



ARTÍCULO ORIGINAL

## Descripción morfológica de gónadas y células sexuales de dos especies de ranas cubanas del género *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae)

*Morphological description of gonads and sexual cells in two species of Cuban frogs of genus Eleutherodactylus (Anura: Eleutherodactylidae)*

Ligsuan Casas Guillama<sup>1\*</sup>, Yamilka Rodríguez<sup>2</sup>, Ana Sanz<sup>2</sup>, Reyna Lara<sup>3</sup>, María de Lourdes Segura<sup>3</sup> y Luis Felipe Jiménez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Neuromorfología, Centro Internacional de Restauración Neurológica, Cuba

<sup>2</sup> Departamento Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>3</sup> Departamento de Biología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

\* Autor para correspondencia: [lcasas@neuro.ciren.cu](mailto:lcasas@neuro.ciren.cu)

### RESUMEN

El género *Eleutherodactylus* posee un 98% de endemismo en Cuba. Son muchas las interrogantes sobre la biología reproductiva de las especies que lo componen, por lo que nuestro objetivo es describir la morfología de las gónadas y de las células sexuales a través de microscopía clásica y electrónica de transmisión de dos especies del género *Eleutherodactylus goini* y *E. zugi*. Las especies fueron recolectadas en la provincia de Pinar del Río y procesadas a través de métodos de histología para microscopía óptica y electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos muestran que las hembras carecen de pigmentación en los ovarios, el citoplasma es homogéneo en cada estadio de desarrollo folicular y los ovocitos previtelogénicos presentaron numerosos nucléolos. En el caso de los machos se observó una túnica albugínea pigmentada en *E. zugi* y transparente en *E. goini*, lo que puede deberse a que a pesar de ser una especie que habita en la hojarasca de zonas boscosas, realiza vocalizaciones durante el día en busca de pareja. El desarrollo espermatogénico es por cistos, donde los espermatoцитos primarios eran las células más grandes. En los espermatozoides maduros se observó una ultraestructura semejante en ambas especies: ausencia de perforatorio y cono subacrosómico, cuello corto solo visible al Microscopio Electrónico de Transmisión, microtúbulos del axonema sin brazos de dineína y una membrana ondulante como estructura accesoria de la cola.

**Palabras Claves:** reproducción, ovocitos, espermatozoides.

### ABSTRACT

*The genus Eleutherodactylus possesses 98% of endemism in Cuba. There are many questions about the reproductive biology of the species that compose it, so our aim is to describe the morphology of the gonads and sexual cells through classical and transmission electron microscopy of two species of the genus Eleutherodactylus goini and E. zugi. The species were collected in the*

Recibido: 2014-06-09

Aceptado: 2014-07-11

province of Pinar del Río and processed by histological methods for optical and transmission electron microscopy. The results show that females lack of pigmentation in the ovaries, the cytoplasm is homogeneous at each stage of follicular development and presented numerous nucleoli of oocytes. For males, the tunica albuginea was pigmented in *E. zugi* and transparent in *E. goini*, which may be because *E. zugi* despite being woodland litter specie makes vocalizations during the day for mates. Spermatogenic development is by cysts where primary spermatocytes were larger cells. In such a mature spermatozoa was observed the same ultrastructure in both species: no perforatorium and subacrosomal cone, short neck only visible by Transmission Electron Microscope, axoneme microtubules without dynein arms, an undulating membrane as accessory structure of the tail.

**Keywords:** reproduction, oocytes, sperm

## INTRODUCCIÓN

El género *Eleutherodactylus* es el único en Cuba dentro de la familia Eleutherodactylidae. Con un 98% de endemismo en la isla, los individuos que lo componen poseen características que les han permitido ocupar una gran diversidad de nichos ecológicos facilitando su amplia distribución (Hedges *et al.*, 2008). La tendencia a tener una mayor independencia en tierra, trajo como resultado la producción de huevos con una mayor cantidad de vitelo, además de la reducción del número de huevos por puestas, siendo especies de desarrollo directo (Salthe y Duellman, 1973).

En Cuba, las temáticas abordadas sobre el género han estado enfocadas hacia investigaciones de sistemática (Díaz *et al.*, 2003), bioacústica (Rodríguez, 2002) y relaciones filogenéticas (Schmidt *et al.*, 2010). Entre los vertebrados, la estructura de las gónadas es similar en los aspectos básicos (Estrada y Uribe, 2002), pero en los anfibios se han encontrado diferencias que son utilizadas por los investigadores para contribuir a comprender las relaciones que existen en este grupo zoológico (Tries, 1995). Los aspectos relacionados con la biología reproductora y específicamente los morfológicos de las gónadas del género *Eleutherodactylus* han sido tratados por Fontaine (2005), Rodríguez (2008) y en el ciclo reproductor de *E. planirostris* (Iturriaga, 2007). Aun así, son muchas las interrogantes que abundan sobre el tema, por lo que el objetivo de este trabajo es describir por primera vez la morfología de las gónadas y de las células sexuales a través de histología clásica y electrónica de dos especies del género *Eleutherodactylus*: *E. goini* y *E. zugi*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron dos animales adultos de cada sexo de las especies *E. goini* y *E. zugi* durante la temporada lluviosa de Cuba, por lo que deben encontrarse en

etapa reproductora. Las localidades seleccionadas pertenecen a la provincia Pinar del Río, siendo las siguientes: en Sierra de Canalete municipio La Palma (22.68 N, -83.56 W) fue colectada *E. goini* en junio de 2010, mientras que *E. zugi* fue colectada en El Salto, Sierra del Rosario (22.86 N, -83.21 W), en julio de 2011.

Para la descripción de las gónadas se empleó la técnica clásica para microscopía óptica la cual se inició con la fijación en paraformaldehído al 4% en PBS (0,01 M, pH 7,6), durante 48 horas de las gónadas derechas. Luego se deshidrató empleando soluciones de alcohol etílico de graduación creciente desde el 70 hasta el 100%, realizando dos pases de 30 minutos cada uno. El aclarado se llevó a cabo en dos pases por xilol I y II de 30 minutos cada uno. La infiltración-inclusión se realizó en parafina-xilol en un baño a 58 °C. Los cortes de 3 µm aproximadamente de grosor se realizaron con ayuda de un micrótopo vertical de rotación manual. Posteriormente, se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina. Después de realizada la tinción, la preparación se montó utilizando bálsamo de Canadá. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico, utilizándose objetivos de 20, 40, 60 y 100X.

Para la descripción de la ultraestructura de las células sexuales se utilizó la técnica para microscopía electrónica de transmisión. Las gónadas izquierdas se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato a pH 7,4, donde se mantuvo de 24 a 48 h hasta su traslado al laboratorio de Nanobiología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), donde se realizó el resto del procesamiento del material. Una vez en el laboratorio, se realizaron tres lavados a las muestras de cinco minutos cada uno con PBS 1X. Luego de efectuarse la fijación se

realizó una postfijación utilizando tetraóxido de osmio al 1% durante una hora. La deshidratación fue en una serie de alcohol etílico de concentración creciente: 30-96%, durante diez minutos cada uno, tres pases por alcohol al 100%, durante cinco minutos cada uno y tres lavados con óxido de propileno al 100%, por cinco minutos cada uno. La preinclusión se llevó a cabo en una mezcla de óxido de propileno-resina epóxica en una proporción 1:1 por 24 h. Los bloques obtenidos fueron cortados en un ultramicrotomo, utilizando cuchillas de vidrio para los cortes semifinos (200-500 nm) y de diamante para los cortes ultrafinos (40-60 nm).

Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina. Para verificar la efectividad del procesamiento en cuanto a la calidad del material y seleccionar las zonas de interés, las preparaciones fueron observadas en un microscopio de campo claro con objetivos de 20, 40, 60 y 100X. Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo al 0,3%. Las rejillas contrastadas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL JEM 1010 que opera a 80 kV y permite el registro digital de las imágenes.

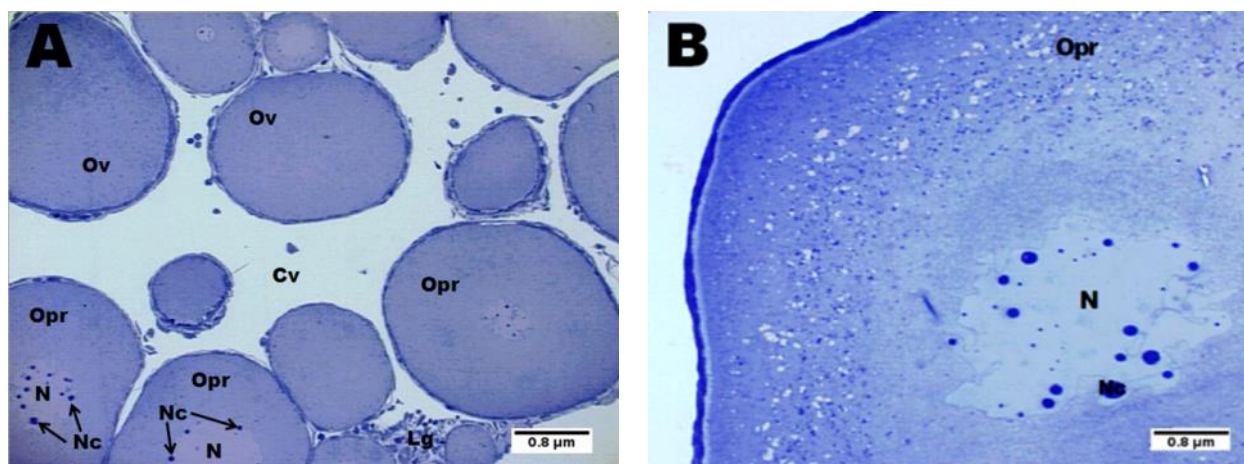
## RESULTADOS

### Descripción de las gónadas de las hembras

En las dos especies, los ovarios se observaron traslúcidos y no presentaron pigmentos en su cubierta externa. Su forma fue de racimos con ovocitos en diferentes estadios (Fig. 1A). La presencia de ovocitos previtelogénicos hasta los postvitelogénicos avanzados confirmó que las hembras colectadas se encontraban en un estado reproductor avanzado, siendo los más abundantes los vitelogénicos. También se observaron ovocitos postvitelogénicos.

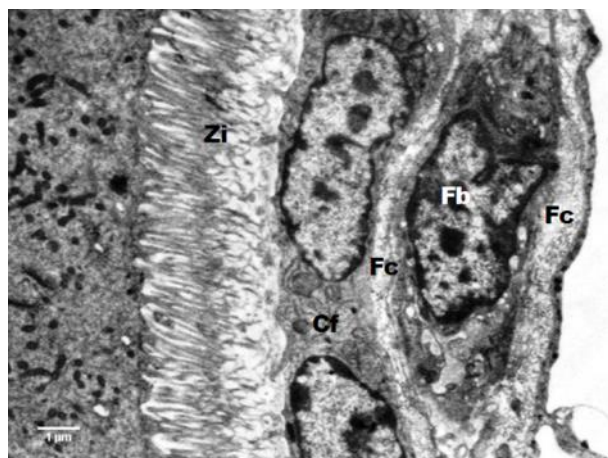
Los ovarios estuvieron cubiertos por un epitelio germinativo y se observó una cavidad central (Fig. 1A). Hacia la periferia ovárica se encontraron ovocitos previtelogénicos con muy poco nivel de desarrollo. Todos los ovocitos presentaron una membrana vitelina (zona de interacción), además de la membrana plasmática (Fig. 1B).

A continuación se observaron células foliculares que permanecen en un solo estrato en los tres estadios de desarrollo. A estas células foliculares a su vez las cubre una teca, la cual al MET se observó formada por tejido conectivo con fibroblastos, vasos sanguíneos y fibras colágenas (Fig. 2).



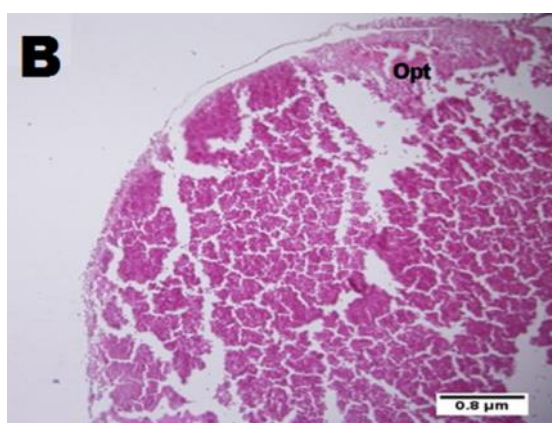
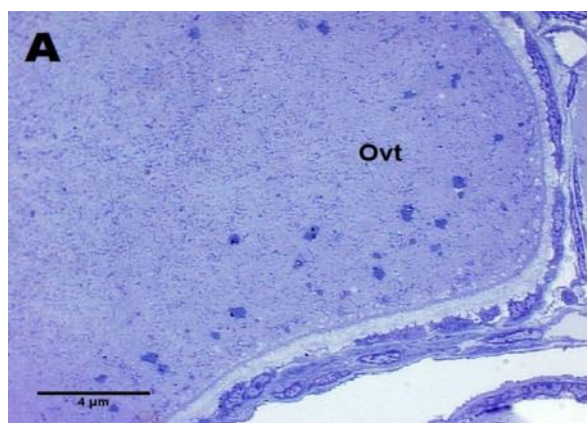
**Figura 1:** Fotomicrografías obtenidas de cortes de ovarios de especies del género *Eleutherodactylus* teñidos con azul de toluidina: A. *Eleutherodactylus goini* donde se observa: Cv- cavidad central, Opr- ovocito previtelogénico, N- núcleo, Nc- nucléolos, Ov- ovocito vitelogénico y Lg-lecho germinal. B. *Eleutherodactylus zugii*, donde se evidencia un ovocito previtelogénico-Opr, N- núcleo y Nc- nucléolos.

Figure 1: Photomicrographies from ovary slices of species of genus *Eleutherodactylus* dyed with toluidine blue: A. *Eleutherodactylus goini* where it is shown: Cv- central cavity, Opr- previtelogenic ovocyte, N- nucleus, Nc- nucleolus, Ov- vitelogenic ovocyte and Lg-germinal bed. B. *Eleutherodactylus zugii*, where is evident a previtelogenic ovocyte -Opr, N- nucleus and Nc- nucleolus.



**Figura 2:** Fotomicrografías de ovocito previtelogénico obtenido de cortes de ovarios teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo de *Eleutherodactylus zugi*, mostrándose Fb-fibroblasto, Fc- fibras de colágeno, Cf- células foliculares y Zi - membrana vitelina (zona de interacción).

Figure 2. Photomicrographies of previtellogenic oocyte obtained from ovarian sections stained with lead citrate and uranyl acetate of *Eleutherodactylus zugi*, showing Fb-fibroblast, Fc-collagen fibers, Cf-follicular cells and Zi-vitelline membrane (interaction zone).



**Figura 3:** Fotomicrografías obtenidas de cortes ovocitos de *Eleutherodactylus goini*. A: Ovocito vitelogénico teñido con azul de toluidina (Ovt). B: Ovocito postvitelogénico teñido con hematoxilina-eosina (Opt).

Figura 3: Photomicrographies obtained from cuts of oocytes from *Eleutherodactylus goini*. A: Vitellogenic oocyte stained with toluidine blue (Ovt). B: Postvitellogenic oocyte stained with hematoxylin-eosine (Opt).

En los ovocitos previtelogénicos el MET evidenció un núcleo irregular y voluminoso en posición central. También se mostró hacia el interior del núcleo la presencia de numerosos nucléolos cuya distribución fue en la mayoría de los cortes hacia la envoltura nuclear (Fig. 1B).

Los ovocitos vitelogénicos fueron fáciles de reconocer debido a que la cubierta de células foliculares estuvo muy unida a las células de la teca. El citoplasma de estos ovocitos se apreció muy abundante y mostró una acumulación progresiva de vitelo en forma de plaquetas vitelinas, desde la periferia de la célula hacia el citoplasma que rodea al núcleo. En el caso de los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, el citoplasma fue de un azul más oscuro hacia la zona del núcleo que hacia la periferia (Fig. 3A). Posteriormente, las

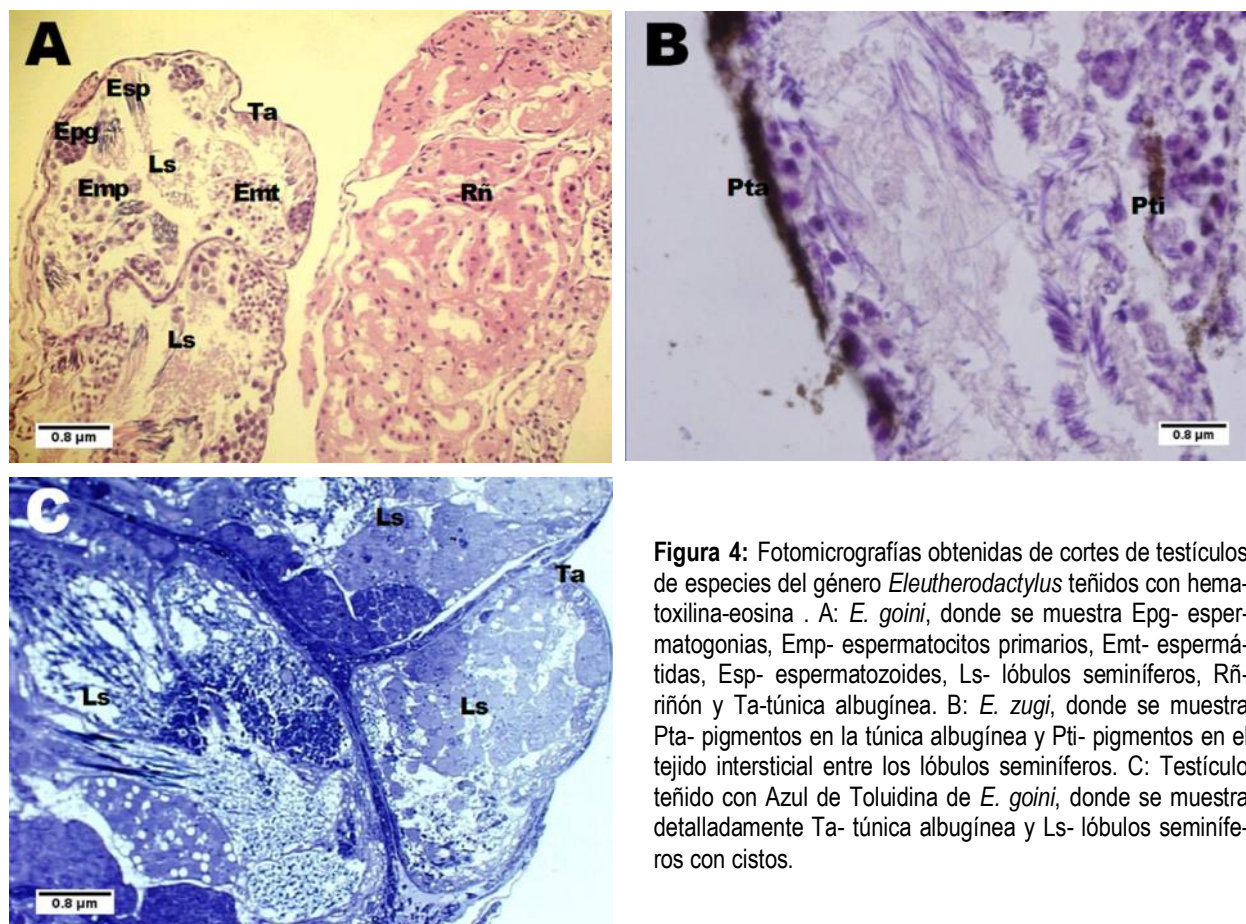
plaquetas aumentan en número y en tamaño, es en este momento donde el folículo se encuentra en etapa ovulatoria.

Los ovocitos postvitelogénicos fueron los de mayor tamaño, encontrándose en la capa granulosa las células foliculares muy aplanadas y la teca externa rodeando todo el folículo. En el citoplasma se observaron abundantes plaquetas vitelinas de gran tamaño (Fig. 3B).

#### Descripción de las gónadas de los machos.

Los testículos se encontraron recubiertos por la túnica albugínea, la cual desde su posición periférica penetra un poco hacia la gónada, y envuelve a numerosos compartimientos en su interior que son los denominados lóbulos seminíferos, de forma hexagonal.





**Figura 4:** Fotomicrografías obtenidas de cortes de testículos de especies del género *Eleutherodactylus* teñidos con hematoxilina-eosina. A: *E. goini*, donde se muestra Epg- espermatogonias, Emp- espermatocitos primarios, Emt- espermátidas, Esp- espermatozoides, Ls- lóbulos seminíferos, Rñ- riñón y Ta- túnica albugínea. B: *E. zugi*, donde se muestra Pta- pigmentos en la túnica albugínea y Pti- pigmentos en el tejido intersticial entre los lóbulos seminíferos. C: Testículo teñido con Azul de Toluidina de *E. goini*, donde se muestra detalladamente Ta- túnica albugínea y Ls- lóbulos seminíferos con cistos.

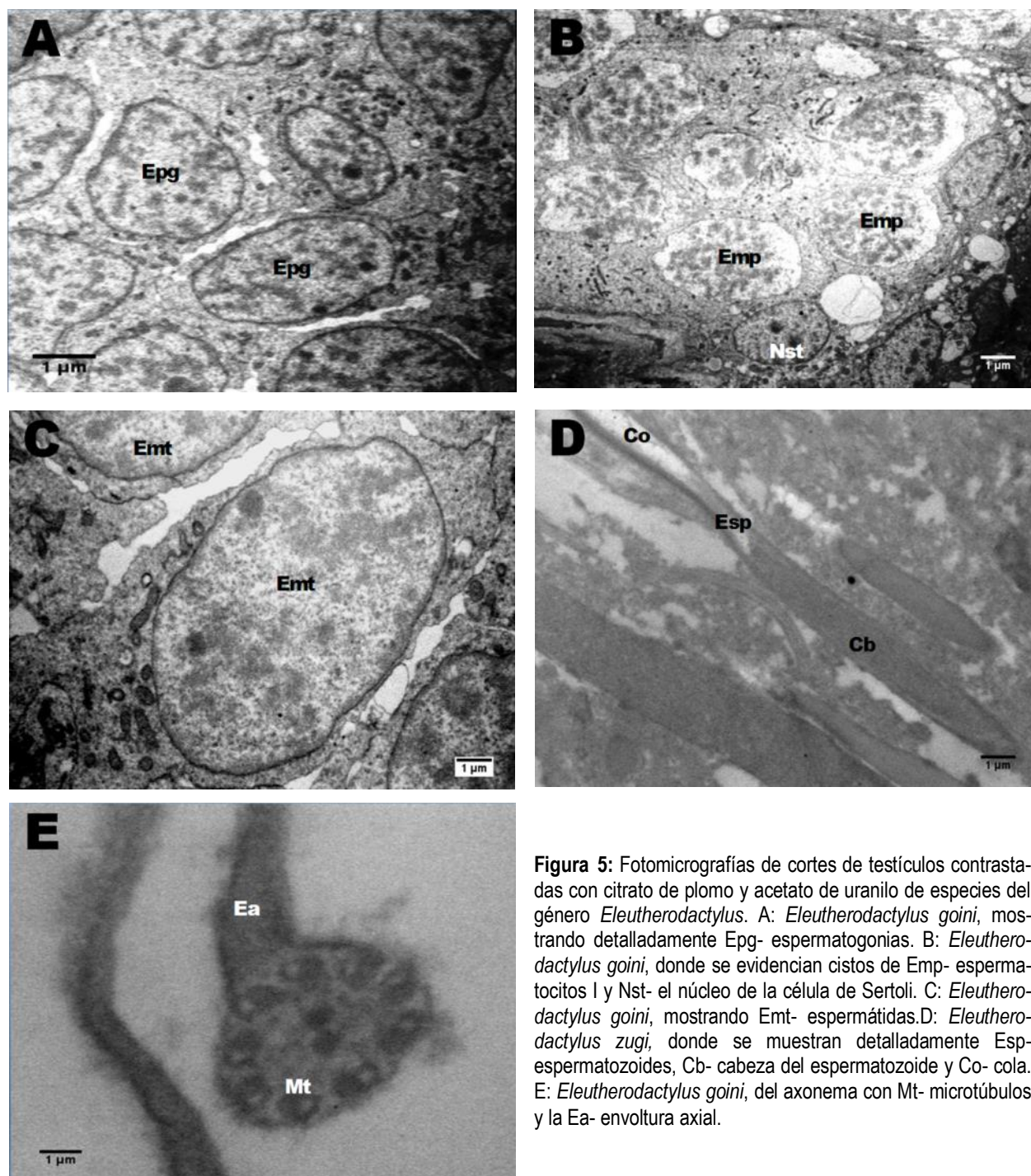
Figure 4: Photomicrographies from testicles slices of species of genus *Eleutherodactylus* dyed with hematoxilin-eosine. A: *E. goini*, showing Epg- spermatogonies, Emp- primary spermatocyte, Emt- spermatids, Esp- spermatozoon, Ls- seminiferous lobe, Rñ- kidney and Ta- albugineus tunic. B: *E. zugi*, showing Pta- pigment in albugineus tunic and Pti- pigments in interstitial tissue between seminiferous lobe. C: Testicle dyed with Toluidine blue of *E. goini*, showing in detail Ta- albugineus tunic and Ls- seminiferous lobe with cistos.

La túnica se observó transparente en *E. goini* (Fig. 4A), mientras que en *E. zugi* estaba pigmentada (Fig. 4B). En el interior de los lóbulos seminíferos el patrón espermatogénico observado fue por cistos (Fig 4A y 4C).

Las células de Sertoli que componen cada cisto, en íntima relación con las células sexuales, fueron grandes, con abundante citoplasma y un gran núcleo (Fig. 5B), además de observarse presencia de nucléolos. En las dos especies se distinguieron cistos de espermatogonias, espermatocitos I (primarios), espermátidas y espermatozoides, los cuales se describen a continuación.

Las espermatogonias se encontraron cercanas a la membrana basal del lóbulo seminífero, y fueron células grandes, de forma esférica y con un núcleo circular

(Fig. 5A). Los espermatocitos I (Fig. 5B) fueron células grandes y esféricas, de hecho, las de mayor tamaño observadas en el interior de los cistos. Presentaron núcleos redondeados, de un tamaño más pequeño que el de las espermatogonias y abundantes mitocondrias en su citoplasma. Las espermátidas fueron células redondeadas (Fig. 5C) y se ubicaron hacia el centro del lóbulo seminífero. Estas células presentaron un núcleo que ocupó casi todo su interior. Se observaron los tres estadios de desarrollo: espermátidas tempranas, intermedias y tardías, los cuales se identificaron sobre la base de un aumento gradual en la compactación de la cromatina. Las espermátidas tardías presentaron un núcleo muy electrondenso.



**Figura 5:** Fotomicrografías de cortes de testículos contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo de especies del género *Eleutherodactylus*. A: *Eleutherodactylus goini*, mostrando detalladamente Epg- espermatogonias. B: *Eleutherodactylus goini*, donde se evidencian cistos de Emp- espermatocitos I y Nst- el núcleo de la célula de Sertoli. C: *Eleutherodactylus goini*, mostrando Emt- espermátidas. D: *Eleutherodactylus zugii*, donde se muestran detalladamente Esp- espermatozoides, Cb- cabeza del espermatozoide y Co- cola. E: *Eleutherodactylus goini*, del axonema con Mt- microtúbulos y la Ea- envoltura axial.

Figure 5: Photomicrographies of testicles cuts of species of the genus *Eleutherodactylus* contrasted with uranyl acetate and lead citrate. A: *Eleutherodactylus goini*, showing detailed Epg - spermatogonia. B: *Eleutherodactylus goini* where is evident cysts of Emp - spermatocytes I and Nst - nucleus of Sertoli cell. C: *Eleutherodactylus goini*, showing Emt- espermátidas. D: *Eleutherodactylus zugii*, showing in detail Esp- sperm, Cb - head of the sperm and Co-tail. E: *Eleutherodactylus goini*, of the axoneme with Mt - microtubules and Ea - axial sheath.

Los espermatozoides se observaron alargados ubicados en ramilletes y orientados en la misma dirección. En ellos se observaron la cabeza, la cola (Fig. 5D) y una zona correspondiente al cuello situada entre estas dos. En la región de la cabeza se encuentra el núcleo y el acrosoma, el primero muy teñido debido a la elevada compactación de la cromatina en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina y muy electrodensos al MET. No se observó perforatorio ni cono subacrosómico en ninguna de las dos especies (Fig. 5D). Entre la cabeza y la cola se observó el cuello, extremadamente corto y solo distinguible al MET. Presentó escaso citoplasma y los centríolos proximal y distal posicionados perpendicularmente uno respecto al otro (Fig. 5D). La cola o flagelo, estuvo formada por un axonema y una membrana ondulante como estructura accesoria. En el axonema, en un corte transversal, no se observaron los dobletes conectados por brazos de dineína en los nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos. (Fig. 5E). La membrana ondulante en sección transversal estuvo formada por una fibra yuxtaxonemal asociada al axonema, una vaina o envoltura axial y una fibra axial.

## DISCUSIÓN

### Descripción de las gónadas de las hembras

La ausencia de pigmentos en la cubierta externa de los ovarios de las dos especies es un carácter destacable puesto que existen diferentes patrones de pigmentación en los anfibios. Por ejemplo, Fontaine (2005) encontró pigmentos en la capa que rodea al ovario en *E. glamyrus*. Por su parte, Sharon *et al.* (1997) al describir los ovarios de una especie de salamandra encontraron que era translúcida. A la pigmentación oscura del ovario y de otros órganos donde puede encontrarse, se le atribuye la función de protección frente a las radiaciones ultravioletas provenientes del sol. Como *E. goini*, habita en el suelo y en las oquedades de las rocas y presenta hábitos nocturnos, entonces los resultados son coherentes con sus hábitos de vida. En otras especies de anfibios anuros aparece una concentración de pigmentos en la zona correspondiente al polo animal del huevo, a la cual se le atribuye una función protectora frente a los rayos ultravioleta (Gilbert, 2006).

En cuanto a los tres estadios de desarrollo de los ovocitos, en los previtelogénicos, la presencia de gran cantidad de nucléolos observado en los cortes de *E.*

*goini*, puede deberse a que estos orgánulos garantizan los componentes de ARN ribosomal para la síntesis proteica que se dispara al inicio del desarrollo del embrión y que son aportados por el citoplasma materno (Gilbert, 2006).

Con relación a los ovocitos vitelogénicos vistos al microscopio de campo claro, resalta la acumulación progresiva de vitelo en ellos, en forma de plaquetas, desde la periferia hasta la zona de citoplasma cercana al núcleo. Las plaquetas con la tinción de hematoxilina-eosina se ven rosadas intensas y en los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, de un azul muy oscuro. También De Oliveira y De Souza (2004), en ovocitos vitelogénicos notan una ubicación periférica de las plaquetas vitelinas.

### Descripción de las gónadas de los machos

La túnica albugínea pigmentada en *E. zugi*, a diferencia de la transparente en *E. goini*, puede deberse a que a pesar de ser una especie que habita en la hojarasca de zonas boscosas, realiza vocalizaciones durante el día en busca de pareja según observaciones de campo. De Oliveira *et al.* (2002) consideran que la pigmentación de los testículos es una característica poco usual en los anuros. En el sapo *Xenopus laevis* y en otros vertebrados no mamíferos, las células con pigmentos pueden encontrarse en diferentes órganos, constituyendo un sistema de pigmentación extracutánea de función desconocida (Ogielska, 2009).

El hecho de encontrarse células sexuales en todos los estadios de la espermatogénesis en el interior de los testículos, confirma que los animales colectados estaban en plena etapa reproductiva, lo que coincide con lo encontrado por Iturriaga (2007). Este autor describió un ciclo reproductivo discontinuo en *E. planirostris*, con un aumento de la actividad espermatogénica durante los meses de verano. Es precisamente en estos meses donde se realizó la recolecta de los ejemplares utilizados en este estudio.

Los espermatoцитos I fueron las células más grandes de todos los estadios descritos, al igual que lo encontrado por otros autores (De Oliveira y De Souza, 2004). Esto puede deberse a que en este estadio la célula que se encuentra en el momento de la espermatogénesis denominado etapa de crecimiento. Sin embargo, Uribe (2003b) informa en sus trabajos que las células mayores fueron las espermatogonias. No se encontraron evidencias en este trabajo de espermatoцитos II lo cual



puede deberse a que son escasas en los cistos pues la primera división de maduración es muy rápida (Uribe, 2003a).

Las células de Sertoli fueron observadas en el interior de todos los cistos en las dos especies estudiadas, incluso en aquellos cercanos al lumen del lóbulo seminífero donde se liberaban los espermatozoides. Estas células son una característica permanente en la mayoría de los vertebrados (Paniagua, 2002; Smita *et al.*, 2004; Gilbert, 2006). Sin embargo, Pudney (1999) consideró que cuando se liberaban los espermatozoides producidos en los cistos hacia el lumen del lóbulo, las células de Sertoli que los acompañaban degeneraban.

En otras especies de anuros los espermatozoides tienen todos los elementos descritos en este estudio, aunque la forma puede variar. El espermatozoide maduro de *Epipedobates flavopictus* (Dendrobatidae) es también filiforme pero la cabeza es moderadamente curva y proporcionalmente del mismo tamaño que la cola (Garda *et al.*, 2002). Costa *et al.* (2004) al comparar los espermatozoides de tres especies del género *Phyllomedusa* plantearon que son alargados y filiformes, con tres regiones distinguibles: cabeza (con acrosoma y núcleo), cuello y cola; la cabeza es ligeramente curva a diferencia de lo encontrado en el presente trabajo.

La ausencia de perforatorio y cono subacrosómico en el acrosoma de los espermatozoides de las especies estudiadas puede ser explicada como un carácter evolucionado. En este sentido, Kwon y Lee (1995) consideran que el cono subacrosómico presente en el espermatozoide de *Ascaphus* (anuro primitivo) es característico de los urodelos pero no está presente en la mayoría de los anuros. Garda *et al.* (2004), al analizar la ultraestructura de los espermatozoides de varias especies pertenecientes a tres géneros de la familia Hylidae, observaron un cono subacrosómico en una de ellas mientras que las otras dos poseen solo remanentes de esta estructura. Sin embargo, Jamieson *et al.* (1993) refirieron que este tipo de estructura puede estar presente en los espermatozoides de algunos amniotas, lo cual puede interpretarse como una divergencia para este carácter. Al referirse al perforatorio, Kwon y Lee (1995) afirman que las familias de anuros más evolucionados que los eleuterodactílidos, como Pipidae, Ranidae y Rhacophoridae carecen de este elemento, por lo que se puede inferir que la ausencia de un perforatorio es un carácter apomórfico

dentro de los anuros y que se ha ido simplificando hasta desaparecer durante su evolución hacia la vida terrestre.

La región del cuello solo se puede distinguir a nivel ultraestructural, pues es extremadamente corta, al igual que lo encontrado por Scheltinga *et al.* (2002) al describir once especies de la familia Microhylidae, y Costa *et al.* (2004) en tres especies del género *Phyllomedusa* de la familia Hylidae.

Acerca de la posición perpendicular que adoptan en la pieza de conexión o cuello los centriolos proximal y distal entre sí, Kwon y Lee (1995) plantean que la orientación de los centriolos varía y han pretendido relacionarla con la posición evolutiva de un grupo dado. Respecto a los anuros, distinguen tres tipos de orientación. Una primera donde los dos centriolos forman un ángulo de 70°, tomando en consideración que el centriolo proximal y el eje medio del espermatozoide son perpendiculares. Este tipo aparece en los miembros de la familia Myobatrachidae. En una segunda orientación, los dos centriolos están ubicados perpendicularmente, y es común en Bufonidae, Hylidae y Eleutherodactylidae, como ocurre en las dos especies que se discuten. Un tercer tipo incluye a los anuros más evolucionados, como las familias Ranidae y Pipidae, los cuales se caracterizan porque sus centriolos forman un ángulo de 140° por lo que estas características ultraestructurales del espermatozoide pudieran tener valor taxonómico al menos a nivel de género.

Las características ultraestructurales encontradas en la cola de los espermatozoides de estas especies, pueden relacionarse con el modo de reproducción que presentan los anuros y en general, los anfibios. Por ejemplo, en los microtúbulos del axonema de las dos especies en estudio los brazos de dineína estuvieron ausentes. Esto ha sido considerado como un carácter que aparece en los espermatozoides que tienen poca movilidad. A este efecto, Van Der Horst *et al.*, (1995) consideraron que las especies con modo terrestre de fertilización externa poseen espermatozoides inmóviles en un amplio rango de medios fisiológicos con concentraciones osmóticas que van desde los 10 hasta los 30 mOsm/kg. En los que muestran un modo acuático de fertilización, la movilidad del espermatozoide es importante para su locomoción hasta el ovocito de la hembra, aun cuando las cloacas del macho y la hembra estén muy próximas, de forma similar a lo observado en *Xenopus* (Ogielska, 2009). En los de fertilización terrestre los espermatozoides son liberados directamente



sobre los huevos, por lo que la necesidad de una locomoción vigorosa y mantenida en el tiempo no es tan necesaria como en los acuáticos.

La cola y la membrana ondulante descrita en este estudio se ha observado en numerosas especies de anuros. Sin embargo, varios casos de pérdida de la membrana ondulante han ocurrido durante la evolución de los anuros. Es posible que este carácter esté relacionado con la simplificación de elementos accesorios en la célula masculina, la cual va a tener una relación estructura-función muy precisa, pero que todavía está presente en los eleutherodactílicos.

### AGRADECIMIENTOS

A los profesores del Departamento de Biología Animal y Humana de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana, en especial a la técnico de laboratorio Aleida Romero por ayudar a realizar el procesamiento de las muestras, así como a la doctora Bárbara Estupiñán por el uso de su laboratorio para el corte y la tinción de las muestras en el departamento de Neuromorfología del Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). El procesamiento para microscopía electrónica se realizó gracias a un proyecto de investigación con la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Agradecemos a tres revisores anónimos que contribuyeron a mejorar la calidad del artículo.

### LITERATURA CITADA

- Costa, G. C., A. A. Garda, R. D. Teixeira, G. R. Colli *et al.* (2004) Comparative analysis of the sperm ultrastructure of three species of *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae) *Acta Zool.* (Stockholm) 85: 257-262.
- De Oliveira, C. y L. R. De Souza (2004) Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovaris* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). *Rev. Brasil. Zool.* 21(4): 919-923.
- De Oliveira, C., C. Zanetoni y R. Zierri (2002) Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Rev. Chilena Anat.* 20 (3): 263-268.
- Díaz, L. M.; A. Estrada y S. Blair Hedges (2003) A new riparian frog of the genus *Eleutherodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae) from Eastern Cuba. *Carib. J. Sci.* 39 (1-2): 63-71.
- Estrada, E. y M. C. Uribe (2002) Atlas de Histología de Vertebrados. Edit. UNAM. Ciudad México. 222 pp.
- Fontaine, Y. (2005) Morfología de las gónadas de ranitas cubanas del género *Eleutherodactylus*. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana.
- Garda, A. A.; G. R. Colli; O. Aguiar-Jr.; S. M. Recco-Pimentel *et al.* (2002) The ultrastructure of the spermatozoa of *Epipedobates flavopictus* (Amphibia, Anura, Dendrobatidae), with comments on its evolutionary significance. *Tissue & Cell* 34(5): 356-364.
- Garda, A. A.; G. C. Costa; G. R. Colli y S. N. Bão (2004) The spermatozoa of Pseudinae (Amphibia, Anura, Hylidae), with a test of hypothesis that sperm ultrastructure correlates with reproductive modes in anurans. *J. Morphol.* 261: 196-205.
- Gilbert, S. F. (2006) Developmental Biology. Carol Wigg (Ed.) 8va. Ed., Sinauer Associates Inc., Massachusetts, E.U.A. 817 pp.
- Hedges, S. B., W. E. Duellman y M. P. Heinicke (2008) New World direct developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737: 1-182.
- Iturriaga, M. (2007) Ciclo gonadal y de los cuerpos grasos de *Eleutherodactylus planirostris* (Anura: Leptodactylidae) en Ciudad de la Habana. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana.
- Jamieson, B. G. M.; M. S. Y. Lee y K. Long (1993) Ultrastructure of the spermatozoon of the internally fertilizing frog *Ascapheus truei* (Ascapidae: Anura: Amphibia) with phylogenetic considerations. *Herpetologica* 49: 52-65.
- Kwon, A. S. y Y. H. Lee (1995) Comparative spermatology of anuran with special references to phylogeny. En: Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. B. G. M. Jamieson, J. Ausio y J. L. Justine (Eds) Mem. Muséum National d'Histoire Naturelle. 166: 321-332.
- Ogielska, M. (2009) Reproduction of Amphibian, E.U.A., Science Publishers, Enfield, 436 pp.
- Paniagua, P. (2002) Citología e histología vegetal y animal. McGraw-Hill Interamericana, España. 3era. Edición. 1002 pp.
- Pudney, J. (1999) Leydig and Sertoli cells, nonmammalian. En: Encyclopaedia of reproduction. E. Knobil y J. D. Neill (Eds.). Academic Press, Nueva York. pp.:1008-1020.
- Rodríguez, A. (2002) Variación intraespecífica en la llamada de anuncio de *Eleutherodactylus auriculatus* (Anura: Leptodactylidae) en la Isla de Cuba. Tesis de Maestría. Universidad de La Habana.
- Rodríguez, Y. (2008) Morfología de las gónadas de cuatro especies del género *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae). Tesis de Doctorado. Universidad de La Habana.
- Salthe, S. N y W. E. Duellman (1973) Quantitative constraints associated with reproductive mode in anurans, En: Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems. J. L. Vial (Ed.). Columbia: Univ. Missouri Press. Pp.: 229-249.
- Scheltinga, D. M., B. G. M. Jamieson, D. P. Bickford, A. A. Garda, *et al.* (2002) Morphology of the spermatozoa of the Microhylidae (Anura, Amphibia). *Acta Zool.* 83: 263-275.
- Schmidt, M., C. Steinlen, J. P. Bogart, W. Feichtinger, *et al.* (2010) The chromosomes of Terraranan Frogs. Insights into Vertebrate Cytogenetics. Edit Kanger. 568 pp.
- Sharon, R., G. Degani y M. R. Warburg (1997) Oogenesis and the

- ovarian cycle in *Salamandra salamandra infraimmaculata* Mertens (Amphibia: Urodela: Salamandridae) in fringe areas of the taxon's distribution. *Journal of Morphology* 231: 149-160.
- Smita, M., O. V. Oommen, M. G. Jancy y M. A. Akbarsha (2004) Stages in spermatogenesis of two species of caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Uraeotyphlus cf. narayani* (Amphibia: Gymnophiona): light and electron microscopy study. *J. Morphol.* 261: 92-104.
- Tries, R. (1995) *Morphology of Vertebrate Sperm*. Pergamon Press. 504 pp.
- Uribe, M. C. (2003a) Reproductive biology and phylogeny of Urodela. The testes, spermatogenesis and male reproductive ducts. H. M. Dutta y J.S. Datta Munshi (Eds.) Science Publishers, Inc. pp.: 183-202.
- Uribe, M. C. (2003b) Vertebrate Functional Morphology. Reproductive Systems of Caudata Amphibia. Sci. Pub. Inc. 267-293.
- Van Der Horst, G; B. Wilson y A. Channing (1995) Amphibian sperm: phylogeny and fertilization environment. En: *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. B. G. M. Jamieson, J. Ausio y J. L. Justine (Eds). Mem. Muséum National d'Histoire Naturelle. 166: 333-342.

• • •

**Editor para correspondencia:** Dr. Ariam Jiménez Reyes