

1985

# Gametogenesis en *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona: Typhlonectidae)

Rafael O. de Sá

University of Richmond, rdesa@richmond.edu

Nibia Berois

Follow this and additional works at: <http://scholarship.richmond.edu/biology-faculty-publications>

 Part of the [Biology Commons](#), [Population Biology Commons](#), [Terrestrial and Aquatic Ecology Commons](#), and the [Zoology Commons](#)

## Recommended Citation

de Sá, Rafael O., and Nibia Berois. "Gametogenesis en *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona: Typhlonectidae)." *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 3 (1985): 25-30.

This Article is brought to you for free and open access by the Biology at UR Scholarship Repository. It has been accepted for inclusion in Biology Faculty Publications by an authorized administrator of UR Scholarship Repository. For more information, please contact [scholarshiprepository@richmond.edu](mailto:scholarshiprepository@richmond.edu).

## GAMETOGENESIS EN *CHTHONERPETON INDISTINCTUM* (GYMNOPHIONA: TYPHLO- NECTIDAE)<sup>1</sup>

Rafael de Sá\* y Nibia Berois\*\*

### RESUMEN

Histológicamente, las gónadas de *Chthonerpeton indistinctum* son similares a las ya descritas para otras especies del orden Gymnophiona. Los lóbulos testiculares se hallan compartimentados en unidades estructurales denominadas lóculos. La espermatogénesis ocurre en cistos sincrónicos de células germinales. Durante la espermiogénesis se identifican cuatro estados consecutivos de desarrollo: 1) cistos de espermátidas redondeadas; 2) cistos de espermátidas arrifionadas; 3) cistos de espermátidas bastoniformes y 4) espermátidas en ramillete.

El análisis histológico de los ovarios mostró la presencia de tres estados en la maduración de los folículos ováricos. Estas etapas pueden ser identificadas de acuerdo a: 1) ubicación del folículo en la pared ovárica; 2) morfología y características tintoreales del ovocito; 3) desarrollo de la membrana pelúcida; 4) organización de la capa de células foliculares.

Fueron observados y descritos folículos atrésicos y cuerpos lúteos.

### SUMMARY

Gametogenesis in *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona: Typhlonectidae)

Histologically, the gonads of *Chthonerpeton indistinctum* are similar to others described for the order Gymnophiona. The testes lobes are divided into structural units or locules. Spermatogenesis takes place in synchronic cysts of germinal cells. Four stages of development were identified during spermiogenesis: 1) cysts of round spermatids; 2) cysts of kidney-shaped spermatids; 3) cysts of attenuate spermatids, and 4) spermatids in a bouquet arrangement.

The histological analysis of the ovaries showed the existence of three different stages of maturation of the ovarian follicles. These stages can be identified by: 1) location of the follicle in the ovary wall; 2) oocyte morphology and staining characteristics; 3) development of the zona pellucida, and 4) organization of the follicular layer.

Atretic follicles and corpora lutea also were found.

### INTRODUCCION

El orden Gymnophiona comprende sólo 5 familias de anfibios ápodos, de hábitos cavícolas y acuáticos. Todas las cecilias presentan fertilización interna, y todas las especies de las familias Typhlonectidae y Scolecomorphidae y algunas Caeciliidae son vivíparas.

Typhlonectidae contiene 19 especies, y se halla representada en el Uruguay por una sola: *Chthonerpeton indistinctum* (Reinhardt y Lutken, 1862). La bibliografía relacionada con la biología de esta especie, aparte de la taxonómica, se limita a: Lieberman (1939) y Barrio (1969) para reproducción; Barrio *et al.* (1971) y Wake y Case (1975) para citogenética; Carlisky (1969) para excreción; Aguiar (1979) para tubo digestivo; De Carlo (1984) para sistema respiratorio, y Engelke y De Paula (1979) para sangre.

En este trabajo se resumen nuestras observaciones acerca de la gametogénesis en *Chthonerpeton indistinctum*. Estudios más detallados sobre la espermatogénesis y la ovogénesis serán publicados por separado.

1 Trabajo presentado en la Reunión de Comunicaciones correspondiente al día 27 de julio de 1984.

\* Museum of Natural History and Department of Systematics and Ecology. The University of Kansas, Lawrence, Kansas 66045-2454, USA.

\*\* Departamento de Biología Celular, Facultad de Humanidades y Ciencias. Universidad de la República. Tristán Narvaja 1674, Montevideo.

## MATERIAL Y METODO

Durante los meses de abril y mayo de 1983 arribó a las costas uruguayas del Río de la Plata, arrastrada por la corriente ocasionada por el desborde de los ríos, abundante vegetación constituida especialmente por camalotes *Eichornia crassipes*. En ella llegaron varias especies de anfibios; ejemplares de *Chthonerpeton indistinctum* se colectaron bajo la vegetación fresca arrojada a la costa de los Deptos. de Montevideo (Playas Pocitos, Malvín, Carrasco y Pajas Blancas) y de San José (Playa Pacual).

El material utilizado para este estudio se conserva en formol al 10%; parte de él está depositado en la colección de anfibios del Depto. de Zoología Vertebrados de la Facultad de Humanidades y Ciencias, Montevideo, con la característica ZVC-B 2027; el resto se encuentra en la colección particular de uno de los autores (RdS).

Para la descripción histológica se tomaron muestras de las gónadas, que se incluyeron en parafina, realizándose cortes transversales de 5 micras de espesor aproximadamente. Las técnicas de coloración empleadas fueron: hematoxilina-eosina (Ganter y Jolles, 1970), tanto para testículo como ovario, y coloración de alcromo (Lillie, 1954) para ovario. Para la observación de espermatozoides, además de los cortes histológicos se hicieron extendidos celulares que se colorearon con técnicas de nitrato de plata (Elder y Hsu, 1981).

Los preparados histológicos fueron observados y fotografiados empleando un microscopio óptico Olympus, modelo Vanox.

## RESULTADOS

### Testículo

Histológicamente, los testículos de *C. indistinctum* están compartimentados en unidades estructurales denominadas lóculos. Dichos lóculos se hallan separados por tabiques de tejido conectivo, que son de mayor espesor entre los lóculos centrales. En los tabiques centrales encontramos tubos colectores. En el interior de estos lóculos se realiza la espermatogénesis, la cual ocurre en agrupaciones celulares denominadas cistos (nidos celulares de Loft). Cada cisto presenta todas las células germinales que lo conforman en el mismo estado de desarrollo, y se observan núcleos de células somáticas (células de Sertoli) asociados a las paredes de los mismos. En el interior de los lóculos, entre los cistos de células germinales, se observa una matriz vacuolada, refrigente o escasamente teñida con eosina, que llena en mayor o menor grado la luz locular.

### Elementos celulares.

Las espermatogonias de *C. indistinctum* son las células más grandes de la línea germinal ( $n = 50$ ,  $\bar{x} = 10.6 \mu\text{m}$ ,  $s = \pm 1.68 \mu\text{m}$ ). Este tipo celular se caracteriza por presentar un núcleo redondeado, basófilo, con cromatina granulosa. Las espermatogonias se hallan generalmente localizadas en la periferia del lóculo. Las divisiones mitóticas de las espermatogonias producen los cistos de espermatoцитos. Los espermatoцитos también exhiben un núcleo redondeado, pero éste es de menor tamaño ( $n = 50$ ,  $\bar{x} = 8.00 \mu\text{m}$ ,  $s = \pm 0.93 \mu\text{m}$ ). El núcleo de los espermatoцитos se tiñe más intensamente con colorantes basófilos, y la cromatina adquiere un aspecto filamentosos o de red. Los cistos de espermátidas se originan como resultado de las divisiones meióticas de los espermatoцитos. Los núcleos de este tipo celular son los más pequeños en la línea germinal ( $n = 50$ ,  $\bar{x} = 5.06 \mu\text{m}$ ,  $s = \pm 0.55 \mu\text{m}$ ), y presentan una cromatina condensada.

Basados en la variación de la morfología nuclear reconocemos: 1) cistos de espermátidas redondeadas; 2) cistos de espermátidas de núcleo arriñonado; 3) cistos de espermátidas bastoniformes, y 4) cistos de espermátidas en ramillete.

Los espermatozoides maduros los encontramos enclavados en el citoplasma de las células de Sertoli, o libres entre los diferentes cistos de células germinales, agrupándose especialmente en la luz ampular. La morfología del espermatozoide maduro muestra una cabeza aparentemente cilíndrica, relativamente grande ( $n = 50$ ,  $\bar{x} = 17.34 \mu\text{m}$ ,  $s = \pm 0.85 \mu\text{m}$ ), e intensa y homogéneamente basófila. En los extendidos celulares, el flagelo es fácilmente observable por su positividad a la plata; en estos preparados el flagelo exhibe una longitud aproximadamente dos veces mayor que la cabeza.

Las únicas células somáticas identificadas fueron las células de Sertoli. Este tipo celular se caracteriza por su núcleo de sección algo triangular, menor basofilia que las células germinales, y cromatina finamente granulada en la que se destaca un gran nucleolo intensamente coloreado.

## Ovario

La observación macroscópica de los ovarios de *C. indistinctum* revela la presencia de dos tipos de elementos germinales que aparecen como: 1) elementos pequeños, translúcidos, y 2) elementos de mayor tamaño, de color amarillo pálido. Ambos tipos de elementos pueden encontrarse en cualquier zona del ovario, lo cual histológicamente se correlaciona con una irregular distribución de los elementos en maduración. A diferencia de lo observado macroscópicamente, el análisis histológico reveló la presencia de tres tipos de folículos: primarios, secundarios y terciarios. Estos folículos se identifican de acuerdo a: 1) ubicación del folículo en la pared ovárica; 2) morfología y afinidades tintoriales del ovocito; 3) desarrollo de la membrana pelúcida, y 4) organización de la capa folicular.

El folículo primario se halla alojado en el epitelio superficial de la pared ovárica, y está compuesto por un ovocito con núcleo central, o ligeramente excéntrico, que tiene un nucleolo grande y otro más pequeño. El citoplasma del ovocito no difiere mayormente del citoplasma gonial. Rodeando al ovocito se reconocen unas pocas células epiteliales que se han aplanado en su superficie.

El folículo secundario se localiza más internamente en la pared ovárica. En esta etapa el ovocito exhibe un núcleo oval y excéntrico, en el cual se destacan un mayor número de nucleolos. El citoplasma se halla repleto de finas granulaciones débilmente PAS positivas y que adquieren una coloración celeste con el alcromo. Rodeando a este ovocito encontramos un mayor número de células foliculares, que todavía no forman una capa continua. En esta etapa del desarrollo del folículo comienza a acumularse una fina capa de material PAS positivo entre las células foliculares y el ovocito.

Finalmente, el folículo terciario es el que se encuentra localizado más internamente en la pared ovárica; presenta un núcleo aplanado, totalmente excéntrico, con cromatina de aspecto homogéneo y una gran proliferación de nucleolos. El citoplasma del ovocito se halla repleto de granulaciones de dos tipos: las finas, ya observadas en la etapa de maduración anterior y que se ven fundamentalmente en la periferia del ovocito inmediatamente por debajo de la membrana celular, y un segundo tipo de mayor tamaño, marcadamente PAS positivas y muy abundantes. Una capa continua de células foliculares rodea al ovocito. Las células foliculares en esta etapa son altas, y presentan un núcleo central y oval. A la vez, el material PAS positivo, localizado entre las células foliculares y el ovocito, forma también una capa continua que rodea al ovocito.

Además de los folículos descritos encontramos otras estructuras que se asemejan a folícu-

los terciarios, pero difieren con respecto a éstos en que no existe membrana pelúcida, las células foliculares no forman una capa definida alrededor del ovocito, y las granulaciones PAS positivas no se distribuyen homogéneamente en el citoplasma del ovocito sino que aparecen en acúmulos. En ningún caso observamos el núcleo en estas estructuras. El citoplasma del ovocito muestra una invasión de células pequeñas, de núcleo muy basófilo, identificadas como linfocitos.

Estructuras avitelinadas, formadas por agrupaciones celulares carentes de granulaciones PAS positivas, se observaron en diferentes regiones del ovario, hallándose unidas o conectadas con el epitelio superficial por medio de un pedículo. Dichas agrupaciones celulares tienen un aspecto redondeado, y quedan constituidas por una capa externa de células, similares a las células foliculares, y un estroma central. Rodeando estas estructuras hay una proliferación de tejido conectivo y vasos sanguíneos.

## DISCUSION

### Testículo

La estructura histológica del testículo de *C. indistinctum* concuerda con el patrón descrito para otras especies del orden (Spengel, 1876; Wake, 1968 y 1977). Consiste en una serie de compartimientos llamados lóculos (Seshachar, 1936), dentro de los cuales ocurre la espermatogénesis.

La espermatogénesis en *C. indistinctum* mantiene el modelo descrito para los anamniotas (Roosen-Runge, 1977). Los elementos germinales se desarrollan en agrupaciones celulares o cistos sincrónicos. El sincronismo en las divisiones ha sido estudiado a nivel de microscopía electrónica en peces (Clerot, 1971), y el hecho tiene una explicación estructural al observarse verdaderos puentes intercelulares entre las células germinales de un mismo cisto. La presencia de estos puentes citoplásmicos permite explicar las divisiones sincronizadas, al existir entre todas las células una relación de continuidad, la cual facilita la rápida difusión de los mensajes del ciclo celular.

Las espermatogonias son las células de mayor tamaño en la línea germinal, y se observan generalmente en ciertas zonas de la pared locular integrando el epitelio germinativo. A diferencia de lo citado por Seshachar (1936 y 1939) para otras especies de cecilias, no observamos polimorfismo nuclear en este tipo celular, y el núcleo de las espermatogonias se vio siempre con aspecto redondeado. De las espermatogonias derivan los espermatocitos; en esta etapa ocurre la meiosis, como en todos los vertebrados y como resultado de la misma se originan los cistos de espermátidas. Estas células son haploides y las más pequeñas de la línea germinal. Se observan varios tipos de espermátidas al sufrir éstas un proceso de diferenciación, espermiación, el que en términos generales consiste en una progresiva condensación de la cromatina, alargamiento del núcleo, formación del acrosoma, pérdida del citoplasma y adquisición del flagelo. Para *C. indistinctum* detectamos 4 etapas en la espermiación. En una primera encontramos las espermátidas de aspecto redondeado y núcleo condensado, a las que identificamos como espermátidas primitivas o tempranas. Al continuar la espermiación las espermátidas tempranas comienzan a adquirir forma arriñonada, apreciándose también un leve alargamiento del núcleo. A continuación las espermátidas adquieren un aspecto bastoniforme observándose un mayor alargamiento nuclear. Finalmente las espermátidas se identifican conformando ramilletes adheridos al citoplasma de las células de Sertolí. En este período los núcleos adquieren el aspecto de la cabeza del espermatozoide maduro, y se encuentran orientados paralelamente, dando la imagen de ramillete que caracteriza a este estado. El pasaje de la morfología arriñonada a la bastoniforme es favorecido por la

ruptura de las paredes del cisto, con la consiguiente expansión de las espermátidas y, en consecuencia, la adquisición de la morfología bastoniforme.

El espermatozoide, producto final de todo el proceso, puede verse agrupado o libre en la luz locular. Su morfología se aprecia mejor en los extendidos celulares. En estos casos se destaca el acrosoma, diferenciación típica del aparato de Golgi, en el extremo anterior, así como el flagelo en el extremo posterior.

## Ovario

Los anfibios se caracterizan por presentar ovocitos teleolecitos, es decir con gran acúmulo de material nutritivo. Estos ovocitos se hallan detenidos en la metafase de la segunda división meiótica, bloqueo que desaparece como consecuencia de la fecundación, y la maduración del ovocito se completa con posterioridad a la entrada del espermatozoide. Durante la maduración intraovárica, los cambios más espectaculares ocurren a nivel del citoplasma del ovocito, ya que en él se acumulan los nutrientes que luego utilizará el embrión.

Wake (1977) describe ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos para otras especies del orden Gymnophiona. En sus lineamientos generales a nivel macroscópico, *C. indistinctum* mantiene este mismo patrón, pero el análisis histológico nos permite clasificar los folículos en desarrollo en 3 categorías: primarios, secundarios y terciarios. Los folículos primarios y secundarios de nuestra clasificación corresponden a los previtelogénicos de la clasificación de Wake, y los folículos terciarios a los vitelogénicos.

El citoplasma del ovocito presenta dos tipos de vitelo de aparición sucesiva: un vitelo temprano, presente en los folículos primarios y fundamentalmente en los secundarios, y otro vitelo de aparición más tardía, en forma de grandes granulaciones PAS positivas, que enmascaran al vitelo temprano en los folículos terciarios. Además, ambos tipos de vitelo pueden diferenciarse por sus afinidades tintoriales.

Otras características que nos permiten diferenciar a los folículos primarios y secundarios de los terciarios, es el cambio en la posición del núcleo el que se hace más excéntrico, y el progresivo aumento en el número de nucléolos. El desplazamiento del núcleo se explica por el paulatino aumento y deposición de vitelo, mientras que el segundo evento corresponde a un fenómeno de amplificación de los genes encargados de codificar la síntesis de los rRNA. Además de estas características del ovocito, existen otras particularidades que nos permiten identificar las diferentes etapas en la maduración del folículo ovárico. A partir de los folículos secundarios se empieza a visualizar el acúmulo de una membrana PAS positiva como consecuencia del intercambio entre el ovocito y las células foliculares. Esta membrana se completa recién en el folículo terciario, formando la típica membrana pelúcida que rodea al folículo de otros vertebrados.

Por último, la capa de células foliculares también sufre cambios durante la maduración del folículo. En los folículos primarios son células aplanadas que no forman una capa continua, mientras que en los terciarios son células altas que rodean totalmente al ovocito.

Las estructuras similares a los folículos terciarios pero carentes de núcleo y con el vitelo agrumado, se identifican como folículos atrésicos. El fenómeno de atresia aparece como resultado de la reincorporación al organismo de los materiales acumulados en el citoplasma de los ovocitos de aquellos folículos que, por diferentes razones, no siguen la vía normal de la ovulación (Rastogi, 1969).

Estructuras avitelinas similares a las encontradas en *C. indistinctum* han sido descritas por Tonutti (1931) y Wake (1968) para otras especies de cecilias. Posteriormente Wake (1977), reporta estructuras similares como cuerpos lúteos, para la mayoría de las especies vivíparas y en

varias especies ovíparas. Recientemente Exbrayat y Collenot (1983) mediante estudios histológicos, identificaron positivamente estas estructuras como cuerpos lúteos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Departamento de Zoología Vertebrados de la Facultad de Humanidades y Ciencias, por permitirnos utilizar el material depositado en su colección de anfibios. También deseamos expresar nuestro reconocimiento a la Dra. Marvalee H. Wake, la que continuamente nos proporcionó bibliografía, de otra manera no disponible, y nos estimuló en nuestro trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

- AGUIAR, M.L. 1979. Estudio histológico do esôfago de *Chthonerpeton indistinctum* (Amphibia: Gymnophiona). Acta Biol. Leopold., 1(1): 45-53.
- BARRIO, A. 1969. Observaciones sobre *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona, Caeciliidae) y su reproducción. Physis, 28(177): 499-503.
- , F.A. SAEZ y P. RINALDI DE CHERI. 1971. The cytogenetics of *Chthonerpeton indistinctum* (Amphibia: Gymnophiona). Caryologia, 24(4): 435-445.
- CARLISKY, N.J., A. BARRIO y L.I. SADNIK. 1969. Urea biosynthesis and excretion in the legless amphibian *Chthonerpeton indistinctum* (Apoda). Comp. Biochem. Physiol., 29: 1259-1262.
- CLEROT, J. 1971. Les pontes intercellulaires du testicule du gardon: organisation syncytiale et synchronie de la différenciation des cellules germinales. J. Ultrast. Res., 37: 690-703.
- DE CARLO, J.M. 1980. Anatomía microscópica del sistema respiratorio de *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona: Typhlonectidae). Physis Secc. B., 39(96): 27-36.
- ELDER, F.S. y T.S. HSU. 1981. Silver-staining patterns of mammalian epididymal spermatozoa. Cytogenet. Cell. Genetics., 30: 157-167.
- ENGELKE, M. y C. DE PAULA. 1979. Contribuição ao estudo hematológico de *Chthonerpeton indistinctum* (Amphibia, Apoda). Eritrócites e trombócites. Acta Biol. Leopold., 1(1): 97-109.
- EXBRAYAT, J.M. y G. COLLENOT. 1983. Quelques aspects de l'évolution de l'ovaire de *Typhlonectes compressicaudus* (Dumeril et Bibron, 1841), Batracien apode vivipare. Etude quantitative et histo-chimique des corps jaunes. Reprod. Nutr. Develop., 23(5): 889-898.
- GANTER, P. y G. JOLLES. 1970. Histochimie normale et pathologique. Vol. 2. Ganthier-Villars (ed.). 1904 pág.
- LIEBERMAN, J. 1939. Distribución geográfica de los cecílicos argentinos y observación acerca de la biología. Physis, 16(48): 7-8.
- LILLIE, R.D. 1954. Histopathologic technic and practical histochemistry. The Blakiston Company Inc. (ed.) 501 pág.
- RASTOGI, R.K. 1969. The occurrence and significance of ovular atresia in fresh water mud-eel, *Amphipsous cuchia*. Acta Anat., 73: 148-160.
- ROOSEN-RUNGE, E. 1977. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge Univ. Press.
- SESHACHAR, B.L. 1936. The spermatogenesis of *Ichthyophis glutinosus* Linn. I. The spermatogonia and their division. Zeit. f. Z. Forsch. u. Mikr. Anat., 24: 662-706.
- 1939. The spermatogenesis of *Uraeotyphlus narayani*. La cellule, 38: 63-76.
- SPENGLER, J. 1876. Das Urogenitalsystem der Amphibien. I. Theil. Der anatomische Bau des Urogenitalsystems Arbeit. aus dem Zool. Zoot. Inst. Würzburg, 3: 51-114.
- TONUTTI, E. 1931. Beitrag zur Kenntnis der Gymnophionen. 15. Das Genitalsystem. Morph. Jahrb., 68: 151-292.
- WAKE, M.H. 1968. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. The gonada and the fat bodies. J. Morph., 126(3): 291-331.
- 1977. The reproductive biology of the caecilian: an evolutionary perspective. In: D. H. Taylor and S.I. Gutman (ed.). The reproductive biology of the amphibians. pp. 73-101. Plenum Publ. Corp.
- y S. CASE. 1975. The chromosomes of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). Copeia, (3): 510-516.