**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

# Descripción morfológica parcial de la oogénesis de *Bolitoglossa peruviana* (Caudata, Plethodontidae)

**Disertación previa a la obtención del Título de Licenciada en Ciencias Biológicas**

**Stefania Alejandra Tapia Guato**

**Quito, 2018**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Stefania Alejandra Tapia Guato ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Óscar Pérez

Director de Disertación

28 de febrero del 2018

A mis padres por su incondicional apoyo y principalmente a mis hermanos Monserratte y Saúl porque sin su luz esto no habría sido posible.

# AGRADECIMIENTOS

A Óscar Pérez, director de mi proyecto de tesis por su gran apoyo, motivación, tiempo compartido y por creer en mi desde el primer momento, acogiéndome en su laboratorio y transmitiéndome su amor por la biología del desarrollo.

A la PUCE, por el financiamiento de esta investigación.

Al laboratorio de citogenética de la PUCE y a su equipo por permitirme utilizar sus instalaciones y ayudarme con material colectado para la realización de este estudio.

A mis grandes amigos del colegio, quienes siempre han estado presentes de cualquier forma y me han visto crecer. Por las experiencias vividas y el gran lazo que hemos formado en todos estos años.

A mis amigos de la Universidad, por compartir ese amor a la vida.

A mis queridos primos, por su gran cariño y confianza.

A mi Tío Teodoro Barros, quién siempre ha demostrado interés en todos mis proyectos a lo largo de mi carrera y me ha alentado a seguir.

A mis padres Edwin y Judy, que a pesar de los tiempos difíciles nunca se han rendido conmigo, por su único y verdadero amor.

A mis hermanos Monserratte y Saúl, quienes me han servido de inspiración y a quienes espero haber alentado a seguir adelante y nunca rendirse.

A mi abuelita, por sus consejos y su tierno amor.

# TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN ..... 1
2. ABSTRACT ..... 2
3. INTRODUCCIÓN ..... 3
3.1 OBJETIVOS ……8
3.1.1 OBJETIVO GENERAL ……8
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ……..…..8
4. MATERIALES Y MÉTODOS ..... 9
4.1 OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES ..... 9
4.2 TABLA DE LA OOGÉNESIS ..... 9
4.3 ANÁLISIS DE OOGÉNESIS ..... 10
5. RESULTADOS ..... 11
5.1 OOGÉNESIS ..... 12
6. DISCUSIÓN ..... 13
7. CONCLUSIONES ..... 20
8. LITERATURA CITADA ..... 22
9. FIGURAS ..... 228
10. TABLAS ..... 35
11. ANEXOS ……..... 37

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ovariectomía y porción del ovario de *B. peruviana* ……... 28

Figura 2. Oogonías ……. 29

Figura 3. Oocitos primarios …… 30

Figura 4. Desarrollo de oocitos previtelogénicos ……... 31

Figura 5. Desarrollo de oocitos vitelogénicos …… 32

Figura 6. Oocitos postvitelogénicos ……... 33

Figura 7. Media y desviación estándar del tamaño de los oocitos ……. 34

# LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los estadios de la oogénesis en *B. peruviana* ……. 35

Tabla 2. Medidas de los oocitos, media ($\bar{x}$) y desviación estándar (σ) ……...…….. 36

# LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tamaño de los oocitos de algunas especies de salamandras……. 37

# 1. RESUMEN

La diversidad de salamandras en Ecuador consiste en dos géneros y nueve especies. En este estudio se describe por primera vez la oogénesis de *Bolitoglossa peruviana*, una salamandra que habita en la Amazonia peruana y ecuatoriana. En la investigación se colectaron tres muestras de individuos de la provincia de Orellana, los cuales fueron anestesiados y sometidos a ovariectomías. Para ello, los ovarios se preservaron y fijaron en el fijativo de Smith mantenido en formaldehído al 1,5% y almacenado a 4 ° C. Se realizaron cortes histológicos semifinos en micrótomo en el Hospital Oncológico Solca. Estos cortes se tiñeron con Eosina–Hematoxilina (E-H) con el fin de visualizar los núcleos celulares y el citoplasma, para luego ser fijados con parafina. Finalmente, los cortes se visualizaron y microfotografiaron con el programa "Infinity Analyze Software" acoplado a un microscopio con cámara. Basándose en estudios previos de la oogénesis en *Salamandra salamandra infraimmaculata* y *Salamandrella keyserlingii*, se describieron seis estadios de la oogénesis dividido en tres fases para *B. peruviana*: previtelogénesis, vitelogénesis y postvitelogénesis. Este estudio comparte las siguientes similitudes con la literatura encontrada: aparición de plaquetas de yema, una membrana folicular que consiste en dos tipos de células conocidas como teca y granulosa o células foliculares, núcleos y nucléolos. Por todo lo anterior, se tuvo en cuenta las características antes mencionadas debido a que su presencia en los oocitos es representativa para clasificar los estadios.

**Palabras clave:** oogénesis; previtelogénesis; vitelogénesis; postvitelogénesis.

## *2. ABSTRACT*

The diversity of salamanders in Ecuador consists of two genera and nine species. This study describes for the first time the oogenesis of *Bolitoglossa peruviana*, a salamander that lives in the Peruvian and Ecuadorian Amazonia. In the investigation, three samples were collected from the province of Orellana, which were anesthetized and subjected to ovariectomies. For this, the ovaries were preserved and fixed in Smith's solution, maintained in 1.5% formaldehyde solution and stored at 4 ° C. Semi-minimal histological sections were made in the microtome at the Oncological Hospital Solca. These sections were stained with Eosin-Hematoxylin (E-H) in order to visualize the cell nuclei and the cytoplasm and then be fixed with paraffin. Finally, they were visualized and microphotographed with the program "Infinity Analyze Software" coupled to a microscope with a camera. Based on previous studies of oogenesis in *Salamandra salamandra infraimmaculata* and *Salamandrella keyserlingii*, six stages of oogenesis were described divided into three phases for *B. peruviana*: previtellogenesis, vitellogenesis, and postvitellogenesis. The research shares the following similarities between the literature and *B. peruviana:* a follicular membrane consisting of two types of cells known as teca and granulosa or follicular cells, yolk platelets, nuclei and nucleoli. For all the above, the aforementioned characteristics were taken into account because their presence in the oocytes is representative to classify the stages.

**Keywords:** Oogenesis; previtellogenesis; vitellogenesis; postvitellogenesis.

# 3. INTRODUCCIÓN

Los anfibios fueron los primeros vertebrados en dispersarse ampliamente en tierra firme. Actualmente se agrupan en tres grupos: Gymnophiona, Anura y Urodela (Carey y Bryant, 1995). Dentro de este último grupo se encuentran las salamandras y ciertas formas acuáticas que son conocidas como tritones (Wright y Whitaker, 2001). El grupo urodela contiene 9 familias con un total de 68 géneros y 716 especies a nivel mundial (American Museum of Natural History, 2017).

El fácil mantenimiento y la gran abundancia de salamandras en Norteamérica ha permitido la elaboración de varias investigaciones a miembros de este grupo. El estudio en cuanto a sus propiedades regenerativas ha encaminado a descubrir las bases celulares y genéticas de la regeneración de tejidos (Seifert, Monaghan, Voss y Maden, 2012).

En Ecuador se encuentra presente una sola familia de salamandras, Plethodontidae, la cual contiene la mayor diversidad y número de especies en el mundo. Sin embargo, en el país se han registrado apenas dos géneros y nueve especies (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2017).

Uno de los géneros más representativos, presentes en Ecuador es *Bolitoglossa*. Este género contiene ocho especies y dos de ellas son endémicas de este país, se ubican en la parte tropical y los andes. (PUCE, 2017).

Los miembros de la familia Plethodontidae son también conocidos como salamandras sin pulmones (Wright y Whitaker, 2001). Su estrategia reproductiva se basa en la oviparidad; es decir, se reproducen por medio de huevos que las hembras depositan en el medio externo y su desarrollo ocurre fuera del cuerpo de la hembra (Pincheira, 2012). Casi todos los miembros de esta familia son desarrolladores directos. Una característica importante que ha permitido la evolución del desarrollo directo es la fertilización interna. Los machos liberan esperma rodeado de capas de gelatina (espermatóforos) en el agua (Buckley, 2012). Las hembras se posan sobre los espermatóforos y los recogen mediante su cloaca, donde se liberan espermatozoides y se almacenan en la espermateca a la salida del oviducto hasta la fertilización (Mansour *et al.,* 2011). Este tipo de fertilización sucede en la

mayoría de familias de las salamandras, excepto en Sirenidae, Hynobiidae y Cryptobranchidae (Buckley, 2012).

En biología reproductiva, entender el proceso base desde la formación de gametos es fundamental para estudiar los procesos posteriores como la maduración de gónadas, fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario (Wright y Whitaker, 2001). Sin embargo, las investigaciones que se han realizado hasta el momento en Sudamérica son escasas. La propuesta de este estudio es realizar un reporte de la oogénesis y maduración de gónadas en salamandras de la especie *Bolitoglossa peruviana* del Ecuador.

La oogénesis es similar en los tres grupos de anfibios. Es un proceso complejo regulado por una gran cantidad de factores intra y extra ováricos. Las oogonías, que se originan a partir de células primordiales germinales se multiplican por mitosis y forman oocitos primarios que se detienen en la etapa de profase de la primera división meiótica hasta que están completamente desarrollados (Rugh, 1951; Lofts, 1974; Saidapur, 1982; Sharon, Degani y Warburg, 1997; Sánchez y Smitz, 2012).

Pese a que Lofts (1974) reconoce en anfibios dos fases de la oogénesis: primaria y secundaria, caracterizadas por la acumulación de yema y por el crecimiento del oocito, la mayoría de los estudios sobre la oogénesis de los anfibios reconocen tres fases principales: previtelogénesis, vitelogénesis, y postvitelogénesis o maduración (Sharon *et al.*, 1997; Yartsev, Exbrayat y Kuranova, 2015).

El ovario de anfibios contiene 2 tipos de oocitos: oocitos pequeños, independientes de gonadotropina y oocitos grandes dependientes de gonadotropina. Después de la metamorfosis o en el caso de desarrolladores directos tras su eclosión, los oocitos más pequeños, aumentan rápidamente en número (Duellman y Trueb, 1994). A pesar de las diferentes estrategias reproductivas, los folículos previtelógenicos, vitelogénicos y postvitelogénicos son similares estructuralmente en cecílidos, anuros y urodelos (Masood-Parvezz y Nadkarni, 1993).

Varios aspectos de la oogénesis se han descrito para *Proteus anguinus anguinus* (Amphibia, Caudata, Proteidae) (Mali y Bulog, 2010), *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata, Proteidae) (Kessel y Panje, 1968), *Triturus* (Amphibia, Caudata, Salamandridae)

(Fischer, 1932), *Pleurodeles* (Amphibia, Caudata, Salamandridae) (Bonnafant-Jais y Mentre, 1983), *Salamandra salamandra infraimmaculata* (Amphibia, Caudata, Salamandridae) (Sharon *et al.,* 1997), *Salamandrella keyserlingii* (Amphibia, Caudata, Hynobiidae) (Yartsev, Exbrayat y Kuranova, 2015). Estos dos últimos, Sharon et al. (1997) y Yartsev et al. (2015), distinguieron tres fases de la oogénesis: oocitos previtelogénicos, vitelogénicos y postvitelogénicos.

En la descripción de la oogénesis en *Salamandra salamandra infraimmaculata* por parte de Sharon et al. (1997), la primera fase, previtelogénesis, contiene tres estadios. En el estadio I las oogonías se dividen y forman nidos celulares, en el estadio II las oogonías se diferencian en oocitos y en el estadio III el citoplasma del oocito incrementa en volumen. En la segunda fase, vitelogénesis, en el estadio IV se acumulan lípidos en las vacuolas y aparecen las plaquetas de yema en el borde del citoplasma. En el estadio V, los oocitos aumentan en volumen rápidamente debido al incremento de plaquetas de yema hasta alcanzar su tamaño máximo. En la última fase, la postvitelogénesis se reconoce el último estadio VI, en el cual comienza la maduración y es caracterizado por el movimiento del núcleo hacia el polo animal (Sharon *et al.,* 1997).

Yartsev et al. (2015), describen la oogénesis para *Salamandrella keyserlingii* igualmente en seis estadios, divididos en tres fases. En el estadio I, la oogonía es la más pequeña de las células oogénicas, localizadas individualmente o en grupos en la pared ovárica. En el estadio II se encuentran los oocitos previtelogénicos, sin presencia de yema. En el estadio III, aparición de gránulos de yema en la periferia del oocito y en el estadio IV los oocitos tienen dos tipos de citoplasma: una gran región periférica rica en gránulos de yema y una región central sin ellos que contiene al núcleo. Los oocitos del estadio V son ricos en gránulos de yema y en el estadio VI se presentan los oocitos ya maduros.

En *Xenopus laevis*, la especie más estudiada por ser modelo de desarrollo en anuros, también se encontraron seis estadios. Sin embargo, durante la previtelogénesis se encontró un estadio en el que se forma una hoja delgada sobre la superficie del oocito, cuatro estadios en la fase vitelogénica en los que se forman pigmentos, el polo animal y vegetal se comienzan a diferenciar, los gránulos de yema se encuentran dispersos a lo largo de oocito y estos incrementan en número y tamaño. Finalmente, un estadio en la fase postvitelogénica en la que el oocito está completamente crecido (Dumont, 1972). Por último, en cecílidos,

Exbrayat (2006), identificó seis estadios utilizando una categorización propia. Describe que en el estadio I las oogonías están agregados en nidos germinales; en el estadio II los oocitos primarios pueden estar rodeados o no de células foliculares y pueden estar dentro o fuera de los nidos germinales; en el estadio III los oocitos presentan núcleos con varios nucléolos; el estadio IV presenta oocitos y folículos vitelogénicos con plaquetas de yema grandes; en el estadio V existen folículos atrésicos y por último en el estadio VI los oocitos presentan cuerpos lúteos.

En anfibios, los oocitos en desarrollo se encuentran en los folículos asociados con el ovario. La oogonía se deriva de gonocitos primordiales y da lugar mitóticamente a sucesivas generaciones de oocitos (Lofts, 1974). Los oocitos previtelogénicos incrementan en tamaño casi diez veces y los componentes necesarios para este crecimiento son provistos por el ovario, a través de las membranas plasmáticas formando la pared folicular (Wallace, Jared y Nelson, 1970; Duellman y Trueb, 1994; Nieuwkoop, Johnen, y Albers, 1985). El proceso de vitelogénesis es la acumulación de yema en el citoplasma del oocito, proveyéndolo de los nutrientes necesarios para su desarrollo embrionario (Follet y Redshaw, 1974; Lofts, 1974).

Además del conocimiento del desarrollo de los oocitos, el entendimiento básico de la historia de vida de los anfibios es esencial para proveer los elementos necesarios a un programa de apareamiento exitoso en cautiverio y de esta forma, comprender el tiempo de madurez de los ovarios (Wright y Whitaker, 2001). Uno de los factores principales para la maduración de los ovarios en las salamandras son las condiciones ambientales (Duellman y Trueb, 1994). La temperatura, aparentemente es el principal factor que controla la gametogénesis en muchas salamandras (Duellman y Trueb, 1994). Temperaturas mayores a 20 °C son necesarias para iniciar la espermatogénesis en *Plethodon cinereus* o la ovulación en *Cynops pyrrhogaster*. Un factor más se suma a la hora de determinar la maduración de ovarios en salamandras; la estacionalidad (Duellman y Trueb, 1994). Según Fraser (1980) otro factor a tomar en cuenta en las salamandras es la condición de corpulencia, la cual puede afectar el proceso de maduración de oocitos de dos maneras fundamentales: 1) afectando el número de oocitos maduros para un tamaño corporal determinado y 2) afectando la velocidad de maduración. Cada uno de los factores antes mencionados tienen una consecuencia importante para el éxito reproductivo de la salamandra; el primero por su efecto sobre el tamaño de la puesta y el segundo por el momento de la oviposición (Fraser, 1980).

Las salamandras presentan tres modos reproductivos. En el modo reproductivo I, los huevos son abandonados al aire libre en aguas tranquilas, los huevos son relativamente pequeños y tienen melanina en el polo animal; No hay cuidado parental. En el modo reproductivo II los huevos se depositan en un área restringida, debajo de piedras u objetos en el agua con corriente. Los huevos son más grandes que en el modo reproductivo I y no muestran pigmentos de melanina; el cuidado parental aparece en algunas especies. Finalmente, en el modo reproductivo III de desarrolladores directos, los huevos se depositan todos a la vez, debajo de objetos en la tierra; El cuidado parental aparece en todas las especies. Los huevos son más grandes que en cualquiera de los modos anteriores (Salthe, 1969).

Los ciclos reproductivos en vertebrados pueden estar categorizados como asociados, desasociados o continuos (Bruce, 2003). Los ciclos asociados y desasociados ocurren en las salamandras de zona templada que tienen reproducción estacional. En el primer caso, la espermatogénesis y la oogénesis son sincrónicas, de modo que el cortejo y la transferencia de esperma se siguen inmediatamente, en cualquier orden, mediante oviposición y fertilización (Bruce, 2003). Este tipo de ciclo se encuentra en las salamandras que tienen fertilización externa y en especies con fertilización interna donde los machos y las hembras se reúnen en estanques de cría durante períodos breves cada año cuando las condiciones climáticas son favorables; por ejemplo, en muchas especies de la familia Ambystomatidae (Bruce, 2003). Por el contrario, en ciclos desasociados, la espermatogénesis y la oogénesis no son necesariamente sincrónicas (Bruce, 2003). El cortejo y la transferencia de esperma ocurren semanas o meses antes de la oviposición; Tras la transferencia, los espermatozoides se conservan y tal vez se nutren en la espermateca de la hembra hasta la temporada de oviposición (Bruce, 2003). Tales ciclos son característicos de Plethodontidae (Bruce, 2003). Los ciclos continuos, que son equivalentes a no estacionales implican la reproducción durante todo el año y son probablemente poco comunes en las salamandras, a excepción de algunas especies de bolitoglossinas neotropicales en ambientes estacionales. Por lo tanto, en el gran clado de los pletodóntidos tropicales los patrones reproductivos masculinos y femeninos pueden diferir y la variación interespecífica en el ciclo femenino se correlaciona en parte con la magnitud de la estacionalidad húmedo-seco (Bruce, 2003).

## 3.1 OBJETIVOS

### 3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Describir la oogénesis de *Bolitoglossa peruviana* en el Ecuador.

### 3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener gametos de salamandra mediante ovariectomías.

Determinar los diferentes estadios de la oogénesis en *Bolitoglossa peruviana*.

Elaborar una tabla descriptiva morfológica de la oogénesis de *B. peruviana*.

# 4. MATERIALES Y MÉTODOS

## 4.1 OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES

Para este estudio se colectaron individuos de la especie *Bolitoglossa peruviana*. Se realizaron salidas de campo hacia la estación científica Yasuní, ubicada en la provincia de Orellana. Los especímenes fueron encontrados en la superficie de las hojas, a unos 30 – 70 cm del suelo. La colección fue manual, mediante el uso de fundas plásticas transparentes previamente oxigenadas. Los individuos fueron trasladados rápidamente a terrarios previamente diseñados, con mallas plásticas, papel toalla humedecido para la base, hojarasca recolectada del mismo lugar de colección y charcas de agua ozonificada reposada. El cautiverio y manejo de los individuos se basó en los parámetros bioéticos de preservación según las normas de la Asociación Americana de Medicina y Veterinaria (Wright y Whitaker, 2001; AVMA, 2013).

El Laboratorio de Investigación en Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, colaboró con 2 individuos de *Bolitoglossa peruviana*, colectados en la estación científica Yasuní, permitiendo utilizar el ovario de los especímenes para esta investigación.

## 4.2 TABLA DE LA OOGÉNESIS

A los individuos vivos donados por el LICBA y que fueron mantenidos en cautiverio por aproximadamente 10 meses, se los anestesió con MS – 222 al 15% por aproximadamente cinco minutos (dependiendo del peso del animal) y rápidamente se procedió a realizar la ovariectomía. Se hizo un corte de alrededor de 5 mm, en el tercer cuarto del cuerpo hacia el lado distal por el costado izquierdo (Fig. 1). Al encontrar el ovario se procedió a extraer todo su contenido y se dividió en dos porciones: la primera que fue sumergida en solución de Smith y permaneció de tal manera por dos días a temperatura ambiente para luego ser fijada en formaldehido al 1,5% y almacenada a 4 °C. La segunda porción fue inmersa en solución MEMFA por un día y fijada en solución Dents, la que se almacenó a -20 °C.

Las gónadas extraídas, mantenidas en formaldehído al 1,5% fueron enviadas al laboratorio de histología del área de patología del Hospital Oncológico Solca, donde se les

realizaron cortes del tejido de 4 µm de grosor mediante el uso de micrótomo, para luego ser fijados y sellados en parafina. Los cortes fueron se tinturaron con Eosina-Hematoxilina.

### 4.3 ANÁLISIS DE OOGÉNESIS

Se realizaron fotografías tanto con el microscopio como con el estereoscopio a la mayor cantidad de oocitos encontrados en buen estado en las placas, con el programa "Infinity Analyze Software" para la cámara "Lumera USB Scientific camera". También se tomaron las medidas del diámetro de las células y el núcleo con una herramienta proporcionada por el mismo programa; Se hicieron anotaciones de las observaciones con respecto al núcleo, nucléolo, posición y estado de estos, además de las características del citoplasma de la célula para la clasificación de estadios de la oogénesis. Se realizaron comparaciones morfológicas de la oogénesis en *Xenopus laevis*, *Salamandra salamandra infraimmaculata* y *Salamandra keyserlingii*.

# 5. RESULTADOS

## 5.1 OOGÉNESIS

Se obtuvieron 33 oocitos pertenecientes a *B. peruviana*, de los cuales se analizaron 27 oocitos que fueron fijados en formaldehído al 1,5%. Se determinaron seis estadios de la oogénesis divididos en tres fases: previtelogénesis, vitelogénesis y postvitelogénesis. Para clasificar estadios se consideraron cuatro características principales: (1) Presencia de dos tipos de citoplasma, (2) organización de las envolturas foliculares, (3) formación y distribución de las plaquetas de yema, (4) formación y distribución del núcleo y nucléolos. El folículo más pequeño pertenece al estadio I, con 33,2 µm de diámetro (Fig. 2 A) y el de mayor diámetro es de 1642,4 µm perteneciente al estadio VI (Fig. 6 A).

Esta clasificación se basa principalmente en estudios previos de oogénesis en *Salamandra salamandra infraimmaculata, Salamandrella keyserlingii* y *Xenopus laevis.*

Estadio I. Oogonías. Estas células progenitoras de oocitos, se localizan por separado o agrupadas entre células foliculares en la pared del ovario (en porciones epiteliales de las partes del ovario) llamadas nidos germinales. El núcleo presenta coloración por H-E (Eosina - Hematoxilina), es ovalado y ocupa casi todo el tamaño de la célula, además presenta nucléolos (Fig. 2 A y B).

Estadio II. Oocitos primarios. Las oogonías se diferencian en oocitos primarios, estos oocitos se pueden encontrar de la misma forma, por separado o agrupados, dentro o fuera de los nidos germinales y presentan una envoltura folicular que consiste en capas de células (teca y células foliculares que se diferenciaran en el epitelio germinal). Contienen relativamente poco citoplasma. No hay presencia de membrana vitelina (Fig. 3 A).

Estadio III. Oocito previtelogénico temprano. Ausencia de plaquetas de yema en el citoplasma. Sin embargo, el citoplasma existente es parecido a las plaquetas de yema. Los oocitos incrementan en volumen debido a la adición de citoplasma, este último es homogéneo y visible al ser tinturado con H&E. Los nucléolos se encuentran esparcidos por

todo el núcleo, aparición de gránulos proteicos dispersos en el citoplasma, la envoltura folicular se diferencia en teca y células foliculares (Fig. 3 B y C).

Estadio IV. Oocito previtelogénico tardío. Parecido al estadio anterior, sin embargo, los nucléolos se agrupan en la periferia del núcleo y este aumenta en volumen (Fig. 4 A y B).

Estadio IV. Oocito previtelogénico tardío. El oocito incrementa en volumen debido a la adición de citoplasma, se forma un anillo alrededor del núcleo. En algunos oocitos se puede evidenciar la presencia de membrana vitelina (en el caso de aquellos que estén por entrar a vitelogénesis) (Fig. 4 C y D).

Estadio V. Oocito vitelogénico temprano. Dos tipos de citoplasma son distinguibles, citoplasma denso, agrupado en la periferia del oocito, como un anillo, el citoplasma menos denso se encuentra rodeando al núcleo. Se observa una estratificación en el citoplasma más denso y aparición de plaquetas de yema en el mismo. El núcleo comienza a migrar hacia el polo animal de la célula y es de tamaño menor frente a la célula con respecto a estadios anteriores, además presenta un borde ondulado. El volumen de los oocitos sigue incrementando debido al número de plaquetas de yema. La membrana vitelina se hace más evidente (Fig. 5 A, B y C).

Estadio V. Oocito vitelogénico tardío. Similar al estadio anterior, el núcleo sigue disminuyendo en tamaño, el citoplasma de dos tipos aún existe. Los gránulos proteicos en el citoplasma siguen presentes (Fig. 5 E y F).

Estadio VI. Oocito postvitelogénico. El citoplasma se hace homogéneo, prácticamente todo el volumen de la célula es ocupado por la yema. El oocito ha alcanzado su tamaño máximo. Las células foliculares se aplanan (Fig. 6 A y B).

# 6. DISCUSIÓN

Para la biología reproductiva de salamandras hay escasos estudios histológicos en hembras, muy pocos detallan por completo los estadios de la oogénesis y todos se restringen a salamandras del hemisferio norte, por lo que no existen descripciones de la oogénesis en salamandras del hemisferio sur representadas totalmente por la familia Plethodontidae.

Para un mejor entendimiento y elucidación del ovario y ciclo reproductivo de *Bolitoglossa* se comenzó con el estudio de su oogénesis. Para el anfibio más estudiado, *Xenopus laevis*, modelo de desarrollo en anuros se establece seis estadios de la oogénesis dividido en tres fases sobre la base de su apariencia externa, color, tamaño, cambios cualitativos y cuantitativos más notables en los oocitos (Dumont, 1972). La primera fase de previtelogénesis (estadios 1-2), la segunda fase de vitelogénesis (estadios 3-5) y la tercera fase de postvitelogénesis (estadio 6) (Dumont, 1972). El mismo criterio se ha usado para clasificar nuestros estadios (Mali y Bulog, 2010). La mayoría de los autores se basan en este estudio para describir oocitos de diferentes anfibios. Para salamandras, el modelo de desarrollo es el axolotl (Voss, Epperlein y Tanaka, 2009). Sin embargo, existen también clasificaciones alternativas de organismos no modelos como el Sharon et al. (1997) y Yartsev et al. (2015), los cuales establecieron de la misma manera que en el organismo modelo, seis estadios para la oogénesis en salamandras divido en tres fases. Algunos autores rechazan los dos primeros estadios, debido a que no son considerados como oocitos sino como oogonías y oocitos primarios (Sharon *et al*., 1997). Sin embargo, Yartsev et al. (2015) consideran estos procesos juntos, en vista de la relación entre el crecimiento de oocitos y la foliculogénesis.

En la figura 7, se puede apreciar que los valores de la desviación estándar no están ampliamente dispersos alrededor de la media aritmética (Tabla 2), es decir, no hay una diferencia considerable en la media del tamaño de los oocitos para cada estadio. Debido a la poca disponibilidad de individuos respecto a la extracción de material, no fue posible realizar un análisis estadístico más minucioso para los tamaños de los oocitos. Los oocitos extraídos en buen estado permitieron definir una tabla de la oogénesis para *B. peruviana* (Tabla 1). Sin embargo, para completar esta tabla aún es necesario abordar ciertos temas como la ultraestructura de varios elementos que conforman los folículos, por ejemplo, en lípidos,

mitocondrias, membranas externas, microvellosidades etc. (Kessel y Panje, 1968; Mali y Bulog, 2010).

Una de las características morfológicas más importantes que se tuvo en cuenta para clasificar los estadios fue la posición del núcleo. Este (14 µm), en los nidos germinales ocupa casi la mitad del tamaño de la célula (33,2 µm) (Fig. 2 A y B). En los oocitos primarios que entran a previtelogénesis el núcleo es siempre predominante, espacialmente, porque los oocitos pueden aumentar su tamaño extensamente. La previtelogénesis se caracteriza por un crecimiento citoplásmico extenso de los oocitos. El diámetro de los oocitos en *Proteus* aumenta aproximadamente 100 µm a 600 µm durante la previtelogénesis (Anexo 1.) (Mali y Bulog, 2010). Ocurre de igual manera en *X. laevis,* donde el crecimiento citoplásmico conduce a un aumento de más de 200 veces en el volumen celular; es decir, un aumento en el diámetro de los oocitos de aproximadamente 50 µm a 300 µm (Sánchez y Villecco 2003; Mali y Bulog, 2010) y en *B. peruviana* el diámetro de oocitos previtelogénicos aumentó de 20 µm a 520 µm (Anexo 1). En el estadio II de la oogénesis (Fig. 3 A) no se puede apreciar el núcleo en los oocitos primarios, por lo que puede deberse a que el corte que se realizó no fue el adecuado, impidiendo ver dicha estructura. En los oocitos previtelogénicos el núcleo es excéntrico (Fig. 1, 2, 3 y 4) mientras que en los oocitos vitelogénicos el núcleo continúa siendo excéntrico, pero se encuentra migrando hacia el polo animal (Fig. 5 A y E). En esta fase de la vitelogénesis los oocitos en vitelogénesis temprana y tardía no varían mucho en su diámetro celular. Sin embargo, el núcleo que se encuentra migrando disminuye en tamaño en referencia al estadio anterior (Fig. 5 A y E).

La aparición de plaquetas de yema también es otra característica importante para clasificar los estadios, a medida que estas aumentan, también se incrementa el tamaño del oocito. Los oocitos de mayor tamaño se encuentran en individuos a punto de iniciar con el ciclo reproductivo (Mali y Bulog, 2010). Esta fase de aparición y acumulación de yema se denomina vitelogénesis y a diferencia de lo que se planteaban Wallace y Dumont (1968) sobre el término vitelogénesis, que era usado para referirse a las hembras de *Xenopus* dedicadas a la producción de una gran cantidad de proteína de la yema necesaria para la maduración de los oocitos, en 1972 Dumont describe esta fase como el desarrollo de los oocitos donde se forma la mayor parte de la yema.

La mayoría de las salamandras vivientes tienen un desarrollo directo, lo que implica que el cortejo, el apareamiento y la oviposición ocurran en la tierra y las crías eclosionen como adultos completamente formados, pero en miniatura. Esta estrategia reproductiva que no presenta estadio larval está restringido a un único linaje de los caudatas, que son las salamandras sin pulmones de la familia Plethodontidae (Wake y Hanken, 1996; Beachy y Bruce, 2003). Ser desarrolladores directos implica tener ciertas características como: grandes huevos con gran cantidad de yema y mayor duración del desarrollo embrionario, debido a que formar un individuo completamente desarrollado conlleva una demanda de energía más alta (Duellman y Trueb, 1994; Collazo y Marks, 1994). Al contrario de lo esperado, el tamaño de los oocitos postvitelogénicos de los organismos alternativos que presentan desarrollo indirecto y el organismo en estudio, desarrollador directo, tuvieron medidas de diámetro similares, de 1000 µm a 1600 µm (Anexo 1). Sin embargo, se debe tener en cuenta que el tamaño corporal de *B. peruviana* (8 – 8,5 cm) frente a las especies de desarrollo indirecto (*S. s. infraimmaculata* 15 – 25 cm y *S. keyserlingii* 9 – 12,5 cm) (Sharon *et al.*, 1997; Yartsev *et al.*, 2015) es menor y no obstante el tamaño del oocito postvitelogénico de *B. peruviana* es similar al de las otras dos especies, pero no tan grande como para ser desarrollador directo. Por cuanto, el tamaño de huevo más grande registrado para desarrolladores directos en caudata, es el de *Bolitoglossa subpalmata* con un tamaño corporal similar al de *B. peruviana*, pero con un tamaño de huevo de 5000 µm (Vial, 1968; Duellman y Trueb, 1994).

El tamaño del huevo también puede estar definido por el tamaño del cuerpo. Caruso, Sears, Adams y Lips (2014) mencionan que el cambio climático se ha visto implicado en la reducción del tamaño del cuerpo de las salamandras de la familia Plethodontidae. Dichos cambios pueden afectar las poblaciones de anfibios de muchas maneras. La fecundidad y tamaño del huevo están positivamente correlacionadas con el tamaño del cuerpo en anfibios (Wells, 2007; Peterman *et al.*, 2016). Esto se debe a que, en climas más cálidos, lugar donde habitan estas salamandras, las tasas metabólicas aumentan y la actividad de búsqueda de alimento en la superficie disminuye debido a las mayores tasas de pérdida de agua por evaporación (Gifford y Kozak, 2012; Peterman and Semlitsch, 2014) lo que puede reducir la fecundidad (Milanovich, Trauth, Saugey y Jordan, 2006; Vucetich, Waite y Nunney, 2014) o el tamaño corporal total y por ende el del huevo (Gardner *et al.*, 2011; Peterman *et al.*, 2016), considerado una de las razones del tamaño del huevo no tan grande en *B. peruviana* siendo aún desarrollador directo.

Si el tamaño de la hembra puede influir en el tamaño del huevo, también lo hace su modo reproductivo. Para un volumen dado de huevo, un cambio del modo I al modo III implica una disminución del tamaño corporal. Por lo tanto, los animales que muestran el modo III no necesariamente tienen huevos más grandes que los que muestran el modo I y esto solo es cierto dentro de una clase de tamaño corporal dada (Salthe, 1969). Razón por la cual, a diferencia de lo que se pensaba, el hecho de que las tres especies de salamandras mencionadas poseyeran tamaños similares de huevos o que *B. peruviana* no tuviera un tamaño de huevo tan grande no es de extrañar. Probablemente la selección natural no podría producir una disminución en el tamaño de la nidada como tal (Lack, 1954). El modo reproductivo III se observa mejor como un corolario necesario para un aumento en el gasto de energía por huevo por parte de la hembra, ya sea en forma de aumento de la deposición de yema o aumento de energía (tiempo) dedicado al cuidado parental (Williams, 1966). En los pletodóntidos, el patrón reproductivo en modo II dio lugar al modo III probablemente por un aumento en el volumen del huevo y una disminución concomitante en el tamaño del nido. Las formas anatómicamente más primitivas (Wake, 1966) muestran el modo II, mientras que el modo III se encuentra entre las formas anatómicamente más avanzadas (Salthe, 1969).

El patrón de modo reproductivo III está asociado con el desarrollo en sitios terrestres y se omite la etapa de larva acuática, lo que trae consigo la siguiente duda: ¿es necesario producir un huevo más grande antes de que sea posible lograr un desarrollo directo? El acortamiento de las características larvales que se produce durante el desarrollo directo (Dent, 1942) puede ocurrir en una amplia gama de tamaños de huevos y, por lo tanto, no necesariamente se asocia con huevos grandes. *Desmognathus wrighti*, por ejemplo, es conocido como el único desmognathide en lograr el desarrollo directo, y sin embargo tiene el tamaño de huevo más pequeño encontrado en este grupo, comparado con el tamaño de huevo de muchos ambystomatides del modo I. No obstante, dentro de cualquier clase de tamaño corporal adulto las especies que muestran desarrollo directo también tienen el huevo más grande. Por lo tanto, aunque el desarrollo directo no requiere de un huevo absolutamente grande, siempre estará asociado con el huevo más grande conocido para un tamaño corporal dado, aunque esto no se cumpla en su totalidad como ya se planteó previamente (Salthe, 1969).

Dentro de cualquier taxón, las salamandras terrestres tienden a ser más pequeñas que las acuáticas. Todos los pletodóntidos que muestran el modo reproductivo tipo III son terrestres. La única conclusión válida es que durante la transición del modo II al modo III, el tamaño corporal no aumentó. Organ (1961) demostró que en *Desmognathus*, la evolución hacia un modo reproductivo tipo III ha sido acompañada por una disminución en el tamaño corporal. Por tanto, se puede concluir que, durante esta transición, el tamaño del huevo aumentó, o al menos aumentó el tamaño relativo del huevo, es decir, el huevo no disminuyó de tamaño tan rápido como ocurrió con las dimensiones adultas del cuerpo (Salthe, 1969).

Otro parámetro para la clasificación de oocitos es la envoltura folicular. El ovario de *Bolitoglossa peruviana* está cubierto de una delgada, transparente envoltura de tejido conectivo y numerosos oocitos están unidos al lado interno del ovario (Fig. 5 D) (Sharon *et al.,* 1997). En casi todos los organismos, el oocito en desarrollo es invertido por las células y los elementos formados son denominados colectivamente como la envoltura folicular. Esta estructura representa una barrera morfológica y fisiológica entre el oocito y su ambiente. Se ha sostenido durante mucho tiempo que la estrecha relación que existe entre la envoltura nuclear y el tamaño del oocito se debe a que las células establecen una función importante en la nutrición del oocito y en la mediación del transporte de materiales del huevo en crecimiento. La presencia de esta envoltura desde los estadios iniciales en los oocitos refleja una gran importancia en su formación (Kessel y Panje, 1968). Durante la profase inicial de la oogénesis, los fibroblastos del tejido conjuntivo se diferencian en una capa de células, el epitelio del folículo o la capa de células, la cual rodea la superficie del oocito. El epitelio del folículo está rodeado por la teca, compuesta de fibras de tejido conjuntivo, matriz, fibroblastos y capilares. La teca, a su vez, está rodeada por el epitelio o serosa de la superficie, que constituye la capa más externa del folículo (Kessel y Panje, 1968).

Tanto la masa como la longitud ovárica están correlacionados significativamente con la masa y longitud corporal. La longitud del ovario está también relacionada con el número de oocitos (Sharon *et al.,* 1997). Se encontraron aproximadamente 12 oocitos por ovario, de todos los estadios en todas las hembras examinadas. *Bolitoglossa* es aparentemente no estacional, es decir, acíclica (con algunas excepciones) (McDiarmid y Worthington, 1970), por lo que depositan sus huevos en estaciones húmedas y secas. Se puede observar que depositan los huevos durante todo el año en áreas donde las estaciones no son bien marcadas o donde las condiciones locales proveen un clima uniformemente húmedo (McDiarmid y

Worthington, 1970). Esto se extiende ampliamente dentro de la familia Plethodontidae (Bishop,1941; Organ, 1960; Highton, 1962; McDiarmid y Worthington, 1970), por lo cual en *Bolitoglossa peruviana* se encontraron oocitos de todos los estadios en las hembras examinadas. Esto también se observó en S. *s. infraimmaculata,* los primeros cuatro estadios fueron vistos en todos los ovarios examinados; es decir, el ciclo ovárico es independiente de la estación y la etapa reproductiva. Este mismo patrón se obtuvo en los ovarios de *S. keyserlingii*. Por lo tanto, la oogénesis no depende de la estación o gestación a excepción de oocitos postvitelogénicos que mayormente dependen de la estación. Esto es una adaptación para condiciones climáticas extremas e impredecibles cuando las hembras deben estar listas para ovular prácticamente en cualquier momento (Sharon *et al.,* 1997).

En *Proteus* solo se encontraron oocitos en los primeros estadios (Anexo 1.). En este estudio los oocitos previtelogénicos también fueron predominantes. Los oocitos están rodeados por una delgada envoltura nuclear compuesta por células foliculares (Mali y Bulog, 2010) y esto también se pudo evidenciar en nuestros oocitos (Fig. 5 D).

En salamandras, la corpulencia puede afectar el proceso de postvitelogénesis de dos maneras fundamentales: 1) afectando el número de oocitos maduros por un tamaño corporal dado y 2) perjudicando la tasa de maduración. Cada uno tiene una importante consecuencia en la aptitud de la salamandra, la primera por su efecto en el tamaño de la puesta y la segunda por el tiempo de oviposición (Fraser, 1980). Como se mencionó anteriormente, los oocitos que predominaban en todos los ovarios examinados de *B. peruviana*, eran oocitos previtelogénicos, por lo que su tamaño corporal podría explicar el porqué del limitado número de oocitos maduros presentes en las salamandras hembras. Sin embargo, este patrón se encontró en otras especies de salamandras con tamaños corporales más grandes que *B. peruviana*.

Bonnafant-Jais y Mentre (1983) también muestran que el ovario de *Pleurodeles waltlii* contiene oocitos en todos los estadios durante todo el año. Sin embargo, hay ciertas excepciones en algunos tritones como *T. vittatus*. En *Triturus torosa*, la deposición de la yema tiene lugar durante la estivación y la migración a los sitios de reproducción entre 5-6 meses antes de la ovulación (Miller y Robbins, 1954). Adams (1940) afirmó que el desarrollo de los oocitos en *T. viridescens* está sincronizado; por lo tanto, la masa ovárica es baja durante el verano y alta desde el otoño hasta la primavera. El ciclo ovárico en otras

subespecies de *Salamandra salamandra* depende de la estación (como en *S.s. terrestris*) o de la gestación (como en *S.s fastuosa*) con desarrollo sincronizado de oocitos (Joly, Chesnel y Boujard, 1994). Por otro lado, en *S. infraimmaculata*, los oocitos de estadios previtelogénicos y vitelogénico se encuentran durante todo el año (Pearslon, Jackson y Degani, 2007).

Como ya se mencionó anteriormente el máximo número de huevos producidos por salamandras durante la época de apareamiento puede estar limitado por el tamaño del cuerpo. Sin embargo, publicaciones de regresiones y correlaciones en cuanto al tamaño de puesta con el tamaño del cuerpo en ciertas ocasiones son débiles y a veces no son significativas (Fraser, 1980). En una estación, los individuos de la población pueden no madurar en la mayor cantidad posible de puestas dentro de la limitación del tamaño del cuerpo. Aunque se conoce poco sobre la causa de esta variabilidad y el proceso que controla el tamaño de la puesta en salamandras, existe una escasa evidencia de que la nutrición puede afectar el crecimiento de los oocitos en otros anfibios como en *Xenopus laevis* (Wallace, 1978; Fraser, 1980).

# 7. CONCLUSIONES

Realizar comparaciones en organismos no modelos ofrece oportunidades únicas para probar la validez y generalidad de muchas observaciones derivadas de estudios en organismos modelo y para investigar problemas de desarrollo únicos e importantes que no están representados por ellos (Wake y Hanken, 1996).

Existen seis estadios divididos en tres fases para la oogénesis de *Bolitoglossa peruviana.*

*B. peruviana* contiene oocitos en todos los estadios a lo largo de todo el año, es decir, es no estacional.

*B. peruviana* comparte varias similitudes morfológicas de la oogénesis con los organismos previamente mencionados. Sin embargo, existen ciertas características morfológicas que comparten estos organismos, pero que aparecen en diferentes estadios en cada especie comparada.

Nuestro estudio morfológico indica que los oocitos previtelogénicos fueron predominantes en los ovarios examinados de *B. peruviana,* debido a que para obtener oocitos totalmente crecidos se necesita de ciertos factores ambientales que en cautiverio fue imposible obtener.

El tamaño del oocito completamente crecido de la especie en estudio es de aproximadamente 1600 µm, bastante grande en relación con el tamaño de su cuerpo.

Aún es necesario ahondar la ultraestructura de los oocitos para obtener una tabla completa de la oogénesis de *B. peruviana.*

La posición del núcleo y la aparición de las plaquetas de yema en los oocitos fueron las principales características que se tomaron en cuenta dentro de este estudio para clasificar estadios, ya que proporcionaron información del diámetro de los oocitos y la aparición de nuevas estructuras dentro de los mismos.

El tamaño de huevo de *B. peruviana* se puede ver influenciado tanto por su modo reproductivo, el cual implica ser desarrolladores directos, como por el tamaño corporal de la hembra que se ha visto reducido por el cambio climático.

La información proporcionada en relación a los resultados obtenidos en el estudio constituye el primer reporte de descripción morfológica de la oogénesis de *B. peruviana*. Siendo así este estudio, el primer registro acerca de la gametogénesis parcial para una salamandra del hemisferio sur con modo reproductivo de desarrollo directo. La información acerca de esta especie es muy limitada, sobre todo tratándose de su morfología reproductiva. Los estudios acerca de la oogénesis en los urodelos son muy escasos, por lo tanto, esta información proporciona un mayor conocimiento sobre su modo reproductivo y estimación de épocas reproductivas.

# 8. LITERATURA CITADA

Adams, A. E. (1940). Sexual conditions in Triturus viridescens; Am J Anat; 66, 235–275.

AmphibiaWebEcuador (base de datos en línea). Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/ListaEspecies.aspx?Id=103 (14 de Febrero del 2018)

AVMA. (2013). Guidelines for the Euthanasia of Animals. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.

Barth, L. G. y Barth, L. J. (1954). *The energetics of development*. New York: Columbia University. Press.

Beachy, CK. y Bruce, RC. (2003). Life history of a small form of the plethodontid salamander *Desmognathus quadramaculatus*. Amphib Reptil, 24, 13–26.

Bishop, S. C. (1941). The salamanders of New York. New York State Mus. Bull, 324, 1-365.

Bonnafant-Jais, M.L. y Mentre, P. (1983). Study of oogenesis in the newt *Pleurodeles waltlii* M.I. Ultrastructural study of the different stages of oocyte development. J. Submicrosc. Cytol, 15, 453–478.

Bruce, R. C. (2003). Life Histories. En D. M. Sever (eds). *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela.* (Pp. 477-525). Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.

Buckley, D. (2012). Evolution of Viviparity in Salamanders ( Amphibia , Caudata ). Encicl Life Sci, 1–5.

Caruso, N. M., Sears, M. W., Adams, D. C. y Lips, K. R. (2014). Widespread rapid reductions in body size of adult salamanders in responde to climate change. Global Change Biology, 20, 1751–1759.

Collazo, A. y Marks, S. B. (1994). Development of *Gyrinophilus porphyniticus*: identification of the ancestral developmental pattern in the salamander family Plethodontidae. J. Exp. Zool, 268, 239-258.

Dent, J. N. 1942. The embryonic development of *Plethodon cinereus* as correlated with the differentiation and functioning of the thyroid gland. J. Morphol, 71, 577-598.

Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians.* Balimore and London: The Johns Hopkins University Press.

Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. Journal of Morphology, 136(2), 153-179. Recuperado de: http//doi.org/10.1002/jmor.1051360203

Exbrayat, J. M. (First Edit). (2006). *Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians)*. Enfield: Science Publishers.

Fischer, I. (1932). Beiträge zur Kenntnis des Jahreszyklus des Urodeleneierstockes. Teil II: Der atretische Follikel von *Triton alpestris*. Z. Morphol. Mikr. Anat, 31, 521–625.

Follet, B. K. y Redshaw, M. R. (1974). The physiology of vitellogenesis. En B. Lofts (eds). *Physiology of the Amphibian, II.* (pp 219 – 308). New York: Academic Press.

Fraser, DF. (1980). On the Environmental Control of Oocyte Maturation in a Plethodontid Salamander. Springer in cooperation with International Association for Ecology. Ecology, 46, 302–307. Recuperado de: http://www.jstor.org/stable/4216172.

Frost, D. R. Amphibian Species of the World, an Online Reference. Version 6.0. (base de datos en línea). Nueva York, EEUU: American Museum of Natural History. Disponible en: http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php (14 de febrero de 2018).

Gardner, J. L., Peters, A., Kearney, MR., Joseph, L. y Heinsohn, R. (2011). Declining body size: A third universal response to warming?. Trends Ecol Evol, 26, 285–291.

Gifford, M. E. y Kozak, K. H. (2012). Islands in the sky or squeezed at the top? Ecological causes of elevational range limits in montane salamanders. Ecography, 35, 193–203.

Highton, R. (1962). Geographic Variation in the Life History of the Slimy Salamander. Copeia, 1962, 597–603.

Joly, J., Chesnel, F. y Boujard, D. (1994). Biological adaptations and reproductive strategies in the genus *Salamandra*. Mertensiella, 4, 255–269.

Kessel, R. G. y Panje, W. R. (1968). Organization and activity in the pre- and postovulatory follicle of *Necturus maculosus*. J Cell Biol, 39, 1–34.

Lack, D. (1954). The evolution of reproductive rates. En J. Huxley et al. (eds.), *Evolution as a process.* (p. 143-156). London. Allen and Unwin.

Lofts, B. (1974). Reproduction. En B. Lofts (eds). *Biology of the Amphibia.* (pp. 107–218). New York and London: Academic Press,.

Masood-Parveez, U. y Nadkarni, V. B. (1993). The ovarian cycle in an oviparous gymnophione amphibian, *Ichthyophis beddomei* (Peters). J. Herpetol, 27, 59–63.

Mali, L. B. y Bulog, B. (2010). Ultrastructure of previtellogene oocytes in the neotenic cave salamander *Proteus anguinus anguinus* (Amphibia, Urodela, Proteidae). Protoplasma, 246, 33–39.

Mansour, N., Lahnsteiner, F. y Patzner, R. A. (2011). Collection of gametes from live axolotl, *Ambystoma mexicanum*, and standardization of in vitro fertilization. Theriogenology, 75, 354–361.

McDiarmid, Roy W. y Worthington, R. D. (1970). Concerning the Reproductive Habits of Tropical Plethodontid Salamanders. Herpetologica, 26, 57–70.

Milanovich, J., Trauth, S. E., Saugey, D a. y Jordan, R. R. (2006). Fecundity, Reproductive Ecology, and Influence of Precipitation on Clutch Size in the Western Slimy Salamander (*Plethodon Albagula*). Herpetologica, 62, 292–301.

Miller, X. R. y Robbins, M. E. P. (1954). The reproductive cycle in taricha torosa (*Triturus torosus*). *J. Exp. Zool. 125*, 415–445. doi:10.1002/jez.1401250304

Nieuwkoop, P. D., Johnen, A. G., y Albers, B. (1985). *The epigenetic nature of early chordate development: Inductive interaction and competence.* London: Cambridge University press.

Organ, JA. (1960). Studies on the life history of the salamander, *Plethodon welleri*. Copeia, 1960, 287–297.

Organ, J. A. (1961). Studies of the local distribution, life history, and population dynamics of the salamander genus *Desmognathus* in Virginia. Ecol. Monogr, 31, 189-220.

Pearlson, O., Jackson, K. y Degani, G. (2007). The gonadal cycle in males and females of *Triturus vittatus vittatus* (urodela) from the southern limit of its distribution. Progressses and Perspective in Veterinary Medicine p: 227-233.

Peterman, W. E. y Semlitsch, R. D. (2014). Spatial variation in water loss predicts terrestrial salamander distribution and population dynamics. Oecologia, 176, 357–369.

Peterman, W. E., Crawford, J. A. y Hocking, D. J. (2016). Effects of Elevation on Plethodontid Salamander Body Size. Copeia, 104, 202–208. Recuperado de: http://www.bioone.org/doi/10.1643/OT-14-188

Pincheira, D. D. (2012). *Selección y evolución adaptativa: Fundamentos teóricos y empíricos desde la perspectiva de los lagartos*. Santiago – Chile: Ediciones universidad católica de Chile.

Rugh, R. (1951). *The frog: Its reproduction and development*. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc.

Saidapur, K. S. (1982). Structure and function of postovulatory follicles (corpora lutea) in the ovaries of nonmammalian vertebrates. Int Rev Cytol, 75, 243–285.

Salthe, S. N. (1969). Reproductive modes and the number and sizes of ova in the urodeles. Am Midl Nat, 81, 467–490.

Sánchez, S. S. y Villecco, E. I. (2003). Oogenesis. En Jamieson. G. M (eds). *Reproductive biology and phylogeny of anura*. Vol 2, 1st edn. (pp 27–71). Science Publishers, Enfield.

Sánchez, F. y Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis, 1822, 1896–1912. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013

Seifert, A., Monaghan, J., Voss, R. y Maden, M. (2012). Skin regeneration in adult axolotls: A blueprint for scar-free healing in vertebrates. PLoS One 7.

Sharon, R., Degani, G. y Warburg, M. R. (1997). Oogenesis and the Ovarian Cycle in *Salamandra salamandra infraimmaculata* Mertens (Amphibia; Urodela; Salamandridae) in Fringe Areas of the Taxon's Distribution. J Morphol, 160, 149–160.

Vial J. L. 1968. The ecology of the Tropical salamander, Bolitoglossa subpalmata, in Costa Rica. Rev Biol Trop 15:13–115.

Voss, S. R., Epperlein, H. H., y Tanaka, E. M. (2009). Ambystoma mexicanum, the axolotl: A versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. Cold Spring Harb Protoc 4:1–9.

Vucetich, JA., Waite, TA. y Nunney L. (2014). Fluctuating population size and the ratio of effective to census population size. *Society for the Study of Evolution, 51*, 2017–2021. doi: 10.1111/j.1558-5646.1997.tb05123.x

Wake, D. B. (1966). Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae. Mem. So. California Acad. Sci, 4, 1-111.

Wake, D. B. y Hanken, J. (1996). Direct development in the lungless salamanders: What are the consequences for developmental biology, evolution and phylogenesis? Int J Dev Biol, 40, 859–869.

Wallace, R. A., Jared, D. W. y Nelson, B. L. (1970). Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. I. Preliminary studies. J Exp Zool, 175, 259–269.

Wallace, R. A. (1978). Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. En RE. Jones (eds). *The Vertebrate Ovary*. (pp. 469-502). New York, Plenum Press.

Wells, K. D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago.

Williams, G. C. (1966). *Adaptation and natural selection*. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey. 307 p.

Wischnitzer, S. (1966). The ultrastructure of the cytoplasm of the developing amphibian egg. Adv. Morphogen, 5, 131–179.

Yartsev, V. V. y Kuranova, V. N. (2015). Seasonal dynamics of male and female reproductive systems in the Siberian salamander, *Salamandrella keyserlingii* (Caudata, Hynobiidae). Asian Herpetol Res, 6, 169–183.

Yom-Tov, Y. y Yom-Tov, J. (2005). Global warming, Bergmann's rule and body size in the masked shrew *Sorex cinereus* Kerr in Alaska. J Anim Ecol, 74, 803–808.

Yartsev, V. V., Exbrayat, J. M. y Kuranova, V. N. (2015). Oogenesis in the Siberian salamander, *Salamandrella keyserlingii* (Amphibia: Caudata, Hynobiidae). Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk. *State University Journal of Biology*, *4(32)*, 127-144. doi: 10.17223/19988591/32/7. In Russian, English summary.

# 9. FIGURAS

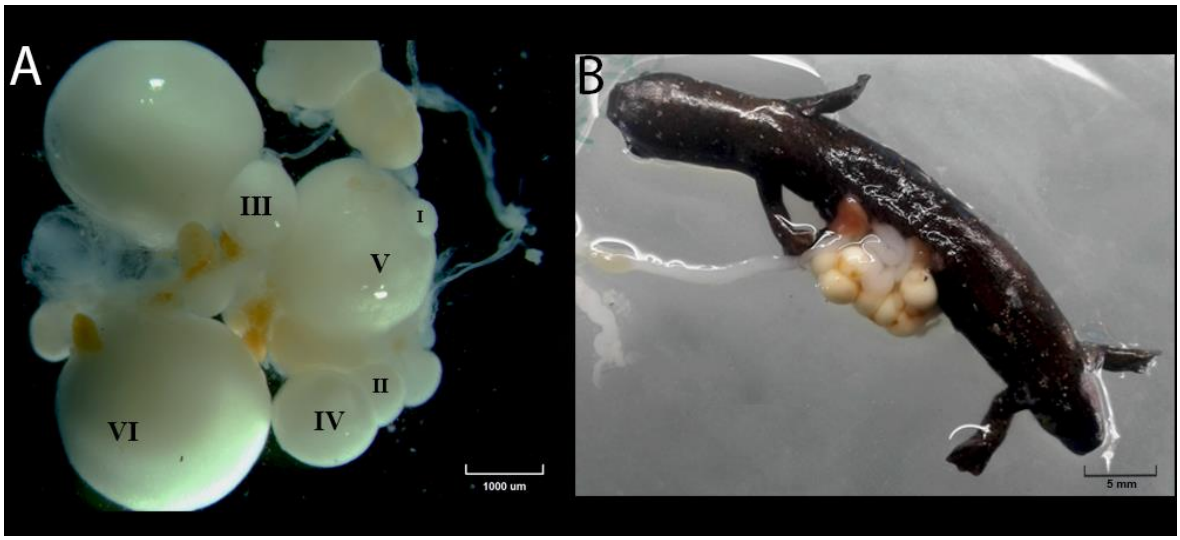



**Figura 1.** A. Porción del ovario sumergido en solución de Smith, conteniendo todos los estadios de la oogénesis (estadios I, II, III, IV, V y VI). B. Extracción del ovario izquierdo del tercer cuarto del cuerpo hacia el lado distal (tomando en cuenta la cola), por el costado izquierdo mediante el procedimiento quirúrgico que se llevó a cabo para la ovariectomía. Estos oocitos fueron utilizados para la fijación en formaldehído al 1,5% y posterior tinción con H y E.

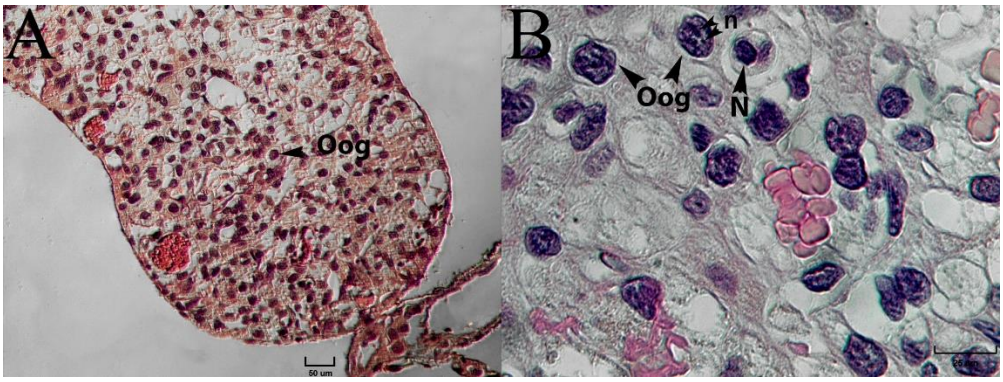



**Figura 2. Oogonías.** A. estadios tempranos: Oogonías agrupadas en nidos germinales (10x). B. Nidos germinales, el núcleo ocupa casi todo el tamaño de la célula, y presenta nucléolos (40x) (33,2 µm).

Oog: oogonía, N: núcleo, n: nucléolo.

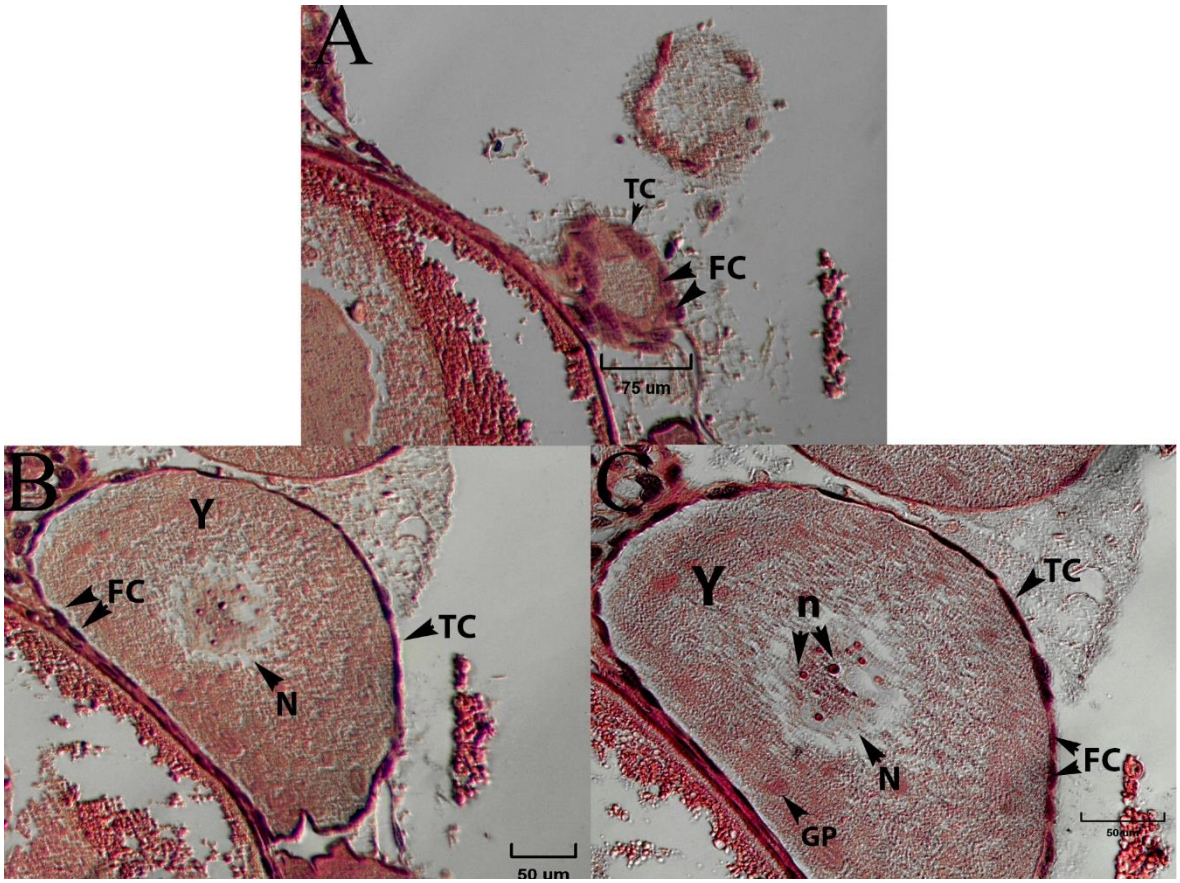



**Fig 3. Oocitos primarios**. A. las oogonías se diferencian en oocitos y se forma la envoltura del folículo que consiste en capas de células (teca y células foliculares) (10x y 20x respectivamente) (87,6 µm). B y C. Los oocitos incrementan en volumen, aparición de gránulos proteicos en el citoplasma, núcleo con varios nucléolos esparcidos dentro de este (10x y 20x respectivamente) (229,6 µm).

FC: Células foliculares, Y: yema, TC: teca, GP: gránulos proteicos.

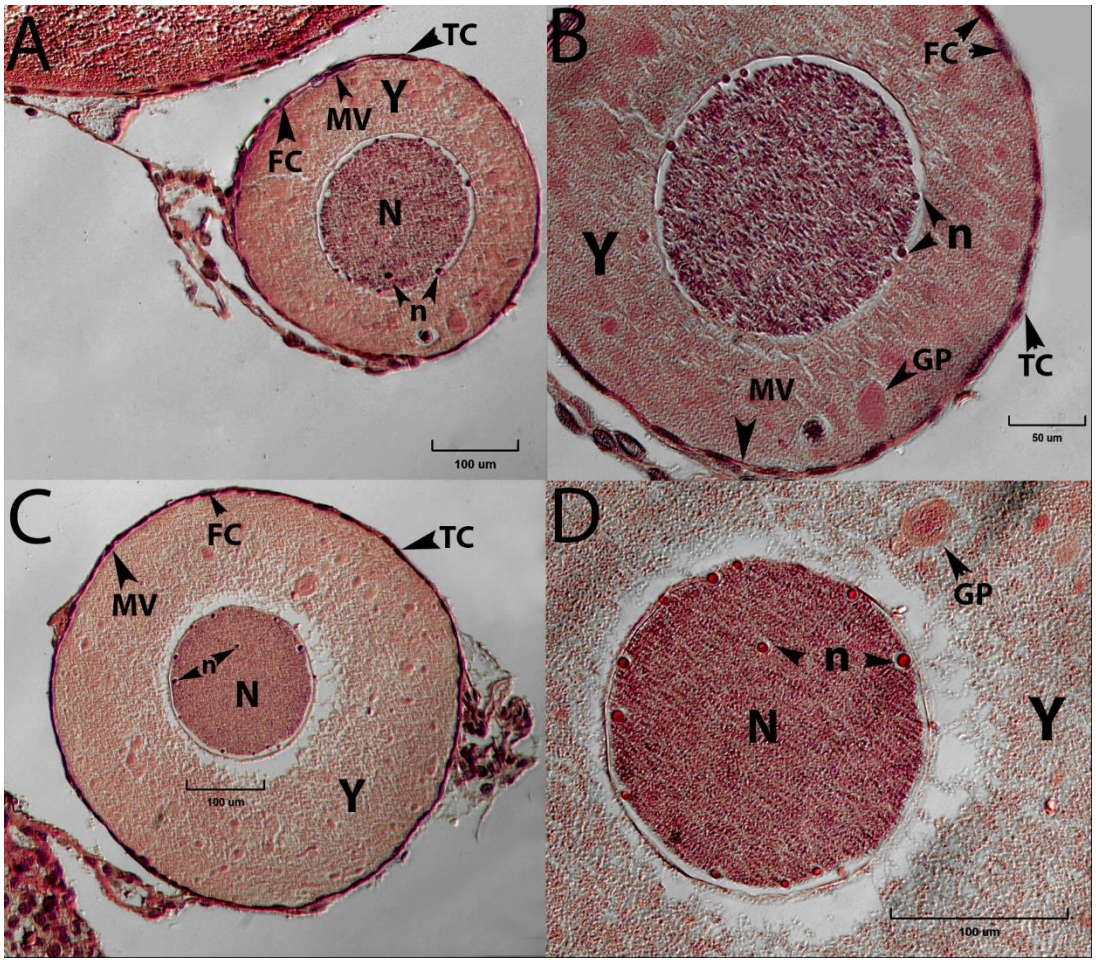



**Fig 4. Desarrollo de oocitos previtelogénicos**. A y B. Los nucléolos comienzan a agruparse en la periferia del núcleo y este incrementa en volumen (10x y 20x respectivamente) (347,6 µm). C y D. Los nucléolos continúan agrupados en la periferia del núcleo y se forma un anillo que rodea al núcleo (10x y 20x respectivamente) (521,8 µm).

MV: membrana vitelina.

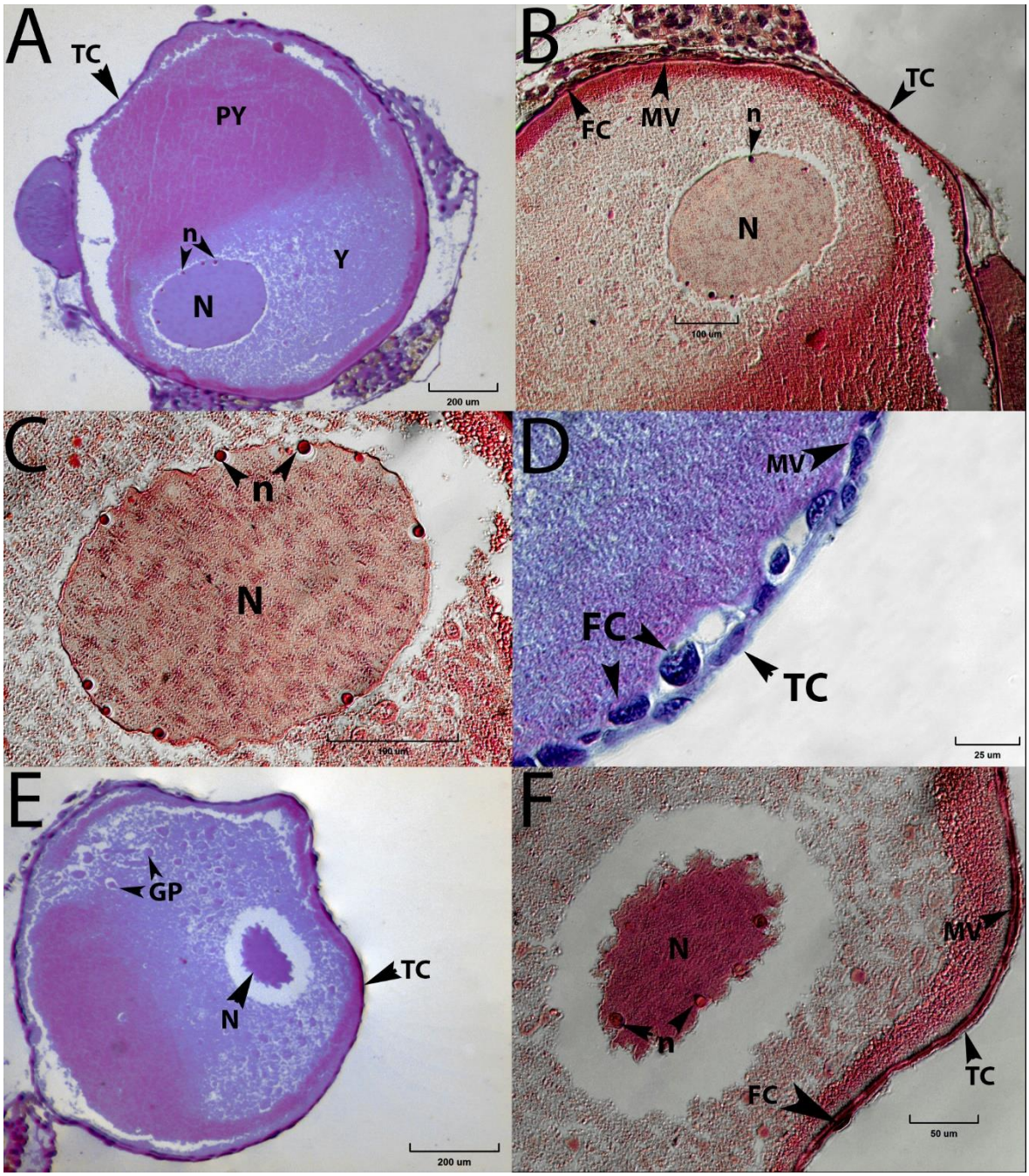



**Figura 5. Desarrollo oocitos vitelogénicos.** A, B y C. Dos tipos de citoplasma se puede identificar, aparición de plaquetas de yema, el volumen de los oocitos incrementa debido al número de plaquetas de yema, el núcleo comienza a migrar al polo animal y presenta un borde ondulado (4x, 10x y 20x respectivamente) (826,2 µm). D. Detalle de la membrana, membrana folicular integrada por sus dos capas (Teca y células foliculares) (40x). E y F. El núcleo decrece en volumen, aún existe dos tipos de citoplasma (5x y 20x respectivamente) (848,8 µm).

PY: plaquetas de yema.

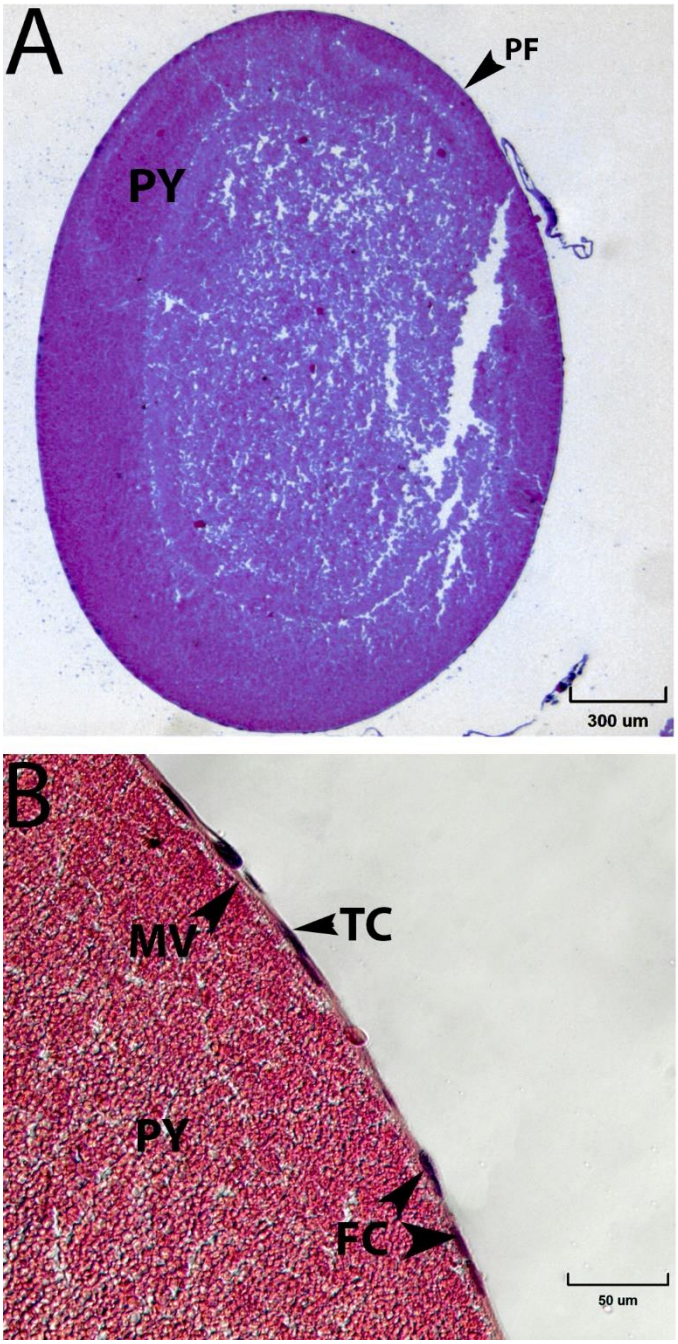



**Figura 6. Oocitos postvitelogénicos**. A. El citoplasma se hace homogéneo, el oocito alcanza su estadio máximo, las plaquetas de yema llenan el oocito. B. Las células foliculares se aplanan (2x y 20x respectivamente) (1642, 4 µm).

PF: pared folicular.

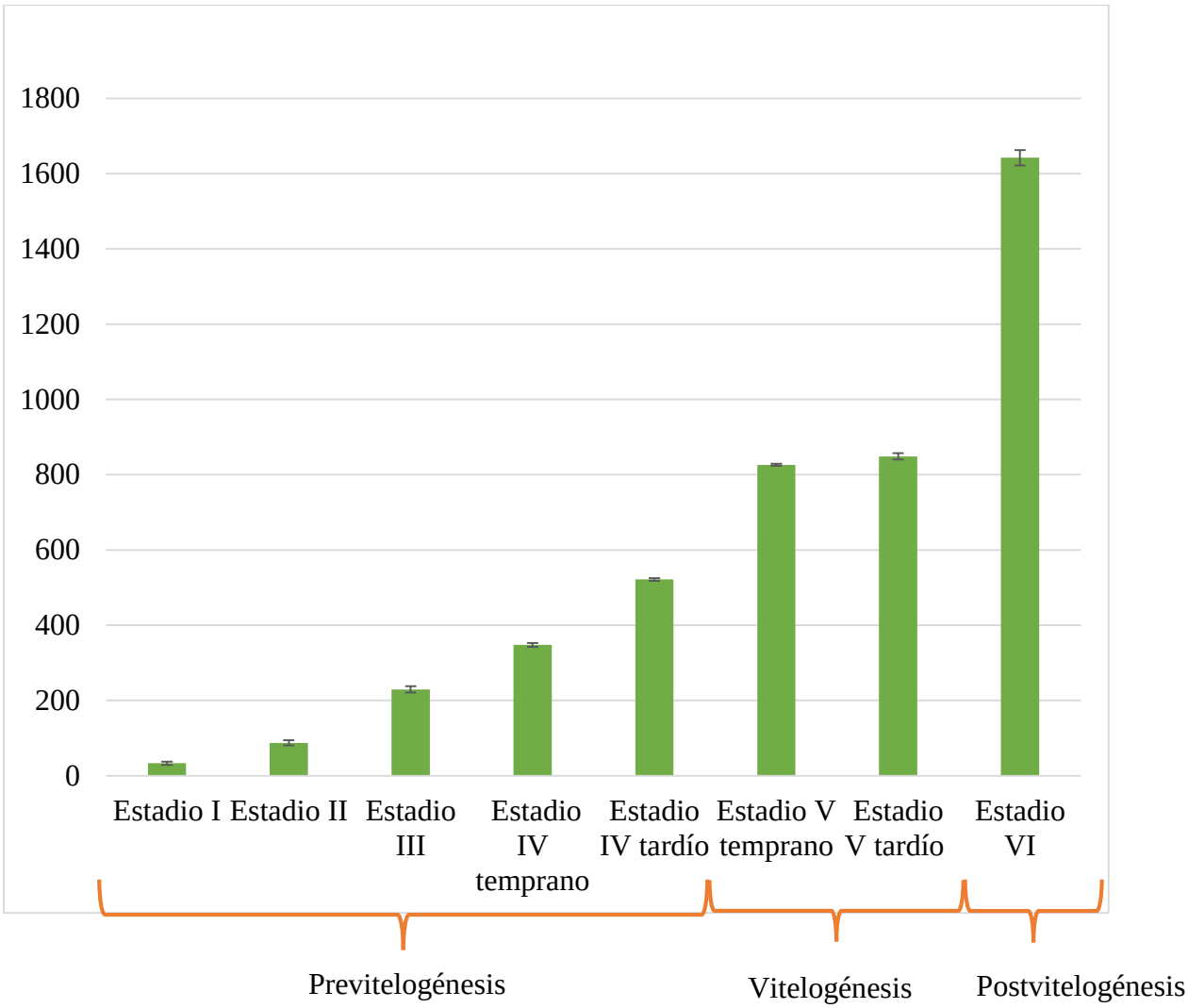



**Fig 7.** Media y desviación estándar del tamaño de los oocitos para todos los estadios de la oogénesis.

# 10.TABLAS

**Tabla 1.** Descripción de los estadios de la oogénesis en *B. peruviana*

| Estadios de la oogénesis | Fases de la oogénesis | Características representativas |
|---|---|---|
| **Estadio I** | Previtelogénesis | Oogonías agrupadas en nidos germinales, el núcleo es ovalado, ocupa casi todo el tamaño de la célula y presenta nucléolos. |
| **Estadio II** | Previtelogénesis | Se forman los oocitos, presentan envoltura folicular que consiste en teca y células foliculares o granulosa. Contiene relativamente poco citoplasma. |
| **Estadio III** | Previtelogénesis | Citoplasma homogéneo parecido a plaquetas de yema, conteniendo parches proteicos dispersos en el mismo, los oocitos incrementan en volumen, los nucléolos se encuentran esparcidos por todo el núcleo. La envoltura folicular se diferencia en teca y granulosa. |
| **Estadio IV** | Previtelogénesis | Los nucléolos se agrupan en la periferia del núcleo y este aumenta en volumen. En oocitos más avanzados se forma un anillo alrededor del núcleo y en ciertos casos se puede evidenciar la presencia de membrana vitelina. |
| **Estadio V** | Vitelogénesis | Dos tipos de citoplasma son distinguibles: 1) citoplasma denso estratificado, agrupado en la periferia del oocito y 2) y citoplasma menos denso o ligero que se encuentra rodeando al núcleo. El núcleo presenta un borde ondulado y comienza a migrar hacia el polo animal. La membrana vitelina se hace más evidente. |
| **Estadio VI** | Postvitelogénesis | El citoplasma se hace homogéneo, prácticamente todo el volumen de la célula es ocupado por las plaquetas de yema. En este estadio el oocito ha alcanzado su tamaño máximo. |

**Tabla 2.** Promedio del tamaño de los oocitos examinados, media ($\bar{x}$ ) y desviación estándar ($s$).

| | **Estadio I µm** | **Estadio II µm** | **Estadio III µm** | **Estadio IV Temprano µm** | **Estadio IV Tardío µm** | **Estadio V Temprano µm** | **Estadio V Tardío µm** | **Estadio VI µm** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | 36 | 98 | 221 | 355 | 525 | 827 | 858 | 1627 |
| **B** | 35 | 83 | 235 | 345 | 517 | 822 | 843 | 1623 |
| **C** | 26 | 82 | 220 | 350 | 522 | 828 | 838 | 1668 |
| **D** | 37 | 90 | 237 | 343 | 520 | 825 | 855 | 1633 |
| **E** | 32 | 85 | 235 | 345 | 525 | 829 | 850 | 1661 |
| $\bar{x}$ | 33,2 | 87,6 | 229,6 | 347,6 | 521,8 | 826,2 | 848,8 | 1642,4 |
| $s$ | 4,4384682 | 6,5802736 | 8,3546394 | 4,8785244 | 3,4205263 | 2,7748874 | 8,2885463 | 20,634922 |

# 11.ANEXOS

**Anexo 1.** Tamaño de oocitos de especies previamente descritas y *B. peruviana*.

| Especie | Estadio I µm | Estadio II µm | Estadio III µm | Estadio IV µm | Estadio V µm | Estadio VI µm | Tamaño corporal cm | Cita |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***S. s. infraimmaculata*** | 0 - 20 | 0 - 20 | 310 - 350 | 450 | 6000 | 1300 | 15 – 25 | (Sharon *et al.*, 1997) |
| ***P. a. anguinus*** | 100 - 300 | 600 | | | | | | (Mali y Bulog, 2010) |
| ***S. keyserlingii*** | 0 – 20,9 | > 230,77 | ~ 494,70 | ~ 634,52 | 875,30 | 1534,33 | 9 – 12,5 | (Yartsev *et al.*, 2015) |
| ***B. peruviana*** | 0 – 33,6 | 87,6 | ~ 229,6 | 347,6 – 521,8 | 826,2 – 848, 8 | 1642,4 | 8 – 8,5 | Especie en estudio |

# DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Stefania Alejandra Tapia Guato**,** con CC.# 1722450424, autor del trabajo de graduación intitulado "Descripción morfológica parcial de la oogénesis de *Bolitoglossa peruviana* (Caudata, Plethodontidae)." previa la obtención del grado académico de licenciada en Ciencias Biológicas, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 28 de Febrero del 2018

Stefania Alejandra Tapia Guato

CC.# 1722450424