

**Descripción morfológica e histológica del tracto reproductor masculino de *Caecilia thompsoni* Boulenger, 1902 (Amphibia: Gymnophiona)**

**Carlos Andrés Serrano Pérez**

**Proyecto de grado para optar al título de Biólogo**

**Directora**

**Martha Patricia Ramírez Pinilla**

**Ph. D. en Ciencias Biológicas con orientación en zoología**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Bucaramanga**

**2017**

### **Agradecimientos**

A mi familia, en especial a mi hijo, por darme la motivación que me permitió ser perseverante y trazar nuevos rumbos y metas para mi vida. A Margarita Navarro por acompañarme en momentos cruciales de mi carrera y su apoyo en la culminación de este proyecto. A Nathaly, y Heriberto por su amistad incondicional.

Al profesor Germán Patiño y a todos mis maestros por revelarme la magnitud del fenómeno universal de la vida y por inspirarme a hacer de mí una mejor persona. De manera especial a la Doctora Martha Patricia Ramírez Pinilla por la confianza que me brindó, su acompañamiento durante el desarrollo de este proyecto de investigación y por su constructiva y constante retroalimentación en mi ejercicio académico.

A Elson Meneses Pelayo, por su amable colaboración en el muestreo de campo y por contagiarme de su entusiasmo por la taxonomía de herpetos.

A Mark Wilkinson por sus recomendaciones en el análisis de los resultados de esta investigación. Al profesor Andrew Crawford por el préstamo de especímenes de la Universidad de los Andes.

## Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	9
1. Competencias de la pasantía de investigación: .....	11
2. Objetivos .....	12
2.1. Objetivo general .....	12
2.2. Objetivos específicos .....	12
3. Metodología .....	12
3.1. Recolección de muestras .....	12
4. Resultados .....	14
4.1. Morfología general: .....	15
4.1.1. Testículos .....	15
4.1.2. Riñones, conductos urogenitales y conductos de Müller .....	16
4.1.3. Cloaca. ....	17
4.2. Histología .....	18
4.2.1. Testículos .....	18
4.2.2. Riñones, conductos urogenitales y conductos de Müller .....	20
4.2.3. Cloaca. ....	21
4.2.4. Vejiga y musculo retractor cloacal. ....	22
5. Discusión .....	23

5.1. Testículos .....	23
5.2. Conductos urogenitales y de müller.....	27
5.3. Cloaca .....	30
6. Conclusiones.....	31
Referencias Bibliográficas .....	32

### **Lista de Apéndices**

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Figuras y Tablas.....	37

## Resumen

**TÍTULO:** DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA DEL TRACTO REPRODUCTOR MASCULINO DE *Caecilia thompsoni* Boulenger, 1902 (AMPHIBIA: GYMNOPTIONA)\*

**AUTOR:** CARLOS ANDRÉS SERRANO PÉREZ\*\*

**PALABRAS CLAVE:** CAECILIA THOMPSONI, GYMNOPTIONA, MADUREZ SEXUAL, HISTOLOGÍA

### DESCRIPCIÓN:

Se estudió la morfología del tracto reproductivo de machos de *Caecilia thompsoni* para determinar variaciones entre individuos de distintos tamaños corporales que indicaran el tamaño de madurez sexual y establecer comparativamente las características morfológicas del tracto con respecto a otras especies del orden Gymnophiona. Se determinó que el tamaño a la madurez sexual puede estimarse entre los 23cm y los 58cm de longitud rostro cloaca, dado el desarrollo completo de las células de la línea germinal dentro de los lóculos testiculares, la hipertrofia de la glándula de Müller y a la abundancia moderada de células de Leydig en el tejido intersticial. Una vez los individuos alcanzan la madurez sexual, las características morfológicas son bastante consistentes a nivel macroscópico e histológico entre machos de tamaños muy disímiles. Se evidenció una variación en el tamaño de los lóbulos testiculares mucho más amplia que la reportada en estudios comparativos en Gymnophiona, hallando lóbulos testiculares inmaduros en la etapa adulta. Se encontraron especializaciones cloacales como la presencia de músculo propulsor, senos venosos y sacos ciegos que diferencian claramente a *C. thompsoni* de otras especies del género. La organización de los epitelios luminales de los conductos Wolf y de Müller difiere de la de miembros de la familia Uraeotyphlidae y sugiere un rol secretor complementario entre los dos conductos. A pesar de estas diferencias, las características morfológicas generales, tanto macroscópicas como microscópicas, de los tractos reproductivos de machos adultos de *C. thompsoni* siguen el patrón conocido para los machos reproductivamente activos de Gymnophiona.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Directora Martha Patricia Ramírez Pinilla PhD.

**ABSTRACT**

**TITLE:** MORPHOLOGY AND HISTOLOGY OF THE MALE REPRODUCTIVE TRACT OF *Caecilia thompsoni* Boulenger, 1902 (AMPHIBIA:GYMNOPHIONA)\*

**AUTHOR:** CARLOS ANDRÉS SERRANO PÉREZ\*\*

**KEY WORDS:** CAECILIA THOMPSONI, GYMNOPHIONA, MADUREZ SEXUAL, HISTOLOGÍA

**DESCRIPTION:**

The morphology of the male reproductive tract of *Caecilia thompsoni* was studied to determine variations among individuals of different body sizes that indicate the sexual maturity size and to establish comparatively the morphological characteristics of the tract with respect to other species of the order Gymnophiona. It was determined that size at sexual maturity can be estimated between 23cm and 58cm of snout-cloacal length, given the complete development of the germinal cells within the testicular loci, Müller's gland hypertrophy, and moderate abundance of Leydig cells in the interstitial tissue. Once the individuals reach sexual maturity, the morphological characteristics are quite consistent at macroscopic and histological level among males of very different sizes. There was evidence of a great variation in the size of the testicular lobes than that reported in comparative studies in Gymnophiona, finding immature testicular lobes in the adult stage. Cloacal specializations were found, such as the presence of propulsor muscle, venous sinuses and blind sacks that clearly differentiate *C. thompsoni* from other species of the genus. The organization of the luminal epithelia of the Wolf and Müller ducts differs from that of members of the Uraeotyphlidae family and suggests a complementary secretory role between the two ducts. Despite these differences, the general morphological characteristics, both macroscopic and microscopic, of the reproductive tracts of adult males of *C. thompsoni* follow the pattern known for the reproductively active males of Gymnophiona.

---

\* Degree work

\*\* Science Faculty. School of Biology. Director Martha Patricia Ramírez Pinilla PhD.

## Introducción

Las cecilias (clase Amphibia, orden Gymnophiona) constituyen el grupo menos conocido de anfibios debido a que para muchas de ellas sus hábitos de vida son predominantemente fosoriales, lo cual dificulta su recolección y estudio. Por lo tanto, aspectos básicos de la biología de las cecilias son aún poco conocidos (Wilkinson et al., 2008) y la mayoría de estudios se han centrado en especies muestreadas con mayor frecuencia, entre las que se encuentran especies acuáticas como *Typhlonectes compressicauda* (Wake, 2006) o terrestres como *Gegeneophis ramaswamii*, la cual ha sido objeto de estudios poblacionales (Measey et al., 2004).

El estudio del orden Gymnophiona resulta interesante desde el punto de vista evolutivo, dado que sus caracteres moleculares lo ubican en la base de la historia evolutiva de los anfibios (Wake et al., 2009; Pyron et al., 2011; San Mauro et al., 2014) y debido a que poseen un conjunto de caracteres anatómicos y funcionales altamente especializados e infrecuentes entre los anfibios y otros tetrápodos (Wake, 1968; 1970 a, b; 1972): tentáculos cefálicos quimiorreceptores (Schmidt et al., 1990), fertilización interna con almacenamiento de esperma (Kuehnel, 2012), viviparismo u oviparismo (Gower, 2008), cloaca eversible copulatoria (Gower et al., 2002), diferenciación de los conductos de Müller en glándulas masculinas que facilitan el transporte de espermatozoides (George et al., 2005), matrotrofía embrionaria en especies vivíparas (Delsol et al., 1981; Wake, 2006) o cuidado parental de las crías en especies ovíparas con base en la alimentación a partir de la piel de la madre (dermatofagia) (Kupfer et al., 2006), entre otros. En la actualidad, aún es motivo de discusión la forma en que evolucionaron algunos de estos caracteres y su ancestralidad

(Exbrayat et al., 2006; San Mauro et al., 2014). Adicionalmente, ante la poca cantidad de caracteres diagnósticos externos, se ha sugerido la utilidad sistemática de la morfología interna del falodeo (Taylor, 1968; Wake, 1972), aunque ésta hipótesis aún se encuentra en discusión (Gower et al., 2002).

Por otra parte, sobre el tracto reproductor masculino y a nivel histológico testicular se han realizado estudios comparativos en donde se ha reportado la ocurrencia de un patrón quístico único de diferenciación de las células de la línea germinal (Wake, 1968; Akkanee et al., 2014), con presencia de cohortes gaméticas en distintos estados de maduración (Smita et al., 2004), células ameboides fagocíticas al interior de los quistes (Smita, et al., 2005), a diferencia del patrón reportado para otros anfibios. De manera similar, se ha sugerido estacionalidad en la composición relativa celular de la línea germinal (Smita et al., 2005; Measey et al., 2008) y de la glándula Mülleriana (George et al., 2004) para algunas especies.

*Caecilia thompsoni* (Boulenger, 1902), es una especie endémica de Colombia que se distribuye en la cuenca del río Magdalena (Lynch, 1999), y se encuentra entre las cecilias terrestres de mayor tamaño corporal, alcanzando hasta 176 centímetros de longitud (Arredondo, 2007). Se desconocen casi todos los aspectos de su historia de vida y en particular sobre su biología reproductiva como por ejemplo el tamaño a la madurez sexual y la morfología del tracto reproductivo y del órgano intromitente de los machos.

Por lo tanto, en la presente pasantía, se describirá por primera vez el tracto reproductivo masculino de machos de diferentes tamaños corporales de *C. thompsoni* y se realizarán comparaciones con los datos existentes para otras especies de Gymnophiona.

### **1. Competencias de la pasantía de investigación:**

1. Desarrollar trabajo de campo para la recolección de especies criptozoicas o subterráneas del orden Gymnophiona.
2. Identificar especies del orden Gymnophiona mediante el uso de claves taxonómicas.
3. Aplicar métodos para la eutanización, conservación e ingreso de especímenes a colecciones biológicas.
4. Realizar descripciones morfológicas por medio de la disección de especímenes de colección.
5. Analizar y describir microscópicamente tejidos animales mediante la implementación de protocolos de histotecnica básica (fijación, inclusión, corte y tinción).
6. Revisar bibliografía científica como base para iniciar y sustentar un proyecto de investigación.
7. Redactar un informe final para la comunicación de un trabajo de investigación.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Describir macroscópica y microscópicamente el tracto reproductor de machos de *Caecilia thompsoni*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar variaciones morfológicas en los tractos reproductivos de machos de diferentes tamaños corporales indicando el tamaño mínimo de madurez sexual encontrado.
- Comparar los resultados obtenidos con los descritos en la literatura existente para las demás especies de Gymnophiona.

## 3. Metodología

### 3.1. Recolección de muestras

Las cecilias a examinar se recolectaron en el municipio de San Vicente de Chucurí, (6°52'55"N, 73°24'43"O) y en el municipio de Betulia (6°54'00"N 73°17'01"O) Departamento de Santander,

Colombia. Se realizaron caminatas a lo largo de senderos de suelos húmedos o cercanos a fuentes de agua y se removió la capa superficial del suelo en busca de cecilias terrestres. Adicionalmente, se utilizaron especímenes de la Colección Herpetológica de la Universidad Industrial de Santander para aumentar el tamaño muestral. Los datos de recolección de todos los individuos se resumen en la Tabla 1 (Ver anexos).

### **3.2. Procesamiento y análisis de muestra**

Los individuos recolectados fueron fijados en formalina al 10% neutralizada con amortiguador de fosfatos de sodio, deshidratados en diluciones ascendentes de etanol (0%-30%-50%-70%) y finalmente depositados en la Colección Herpetológica de la Universidad Industrial de Santander (UIS-A-5378, UIS-A-5742, UIS-A-5753, UIS-A-5743). Una vez conservados los especímenes en etanol al 70%, se midió la longitud rostro-cloaca y se disecaron por medio de una incisión ventral en sentido longitudinal desde la cloaca hasta el tercio anterior del espécimen. Se tomaron datos de longitud, forma y disposición de los componentes del tracto reproductivo (lóbulos testiculares, conductos de Müller, conductos de Wolf, ductos espermáticos, urodeo y falodeo) y órganos asociados (riñones, tubo digestivo, peritoneo, músculos esqueléticos, vasos sanguíneos); se hicieron registros fotográficos de las estructuras macroscópicas con una cámara digital Nikon D300®. Posteriormente, se extrajeron tres lóbulos testiculares derechos, tres secciones del riñón derecho (anterior, medio y posterior) y dos secciones posteriores del tracto reproductivo (urodeo y falodeo), realizando cortes dentro del rango de 0,5 cm a 1 cm de longitud.

Los tejidos extraídos se deshidrataron en diluciones ascendentes de etanol-xilol e incluyeron en bloques de Paraplast (Leica Biosystems®) de acuerdo con el protocolo de Luna (1968). Se

efectuaron cortes histológicos seriados en un micrótopo rotativo Sakura Accu-Cut SRM® con un grosor de 7 µm, los cuales se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E), PAS-azul de Alcian (PAS-AB) y tinción tricrómica de Masson (TM), de acuerdo con los protocolos de Luna (1968). Los cortes fueron observados en un microscopio Nikon Eclipse 55i® y fotografiados con una cámara digital Canon EOS Rebel Xs integrada®.

Las mediciones, y características morfológicas e histológicas se compararon entre individuos, determinando variaciones morfológicas relacionadas con el estado de actividad y madurez reproductiva. Se determinó tamaño mínimo corporal de la madurez sexual y se compararon los resultados con trabajos previos para otras especies dentro del orden Gymnophiona.

Finalmente, para las disecciones, comparaciones morfológicas e identificación de estructuras se utilizó como marco de referencia las descripciones morfológicas realizadas por (Wake, 1970a, 1970b, 1972, 1994) y la identificación taxonómica se llevó a cabo siguiendo los criterios ofrecidos por (Lynch, 1999).

#### 4. Resultados

Producto del trabajo de recolecta en campo se obtuvieron cuatro individuos de los cuales solo uno de ellos (UIS-A-5378) fue identificado como macho de *Caecilia thompsoni* (LRC: 168 cm). Los especímenes restantes se identificaron como *Caecila* sp. por lo cual, no fueron utilizados para esta investigación. Con respecto a los ejemplares de museo, dado su estado de preservación, solo tres de cuatro machos catalogados como *C. thompsoni* fueron considerados para el análisis

histológico: UIS-A-5965 (LRC: 58,5 cm), UIS-A-5189 (LRC: 61 cm) y UIS-A-4937 (LRC: 21cm).

Con relación al tamaño mínimo de madurez sexual, se encontró que UIS-A-5965, UISA-5189 y UIS-A-5378 presentaban todas las características diagnósticas para un estado reproductivo activo: Glándula Mülleriana hipertrofiada, quistes meióticos en todos los estados de diferenciación dentro de los lóbulos testiculares, abundantes células de Leydig y quistes de espermatozoides en espermiación. Para UIS-A-4937, el individuo de menor tamaño, el desarrollo macroscópico gonadal era imperceptible y no fue posible identificar si las gónadas eran masculinas o femeninas por lo cual se determinó como un individuo claramente inmaduro.

A pesar de que en los tres individuos maduros se observaron algunas diferencias en las dimensiones absolutas a lo largo de del tracto reproductivo, diámetro y longitud, estas no van más allá de las esperadas durante el desarrollo continuo en anfibios. En referencia a las dimensiones relativas al tamaño del animal, se encontró que los sitios de inserción de los conductos urogenitales, la ubicación y longitud de la cadena testicular y conductos urogenitales, se conservan entre los individuos examinados.

#### **4.1. Morfología general:**

**4.1.1. Testículos.** Los testículos de *Caecilia thompsoni* se disponen de forma paralela en el tercio posterior del animal entre los cuerpos grasos y el tubo digestivo. Se encuentran segmentados en cadenas de lóbulos, formadas por un número medio de 9 lóbulos primarios de mayor tamaño y 9 lóbulos secundarios de menor tamaño (con una relación de tamaño de hasta 10:1), estos últimos ubicados principalmente hacia los extremos de los testículos. Se observó que

los lóbulos testiculares pueden estar compuestos de lóbulos primarios o secundarios parcialmente fusionados mediante mesotelio (Fig.1B, Fig. 8C). Para UIS-A-5378, el lóbulo más pequeño fue de 0,11 cm y el más grande de 1,74 cm.

Por otra parte, todas las secciones del testículo se hallan cohesionadas entre sí mediante conductos longitudinales adheridos a una capa de mesotelio que se extiende lateralmente hacia los cuerpos grasos y el tubo digestivo (Fig. 8 C); este a su vez, lleva sangre a los testículos desde la aorta dorsal por medio de vasos sanguíneos transversales (Fig. 8D). De manera similar, otro grupo de ductos transversales (ductos espermáticos), atraviesa esta membrana y conecta a los lóbulos en su parte media o apical con los conductos de Wolf. No se encontró evidencia de espermatozoides en los ductos espermáticos, en los ductos urogenitales o en los túbulos renales.

**4.1.2. Riñones, conductos urogenitales y conductos de Müller.** Los riñones se sitúan en la cara dorsal del tubo digestivo y se extienden desde la región posterior hepática hasta la región cloacal (Fig. 1B). La pareja de órganos presentan un tamaño similar y se encuentran unidos entre sí mediante mesotelio. Es esta misma membrana conectiva, la que mantiene a la aorta dorsal en contacto con los riñones, permitiendo así una abundante irrigación sanguínea. En UIS-A-5378, se observan claramente ductos espermáticos que comunican a los lóbulos testiculares con los riñones. En los individuos de colección, estos ductos no pudieron identificarse con certeza, quizás por el tamaño o estado de preservación de los individuos.

Hacia la cara ventrolateral externa de cada riñón se encuentran adheridos los conductos de Wolf (conductos urogenitales) y conductos de Müller (glándulas de Müller, Fig. 1C), los cuales presentan un ensanchamiento hacia la región caudal y una reducción progresiva de los conductos Müllerianos en su extremo anterior hasta hacerse indiferenciables del tejido conectivo renal (Fig.

5A-B, 9A-B). El par de conductos se encuentran cohesionados en toda su extensión hasta la región caudal, en donde se separan de cada riñón para formar un bucle que permite su inserción independiente en la región dorsal de la cloaca (Fig. 8B).

**4.1.3. Cloaca.** En la cloaca convergen las vías digestivas, excretoras y reproductivas. Éste órgano se halla delimitado anteriormente por la zona de inserción de los conductos urogenitales, de donde también derivan los lóbulos vesicales (anterior y posterior) y además se adhiere el músculo retractor cloacal (Fig. 1C).

Se halla típicamente dividida en dos regiones claramente diferenciables a nivel macroscópico: el urodeo, la sección más anterior contigua al tubo digestivo, y el falodeo, la sección más posterior, la cual presenta un ensanchamiento inmediato al urodeo y un adelgazamiento hacia el disco anal. Este último constituye el conducto de salida del material digestivo y urogenital, separado únicamente por un grueso anillo muscular del esfínter cloacal (Fig. 6).

Por otra parte, la estructura macroscópica interna del falodeo se encuentra tapizada por surcos longitudinales circunscritos a la región de mayor grosor y surcos transversales en su región posterior. En posición evertida (Fig. 8A), parte de la superficie luminal de la cloaca queda expuesta en la parte externa del órgano copulador, conservándose la morfología de los surcos, pero configurando un bulbo distal de mayor grosor, unido al disco anal mediante un delgado conducto de surcos transversales (Fig. 8A).

## 4.2. Histología

**4.2.1. Testículos.** Los lóbulos testiculares están segmentados internamente mediante paredes de tejido conectivo continuo con la pared externa del testículo, formando compartimientos (lóculos) (Fig. 2A). Cada lóculo está compuesto de quistes celulares de la línea germinal rodeados por el citoplasma eosinófilo de células de Sertoli. Los núcleos de las células de Sertoli se encuentran agrupados hacia la periferia locular (Fig. 2D) o en la parte central del lóculo acompañando el desarrollo de los quistes germinales (Fig. 2F). Los gametos en desarrollo se disponen en la periferia de cada quiste en torno un lumen central. El estadio de diferenciación para cada uno de estos grupos celulares es el mismo, sin embargo, dentro de un mismo lóculo se encuentran representados la mayoría, sino todas, las etapas de desarrollo de las células de la línea germinal (Fig. 2B).

Se identificaron seis tipos celulares de la línea germinal atendiendo a diferencias en cuanto al tamaño del núcleo, tamaño celular y estado de condensación del núcleo: espermátogonias, células individuales (primarias) o formando grupos (secundarias), con núcleos de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$  ubicadas hacia la periferia locular (Fig. 2D); espermátocitos primarios, de tamaño nuclear similar a las espermátogonias, proporcionalmente más grande con respecto al citoplasma y presencia de cromosomas condensados (Fig. 3C); espermátocitos secundarios, con una visible reducción de la relación citoplasma/núcleo y cromosomas condensados, se observan quistes de este tipo celular en menor cantidad (Fig. 3D); espermátides tempranas, las cuales presentan reducción del tamaño celular y nuclear, formando quistes de numerosas células redondeadas (Fig. 3D); espermátides tardías, con núcleo condensado y alargado (Fig. 3D); espermátocitos, células independientes de núcleos cortos, extremos acrosomales redondeados y largos flagelos

(Fig. 3B). De esta manera, se evidencia la ocurrencia activa de los procesos de espermatogénesis, espermiogénesis e inclusive, la espermiación en algunos de los quistes de espermatozoides, en la que ocurre el rompimiento del quiste hacia los ductulos espermáticos en el tejido intersticial (Fig. 4F).

En cuanto a las células no germinales, se pudieron identificar otros tipos celulares asociados al soporte de los procesos que ocurren dentro de los lóculos: células ameboides (Figs. 3A, 4C), de núcleos ovoides y citoplasma irregular, encontradas al interior de los lóculos desde las etapas de espermatocitos primarios hasta espermatozoides; células de Leydig (Figs. 3B y 2C), abundantes en los espacios interloculares, células endoteliales de los vasos sanguíneos (Fig. 4 B y E), células mioideas interloculares en el tejido conectivo interocular (4C) y células epiteliales de los ductulos espermáticos (conductos colectores). Este último epitelio, puede ser de tipo monoestratificado o pseudoestratificado compuesto de células grandes de núcleos redondeados y citoplasma claro y células de menor tamaño de forma irregular.

Por otro lado, al examinar si existía variación en la composición de las células de la línea germinal a lo largo de los diferentes lóbulos testiculares, se encontró que los lóbulos secundarios más anteriores y más posteriores de menor tamaño, se presentan como órganos sin diferenciación meiótica. Lo anterior atiende a la presencia un único tipo de célula germinal (espermatogonias) separadas de manera irregular por tejido conectivo y vasos sanguíneos. Tales lóbulos carecen de quistes con células germinales y células de Sertoli típicos de las secciones mediales del testículo (Fig. 3E-F). De esta manera, los lóbulos ubicados hacia los extremos testiculares muestran una apariencia inmadura, en comparación con los lóbulos centrales, en donde pueden evidenciarse todas las etapas del desarrollo meiótico, la espermiogénesis y la espermiación.

**4.2.2. Riñones, conductos urogenitales y conductos de Müller.** La apariencia histológica de los conductos de Wolf muestra que están formados por un epitelio pseudoestratificado ciliado (ocasionalmente columnar ciliado hacia la región anterior) y una densa matriz de tejido conectivo, dada la presencia de abundantes fibras de colágeno (Fig. 9A-C). El epitelio está compuesto de tres tipos celulares (*sensu* Møbjerg et al., 2004): células ciliadas principales (de mayor tamaño), células oscuras intercalares columnares (las menos numerosas) y células basales (dispersas en la parte basal entre las células principales y en contacto directo con la membrana basal del epitelio). Hacia la región más posterior del conducto, solo son visibles células principales. Los conductos de Wolf poseen en general, menor diámetro que los conductos de Müller, pero con un lumen más amplio, con evidencia de secreciones de mucopolisacáridos ácidos y polisacáridos neutros (PAS-AB+). En ninguno de los ejemplares se observaron espermatozoides lumbinales en estos conductos (Fig. 9D).

Los riñones no se modifican de forma importante desde su parte más anterior, a excepción de lo referente a sus dimensiones relativas y a su asociación con los conductos de Müller, los cuales se ven reducidos progresivamente a una capa de tejido conectivo en sentido craneal (Figs. 5A-B y 9A-B).

En todos los individuos examinados, la glándula de Müller presenta hipertrofia característica del estado reproductivo, con presencia de numerosas criptas tubulares [17-19] de secreción, y un reducido lumen central. Las criptas, están revestidas por un epitelio plegado, de carácter columnar pseudoestratificado ciliado hacia su parte interna y columnar simple ciliado hacia el lumen central de la glándula. Se identificaron dos tipos celulares en el epitelio de las criptas tubulares: células no ciliadas de núcleos basales, más delgadas en su superficie adluminal que en su superficie abluminal; células ciliadas, con núcleos cercanos al lumen, lugar en que la célula es

más ancha que en la región basal. En cuanto al tejido conectivo. Este epitelio es plegado y está soportado a nivel basal por tejido conjuntivo con abundante irrigación sanguínea en el que se observaron células ameboides dispersas principalmente hacia la región luminal central de sostén; el tejido conjuntivo es continuo con el revestimiento externo de la glándula (Fig.5D, 5F). El recorrido de las criptas glandulares es tortuoso, yendo desde la base de la glándula en la parte más externa del órgano, hasta el lumen central.

Se determinaron secreciones de polisacáridos neutros (PAS positivos) y mucopolisacáridos ácidos (AB positivos) al interior de las criptas de secreción; estos últimos principalmente, hacia la periferia de conducto de Müller (Fig.9 G-H).

**4.2.3. Cloaca.** Dada su continuidad con el tubo digestivo, el urodeo muestra un plegamiento similar al epitelio que reviste el lumen de dicho conducto, el cual está conformado por surcos (depresiones) y crestas tisulares longitudinales (Fig. 6). Esta sección cloacal, se extiende en sentido posterior, desde la abertura de los conductos urogenitales (Fig. 8B), hasta el inicio del falodeo, el cual está marcado por la aparición de sacos ciegos (Fig. 6E) pareados en la cara dorsal del urodeo y que se extienden en sentido craneal. Ambas secciones cloacales se prolongan en dirección caudal, formando un único conducto en la parte medial de la cloaca (Fig. G), la cual se va reduciendo en diámetro paulatinamente hasta alcanzar el esfínter cloacal (Fig. H-K).

Tanto el tubo digestivo como el urodeo, contienen células caliciformes, secretoras de mucopolisacáridos ácidos (PAS+, Fig. 9E-F). En el caso del urodeo, las células secretoras se agrupan principalmente en la región dorsal del urodeo anterior, siendo la parte dorsal ocupada por células ciliadas; en la región posterior del urodeo, el epitelio ciliado se reduce y pasa a ser ocupado por células caliciformes. Tales características histológicas se encuentran ausentes en el

falodeo, el cual, en contraposición, posee un epitelio simple columnar ciliado, soportado por abundante tejido conectivo con gran irrigación sanguínea y presencia de tejido muscular liso circular y longitudinal circundante. El tejido conectivo posee espacios intercelulares (senos venosos) en su parte anterior, tejido que progresivamente va siendo reemplazado por tejido muscular liso (músculos propulsores) y está altamente vascularizado hacia la parte medial-dorsal del falodeo (Fig. 7A-F). Ambos, senos venosos y musculatura propulsora, se reducen progresivamente, y se encuentran ausentes en la parte más posterior de la cloaca.

Por otra parte, el falodeo, en posición evertida, conforma el órgano intromitente, el cual expone las crestas de tejido muscular a manera de bulbo en su región más distal. Tal estructura, se encuentra unida al disco anal, mediante la sección más posterior del falodeo, cuyo epitelio se halla altamente plegado, presumiblemente para permitir su distensión y eversión completa (Fig. 6K). De manera similar, considerando la morfología interna de los sacos ciegos estos se encontrarían al interior de este bulbo distal del falodeo.

**4.2.4. Vejiga y musculo retractor cloacal.** Los lóbulos vesicales poseen un lumen circunscrito por un epitelio de transición, rodeado por tejido conectivo y abundante musculatura lisa longitudinal y transversal (Fig. 7G). Con respecto al músculo retractor, este se organiza en paquetes de fibras musculares (fascículos) de apariencia esquelética por su grado de organización (Fig. 7H).

## 5. Discusión

### 5.1. Testículos

Mediante el análisis histológico de tres de los especímenes utilizados para el presente estudio, se determinó que su tracto reproductivo corresponde al de organismos en actividad reproductiva, dado el desarrollo completo de las células de la línea germinal dentro de los lóculos testiculares, la hipertrofia de la glándula de Müller y a la abundancia moderada de células de Leydig en el tejido intersticial. Por lo tanto, los tres individuos eran individuos adultos y entonces el individuo más pequeño de estos (58,5 cm) ya ha alcanzado la madurez sexual. El cuarto espécimen (21 cm), fue considerado inmaduro dada la imposibilidad de detectar tejido gonadal o conductos evidentes a nivel macroscópico.

Se encontró que *Cecilia thompsoni* posee segmentación testicular en lóbulos de tamaño y forma variable, conductos urogenitales dispuestos paralelos a los riñones, y diversas especializaciones cloacales que corresponden, a rasgos generales, con observaciones realizadas para otras especies de Gymnophiona (Wake, 1968). No obstante, posee particularidades que permiten diferenciarla de especies dentro del género como *Caecilia ochrocephala*, la cual posee una alta reducción de la segmentación testicular (Wake, 1968). A nivel histológico, se describieron los tejidos que componen el tracto reproductivo masculino y estructuras asociadas (vejiga y músculo retractor cloacal) y el tipo de secreciones halladas en los conductos de Wolf,

conductos de Müller y la cloaca, lo cual permite inferir algunos aspectos funcionales asociados a la reproducción de *C. thompsoni*.

*Caecilia thompsoni* presenta el patrón típico de espermatogénesis quística común a todas las especies del orden Gymnophiona, lo cual es coherente a su vez con el proceso de espermatogénesis quística observado en los otros dos órdenes de anfibios (Pierantoni et al., 2002). Sin embargo, en referencia a la composición tisular de los lóbulos testiculares, se evidenció la presencia de células no germinales adicionales a las células de Sertoli al interior de los quistes meióticos, las cuales ya han sido reportadas para otras especies dentro del orden (Wake, 1968, 1977; Exbrayat, 1986; Smita et al., 2003, 2004, 2005). No obstante, ha existido discrepancia en cuanto a las descripciones del origen y papel de estas células. En *Ichthyophis glutinosus* fueron descritas como células germinales degeneradas (Sesachar, 1936, citado en Smita, et al., 2005); en *T. compressicauda*, como células de Sertoli que han penetrado en el lumen quístico para ser evacuadas en el proceso de espermiación (Exbrayat, 1986); en *Uraeotyphlus narayani*, como células ameboides con un origen independiente a las células de Sertoli (Smita et al., 2005), a partir de la proliferación celular de los ductos espermáticos. Los hallazgos del presente trabajo le dan soporte a la hipótesis de este último autor, considerando la presencia de tejido epitelial pseudo-estratificado en el epitelio de los ductos espermáticos cercanos a los lóbulos testiculares, los cuales se componen de dos tipos celulares: células grandes de núcleos redondeados y citoplasma claro y células de menor tamaño de forma irregular. Lo anterior es consistente con una proliferación celular responsable del origen de las células ameboides (Smita et al., 2005) a partir de las células amorfas de los ductos. Además, la íntima asociación de las células de Sertoli al desarrollo de las células de la línea germinal observado en *C. thompsoni*, y en otras especies como *Uraeotyphlus narayani* e *Ichthyophis tricolor* (Smita et

al., 2003), y la clara diferenciación del citoplasma de las primeras con respecto al de las células ameboides, no sustentan el carácter decidido asignado por Exbrayat a las células de Sertoli.

Estudios comparativos señalan que para Gymnophiona existen dos morfotipos en los cuales se pueden clasificar los gametos masculinos: I. Espermatozoides con cabeza, cuerpo y acrosoma largos con un extremo acrosomal redondeado; II. Espermatozoides con cabeza y cuerpo gruesos con un extremo acrosomal obtuso o en forma de bala ( Wake, 1994; Scheltinga et al., 2003). Wake describe una amplia variación de la morfología de los espermatozoides en Caeciliidae (familia acá definida por la clasificación de 5 familias de Hedges et al., 1993); sin embargo, a la luz de una nueva clasificación en 10 familias (San Mauro, et al., 2014a), tal variación queda reducida a solo dos géneros (*Caecilia* y *Oscacaecilia*), teniendo en cuenta que las especies en las familias Siphonopidae, Dermophiidae, Indotyphlidae y Herpelidae, anteriormente incluidas en Caeciliidae, ya no hacen parte de este taxón. En el presente estudio se encontró que *C. thompsoni* tiene un espermatozoide del morfotipo II al igual que la otra especie de Caeciliidae para la cual existe descripción morfológica de los espermatozoides (*Caecilia orientalis*) ( Wake, 1977).

A nivel de los ductos espermáticos la presencia de células claras en *Caecilia thompsoni*, es común en todas las especies de cecílicos para los cuales este rasgo ha sido estudiado (Sesachar, 1936, citado en Smita et al., 2005; Exbrayat, 1986; Smita et al., 2005), en cuanto a que son estas las que originan las espermatogonias de los lóculos testiculares una vez se da la espermiación. A nivel histológico, sus características son similares a las espermatogonias primarias identificadas en este trabajo.

Por otro lado, en el presente trabajo se encontró que *Caecilia thompsoni*, una especie situada en una rama intermedia en la filogenia Gymnophiona (Pyron et al., 2011; Wilkinson et al., 2011; San Mauro et al., 2014), posee un número medio de 9 lóbulos testiculares principales.

Considerando las relaciones filogenéticas de las especies de gimnofiones, se ha sugerido que existe una tendencia hacia la reducción del número de lóbulos testiculares, siendo más abundantes y uniformes en especies de la familia Rhinathrematidae, y menos abundantes, pero de tamaño más disímil en especies de las familias más derivadas como Dermophiidae (Wake, 1968). Tres especies de la familia Caecilidae fueron examinadas por Wake, reportando un rango de 6-10 lóbulos testiculares, lo que permite afirmar que los resultados de la presente investigación concuerdan con el número encontrado para otras especies de la familia. La aparente fusión de lóbulos testiculares que presenta *C. thompsoni* y otras especies de la familia Caecilidae, podría ser el mecanismo que subyace a la reducción del número de lóbulos testiculares. Lo anterior está soportado a nivel histológico, teniendo en cuenta que las paredes loculares son continuas con el tejido conectivo que rodea a cada lóbulo testicular.

Sin embargo, las observaciones realizadas en *C. thompsoni* ponen en duda la reducción de lóbulos si se tiene en cuenta la existencia de los lóbulos de menor tamaño descritos en el presente trabajo. Wake planteó esta hipótesis comparando testículos de 46 especies de cecilias pero no reporta un tamaño mínimo de lóbulos testiculares o la existencia de lóbulos más pequeños hacia los extremos del testículo. En consecuencia, la tendencia evolutiva arriba mencionada podría resultar artificiosa dado que podría estar basada sobre conteos parciales del número de lóbulos testiculares. Además, Wake reconoció que algunas especies vivíparas como *Gymnopsis multiplicata* y *Geotrypetes seraphini*, presentan fusión testicular en la transición hacia la madurez sexual (Wake, 1977), lo que podría indicar modificación ontogénica de esta característica. Una revisión de esta hipótesis a partir de esta nueva evidencia morfológica podría contribuir a probar que la reducción de la segmentación testicular es una tendencia evolutiva y/o producto de cambios ontogenéticos.

## 5.2. Conductos urogenitales y de müller

Se pudo establecer que tanto el conducto de Müller como el de Wolf de *Caecilia thompsoni* se comunican de manera independiente con la cloaca, condición que es similar a lo reportado para otras especies de diferentes familias de Gymnophiona como en *T. compressicauda* (Exbrayat, 1991), *Gymnopsis m. próxima*, *Bouengerula bouengeri* y *Uraeotyphlus. menoni* (Wake, 1970a). Esto contrasta con la descripción para *Uraeotyphlus narayani*, que presenta una fusión previa de los conductos de Müller y de Wolf en un ducto común, antes de la entrada en la cloaca (George et al., 2004). A nivel fisiológico, se ha sugerido que la unión de los dos conductos en un ducto común podría representar una ventaja adaptativa para la reproducción, dado que facilitaría la interacción temprana de los espermatozoides con los fluidos Müllerianos, favoreciendo así el soporte nutricional que estos le proporcionan durante el transcurso de la cópula (George et al., 2005).

En los conductos de Müller de *C. thompsoni* se presenta un aumento progresivo del grosor en sentido caudal, lo que permite clasificar esta glándula como una glándula de tipo 2 de la clasificación de Wake (1970), en contraste con las tipo 1, que muestran un aumento abrupto de grosor en su región posterior. A nivel histológico, *C. thompsoni* presenta un número de criptas glandulares mucho menor [17-19] que las reportadas para *U. narayani* [35-55] (George, et al., 2004), lo cual podría relacionarse con una hipertrofia más marcada de la glándula hacia la región posterior en esta última especie. De esta forma, una mayor cantidad de criptas, estaría representando a nivel macroscópico un mayor grosor de la glándula, cuando se compara con las glándulas de tipo 1. La hipertrofia glandular también podría estar relacionada con una mayor actividad reproductiva, considerando que en *Uraeotyphlus narayani*, el máximo tamaño de esta

glándula coincide con el pico reproductivo de esta especie durante la temporada de lluvias (Smita et al., 2004). Es posible que la morfología de las glándulas tipo 2 esté reflejando a nivel macroscópico la hipertrofia asociada al pico de actividad reproductiva pero también una mayor cantidad de criptas tubulares.

Por otra parte, el epitelio de superficie y el tejido conectivo de la glándula de Müller evidencian un aspecto muy similar al de *U. narayani*, en cuanto al tipo de células presentes en ambos tejidos y a su alta vascularización. Sin embargo, se evidencian ligeras diferencias en la distribución de estos tipos celulares a lo largo de la glándula de Müller. *Uraeotyphlus narayani* posee una glándula Mülleriana con un lumen central continuo con el lumen de las criptas tubulares; el epitelio que rodea a ambos tipos de lumen está tapizado uniformemente por dos tipos de células, secretoras de núcleo basal y ciliadas de núcleo apical (George et al., 2004). Se encontró que las secreciones glandulares eran PAS-AB+ tanto en las criptas como en el lumen central. En contraste, en *C. thompsoni*, el epitelio del lumen central, está aparentemente desprovisto de células secretoras, presentándose un tapiz ciliado más conspicuo que en las criptas tubulares. Al evaluar el carácter de las secreciones Müllerianas en *C. thompsoni*, la respuesta a tinción PAS-AB fue positiva para las criptas tubulares y negativa para el epitelio del lumen central, lo que podría corresponder con las diferencias en la composición celular de estos dos epitelios.

A pesar de esta ligera diferencia en distribución de las secreciones en la glándula de *C. thompsoni*, se observó que el tipo de secreción es similar a las de otras especies de Gymnophiona (Wake, 1981; George et al., 2005), en las que se muestra la presencia prominente de gránulos de secreción de tipo mucopolisacáridos ácidos y polisacáridos neutros. Tonutti (1931, citado por Wake, 1981), mencionó por primera vez que la glándula de Müller, podría ser un análogo

funcional a la glándula prostática. Esto se demostró en *U. narayani*, cuyas secreciones Müllerianas son ricas en proteínas que al parecer comparten homología con las producidas por la glándula prostática de mamíferos, lo cual corrobora la hipótesis de que estas aportan sustento nutricional a los espermatozoides permitiendo así, el mantenimiento de la motilidad espermática en su trayecto hacia la cloaca femenina (George et al., 2005). Con base en esta evidencia, podemos asumir que la glándula de Müller de *C. thompsoni* se ajusta al rol fisiológico de las secreciones Müllerianas de otras especies de Gymnophiona estudiadas.

La composición celular en los conductos de Wolf de *C. thompsoni* es similar a la reportada para los gimnofiones *Siphonops annulatus* (Wake, 1970a), *Typhlonectes compressicauda* (Sakai et al., 1986) y *Geotrypetes seraphini* (Møbjerg et al., 2004). En *C. thompsoni* este epitelio muestra secreciones de mucopolisacáridos ácidos y polisacáridos neutros lo cual sugiere una función complementaria con las secreciones de la glándula Mülleriana. Esta afirmación cobra relevancia, considerando que los espermatozoides de *C. thompsoni*, posiblemente poseen movilidad en los testículos desde que ocurre la espermiación, como fue demostrado en *Uraeotyphlus narayani* (George et al., 2005), por lo que necesitarían una fuente inmediata de nutrientes que soporte este desplazamiento activo. En consecuencia, las secreciones de los conductos de Wolf de *C. thompsoni*, podrían representar un soporte nutricional complementario al de las glándulas de Müller durante el tránsito de estas células hacia la cloaca. La presencia de células epiteliales ciliadas sugiere que los conductos de Wolf poseen además, un rol en el transporte de los espermatozoides y en el movimiento de sustancias de secreción hacia la cloaca (Akkaneet et al., 2014), considerando que este conducto, al menos en *C. thompsoni*, parece estar desprovisto de musculatura propia de movimientos peristálticos.

### 5.3. Cloaca

Se ha propuesto que la morfología del falodeo en *Gymnophiona* es una potencial fuente de caracteres que pueden enriquecer la sistemática de este grupo (San Mauro et al., 2014), incluso a nivel de especie (Taylor, 1968). Este órgano, puede estar provisto de tuberosidades musculares, sacos ciegos, surcos y pliegues con distinta composición tisular, que puede ser útil en la diferenciación de especies cuyos límites no son claros aún.

En este trabajo encontramos que *C. thompsoni*, posee sacos ciegos bien desarrollados que se proyectan en sentido anterior lo cual contrasta con lo encontrado para otras especies del mismo género: *C. tentaculata*, presencia de bulbos dorsales pareados; *C. pachynema* y *C. orientalis* ausencia de sacos ciegos (Wake, 1972); *C. inidstinctum* (Tonutti, 1931), con presencia de sacos ciegos. Sin embargo, estas diferencias podrían estar asociadas a la ontogenia de los individuos examinados (Gower et al., 2002), aspectos que no fueron tenidos en cuenta por Wake y Tonutti. Adicionalmente se ha demostrado que puede presentarse variación estacional en la composición histológica de *Typhlonectes compressicauda* tanto en machos como en hembras (Exbrayat, 1991) mas no a nivel macroscópico. En el presente trabajo, dos especímenes de más de un metro de longitud de diferencia (UISA5965 y UIS-A-5378) presentaron sacos ciegos claramente desarrollados, por lo cual, esta característica es consistente en machos adultos y podría ser utilizada como un carácter diagnóstico para esta y otras especies dentro del género. Sin embargo es necesario aclarar la variación ontogénica e intraespecífica que pueda tener este rasgo dentro de *Gymnophiona* con estudios que consideren un mayor número de individuos.

Atendiendo a la composición histológica del falodeo, se han sugerido diversos mecanismos de eversión, tales como la contracción del músculo propulsor (Tonutti, 1931), contracción de los

músculos de la pared corporal y la creación turgencia del tejido conectivo con presencia de senos venosos (Wake, 1972). Esta autora encontró que en *Gymnopsis multiplicata* la musculatura propulsora y senos venosos se encuentran aparentemente ausentes, por lo cual sugiere que el principal mecanismo de eversión es la contracción de la pared corporal. *C. thompsoni*, muestra a nivel histológico la evidencia de senos venosos conspicuos con abundante irrigación sanguínea y musculatura propulsora en las regiones mediales del falodeo, por lo que la eversión del falodeo puede ser el resultado de la interacción de estos tres tipos de mecanismos. Sin embargo, el que los músculos propulsores no se anclen al disco anal en esta especie, parece ser consistente con un rol de menor importancia que el sugerido por Tonutti (1931),

Con respecto al músculo retractor cloacal, su inserción desde la pared corporal ventral hasta el inicio de la cloaca, corresponde al patrón típico encontrado para todos los gimnofiones (Taylor, 1968). En este trabajo, se observó que la organización de las fibras musculares es similar a la del tejido esquelético, lo cual sugiere que su contracción es de tipo voluntaria.

## 6. Conclusiones

El tamaño mínimo de la madurez sexual de *Caecilia thompsoni* se estima entre los 21cm y los 58cm de longitud rostro cloaca. Una vez alcanzada la madurez sexual, las características morfológicas durante la etapa reproductiva son bastante consistentes entre machos de distintos tamaños, a nivel macroscópico e histológico.

El tracto reproductivo de *Caecilia thompsoni*, posee características histomorfológicas muy similares a otras especies de Gymnophiona, con ligeras variaciones moderadas a nivel cloacal con respecto a otras especies de *Caecilia*.

### Referencias Bibliográficas

- Akkanee, P., Pramote, C., Itsares, M., & Kannika, C. (2014). Histomorphological studies of the testis and male genital ducts of Supachai ' s caecilian , *Ichthyophis supachaii* Taylor , 1960 (Amphibia: Gymnophiona). *Acta Zoologica*, 0, 1–14.
- Arredondo, J. (2007). *Caecilia thompsoni* (Thompson's caecilia). *Herpetological Review*, 38(4), 444–445.
- Boulenger, G. A. (1902). XIX. Descriptions of two new South-American Apodal Batrachians. *Journal of Natural History*, 10(56), 152–153.
- Exbrayat, J. M. (1986). Le testicule de *Typhlonectes compressicaudus*; structure, ultrastructure, croissance et cycle de reproduction. *Mém. Soc. Zool. Fr*, 43, 121–132.
- Exbrayat, J. M., & Estabel, J. (2006). Anatomy with particular reference to the reproductive system. In J. M. Exbrayat (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians)* (pp. 79–155). Enfield: Science Publishers Incorporated.
- Exbrayat, J.-M. (1991). Anatomie du cloaque chez quelques Gymnophiones. *Bull Soc Herp Fr*, 58, 31–43.
- George, J. M., Smita, M., Kadalmani, B., Girija, R., Oommen, O. V., & Akbarsha, M. A. (2004). Secretory and basal cells of the epithelium of the tubular glands in the male Mullerian gland of the caecilian *Uraeotyphlus narayani* (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of Morphology*, 262, 760–769.
- George, J. M., Smita, M., Kadalmani, B., Girija, R., Oommen, O. V., & Akbarsha, M. A. (2005). Contribution of the secretory material of caecilian (Amphibia: Gymnophiona) male Mullerian gland to motility of sperm: A study in *Uraeotyphlus narayani*. *Journal of Morphology*, 263, 227–237.

- George, J. M., Smita, M., Oommen, O. V., & Akbarsha, M. A. (2004). Histology and Ultrastructure of Male Mullerian Gland of *Uraeotyphlus narayani* (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of Morphology*, 260, 33–56.
- Gower, D. J., Giri, V., Dharne, M. S., & Shouche, Y. S. (2008). Frequency of independent origins of viviparity among caecilians (Gymnophiona): evidence from the first “live-bearing” Asian amphibian. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(5), 1220–1226.
- Gower, D. J., & Wilkinson, M. (2002). Phallus morphology in caecilians (Amphibia, Gymnophiona) and its systematic utility. *Bulletin of Natural History Museum*, 68(2), 143–154.
- Hedges, S. B., Nussbaum, R. A., & Maxson, L. R. (1993). Caecilian Phylogeny And Biogeography Inferred From Mitochondrial Dna Sequences Of The 12s Rrna And 16s Rrna Genes (Amphibia: Gymnophiona). *Herpetological Monographs*, 7, 64–76.
- Kuehnel, S., & Kupfer, A. (2012). Sperm storage in caecilian amphibians. *Frontiers in Zoology*, 9(12), 1–5.
- Kupfer, A., Müller, H., Antoniazzi, M. M., Jared, C., Greven, H., Nussbaum, R. A., & Wilkinson, M. (2006). Parental investment by skin feeding in a caecilian amphibian. *Nature*, 440(7086), 926–929.
- Lynch, J. (1999). Una aproximación a las culebras ciegas de Colombia (Amphibia: Gymnophiona). *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias*, 23, 317–337.
- Measey, G. J., Gower, D. J., Oommen, O. V., & Wilkinson, M. (2004). A mark–recapture study of the caecilian amphibian *Gegeneophis ramaswamii* (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae) in southern India. *Journal of Zoology*, 261(2), 129–133.
- Measey, G. J., Smita, M., Beyo, R. S., & Oommen, O. V. (2008). Year-round spermatogenic activity in an oviparous subterranean caecilian, *Boulengerula taitanus* Loveridge 1935 (Amphibia Gymnophiona Caeciliidae). *Tropical Zoology*, 21(1), 109–122. Retrieved from
- Møbjerg, N., Jespersen, Å., & Wilkinson, M. (2004). Morphology of the kidney in the West African caecilian, *Geotrypetes seraphini* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae). *Journal of Morphology*, 262(2), 583–607.

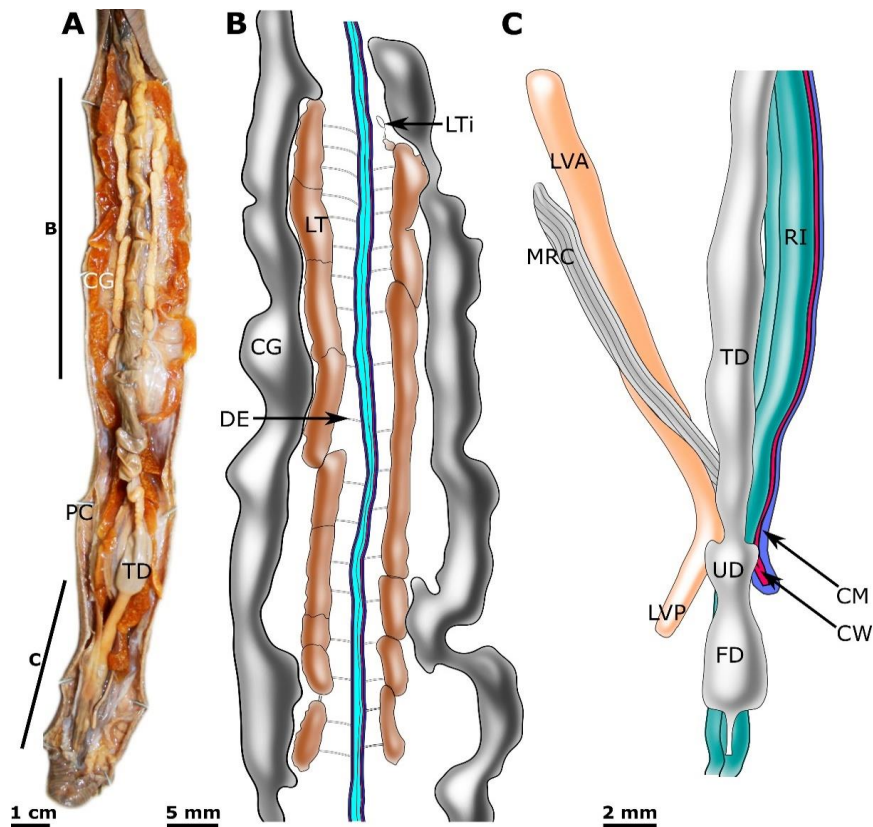
- Pierantoni, R., Cobellis, G., Meccariello, R., Palmiero, C., Fienga, G., Minucci, S., & Fasano, S. (2002). The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1), 131–139.
- Pyron, A. R., & Wiens, J. J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 543–583.
- Pyron, A., & Wiens, J. J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 543–583.
- Sakai, T., Billo, R., & Kriz, W. (1986). The structural organization of the kidney of *Typhlonectes compressicaudus* (Amphibia, Gymnophiona). *Anatomy and Embryology*, 174(2), 243–252.
- San Mauro, D., Gower, D. J., Müller, H., Loader, S. P., Zardoya, R., Nussbaum, R. A., & Wilkinson, M. (2014b). Life-history evolution and mitogenomic phylogeny of caecilian amphibians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 73(1), 177–189.
- Scheltinga, D. M., Wilkinson, M., Jamieson, B. G. M., & Oommen, O. V. (2003). Ultrastructure of the Mature Spermatozoa of Caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of Morphology*, 258(2), 179–192.
- Schmidt, A., & Wake, M. H. (1990). Olfactory and vomeronasal systems of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of Morphology*, 205(3), 255–268.
- Smita, M., Beyo, R. S., George, J. M., Akbarsha, M. A., & Oommen, O. V. (2005). Seasonal variation in spermatogenic and androgenic activities in a caecilian testis (*Ichthyophis tricolor*). *Journal of Zoology*, 267, 45–53.
- Smita, M., Jancy, M. G., Akbarsha, M. A., & Oommen, O. V. (2005). Ameboid Cells in Spermatogenic Cysts of Caecilian Testis. *Journal of Morphology*, 263, 340–355.
- Smita, M., Oommen, O. V., George, J. M., & Akbarsha, M. A. (2003). Sertoli Cells in the Testis of Caecilians, *Ichthyophis tricolor* and *Uraeotyphlus cf. narayani* (Amphibia: Gymnophiona): Light and Electron Microscopic Perspective. *Journal of Morphology*, 258, 317–326.

- Smita, M., Oommen, O. V, Jancy, M. G., & Akbarsha, M. A. (2004). Stages in Spermatogenesis of Two Species of Caecilians , *Ichthyophis tricolor* and *Uraeotyphlus cf . narayani* (Amphibia: Gymnophiona): Light and Electron Microscopic Study. *Journal of Morphology*, 261, 92–104.
- Taylor, E. H. (1968). *Caecilians of the world*, University of Kansas Press.
- Tonutti, E. (1931). Beitrag zur Kenntnis der Gymnophionen. XIX. Kopulationsorgane bei weiteren Gymnophionenarten. *Morphologisch Jarbucher*, 72.
- Wake, M. H. (1968). Evolutionary Morphology of the Caecilian Urogenital System: I. The Gonads and the Fat Bodies. *Journal of Morphology*, 126, 291–332.
- Wake, M. H. (1970a). Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. II. The kidneys and urogenital ducts. *Acta Anatomica*, 75, 321–358.
- Wake, M. H. (1970b). Evolutionary Morphology of the Caecilian Urogenital System . Part III . The Bladder. *Herpetologica*, 26(1), 120–128.
- Wake, M. H. (1972). Evolutionary Morphology of the Caecilian Urogenital System. IV. The Cloaca. *Journal of Morphology*, 136, 353–366.
- Wake, M. H. (1977). The Reproductive Biology of Caecilians: An Evolutionary Perspective. In *The Reproductive Biology of Amphibians* (pp. 73–101).
- Wake, M. H. (1981). Structure and function of the male Mullerian gland in caecilians, with comments on its evolutionary significance. *Journal of Herpetology*, 15(1), 17–22.
- Wake, M. H. (1981). Structure and Function of the Male Mullerian Gland in Caecilians , with Comments on Its Evolutionary Significance. *Journal of Herpetology*, 15(1), 17–22.
- Wake, M. H. (1994). Comparative Morphology of Caecilian Sperm (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of Morphology*, 221, 261–276.
- Wake, M. H. (2006). A Brief history of research on Gymnophionan reproductive biology and

- development. In J. M. Exbrayat (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians)* (pp. 1–38)., Enfield: Science Publishers Incorporated.
- Wake, M. H., & Zhang, P. (2009). A mitogenomic perspective on the phylogeny and biogeography of living caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 479–491.
- Wilkinson, M., Kupfer, A., Marques-Porto, R., Jeffkins, H., Antoniazzi, M. M., & Jared, C. (2008). One hundred million years of skin feeding? Extended parental care in a Neotropical caecilian (Amphibia: Gymnophiona). *Biology Letters*, 4(4), 358–361.
- Wilkinson, M., Mauro, D. S., Sherratt, E., & Gower, D. J. (2011). A nine-family classification of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Zootaxa*, (2874), 41–64.

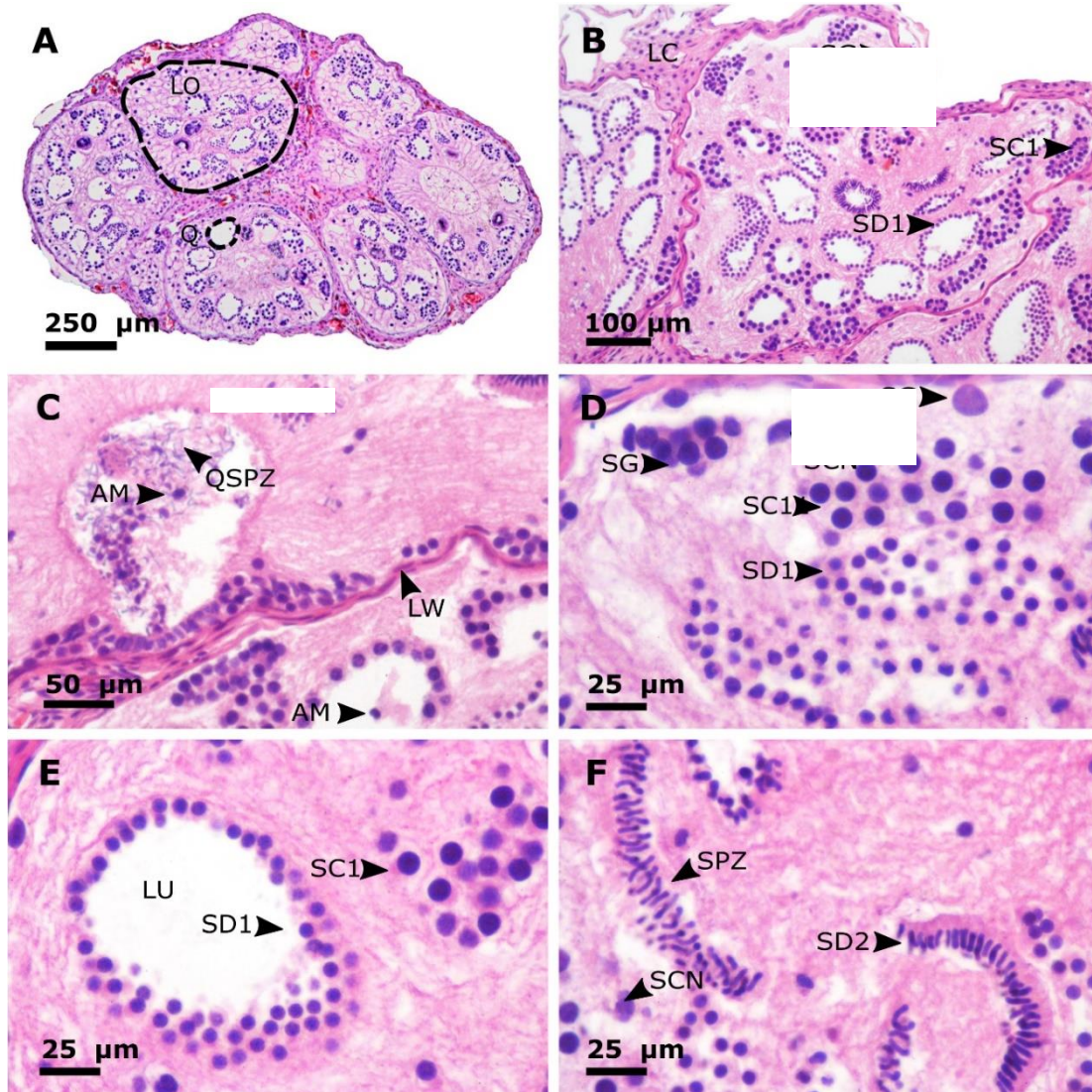
## Apéndices

## Apéndice A. Figuras y Tablas

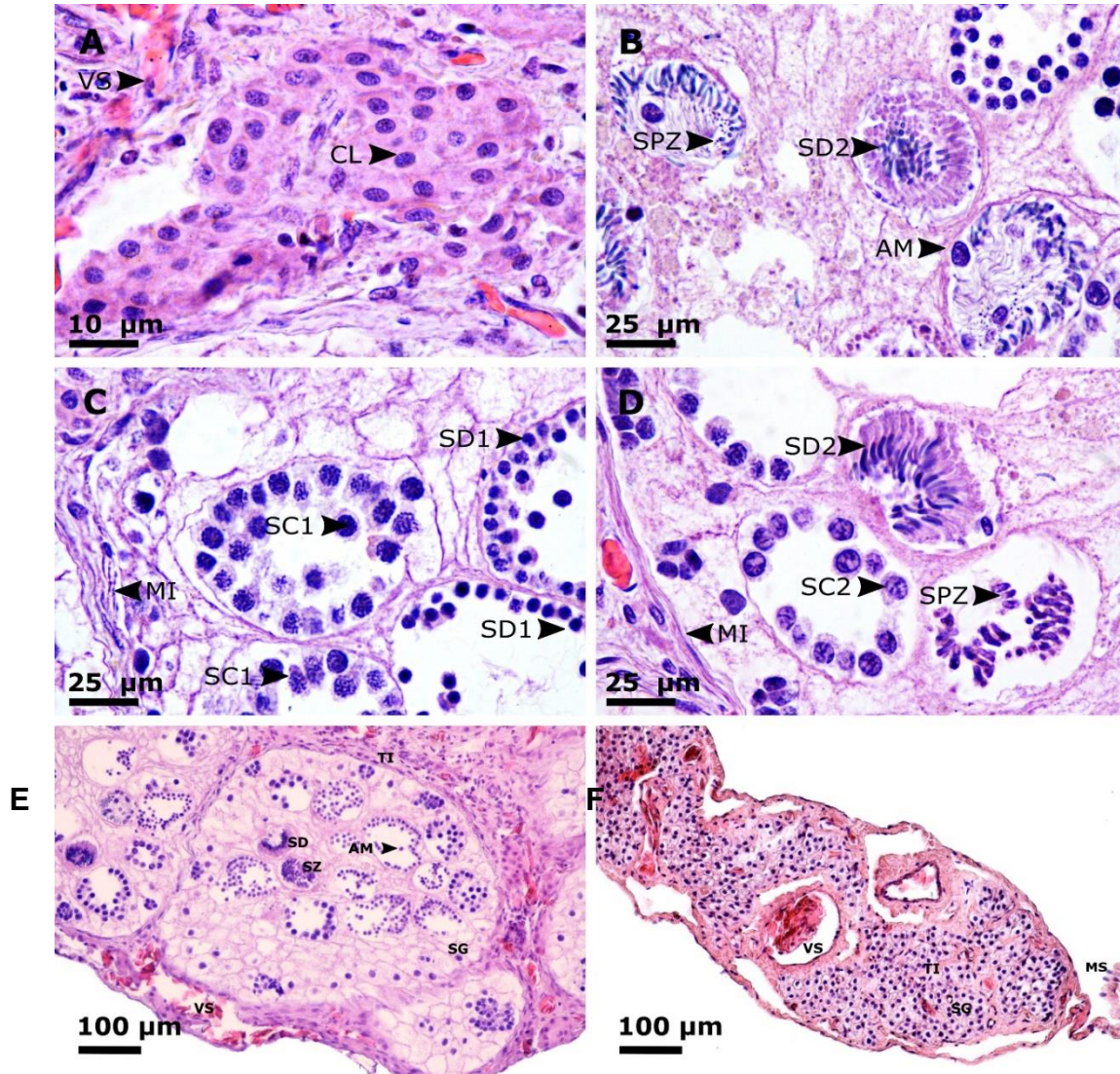
Figura 1. Vista general del tracto reproductivo de *C. thompsoni*:

**Fig. 1.** Vista general del tracto reproductivo de *C. thompsoni*: (UISA5965). **A.** Vista de la cavidad corporal. Se observa la disposición paralela de los cuerpos grasos (CG), lóbulos testiculares (LT), el tubo digestivo (TD) al interior de la pared corporal (PC) **B.** Vista general del tracto reproductivo en el celoma. Se observa la disposición paralela de los cuerpos grasos (CG), lóbulos testiculares (LT), lóbulos testiculares inmaduros (Lti) y ductos espermáticos (DE). El tubo digestivo no se muestra para poder visualizar el tracto reproductivo. **C.** Detalle de la morfología general de la cloaca y de estructuras asociadas. Se muestra la disposición paralela de los conductos de Müller (CM) y conductos de Wolf (CW), adheridos a la cara dorsolateral de los riñones (RI), el tubo digestivo (TD), urodeo (UD), faldeo (FD), lóbulos vesicales anterior (LVA) y posterior (LVP). Asimismo, se observan los lugares de inserción del músculo retractor cloacal (MRC).

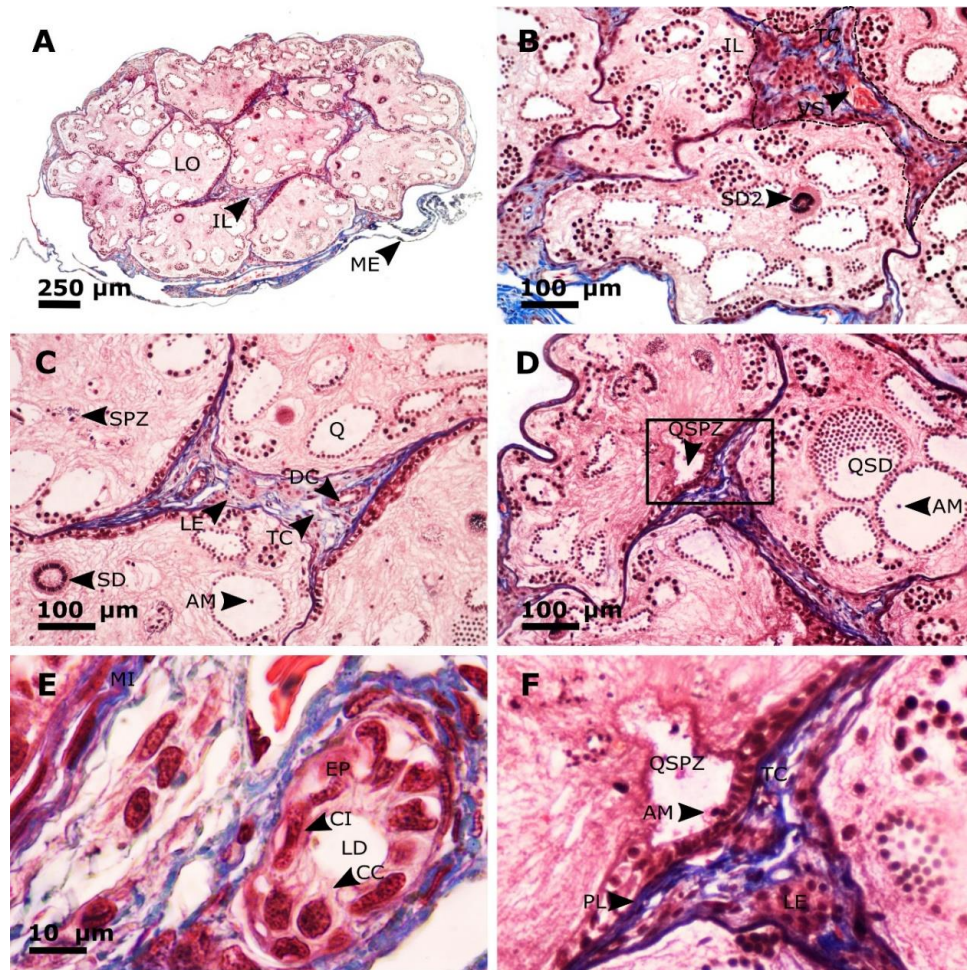
**Figura 2. Detalle de lóbulos testiculares de la región media del testículo de *C. thompsoni*:**



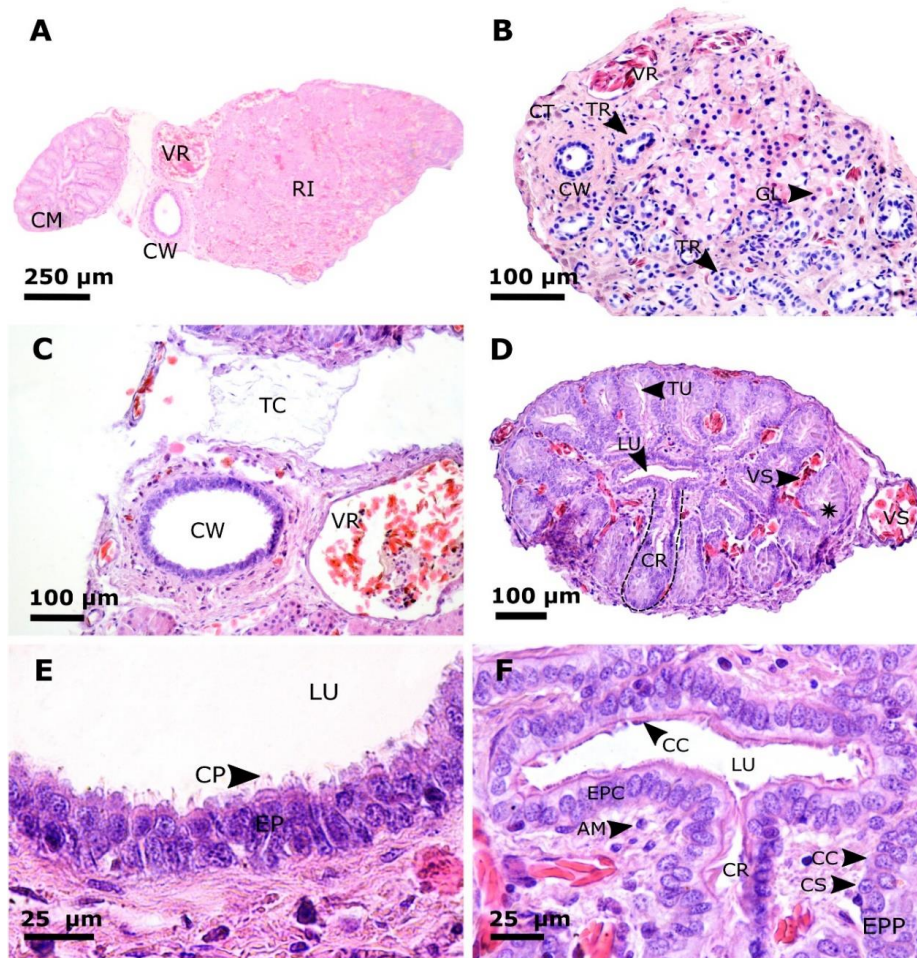
**Fig. 2.** Detalle de lóbulos testiculares de la región media del testículo de *C. thompsoni*: **A:**Sección transversal de lóbulo testicular de la región media del testículo de *C. thompsoni*. Lóculos (LO) con presencia de quistes (Q) en todos los estados de diferenciación. **B:**Detalle de lóbulo con quistes de espermatocitos primarios (SC1), espermatídes (SD1) primarias, espermatogonias (SG) y células de Leydig. **C:** Porción de lóbulo mostrando quiste de espermatozoides (QSPZ) en espermiación, célula amebode (AM) y la pared locular (LW). La separación de las células tras la diferenciación indica que son espermatozoides **D:** Porción de lóbulo mostrando quistes y núcleo de célula de Sertoli (SCN). **E:** Porción de lóbulo con quistes germinales. Es visible el lúmen del quiste (LU) de las células germinales. **F:** Porción del testículo con presencia de quistes de espermatozoides y espermatídes secundarias (SD2). Figs. 2A-F, **H&E**.

**Figura 3. Tipos celulares presentes en el testículo de *C. thompsoni*.**

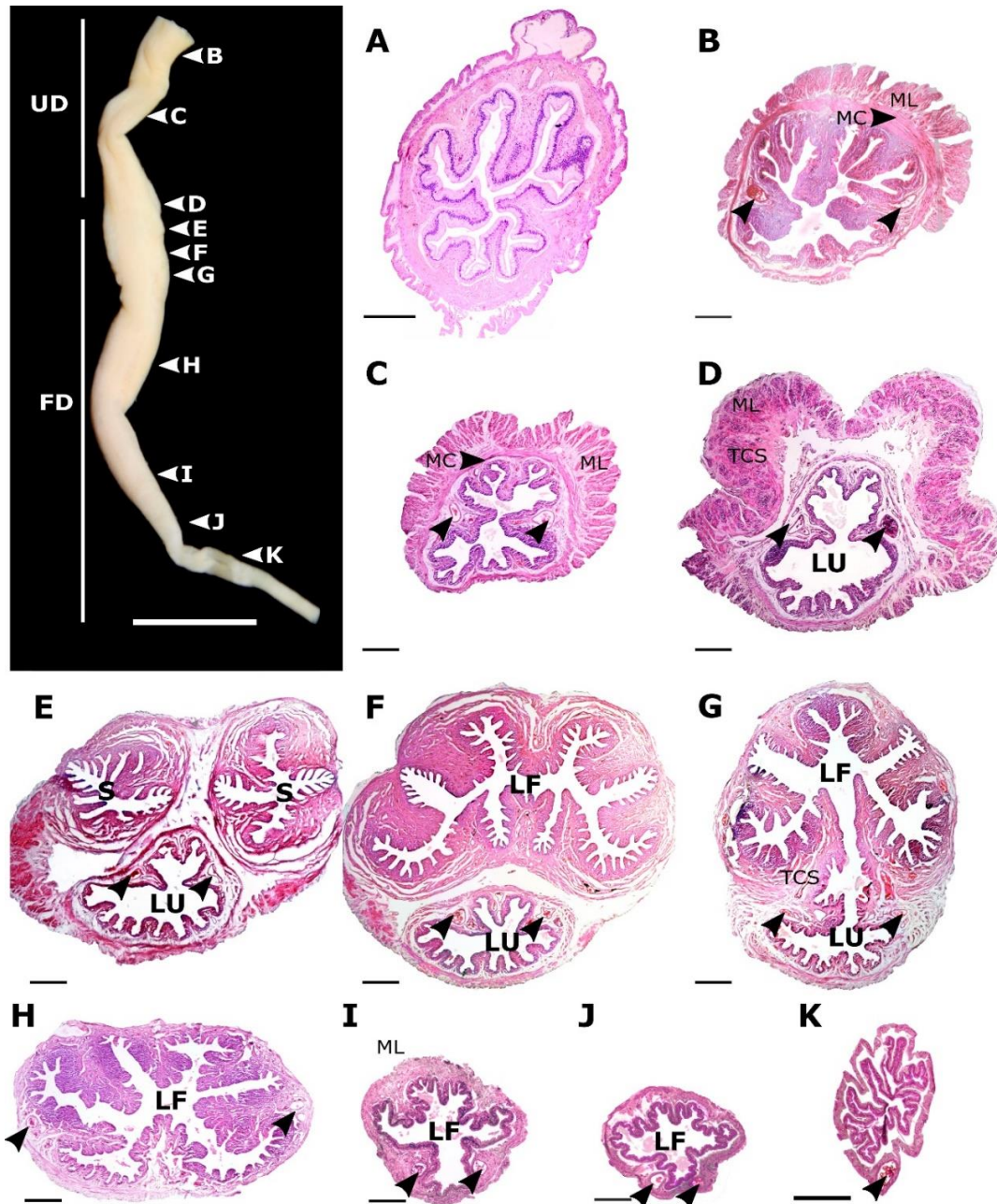
**Fig. 3.** Tipos celulares presentes en el testículo de *C. thompsoni*. **A:** Sección del espacio interlobulillar (intersticial). Células de Leydig (CL) vasos sanguíneos (VS). **B:** Sección de lóculo. Son visibles distintos estados de diferenciación de los quistes germinales: espermátides tardías (SD2) y espermatozoides (SPZ). También se observan células ameboides (AM) al interior de los quistes. **C:** Quistes de espermatocitos primarios (SC1) y espermátides tempranas (SD1). Los cromosomas condensados al interior del núcleo son evidentes. **D:** Quistes con espermátides tardías (SD2), espermatocitos secundarios (SC2) y espermatozoides (SPZ). En las paredes loculares se observan células mioideas (MI). **E:** Detalle de lóculo de un lóbulo primario. **F:** Detalle de lóculo de un lóbulo secundario (inmaduro), compuesto de espermatogonias (SG), tejido conectivo (TC), vasos sanguíneos (VS). El lóbulo está rodeado de mesotelio (ME). Figs. A-F, H&E.

**Figura 4. Tipos de tejidos presentes en el testículo de *C. thompsoni***

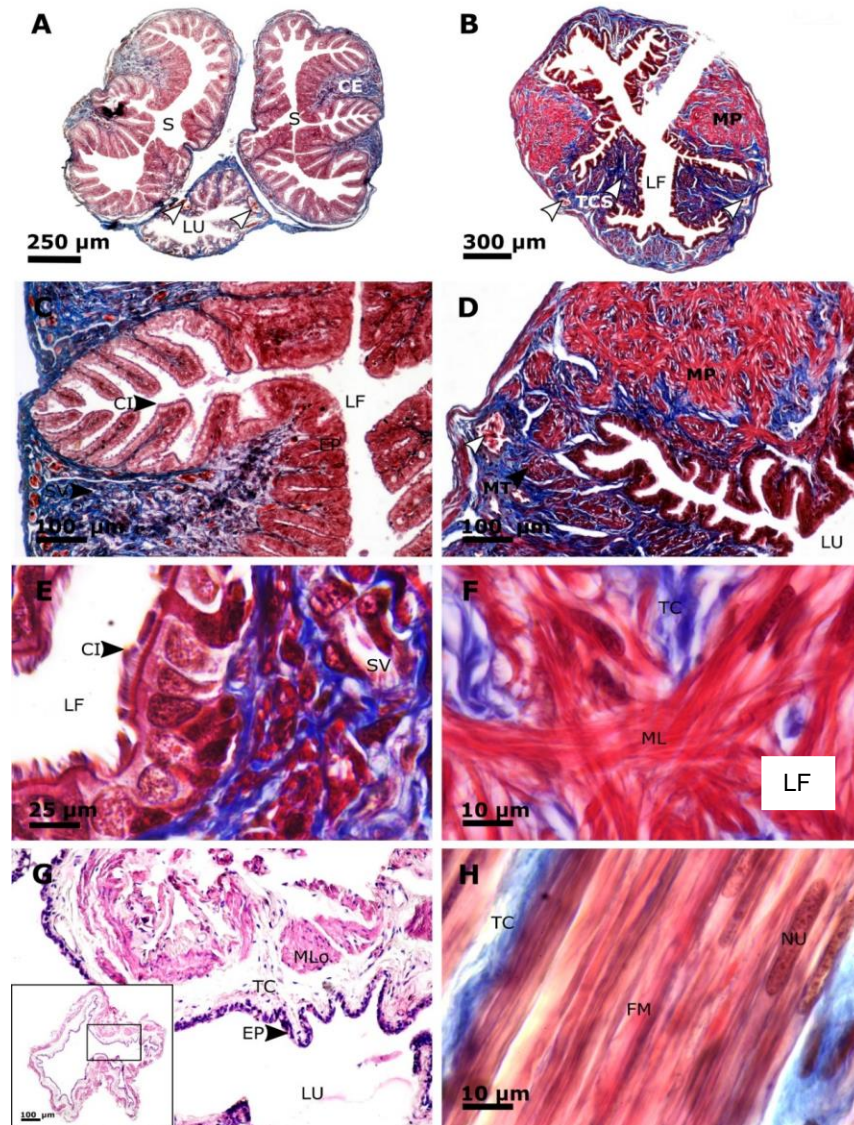
**Fig. 4.** Tipos de tejidos presentes en el testículo de *C. thompsoni*. Las figuras de colágeno están marcadas en azul, lo cual es indicador de la presencia de tejido conectivo. **A:** Sección transversal de lóbulo testicular. Se observan lóculos (LO), rodeados de tejido intersticial (IL), y mesotelio (ME) en la parte más externa del testículo. **B:** Detalle de lóbulo. Se muestra el tejido interloquular (líneas punteadas), vasos sanguíneos (VS) y tejido conectivo (TC). Al interior de los lóculos se observan quistes de espermatides con un típico arreglo circular. **C:** Tejido interloquular con presencia de ductos espermatídicos (DC), células de Leydig (LE), tejido conectivo (TC). En los lóculos se observan quistes (Q) de espermatides (SD), espermatozoides (SPZ), algunos con células ameboides. **D:** Lóbulo con quiste en espermiación (QSPZ). Quiste de espermatides (QSD) y célula ameboides (AM). **E:** Detalle de figura C. Se muestra el epitelio pseudoestratificado del ducto espermatídico (EP), con dos tipos distintivos de células: células claras (CC) y células irregulares (CI) las cuales darán origen a espermatogonias y espermatozoides respectivamente. **F:** Detalle de figura D. Se muestra un quiste en espermiación (QSPZ) abriéndose hacia la pared locular (PL) para liberar los espermatozoides y una célula ameboides (AM). En espacio intersticial se muestra tejido conectivo (TC) y células de Leydig (LE). Se observa la pared locular (PL). Figs. 4A–F, **Tricrómica de Masson.**

**Figura 5. Estructura de los conductos de Müller y Wolf de *C. thompsoni***

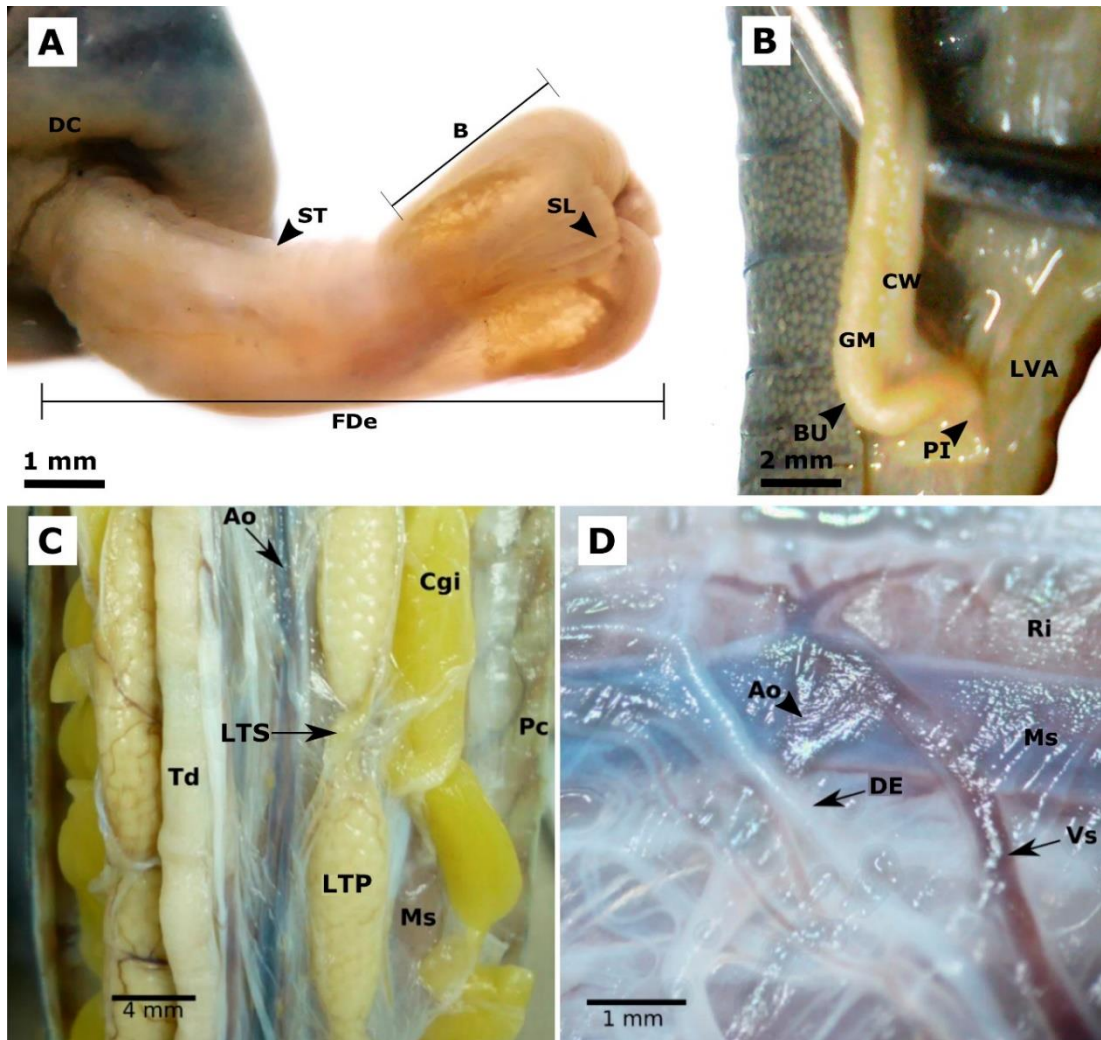
**Fig. 5.** Estructura de la glándula de Müller y conductos de Wolf de *C. thompsoni*. **A:** Corte transversal de sección medial del riñón (RI) conductos de Wolf (CW), conductos de Müller (CM) y vaso sanguíneo (VS). **B:** Corte transversal de la sección más anterior del riñón. Se pueden visualizar los túbulos renales (TR), conductos de Wolf (CW), la vena renal (VR), el tejido conectivo que forma parte de CW y los glomérulos renales. Los conductos de Müller se encuentran ausentes en esta región anterior del riñón. **C:** Unión CW-CM. Se observa el tejido conectivo laxo que mantiene unidos a ambos ductos. **D:** Sección posterior de la glándula de Müller. Son visibles las criptas glandulares tubulares (CR, líneas punteadas), y el recorrido tortuoso que deben recorrer hasta el lumen central (LU) de la glándula (asterisco). Abundante irrigación atraviesa tejido conectivo con amplios espacios intercelulares entre las criptas. **E:** Detalle de conductos de Wolf. Se muestra el epitelio ciliado (EP), células principales con cilios (CP) y el tejido conectivo (TC) que forma al conducto de Wolf. **F:** Detalle del lumen central de la glándula de Müller. Se muestra el epitelio ciliado del lumen central (LU) tapizado por células ciliadas. El epitelio pseudoestratificado columnar ciliado que rodea al lumen de las criptas (EPP) muestra claramente dos tipos de células: células secretoras (CS) de núcleos basales y células ciliadas de núcleos apicales (CC) Dispersas en el tejido conectivo se muestran células ameboides (AM). Figs. A-F. **H&E.**

Figura 6. Morfología interna de la cloaca de *C. thompsoni*

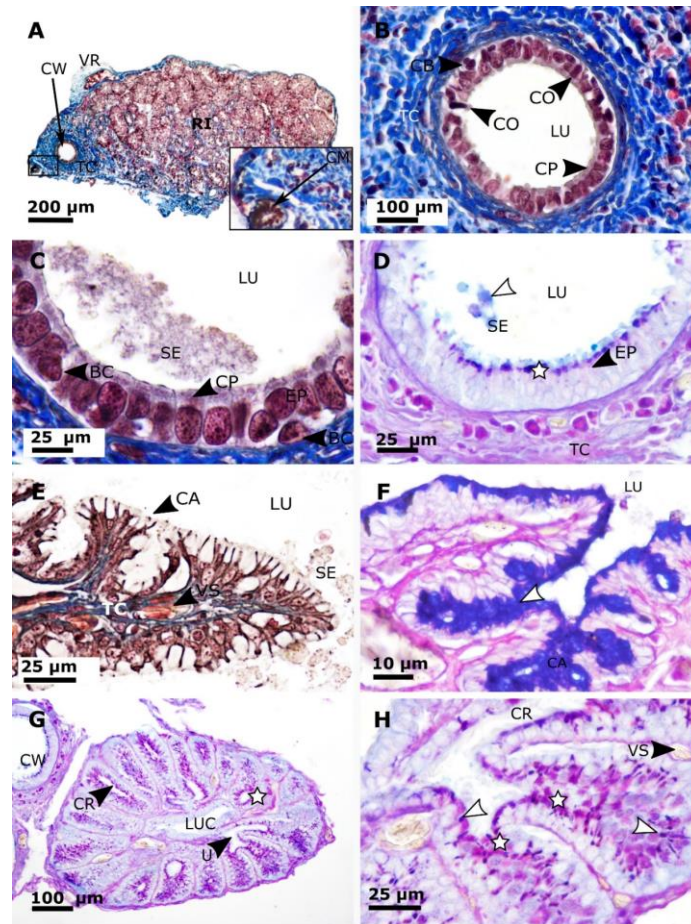
**Fig. 6.** Morfología interna de la cloaca de *C. thompsoni*. Arriba a la izquierda. Cloaca aislada mostrando secciones de cortes A-K. **A:** Tubo digestivo. **B-D:** Secciones del urodeo. Se observa musculatura circular (MC), musculatura longitudinal (ML), lumen del urodeo (LU) y tejido conectivo con presencia de senos (TCS). **E-F:** Sección del urodeo /falodeo. Los sacos ciegos (S), se extienden en sentido posterior hasta fusionarse en el falodeo. **G:** Fusión urodeo/falodeo para formar un único conducto. **H-K:** Reducción progresiva del tejido muscular, conectivo y epitelial de falodeo hasta su fusión con el esfínter cloacal. Figs. A-K. **H&E.**

Figura 7. Tipos de tejidos presentes en la cloaca de *C. thompsoni*

**Fig. 7.** Tipos de tejidos presentes en la cloaca de *C. thompsoni*. **A, C, E:** Sección del faldeo anterior. El lumen del faldeo está tapizado por epitelio monoestratificado ciliado. Este epitelio está soportado por tejido conectivo con presencia de senos venosos (SV) con amplia irrigación sanguínea. Se en esta región, ya son notorios los sacos ciegos (S) y lumen del urodeo rodeado por células caliciformes (LU), **B, D:** Sección posterior del faldeo. Se muestra el musculo propulsor (MP), tejido conectivo con presencia de senos venosos y el lumen del faldeo. **F:** Se muestra la musculatura lisa del faldeo (ML) que hace parte del músculo propulsor. **G:** Sección transversal de lóbulo anterior de la vejiga. En el recuadro, se puede visualizar un visión general de la sección transversal del lóbulo (escala 100 micrones). Es visible una gruesa capa de musculatura longitudinal (ML), permeada por tejido conectivo de sostén (TC), y epitelio de transición (EPT), rodeando al.lumen de la vejiga (LV). **H:** Músculo retractor cloacal. Se visualizan paquetes de fibras musculares (FM) y algunos de sus núcleos (NU), rodeadas de una matriz de tejido conectivo. Núcleo (NU). Figs. A-F y H, **Tinción tricrómica; G, H&E.**

**Figura 8. Falodeo evertido y estructuras asociadas a la cloaca de *C. thompsoni***

**Fig. 8.** Aspecto macroscópico del tracto reproductivo de *C. thompsoni*. **A:** Vista general del falodeo evertido. Se observa el bulbo distal del falodeo (B), tapizado con surcos longitudinales (SL). El bulbo se comunica con el disco cloacal (DC) mediante la porción más posterior del falodeo en posición evertida. En esta zona, el falodeo muestra surcos transversales (ST) y su delgada pared deja entrever el urodeo que conduce los espermias hacia la cloaca de la hembra. **B:** Vista de la región dorsal-anterior de la cloaca. Es visible el punto de inserción (PI) de la glándula de Müller (GM) y conducto de Wolf (CW), formando un bucle (BU) copulatorio, que se extiende cuando el falodeo se encuentra evertido, permitiendo su salida del disco cloacal. Los lóbulos vesicales anterior (LVA) y posterior (no visible), también se comunican con la cloaca mediante el punto de inserción. **C:** Morfología interna de *Caecilia thompsoni*, mostrando la disposición paralela del tubo digestivo (Td), aorta dorsal (Ao) lóbulos testiculares primarios (LtP), lóbulos testiculares secundarios (LtS), mesotelio (Ms), cuerpos grasos izquierdo (Cgi) y pared corporal (Pc). **D:** Detalle de mesotelio (Ms). Se muestra cómo esta membrana es atravesada por ductos espermáticos (DE) y vasos sanguíneos (Vs) transversales, que comunican a los testículos con los riñones (Ri).

**Figura 9. Determinación de tipos de secreción en el tracto reproductivo de *C. thompsoni***

**Fig. 9.** Determinación de tipos de secreción en el tracto reproductivo de *C. thompsoni*. **A:** Región anterior del riñón. El conducto de Müller (CM), se encuentra reducido a un epitelio columnar simple en esa región del riñón (RI), siendo más prominente el conducto de Wolf (CW). Vena renal (VR). **B-C.** Detalle de conductos de Wolf cuyo epitelio luminal (EP) es soportado por una gruesa matriz de tejido conectivo (TC). El lumen del conducto (LU) muestra la presencia de secreciones (SE) provenientes del epitelio (EP) y las distintas células que lo componen: células oscuras (CO) y células principales (CP) y células basales. **D:** Resultado positivo (estrella) para PAS (púrpura) y positivo (cabeza de flecha) para AB (azul) en el conducto de Wolf, se muestra el lumen del conducto (LU) y el tejido conectivo circundante (TC). **E:** Epitelio luminal de urodeo, en donde se evidencian células secretoras caliciformes (CA) y sus secreciones (SE). El urodeo. El tejido conectivo (TC) que comunica con el epitelio recibe vasta irrigación sanguínea por vasos (VS). **F:** Resultado positivo para AB (azul) en el urodeo sobre las células caliciformes (CA). **G-H.** Resultado positivo para polisacáridos neutros PAS (púrpura, estrella) y resultado positivo para mucopolisacáridos ácidos para AB (azul, cabeza de flecha blanca) en glándula Mülleriana. Se visualizan las criptas tubulares de secreción (CR), con evidencia de fusión (U). El lumen central (LU) carece de secreciones de estos dos tipos mientras que la los mucopolisacáridos se localizan predominantemente hacia la base de las criptas glandulares. Figs. A-C y F. **Ticrómica de Masson; D, F-H, PAS-AB.**

**Tabla 1. Datos de recolección de especímenes utilizados para la investigación.**

Especie	Número de colección	Localidad	Fecha de colección	Empleado en el estudio
<i>Caecilia thompsoni</i>	UIS-A-4937	Llano de Palma, Rionegro, Santander	29 Julio 2012	✓
<i>Caecilia thompsoni</i>	UIS-A-5189	Lebrija, Vereda la Girona, Santander	20 de Abril 2011	✓
<i>Caecilia thompsoni</i>	UIS-A-5378	San Vicente de Chucurí, Vereda La Colorada, Santander	Enero de 2015	✓
<i>Caecilia sp.</i>	UIS-A-5742	Betulia, Vereda Sogamoso, sector corintios	Abril de 2015	
<i>Caecilia sp.</i>	UIS-A-5753	Betulia, Vereda Aguamieluda Alta, Santander	Mayo de 2005	
<i>Caecilia sp.</i>	UIS-A-5743	Betulia, Vereda Sogamoso, sector Corintios	Septiembre de 2016	
<i>Caecilia thompsoni</i>	UIS-A-5965	Magdalena medio santandereano, sin localidad específica	Sin fecha	✓