

MORFOLOGÍA DEL OVARIO EN RANAS DEL GÉNERO *ELEUTHERODACTYLUS* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE).

Yamilka Rodríguez-Gómez^{1*}, Ana Sanz-Ochotorena¹, María de Lourdes Segura-Valdés², Reyna Lara-Martínez² y Luis Felipe Jiménez-García².

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

²Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

* Autor de correspondencia: Yamilka-Rodríguez-Gómez E-mail: yami@fbio.uh.cu

Calle 25 No.455, Vedado, Ciudad de La Habana, CP 10400. Cuba. Tlf: 537-8365779, Fax: 537-8321321

Recibido: Agosto 2010. Aprobado: Noviembre 2010.

Publicado: Noviembre 2010.

RESUMEN

El género *Eleutherodactylus* en Cuba agrupa 52 especies de ranitas que se reproducen en la tierra y tienen desarrollo directo. La descripción de su sistema reproductor, en especial la morfología de sus gónadas, aporta datos sobre su radiación adaptativa. Los objetivos del trabajo son describir la morfología de los ovarios de seis especies de *Eleutherodactylus*: *E. goini*, *E. planirostris*, *E. riparius*, *E. casparis*, *E. zugii* y *E. varleyi* y encontrar alguna evidencia del papel de las células foliculares en el proceso de crecimiento de los ovocitos. Se analizaron muestras de ovarios de hembras adultas mediante microscopía óptica (campo claro y epifluorescencia) y electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos permiten afirmar que la morfología de los ovarios de las seis especies es similar a la de otros anfibios. En ellos se distinguen ovocitos en tres estadios de la vitelogénesis. El inmunomarcaje fluorescente con FITC para proteínas SR (factores de transcripción no-snRNP) demostró su presencia en forma de un patrón moteado rodeado de un patrón difuso más o menos extendido en los ovocitos previtelogénicos, al igual que en las células foliculares, lo cual indica una actividad transcripcional intensa. Lo anterior sugiere la implicación de las células foliculares en el traslado o síntesis de los componentes del vitelo. Este patrón moteado se atenúa e incluso puede estar ausente, en el núcleo de los ovocitos vitelogénicos y en etapas posteriores o postvitelogénesis.

Palabras claves: Anfibios, ovocitos, células foliculares, inmunofluorescencia, ultraestructura

MORPHOLOGY OF THE OVARY IN FROGS OF THE GENUS *ELEUTHERODACTYLUS* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE).

ABSTRACT

The genus *Eleutherodactylus* in Cuba has 52 species of frogs that breed on land and have direct development. The description of the reproductive system, especially the morphology of their gonads, provides data on their adaptive radiation. Our objectives are to describe the morphology of the ovaries of six species of *Eleutherodactylus*: *E. goini*, *E. planirostris*, *E. riparius*, *E. casparis*, *E. zugii* and *E. varleyi* and find some evidence of the role of follicular cells in the process of growth of oocytes. Samples of ovaries of adult females were analyzed by light microscopy (brightfield and fluorescence) and electronic transmission. The results confirm that the morphology of the ovaries of the six species is similar to that of other amphibians. We distinguish three stages of oocytes in vitellogenesis. The FITC immunofluorescent staining for SR proteins (transcription factors, non-snRNP) showed the presence of these factors in the form of a mottled pattern surrounded by a diffuse pattern more or widespread in the oocytes, as in the follicular cells, which indicates a strong transcriptional activity. This suggests the involvement of the follicular cells in the transfer or synthesis of the components of the yolk. This speckled pattern is attenuated and may even be absent in the nucleus of oocytes and in later stages or postvitellogenesis.

Key words: Amphibians, oocytes, follicular cells, immunofluorescence, ultrastructure.

INTRODUCCIÓN

El género *Eleutherodactylus* es el más diverso y de mayor endemismo entre los vertebrados cubanos [1]. De las 52 especies descritas, solo una, *E. planirostris*, no es endémica de Cuba, pues se le encuentra también en otras regiones del Caribe, E. U. A. y México. Las ranas de este

género se caracterizan por poseer la piel más lisa que los llamados sapos, tienen la cabeza de ancho moderado y las extremidades posteriores adaptadas para saltar y cavar. Algunos de los individuos son relativamente pequeños, típicamente miden entre 20 y 50 mm de longitud hocico-cloaca, aunque pueden ser menores.

Estas ranitas se reproducen en la tierra pues colocan sus huevos en las oquedades de las rocas o en la hierba donde son fertilizados por el macho. Además, siguen un desarrollo directo, sin pasar por estadios larvales. Estas características les han permitido ocupar una gran diversidad de nichos ecológicos y han facilitado su amplia distribución [2, 3]. De ahí que los estudios relacionados con su reproducción son de gran importancia para explicar la mayor y más diversa radiación adaptativa de anfibios que ha ocurrido en la Isla de Cuba y emprender futuros proyectos de conservación. Este trabajo propone describir la morfología de los ovarios de seis especies del género *Eleutherodactylus* y encontrar alguna evidencia del papel de las células foliculares en el proceso de crecimiento de las células sexuales de las hembras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cinco hembras adultas de seis especies del género *Eleutherodactylus*: *E. goini*, *E. planirostris*, *E. riparius*, *E. casparis*, *E. zugii* y *E. varleyi*; colectadas en el occidente de Cuba durante el período reproductivo de los años 2008 y 2009. En el laboratorio se les extrajeron ambos ovarios. El ovario izquierdo de cada ejemplar fue fijado en paraformaldehído al 4 % (Panreac) y el derecho, en glutaraldehído al 2.5 % en buffer fosfato a pH 7.4 (Applichem).

Procesamiento del ovario izquierdo:

Las muestras fueron procesadas por la técnica clásica de inclusión en parafina (Paraplast®). Algunas preparaciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) y otras se procesaron con la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En ella se utilizó el anticuerpo monoclonal 3C5 contra la familia de proteínas SR [4], las cuales son consideradas factores de transcripción. Detectando su presencia en la célula, podemos obtener una clara idea de su actividad transcripcional. Como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón acoplado con isotiocianato de

fluoresceína (FITC) (Dako) que emite una fluorescencia de color verde.

Además se adicionó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Roche) a una concentración de 0.1 µg/ml. Este compuesto intercalante del ADN, permite detectar diversos grados de compactación de la cromatina. Con el cual el color azul más brillante se observa en ADN no compactado, mientras que el azul más claro o casi blanco denota compactación. Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico Nikon E 800, con objetivos de 20, 40, 60 y 100X. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio con el programa FlashPoint 3D FPG.

Procesamiento del ovario derecho:

Las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión. La inclusión se llevó a cabo con resina epóxica (Merck) y se obtuvieron cortes semifinos (teñidos con azul de toluidina) y ultrafinos, con un micrótomo modelo Ultracut de Leica. Las rejillas se contrastaron y se observaron en un microscopio JEOL JEM 1010.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ovarios de las seis especies analizadas muestran caracteres comunes, por lo que serán descritos en conjunto. Son órganos pares y se encuentran situados en la parte superior de la región abdominal, adosados a los riñones. En la etapa reproductiva ocupan una zona amplia, donde pueden llenar prácticamente todo el abdomen. Su forma, en general, es racimosa por la presencia de los ovocitos de diferentes tamaños, al igual que en otros anfibios [5, 6, 7, 8].

Tinción con hematoxilina-eosina:

En los cortes histológicos de los ovarios se observa una cavidad central (Fig.1) entre los ovocitos y uno o dos lechos germinales con ovogonias hacia la periferia (Fig. 2), similar a lo que se describe en otros anfibios. La

cavidad central se considera como un espacio interior lleno de linfa, no limitado por membrana alguna, tal y como consideran algunos autores (2009) [5, 8].

El lecho germinal está formado por algunas ovogonias reunidas, rodeadas por agrupaciones de células somáticas que son las células foliculares.



Fig. 1. Corte de ovario de *E. planirostris* con varios ovocitos previtelogénicos (op) y vitelogénicos (ov). Nótese la cavidad central (cv) y un lecho de ovogonias (og). H-E.

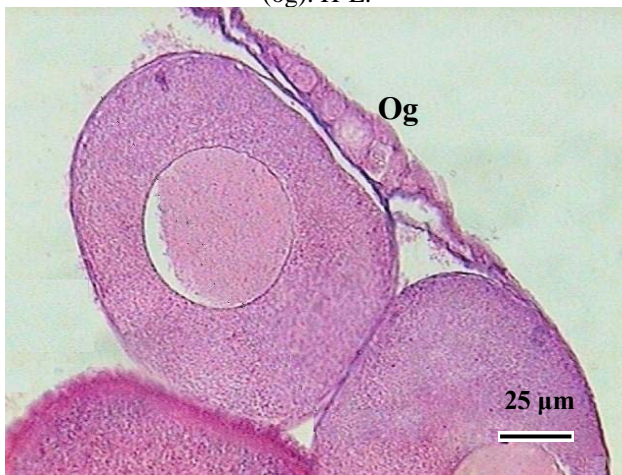


Fig. 2. Detalle del ovario de *E. planirostris* donde se observa un lecho de ovogonias (Og). H-E.

Las ovogonias son las células germinales que inician la ovogénesis, son las más pequeñas, con núcleo visible y muy teñido con hematoxilina, mientras que su citoplasma se aprecia más claro. Las células foliculares rodean a los ovocitos en el lecho germinal y hacia zonas más internas del ovario.

Los ovocitos más pequeños, al igual que en estadios posteriores, se encuentran recubiertos, a continuación de la membrana plasmática, por una membrana de naturaleza inerte, la membrana vitelina. Externamente los rodean las células foliculares. Esta capa de células va a permanecer en un solo estrato de células planas durante todo el desarrollo de los ovocitos. Por fuera de la capa de células foliculares se distingue una capa delgada formada por tejido conectivo, que constituye la teca.

En los ovocitos previtelogénicos, primer estadio de la vitelogénesis, puede apreciarse un núcleo, de contornos irregulares, donde destaca la presencia de abundantes nucléolos (Fig.3).

En esta fase los ovocitos han aumentado de tamaño como consecuencia del material que se acumula. La gran cantidad de nucléolos observados puede deberse a que son los que garantizan los componentes de ARNr para la síntesis proteica que se dispara al inicio del desarrollo del embrión y que son aportados por el citoplasma materno.

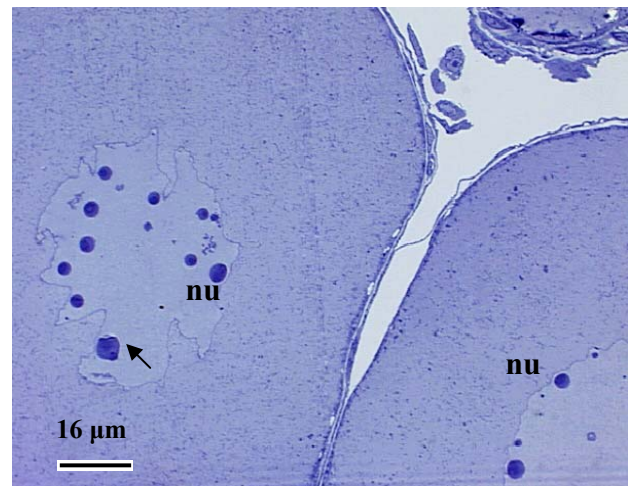


Fig. 3. Dos ovocitos previtelogénicos de *E. goini* donde se observan sus numerosos nucléolos (nu y flecha). Azul de Toluidina.

Posteriormente aparecen los ovocitos vitelogénicos, que son los más numerosos encontrados en los ovarios de las seis especies. Resalta en ellos la acumulación progresiva de vitelo, en forma de plaquetas vitelinas, desde la periferia hasta la zona de citoplasma cercana al núcleo

(Fig.4), lo que coincide con lo encontrado por De Oliveira y De Souza [9].

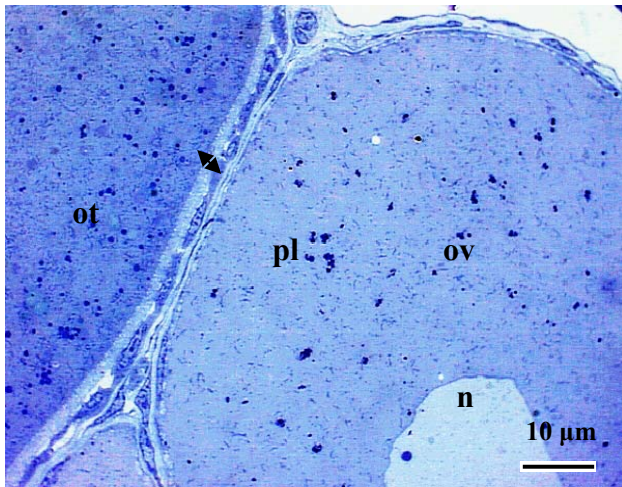


Fig. 4. Dos ovocitos de *E. varleyi*: derecha, vitelogénico (ov) e izquierda, postvitelogénico (ot). Se observan las plaquetas vitelinas (pl), la membrana vitelina (flecha bidireccional) y una parte del núcleo del ovocito vitelogénico (n). Azul de toluidina.

El número de nucléolos disminuye en la medida que avanza la vitelogénesis. Este patrón es similar al de otros anuros, por ejemplo, *Xenopus laevis* [10], *Melanophryniscus stelzneri* [11] y uno del mismo género, *Eleutherodactylus unistrigatus* [12]. Por su parte, Uribe [6] describe resultados diferentes en salamandras y plantea que, según sus observaciones, durante la vitelogénesis la cantidad de nucléolos aumentaba. Tal vez la presencia de numerosos nucléolos en los ovocitos vitelogénicos sea debido a que la síntesis de ARNr no es suficiente aún y se necesite un poco más, o la velocidad de su síntesis y ensamblaje pueda ser especie-específica.

En etapas avanzadas de la vitelogénesis se distingue en el folículo una zona con el núcleo excéntrico (polo animal) y otra donde son más abundantes las plaquetas vitelinas (polo vegetativo). Posteriormente, las plaquetas vitelinas aumentan en número y en tamaño. En este momento se puede considerar que el folículo se encuentra en la postvitelogénesis o etapa ovulatoria (Fig.5).



Fig. 5. Ovocito postvitelogénico de *E. varleyi*. Nótese el núcleo excéntrico (n) en el polo animal (pa) y las plaquetas vitelinas (pl) en el otro hemisferio, formando el polo vegetativo (pv). H-E.

Immunofluorescencia

Todos los ovocitos observados mostraron el núcleo de color azul claro, lo que denota cierto grado de compactación de la cromatina, lo cual pudiera considerarse una forma de protección de su genoma haploide. Sin embargo, sí se aprecia el marcaje azul brillante en los núcleos de las células foliculares de los folículos previtelogénicos (Fig. 6) y dentro de los ovocitos, las regiones de alta compactación de este ácido nucleico.

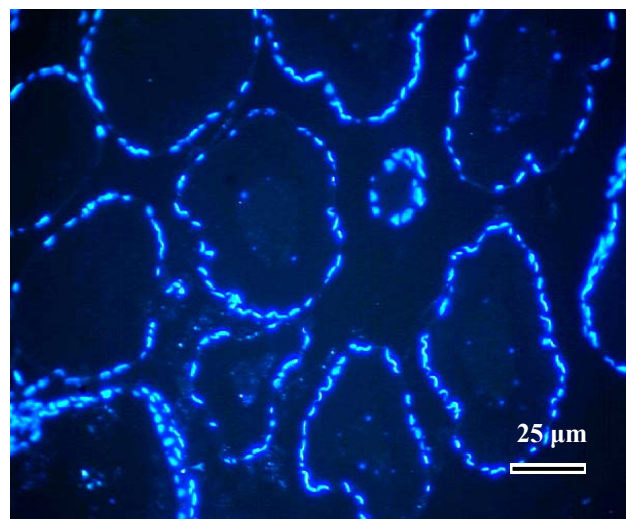


Fig. 6. Corte de ovario de *E. goini* tenido con DAPI. Se destacan los núcleos de las células foliculares en color azul brillante.

Por otra parte, el marcaje con FITC muestra motas de color verde difuso en los núcleos de los ovocitos previtelogénicos, las cuales son estructuras ricas en factores de empalme o “splicing” (Fig. 7). Esto sugiere un incremento en la actividad transcripcional de estas células como consecuencia de la síntesis de moléculas necesarias para la producción de vitelo, que se acumulan en el citoplasma de los ovocitos en esta etapa.

Ya en los ovocitos vitelogénicos el patrón moteado se atenúa. El núcleo de estos ovocitos posee un patrón con motas, aparentemente más pequeñas, y material difuso (Fig.7), pues parece haber concluido el proceso sintético. Por otra parte, en el núcleo de las células foliculares que rodean a los ovocitos, sobre todo los previtelogénicos, se observa también el patrón moteado [13], con motas de diferentes tamaños, embebidas en un patrón difuso; y la región del nucléolo negativa a la tinción, lo que indica también actividad transcripcional mantenida en estas células.

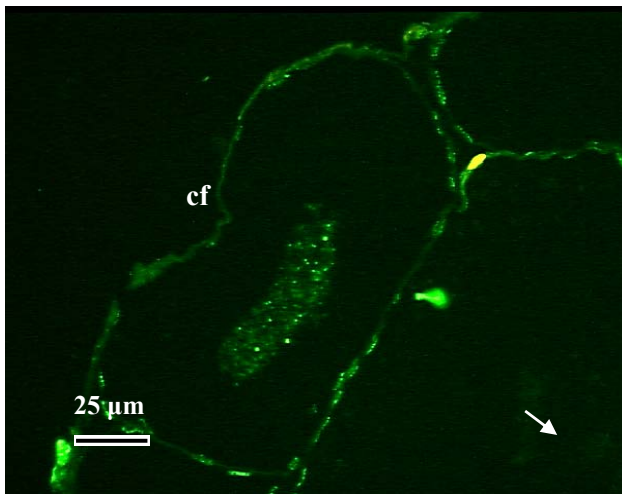


Fig. 7. Dos ovocitos de *E. casparis* teñidos con FITC: izquierdo, previtelogénico y derecho, inicio de la vitelogénesis (núcleo con una flecha mostrando marcaje negativo). Nótese el patrón moteado en las células foliculares (cf).

Lo anterior indica que estas son células activas desde el punto de vista sintético, ya sea como parte del procesamiento de los componentes del vitelo que le llegan por vía sanguínea -anteriormente formados en el hígado- o en el aporte de determinados elementos que ellas

mismas elaboran, por lo que no deben ser consideradas solamente como células somáticas acompañantes. Este resultado apoya lo planteado por Uribe [5] en urodelos, al sugerir que en las células foliculares hay síntesis activa de lípidos, carbohidratos y proteínas, las cuales pasan al ovocito.

Ultraestructura

Los folículos previtelogénicos presentan externamente a la capa de células foliculares la teca de tejido conectivo formada por fibroblastos, vasos sanguíneos y fibras colágenas. Los fibroblastos son células grandes y muy alargadas. Presentan un núcleo voluminoso que ocupa casi todo el interior de la célula. A continuación de la teca y más cercano al ovocito, se hallan las células foliculares (Fig. 8), al igual que ocurre en otros anfibios [9].

Por fuera de la membrana plasmática e internamente a las células foliculares se encuentra la membrana vitelina, la cual se observa al microscopio electrónico de transmisión muy ancha y con electrodensidad moderada.

El aumento considerable de tamaño del ovocito, en un tiempo relativamente corto, pudiera ser que no favorezca la estratificación de las capas de células foliculares en el resto de las etapas de la vitelogénesis por las que transita el ovocito, aunque este aspecto no está claro en muchos grupos de vertebrados no mamíferos.

Se pudo apreciar que la membrana plasmática del ovocito presenta microvellosidades hacia las células foliculares, mientras que de las células foliculares poseen proyecciones del citoplasma hacia las microvellosidades del ovocito. Ambas proyecciones se interdigitan y se aprecia en ellas una relación íntima (Fig. 8).

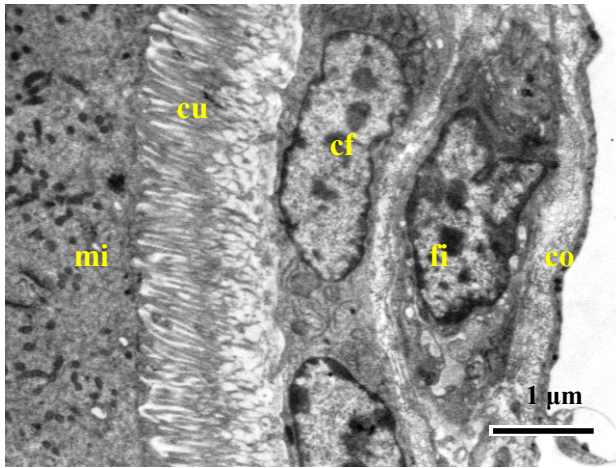


Fig. 8. Periferia de un ovocito previtelogénico de *E. zugi* donde se muestran las células foliculares (cf), su relación íntima con el ovocito (cu) y la teca, compuesta por fibroblastos (fi) y fibras colágenas (co). Notéese también las mitocondrias abundantes (mi).

A esta relación estrecha de le adjudica una función decisiva en el paso de nutrientes y moléculas para regular el desarrollo del ovocito [14, 15] pues incrementa el área disponible para la entrada de precursores del vitelo. En el caso de anfibios, esta entrada parece ocurrir por difusión o por endocitosis [5, 6, 8]. Es importante recordar la marca positiva del patrón moteado en las células foliculares obtenida en el presente estudio, lo cual sugiere que, posiblemente, estas células no solo actúan como vía para el paso de compuestos, sino que pueden sintetizar algunas moléculas de diversa naturaleza, que se incorporen al ovocito o modificar de alguna manera las que le llegan, aunque esta afirmación necesita estudios posteriores.

En el citoplasma de los ovocitos previtelogénicos se observan también un aparato de Golgi y abundantes mitocondrias alargadas y ovoides. Estas mitocondrias se encuentran dispersas y no agrupadas en una masa uniforme cerca del núcleo, o sea, no forman el cuerpo de Balbiani (Fig. 9).

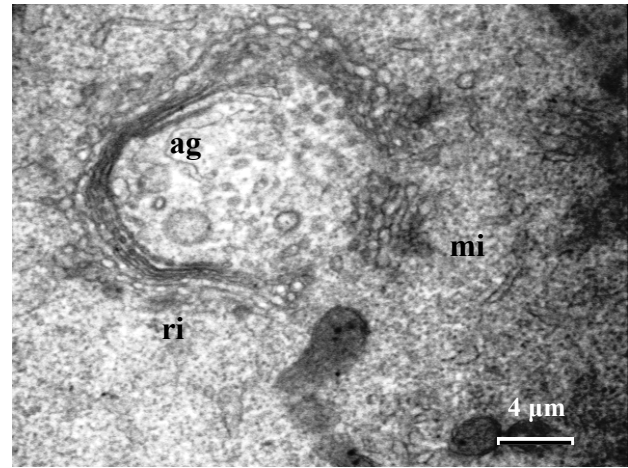


Fig. 9. Citoplasma de un ovocito previtelogénico de *E. zugi* donde se observa el aparato de Golgi (ag), las mitocondrias (mi) y abundantes ribosomas (ri).

Ogielska y Kotusz [7] informan que en algunas especies de anfibios anuros (*Xenopus laevis*, *Rana temporaria* y *Bombina orientalis*) las mitocondrias se localizan cerca del núcleo formando una masa única, el cuerpo de Balbiani. Sin embargo, consideran que no es una característica uniforme en los anfibios, pues en muchas especies las mitocondrias se organizan en grupos irregulares y el cuerpo de Balbiani no se forma, tal y como se observa en las seis especies analizadas.

En los folículos vitelogénicos la teca se mantiene con características similares a la de los folículos previtelogénicos, mientras que en la capa de células foliculares se observan retraídas las proyecciones citoplasmáticas que se enviaban hacia el ovocito y que caracterizaban a los folículos previtelogénicos (Fig. 10). Esto se relaciona con lo observado en el marcaje fluorescente en estas células, pues en esta etapa el patrón moteado se atenúa.

En el citoplasma de los ovocitos vitelogénicos se destaca la presencia de abundantes ribosomas y plaquetas vitelinas ovoides, las cuales se han ido acumulando durante el proceso de formación del vitelo.

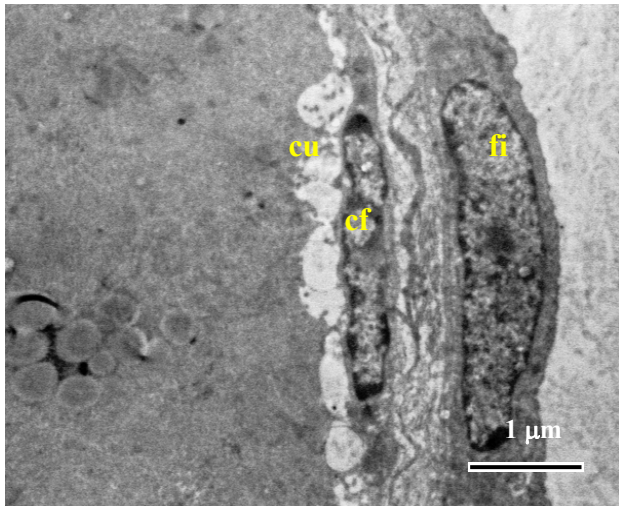


Fig. 10. Periferia de un ovocito vitelogénico de *E. riparius*. Se observan las células foliculares (cf), las proyecciones que relacionan ovocito y células foliculares, ya retraídas (cu) y un fibroblasto de la teca (fi).

La presencia de ribosomas demuestra que desde esta etapa tan temprana ya están ensamblados. Ogielska y Kotusz [7] plantean que los ribosomas pueden ser identificados desde los primeros estadios de la profase en los ovocitos, específicamente en el diploteno. Su localización en la región que debe corresponderse con el futuro polo vegetativo del citoplasma, sugiere que este sitio puede estar probablemente predestinado para la deposición de las partículas de ARNr. La producción de grandes cantidades de ARNr durante la ovogénesis, es un proceso importante que garantiza los ribosomas para la síntesis proteica durante el desarrollo temprano del embrión en los anfibios, y que aporta el ovocito [14].

CONCLUSIONES

Los ovarios de seis especies del género *Eleutherodactylus* presentaron ovocitos en tres etapas de la vitelogénesis, cada una de las cuales implica cambios en la morfología de estas células. Estos cambios pudieron evidenciarse con microscopía de campo claro y electrónica de transmisión. El núcleo de los ovocitos previtelogénicos y de sus células foliculares presenta un patrón moteado difuso para proteínas SR, lo cual indica una actividad transcripcional intensa.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Doctorado Conjunto UNAM-Universidad de La Habana y a la Secretaría General de la UNAM, por el apoyo económico recibido para el procesamiento y análisis de las muestras.

REFERENCIAS

- [1] Díaz L. M., Cádiz A. (2008) *Guía taxonómica de los anfibios de Cuba*, Bélgica, ABC taxa, Vol.4 i-vi, 294 pp.
- [2] Wells K. D. (2007) *The ecology and behaviour of amphibians*, E.U.A., The University of Chicago Press, 1148 pp.
- [3] Hedges S. B., Duellman W. E., Heinicke M. P. (2008) "New world direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography and conservation" *Zootaxa* 1737: 1-182
- [4] Turner B. M., Franchi L. (1987) "Identification of protein antigens associated with the nuclear matrix and with clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells" *J. Cell Sci.* 87: 269-282.
- [5] Uribe M. C. (2003a) *Reproductive biology and phylogeny of Urodela. The ovary and oogenesis*", E.U.A., Science Publishers Inc., pp. 135-150
- [6] Uribe M. C. (2003b) *Vertebrate functional morphology. Reproductive systems of Caudata, Amphibians*, E.U.A., Science Publishers, Inc., pp. 267-293
- [7] Ogielska M., Kotusz A. (2004) "Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians" *J.Morphol.* 259:41-54
- [8] Ogielska M. (2009) *Reproduction of Amphibian*, E.U.A., Science Publishers, Enfield, 436 pp.
- [9] De Oliveira C., De Souza L. R. (2004) "Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovaris* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae)" *Rev. Bras. Zool.* 21(4): 919-923

- [10] Dumont J. N. (1972) "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals" *J. Morphol.* 136: 153-179
- [11] Roca M. F., Echevarría D. D. (1996) "Morfología de los oocitos en diplotene de *Melanophryniscus stelzneri* (Weyenbergh, 1875) (Anura, Bufonidae)" *Alytes* 14 (2): 85-100.
- [12] Nina L. H., Del Pino E. M. V. (1977) "Estructura histológica del ovario del sapo *Eleutherodactylus unistrigatus* y observaciones sobre el desarrollo embrionario" *Rev. de la Pontificia Univ. Católica del Ecuador* 5 (16): 31-41.
- [13] George R., Segura M. L., González L., Jiménez L. F. (2002) "Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action." *Biol. Cell* 94: 99-108
- [14] Browder L. W., Erickson C. A., Jeffery W. R. (1993) *Developmental Biology*, E.U.A., Saunders College Publishing, 425 pp.
- [15] Gilbert S. F. (2006) *Developmental Biology*, E.U.A., Sinauer Associates Inc., 8va. Ed., 817 pp.