



ARTÍCULO ORIGINAL

¿Aporta la histología de los ovarios evidencias suficientes para determinar el patrón de reproducción de una especie de anfibio anuro?

Does the histology of the ovaries provide sufficient evidence to determine the reproduction pattern of an anuran amphibian species?

Yamilka Rodríguez^{1*}, Ana C. Sanz-Ochotorena¹, María de L Segura-Valdés², Reyna Lara-Martínez², Luis F. Jiménez-García²

¹ Dpto. Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

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

*Autor para correspondencia:

yami@fbio.uh.cu

RESUMEN

El éxito reproductivo de los anfibios se debe al desarrollo de estrategias reproductivas que aumenten sus posibilidades de adaptación. En Cuba habitan 68 especies que se reproducen en un clima tropical con dos estaciones: lluvia y seca, y determinar su tipo de patrón reproductivo ayudaría a entender su comportamiento y su dinámica poblacional. El objetivo es proponer el patrón reproductivo de algunas especies de anuros cubanos mediante el análisis histológico de sus ovarios durante las épocas de lluvia y seca. Se recolectaron hembras de cinco especies del género *Eleutherodactylus*, cinco de *Peltophryne* y *Osteopilus septentrionalis*. Los ovarios derechos fueron fijados en paraformaldehído al 4%, se procesaron según la técnica histológica clásica y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los izquierdos se fijaron en glutaraldehído al 2,5%, se realizaron cortes semifinos y se tiñeron con azul de toluidina. Se clasificaron los ovocitos en previtelogénicos, vitelogénicos y posvitelogénicos considerando el grado de acumulación de vitelo citoplasmático. Todos son apreciables en temporada de lluvia en un individuo, por lo que las hembras no depositan todos los huevos de una vez sino que realizan varias puestas en un mismo evento reproductivo. Se describen lechos de ovogonias y ausencia de folículos atrésicos. Al observar vitelogénesis avanzada en algunos ejemplares aún fuera de la época de lluvia, se considera la extensión de la temporada reproductiva ante las altas temperaturas. Lo anterior, unido a que en temporada de seca se observan ovocitos previtelogénicos en la mayoría de las especies, permite considerar su patrón de reproducción como potencialmente continuo.

Palabras clave: anuros, ovocitos, vitelogénesis, lechos de ovogonias, *Eleutherodactylus*, *Peltophryne*, *Osteopilus septentrionalis*

Recibido: 2020-07-23

Aceptado: 2020-11-23

ABSTRACT

The reproductive success of amphibians is due to the development of reproductive strategies that increase their adaptation possibilities. In Cuba there are 68 species that reproduce in a tropical climate with two seasons: wet and dry, and determining their type of reproductive pattern would help to understand their behavior and population dynamics. The objective is to propose the reproductive pattern of some species of Cuban anurans by histological analysis of their ovaries during the wet and dry seasons. Females of five species of the genus *Eleutherodactylus*, five of *Peltophryne* and *Osteopilus septentrionalis* were collected. The right ovaries were fixed in 4% paraformaldehyde, processed according to the classic histological technique and stained with hematoxylin-eosin. The left ones were fixed in 2,5% glutaraldehyde, semi-fine sections were made and stained with toluidine blue. The oocytes were classified into previtellogenic, vitellogenic and postvitellogenic considering the degree of accumulation of yolk in the cytoplasm. All are appreciable in the wet season in the same specimen, so that the females do not lay all the eggs at once, but rather make several layings in the same reproductive event. Beds of oogonia and absence of atresic follicles are described. When observing advanced vitellogenesis in some specimens even outside of wet season, the extension of the reproductive season is considered due to high temperatures. The above, together with the fact that in the dry season, previtellogenic oocytes are observed in most species, it allows us to consider their reproduction pattern as potentially continuous.

Keywords: anurans, oocytes, vitellogenesis, beds of oogonia, *Eleutherodactylus*, *Peltophryne*, *Osteopilus septentrionalis*

INTRODUCCIÓN

El éxito reproductivo de los anfibios anuros en numerosas regiones del mundo se debe en gran medida al desarrollo de estrategias que han tendido a aumentar sus posibilidades de reproducción y por consiguiente, de adaptación al hábitat (Wells, 2007; Vitt y Caldwell, 2014; Pough *et al.*, 2016). Determinar el tipo de patrón reproductivo de cualquier grupo es un aspecto esencial para entender el comportamiento y la dinámica de sus poblaciones, y poder proponer, a corto plazo, una estrategia efectiva de conservación (Moreno *et al.*, 2018).

En la literatura se describen varios de estos patrones en los anfibios, principalmente agrupados en discontinuos (también denominados estacionales) o continuos (Uribe, 2003; Ogielska y Kotusz, 2004; Antoniazzi *et al.*, 2019). En el primer tipo, las especies muestran una dependencia de las variables climáticas que desencadenan el inicio de su reproducción fundamentalmente en las estaciones asociadas al verano y es característico de las especies que habitan en climas templados y/o con una marcada estacionalidad (Sretarugsa *et al.*, 2001; Díaz-Páez y Ortiz, 2001; Uribe, 2003; Aguilar-Miguel *et al.*, 2009). En el segundo, los individuos pueden reproducirse durante todo el año, lo cual no debe ser interpretado como independencia de estos factores climáticos, sino más bien, que estos se mantienen estables durante muchos meses y hace posible que el apogeo reproductivo se mantenga en el tiempo. Con frecuencia este tipo de patrón continuo se encuentra en especies que habitan en regiones tropicales (Valderrama-Vernaza *et al.*, 2010; Antoniazzi *et al.*, 2014).

El clima de la isla de Cuba es tropical con ausencia de las cuatro estaciones bien marcadas por lo que se considera que existen dos épocas: una de lluvia, de mayo a octubre y que coincide con el verano y otra de seca, de noviembre a abril, meses donde tiene lugar el invierno (Instituto de Meteorología, 2020). En estas etapas, el comportamiento de las precipitaciones puede ser desigual en las distintas localidades del país, ya sea región costera o montañosa. Sin embargo, la temperatura alcanza valores máximos en los meses de verano, mientras que el mínimo ocurre en enero y febrero. No obstante, se pueden encontrar diferencias entre la zona occidental y central de Cuba con respecto a la oriental, de entre 2-4°C (Díaz y Cádiz, 2008; Mancina *et al.*, 2017).

Otro elemento a considerar es el modo de reproducción de la especie analizada, pues indudablemente ejerce una influencia sobre el patrón reproductivo. Para determinar el modo de reproducción de una especie es necesario conocer varios aspectos como el sitio de reproducción, el tamaño de la puesta, el tipo de desarrollo que presentan e incluso la existencia de cuidados parentales (Haddad y Prado, 2005; Wells, 2007; Moreno *et al.*, 2018). De ahí que es importante considerar los lugares donde ocurre la puesta, atendiendo a la humedad y tipo de vegetación, y si el desarrollo es indirecto o directo.

Cuba alberga 68 especies de anfibios, todos anuros: del género *Eleutherodactylus*, 58 especies; del género *Peltophryne*, ocho especies; y además *Osteopilus septentrionalis*, especie autóctona y *Lithobates catesbeianus*, introducida (Alonso y García, 2017; Frost, 2020).

Los estudios en materia de reproducción de estos grupos han sido frecuentes en la última década, pues se ha incrementado notablemente el interés que están despertando en los investigadores. De ahí que se cuenta con información valiosa acumulada durante varios años que incluye, como es lógico, varias temporadas reproductivas.

Son numerosos los datos de la dinámica de las gónadas y de los cuerpos grasos, la histología del sistema reproductor y la ultraestructura celular de los gametos de un número considerable de especies de anfibios cubanos (e.g. Fontaine, 2005; Rodríguez-Gómez, 2008; Sanz *et al.*, 2008; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010; Iturriaga *et al.*, 2012; 2014; Casas *et al.*, 2014; Rodríguez, 2015; Alfonso *et al.*, 2017; Sanz *et al.*, 2019). El objetivo de este trabajo es proponer el tipo de patrón reproductivo que poseen algunas especies de anuros que habitan en Cuba mediante el análisis de la histología de sus ovarios durante las épocas de lluvia y de seca.

Se han considerado para este estudio cinco especies de ranitas del género *Eleutherodactylus*, todas con desarrollo directo y que utilizan ambientes más bien terrestres para reproducirse, cinco especies de sapos del género *Peltophryne* y *Osteopilus septentrionalis*. Las últimas seis tienen estadios larvales en su desarro-

llo y sus puestas ocurren fundamentalmente en cuerpos de agua.

El trabajo basa sus consideraciones en recolectas realizadas en los últimos 10 años y la toma de muestras de gónadas para ser procesadas con histología convencional. Esta información permitiría llegar a conclusiones más exactas acerca del patrón reproductivo de estas especies al basarse en el estudio histológico de los ovarios de los anuros que habitan en Cuba, endémicos o no, unido a otras evidencias como la dependencia entre el inicio de la temporada reproductiva y las variables climáticas, que también son contempladas. La posibilidad de determinar el tipo de patrón reproductivo de una especie es uno de los primeros elementos a considerar para establecer estrategias de manejo donde proceda y podrá contribuir a la revisión del estado de amenaza de cada una de estas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 3 hembras de 11 especies de anfibios de los géneros: *Eleutherodactylus* (*E. atkinsi*, *E. blairhedgesi*, *E. goini*, *E. thomasi* y *E. zugii*), *Peltophryne* (*P. empusa*, *P. florentinoi*, *P. longinasa*, *P. peltoccephala* y *P. taladai*) y *Osteopilus septentrionalis* en zonas donde habitan en Cuba (Fig. 1), entre los años 2009 al 2018.

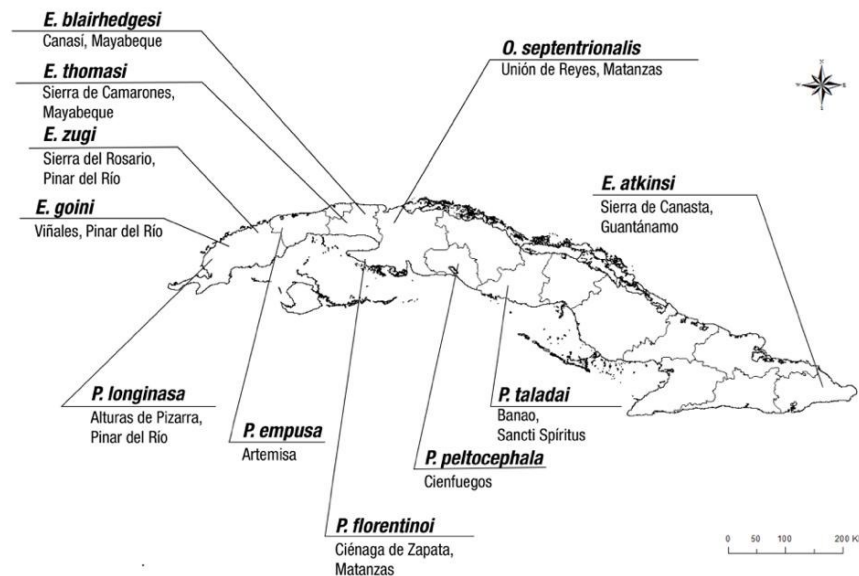


Figura 1. Localidades donde fueron recolectadas las 11 especies de anfibios de los géneros *Eleutherodactylus* (*E. atkinsi*, *E. blairhedgesi*, *E. goini*, *E. thomasi* y *E. zugii*), *Peltophryne* (*P. empusa*, *P. florentinoi*, *P. longinasa*, *P. peltoccephala* y *P. taladai*) and *Osteopilus septentrionalis*.

Figure 1. Locations where the 11 species of amphibians of the genus *Eleutherodactylus* (*E. atkinsi*, *E. blairhedgesi*, *E. goini*, *E. thomasi* y *E. zugii*), *Peltophryne* (*P. empusa*, *P. florentinoi*, *P. longinasa*, *P. peltoccephala* y *P. taladai*) and *Osteopilus septentrionalis* were collected.

La búsqueda de los ejemplares se realizó fundamentalmente entre los meses de mayo a octubre y de noviembre a enero.

Todos los animales fueron tratados éticamente. Los ejemplares se trasladaron al laboratorio, se sacrificaron en atmósfera de cloroformo y se realizó la disección que permitió corroborar su sexo e incluir solo individuos adultos. Se fijaron fragmentos del ovario derecho de todos los ejemplares en paraformaldehído al 4% y se procesaron según la técnica histológica clásica (Aguilar *et al.*, 1996). Se obtuvieron cortes entre 5 y 7 μm con un micrótopo de rotación manual marca Sakura y se colocaron en portaobjetos con albúmina como adherente. Las láminas se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E).

El ovario izquierdo se fijó en glutaraldehído al 2,5% y se procesó para análisis posteriores de ultraestructura de las células sexuales. No obstante, en el procesamiento de estas muestras para verificar la efectividad en cuanto a la calidad del material y seleccionar las zonas de interés, se realizaron cortes semifinos entre 200-500 nm, que también fueron analizados. Los bloques fueron cortados en un ultramicrótopo Leica Ultracut, utilizando cuchillas de vidrio. Fueron colocados en portaobjetos con la ayuda de un asa de cobre y teñidos con azul de toluidina (AT) (Vázquez-Nin y Echevarría, 2000).

Todas las láminas se observaron en un microscopio de campo claro Novel con objetivos de 5X, 10X, 20X, 40X y 100X; con cámara acoplada digital Nikon E400 para el registro fotográfico. El análisis de los cortes histológicos permitió clasificar los ovocitos en tres estadios: previtelogénicos, vitelogénicos y posvitelogénicos o maduros según Iturriaga *et al.* (2012), teniendo en cuenta el grado de acumulación de vitelo en el citoplasma durante su etapa de crecimiento.

RESULTADOS

Los ovarios se encontraron situados hacia la parte superior de la región abdominal, sostenidos por un pliegue de tejido denominado mes ovario y adosados a los riñones. Su aspecto es racimoso debido a la presencia de los ovocitos en su interior, visibles macroscópicamente en el momento de la disección (Fig. 2).

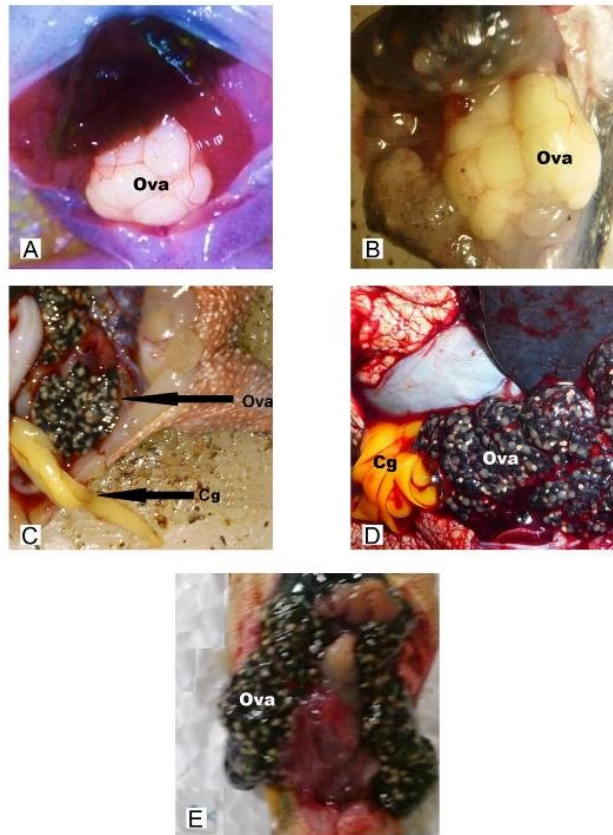


Figura 2. Ovarios racimosos de cinco de las especies estudiadas fotografiados en el momento de la disección. **A.** *Eleutherodactylus thomasi*. **B.** *E. goini*. **C.** *Peltophryne empusa*. **D.** *P. florentinoi*. **E.** *Osteopilus septentrionalis*. Ova: Ovario con ovocitos, Cg: cuerpo graso.

Figure 2. Raceme ovaries of five of the studied species photographed at the time of dissection. **A.** *Eleutherodactylus thomasi*. **B.** *E. goini*. **C.** *Peltophryne empusa*. **D.** *P. florentinoi*. **E.** *Osteopilus septentrionalis*. Ova: ovary with oocytes, Cg: fat body.

Se observaron pigmentos asociados a los ovocitos de las especies de *Peltophryne* y en *Osteopilus septentrionalis*, no así en *Eleutherodactylus* (Fig. 3). Esta pigmentación se observa más marcada en una zona del ovocito, lo cual define dos polos: un polo animal, pigmentado de color marrón oscuro y cercano a la zona donde se encuentra el núcleo, y el polo vegetativo, de coloración blanco-amarillenta. Ambos polos son visibles macroscópicamente en el momento en que la cavidad abdominal queda expuesta (Fig. 2 C, D y E).

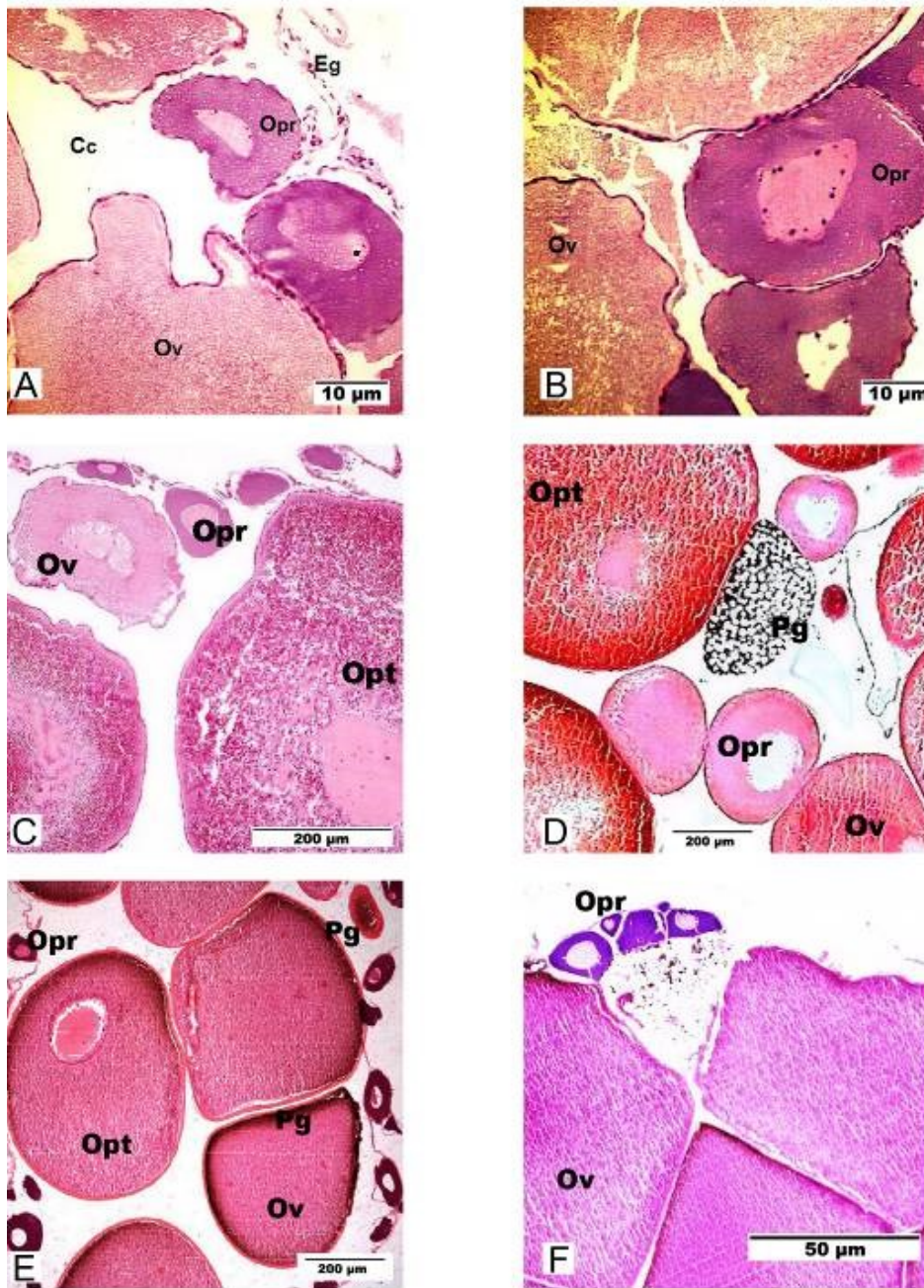


Figura 3. Cortes de ovarios de seis de las especies de anuros analizados recolectados en los meses de lluvia donde se observan ovocitos en diferentes etapas de desarrollo. **A.** Ovario de *Eleutherodactylus goini* donde se muestra la cavidad central. H-E. **B.** Ovario de *E. zugii*. H-E. **C.** Ovario de *E. atkinsi*. H-E. **D.** Ovario de *Peltophryne longinasa*. H-E. **E.** Ovario de *P. empusa*. H-E, 5X. **F.** Ovario de *Osteopilus septentrionalis*. H-E. Opr: ovocito previtelogénico, Ov: ovocito vitelogénico, Opt: ovocito posvitelogénico, Cc: cavidad central, Eg: epitelio germinal, Pg: pigmentos.

Figure 3. Ovarian sections of six of the analyzed anura species collected in the rainy months where oocytes are observed at different stages of development. **A.** Ovary of *Eleutherodactylus goini* showing the central cavity. H-E. **B.** Ovary of *E. zugii*. H-E. **C.** Ovary of *E. atkinsi*. H-E. **D.** Ovary of *Peltophryne longinasa*. H-E. **E.** Ovary of *P. empusa*. H-E. **F.** Ovary of *Osteopilus septentrionalis*. H-E. Opr: previtellogenetic oocyte, Ov: vitellogenetic oocyte, Opt: postvitellogenetic oocyte, Cc: central cavity, Eg: germinal epithelium, Pg: pigments.

En los cortes histológicos se aprecia un espacio o cavidad central en el interior del ovario (Fig. 3A). La distribución y cantidad de ovocitos en los diferentes estadios de vitelogénesis no es homogénea en todos los meses del año donde se realizaron las colectas pues en la etapa de apogeo reproductivo, los ovarios ocupan prácticamente todo el abdomen.

En los ovarios de los ejemplares recolectados en temporada de lluvias se observaron ovocitos en todas las etapas de desarrollo, y en un número tal que la cavidad central desaparece (Fig. 3B, C, D, E y F). Hacia la periferia ovárica se encuentran algunos lechos germinales, que serán detallados más adelante, y ovocitos previtelogénicos.

Combinados con los anteriores, se observan ovocitos vitelogénicos en diverso grado de acumulación de plaquetas vitelinas y menos abundantes, ovocitos posvitelogénicos. Estos últimos son los que deben ser ovulados.

Sin embargo, en los ejemplares que se recolectaron en temporada de seca, en los ovarios se observa un epitelio germinativo que los recubren y se evidencia la presencia de una cavidad central y ovocitos con muy poco nivel de desarrollo, casi todos con características de una previtelogénesis incipiente (Fig. 4). No obstante, dos ejemplares de *O. septentrionalis* exhibieron ovocitos vitelogénicos en el mes de noviembre (Fig. 4D) y aún en diciembre.

En estos casos se observa la presencia de abundantes cuerpos pigmentarios en el ovario. En un ejemplar de *P. peltocephala* se identificó en los cortes la presencia de un órgano de Bidder prominente (Fig. 4B).

Para la identificación de las etapas de la vitelogénesis por la que se encuentra transitando el ovocito y que va a permitir su clasificación, consideramos en primer lugar la coloración de cada tipo de ovocito con las tinciones utilizadas.

La tinción con hematoxilina-eosina mostró variaciones en la coloración del vitelo en un mismo ovocito, un rosado más intenso hacia la zona más cercana al núcleo y más claro hacia la periferia al inicio de la vitelogénesis. De ahí que se observe desde el rosado-violáceo opaco y homogéneo para los ovocitos

previtelogénicos (Fig. 3 A y B), rosado claro para los vitelogénicos en la zona cercana al núcleo y más oscuro en la periferia (Fig. 3C, 6B y D).

El rosado más intenso, casi rojo-violeta para los postvitelogénicos en todo el interior del ovocito, acorde a la cantidad de plaquetas vitelinas en el citoplasma (Fig. 7A, C, D y E). De igual forma, se aprecia la misma variación en la intensidad del color azul en los cortes teñidos con azul de toluidina, en los previtelogénicos (Fig. 4A, 5B y E), vitelogénicos (Fig. 6E y F) y posvitelogénicos (Fig. 7B y F). Posteriormente se consideraron otros detalles a nivel celular que serán descritos a continuación.

Los ovocitos previtelogénicos están rodeados por células somáticas epiteliales denominadas foliculares. Este recubrimiento se aprecia en los ovocitos que se encuentran cercanos al lecho germinal pero también se observa en ovocitos previtelogénicos que se encuentran en otras zonas del ovario. Estas células foliculares en la capa granulosa se encuentran muy unidas. En la medida que ocurre el desarrollo de los folículos y la acumulación de vitelo en su interior aumenta, las células sexuales se aprecian de mayor tamaño.

Las células foliculares de la cubierta son planas y externamente aparece otra capa de células que conforman la teca (Fig. 5A y B) la cual presenta fibroblastos. Estas últimas son células grandes y alargadas con un núcleo voluminoso e irregular y de un gran tamaño en comparación con el citoplasma. Estas dos capas de células se observaron muy unidas. El núcleo del ovocito es irregular, situado hacia la zona central y muestra en su interior la presencia de numerosos nucléolos cuya distribución fue en la mayoría de los cortes hacia la envoltura nuclear (Fig. 5C, D y E).

Los ovocitos vitelogénicos son fáciles de reconocer macroscópicamente debido a su gran tamaño. Al igual que los ovocitos previtelogénicos, presentan una cubierta de células foliculares muy unida a la cubierta externa formada por la teca (Fig. 6A, B, C y F). Al igual que en el estadio anterior, los ovocitos se encuentran recubiertos, después de la membrana plasmática, por una membrana de naturaleza inerte, la membrana vitelina (Fig. 6F).

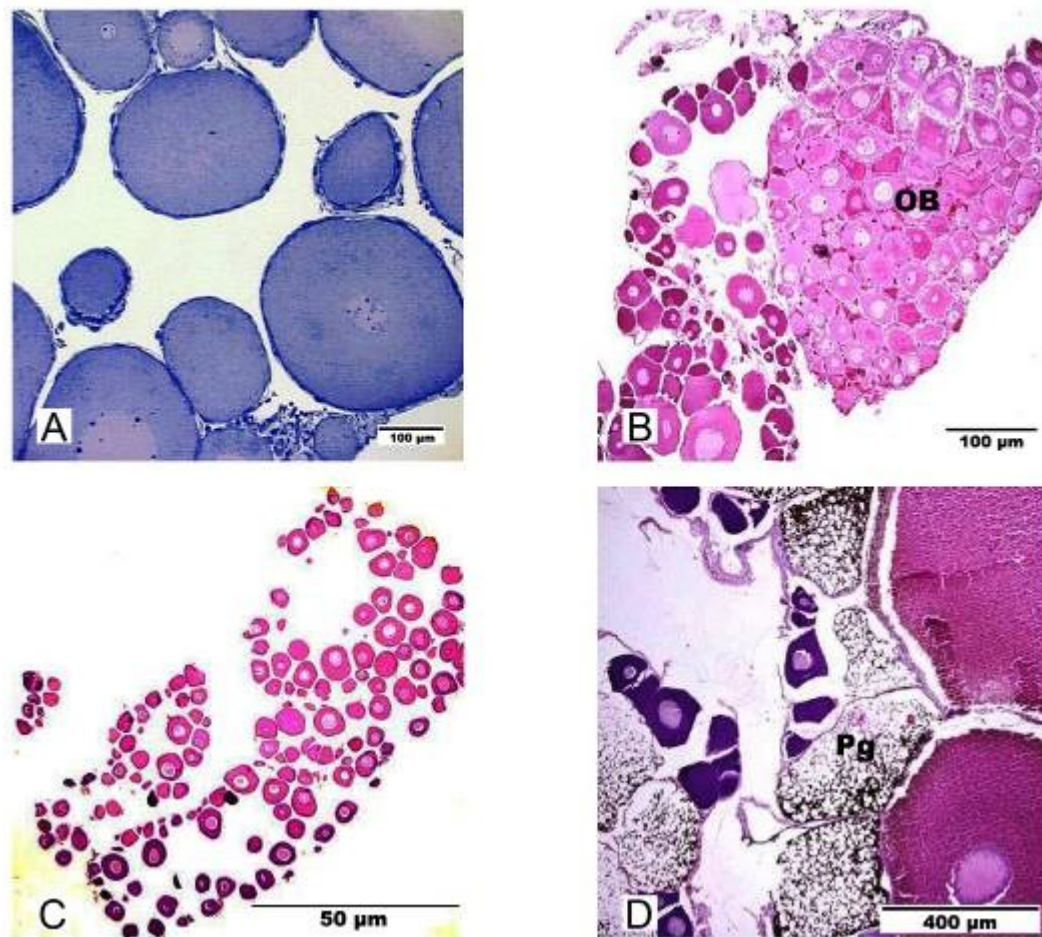


Figura 4. Cortes de ovarios de las tres especies de anuros recolectados en los meses de seca donde se observan ovocitos en la primera etapa de la vitelogénesis. **A.** Ovario de *Eleutherodactylus goini* recolectado en febrero. AT. **B.** Ovario de *Peltophryne peltoccephala* de ejemplar recolectado en noviembre, donde se observa en la esquina superior derecha el órgano de Bidder. H-E. **C.** Ovario de *Osteopilus septentrionalis* con ovocitos previtelogénicos de ejemplar recolectado en noviembre. H-E. **D.** Ovario de *O. septentrionalis* con ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos de ejemplar recolectado también en noviembre. Nótese la presencia de numerosos cuerpos pigmentarios (atresia pigmentaria) H-E.

Figure 4. Ovarian sections of the three species of anurans collected in the dry months where oocytes are observed in the first stage of vitellogenesis. **A.** Ovary of *Eleutherodactylus goini* collected in February. AT. **B.** Ovary of *Peltophryne peltoccephala* from a specimen collected in November, showing Bidder's organ in the upper right corner. H-E. **C.** *Osteopilus septentrionalis* ovary with previtellogenic oocytes from specimen collected in November. H-E. **D.** Ovary of *Osteopilus septentrionalis* with previtellogenic and vitellogenic oocytes from a specimen also collected in November. Note the presence of numerous pigmentary bodies (pigmentary atresia). H-E. OB: Bidder's organ, Pg: pigments.

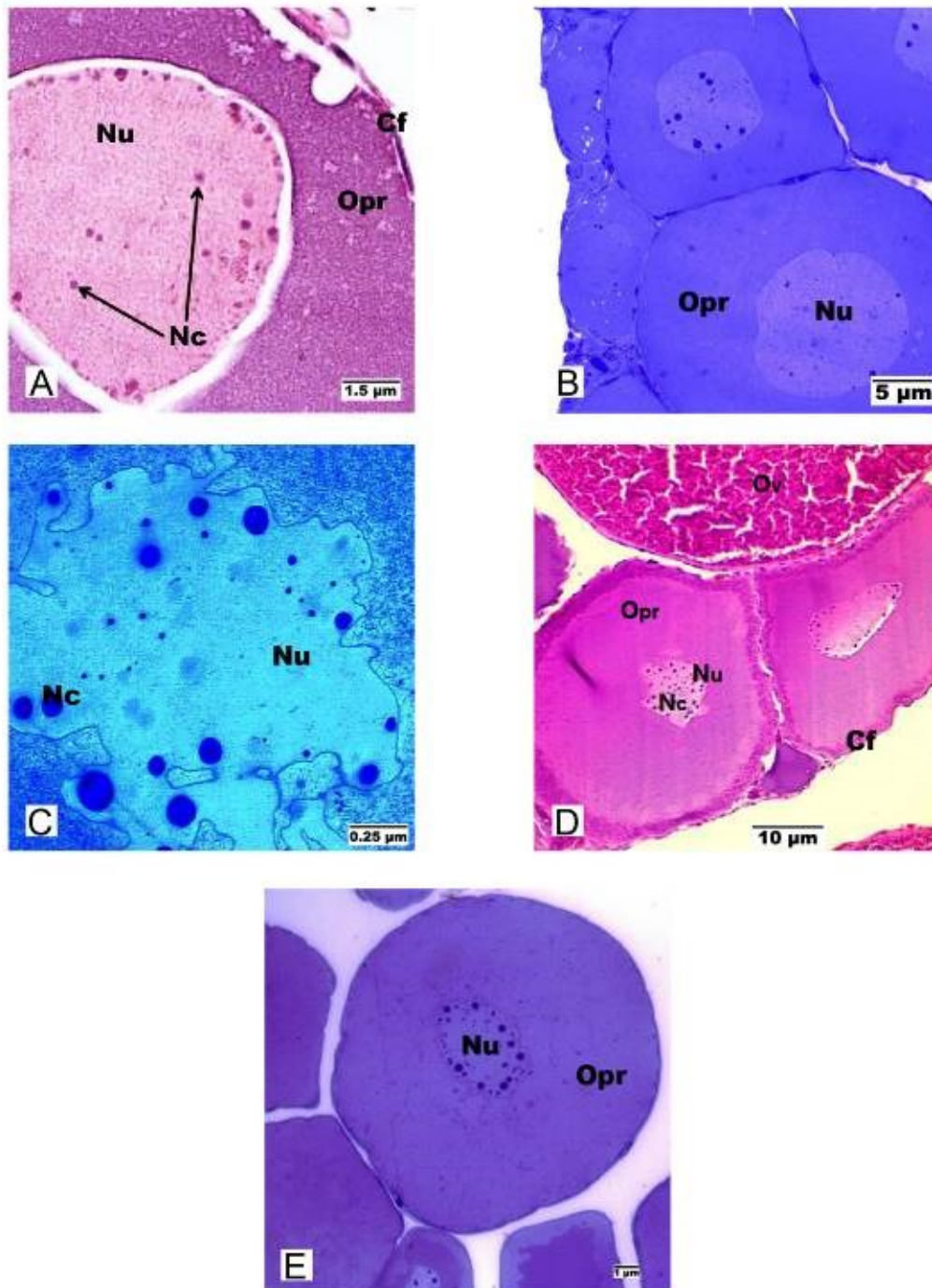


Figura 5. Ovocitos previtelogénicos presentes en los ovarios de cinco de las especies de anuros analizadas. **A.** *Eleutherodactylus atkinsi*. H-E. **B.** *E. blairhedgesi*. AT. **C.** Núcleo de ovocito de *E. zugi* donde se observan los nucléolos. AT. **D.** *Peltophryne taladai*. H-E. **E.** *Osteopilus septentrionalis*. AT. Opr: ovocito previtelogénico, Ov: ovocito vitelogénico, Nu: núcleo, Nc: nucléolo, Cf: células foliculares.

Figure 5. Previtellogenic oocytes present in the ovaries of five of the species of anurans analyzed. **A.** *Eleutherodactylus atkinsi*. H-E. **B.** *E. blairhedgesi*. AT. **C.** Oocyte nucleus of *E. zugi* showing the nucleoli. AT. **D.** *Peltophryne taladai*. H-E. **E.** *Osteopilus septentrionalis*. AT. Opr: previtellogenic oocyte, Ov: vitellogenic oocyte, Nu: nucleus, Nc: nucleolus, Cf: follicular cells.

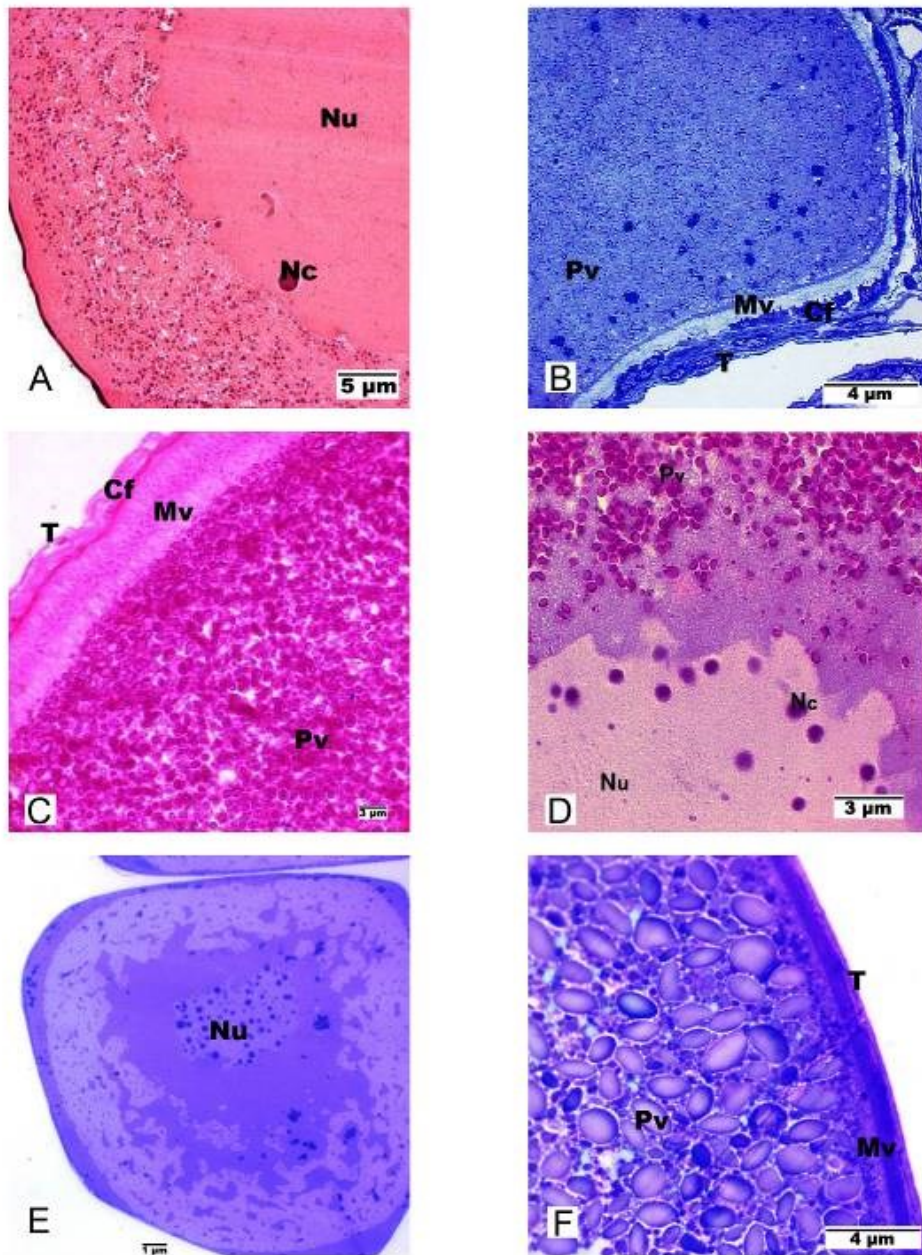


Figura 6. Ovocitos vitelogénicos presentes en los ovarios de cinco de las especies de anuros analizadas. **A.** *Eleuterodactylus atkinsi* al inicio de la vitelogénesis. H-E. **B.** Ovocito de *E. goini* con vitelogénesis avanzada. AT. **C.** Periferia de un ovocito de *Peltophryne florentinoi*. H-E. **D.** Núcleo de un ovocito de *P. taladai* que se aprecia menos irregular que en los ovocitos previtelogénicos. H-E. **E.** Ovocito de *Osteopilus septentrionalis*. AT. **F.** Periferia de ovocito de *Osteopilus septentrionalis*. AT. Opr: ovocito previtelogénico, Ov: ovocito vitelogénico, Pv: plaquetas vitelinas, Nu: núcleo, Nc: nucléolo, T: teca, Mv: membrana vitelina.

Figure 6. Vitellogenic oocytes present in the ovaries of five of the species of anurans analyzed. **A.** *Eleuterodactylus atkinsi* at the beginning of vitellogenesis. H-E. **B.** Oocyte of *E. goini* with advanced vitellogenesis. AT. **C.** Periphery of a *Peltophryne florentinoi* oocyte. H-E. **D.** Nucleus of a *P. taladai* oocyte that appears less irregular than in previtellogenic oocytes. H-E. **E.** Oocyte of *Osteopilus septentrionalis*. AT. **F.** Oocyte periphery of *Osteopilus septentrionalis*. AT. Cf: follicular cells, T: theca, Mv: vitelline membrane, Pv: vitelline platelets, Nu: nucleus, Nc: nucleolus, T: theca, Mv: vitelline membrane.

El citoplasma de estos ovocitos es muy abundante y muestra una acumulación progresiva de vitelo en forma de plaquetas vitelinas, que se observa diferente en la periferia de la célula respecto al citoplasma que rodea al núcleo. De ahí que durante esta etapa en el citoplasma del ovocito se aprecia una diferenciación en regiones en función de la acumulación de orgánulos; una región cortical más externa y periférica, una región medular inmediatamente por debajo, que se observa más clara en las tinciones, y una última región, más cercana al núcleo, que se corresponde con el citoplasma activo, la cual se observa aún más clara con las tinciones empleadas (Fig. 6A, D y E).

En los ovocitos postvitelogénicos se aprecia un aumento considerable de tamaño y solamente pueden ser observados completamente con bajos aumentos al microscopio de campo claro. Poseen la capa granulosa, las células foliculares muy aplanadas y la teca externa rodeándolo (Fig. 7). Estas últimas dos capas de células se observaron muy unidas entre sí, con apariencia de una sola capa (Fig. 7A, B, D y F). La coloración del citoplasma es uniforme en todo el ovocito debido a la presencia de abundantes plaquetas vitelinas de gran tamaño (Fig. 7E y F).

Se comprobó la presencia de lechos germinales de ovogonias en la periferia ovárica, observada en los cortes de ovarios de las especies analizadas (Fig. 8). No se observaron folículos atrésicos en ninguno de los cortes analizados.

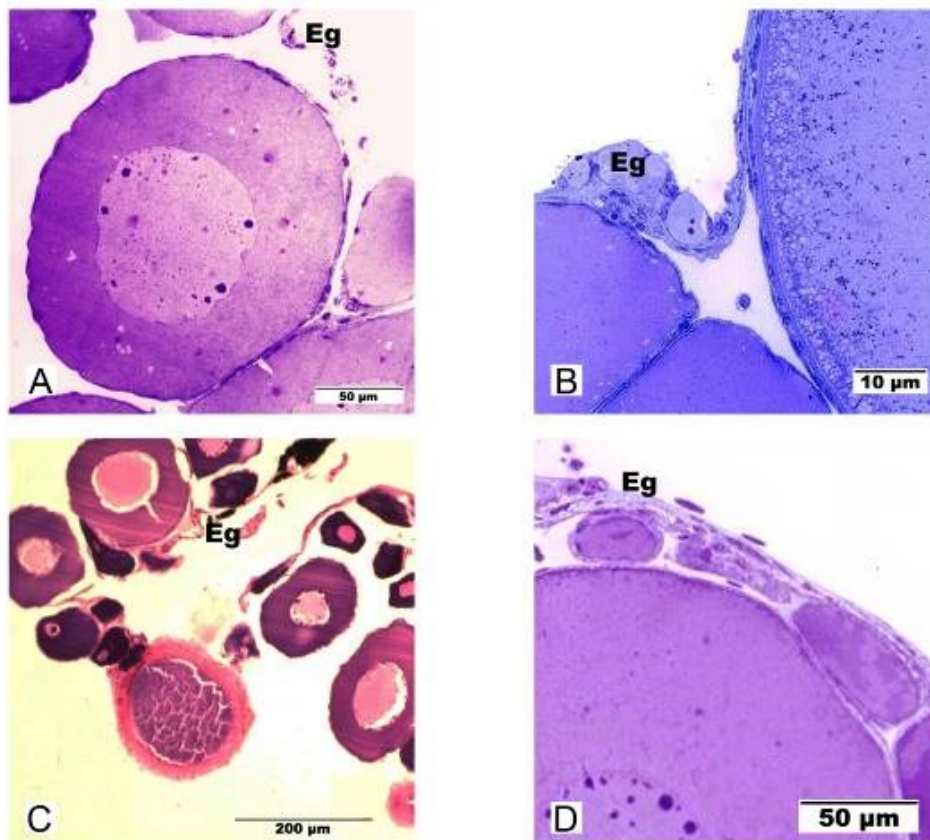


Figura 8. Lechos germinales en la periferia de los ovarios de cuatro de las especies analizadas. **A.** *Eleutherodactylus bairhedgesi*. AT. **B.** *E. thomasi*. AT. **C.** *Peltophryne empusa*. H-E. **D.** *Osteopilus septentrionalis*. AT. Eg: epitelio germinal.

Figure 8. Germ beds in the periphery of the ovaries of four of the species analyzed. **A.** *Eleutherodactylus bairhedgesi*. AT. **B.** *E. thomasi*. AT. **C.** *Peltophryne empusa*. H-E. **D.** *Osteopilus septentrionalis*. AT. Eg: germinal epithelium.

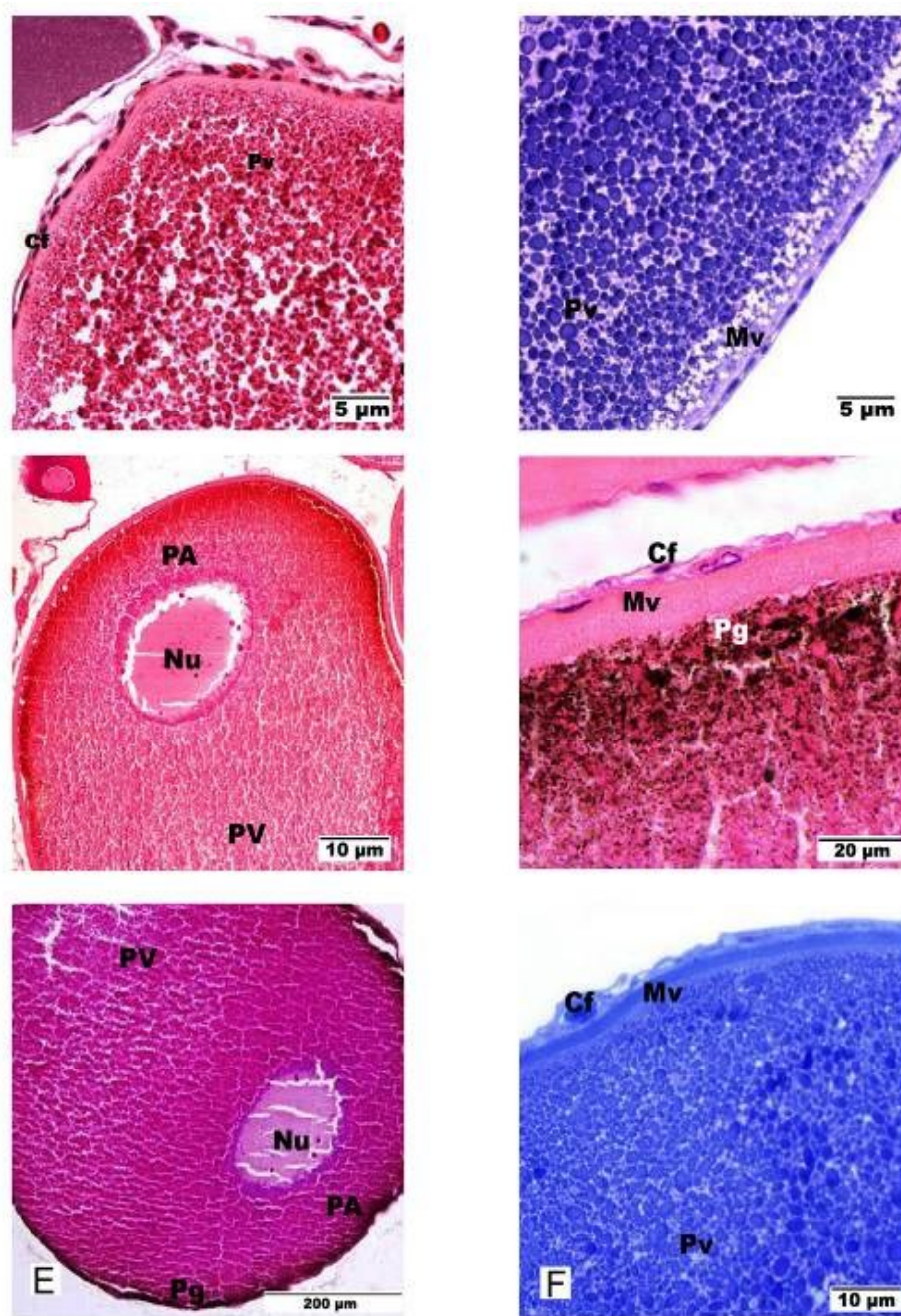


Figura 7. Ovocitos postvitelogénicos presentes en los ovarios de cuatro de las especies de anuros analizadas. **A.** *Eleutherodactylus atkinsi*. H-E. **B.** Periferia de un ovocito de *E. thomasi*. AT. **C.** *Peltophryne empusa*. H-E. **D.** Periferia de un ovocito de *P. empusa* donde se aprecian pigmentos. H-E. **E.** Ovocito de *Osteopilus septentrionalis* donde se distinguen el polo animal pigmentado y el polo vegetativo. H-E. **F.** Periferia de un ovocito de *Osteopilus septentrionalis*. AT. Opt: ovocito postvitelogénico, Pv: plaquetas vitelinas, Cf: células foliculares, PA: polo animal, PV: polo vegetativo, Pg: pigmentos, Pv: plaquetas vitelinas.

Figure 7. Postvitellogenic oocytes present in the ovaries of four of the species of anurans analyzed. **A.** *Eleutherodactylus atkinsi*. H-E. **B.** Periphery of an *E. thomasi* oocyte. AT. **C.** *Peltophryne empusa*. H-E. **D.** Periphery of a *P. empusa* oocyte showing pigments. H-E. **E.** Oocyte of *Osteopilus septentrionalis* where the pigmented animal pole and the vegetative pole are distinguished. H-E. **F.** Periphery of an *Osteopilus septentrionalis* oocyte. AT. Cf: follicular cells, Mv: vitelline membrane, Pv: vitelline platelets, Nu: nucleus, PA: animal pole, PV: vegetative pole, Pg: pigments, Pv: vitelline platelets.

DISCUSIÓN

El sistema reproductor femenino de las siete especies estudiadas presentó las características morfológicas típicas de las hembras de anfibios anuros, compuesto por un par de ovarios y dos oviductos asociados (Estrada y Uribe, 2002; Ogielska y Kotusz, 2004; Wells, 2007). La histología de los ovarios muestra características generales que coinciden con otras especies de anuros (Sanz *et al.*, 2008, Sanz *et al.*, 2011; Iturriaga *et al.*, 2012; Casas *et al.*, 2014; Alfonso *et al.*, 2017). La descripción mostrada de los ovocitos en las distintas etapas de la vitelogénesis coincide con lo observado por Fontaine (2005), Iturriaga *et al.* (2012) y Alfonso *et al.* (2017) para especies cubanas, sobre todo del género *Eleutherodactylus*. Igualmente es similar a lo hallado para otras ranas por otros autores (Hoque y Saidapur, 1994; Prado *et al.*, 2004; De Oliveira y De Souza, 2004).

Los pigmentos encontrados hacia el polo animal en los ovocitos de las especies de *Peltophryne* y en *Osteopilus septentrionalis*, pudieran interpretarse como un factor de protección del núcleo que se encuentra ubicado hacia esa zona frente a las radiaciones ultravioletas provenientes del sol (Gilbert, 2006). No obstante, estas especies muestran una mayor dependencia de cuerpos de agua para sus puestas que las del género *Eleutherodactylus*, por lo que se requieren estudios posteriores para validar esta afirmación o sugerir otra función de estos pigmentos en los ovocitos.

La presencia de un órgano de Bidder en una hembra del sapo *P. peltocéphala* es un hallazgo poco común en especies cubanas. Es una estructura considerada como típica en los testículos de los machos de las especies de sapos del género *Peltophryne* (Sanz *et al.*, 2015). El órgano funciona como un ovario vestigial, aunque se menciona su posible función endocrina y no es típica su presencia en todas las hembras adultas de las distintas especies de sapos (Piprek *et al.*, 2014).

Es frecuente encontrar en la literatura varios estadios dentro de la etapa de crecimiento donde ocurre la acumulación de vitelo en el ovocito, teniendo en cuenta la disposición de las plaquetas vitelinas en torno al núcleo y su cantidad, así como la ubicación del núcleo pues a medida que avanza la vitelogénesis se va desplazando hacia la periferia de la célula (De Oliveira y De Souza, 2004; Prado *et al.*, 2004). El núcleo marcadamente irregular y con numerosos nucleólos, carácter que también permite identificar los

ovocitos previtelogénicos, se debe a que estos 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; Sanz *et al.*, 2019).

No obstante, al microscopio de campo claro, la clasificación en tres estadios es suficiente, si se tiene en cuenta que en la etapa de vitelogénesis es posible determinar una vitelogénesis temprana y una más avanzada, de acuerdo a la presencia y disposición de las plaquetas vitelinas en el citoplasma (Iturriaga, 2012).

En todos los años de muestreo ha sido posible la identificación de folículos en diferentes estadios de desarrollo en una misma hembra lo cual es fácilmente detectable en los meses de apogeo reproductivo, que coinciden con la época de lluvia. No obstante, en las especies que se recolectaron en prácticamente todos los meses del año, la disminución de la capacidad reproductiva demostrada a partir de la ausencia de ovocitos vitelogénicos en el ovario se constata entre noviembre y enero. Esto permite afirmar que pueden reproducirse prácticamente durante todo el año, si las variables ambientales resultan favorables. De ellas, en la literatura se ha considerado fundamentalmente la temperatura como factor más influyente y posteriormente, las precipitaciones, como se ha demostrado en estudios anteriores de la dinámica gonadal de algunas de estas especies (Iturriaga *et al.*, 2014; Rodríguez, 2015).

La presencia de los tres estadios de desarrollo en un mismo ejemplar ha sido considerado como evidencia de que las hembras no depositan todos los huevos de una vez, sino que realizan varias puestas en un mismo evento reproductivo (Bignotte, 2019). Según Pacheco-Florez y Ramírez-Pinilla (2014) en un estudio similar realizado a *Geobatrachus walkerien* en Colombia, sería posible determinar o al menos inferir el número de puestas de una hembra determinando el número de folículos vitelogénicos y posvitelogénicos que poseen en sus ovarios.

Esto apunta a considerar la existencia de varios picos reproductivos en un mismo año, unido a la extensión de su temporada reproductiva bajo la influencia de las altas temperaturas, aún fuera de la época de lluvia. La temperatura ha demostrado ser el factor predominante que desencadena el inicio de la temporada reproductiva, más que las precipitaciones, la humedad relativa o el fotoperíodo (Iturriaga *et al.*,

2014; Casas *et al.*, 2014; Rodríguez, 2015) aunque en meses de la llamada época de seca, si la temperatura se mantiene en valores altos similares a los del verano, es posible encontrar actividad reproductiva en estos individuos, como ocurrió en *Osteopilus septentrionalis*.

Lo anterior lleva a considerar el patrón de reproducción de estas especies cubanas como potencialmente continuo, considerado como intermedio entre los tipos continuo y el discontinuo o estacional. En las regiones templadas, tropicales y subtropicales, se considera que en las especies con patrón continuo la reproducción ocurre durante todo el año (Pacheco-Florez y Ramírez-Pinilla, 2014), a diferencia de aquellas donde es discontinuo o estacional. Este último se relaciona con una dependencia marcada con los cambios en la temperatura o las precipitaciones, en aquellos lugares con una clara estacionalidad, respecto al inicio de la vitelogénesis y también de la espermatogénesis en los machos (Sretarugsa *et al.*, 2001).

La reproducción durante todo el año con independencia de las condiciones climáticas no se ajusta a lo que ocurre en las poblaciones cubanas analizadas por lo que su ciclo reproductivo no debe ser considerado como continuo. Tampoco sería adecuado clasificarlo como discontinuo, pues en realidad en algunos momentos es posible encontrar etapas avanzadas de la vitelogénesis, y por ende, posibilidad de puesta de huevos, en meses considerados como menos favorables para su apareamiento, como son los meses de la temporada de seca. Tal patrón discontinuo es descrito en especies que habitan en regiones tropicales con marcada estacionalidad pero también en regiones templadas (Hoque y Saidapur, 1994; Todd *et al.*, 2010).

La presencia de lechos de ovogonias en los ovarios constituye otra evidencia que apoya la posibilidad de realizar varias puestas en una misma temporada reproductiva. Los lechos germinales son considerados un carácter típico de los anuros, aunque también se han descrito en peces óseos y en reptiles (Uribe, 2003). En algunos grupos pueden encontrarse dos lechos o incluso un epitelio externo de ovogonias. Esto se relaciona con la posibilidad de que a lo largo de toda la vida reproductiva de la hembra, las células germinales originen ovogonias durante todo el año, a diferencia de elasmobranchios, aves y mamíferos, donde esta multiplicación ocurre durante la etapa embrionaria (Uribe, 2003; Gilbert, 2006). Los lechos

de ovogonias son la evidencia de que la hembra cuenta con poblaciones celulares primarias para varios eventos reproductivos en el año pero su activación depende de las variables ambientales.

En cuanto a la ausencia de folículos atrésicos detectada, algunos autores consideran que en anuros la atresia no es frecuente, aun cuando se le considera un evento común a todos los vertebrados. Sin embargo, Sretarugsa *et al.* (2001) describieron la presencia de folículos degenerados en una población de *Hoplobatrachus tigerinus* (reportado anteriormente como *Rana tigrina*) de Tailandia, mantenida en condiciones de laboratorio y refirieron su incremento en los meses de octubre a febrero donde la actividad reproductiva decrece. Igual resultado fue reportado por Pucci *et al.* (2012) para *Leptodactylus latinasus* mantenida en cautiverio. Se ha demostrado que en cautividad, aun si se logra el amplexo, las hembras no siempre alcanzan la ovulación, resultando en huevos vitelogénicos con atresia. La falta de condiciones ambientales adecuadas no siempre proporcionadas por las cámaras donde se mantienen los ejemplares pudiera ser la causa del incremento de los procesos de atresia encontrados. La atresia masiva se traduce en ausencia de ovulaciones adecuadas lo que sustenta la relación entre las variables ambientales y la maduración de las células sexuales (Pucci *et al.*, 2012).

Luego de aceptar la contribución histológica que se obtiene al analizar los cortes de ovarios, sobrevienen dos interrogantes: ¿es de esperar que el inicio de la espermatogénesis en los machos coincida en época con la vitelogénesis en las hembras? y ¿la producción de espermatozoides se mantendrá durante toda la temporada reproductiva de modo que permita la fertilización de los ovocitos maduros? La respuesta a estas preguntas debe ser afirmativa si se tiene en cuenta que Iturriaga *et al.* (2014) informaron una espermatogénesis total a partir de junio en los machos de *E. planirostris* de una población de La Habana, mientras que la vitelogénesis en las hembras comenzó en abril. No obstante, algunos autores han demostrado que la temperatura se relaciona directamente con el inicio de la vitelogénesis pero no necesariamente ejerce una influencia sobre el comienzo de la espermatogénesis (Hoque y Saidapur, 1994; Díaz-Páez y Ortiz, 2001). En reportes posteriores sería conveniente demostrar este comportamiento a nivel histológico en los testículos de las especies aquí estudiadas, pues la sincronización de ambos eventos permitiría explicar el éxito reproductivo de estas especies.

LITERATURA CITADA

- Aguilar M., B. Coutiño y P. Salinas (1996). Manual de técnicas histológicas e histoquímicas. Facultad de Ciencias. UNAM. México 130 pp.
- Aguilar-Miguel X., G. Legorreta B Y G. Casas-Andreu (2009). Reproducción *ex situ* en *Ambystoma granulosum* y *Ambystoma lermaense* (Amphibia: Ambystomatidae) Acta Zool. Mex 25(3): 443-454
- Alfonso Y. U., Y. Rodríguez-Gómez, P. Charruau, A. Sanz-Ochotorena y K. L. Krysko (2017). Oviposition and gonadal ultrastructure in the Cuban groin-spot frog, *Eleutherodactylus atkinsi* Dunn, 1925 (Anura: Eleutherodactylidae). Coepeia 105: 781-790.
- Alonso R. y L. Y. García (2017). Anfibios. En: C. A. Mancina y D. D. Cruz, (Eds.) Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas. Editorial AMA, La Habana. pp. 348-375.
- Antoniazzi C. E., J. A. López, R. Ghirardi y A. P. Armando (2014). Parámetros reproductivos de *Hypsiboas punctatus* (Schneider, 1799) (Anura: Hylidae) en el extremo sur de su área de distribución. Rev. Peru. Biol. 20(3): 241 – 244
- Antoniazzi C. E., J. A. López, R. Ghirardi y A. P. Armando (2019). Biología reproductiva de *Boana pulchella* y *Boana punctata* (Anura: Hylidae) en poblaciones simpátricas de humedales templados. Caldasia 41(2): 245-256.
- Bignotte I. (2019). Reproducción y vocalizaciones en especies de ranas del género *Eleutherodactylus* del Oriente de Cuba. Tesis de Doctorado, Universidad de Alicante, España. 132pp.
- Casas L., Y. Rodríguez, A. Sanz, R. Lara, M. L. Segura y L. F. Jiménez (2014). Descripción morfológica de gónadas y células sexuales de dos especies de ranas cubanas del género *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae). Rev. Cub. Cien. Biol. 3: 38-47.
- De Oliveira C. y L. R. De Souza (2004). Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovaris* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). Rev. Bras. Zool. 21(4): 919-923.
- Díaz L. M. y A. Cádiz (2008). Guía taxonómica de los anfibios de Cuba. AbcTaxa 4: 1-294.
- Díaz-Páez H.P. y J.C. Ortiz (2001). The reproductive cycle of *Pleurodema thaul* (Anura, Leptodactylidae) in central Chile. Amphibia-Reptilia 22: 431-445.
- Estrada E. y M.C. Uribe (2002). Atlas de histología de vertebrados. Coordinación de Servicios Editoriales, Facultad de Ciencias. UNAM, México. 222pp
- Fontaine Y. (2005). Morfología de las gónadas de ranitas cubanas del género *Eleutherodactylus*. Tesis de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. 43p.
- Frost D. R. (2020). Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponible en: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. Último acceso : 11 de noviembre de 2020.
- Gilbert S. F. (2006). Developmental Biology. Sinauer Associates Inc., Massachusetts. 8th. Edition. 817 pp.
- Haddad C. F. y C. P. Prado (2005). Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. BioScience 55(3):207-217.
- Hoque B. y S.K. Saidapur (1994). Dynamic oogenesis in the tropical anuran *Rana tigrina* (Amphibia: Ranidae) with special reference to vitellogenic cycle in wild-caught and captive frogs. J. Biosci. 19:339-352.
- Instituto de Meteorología (2020). <http://www.met.inf.cu/clima/ClimaCuba.htm>. (último acceso 11 de noviembre de 2020).
- Iturriaga M., Y. Rodríguez-Gómez y A. Sanz (2012) Structural and ultrastructural description of the gonads of *Eleutherodactylus planirostris* (Anura: Eleutherodactylidae). Herpetol. Notes 5:281-290.
- Iturriaga M., A. Sanz y R. Oliva (2014). Seasonal Reproduction of the Greenhouse Frog *Eleutherodactylus planirostris* (Anura: Eleutherodactylidae) in Havana, Cuba. South Am. J. Herpetol. 9(2): 142-150.
- Mancina C. A., R. Fernández de Arcila, D. D. Cruz, M. A. Castañeira y A. González (2017). Diversidad biológica terrestre de Cuba. En: C. A. Mancina y D. D. Cruz (Eds.) Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas. Editorial AMA, La Habana. pp. 8-22.
- Moreno R., G. Santos y A. García (2018). Las selvas secas y la reproducción de los anfibios. CONABIO. Diversitas 140: 12-16.
- Ogielska M. y A. Kotusz (2004). Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. J. Morphol. 259:41-54.
- Pacheco-Florez V. y M. P. Ramírez-Pinilla (2014). Ecología reproductiva de *Geobatrachus walkeri* (Anura: Srrabomantidae). Rev. Biol. Trop. 62(1): 183-199.
- Piprek R. P., K. Malgorzata y J. Z. Kubiak (2014). Bidder's organ -structure, development and function. International Int. J. Dev. Biol. 58: 819-827.
- Pough F. H., R. M. Andrews, M. L. Crump, A. H. Savitzky, K. D. Wells y M. C. Brandley (2016) Herpetology. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, 4th Edition. 589 pp.
- Prado C. P., F. Camargo,, A. P. Z. Silva y J. Zina (2004). Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological considerations. Braz. J. Morphol. Sci. 21(4)177-184.
- Pucci A., M. L. Ponssa, F. J. Pucci; M. F. Alcaide (2012) Histología de ovario en hembras vitelogénicas de *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae). Acta Zool. lilloana56 (1-2): 44-53.
- Rodríguez-Gómez Y. (2008). Morfología de las gónadas de cuatro especies del género *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae). Tesis de Doctorado. Universidad de La Habana, Cuba. 87p.
- Rodríguez-Gómez Y., A. Sanz, M. L. Segura-Valdez, R. Lara-Martínez y L. F. Jiménez-García (2010). Morfología del ovario en ranas del género *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae). Microsc. Acta 19:271-278.

- Rodríguez R. (2015). Ciclo gonadal de *Osteopilus septentrionalis* (Anura: Hylidae) en la provincia Matanzas, Cuba. Tesis de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. 78pp.
- Sanz A., M. L. Segura-Valdez, Y. Rodríguez-Gómez, R. Lara-Martínez y L. F. Jiménez-García (2008). Estructura y ultraestructura de la gónada de los machos de *Bufo fustiger* (Anura: Bufonidae). *Tip Rev. Espec. Cienc. Quím. Biol.* 11: 81-86.
- Sanz A., M. L. Segura-Valdez, Y. Rodríguez-Gómez, R. Lara-Martínez y L. F. Jiménez-García (2011). Pigmentos en los testículos de cinco anfibios endémicos de Cuba (*Eleutherodactylus turquinensis*, *E. cuneatus*, *E. glamyrus*, *Bufo longinasus longinasus* y *B. longinasus cajalbanensis*). *Tip Rev. Espec. Cienc. Quím. Biol.* 14:30-37.
- Sanz A., Y. Rodríguez-Gómez, M. L. Segura-Valdez, R. Lara-Martínez y L. F. Jiménez-García (2015). El órgano de Bidder en sapos (*Peltophryne* spp.) endémicos de Cuba. Aspectos morfológicos y de ultraestructura. *Rev. Cub. Cien. Biol.* 4(1): 78-88.
- Sanz A., Y. Rodríguez-Gómez, M. L. Segura-Valdez, R. Lara-Martínez y L. F. Jiménez-García (2019). Anfibios cubanos. Atlas de la morfología microscópica de las gónadas de los anfibios y reptiles de Cuba. Editorial UH, La Habana. pp. 23-40.
- Sretarugsa, P., W. Weerachayanukula, J. Chavadeja, M. Krutrachueb y P. Sobhona (2001). Classification of developing oocytes, ovarian development and seasonal variation in *Rana tigerina*. *ScienceAsia* 27: 1-14.
- Todd B. D., D. E. Scott, J. H. K. Pechmann, J. W. Gibbons (2010). Climate change correlates with rapid delays and advancements in reproductive timing in an amphibian community. *Proceedings of the Royal Society B*:1-7. doi:10.1098/rspb.2010.1768
- Uribe M. C. (2003). Amphibians. En: H. M. Dutta y J.S. DattaMunshi (Eds.) *Vertebrate functional morphology. Reproductive systems of Caudata*. Science Publishers, Inc. Sci. Pub. Inc. pp. 267-293.
- Valderrama-Vernaza M., V. H. Serrano-Cardozo y M. P. Ramírez-Pinilla (2010). Reproductive activity of the andean frog *Ranitomeya virolinensis* (Anura: Dendrobatidae). *Copeia* 2: 211-217.
- Vázquez-Nin G. H. y O. M. Echevarría (2000) *Introducción a la Microscopía Aplicada a las Ciencias Biológicas*. UNAM, Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 168 pp.
- Vitt L. J y J. P. Caldwell (2014). *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press, Elsevier, 4th Edición. 757 pp.
- Wells K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago. 1085 pp.

