



CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

Aportes al conocimiento de la morfología microscópica de las gónadas de anfibios y reptiles cubanos

Ana Clara Sanz Ochotorena ^{1*} <http://orcid.org/0000-0002-5124-3905>
Yamilka Rodríguez Gómez ¹ <http://orcid.org/0000-0002-4861-7806>
María de Lourdes Segura Valdéz ² <http://orcid.org/0000-0001-6462-7775>
Luis Felipe Jiménez García ² <http://orcid.org/0000-0003-2368-2975>
Reyna Lara Martínez ² <http://orcid.org/0000-0003-2708-573X>
Manuel Iturriaga Monsisbay ³ <http://orcid.org/0000-0003-0231-1366>
Tomás Michel Rodríguez Cabrera ³ <http://orcid.org/0000-0001-5905-4730>

¹Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

²Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México

³Instituto de Ecología y Sistemática (IES). La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: anita@fbio.uh.cu, ochotorena26@yahoo.com

RESUMEN

Palabras clave

histología; ultraestructura; ovogénesis; espermatogénesis

Introducción: Se reconoce la importancia ecológica de los anfibios y reptiles, vitales en el funcionamiento de los ecosistemas y con patrones de reproducción diversos. No existen muchos estudios en biología de la reproducción en especies cubanas. El objetivo es mostrar el impacto de los estudios histológicos y ultraestructurales de las gónadas de anfibios y reptiles cubanos en la determinación del estado reproductivo del ejemplar y las etapas de la gametogénesis. **Métodos:** Se recolectaron once ranas del género *Eleutherodactylus*, un hílido y ocho sapos del género *Peltophryne*, además de tres especies de lagartijas; dos lagartos, un geckónido y cinco serpientes. Se procesaron las gónadas de ambos sexos con histología clásica, inmunofluorescencia, microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica. **Resultados:** En anfibios y reptiles los ovocitos se clasifican en previtelogénicos, vitelogénicos y postvitelogénicos, acorde al proceso de síntesis y deposición del vitelo. Se aprecia una mayor cantidad de ovocitos vitelogénicos en etapa reproductiva. Los testículos contienen lóbulos seminíferos en anfibios donde tiene lugar la espermatogénesis cística y túbulos en reptiles, con espermatogénesis radial. Se identificó el órgano de Bidder en los sapos machos y en una hembra. La morfología de los espermatozoides en anfibios es similar incluso a nivel ultraestructural, y diferente entre los lagartos y las serpientes. Conclusiones: la histología clásica establece diferencias a nivel celular en ovarios y testículos, aspecto esencial para describir los ciclos gonadales que se suceden en anfibios y reptiles. Los caracteres histológicos y ultraestructurales permitieron describir los tipos celulares de la gametogénesis.



Contributions to the knowledge of microscopic morphology of the gonads of Cuban amphibians and reptiles

ABSTRACT

Keywords

histology; ultrastructure; oogenesis; spermatogenesis

Introduction: The ecological importance of amphibians and reptiles, vital in the functioning of ecosystems and with diverse reproduction patterns, is recognized. There are not many studies in the biology of reproduction in Cuban species. The objective is to show the impact of histological and ultrastructural studies of the gonads of Cuban amphibians and reptiles in determining the reproductive status of the specimen and the stages of gametogenesis. **Methods:** Eleven frogs of the genus *Eleutherodactylus*, one hylid and eight toads of the genus *Peltophryne* were collected, in addition to three species of lizards; two lizards, a geckonid and five snakes. The gonads of both sexes were processed with classical histology, immunofluorescence, transmission electron microscopy, and atomic force microscopy. **Results:** In amphibians and reptiles, oocytes are classified as previtellogenic, vitellogenic and postvitellogenic, according to the process of synthesis and deposition of yolk. There is a greater number of vitellogenic oocytes in the reproductive stage. The testes contain seminiferous lobes in amphibians where cystic spermatogenesis takes place and tubules in reptiles, with radial spermatogenesis. Bidder's organ was identified in male and female toads. The morphology of sperm in amphibians is similar, even at the ultrastructural level, and different between lizards and snakes. **Conclusions:** classical histology establishes differences at the cellular level in ovaries and testes, an essential aspect to describe the gonadal cycles that occur in amphibians and reptiles. The histological and ultrastructural characters allowed to describe the cell types of gametogenesis.

INTRODUCCIÓN

La herpetofauna cubana cuenta con 58 especies de anfibios y 142 reptiles. Su índice de endernismo (84,5 %) es muy alto aun cuando los vertebrados en general no son numerosos en la fauna cubana. ⁽¹⁾

Se reconoce mundialmente la importancia ecológica de los anfibios, al considerarlos excelentes indicadores de la salud de los ecosistemas dada su sensibilidad para responder a ligeros cambios en el medioambiente, ya sea durante la etapa larval o en la adulta. Dichas respuestas se han utilizado para revelar fragmentación del hábitat, impacto de los plaguicidas y otras acciones humanas en el medio.

Es motivo de preocupación la disminución de anfibios a nivel global, motivada por varios factores ⁽²⁾ como la destrucción del hábitat, el cambio climático y la propagación de una enfermedad fúngica llamada quitridiomycosis. Esta afectación de la biodiversidad es considerada por muchos especialistas como la peor de la historia.

Por otra parte, los reptiles también son vitales en el funcionamiento de los ecosistemas. Muchos se alimentan de roedores e insectos por lo que influyen en el control del equilibrio en las zonas donde habitan. ⁽³⁾ Su papel en las tramas tró-

ficas es muy diverso y su distribución está también afectada por la actividad humana.

El neotrópico es un área con una gran diversidad y densidad de anfibios y reptiles, no obstante, no existen muchos estudios que dentro de la biología de la reproducción aborden la histología de las gónadas y los eventos ultraestructurales de la gametogénesis. Situación similar ocurre con la herpetofauna cubana, con vacíos de información en estos temas que el presente estudio pretende resolver. De ahí que el objetivo sea mostrar el impacto de los estudios histológicos y ultraestructurales de las gónadas de anfibios y reptiles cubanos en la determinación del estado reproductivo del ejemplar y las etapas de la gametogénesis.

MÉTODOS

Se incluyen en el estudio once especies de ranas del género *Eleutherodactylus*: *E. atkinsi*, *E. blairhedgesi*, *E. casparii*, *E. dimidiatus*, *E. goini*, *E. planirostris*, *E. pinarensis*, *E. riparius*, *E. thomasi*, *E. varleyi* y *E. zugii*; un hílido, *Osteopilus septentrionalis*; y las ocho especies de sapos bufónidos del género *Peltophryne* que habitan en Cuba, una de ellas con tres subespecies: *P. florentinoi*, *P. fustiger*, *P. peltocephala*, *P. taladai*, *P.*

catalauiceps, *P. empusa*, *P. gundlachi*, *P. longinasa longinasa*, *P. I. cajalbanensis* y *P. I. dunni*. En total son 22 especies.

Se recolectaron también tres especies de anolinos, *Anolis sagrei*, *A. homolechis* y *A. luteogularis*; de otros dos lagartos, *Leiocephalus carinatus* y *L. cubensis*; un geckónido, *Hemidactylus mabouia*; y cinco pequeñas serpientes: *Cubophis cantherigerus*, *Arrhyton vittatum*, *Tropidophis melanurus*, *Tropidophis pardalis* y *Caraiba andreae*, para once especies en total.

Se recolectaron tres ejemplares hembras y tres machos de cada especie en sus zonas de distribución típicas y fueron trasladados a la Facultad de Biología, de la Universidad de La Habana. Se anestesiaron éticamente y las gónadas fueron extraídas mediante un procedimiento quirúrgico convencional.

Se utilizaron para las descripciones y análisis realizados la histología clásica convencional, así como otras técnicas avanzadas: inmunofluorescencia, microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía de fuerza atómica (MFA).

Para la microscopía óptica, las muestras se procesaron mediante las técnicas clásicas de histología.⁽⁴⁾ Se empleó fijación con paraformaldehído al 4 % en PBS (0,01 M, pH 7,6) por 24 horas. Se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E), tricrómica de Mallory, tricrómica de Masson, tinción de Gallego y PAS-hematoxilina. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico Nikon E800, con cámara digital para el registro fotográfico.

Se aplicó el inmunomarcaje fluorescente de los patrones de transcripción mediante la detección de proteínas SR. La inmunodetección se realizó por el método indirecto en cortes de 3 µm a 5 µm de grosor a partir de las muestras obtenidas con la histología clásica y montados sobre portaobjetos de vidrio silanizados (Sigma). Se realizó una tinción para determinar el grado de compactación del ADN con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los núcleos se tiñen en diversos tonos de azul dependiendo del estado de compactación de la cromatina (de azul claro o casi blanco que denota mayor compactación hasta azul brillante, menos compactación).

Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante los programas ScionImage, Image J y Adobe Photoshop.

Se fijaron también fragmentos de las gónadas en glutaraldehído al 2,5 % en buffer fosfato (pH 7,4) de 24 horas a 48 horas para ser procesados con la técnica convencional para MET.⁽⁵⁾ Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina y los ultrafinos fueron contrastados utilizando acetato de uranilo (PolySciences) al 3 % y citrato de plomo (PolySciences) al 0,3%. Las rejillas se observaron en un MET JEOL JEM 1010 que opera a 80 kV y se realizó el registro digital de las imágenes.

Para complementar la descripción de la morfología externa de los espermatozoides, se prepararon suspensiones de

espermatozoides de cuatro especies (*E. planirostris*, *P. fustiger*, *P. longinasa dunni* y *P. taladai*). Se extrajeron los testículos de cada ejemplar y se maceraron en paraformaldehído al 4 % (Sigma) en PBS (0,01 M, pH 7,6). Se extendió una gota de la suspensión en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Las preparaciones se observaron en un MFA Digital Instruments, BioScope, operado en modo de contacto con un controlador Nanoscope IIIa. Las imágenes fueron obtenidas en una computadora conectada al microscopio a través del controlador Nanoscope IIIa y software Bioscope versión 4,32 ce.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Anfibios

El sistema reproductor de ambos sexos consiste de gónadas pareadas delante de los riñones, donde se desarrollan los gametos, y conductos para su transportación^(6,7). Los ovarios de las especies estudiadas tanto ranas (*Eleutherodactylus* y *Osteopilus septentrionalis*) como sapos (*Peltophryne*), consisten de una cavidad central y su aspecto es racimoso en etapa de actividad reproductiva (Fig. 1). Se distinguen células germinales en distintas fases de desarrollo: ovogonias, diploides, que se forman en los lechos germinales y con núcleo conspicuo; ovocitos cubiertos durante todo su desarrollo por una única capa de células somáticas epiteliales –células foliculares– llamada capa granulosa, y al exterior la teca, de tejido conectivo.⁽⁸⁾

Los ovocitos se clasifican en previtelogénicos, vitelogénicos y postvitelogénicos, acorde al proceso de síntesis y de-

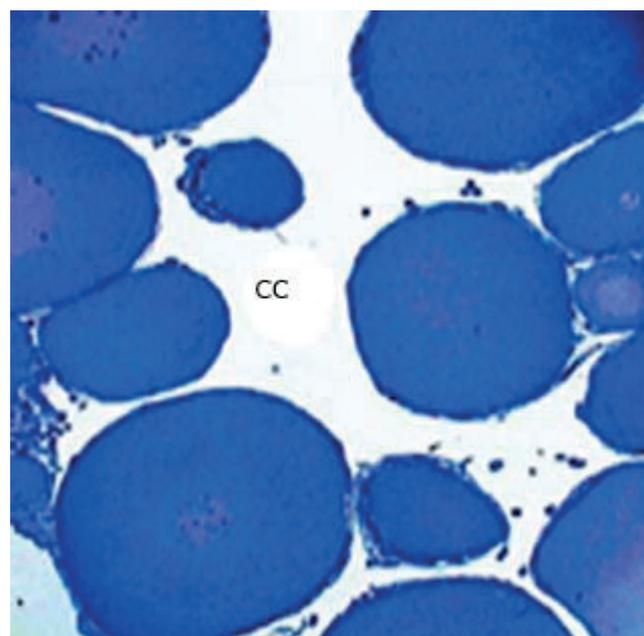


Fig. 1. Corte de ovario de *Eleutherodactylus goini* donde se observan varios ovocitos y la cavidad central (CC). Azul de toluidina. 200X

posición del vitelo. ^(8, 9,10) Es evidente un lecho germinal y en ocasiones dos, como en los cortes histológicos procedentes de *O. septentrionalis*. Esto garantiza una abundante puesta de huevos ⁽¹¹⁾ en este anuro muy exitoso y considerado invasor en otras latitudes. ⁽¹²⁾ También presentan en todos los estadios, sintetizada por el ovocito, una membrana acelular por fuera de la membrana plasmática, denominada membrana vitelina. ^(13, 14)

Durante la previtelogénesis se observaron, tanto al microscopio de campo claro como al electrónico, numerosos nucléolos y cromosomas plumosos o *lamp brush*. Los nucléolos evidencian la producción de ARN ribosomal y los cromosomas plumosos, del ARN mensajero que aporta el citoplasma materno y garantiza la síntesis proteica del futuro embrión. ^(9, 14,15)

Los ovocitos vitelogénicos muestran una acumulación progresiva de vitelo en forma de plaquetas vitelinas, desde la periferia hasta la zona del citoplasma cercana al núcleo. ^(9,16, 17) En los posvitelogénicos el núcleo está desplazado hacia uno de los polos de la célula, denominado polo animal, disposición típica en anuros. ⁽¹⁴⁾ El otro extremo llamado polo vegetativo, tiene mayor concentración de vitelo. En este estadio ocurre la ovulación. ⁽⁹⁾ Fue numerosa la cantidad de ovocitos vitelogénicos durante la etapa reproductiva lo cual supone un gran número de huevos por puesta y por consiguiente una mayor producción de larvas y adultos. ⁽¹⁸⁾

Se identifica en una hembra adulta de *P. peltocephala* la presencia de un órgano de Bidder, lo cual dada la abundancia de ovocitos vitelogénicos encontrados en el ovario, es quizás una limitante para el desarrollo posterior de este órgano ante la necesidad de hembras en estas poblaciones. ⁽¹⁹⁾

Los testículos tienen forma ovoide, algo más alargados en los sapos. Algunos no llegan a 1cm como en los eleuterodactílidos y el sapo pequeño *P. empusa*. En los sapos grandes, su diámetro mayor es de alrededor de 4 cm. Se distinguen cuerpos grasos a su alrededor, sobre todo en etapa no reproductiva, cuando muestran mayor desarrollo, como en otros anfibios ⁽¹⁷⁾ donde se ha descrito su estacionalidad. ⁽¹⁸⁾ Los cuerpos grasos están vinculados en las hembras a la síntesis de vitelo; ⁽⁹⁾ aunque en los machos no hay consenso de su función y pueden constituir una reserva de energía para el cortejo y el apareamiento. ^(18, 20) Al exterior de los testículos se encuentra la túnica albugínea, capa fina de tejido conectivo, transparente, de color blanquecino o incluso, muy pigmentada. ⁽²¹⁾

Se corroboró la presencia de un órgano de Bidder situado en la posición craneal del testículo. Se considera un ovario vestigial, inactivo aparentemente y solo con ovocitos previtelogénicos, ^(22, 23, 24) aunque su color azul brillante al teñirlo con DAPI (Fig. 2) y su ultraestructura al MET, permite considerarlo

como potencialmente funcional pues sugiere que son células con transcripción activa. ⁽¹⁹⁾

Este órgano ha sido objeto de polémicas al atribuírsele diversas funciones, ^(25,26, 27) entre ellas endocrina en ambos sexos y sin relación con el desarrollo de las gónadas. ⁽²⁸⁾ Se discute asimismo que pueda tener un carácter sinapomórfico; no obstante, por su condición hasta ahora única, pudiera ser una apomorfía. ⁽²⁹⁾

El tejido conectivo de la túnica penetra al interior del testículo y rodea compartimientos internos, los lóbulos seminíferos. Entre ellos existe tejido intersticial formado por células de Leydig, fibroblastos y vasos sanguíneos. ⁽³⁰⁾

Las células masculinas en desarrollo se agrupan en cistos en el interior de los lóbulos seminíferos, condición común en anamniotas ^(6,31) por lo que la espermatogénesis en el género *Eleutherodactylus*, ^(16,17) en *Osteopilus septentrionalis* ⁽³²⁾ y en el género *Peltophryne* ^(21,22) es cística. ^(33, 34) Los cistos incluyen una célula de Sertoli sobre la que se ubican las células sexuales en un mismo estadio de diferenciación. ^(16, 17,30)

Las espermatogonias, dan lugar a los espermatoцитos I que entran en la profase meiótica, visible al microscopio de campo claro y al MET. Los espermatoцитos I se dividen en dos espermatoцитos II haploides, que rápidamente originan cada uno dos espermátidas, redondeadas inicialmente. Estas, por la espermiogénesis que ocurre sobre el citoplasma de las células de Sertoli, originan los espermatozoides -particularmente abundantes en *O. septentrionalis*- que son liberados al lumen de los lóbulos seminíferos. ^(17, 30, 32)

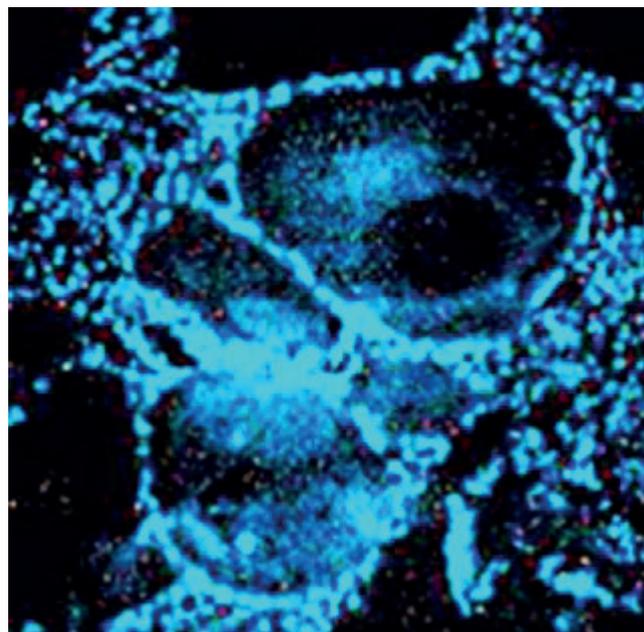


Fig. 2. Tinción con DAPI en órgano de Bidder de *Peltophryne taladai*. Se muestra el marcaje azul brillante en el núcleo de las células foliculares que rodean a los ovocitos previtelogénicos. 200X

El marcaje fluorescente mostró la presencia en los primeros estadios del espermatogénesis, la disminución en las etapas intermedias y la desaparición en el espermatozoide a punto de ser liberado del patrón moteado, lo que demuestra que la intensidad de su actividad transcripcional va disminuyendo hasta que se compacta la cromatina.

Los espermatozoides de los eleuterodactílidos poseen la típica cabeza con un acrosoma peculiar y cola alargada donde destaca una membrana ondulante. (35) La esencia morfológica y funcional de la cola es el axonema, (36) el cual a nivel ultraestructural presenta el patrón de microtúbulos 9 más 2, aunque entre los dobles no existe en este género brazos de dineína, indicador de poca movilidad del espermatozoide. La pérdida de los brazos de dineína no resulta contradictoria durante el desarrollo evolutivo de esta célula si se considera la corta distancia que recorren los espermatozoides hasta el ovocito en el momento de la fertilización en estas especies.

En *O. septentrionalis*, igualmente, en la cabeza del espermatozoide se encuentra el acrosoma alargado, debajo un espacio subacrosómico y el núcleo, muy electrodensito. La región de la cola correspondiente a la pieza media presenta una vaina mitocondrial rodeando el axonema (32) que se aprecia al MET (Fig. 3).

En los espermatozoides de los sapos la cabeza es de forma cónica o alargada como en *P. empusa*. Destaca la presencia de dos colas en *P. fustiger* y *P. taladai* (sapos grandes) lo cual constituye una modificación a la condición flagelada más frecuente en los tetrápodos. En *P. empusa* se observó también indicios de membrana ondulante, ornamento que se ha propuesto como otra característica distintiva en los miembros de la familia *Bufo*. (23) Ambos caracteres fueron verificados al MFA. (37)

La morfología de los espermatozoides en anuros es similar incluso a nivel ultraestructural a la de los espermatozoides de otros anfibios, aunque algunas características distintivas deben ser tenidas en cuenta para futuros análisis taxonómicos y evolutivos. Los resultados permiten esquematizar un espermatozoide tipo en ranas y sapos.

Reptiles

El sistema reproductor femenino en los lagartos estudiados presenta dos ovarios lobulados localizados anteriores a los riñones, en posición dorsal (38,39) y su tamaño presenta variaciones acordes a la época reproductiva. (40) Los ovarios desembocan en los oviductos, donde tiene lugar la formación de las envolturas del huevo, y terminan en la cloaca. (6) Alrededor de los ovarios en la cavidad abdominal pueden observarse cuerpos grasos, grandes y de color blanquecino o amarillo, muy desarrollados en etapa de regresión o recu-

descencia gonadal. (40) Estos hallazgos coinciden con las variaciones ováricas y las propuestas de ciclos reproductivos en reptiles. (41,42, 43)

Los folículos se encuentran en la corteza ovárica en el mismo o en diferentes estadios de desarrollo y por fuera se ubica la teca, en ocasiones pigmentada y muy conspicua, (44) como ocurre en *Hemidactylus mabouia*. (38) El epitelio folicular, en los previtelogénicos, al microscopio de campo claro se observa estratificado, y se denomina capa granulosa, muy característica y solo presente en las hembras del orden *Squamata*. (42) Contiene tres tipos celulares: pequeñas, intermedias y grandes o piramidales (Fig. 4).

La tinción con DAPI en cortes de ovarios permite apreciar una coloración azul brillante en los núcleos de estas células indicando su estado activo transcripcional. Entre las células foliculares fue posible distinguir al MET complejos de unión del tipo unión estrecha. La zona radiata sobre la membrana

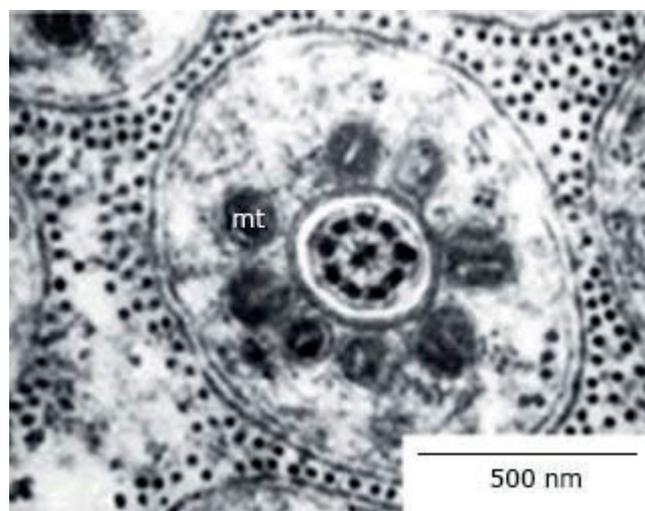


Fig. 3. Corte transversal de la cola de un espermatozoide de *Osteopilus septentrionalis* a nivel de la pieza media. Se observa al centro el axonema, las mitocondrias (mt) y la membrana plasmática al exterior.

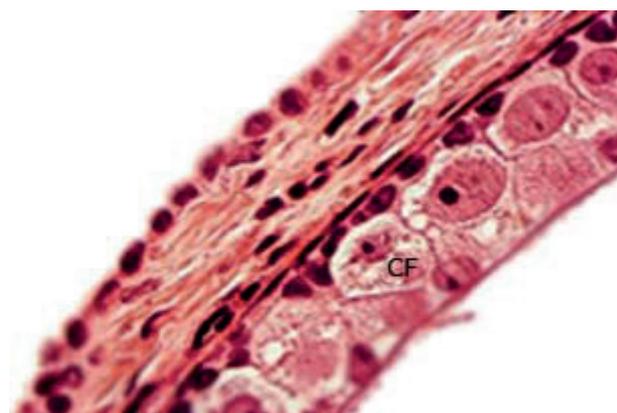


Fig. 4. Periferia de un ovocito previtelogénico de *Tropidophis melanurus*. Se observan las células foliculares (CF) características. H-E 400X

vitelina o zona pellucida, evidencia las interrelaciones entre la membrana plasmática del ovocito y las prolongaciones citoplasmáticas de las células foliculares, homóloga a la membrana vitelina de los anfibios⁽¹³⁾ y otros grupos.⁽¹⁴⁾ Se observa una agrupación de mitocondrias o cuerpo de Balbiani en los ovocitos jóvenes situado en el citoplasma yuxtannuclear.⁽³⁸⁾

Al avanzar la vitelogénesis el ovocito aumenta su diámetro. Las plaquetas vitelinas, se distribuyen por todo el citoplasma como en el resto de reptiles, aves, peces y mamíferos ovíparos, ya que el vitelo nutre al embrión.^(14,42) A medida que esto ocurre las capas de células foliculares van disminuyendo y permanece la de células grandes, que se aplana en los ovocitos postvitelogénicos al reordenarse como resultado del aumento de tamaño considerable del ovocito.⁽⁴²⁾ En ninguno de los cortes de ovarios analizados se observaron lechos germinales de ovogonias ni atresia folicular.

En las hembras de las serpientes, el sistema reproductor consta de dos ovarios pequeños y alargados uno situado muy por delante del otro, característica notable pues muchos ofidios por la forma de su cuerpo solo presentan un ovario.⁽⁴⁵⁾ Son vivíparas y se observaron en algunos ejemplares embriones en el oviducto. La histología del ovario es similar a lo descrito anteriormente para los lagartos cubanos y de otras latitudes,⁽⁴³⁾ pero su ultraestructura muestra grasa y pigmentos. Estos animales de cuerpo largo y delgado, no albergan cuerpos grasos grandes y quizás la grasa intraovárica sea una estrategia ante la necesidad de material lipídico para la síntesis de vitelo dada la ausencia de cuerpos grasos.

En ciertas regiones, incluso en Cuba en determinadas épocas del año, los testículos disminuyen en diámetro y puede encontrarse en adultos un predominio de solo un tipo celular en su interior.⁽⁴²⁾ En las especies estudiadas el testículo derecho se encuentra ligeramente más arriba que el izquierdo, detrás del hígado. Los cubre la túnica albugínea similar a otros vertebrados⁽⁶⁾ que puede ser delgada y transparente, blanquecina o negra como en *Anolis sagrei*, pues hay muchos pigmentos.⁽⁴⁶⁾ Los cuerpos grasos, cuando están presentes, pueden ser grandes y como en otras especies, amarillo claro o casi blancos.⁽⁴⁴⁾

En el interior de los testículos, se hallan los túbulos seminíferos separados por tejido intersticial. Cada túbulo presenta una membrana basal, sobre la que se asientan las espermatogonias. Se apreció en etapa reproductiva una disposición radial de las células sexuales desde esa membrana basal, donde se ubican las menos diferenciadas, hasta el lumen, clásica de los verdaderos amniotas.^(6,43)

Como ya se mencionó anteriormente en anfibios,⁽³¹⁾ las células de Sertoli sostienen en su citoplasma a las células sexuales en desarrollo. En los túbulos seminíferos en reposo o en

recrudescencia, solamente se encuentran presentes espermatogonias y algún espermatocito I sobre las células de Sertoli. Este período en Cuba corresponde a la época de seca, entre octubre y abril, donde ocurre una disminución o ausencia de actividad reproductiva. Cuando la gónada está en pleno apogeo reproductivo, generalmente en meses lluviosos y de altas temperaturas, en el interior de los túbulos se desarrolla la espermatogénesis completa, igual que en otras especies.^(46,47) La ultraestructura de las células sexuales masculinas confirma los hallazgos histológicos y, por ejemplo, muestran a los espermatocitos I como las células más grandes y con cromosomas en diferentes etapas de la profase I de la meiosis.^(48,49)

En las espermatidas se distingue el cuerpo cromatoide o *nuage* descrito en otros reptiles en esta etapa del espermatogénesis que constituye un agregado de vesículas, en ocasiones cerca del complejo de Golgi.⁽⁵⁰⁾ La espermiogénesis se distingue por varios eventos que van convirtiendo a una espermatida redonda en un espermatozoide, como se refiere por otros autores.⁽⁵¹⁾

En los machos de las serpientes cubanas los testículos se encuentran dorsales, el derecho más cercano a la parte anterior del animal. Su forma es muy alargada y su túnica albugínea es de color blanco, sin pigmentos. Asociados a las gónadas se detectaron cuerpos grasos de diferentes tonalidades de amarillo en algunas etapas del año, correspondiendo a períodos de recrudescencia gonadal.⁽⁵²⁾

Los espermatozoides de los lagartos presentan características similares. La cabeza es alargada, al igual que el acrosoma, y tiene muy conspicuas sus propias membranas. En las tres especies del género *Anolis* se aprecia un espacio subacrosómico, como característica distintiva, y una región electrolúcida epinuclear no presente en los espermatozoides de otros lagartos estudiados. Su espermatozoide muestra un centriolo distal en la concavidad posterior del núcleo o fosa nuclear, los centriolos proximal y distal perpendiculares entre sí, similar a lo informado por otros autores,^(51,53) además presenta hombros nucleares.

La cola del espermatozoide maduro posee un axonema que la recorre en toda su longitud. En los tres anolinos se observaron cuerpos densos a lo largo de la cola, rodeando al axonema en la pieza principal y cuerpos intermitocondriales en la pieza media. Estos últimos están también presentes en la cola del espermatozoide de *Hemidactylus mabouia*, aunque solo a nivel de la pieza media, y se comienzan a organizar durante la espermiogénesis. Un espermatozoide completo reconstruido de *H. mabouia* se observa en la figura 5.

Los espermatozoides en las serpientes exhiben los mismos elementos comunes de los espermatozoides móviles descritos anteriormente.^(54,55) En *Cubophis cantherigerus* se

describe la presencia de una vaina fibrosa todavía a nivel de la pieza final de la cola del espermatozoide maduro, no presente en otros reptiles ni en otros vertebrados, quizás para proporcionarle más estabilidad.



Fig. 5. Reconstrucción del espermatozoide completo de *Hemidactylus mabouia* a partir de fotomicrografías al MET.

Al analizar los túbulos seminíferos y el epidídimo de *Anolis sagrei*, exitoso colonialista e invasor en distintas latitudes, se aprecia una gran abundancia de espermatozoides en su interior. ⁽⁵⁷⁾ Igualmente se distingue una gran estabilidad en el tejido germinal y abundantes espermatozoides en el lagarto *Hemidactylus mabouia*, tal y como ocurre en la rana platanera *Osteopilus septentrionalis*, ambos considerados invasores. ^(11, 12, 38)

Conclusiones

La histología clásica establece diferencias a nivel celular en ovarios y testículos de anfibios y reptiles por lo que es adecuada para determinar la condición de la gónada y, en consecuencia, el estado reproductivo del ejemplar, aspecto esencial para describir los ciclos gonadales que se suceden en estas especies.

Los caracteres histológicos y ultraestructurales permiten clasificar los tipos celulares de la gametogénesis. La ovogénesis incluye una etapa de crecimiento o vitelogénesis y el ovocito se acompaña de células somáticas, que conforman un epitelio simple en anfibios y estratificado en reptiles, con un reordenamiento en una capa en el último estadio. La espermatogénesis es cística en anfibios y radial en reptiles.

Estos resultados se compilan en un Atlas que ofrece por primera vez para Cuba evidencias fotomicrográficas hasta el nivel ultraestructural del proceso de formación de las células sexuales en especies de nuestra herpetofauna, cuya importancia ecológica, evolutiva y taxonómica es fundamental para la salud de los ecosistemas y la supervivencia humana.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a todos los que han colaborado en la obtención de los resultados, en la recolección de

los ejemplares y como coautores de artículos científicos o ponencias presentadas en eventos nacionales o internacionales. A Javier Torres López de la Facultad de Biología, UH (actualmente estudiante de doctorado Universidad de Kansas, EUA) y a Karina Velazco Pérez, también del IES por involucrarse en estos resultados durante varios años. También a Rafael Oliva, Bárbara Estupiñán Díaz, Ileana Fernández Jiménez, Lourdes Teresa Agredano Moreno, Alma Leticia Zamora Cura, Arisbeth Guadalupe Almeida Juárez, Rubén Chávez Rosales, César Damián Alonso Murillo, Georgina Álvarez Fernández, Rogelio Jaime Frago Soriano Roberto Alonso Bosch, Emir Pérez Bermúdez y Jennifer Acosta Cárdenas. Por último, a quienes han sido estudiantes de pregrado de nuestro grupo de investigación, con quienes seguimos en contacto aun cuando su vida profesional la realicen en otras instituciones: Ligsuan Casas Guillama, Jairon Pérez Copa, Saymé Pérez Martínez, Karel Mederos Perugorría, Roxana Rodríguez Ortiz, Yaira López Hurtado, Javier Jorge Álvarez y Laura Alarcón Busquet.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez Gómez A. Anfibios. En: González H, Rodríguez L, Rodríguez A, Mancina C, Ramos I, editores. Libro rojo de los vertebrados de Cuba. La Habana: AMA;2012:55-91p.
2. Alonso Bosch R, García Padrón LY. Anfibios. En Mancina CA, Cruz DD, editores. Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas. La Habana: AMA;2017.348-75p.
3. Torres López J, Rodríguez Cabrera TM, Marrero Romero R. Reptiles. En Mancina CA, Cruz DD, editores. Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas. La Habana: AMA;2017:376-411p.
4. Aguilar M, Coutiño B, Salinas P. Manual de técnicas histológicas e histoquímicas. México DF: Facultad de Ciencias, UNAM;1996.
5. Vázquez Nin GH, Echeverría OM. Introducción a la microscopía aplicada a las ciencias biológicas. México D. F: UNAM, Fondo de Cultura Económica;2000.
6. Kardong KV. Vertebrates. Comparative Anatomy, Function, Evolution. 8th ed. New York: Mc Graw Hill;2018.
7. Uribe M C. Amphibians. En: Dutta HM, Datta Munshi JS, editors. Vertebrate functional morphology. Reproductive systems of Caudata. New Hampshire: Science Publishers Inc;2003:267-93.
8. Sretarugsa P, Weerachayanukul W, Chavadej J, Kruatrachue M, Sobhon P. Classification of developing oocytes, ovarian development and seasonal variation in *Rana tigerina*. Science Asia. 2001;(7):1-14.
9. Rodríguez Gómez Y, Sanz Ochotorena A, Segura Valdez ML, Lara Martínez R, Jiménez García LF. Morfología del ovario en ranas del género *Eleutherodactylus* (Anura: Lep-todactylidae). Acta Microscopica. 2010;19(3):271-8.
10. Antoniazzi C E, López J A, Ghirardi R, Armando A P. Biología reproductiva de *Boana pulchella* y *Boana punctata* (Anura: Hylidae) en poblaciones simpátricas de humedales templados. Caldasia. 2019;41(2):245-56.

11. Sanz Ochotorena A, Rodríguez Gómez Y, Segura Valdez M L, Jiménez García L F. La Histología evidencia la numerosa producción de gametos en especies invasoras. La Habana: Ponencia presentada en IV Convención Internacional virtual de Ciencias Morfológicas Morfovirtual 2018 y IV Jornada Científica de la Cátedra "Santiago Ramón y Cajal"; nov 2018.
12. Glorioso BM, Hardin JM, Muse L, Jennings N, Litton M, Hamilton J, Gergen S. Establishment of the exotic invasive Cuban treefrog (*Osteopilus septentrionalis*) in Louisiana. *Biol Invasions*. 2018;20(10):2707-13.
13. Ogielska M. Reproduction of Amphibian. New Hampshire: Science Publishers Inc; 2009.
14. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 11th ed. Massachusetts: Sinauer Associated Inc; 2016.
15. Boisvert FM, Koningsbruggen S, Navas-cués J, Lamond A I. The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews*. 2007;8(7):574-85.
16. Pucci Alcaide A, Ponsa ML, Pucci Alcaide FJ, Alcaide MF. Histología de ovario en hembras vitelogénicas de *Leptodactylus latinus* (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zool Lilloana*. 2012;56(1-2):44-53.
17. Casas Guillama L, Rodríguez Y, Sanz A, Lara R, Segura ML, Jiménez LF. Descripción morfológica de gónadas y células sexuales de dos especies de ranas cubanas del género *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae). *RCCB*. 2015;3(3):38-47.
18. Iturriaga M, Sanz A, Oliva R. Seasonal Reproduction of the Greenhouse Frog *Eleutherodactylus planirostris* (Anura: Eleutherodactylidae) in Havana, Cuba. *South Am J Herpetol*. 2014;9 (2):142-50.
19. Sanz Ochotorena A, Rodríguez Gómez Y, Segura Valdez ML, Lara Martínez R, Jiménez García LF. El órgano de Bidder en sapos (*Peltophryne* spp.) endémicos de Cuba. Aspectos morfológicos y de ultraestructura. *RCCB*. 2015;4(1):78-88.
20. Carezzano F, Urquiza S, Dorflinger K, Alonso M. Morfohistología testicular de *Ceratophrys ornata* (Bell) (Amphibia, Anura, Ceratophryidae). *Iheringia. Sér. Zool*. 2013;103(2):190-4.
21. Sanz Ochotorena A, Segura Valdez ML, Rodríguez Gómez Y, Lara Martínez R, Jiménez García L F. Pigmentos en los testículos de cinco anfibios endémicos de Cuba (*Eleutherodactylus turquinesis*, *E. cuneatus*, *E. glamyrus*, *Bufo longinasus longinasus* y *B. longinasus cajalbanensis*). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2011; 14(1): 85-92.
22. Sanz Ochotorena A, Segura Valdés ML, Rodríguez Gómez Y, Lara-Martínez R, Jiménez-García LF. Estructura y ultraestructura de la gónada de los machos de *Bufo fustiger* (Anura: Bufonidae). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2008;11(2):81-6.
23. Sanz Ochotorena A, Segura Valdez ML, Rodríguez Gómez Y, Lara Martínez R, Jiménez García LF. Ultraestructura de la gónada del macho de dos subespecies de *Bufo longinasus*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2009;13(2):36-9.
24. Beccari N. Ovogenesi larvale, organi di Bidder e differenziamento dei sessi nei Bufo viridis. *Arch. Anat. Ital. Embriol*. 1925;22:483-549.
25. Ponce K. Les hypothèses concernant la signification de l'organe de Bidder du Crapaud. *Ibrd*. 1927;96:777-8.
26. Dubois R. On the Distribution of Bidder's Organ in Bufonids. *Zool. Meded*. 1947;26:275-9.
27. Brown FD, Pino EM, Krohne G. Bidder's Organ in the Toad *Bufo marinus*: Effects of orchidectomy on the morphology and expression of lamina-associated polypeptide. *Develop. Growth Differ*. 2002;44:527-35.
28. Piprek RP, Kloc M, Kubiak JZ. Bidder's organ structure, development and function. *Int J Dev Biol*. 2015;58(10-11-12):819-27.
29. Naish D. Bidder's Organ and the Holy Quest for Synapomorphies. *Tetrapod Zoology* [Internet]. 2009 [citado jun 2014] Disponible en: <http://scienceblogs.com/tetrapodzoology/2009/10/13/bidders-organ-holy-quest>
30. Oliveira C, Zanetoni C, Zieri R. (): Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomía*. 2002;20:263-8.
31. Shalan AG, Bradshaw SD, Withers PC, Thompson G, Bayomy MF, Bradshaw FJ, Stewart T. Spermatogenesis and Plasma Testosterone Levels in Western Australian Burrowing Desert Frogs, *Cyclorana platycephala*, *Cyclorana maini*, and *Neobatrachus sutor*, during aestivation. *Gen Comp Endocrinol*. 2004;136:90-100.
32. Rodríguez Ortiz R, Rodríguez-Gómez Y, Sanz Ochotorena A, Segura Valdez ML, Lara Martínez R, Jiménez García LF. Spermatogenesis in the banana frog *Osteopilus septentrionalis* (Anura: Hylidae). Temuco: Ponencia presentada al 6th *International Workshop Advances in Science and Technology of Bioresources*; nov 2017.
33. Smita M, Oommen OV, Jancy MG, Akbarsha MA. Stages in Spermatogenesis of Two Species of Caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Uraeotyphlus cf. narayani* (Amphibia: Gymnophiona): Light and Electron Microscopy Study. *J Morphol*. 2004; 261: 92-104.
34. Uribe MC. The testes, spermatogenesis and male reproductive ducts. En: Dutta HM, Datta Munshi JS. editores. *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. New Hampshire: Science Publishers Inc; 2003:183-202.
35. Rodríguez Gómez Y, Sanz Ochotorena A, Segura Valdez ML, Jiménez García LF. Caracterización ultraestructural del espermatozoide del género *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae). *Acta Microscópica*. 2009;18(C):631-2.
36. Garda AA, Costa GC, Colli GR, Báó SN. Spermatozoa of Pseudinae (*Amphibia, Anura, Hylidae*), with a Test of the Hypothesis that Sperm Ultrastructure Correlates with Reproductive Modes in Anurans. *J Morphol*. 2004;261:196-205.
37. Segura Valdez ML, Sanz Ochotorena A, Rodríguez Gómez Y, Zamora Cura AL, Almeida Juárez AG, Chávez Rosales R, Alonso Murillo CD, Álvarez Fernández G, Lara Martínez R, Agredano Moreno LT, Fragoso Soriano RJ, Jiménez García LF. Atlas de microscopía de fuerza atómica de células y tejidos. México: Editoriales UNAM; 2018.
38. Velazco K, Sanz Ochotorena A. Dinámica estacional de la morfología ovárica y de los cuerpos grasos del lagarto invasor *Hemidactylus mabouia* (Sauria: Gekkonidae). *RCCB*. 2016;5(1):43-64.
39. Sanz A. Ciclos reproductivos en reptiles (género *Anolis*). *Biología*. 2000;14(2): 98-107.
40. Domínguez M, Sanz A, Chávez J, Almaguer N. *Cyclical reproduction in females of the Cuban lizard Anolis lucius* (Polychrotidae). *Herpetológica*. 2010;66(4): 443-50.
41. Guraya SS. *Ovarian Follicles in Reptiles and Birds*. Berlin: Springer-Verlag; 1989.
42. Rodríguez Gómez Y, Sanz Ochotorena A, Torres López J, Lara Martínez R, Segura Valdez ML, Jiménez García LF. Foliculogénesis en seis especies de lagartos y serpientes del Orden Squamata (Reptilia). *Acta Microscópica*. 2018;27(3):182-8.

43. Meshaka WE Jr, Smith HT, Dean CL. Gonadal Cycle and Growth of a West Indian Lizard, the Northern Curly-tailed Lizard (*Leiocephalus carinatus armouri*), in southern Florida. *Herp. Con. Biol.* 2006;2(1):109-15.
44. Domínguez M, Sanz A, Almaguer N, Chávez J. Seasonal Reproduction in Males of the Cuban Lizard *Anolis lucius (Polychrotidae)*. *Bol. Soc. Herpetol. Mex.* 2006;14(1):1-9.
45. Di Girolamo DMV, Selleri P. Reproductive Disorders in Snakes. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 2017;20:391-409.
46. Sanz Ochotorena A, Segura Valdez ML, Rodríguez Gómez Y, Lara Martínez R, Jiménez García LF. Histología y ultraestructura del testículo y epidídimo de *Anolis sagrei*. *RCCB.* 2013;2(2):21-30.
47. Rodríguez Gómez Y, Sanz-Ochotorena A. Morfología y ultraestructura de los espermatozoides de dos especies del género *Anolis (Sauria: Polychrotidae)*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 2009;12(1):12-8.
48. Ferreira A, Dolder H. Sperm Ultrastructure and Spermatogenesis in the Lizard, *Tropidurus itambere*. *Biocel.* 2003;27(3):353-62.
49. Gribbins KM. Reptilian Spermatogenesis: A Histological and Ultrastructural Perspective Spermatogenesis. *Bioscience.* 2011;1(3):250-69.
50. Gribbins KM, Siegel DS, Anzalone ML, Jackson DP, Venable KJ, Rheubert JL, Elsey R M. Ultrastructure of Spermiogenesis in the American Alligator, *Alligator mississippiensis (Reptilia, Crocodylia, Alligatoridae)*. *J Morphol.* 2010;(271):1260-71.
51. Rheubert JL, Byron W, Wolf K, Gribbins K. Ultrastructural Study of Spermiogenesis in the Jamaican Gray Anole, *Anolis lineatopus (Reptilia: Polychrotidae)*. *Acta Zool.* 2009;91(4): 484-94.
52. Gribbins KM, Rheubert JL. The Ophidian Testis, Spermatogenesis, and Mature Spermatozoa. *Reproductive Biology and Phylogeny of snakes.* 2011;(9):183-264.
53. Colli GR, Teixeira RD, Scheltinga DM, Mesquita DO, Wiederhecker HC, Bao SN. Comparative Study of Sperm Ultrastructure of Five Species of Teid Lizards (Teiidae, Squamata), and *Cercosaura ocellata (Gymnophthalmidae, Squamata)*. *Tissue Cell.* 2007;39(1):59-78.
54. Gribbins KM, Rheubert JL, Collier M, Siegel D, Sever D. Histological analysis of spermatogenesis and the germ cell development strategy within the testis of the male Western Cottonmouth Snake, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*. *Annals of Anatomy.* 2008;190:461-76.
55. Sanz Ochotorena A, Rodríguez Gómez Y, Segura Valdez ML, Lara Martínez R, Jiménez García LF. Características del espermatogénesis en una serpiente endémica de Cuba: *Caraiba andreae (Squamata: Dipsadidae)*. *RCCB.* 2019;7(1):1-9.
56. Sanz Ochotorena A, Rodríguez Gómez Y. *Anolis sagrei (Reptilia. Polychrotinae)* exitoso e invasor. *RCCB.* 2014;3(1):15-22.

Recibido: 27/05/2021
Aprobado: 02/08/2021

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses en relación con la investigación presentada.

Contribución de la autoría

- Conceptualización: Ana Clara Sanz Ochotorena, Yamilka Rodríguez Gómez, María de Lourdes Segura Valdez, Luis Felipe Jiménez García, Reyna Lara Martínez
- Curación de datos: Ana Clara Sanz Ochotorena, Yamilka Rodríguez Gómez, María de Lourdes Segura Valdez, Luis Felipe Jiménez García, Reyna Lara Martínez, Manuel Iturriaga Monsisbay y Tomás Michel Rodríguez Cabrera
- Análisis formal: Ana Clara Sanz Ochotorena, Yamilka Rodríguez Gómez, María de Lourdes Segura Valdez, Luis Felipe Jiménez García, Reyna Lara Martínez
- Adquisición de fondos: María de Lourdes Segura Valdez y Luis Felipe Jiménez García
- Investigación: Ana Clara Sanz Ochotorena, Yamilka Rodríguez Gómez, María de Lourdes Segura Valdez, Luis Felipe Jiménez García, Reyna Lara Martínez, Manuel Iturriaga Monsisbay y Tomás Michel Rodríguez Cabrera
- Metodología: Ana Clara Sanz Ochotorena, Yamilka Rodríguez Gómez, María de Lourdes Segura Valdez, Luis Felipe Jiménez García, Reyna Lara Martínez, Manuel Iturriaga Monsisbay y Tomás Michel Rodríguez Cabrera
- Administración del proyecto: Luis Felipe Jiménez García
- Redacción-borrador original: Ana Clara Sanz Ochotorena y Yamilka Rodríguez Gómez
- Redacción-revisión y edición: Ana Clara Sanz Ochotorena y Yamilka Rodríguez Gómez

Financiación

El financiamiento para las recolectas de los ejemplares seleccionados para el estudio estuvo proporcionado por el PN Colecciones Zoológicas, su conservación y manejo III dentro del Programa de Biodiversidad. La Dirección General de Cooperación e Internacionalización de la Universidad Nacional Autónoma de México permitió el apoyo financiero para el procesamiento de las muestras con métodos de microscopía de avanzada en dicha institución. El Premio Editorial UH 2019 en la categoría de Ciencias Naturales y Exactas posibilitó la impresión del Atlas.

Cómo citar este artículo

Sanz Ochotorena AC, Rodríguez Gómez Y, Segura Valdez ML, Jiménez García LF *et al.* Aportes al conocimiento de la morfología microscópica de las gónadas de anfibios y reptiles cubanos. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba [internet]* 2021[citado en día, mes y año];11(3): e1043. Disponible en: <http://www.revistaccuba.com/index.php/revacc/article/view/1043>

