de la gónada, esto mencionan, se correlaciona con cambios histológicos, es decir, cuando el tamaño del testículo aumenta, lo mismo sucede con el epitelio germinal de los túbulos seminíferos e inversamente durante la regresión del testículo.

Simon y colaboradores, en 1996, describieron los espermatozoides de las serpientes: los cuales son filiformes, la vesícula acrosómica colapsada cubre un espacio subacrosómico cónico e invierte el ápice nuclear, la pieza media tiene una vaina fibrosa y cuerpos densos dentro de sus capas mitocondriales concéntricas. El complejo del acrosoma: es una estructura alargada que posee las proteínas y enzimas necesarias para la degradación de las capas extracelulares del ovocito durante la fertilización, tiene forma de cono en la parte apical de los espermatozoides.

Por otra parte Graves en 2005, reportó la relación de la morfología espermática de reptiles con otras características seminales como: concentración, motilidad y calidad, de ahí que las alteraciones morfológicas de los espermatozoides podrían estar relacionadas con las alteraciones de otras variables de la muestra en fresco.

Tavares y colaboradores en 2008, describen detalladamente las ultraestructuras de espermatozoides de tres tipos de boas, obteniendo los testículos y los epidídimos “post mortem”; en dicho estudio se muestra que los gametos masculinos de las tres especies son filiformes, cuentan con 3 regiones: cabeza (con núcleo y complejo del acrosoma), pieza intermedia y cola (subdividida en dos), además observaron diferentes membranas multilaminares y microtúbulos extracelulares cerca de la membrana plasmática de los espermatozoides, en este estudio sugieren una gran concordancia entre la ultraestructura y los caracteres anatómicos macroscópicos de los espermatozoides.

Soledad y colaboradores en 2009, realizaron un estudio de Biología reproductiva en la serpiente semiacuática *Liophis semiaureus* (Serpentes, Colubridae) en el nordeste de Argentina y reportaron que todos los machos fueron maduros a partir de los 451 mm de LHC, el macho maduro más chico tuvo 305 mm de LHC. También mencionan que los ciclos reproductivos tanto en hembras como en machos fueron estacionales, con mayor actividad en el período templado-cálido del año, aunque previos a la época de mayor altura en el nivel hidrométrico que ocurre entre marzo y abril. Además no encontraron individuos con actividad reproductiva en otoño e invierno.

Tourmente y colaboradores en 2009, describen un proceso de acariciado ventral para lograr la relajación de la musculatura del animal y después proporcionan masaje sobre la escama anal, lo cual produce distensión de la musculatura cloacal, a esta técnica agregaron un frotamiento en la base de los hemipenes con una sonda de plástico, de 1.5 mm de diámetro, la cual fue insertada 5 a 7 cm dentro de la apertura cloacal, en un movimiento hacia adelante y hacia atrás, para lograr la eversión de los hemipenes y posterior eyaculación, estos autores lograron con la primer técnica una eversión parcial de los hemipenes acompañada de una relajación muscular de la cloaca, incremento de la irrigación en la zona, obteniendo solo la expulsión de heces y la eliminación de secreciones de la glándula anal, pero con la estimulación de la sonda de plástico se logró la eyaculación.

Gribbins y Rheubert en 2011, extrajeron líquido seminal de las familias: Colubridae, Elapidae, Boidae, Leptotyphlopidae, Typhlopidae y Anomalepididae y describen morfológicamente los espermatozoides producidos por estos colúbridos, los cuales poseen membrana plasmática, vesícula acrosómica, cono subacrosomal, un núcleo centriolo distal, axonema, mitocondrias y un cuerpo denso.

Mascorro y colaboradores en 2014, realizaron un estudio en el que determinaron osmolaridad del espermatozoide de 4 géneros de serpientes (*Boa*, *Crotalus*, *Morelia* y *Pituophis*) se obtuvieron eyaculados por estimulación manual. En resultados los espermatozoides presentaban rangos de osmolaridad con rangos de 420 a 480 mOsm/L. y la respuesta al choque osmótico se visualizó en el hinchamiento de la membrana plasmática en la región de la cabeza, pieza media y flagelo.

Materiales y Métodos

Se sexaron a todos los ejemplares *Pituophis deppei deppei* (20) pertenecientes a la gran colección del Laboratorio de Herpetología, también llamado Vivario de la FES Iztacala, haciendo uso de un estilete que se introducía en la cloaca del ejemplar en dirección cráneo-caudal, estando previamente lubricada, (Fig. 7), cuando el estilete era introducido a una longitud entre la cuarta a la octava o decima escama sub caudal sin complicaciones significaba que era un macho y podía ser usado para el presente trabajo (Mengden 1980).



Figura 7. En la imagen del lado izquierdo se muestra el estilete incrustado en la cloaca y la imagen del lado derecho, muestra hasta donde llegó el estilete.

En los días de muestreo se midió la Temperatura en grados centígrados (T°C) y la Humedad relativa (H.R) del herpetario con un termohigrómetro. Se obtuvieron muestras seminales de 9 machos de *Pituophis deppei deppei*, usando la técnica de Mengden y colaboradores (1980), el intervalo de cada muestreo fue de tres semanas a lo largo de un año. Las serpientes son albergadas en cajas de policarbonato (Fig.8).



Figura 8. Contenedores donde se resguarda a las serpientes.

La alimentación de los organismos fue semanal, la cual consistía en ratones de una porción equivalente al 10% del peso total del ofidio, mientras que la hidratación se administraba de viernes a lunes (Fig. 9). Durante el proceso de muda, los ejemplares eran humedecidos con agua haciendo uso de un atomizador una vez al día, hasta que el ofidio terminaba de mudar, el tipo de iluminación que recibieron estos organismos fue artificial (12 horas luz y 12 horas oscuridad), además se asolearon una vez cada mes.



Figura 9. Serpiente con su contenedor de agua.
(Alpizar, 2018).

Obtención de la muestra del líquido seminal:

Para realizar el proceso de extracción de muestras seminales, los ejemplares fueron tomados de sus encierros y se introducían de la porción cefálica a mitad del cuerpo en un tubo de acrílico transparente, quedando fuera de este la porción abdominal media hasta la cola de la serpiente para conservar al ejemplar tranquilo y así tener un mejor manejo (Fig. 10).



Figura 10. Serpiente colocada en tubo de acrílico.

Se limpió la zona cloacal con gasa y posteriormente se estimularon los epidídimos ejerciendo leve presión con los dedos pulgares de la última porción del abdomen hacia la zona cloacal y posteriormente los hemipenes de la cola hacia la cloaca (Fig. 11).

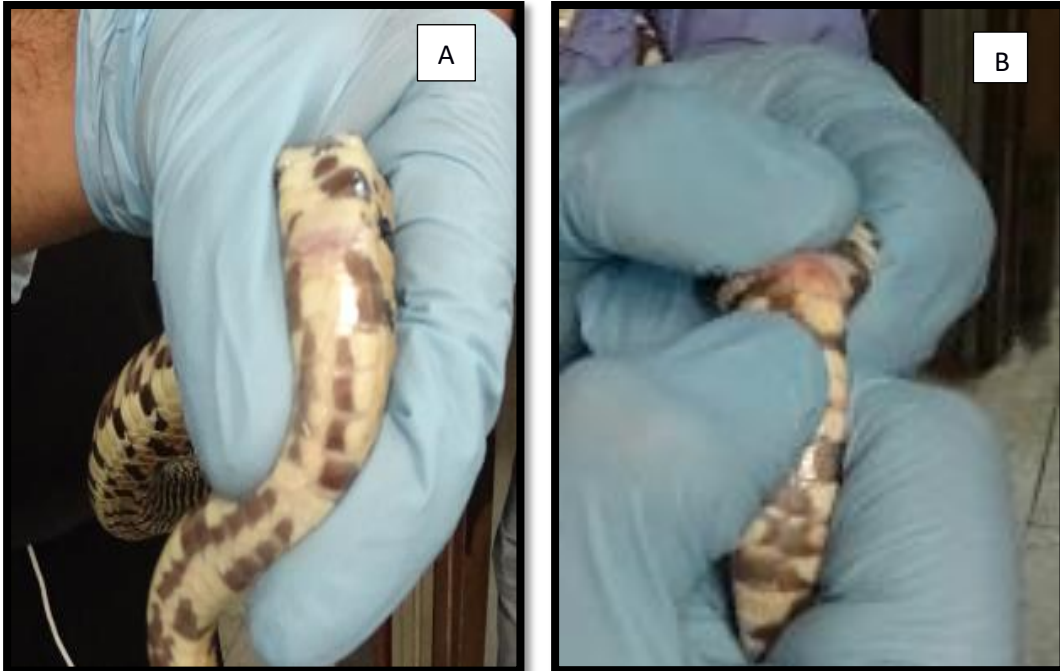


Figura 11. En la imagen "A" se muestra la zona cloacal donde se llevó a cabo el masaje y en la imagen "B" se muestra la aplicación del masaje estimulante.

Al obtener el eyaculado, se tuvo cuidado de no incluir uratos y almizcle para tener una muestra limpia (Fig.12).

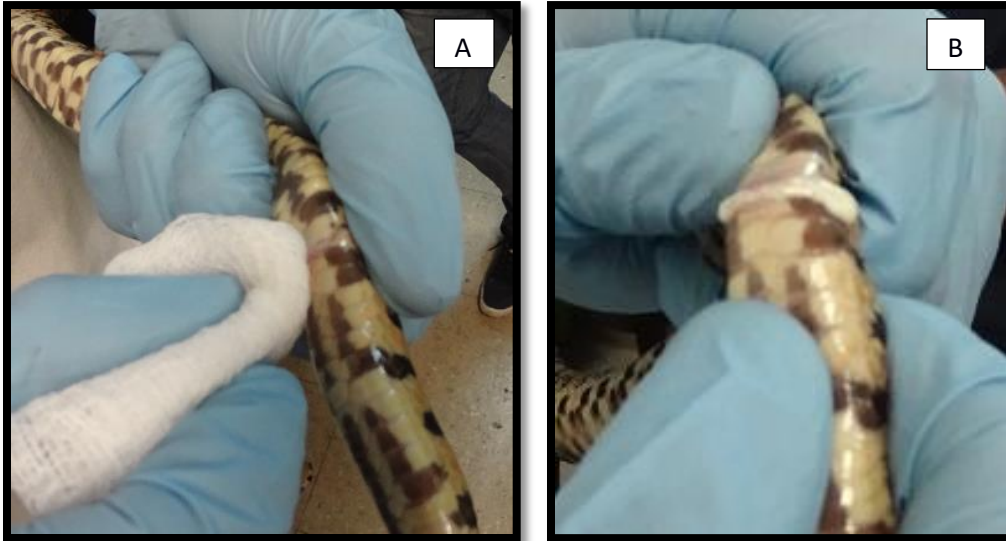


Figura 12. En la imagen "A" se observa cómo se limpia la zona cloacal para evitar contaminar la muestra de uratos y almizcle mostrados en la imagen "B".

El eyaculado fue tomado usando una micropipeta con capacidad de 10 μ l y se colocó en un papel parafilm (Fig.13).

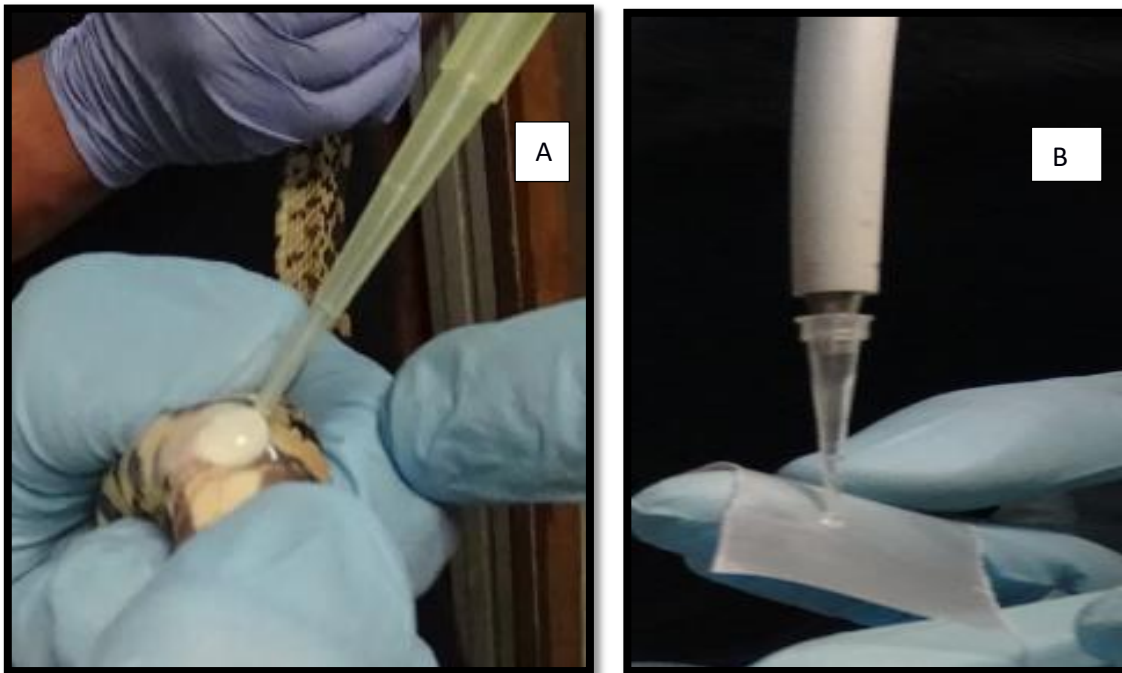


Figura 13. En la imagen "A" se observa la forma de recolección del eyaculado con una micropipeta y en la imagen "B" la colocación del eyaculado sobre papel parafilm.

Evaluación seminal

Para observar la presencia de espermatozoides y la movilidad inicial se tomó 1 μl del eyaculado y se diluyó con 9 μl de solución salina fisiológica en un portaobjetos para su observación en un microscopio óptico según el procedimiento descrito en el manual de la OMS-2010 (Fig. 14).



Figura 14. Analizando movilidad espermática según el manual de la OMS-2010.

Una vez recolectado todo el líquido seminal, este se contó tomándolo del papel parafilm con otra micropipeta calibrada a 5 μl para saber la cantidad exacta de μl que se obtuvo de eyaculado y colocar el total de muestra por ejemplar en un tubo eppendorf con solución salina a modo de dilución 1/20 y poder ser conservada (Fig.15).



Figura 15. Colocando líquido seminal en tubo eppendorf con solución salina.

Morfología espermática:

Para determinar la morfología espermática del semen, se realizó un frotis sobre un portaobjetos usando 10 μl de la dilución previamente preparada y 10 μl de tinción eosina-nigrosina, posteriormente se observó la laminilla al microscopio óptico, donde se contaron

100 espermatozoides para determinar el porcentaje de anomalías primarias y secundarias (Fig. 16).



Figura 16. Frotis realizado en laminilla según el manual de la OMS-2010 para observar morfología espermática.

Concentración espermática:

La muestra diluida con solución salina (estéril al 0,9%, 308 mOs/L y un pH de 6), se puso a temperatura ambiente para conservarlos en buen estado (Fig. 17), así como para poder ser trasladados al laboratorio de reproducción de la FMVZ-UNAM y revisar los datos de concentración espermática haciendo un conteo.



Figura 17. Muestras diluidas y etiquetadas.

Primero el conteo se realizó usando la cámara de Neubauer (Fig. 18), con base en lo establecido en el manual de la OMS, posteriormente se realizó el ajuste a la dilución final multiplicado por el factor de dilución 1/50.

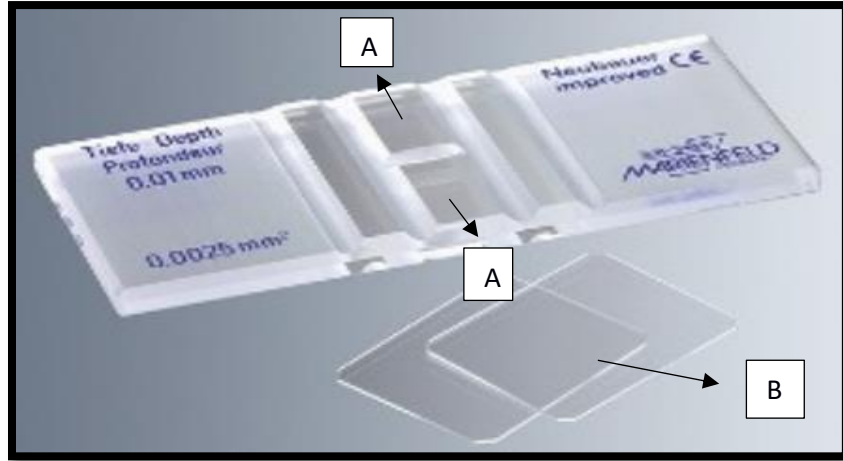


Figura 18. Cámara de Neubauer. La letra "A" indica cada una de las subcámaras mientras que los cubreobjetos están marcados con la letra "B".

El análisis estadístico aplicado fue una Anova de medidas repetidas para ver el efecto de uno o más factores, cuando al menos uno de ellos es intra-sujeto y todos los niveles del factor se aplican a los mismos sujetos, además se usó la prueba de Fisher ya que no incrementa el error tipo β y mantiene constante el tipo α .

La prueba ANOVA de medidas repetidas fue contrastada con las siguientes hipótesis:

$p \geq 0.05$ No hay diferencias significativas
 $p < 0.05$ Hay diferencias significativas

Con ayuda del programa: *Statistica ver.10* se realizaron las pruebas estadísticas.

RESULTADOS y DISCUSION

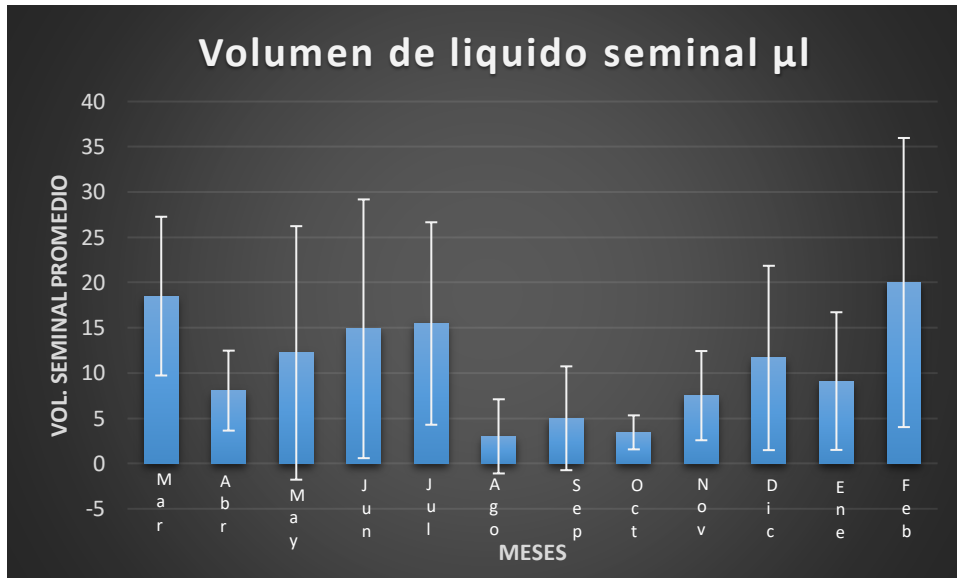
Volumen de líquido seminal

En el cuadro 1, se muestran los valores obtenidos para volumen de líquido seminal a lo largo de un año, siendo marcado con color dorado el mes que se obtuvo un mayor resultado y con azul el resultado más escaso.

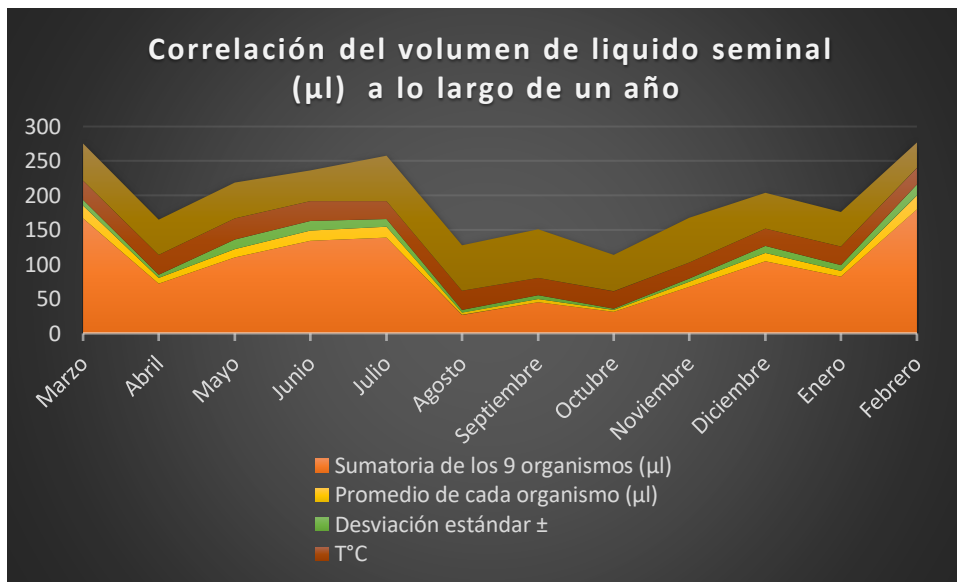
Mes	Sumatoria de los 9 organismos (µl)	Promedio de cada organismo (µl)	Desviación estándar ±	T°C	HR %
Marzo	166.5	18.5	8.7	28	54
Abril	72.5	8	4.4	29	51
Mayo	110	12.2	14	31	52
Junio	134	14.8	14.2	29	44
Julio	139.25	15.4	11.1	26	66
Agosto	27	3	4.1	28	66
Septiembre	45	5	5.7	25	70
Octubre	31	3.4	1.8	25	53
Noviembre	67.5	7.5	4.9	23	65
Diciembre	105	11.6	10.1	25	52
Enero	82	9.11	7.6	27	50
Febrero	180	20	15.9	24	37

Cuadro 1: Líquido seminal obtenido a lo largo de un año, se muestra temperatura en grados centígrados (T°C) y Humedad Relativa en porcentaje (H.R. %).

En el gráfico 1 se observa la desviación estándar del promedio de la variable volumen del líquido seminal de cada mes.



En el gráfico 2 se muestra la correlación existente entre: la temperatura, el volumen de líquido seminal de cada organismo, la desviación estándar y la sumatoria del eyaculado de los 9 organismos tomados a lo largo del año.



Se integraron los meses del año a sus respectivas estaciones para poder obtener los estadísticos.

En la tabla 1 se observan los volúmenes recolectados de cada ejemplar por época del año además del promedio en cada estación con su respectiva desviación estándar.

Tabla 1
"Volumen de líquido seminal (μ l)"

Organismo	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
1	29	24	4.5	47
2	38	48.25	16.5	27.5
3	27	11.5	22.5	52.5
4	47	13	15	30
5	59.5	48	32	20
6	48	73.5	13	38
7	46	34.5	24	61
8	5	1	6	12
9	49.5	46.5	10	79
Promedio	38.77±16.2	33.36±23	15.94±8.9	40.77±21.2

Al realizar la prueba de Anova se obtuvo el siguiente resultado, en donde cuando aparezcan números en negro muestran que no hay correlación entre las variables, mientras que los números rojos nos dicen que si hay correlación.

	F	p
VOL.LIQU	4.84	0.008

Dado que $p = 0.008961 < 0.05$ se concluye que hay diferencias significativas, por lo que se procede a aplicar la prueba DMS de Fisher. Se observa que la estación de Otoño posee un volumen de líquido seminal significativamente menor que en las otras estaciones tal como se observa.

Prueba de Fisher para producción de semen en cada época del año:

	VOL.LIQU	{1}	{2}	{3}	{4}
1	PRIMAVERA		0.462637	0.004369	0.785201
2	VERANO			0.024501	0.316934
3	OTOÑO				0.002232
4	INVIERNO				

Hay diferencias entre 1-3, 2-3, 3-4. Esto implica que el 3 (Otoño) es diferente a todos. Por lo que desde el punto de vista biológico se asume que los volúmenes de líquido seminal son constantes en todas las estaciones del año con la excepción del otoño donde los

volúmenes de líquido seminal bajan drásticamente, suponemos que es debido a que en otoño la serpiente usa su energía para sobrevivir y no busca reproducirse.

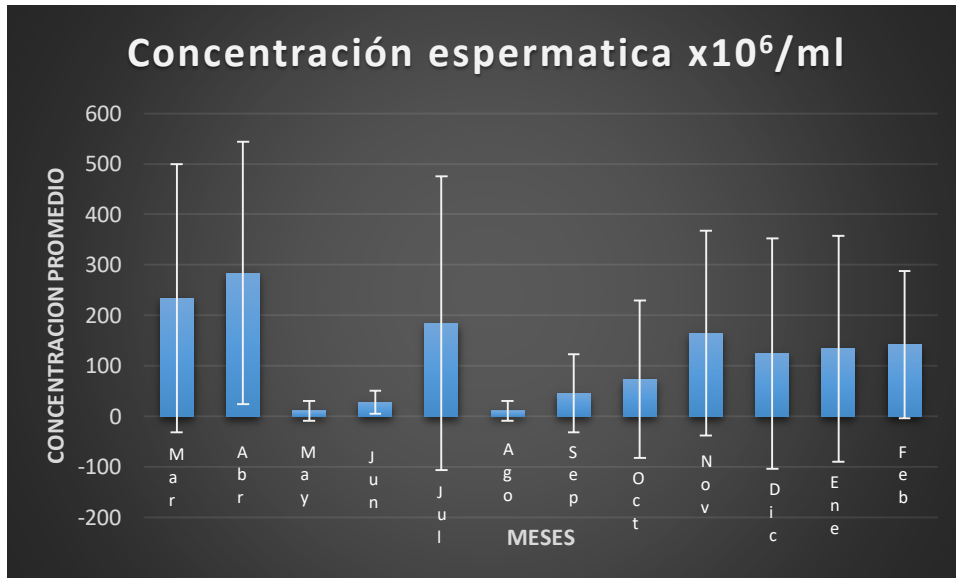
Concentración espermática

En el cuadro 2, se muestran los valores obtenidos para la concentración espermática a lo largo de un año, siendo marcado con color dorado el mes que obtuvo un mayor resultado y con azul el resultado más escaso.

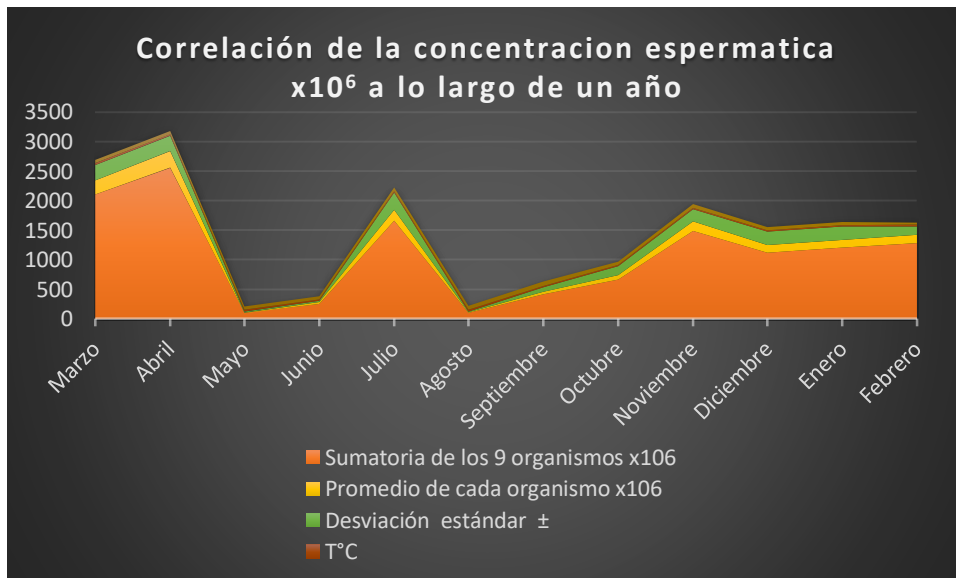
Mes	Sumatoria de los 9 organismos x10 ⁶	Promedio de cada organismo x10 ⁶	Desviación estándar ±	T°C	HR %
Marzo	2105.7	233.9	265.6	28	54
Abril	2554.8	283.8	259.4	29	51
Mayo	96	10.6	19.3	31	52
Junio	254	28.2	22.5	29	44
Julio	1658	184.2	290.8	26	66
Agosto	96.6	10.7	19.5	28	66
Septiembre	410.4	45.6	76.9	25	70
Octubre	662	73.5	156	25	53
Noviembre	1485.7	165	202.5	23	65
Diciembre	1120	124.4	228.3	25	52
Enero	1204	133.7	224.1	27	50
Febrero	1278.7	142	145.7	24	37

Cuadro 2: Concentración espermática obtenida a lo largo de un año, se muestra T°C y H.R. %.

En el gráfico 3 se observa la desviación estándar del promedio de la variable Concentración de cada mes.



En el gráfico 4 se muestra la correlación existente entre: la temperatura, la concentración espermática $\times 10^6$ de cada organismo, la desviación estándar y la sumatoria de la concentración espermática $\times 10^6$ de los 9 organismos tomadas a lo largo del año.



En la tabla 2 se observa la concentración espermática de cada ejemplar por época del año además del promedio en cada estación con su respectiva desviación estándar.

Tabla 2
"Concentración
espermática
 $\times 10^6$ "

Organismo	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
1	792.75	0	186.5	1000.75
2	791.8	103.8	51.2	661
3	609	44	389	104.5
4	0	44	0	1
5	825.5	59	106.2	146
6	679	396.95	634.7	667
7	477.5	468.9	550	329.5
8	32	0	0	43
9	549	892	640.5	650
Promedio	528.5 \pm 313.3	223.1 \pm 304.7	284.2 \pm 271.2	400.30 \pm 354.6

Al realizar la prueba de Anova se obtuvo el siguiente resultado, en donde los números en negro muestran que no hay correlación entre las variables, mientras que los números rojos nos dicen que si hay correlación.

	F	p
CONCENTR	2.85819	0.058133

Dado que $p = 0.058133 \geq 0.05$ se concluye que no hay diferencias significativas. Por lo que desde el punto de vista biológico se asume que los niveles de concentración espermática se mantienen constantes a lo largo de todas las estaciones ya que la espermatogénesis no se inhibe en ningún momento y a pesar de que haya eyaculaciones los segmentos sexuales casi siempre tendrán espermatozoides almacenados. No hay necesidad de hacer una prueba de Fisher.

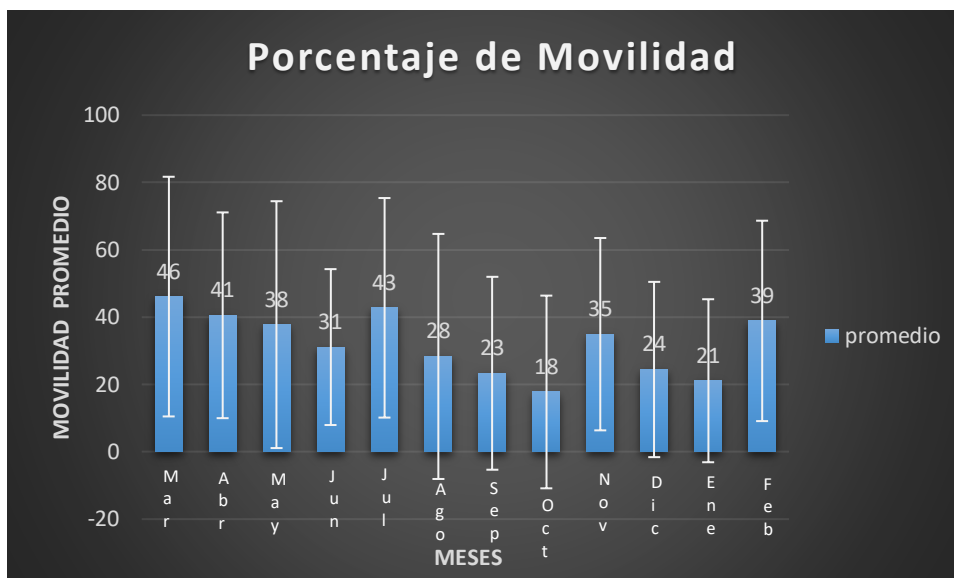
Movilidad

En el cuadro 3, se muestran los valores obtenidos de movilidad en % a lo largo de un año, siendo marcado con color dorado el mes que obtuvo un mayor resultado y con azul el resultado más escaso.

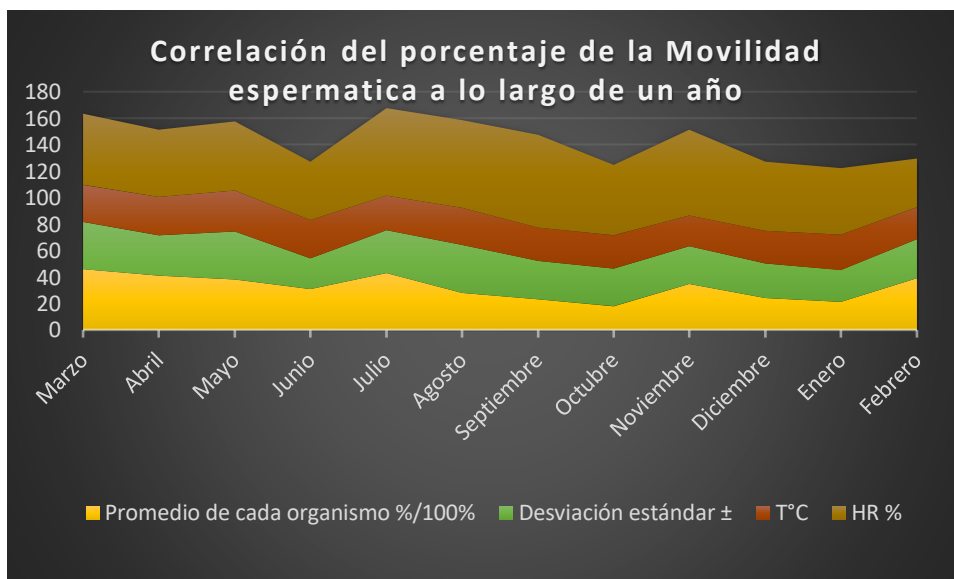
Mes	Promedio de cada organismo %/100%	Desviación estándar \pm	T°C	HR %
Marzo	46	35.6	28	54
Abril	41	30.5	29	51
Mayo	38	36.6	31	52
Junio	31	23.1	29	44
Julio	43	32.6	26	66
Agosto	28	36.4	28	66
Septiembre	23	29.4	25	70
Octubre	18	28.6	25	53
Noviembre	35	28.5	23	65
Diciembre	24	26	25	52
Enero	21	24.2	27	50
Febrero	39	29.7	24	37

Cuadro 3: Movilidad espermática obtenida a lo largo de un año, se muestra T°C y H.R. %

En el gráfico 5 se observa la desviación estándar del promedio de la variable Movilidad de cada mes.



En el gráfico 6 se muestra la correlación existente entre: la temperatura, las movidades de cada organismo, la desviación estándar y la sumatoria de la movilidad de los 9 organismos tomadas a lo largo del año.



En la tabla 3 se observa la movilidad espermática de cada ejemplar por época del año además del promedio en cada estación con su respectiva desviación estándar.

Tabla 3
Movilidad (%)

ORGANISMO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
1	60	23	16	46
2	60	46	6	10
3	30	10	31	16
4	0	10	0	16
5	38	31	20	40
6	71	53	30	36
7	45	56	47	36
8	0	0	25	6
9	68	75	44	43
Promedio	41±27.06	33.77±25.26	24.33±15.78	27.66±15.47

Al realizar la prueba de Anova se obtuvo el siguiente resultado, en donde los números en negro muestran que no hay correlación entre las variables, mientras que los números rojos nos dicen que si hay correlación.

	F	p
MOVILIDAD	2.29544	0.103374

Dado que $p = 0.103374 \geq 0.05$ se concluye que no hay diferencias significativas en la movilidad espermática a lo largo de todas las estaciones del año. Por lo que desde el punto de vista biológico se asume que la movilidad espermática es constante y los espermatozoides podrían llevar a cabo una fecundación óptima. No hay necesidad de hacer una prueba de Fisher.

Morfología espermática

Los espermatozoides visualizados son normales cuando el flagelo no está enrollado ni cortado y el núcleo o también llamada cabeza espermática no presenta hinchazón en la parte distal (Fig. 22).

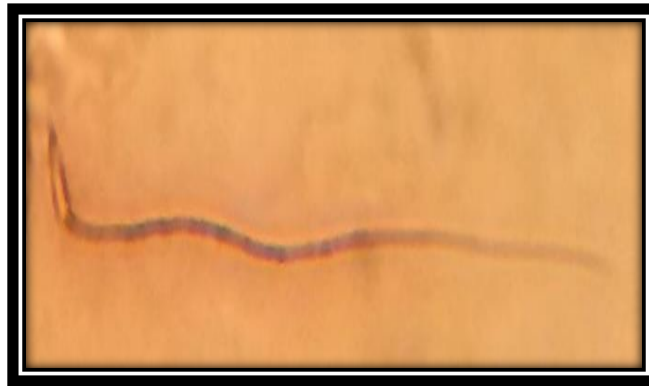


Figura 22. Espermatozoide normal de *Pituophis deppei deppei* observado a 40 X en microscopio óptico.

Anormalidades primarias

Los espermatozoides con anomalías primarias o también llamadas anomalías de tipo 1, se dan por un mal proceso de espermatogénesis y por ende serán espermatozoides no viables para la reproducción (Fig. 23), estos se caracterizan por poseer cabezas hinchadas y flagelos dobles o cortos.

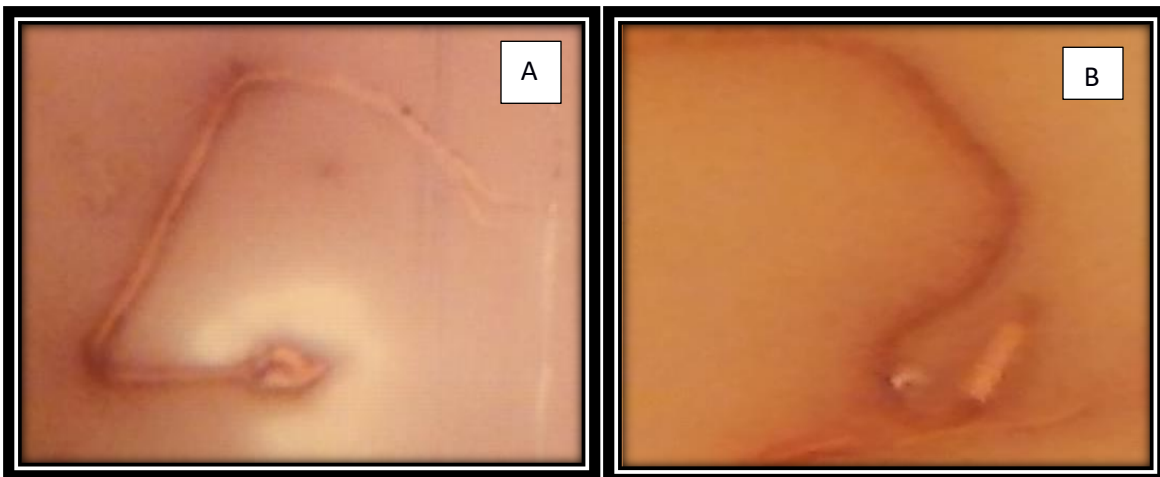


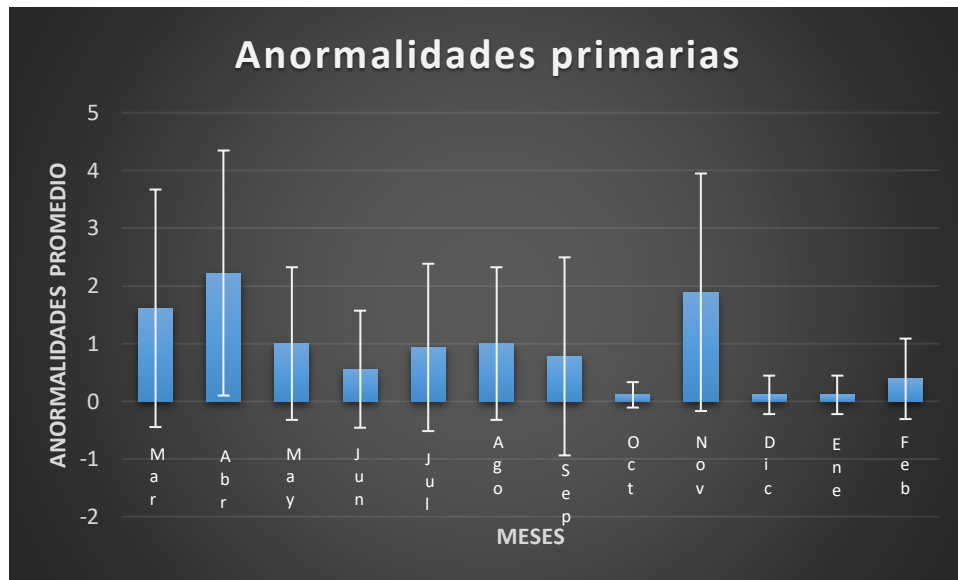
Figura 23. Espermatozoides con anomalía de tipo 1, en la imagen "A" el espermatozoide tiene la cabeza hinchada y flagelo doble en la parte terminal y en la imagen "B" el espermatozoide presenta hinchazón en la cabeza.

En el cuadro 4, se muestran los valores obtenidos de anomalías primarias, en cada mes a lo largo de un año, siendo marcado con color dorado el mes que obtuvo un mayor resultado y con azul el resultado más escaso.

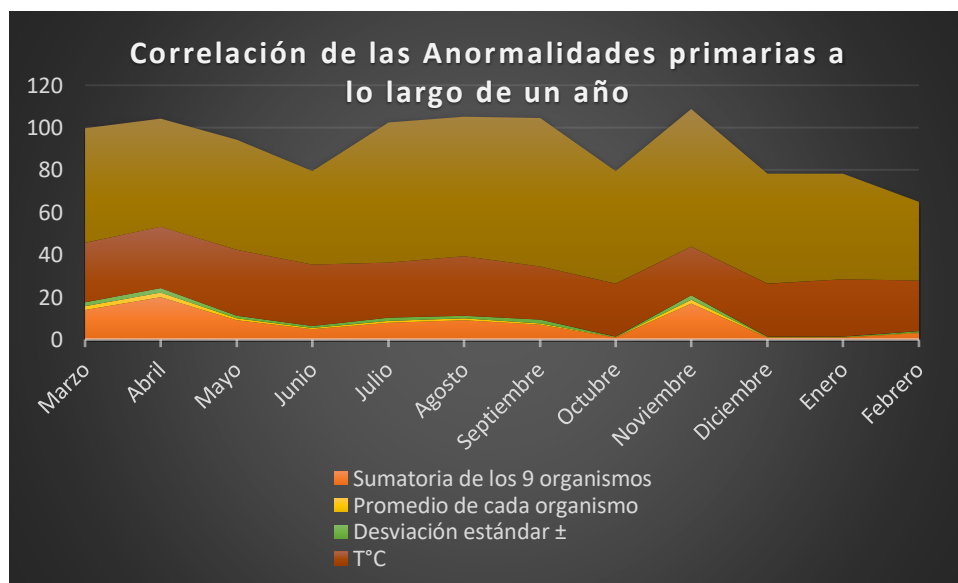
Mes	Sumatoria de los 9 organismos	Promedio de cada organismo	Desviación estándar \pm	T°C	HR %
Marzo	14	1.6	2	28	54
Abril	20	2.2	2.1	29	51
Mayo	9	1	1.3	31	52
Junio	5	.5	1	29	44
Julio	8	.9	1.4	26	66
Agosto	9	1	1.3	28	66
Septiembre	7	.7	1.7	25	70
Octubre	1	.1	.3	25	53
Noviembre	17	1.8	2	23	65
Diciembre	1	.1	.3	25	52
Enero	1	.1	.3	27	50
Febrero	3	.3	.6	24	37

Cuadro 4: Anomalías espermáticas de tipo 1 obtenidos a lo largo de un año, se muestra T°C y H.R. %.

En el gráfico 7 se observa la desviación estándar del promedio de la variable Anormalidades primarias de cada mes.



En el gráfico 8 se muestra la correlación existente entre: la temperatura, las anomalías primarias de cada organismo, la desviación estándar y la sumatoria de anomalías primarias de los 9 organismos tomadas a lo largo del año.



En la tabla 4 se observan las anomalías primarias de cada ejemplar por época del año además del promedio en cada estación con su respectiva desviación estándar.

Tabla 4
Anomalías primarias

ORGANISMO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
1	3	0	4.5	0
2	9	5.9	0	0
3	5.5	1	2.5	0.5
4	0	1	0	0
5	7	0	0	0
6	8	5	3.5	0
7	4.5	7.5	9	1
8	2	0	0	1
9	4.5	2	5.5	3
Promedio	4.83±2.9	2.48±2.8	2.77±3.1	0.61±0.9

Al realizar la prueba de Anova se obtuvo el siguiente resultado, en donde los números en negro muestran que no hay correlación entre las variables, mientras que los números rojos nos dicen que si hay correlación.

	F	p
ANORM1	5.03390	0.007575

Dado que $p = 0.007575 < 0.05$ se concluye que hay diferencias significativas, por lo que se procede a aplicar la prueba DMS de Fisher.

Se realizó el análisis y se obtuvo:

	ANORM1	{1}	{2}	{3}	{4}
1	PRIMAVERA		0.041685	0.071361	0.000722
2	VERANO			0.793156	0.097660
3	OTOÑO				0.058258
4	INVIERNO				

Hay diferencias entre 1-2, 1-4. Se observa que la estación primavera tiene diferencias significativas respecto a verano tal como se observa en la prueba de Fisher. Por lo tanto, en primavera hubo mayor cantidad de espermatozoides con anomalías de tipo 1, ya que la concentración espermática en primavera fue la más alta. Biológicamente se cree que las anomalías primarias dependen de la concentración espermática, ya que a mayor concentración espermática, mayor posibilidad de tener espermatozoides con

anormalidades primarias y a su vez estas anormalidades podrían impedir una fecundación óptima.

Anormalidades secundarias

Mientras que las anormalidades secundarias ó tipo 2, se dan por un cambio de temperatura repentino y drástico, también se pueden dar al momento de teñir la muestra o al homogenizar con pipeteos rápidos (Fig.24) y se caracterizan por poseer una estructura muy retorcida en el flagelo, lo cual le puede impedir tener una buena locomoción y tener pocas posibilidades de fecundar un ovulo.



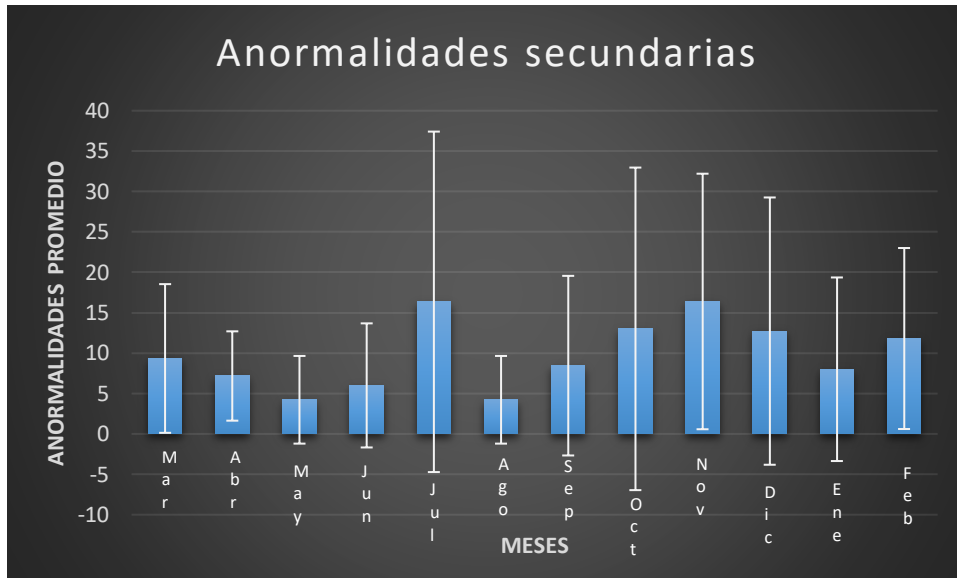
Figura 24. Espermatozoides de *Pituophis deppei deppei* observados a 40X en microscopio óptico. Presentan anomalía de tipo 2 donde se visualizan flagelos retorcidos.

En el cuadro 5, se muestran los valores obtenidos de anomalías secundarias. Se contaron 100 espermatozoides por muestra y de este conteo se visualizó el número de espermatozoides con anomalías secundarias de cada uno de los 9 ofidios a lo largo de un año, siendo marcado con color dorado el mes que obtuvo un mayor resultado y con azul el resultado más escaso.

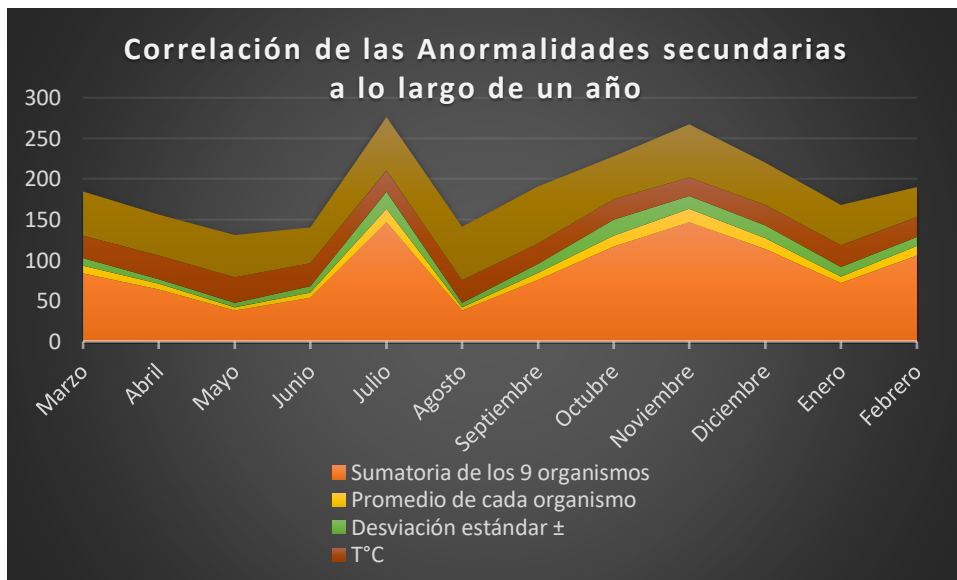
Mes	Sumatoria de los 9 organismos	Promedio de cada organismo	Desviación estándar \pm	T°C	HR %
Marzo	84	9.3	9.2	28	54
Abril	64	7.1	5.5	29	51
Mayo	38	4.2	5.4	31	52
Junio	54	6	7.6	29	44
Julio	147	16.3	21	26	66
Agosto	38	4.2	5.4	28	66
Septiembre	76	8.4	11.1	25	70
Octubre	117	13	19.9	25	53
Noviembre	147	16.3	15.8	23	65
Diciembre	114	12.7	16.5	25	52
Enero	72	8	11.3	27	50
Febrero	106	11.8	11.1	24	37

Cuadro 5: Anormalidades espermáticas de tipo 2 obtenidos a lo largo de un año, se muestra T°C y H.R. %.

En el gráfico 9 se observa la desviación estándar del promedio de la variable Anormalidades secundarias de cada mes.



En el gráfico 10 se muestra la correlación existente entre: la temperatura, las anormalidades secundarias de cada organismo, la desviación estándar y la sumatoria de anormalidades de tipo 2 de los 9 organismos tomadas a lo largo del año.



En la tabla 5 se observan anomalías secundarias de cada ejemplar por época del año además del promedio en cada estación con su respectiva desviación estándar.

Tabla 5
Anormalidades secundarias

ORGANISMO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
1	22.5	0	23.5	41.25
2	56.5	71.1	15	47
3	13.5	3	78	34
4	0	4	0	0
5	30	5	27	11
6	18.5	36	45	41
7	15.5	65	92	28.5
8	8	0	0	18
9	22	55	60	72
Promedio	20.72 ±15.9	26.56 ±30.2	37.83 ±33	32.52 ±21.4

Al realizar la prueba de Anova se obtuvo el siguiente resultado, en donde los números en negro muestran que no hay correlación entre las variables, mientras que los números rojos nos dicen que si hay correlación.

	F	p
ANORM.2	1.12905	0.357128

Dado que $p = 0.357128 \geq 0.05$ se concluye que no hay diferencias significativas. Por lo que desde el punto de vista biológico se asume que las anomalías de tipo 2 dependen de la manipulación que se le da a la muestra una vez que el ofidio eyacula. Estas anomalías al no generarlas el organismo no repercuten en la formación del embrión y su gestación. Posteriormente se realizó un análisis de correlación usando todas las variables para determinar si hay una relación entre ellas (T°C, volumen de líquido seminal, movilidad, concentración, anomalías primarias y anomalías secundarias).

Tabla de correlación

El resultado del análisis se muestra en la siguiente tabla:

	T°C	Vol.liq.sem.	Movilidad	Concentración	Anorm. 1	Anorm. 2
T°C	1,0000 p= -- -	,0802 p=,410	,1140 p=,240	,0026 p=,979	,1624 p=,093	-,2176 p=,024
Vol.liq.sem.		1,0000 p= ---	,3434 p=,000	,2136 p=,026	,0528 p=,587	,2120 p=,028
Movilidad			1,0000 p= ---	,4900 p=,000	,4604 p=,000	,5415 p=,000
Concentración				1,0000 p= ---	,2074 p=,031	,5752 p=,000
Anormalidades tipo 1					1,0000 p= ---	,3931 p=,000
Anormalidades tipo 2						1,0000 p= ---

En la tabla los números en negro muestran que no hay correlación entre las variables, mientras que los números rojos nos dicen que si hay correlación.

En ella podemos observar que existe una relación entre la T°C y las anormalidades secundarias, la cual es inversa, a mayor temperatura, menor cantidad de anormalidades secundarias. Por lo que hay evidencias que permiten suponer que los espermatozoides de *Pituophis deppei deppei* necesitan temperaturas entre los 28°C y 31°C para no alterar su fisonomía.

El Volumen de líquido seminal está relacionado con: movilidad, anormalidades primarias y anormalidades secundarias. Debido a que el volumen de líquido seminal producido durante el invierno, se mantiene dentro del ofidio hasta ser expulsado al copular en la primavera, durante este tiempo el eyaculado se mantuvo nutrido y en buenas condiciones por eso suponemos que tiene una buena movilidad. Sin embargo el ofidio estuvo expuesto a bajas temperaturas y la espermatogénesis no se llevó a cabo correctamente, obteniendo anormalidades primarias. Además la temperatura corporal del ofidio era distinta a la del laboratorio donde se extrajo el eyaculado y suponemos que al tener un choque osmótico se obtuvieron las anormalidades de tipo 2.

La concentración está relacionada con: volumen, movilidad, anormalidades primarias y anormalidades secundarias. Esto debido a que *Pituophis deppei deppei* se reproduce en primavera, la época donde tiene una mayor cantidad de espermatozoides almacenados que produjo durante el invierno, al tener alta concentración, se necesita de un buen abasto de líquido seminal con suficientes nutrientes para mantener preparados a los espermatozoides. Sin embargo el clima al que se expone la serpiente no es el adecuado y suponemos por esto es que se dan las anormalidades.

Al obtener estos resultados notamos que la alteración de una variable depende de otras y que la correlación de variables en aspectos espermatobioscópicas es altamente notable.

La hipótesis se acepta ya que primavera es una estación favorable para la reproducción de *Pituophis deppei deppei*, sin embargo la estación de Invierno también muestra estándares muy altos en donde el coito y la fecundación suponemos serían viables de no ser porque en esta temporada las serpientes prefieren almacenar su energía debido a la escasez de alimento.

En el cuadro 6 se observan los datos completos de todos los valores de cada variable tomada a lo largo de este proyecto. Las columnas que marcan el apartado de "Total" mencionan los datos recopilados de los 9 organismos muestreados en cada mes, mientras que las columnas del apartado "Promedio", dan el valor de cada uno de los 9 organismos muestreados cada mes con su desviación estándar.

ESTACION	Mes	Volumen seminal μl		Concentración $\times 10^6$		Movilidad espermática		Anormalidades primarias		Anormalidades secundarias		T°C	H.R. %
		Total	Promedio IDS	Total	Promedio IDS	Total	Promedio % IDS	Total	Promedio IDS	Total	Promedio IDS		
PRIMAVERA	Marzo	166.5	18.5 \pm 8.7	2105.7	233.9 \pm 265.6	415	46 \pm 35.6	14	1.6 \pm 2	84	9.3 \pm 9.2	28	54
	Abril	72.5	8 \pm 4.4	2554.8	283.8 \pm 259.4	365	41 \pm 30.5	20	2.2 \pm 2.1	64	7.1 \pm 5.5	29	51
	Mayo	110	12.2 \pm 14	96	10.6 \pm 19.3	340	38 \pm 36.6	9	1 \pm 1.3	38	4.2 \pm 5.4	31	52
VERANO	Junio	134	14.8 \pm 14.2	254	28.2 \pm 22.5	280	31 \pm 23.1	5	.5 \pm 1	54	6 \pm 7.6	29	44
	Julio	139.25	15.4 \pm 11.1	1658	184.2 \pm 290.8	385	43 \pm 32.6	8	.9 \pm 1.4	147	16.3 \pm 21	26	66
	Agosto	27	3 \pm 4.1	96.6	10.7 \pm 19.5	255	28 \pm 36.4	9	1 \pm 1.3	38	4.2 \pm 5.4	28	66
OTOÑO	Septiembre	45	5 \pm 5.7	410.4	45.6 \pm 76.9	150	23 \pm 29.4	7	.7 \pm 1.7	76	8.4 \pm 11.1	25	70
	Octubre	31	3.4 \pm 1.8	662	73.5 \pm 156	160	18 \pm 28.6	1	.1 \pm .3	117	13 \pm 19.9	25	53
	Noviembre	67.5	7.5 \pm 4.9	1485.7	165 \pm 202.5	315	35 \pm 28.5	17	1.8 \pm 2	147	16.3 \pm 15.8	23	65
INVIERNO	Diciembre	105	11.6 \pm 10.1	1120	124.4 \pm 228.3	220	24 \pm 26	1	.1 \pm .3	114	12.7 \pm 16.5	25	52
	Enero	82	9.11 \pm 7.6	1204	133.7 \pm 224.1	190	21 \pm 24.2	1	.1 \pm .3	72	8 \pm 11.3	27	50
	Febrero	180	20 \pm 15.9	1278.7	142 \pm 145.7	350	39 \pm 29.7	3	.3 \pm .6	106	11.8 \pm 11.1	24	37

Cuadro 6: Se observan los resultados de cada variable a lo largo de todo el año. Los números resaltados en dorado marcan los valores más altos, mientras que los números en azul representan a los valores más bajos.

Análisis de resultados

En este estudio trabajamos con organismos vivos a diferencia de Tavares (2008) quien trabaja con Boas "post-mortem". Existen escasos estudios con el género *Pituophis*, solamente Gribbins y Rheubert (2011), describen espermatozoides de las familias: Colubridae, Elapidae, Boidae, Leptotyphlopidae, Typhlopidae y Anomalepididae.

En nuestro estudio observamos que la motilidad de los espermatozoides de *Pituophis deppei deppei* es más elevada en el mes de Marzo con un 67% y en Mayo se presenta la más baja movilidad con 9.6%. Esto suponemos que es debido a que después de la cópula el organismo se concentra más en adquirir fuerza para su supervivencia que para llevar a cabo una buena movilidad espermática. M. Tourmente y colaboradores en el 2006, reportan parámetros de motilidad espermática para evaluar la calidad seminal de la Boa constrictora de occidente diciendo que alrededor del 63% de las células se movían. A diferencia de M. Tourmente y colaboradores, nosotros aportamos cual es el mes con mayor movilidad y el mes con menor movilidad.

En este trabajo se obtuvo una concentración espermática media de 1166.5×10^6 y el aspecto de los eyaculados de *Pituophis deppei deppei* era lechoso. Mendgen, et al., (1980) estudiaron a la especie *Elaphe guttata* y obtuvieron como resultados que esta especie tiene concentración espermática alta de: $\bar{x} = 852 \times 10^6 \pm 585 \times 10^6$ espermatozoides / ml, además aportaron que la eyaculación con apariencia blanca tenía concentraciones de espermatozoides significativamente mayores: $\bar{x} = 1,859 \times 10^6 \pm 1,008 \times 10^6$ espermatozoides que los eyaculados de color canela con $\bar{x} = 601 \times 10^6 \pm 439 \times 10^6$ células espermáticas / ml. Es así como sabemos que los eyaculados de *Pituophis deppei deppei* tienen una concentración espermática más baja que la especie *Elaphe guttata* y sus eyaculados siempre fueron de color lechoso.

En nuestro trabajo las anomalías de tipo 1 fueron muy escasas a lo largo de todo el año, lo cual nos indica que los ejemplares del Vivario están en muy buenas condiciones y aptos para reproducción, aunque las anomalías de tipo 2 fueron mayores, estas no repercuten, ya que estas se dieron por un cambio de temperatura al momento de extraer el eyaculado. Además agregamos en que mes del año hay mayor cantidad de anomalías de tipo 1 y 2. De las cuales, las anomalías de tipo 2 se observaron en los flagelos retorcidos incapaces de generar una buena movilidad. Mascorro et al., 2014, hicieron un estudio con 4 géneros de serpientes (Boa, Crotalus, Morelia y Pituophis) reportando que la respuesta al choque osmótico se visualizó en el hinchamiento de la membrana plasmática, en la región de la cabeza, pieza media y flagelo. Mendgen, et al., 1980 también obtuvieron resultados de anomalías espermáticas. En ambos estudios se describen las anomalías de los espermatozoides, sin embargo, nosotros también aportamos cuales son los meses con mayor y menor índice de anomalías e incluimos fotos demostrando diferencias entre espermatozoides normales y con anomalías primarias y secundarias.

Consideramos que para la especie *Pituophis deppei deppei*, estos resultados son muy preliminares en este campo de estudio, sin embargo, podemos plantear que los datos obtenidos en nuestro trabajo, denotan un gran avance, dada la escasez de información de dicha serpiente en el conocimiento de su biología reproductiva.

Conclusión:

Se logró determinar que el volumen de líquido seminal fue más abundante en Febrero y más escaso en Agosto. *Pituophis deppei deppei* almacena el líquido seminal en invierno para copular en primavera, además al tener buena temperatura y basta cantidad de alimento hasta la entrada del otoño, esta serpiente puede copular durante 6 meses (primavera-verano). El dato de concentración espermática fue mayor en Abril y menor en Mayo. Los primeros eyaculados después de la hibernación contienen mayor cantidad de espermatozoides. Se sabe que las Anormalidades Primarias se presentaron más en Abril ya que cuando estuvieron almacenados en riñón y testículos el ofidio estaba propenso a bajas temperaturas mientras que fueron escasas en Octubre, Diciembre y Enero por escasas de producción espermática. Además sabemos que las Anormalidades Secundarias se vieron a la alza en Noviembre y Julio por un choque osmótico al momento de extraer el eyaculado y a la baja en Mayo ya que el cambio de temperatura no fue tan drástico. Se logró evaluar características del semen de *Pituophis deppei deppei* en cautiverio durante un año y estos datos podrán ser usados para futuros proyectos que tengan como objetivo la reproducción y conservación de esta especie.

Referencias

- Aguiar y Di-Bernardo (2005). Reproduction of the water snake *Helicops infrataeniatus* (Colubridae) in southern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 26: 527-533.
- Aitken, R.J., Baker, M.A., and Nixon, B., (2015). Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress. *Asian J Androl.* 17(4): p. 633-9.
- Burbrink, F.T. and Crother, B.I., (2011). Evolution and Taxonomy of Snakes En: Robert D. Aldridge y David M. Sever (eds.) Reproductive biology and phylogeny of snakes. Enfield, NH, USA: Science Publishers. Pp. 21-43.
- Burnie, D. (2003). *Animal*. Dorling Kindersley, Londres. 624 pp.
- CONABIO. (2008). Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F. Capital Natural de México. Volumen 1.
- Depeiges, A. and Dacheux, J. L., (1985) "Acquisition of sperm motility and its maintenance during storage in the lizard, *Lacerta vivipara*," *J. Reprod. Fertil*, vol. 74, pp. 23-27.
- Derivaux J., (2000). Reproducción de los animales domesticos. Edit. Acribia. 504 p.
- Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Ciudad de México.
- Flores, V.O. y García, V.O., (2013). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84 pp.
- Fontanillas, P. J. García A., I. De Gaspar, S. (2000). Los reptiles: Biología, comportamiento y patología. Mundi Prensa, México, D. F. 160 pp.
- Graves, E., (2005) .Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory. *Journal of Assited Reproduction and Genetics*, No. 5: 219-225 pp.
- Gribbins, M. and Rheubert, L. J., (2011). The ophidian testis, spermatogenesis, and mature spermatozoa. En: Robert D. Aldridge y David M. Sever (eds.) Reproductive biology and phylogeny of snakes. Enfield, NH, USA: Science Publishers. Pp. 183-258.
- Hiatt, S. (1998). The Pituophis Page, the Online Reference Guide to Snakes of the Genus Pituophis. USA. 123 pp.
- Lanka, V. Y VIT. 1991. Anfibios y Reptiles. SUSAETA, S. A., Madrid. 1-224 pp.
- Mascorro, F.G., Álvarez A., Bautista, M., Girón, D. y Ramírez, L.M., (2014). Osmolaridad del espermatozoide de los reptiles. Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal.

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, México. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA 6. 218-225 pp.

Mascorro, F. G., Alvarez, T. A., Bautista, M., Giron, D. y Ramirez, L. M., (2014). Diluciones como método de conservación de semen del genero *Crotalus*. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal 4,97.99 pp.

Mengden, A.G., Platz, C.G., Hubbard, R, and Quinn, H., (1980). Insemination in Snakes. En: Murphy, J.B. (Ed.) Reproductive biology and diseases of captive reptiles. Oxford, Ohio, USA: Society for the study of amphibians and reptiles. Pp 71-78

OMS., (2010) Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 162 pp.

Prasad, M. J., and Reddy T.S., (2016). The segment sexual of reptils. Laboratory of reproduction Masachusetts.183 pp.

Proceso espermatogénico. (2012). Referencias electrónicas. Recuperado de: www.espermedhub.mx

Ramírez, B. A. y Hernández, I. X., (2004). Ficha técnica de *Pituophis deppei*. En: Arizmendi M.C. (compilador). Sistemática e historia natural de algunos anfibios y reptiles de México. Herpetological Review 33:203-204 pp.

Red List., (2007). Electronic references. Recuperado de: <https://www.iucn.org/content/more-species-threatened-2007-iucn-red-list>

Simon, C.O., Jamieson, B.G., and Scheltinga, D.M., (1996). The ultrastructure of spermatozoa of Squamata. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae (Reptilia). Herpetologica, 52:216-241pp.

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. SEMARNAT. (2001).

López, Soledad M, Giraudo, Alejandro R, Arzamendia, Vanesa y Chiaraviglio, Margarita. (2009). Biología reproductiva de la serpiente semiacuática *Liophis semiaureus* (Serpentes, Colubridae) en el nordeste de Argentina. Revista chilena de historia natural, 82(2), 233-244.

M. Villagrán-Santa Cruz, F. R. Méndez-de la Cruz y L. Parra-Gómez. (1994). "Ciclo espermatogénico del lacertilio *Sceloporus mucronatus* (Reptilia: Phrynosomatidae)," Revista de Biología Tropical, vol. 42, pp.289-296.

Tavares, B. L., Colli, G.R. and Bao, S. N. (2008). The evolution of sperm ultrastructure among Boidae (Serpentes), Zoomorphology. 127:189-202pp.

Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E., Giojalas, L. and Chiaraviglio, M. (2009). Sperm competition and reproductive mode influence sperm dimensions and structure among snakes, Evolution, 63:2513-2524pp.

Urbina, J. N. y Reynoso, V. H. (2005). Recambio de anfibios y reptiles en el gradiente potrero-borde-interior de la selva en la Reserva de Los Tuxtlas, Veracruz, México. In Sobre diversidad biológica: el significado de las diversidades alfa, beta y gamma, G. Halffter, J. Soberón, P. Koleff y A. Melic (eds.). Monografías 3er Milenio, CONABIO/ CONACYT, México, D.F. /SEA / Diversitas, Zaragoza. p 191-208.

Uribe, P., Ramírez, B. y Casas, A.G. (1999). Anfibios y reptiles de las serranías del Distrito Federal, Cuadernos 32, Instituto de Biología, UNAM, México, D.F.

Zug, G. R., Vitt L. J. and Caldwell J. P. (2001). Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles, second edition. Academic, New York. 630 p.



