



## ARTÍCULO ORIGINAL/ ORIGINAL ARTICLE

### MORFOMETRIA DE TESTÍCULOS Y CELULAS GERMINALES DE *ALLOBATES FEMORALIS* (BOULENGER 1883) (DENDROBATIDAE: ANURA: AMPHIBIA)

### MORPHOMETRY OF THE TESTIS AND GERMINALS CELLS OF *ALLOBATES FEMORALIS* (BOULENGER 1883) (DENDROBATIDAE: ANURA: AMPHIBIA)

Angélico Asenjo<sup>1</sup>, Karen Siu Ting<sup>2</sup> & José Pino<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Zoología, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Herpetología. Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.

<sup>3</sup> Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Departamento de Zoología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.

\* Dirección del autor a la que deben dirigirse las correspondencias: Departamento de Zoología, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19020, 81531-980 Curitiba-PR, Brazil. Correo electrónico: pukara8@yahoo.com (A. Asenjo)

The Biologist (Lima), 2011, 9 (2), jul-dic: 167-175.

## ABSTRACT

The present study describes the morphological aspects of the testis and presents a general characterization of the seminiferous elements of adult specimens (N=8) of *Allobates femoralis* (Boulenger, 1883) collected at the Panguana Biological Station (9°37'S 74°56'W), 250 masl, upstream of the Pachitea river, Yuyapichis district, Puerto Inca province, Huánuco, Peru. The amphibians (25.99 ± 0.97 mm in length) were dissected and their testes were isolated for macroscopic descriptions; later, routine histological protocols for microscopic analysis were done, colored with hematoxylin and eosin dye. The germinal stages were described and measured with the help of an ocular micrometer. The biometrics of the testes were: major axis = 2.254 mm (SD=0.282), minor axis = 1.343 mm (SD=0.181), width = 0.971 (SD=0.097). At a microscopic level we found the albuginea coat (6.51 ± 1.74 µm width) formed by connective tissue and smooth muscle. The seminiferous tubules (162.56 ± 47.61µm) were delimited by a thin layer of connective tissue. Regarding the microscopic features, spermatogenesis in *A. femoralis* occurs into the seminiferous tubules where the cellular elements are organized in spermatocysts. Each cyst contains cells in the same stage of development. The characterization of each cell type allowed the identification of the germ line cells: 1) Spermatogonia, isolated cells or forming groups of the most voluminous cells of the germinal lineage (7.07 ± 1.187 µm) with an irregular nucleus shape. They laid very close to the seminiferous tubule. 2) Spermatocyte I, with a smaller form than spermatogonias (6.95 ± 1.21 µm). 3) Spermatids; with a round shape, as they advance in their development, they elongated slightly and are organized into "bundles" whose heads are attached between them. 4) Spermatozoa, elongated with the flagellum lightly stained, are well compacted cells with the nucleus and cytoplasm reduced, elongated and extend into the lumen of the seminiferous tubule. It is reported for the first time the macroscopic and microscopic description of the testis of *A. femoralis* in Peru.

**Keywords:** *Allobates femoralis*, Dendrobatidae, Peru, spermatogenesis, testis.

## RESUMEN

El presente estudio describe la morfometría del testículo y la línea espermatogénica de especímenes adultos (N=8) de *Allobates femoralis* (Boulenger, 1883) colectados en la Estación Biológica Panguana (9°37'S 74°56'W), 250 msnm, 4–5 km río arriba del Río Pachitea, Distrito de Yuyapichis, provincia de Puerto Inca, Huánuco, Perú. Los anfibios (longitud 25,99±0,97 mm) fueron diseccionados y aislados los testículos con el propósito de obtener datos biométricos, posteriormente se realizaron cortes histológicos, coloreándose con hematoxilina y eosina; los estadios germinales observados fueron descritos y luego medidos con ayuda de un ocular micrométrico. La biometría obtenida de los testículos fue: eje mayor = 2,254 mm (DE = 0,282); eje menor = 1,343 mm (DE = 0,181); ancho = 0,971 mm (DE = 0,097); a nivel microscópico encontramos una capa albugínea (6,51±1,74  $\mu$ m) constituida por tejido conectivo y músculo liso. Los túbulos seminíferos (162.56±47.61 $\mu$ m) están delimitados por una delgada capa de tejido conectivo. En relación a los aspectos reproductivos, se observó en *A. femoralis* que la espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos donde los elementos celulares están organizados en espermatocistos. Cada cisto contiene células en el mismo estadio de desarrollo. La caracterización de cada tipo celular permitió la identificación de las células del linaje germinal: 1) Espermatogonias, son células aisladas o en grupos más voluminosas del linaje espermático (7,07±1,187  $\mu$ m), tienen núcleo irregular, presenta granulaciones cromatínicas y se encuentran por lo general muy cerca de la pared tubular. 2) Espermatocito I, con tamaño menor que las espermatogonia (6,95±1,21 $\mu$ m), 3) Espermátides; redondeadas, con cromatina fina; a medida que avanzan en su desarrollo, éstas se elongan y se organizan en “atados” cuyas cabezas están sujetas entre sí. 4). Los espermatozoides tienen forma alargada siendo su flagelo menos teñido, el núcleo es compactado y el citoplasma se reduce, están distribuidos hacia el lumen del túbulo seminífero. Se reporta por primera vez la descripción macroscópica y microscópica del testículo de *A. femoralis* para el Perú.

**Palabras clave:** *Allobates femoralis*, dendrobatidae, espermatogénesis, Perú, testículo.

## INTRODUCCIÓN

El neotrópico es la zona que comprende las regiones tropicales y subtropicales de América, ha sido desde siempre una de las regiones biogeográficas con una fauna anfibia poco conocida (Fouquet *et al.* 2007).

La población de anfibios refleja un estrecho vínculo entre las variables ambientales (temperatura, precipitaciones, fotoperiodo, altitud, latitud, etc.) y el ajuste de los organismos a su ambiente (Duellman & Trueb 1986). Los patrones reproductivos están correlacionados con condiciones climáticas prevalentes. Los cambios de temperatura y

fotoperiodo estimulan la gametogénesis y establece los tipos de ciclos (Jørgensen 1992).

Los anuros se caracterizan por tener una gran variedad de estrategias reproductivas, lo cual nos puede sugerir variaciones morfológicas y funcionales en sus órganos sexuales (Duellman & Trueb 1986, Oliveira *et al.* 2002). La morfología del aparato reproductor puede presentar variantes anatómicas de forma y de peso que dependen del periodo reproductivo. Se han realizado estudios en la morfología interna de las estructuras reproductivas de los anfibios (Lofts 1974, Duellman & Trueb 1986, Wake & Dickie 1998). Entre estos, varios se han enfocado en los cambios observados a través de los periodos reproductivo y no

reproductivo. Otros se han enfocado en los cambios en las células y en la morfología en los testículos y tubos seminíferos a lo largo del ciclo reproductivo de salamandras norteamericanas (Chan 2003), *Pleurodema thaul* (Leptodactylidae) del sur de Chile (Díaz-Paez & Ortiz 2001) y descripciones exhaustivas de dichas estructuras, como en el caso de *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) (Leptodactylidae) en Brasil (Oliveira *et al.* 2002).

En los anuros, los testículos son órganos ovoides, pareados y compactos de color usualmente amarillos a blancos lechosos (Oliveira *et al.* 2007). En cuanto a la arquitectura morfológica, están revestidos por una túnica albugínea que confina el parénquima testicular constituido por túbulos seminíferos donde se encuentran el tejido germinativo (Oliveira *et al.* 2002). Según Duellman & Trueb (1986), el epitelio germinal puede estar distribuido en túbulos en los Apoda y Anura o en lóbulos testiculares como en los Urodela.

El tejido germinal, que constituye el parénquima testicular, presenta diferentes tipos celulares: espermatogonias ubicadas en el borde del epitelio; espermatocitos y espermátides en secuencia de la diferenciación celular; y los espermatozoides en el lumen o adyacentes. En el epitelio, el arreglo es cístico; grupos de células germinales asociados con la célula de Sertoli, se denomina cisto espermatogénico o espermatocisto (Chavadej *et al.* 2000), cada una de estas unidades están en el mismo estadios de diferenciación y con un desarrollo sincrónico, esto es común entre los anfibios (Oliveira *et al.* 2002).

El proceso de espermatogénesis es muy similar entre los diferentes grupos de vertebrados. Las diferencias más pronunciadas se refieren a los arreglos de los túbulos seminíferos. Entre los anura, se han realizado trabajos a nivel de microscopía de luz (Chavadej *et al.* 2000, Hiragond & Saidapur 2000, Ferreira *et al.*

2008) y microscopía electrónica (Manochantr *et al.* 2003). Lipke (2008) indica que la estructura de la cola de los espermatozoides de los dendrobatidae puede ser utilizada para estudios de análisis filogenéticos.

La familia Dendrobatidae comprende un grupo de anfibios neotropicales de 186 especies clasificadas dentro de 10 géneros (Glaw *et al.* 1998 cit. Vences *et al.* 2000). Muchas ranas dendrobatidos comparten coloraciones aposemáticas y alcaloides en la piel. La presencia del amplexus cefálico es típico para la mayoría de los géneros dendrobatidos y único entre los anura (Duellman & Trueb 1986). *Allobates femoralis* (Boulenger, 1882) está clasificado por la Convención de Comercio Internacional de Especies en Peligro de la Flora y Fauna (CITES) Apéndice II (Frost 2004, May *et al.* 2008).

Debido a la poca información existente sobre la anatomía de los órganos reproductores masculinos de los anura, especialmente de los animales de las regiones neotropicales, y la descripción histológica de los testículos; el propósito de este estudio es describir algunas variaciones morfológicas de los órganos reproductivos del dendrobátido *A. femoralis*, desde el punto de vista anatómico e histológico, analizados independientemente y algunas características de sus células germinales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Estación Biológica Panguana (9°37'S 74°56'W), 250 msnm, 4 - 5 km río arriba del Río Pachitea, Distrito de Yuyapichis, provincia de Puerto Inca, Huánuco (Fig. 1). La provincia de Puerto Inca presenta un clima cálido-húmedo, muy tropical, templado, propio de la sub región: Selva Baja, se caracteriza por la presencia de precipitaciones promedio de 2000 mm anuales y temperaturas que oscilan entre los 25 °C a 39 °C, aproximadamente. Las

zonas de vida identificadas son: bosque pluvial Premontano Tropical y bosque muy húmedo Premontano Tropical (MTC 2009).

### Animales

Adultos machos de *A. femoralis* (= *Epipedobates femoralis*) (N=8) (Fig.2) fueron colectados a mano alzada en el área de estudio del 15 al 20 de noviembre (época de lluvias) de 2003. Dichos especímenes se depositaron en la colección del Departamento de Herpetología del Museo de Historia Natural (MHN) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) en alcohol al 70%.

### Biometría testicular

Los animales fueron diseccionados por laparoscopia, extrayéndoles los dos testículos por medio de una incisión abdominal horizontal. Los testículos removidos fueron medidos en sus respectivos ejes con ayuda de un vernier de metal (0,001mm).

### Análisis Histológico

Posteriormente, los testículos removidos se postfijaron toda la noche a temperatura ambiental en 10 % de formol acético, deshidratados en una batería de diluciones de etanol al 70, 80, 96, y 100 % por 5 min en cada solución. Luego se trasladó la muestra a xilol absoluto por 5 min; a continuación, se embebió cada testículo en Paraplast®. Con la ayuda de un micrótopo Minot, se procedió a realizar cortes seriados de 6  $\mu$ m, los cuales fueron coloreados con Hematoxilina de Harris - eosina amarillenta sellándose la lámina con Entellan®. Las observaciones se realizaron mediante un microscopio óptico Carl Zeiss Jena, modelo Amplival; para las fotomicrografías se utilizó una cámara digital Canon S50, mediante un adaptador para el microscopio.

### Reconocimiento y medición de células

Se escogieron los mejores cortes por lámina; luego, con una magnificación de 630 X se reconocieron los diferentes estados de desarrollo gamético: espermatogonias,

espermatoцитos, espermátides y espermatozoide y se procedió en 100 X a hacer las mediciones de: albugínea, túbulos seminíferos y los morfos de la línea espermatogénica. Se midieron con ayuda de un ocular micrométrico incorporado al microscopio un rango de 40 o 50 células de cada tipo por individuo.

## RESULTADOS

El aparato reproductor masculino de *A. femoralis* presenta variaciones anatómicas conspicuas interespecíficas, especialmente en lo concerniente al tamaño de los testículos y la variación de los cuerpos adiposos abdominales.

Los testículos (Fig. 3) de color crema-blanquecino sin pigmentos en el tejido conectivo o en los lóbulos externos; están situados sobre los riñones mesonéfricos, ligados a estos por una membrana, el mesorquio. En general, son ovalados, compactos y turgentes. En tamaño; son muy pequeños, en promedio: eje mayor = 2,254 mm (DE = 0,282); eje menor = 1,343 mm (DE = 0,181); ancho = 0,971 mm (DE = 0,097). Los adultos midieron en promedio 25,99 mm (DE = 0,976).

En la figura 4, se puede observar la capa albugínea (grosor promedio = 6,512  $\mu$ m; DE = 1,744) alrededor del testículo, constituida por tejido conectivo y músculo liso (fig. 4). En la región cortical se encuentra el tejido conectivo del parénquima y los túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos están delimitados por una delgada capa de tejido conectivo. Estos miden en promedio: eje mayor = 162,56  $\mu$ m, DE = 47,61 y eje menor = 104,85  $\mu$ m, DE = 39,04. Se pudieron distinguir algunas células de Leydig en el intersticio entre los túbulos seminíferos.

En cada túbulo hay grupos de células germinales que se asocian a células de Sertoli. Estos grupos, o quistes germinales (fig. 5)

están formados por células germinales en igual etapa de diferenciación, a lo que se le denomina sincronía de desarrollo.

Se llegaron a distinguir diferentes estadios de desarrollo de células germinales:

**Espermatogonias:** son las células más voluminosas del linaje espermático (Diámetro prom = 7,077  $\mu\text{m}$ ; DE = 1,187). Tiene un núcleo irregular. Presenta granulaciones cromatínicas. Se encuentran por lo general muy cerca de la pared tubular y pueden estar aislados o en grupos. Se pudo detectar el estadio de espermatogonia I, más no pudimos distinguir el de espermatogonia II.

**Espermatocitos:** Son células redondas, con tamaño menor que las espermatogonia (Diámetro prom = 6,956  $\mu\text{m}$ ; DE = 1,218). Son el resultado de la diferenciación del estado de espermatogonia II. Pueden presentar diferentes grados de compactación de la cromatina según la fase de división meiótica en la que se encuentre. Se observaron espermatocitos I, mas no se pudo distinguir del estadio espermatocito II, que difiere del anterior en tener un menor tamaño.

**Espermátides:** Es el estado de diferenciación que le continúa al de espermatocito II. Las espermátides en estadios primarios son redondeadas. A medida que avanzan en su desarrollo, éstas se elongan ligeramente. Se citan 2 estadios en la literatura, espermátide I y espermátide II. Las espermátide II tienen la forma más alargada, la cola también es más notoria y larga, y se organizan en “atados” cuyas cabezas se sujetan a alguna célula de Sertoli.

**Espermatozoides:** Tienen el núcleo bien compactado y el citoplasma se reduce. La cabeza del espermatozoide tiene forma alargada y se adhiere a la célula de Sertoli, mientras que la cola es menos teñida, alargada y se extiende hacia el lumen del túbulo seminífero. Se les observa en grupos o

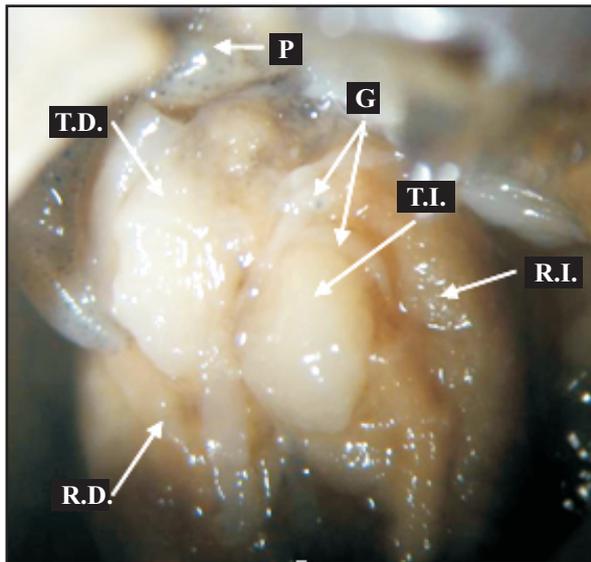
“atados” debido a su asociación con las células de Sertoli. Cuando alcanzan la madurez, éstos son liberados en el lumen.



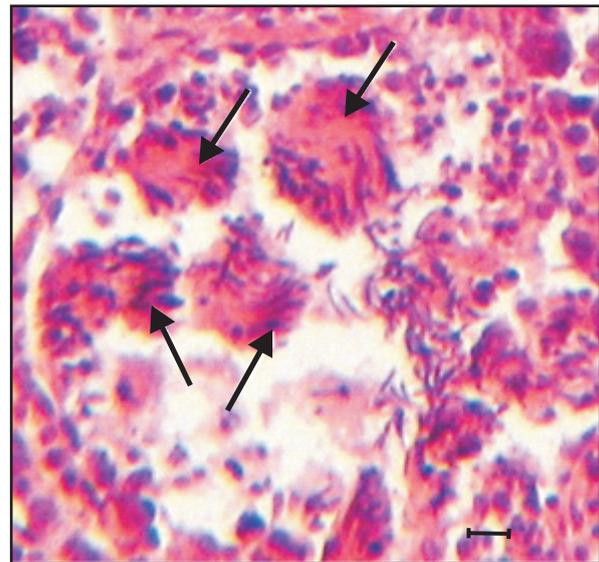
Figura 1. Ubicación del área de estudio (flecha).



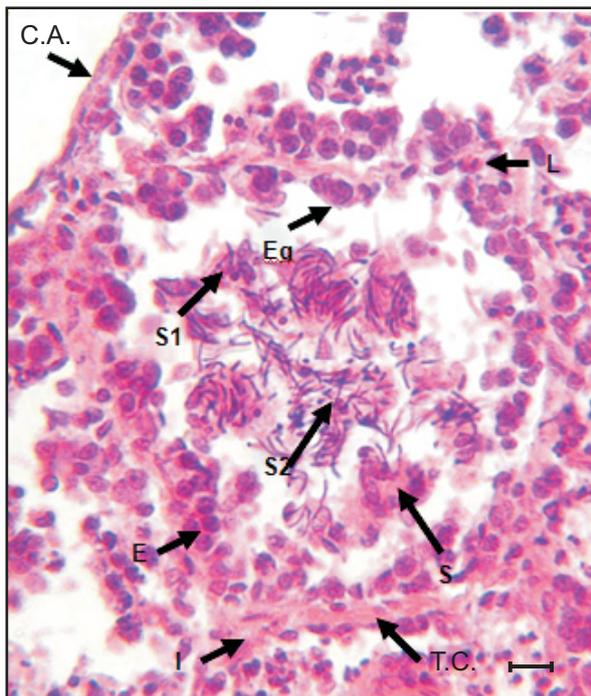
Figura 2. *Allobates femoralis* adulto.



**Figura 3.** Vista anatómica de los testículos de *Allobates femoralis*. 60 X. P= Pulmón, G=Cuerpos grasos, T.I.= Testículo izquierdo, T.D.= Testículo derecho, R.I.= Riñón mesonéfrico izquierdo, R.D.= Riñón mesonéfrico derecho.



**Figura 5.** Corte histológico del testículo de *A. femoralis*. Espermatozoides germinales (flechas). Note la sincronía de los estadios. Barra: 10 micrones.



**Figura 4.** Histología del túbulo seminífero de *Allobates femoralis*. C.A= Capa albugínea; I= Intersticio interlocular; T.C= Tejido conectivo que rodea el túbulo seminífero. L= Célula de Leydig; Eg= Espermatogonia; E= Espermatocito; S= Célula de Sertoli; S1= Espermátides; S2= Haz de espermatozoides en lumen. Barra: 10 micrones.

## DISCUSIÓN

La actividad reproductiva en los anuros esta correlacionada con las condiciones climáticas del ambiente donde viven. Los cambios de la temperatura, fotoperiodo y lluvias afectan la espermatogénesis determinando ciclos continuos o discontinuos; en el caso de las especies que habitan regiones tropicales, con climas húmedos y calor constante los ciclos son continuos o potencialmente continuos (Kumbar & Pancharatna 2001; Ferreira *et al.* 2008).

La falta de pigmentos en los testículos (parénquima y externamente), es una condición usual en los anuros (Duellman & Trueb 1986). Se han reportado algunos casos de testículos con pigmentos en el tejido conectivo del parénquima en *Physalaemus* (Oliveira *et al.* 2002). La forma del testículo es como lo anticipado en otros trabajos en anuros (Duellman & Trueb 1986). El tamaño de los testículos de *A. femoralis* se asemejan en tamaño (2,9 largo x 1,7 mm ancho) a los de

*Microphyla rubra* (Jerdon, 1854) colectados durante la época reproductiva en la India (Hiragond & Saidapur 2000).

En cuanto a la histología, no hay estudios hechos en las gónadas de dendrobatidos. Lo más cercano con lo que podemos comparar son los trabajos realizados en algunas especies de la familia Leptodactylidae (Díaz-Páez & Ortiz 2001, Oliveira *et al.* 2002), donde encontramos gran similitud.

Los anura que exhiben espermatogénesis continua presentan todos los tipos celulares en un mismo túbulo y se diferencian sincrónicamente (Oliveira *et al.* 2002). Se deduce a través de los cortes histológicos que *A. femoralis* tiene una reproducción continua; principalmente, por ser una especie del neotrópico (Oliveira *et al.* 2002). Sin embargo, faltaría realizar más muestreos con individuos en épocas reproductivas y no-reproductiva para poder confirmar si hay épocas definidas de mayor producción espermática.

Con respecto a la presencia de cistos germinales, éstos se han observado en todos los túbulos seminíferos observados. Estos se componen de una célula de Sertoli asociada a un grupo de células germinales que se encuentran casi en el mismo estado de diferenciación y pueden estar rodeadas de una membrana (Oliveira *et al.* 2002). La disposición de las células germinales en espermatocistos es una característica en los anfibios anuros, así como en los vertebrados anamniotas (Lofts cit. Oliveira *et al.* 2002).

Los espermatocistos de diferentes estados de desarrollo se presentaron en la mayoría de túbulos observados y no hubo ningún estado predominante de diferenciación celular en alguna área testicular. Esta observación es muy similar a la obtenida en otros trabajos con Leptodactylidae (Díaz-Páez & Ortiz 2001, Oliveira *et al.* 2002).

Las células del linaje espermatogénico presentan las mismas características que las

observadas en otros trabajos (Díaz-Páez & Ortiz 2001, Oliveira *et al.* 2002). Las espermatogonias eran notablemente más grandes que los espermatocitos y su posición era más cercana a la lámina basal. Fue difícil poder distinguir entre estadios de espermatogonia, con lo que no podemos determinar cual se observó con mayor frecuencia. Lo mismo ocurrió con los espermatocitos, que nos fue difícil distinguir entre estadios de espermatocito I y II, pero esto también pueda deberse a la brevedad del estadio espermatocito II que se ha reportado en otros trabajos con otros vertebrados. No obstante, quizás el contar con mayor número de láminas y especímenes pueda ayudar a afinar estas observaciones en nuestro objeto de estudio.

En el caso de las espermátides, se observaron algunos estadios de desarrollo. Los primeros estadios presentaban células redondeadas que se iban alargando a medida que maduraban. Estas células se agrupan en “atados” en estadios más avanzados que van asociados con las células de Sertoli. En otros trabajos en Leptodactylidae se han reportado cambios morfológicos de las células de Sertoli en relación al desarrollo de las células germinales (Oliveira *et al.* 2002). En nuestro trabajo no hemos notado estas diferencias, pero, como en el caso de los espermatocitos y espermatogonias, quizás con mayores observaciones se pueda afirmar este hecho en dendrobatidos.

Para lo visto en los espermatozoides, se hizo más énfasis en su disposición que en medidas morfométricas debido a la técnica utilizada. Muchos de los espermatozoides estaban cortados o la tinción utilizada no permitía ver bien las colas para poder medirlas. En todo caso, la disposición del esperma en el túbulo seminífero no varía en relación a lo descrito en otros trabajos. Los espermatozoides se agrupan en “atados” hasta alcanzar su madurez. Luego se separan de la célula de

Sertoli a la que estaban unidos y se liberan en el lumen del túbulo seminífero, donde esperan hasta ser transportados al conducto colector. En lo que refiere a su morfología, quizás alguna otra técnica como el frotis con muestra fresca permita ver con mayor detalle las características de la forma de la cabeza, cuello y cola. Lo que nos fue posible ver con nuestros cortes histológicos fue la característica forma alargada de la cabeza y cuello muy corto aparentemente común en todos los anfibios (Duellman & Trueb 1986, Díaz-Paez & Ortiz 2001, Oliveira *et al.* 2002). Los detalles en la morfología del espermatozoide pueden ser utilizados como caracteres en filogenias (Duellman & Trueb 1986) y pueden ayudar a determinar especies o grupos de especies.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chan, L. 2003. Seasonality, microhabitat and cryptic variation in tropical salamander reproductive cycles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 78:489-496.
- Chavadej, J.; Jerareungrattana, A.; Sretarugsa, P. & Pobhon, P. 2000. Structure and development of the testis of Bullfrog, *Rana catesbeiana*, and their changes during seasonal variation. *ScienceAsia*, 26: 69-80.
- Díaz-Páez, H. & Ortiz, J.C. 2001. The reproductive cycle of *Pleurodema thaul* (Anura, Leptodactylidae) in central Chile. *Amphibia-Reptilia*, 22:431-445.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Ferreira, A.; Mehanna, M. & Prado, C. 2008. Morphologic and Morphometric analysis of testis of *Pseudis Limellum* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae) during the reproductive cycle in the Pantanal, Brazil. *Biocell*, 32: 185-194.
- Frost, D.R. 2004. *Allobates femoralis*. *Amphibian Species of the World 3.0* online reference. The American Museum of Natural History (AMNH). Consultado el 08 noviembre 2011 En: <http://www.cites.org/common/com/NC/2006/E-NC2006-Fa-06.pdf>.
- Fouquet, A.; Gilles, A.; Vences, M.; Marty, C. & Blanc, M. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS one* 2(10): e1109.
- Hiragond, N.C. & Saidapur, S.K. 2000. The excurrent duct system of sperm transport in *Rana cyanophlyctis*, *Rana limnocharis*, *Polypedates maculatus*, *Microhyla rubra*, *Bufo melanostictus* and *Bufo fergusonii*. *Zoological Science*, 17: 453-458.
- Jörgensen, C.B. 1992. *Growth and reproduction*. In: *Environmental physiology of the amphibians*. Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Eds). Chicago, Illinois, Univ. Chicago Press, pp: 439-466.
- Kumbar, S.M. & Pancharatna, K. 2001. Determination of age, longevity and age at reproduction of the frog *Microhyla ornata* by Skeletochronology. *Journal of Bioscience*, 26: 265-270.
- Lipke, C. 2008. *Induced spermiation and sperm morphology in the green poison frog, Dendrobates auratus*. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree Doctor of Philosophy (PhD) at the University of Veterinary Medicine Hannover. 146 p.
- Lofts, B. 1974. *Reproduction*. In: *Physiology of Amphibia*, vol. II. Lofts, B. Ed., New York, Academic Press. p. 239-304.
- Manochantr, S.; Sretarugsa, P.; Wanichanon, C.; Chavadej, J. & Sobhon, P. 2003. Classification of spermatogenic cells in *Rana tigerina* based on ultrastructure. *ScienceAsia*, 29: 241-254.
- May, R.; Siu-Ting, K.; Jacobs, J.; Medina-Müller, M.; Gagliardi, G.; Rodriguez, L. & Donnelly, M. 2008. Species diversity and conservation status of amphibians in Madre de Dios, Southern Peru. *Herpetological Conservation and*

- Biology, 4:14-29.
- Ministerio de Transportes y Comunicaciones (MTC). 2009. *Plan Vial de la Provincia de Puerto Inca (Versión Final)*. Provias Rural. 135 p.
- Oliveira, C.; Zanetoni, C. & Zieri, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomía*, 20:263-268.
- Oliveira, C.; Santos, L.R.S. & Zieri, R. 2007. Anatomical variations in the male reproductive system of *Chaunus ornatus* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). *Biota Neotropica*, 7: 43-48.
- Pough, F.H.; Andrews, R.M.; Cadle, J.E.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H. & Wells, K.D. 2001. *Herpetology*. 2<sup>nd</sup> ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 726 p.
- Vences, M.; Kosuch, J.; Lötters, S.; Widmer, A.; Jungfer, K.; Köhler, J. & Veith, M. 2000. Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15: 34-40.
- Wake, M. & Dickie, R. 1998. Oviduct structure and function and reproductive modes in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, 282:477-506.

Fecha de recepción: 30 de agosto del 2011.  
Fecha de aceptación: 08 de noviembre del 2011.