

Micropreparados histológicos de modelos de vertebrados como material docente en la
Escuela de Biología en la Universidad Industrial de Santander

Nicolás Faday Castro Martínez

Pasantía de investigación para optar al título de Biólogo

Directora

Martha Patricia Ramírez Pinilla

Dra. en Ciencias Biológicas

Codirectora

Yurany Nathaly Hernández Díaz

M Sc. en Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

Agradecimientos

En primer lugar, a mis padres y abuelos maternos, por su apoyo constante para llevar a cabo todos mis proyectos, por ser parte de quien soy a nivel personal y profesional.

A Cristian Daza por ser mi amigo y compañero de estudio durante los primeros semestres del pregrado.

A Tiana Beltrán, por siempre motivarme a ser mejor cada día, gracias, por tanto.

A Cristian Cadena por sus constantes palabras de apoyo y motivación durante todo el proceso y ejecución de esta pasantía.

A Juliana Porras por toda la paciencia, compañía y apoyo en cada uno de los días que estuve dentro y fuera del laboratorio.

A la Magister Nathaly Díaz y la Dra. Martha Patricia Ramírez por su confianza al momento de permitirme ingresar, trabajar y llevar a cabo mi proyecto de grado en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados.

Tabla de contenido

Introducción	8
1. Objetivos	10
1.1 Objetivo General	10
1.2 Objetivos Específicos	10
1.3 Competencias	10
2. Metodología	11
2.1 Muestreo	11
2.2 Disección y fijación de tejidos	11
2.3 Deshidratación e inclusión de tejidos	11
2.4 Fotografía y edición	13
3. Resultados	14
3.1 Descripción tisular	15
4. Discusión	34
5. Conclusiones	39
Referencias bibliográficas	40

Lista de figuras

Figura 1. Pulmón de <i>M. musculus</i> con objetivos de 10x y 100x.....	16
Figura 2. Pared del intestino delgado de <i>M. musculus</i> on objetivos de 40x y 100x.....	17
Figura 3. Pared estomacal de <i>M. musculus</i> con objetivos de 4x y 10x.	18
Figura 4. Estómago de <i>E. jonthstonei</i> con objetivos de 40x y 100x.	19
Figura 5. Estómago de <i>H. frenatus</i> con objetivos de 40x y 100x.	20
Figura 6. Corte transversal de hígado de <i>M. musculus</i> con objetivos de 10x y 40x.	21
Figura 7. Hígado de <i>E. jonthstonei</i> con objetivos de 40x y 100x.....	22
Figura 8. Hígado de <i>H. frenatus</i> con objetivos de 40x y 100x.....	23
Figura 9. Riñón de <i>M. musculus</i> con objetivos de 40x y 100x.....	24
Figura 10. Riñón de <i>H. frenatus</i> con objetivos de 40x y 100x.....	25
Figura 11. Corteza renal en riñón de <i>E. jonthstonei</i> con objetivos de 40x y 100x.....	26
Figura 12. Testículo de <i>E. jonthstonei</i> , túbulos seminíferos con objetivos de 40 y 100x.	28
Figura 13. Testículo de <i>H. frenatus</i> con objetivos de 40x y 100x.....	29
Figura 14. Epidídimo de <i>H. frenatus</i> con objetivos de 40x y 100x.....	30
Figura 15. Infundíbulo, conducto ovárico de <i>H. frenatus</i> con objetivos de 40x y 100x.	31
Figura 16. Folículo vitelogénico de <i>E. jonthstonei</i> con objetivos de 40x y 100x.	32
Figura 17. Sangre de <i>M. musculus</i> con objetivos de 100x.	33
Figura 18. Sangre de <i>H. frenatus</i> con objetivos de 100x.	33

Lista de tablas

Tabla 1. Órganos utilizados de cada uno de los individuos modelo.....	14
--	----

Resumen

TÍTULO: MICROPREPARADOS HISTOLÓGICOS DE MODELOS DE VERTEBRADOS COMO MATERIAL DOCENTE EN LA ESCUELA DE BIOLOGIA EN LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

AUTOR: NICOLÁS FADAY CASTRO MARTÍNEZ

PALABRAS CLAVE: HISTOLOGÍA, DESCRIPCIÓN TISULAR, INCLUSIÓN.

DESCRIPCIÓN:

La histología es una rama de la anatomía que nos permite estudiar organismos mediante el análisis y observación de su estructura en diferentes niveles: celular, tisular y de órganos, así mismo, abarca el estudio del funcionamiento de estas mismas estructuras. La histología es una herramienta ampliamente utilizada en la docencia y proyectos desarrollados en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados, así como en las asignaturas de Introducción a la Biología, Biología celular, Metazoa II, Fisiología animal, Biología del desarrollo, cursos presentes en el plan de estudios del pregrado de Biología en la Universidad Industrial de Santander (UIS). Con el fin de obtener el material histológico que dará lugar al inicio de una colección de micropreparados de tejidos de la Escuela de Biología, se usaron individuos de especies no nativas propuestas como vertebrados modelo: *Mus musculus*, *Eleutherodactylus johnstonei* y *Hemidactylus frenatus*. Se realizaron cortes histológicos para diferentes órganos de la cavidad abdominal de las tres especies. Se seccionaron al micrótopo y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los micropreparados se observaron y fotografiaron con el microscopio y una cámara adaptada. Se identificaron y describieron comparativamente los tejidos que conforman las estructuras de los órganos seleccionados y con base en la literatura se explica su función. Se entregan a la Escuela los micropreparados histológicos debidamente marcados, así mismo con base en las fotografías, se proporciona un instrumento útil para la enseñanza del estudio y descripciones tisulares de algunos órganos de vertebrados.

*Pasantía en Investigación

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

Codirectora Yurany Nathaly Hernández Díaz, M Sc.

Abstract

TITLE: HISTOLOGICAL SLIDES OF VERTEBRATE MODELS AS TEACHING MATERIAL IN BIOLOGY SCHOOL AT INDUSTRIAL UNIVERSITY OF SANTANDER

AUTHOR: NICOLÁS FADAY CASTRO MARTÍNEZ

KEY WORDS: HISTOLOGY, TISSUE DESCRIPTION, INCLUSION.

DESCRIPTION:

Histology is a branch of anatomy that allows us to study organisms through the analysis and observation of their structure at different levels: cellular, tissular, and organic, as well as encompassing the study of the functioning of these same structures. Histology is widely used as a tool in teaching and projects developed in the Laboratory of Vertebrate Reproductive Biology, as well as in subjects such as Introduction to Biology, Cell Biology, Metazoa II, Animal Physiology, Developmental Biology, courses of the undergraduate curriculum of Biology at the Industrial University of Santander (UIS). To obtain the histological material that will contribute to the collection of tissular microscopic slides for the School of Biology, individuals of non-native species were collected as vertebrate models: *Mus musculus*, *Eleutherodactylus johnstonei*, and *Hemidactylus frenatus*. Individuals of these species were euthanized and dissected to subsequently fix their internal organs; microtome sections were obtained for different organs from the abdominal cavity, which were stained with hematoxylin and eosin. The slides were observed and photographed with a microscope and an adapted camera. The tissues comprising the structures of the selected organs were identified, comparatively described, and their functions were explained based on the literature. The properly labelled histological microslides are being provided to the Biology School, and based on the photographs, a useful instrument is provided for teaching the study and tissue descriptions of some vertebrate organs.

* Research Internship

**Faculty of Basic Sciences, Biology school. Director Martha Patricia Ramírez Pinilla, PhD.

Codirectora Yurany Nathaly Hernández Díaz, M Sc.

Introducción

La histotecnica es una técnica fundamental en las ciencias, comprende un proceso riguroso mediante el cual permite observar, analizar y estudiar estructuras, funciones, y desarrollo en diferentes niveles: celular, tisular y de órganos (de Juan, 1999; Rodríguez, 2014). Los estudios que incluyen análisis histológicos han permitido ampliar nuestro entendimiento sobre estructuras, así como comprender aspectos morfológicos y fisiológicos asociados con el desarrollo, la reproducción, la identificación de patologías, entre otros, de los grandes grupos de especies tanto de vertebrados como de invertebrados (Rodríguez, 2014).

El Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados (LBRV) de la Universidad Industrial de Santander ha desarrollado múltiples proyectos de investigación que incluyen el análisis histológico para realizar descripciones anatómicas, morfológicas y del desarrollo en grupos como los onicóforos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Romero de Pérez & Ramírez-Pinilla, 2002; Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004; Rueda-Cediel & Ramírez-Pinilla, 2008; Lizcano, 2017; Fonseca, 2016; Serrano-Pérez & Ramírez-Pinilla, 2021).

Aprovechando la experiencia del LBRV, se pretende realizar un base de micropreparados histológicos que sirvan para la enseñanza didáctica de los estudiantes de pregrado de la Escuela de Biología de la UIS. Para el desarrollo de esta colección, se trabajó con *Mus musculus*, una especie de vertebrado modelo que tiene una alta tasa reproductiva y gran adaptabilidad, lo cual le permite establecer poblaciones en diferentes regiones y hábitats, en zonas templadas como tropicales (Battersby et al., 2008; Panti-May et al., 2018). También se incluyó a *Eleutherodactylus johnstonei*, perteneciente a la familia Eleutherodactylidae (Lutz, 1954), una rana endémica de las Antillas menores e introducida en Centroamérica y norte de Suramérica, encontrándose en diversas regiones de Colombia, como lo son Barranquilla, Cali y Bucaramanga (Hernández-Córdoba, 2018). Se sabe que son especies que han aumentado

rápida su distribución puesto que cuenta con una gran capacidad de reproducirse en otros ecosistemas (Ortega et al., 2005) considerándose una especie invasora exitosa (Valencia et al., 2011). Finalmente, *Hemidactylus frenatus* siendo también una especie invasora, cuenta con registros en varias localidades de Colombia, estando presente en 20 de los 32 departamentos del país, (Caicedo-Portilla & Dulcey-Cala, 2011). El éxito de esta especie proveniente del sudeste asiático se basa en la disponibilidad ambiental de presas y las condiciones climáticas, esto junto al comportamiento dietario oportunista y la actividad reproductiva continua, características que parecen ser responsables de su abundancia a lo largo del territorio (Díaz-Pérez et al., 2017). Usar individuos no nativos, con amplia distribución y adaptabilidad facilita llevar a cabo procesos y análisis histológicos de sus estructuras, debido a que se pueden coleccionar sin complicaciones en diferentes áreas rurales y urbanas, sin preocupación de afectar negativamente sus poblaciones al tratarse de especies invasoras.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Elaborar micropreparados histológicos de vertebrados que sirvan como material docente para la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

1.2 Objetivos Específicos

Elaborar placas histológicas de los órganos presentes en la cavidad abdominal de vertebrados de la fauna presente en el campus de la Universidad Industrial de Santander.

Describir la organización tisular de cada uno de los órganos obtenidos mediante las técnicas histológicas comunes y usadas en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados.

Fotografiar el material biológico obtenido en los distintos aumentos que se pueden hallar en los equipos del Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados.

1.3 Competencias

1. Desarrolla habilidades en histología para obtener micropreparados histológicos de sistemas de órganos de vertebrados modelo
2. Identifica y describe morfología tisular de los distintos sistemas de órganos de los animales seleccionados.
3. Realiza fotografías que muestran las características de cada tejido.
4. Escribe correctamente un informe técnico científico que muestre los resultados obtenidos de su trabajo.

2. Metodología

2.1 Muestreo

Para realizar la elaboración de las láminas histológicas, se usaron individuos de *E. johnstonei* y *H. frenatus* colectados en distintas localidades del área metropolitana de Bucaramanga, los individuos de *M. musculus* fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis ambiental de la Escuela de Biología (UIS), estos estaban muertos y listos para su disección.

2.2 Disección y fijación de tejidos

Los individuos colectados de *E. johnstonei* y *H. frenatus* fueron eutanizados con una solución inyectable de roxicaína (roxicaína 2% lidocaína) mediante la aplicación del anestésico inyectado en el corazón, sin generar traumatismos en el espécimen. La disección se realizó por medio de un corte longitudinal superficial en la zona abdominal, de esta manera accediendo a los órganos. Éstos se trocearon y se fijaron con una solución de Bouin donde permanecieron dependiendo del tamaño, para órganos entre 1-3mm el tiempo fue de 2 a 3 horas, y entre 3-5mm el tiempo fue de 3-4 horas y para órganos completos y trozos de 8mm el tiempo de fijación fue superior a 8 horas.

2.3 Deshidratación e inclusión de tejidos

Cada porción del órgano a estudiar fue enjuagado con agua destilada dos veces durante 5 minutos cada vez con el fin de remover la solución de Bouin; las muestras entonces se deshidrataron en soluciones ascendentes de etanol, de la siguiente manera: etanol al 70% durante 10 minutos repitiendo el proceso tres veces más, percatándose que para este punto el tejido ya no desprenda el color amarillo típico de la solución de Bouin y continuando con el proceso de deshidratación, de lo contrario se realizaba un cuarto lavado en alcohol al 70%, posteriormente se usó etanol 80% y 90% durante 20 minutos cada uno y repitiendo el proceso

dos veces, etanol 95% durante 30 minutos por dos cambios para finalmente usar etanol absoluto durante una hora.

Las muestras fueron dejadas en una solución de partes iguales de etanol absoluto y Xilol por al menos una hora, con el fin de retirar el agua restante del tejido sin ser demasiado agresivo con el mismo; finalmente el tejido pasa a una solución pura de Xilol durante 30-45 minutos para muestras de menos de tres milímetros y poco más de una hora y media para muestras mayores a tres milímetros.

Después de la deshidratación se inicia el proceso de inclusión en parafina. Para la inclusión, los tejidos se dispusieron en una mezcla de parafina (Paraplast, Surgipath®) y Xilol en partes iguales durante una hora, posteriormente se pasaron a un recipiente únicamente con parafina durante dos horas, y se repitió este paso en una nueva solución de parafina. Todo este proceso controlando la temperatura en una incubadora entre 58-60 grados centígrados. Las muestras de órganos se acomodaron individualmente en bloques de parafina para que, al momento de realizar los cortes, estos quedaran de manera transversal.

2.4 Corte, tinción y montaje de láminas

Para realizar los cortes se usó un micrótopo rotativo (Sakura Accu-Cut SRM 200®), se obtuvieron pequeñas tiras de parafina y tejido con un grosor de entre 5 y 7 micras, estas tiras se sumergieron en agua tibia para ser finalmente montadas en láminas portaobjeto que estaban previamente preparadas con albúmina para la adhesión de los cortes.

Una vez las láminas con los cortes se llevaron a la incubadora a 60°C durante 10 minutos, buscando que la parafina se adhiriera mejor a la lámina y derritiendo los excesos de parafina que hubiesen quedado sobre la lámina.

Cuando las láminas enfrían se inició la tinción empleando Hematoxilina y Eosina. Para la tinción las láminas se rehidrataron, pasando por tres pasos de xilol, es decir, se sumergieron en tres diferentes depósitos de xilol durante 10 minutos cada uno. El xilol elimina la parafina

de los cortes. Luego los tejidos deben hidratarse empleando etanol en concentraciones descendentes (absoluto, etanol 90%, 80% y 70%), cada uno de estos pasos con una duración de 5 minutos, posteriormente se sumergen en agua durante 10 minutos, seguido por la tinción con hematoxilina durante 10 segundos hasta los 5 minutos dependiendo de las condiciones de la solución. Se pasaron luego a agua tibia (alrededor de 30°C) que removió el exceso de hematoxilina adherido en las láminas, y se sumergieron en Eosina por 15-20 minutos. Se observaron las láminas una vez por minuto con el fin de corroborar la correcta tinción del segundo pigmento. Los cortes en las láminas se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol 70%, 80% dos veces durante 10 minutos por vez, 90% dos veces durante 10 minutos por vez, etanol absoluto dos veces durante diez minutos cada vez y finalmente en xilol dos veces durante 5 minutos cada vez.

Para el montaje de las láminas, se empleó una gota de Enthelan® sobre los cortes y sobre ella se colocaron las laminillas cubreobjeto; al hacerlo, se cuidó de no dejar burbujas que impidieran la correcta observación de la lámina en el microscopio. Los micropreparados así montados se debieron secar por dos días a temperatura ambiente.

Para tejido sanguíneo se obtuvieron gotas de sangre *M. musculus* y *H. frenatus* y se tiñeron con tinción de Wright. Para este tejido, se dispuso poco menos de una gota de sangre del individuo en la lámina se realizó un frotis usando una laminilla y se agregó la tinción de Wright una vez la sangre estuviera seca, luego de 8 minutos se usó una solución buffer con pH neutro durante 8 minutos nuevamente, finalmente se enjuagó con agua, el montaje de las láminas fue similar al de los cortes.

2.4 Fotografía y edición

Cada una de las láminas se observó, y se descartaron las láminas con demasiados artefactos y aquellas en las que la tinción no se hubiera efectuado de manera adecuada. Los cortes fueron revisados en cada uno de los aumentos presentes en el microscopio (Nikon eclipse

55i), de esta manera se lograron comparar los distintos tejidos de los órganos obtenidos de cada una de las especies estudiadas.

Para la fotografía se usó un dispositivo móvil junto a un adaptador acoplado en el ocular del microscopio, sin hacer uso del aumento digital o de exposición artificial. Para la edición de fotografías se hizo uso de Photoshop CS6, Adobe Lightroom y Adobe Illustrator. Únicamente se recortó el borde de la fotografía y se eliminó el fondo, retirando los artefactos y resaltando levemente la tinción, permitiendo observar el tejido de una manera más clara y sin alterar la fotografía. Así mismo, las estructuras fueron identificadas y señaladas en cada uno de los tejidos, además se usó una escala para dimensionar las estructuras de los tejidos en las distintas especies y así tener una percepción del tamaño de las estructuras de los diferentes tejidos.

3. Resultados

Se obtuvieron preparados histológicos de órganos encontrados en la cavidad abdominal de los individuos *M. musculus*, *E. johnstonei* y *H. frenatus* como se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Órganos utilizados de cada uno de los individuos modelo.

<i>Mus musculus</i>	<i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	<i>Hemidactylus frenatus</i>
Estómago	Estómago	Estómago
Intestino delgado	Folículo ovárico	Epidídimo
Hígado	Hígado	Hígado
Riñón	Riñón	Riñón
Pulmón	Testículo	Testículo
Sangre		Sangre

Nota: Esta tabla muestra los órganos seleccionados y usados de cada uno de los individuos que se usaron en la elaboración de los micropreparados histológicos.

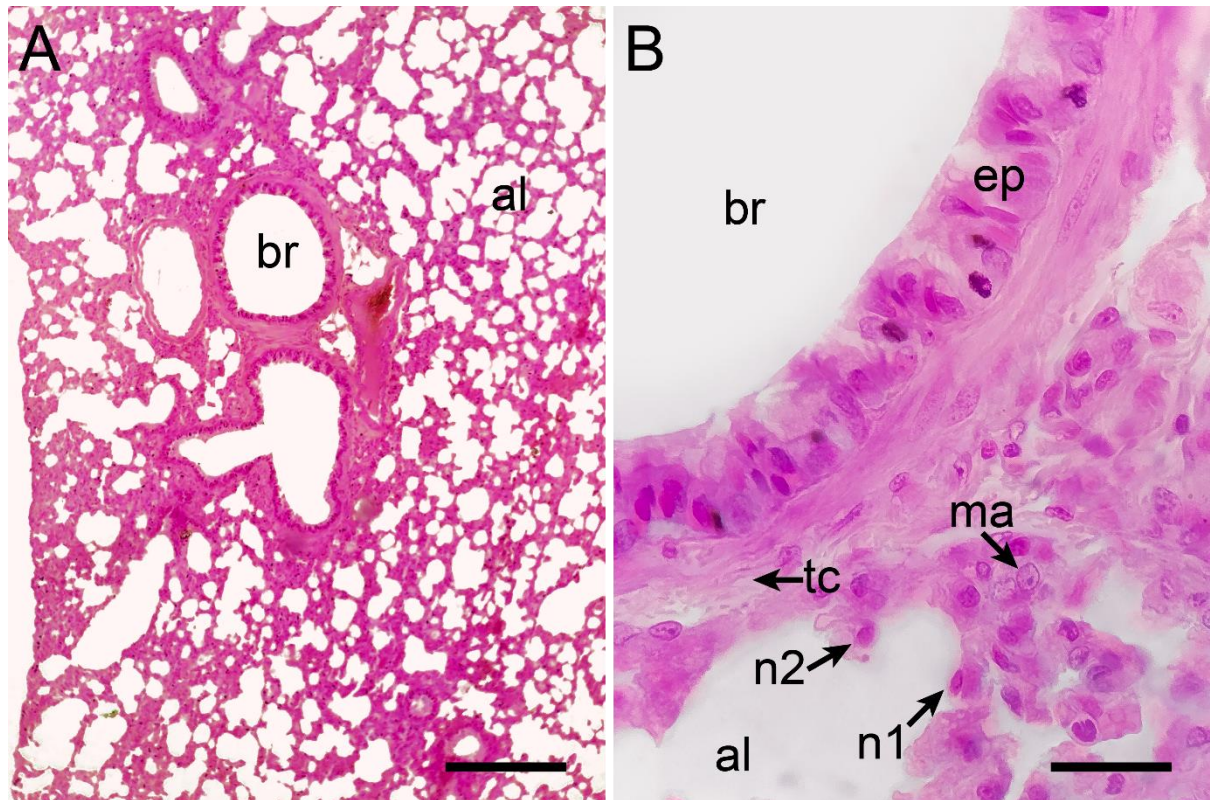
3.1 Descripción tisular

Los cortes histológicos obtenidos fueron descritos con base en las descripciones encontradas en el Atlas de Histología de Vertebrados de la Universidad Autónoma de México (Estrada & Uribe, 2002) y con investigaciones y estudios afines realizados para cada grupo.

Sistema respiratorio

El **pulmón** de *M. musculus* está formado por alvéolos, bronquiolos, tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. Los bronquiolos son estructuras tubulares presentes en los bronquios que se ramifican hasta formar los alvéolos; se forman por epitelio columnar simple, tejido conjuntivo y músculo liso. En los alvéolos que tienen epitelio plano simple, se pueden ver agrupaciones celulares adyacentes al tejido conjuntivo, específicamente neumocitos tipo I y neumocitos tipo II, macrófagos y células del tejido conjuntivo (**Figura 1**): los neumocitos I son los encargados del intercambio gaseoso y están más cercanos a la pared alveolar, mientras que los neumocitos II junto con los macrófagos y el tejido conjuntivo, brindan sostén y evitan el colapso de las estructuras alveolares y de los bronquiolos.

Figura 1. Pulmón de *M. musculus* con objetivos de 10x y 100x.

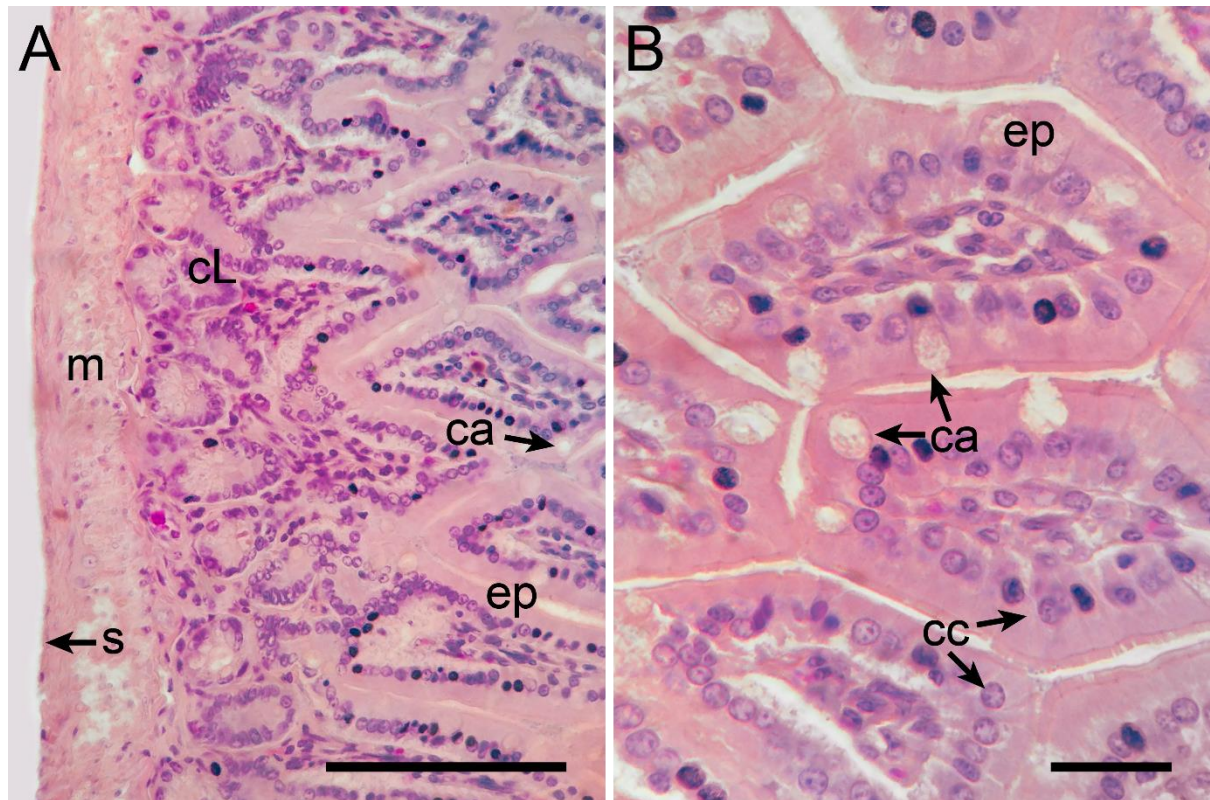


Nota: A. Bronquiolos (br); alvéolos (al). B. Bronquiolo (br); epitelio columnar simple (ep); alvéolo (al); epitelio plano que rodea los alvéolos, conformado por neumocitos 1 (n1) caracterizados por un núcleo aplanado, neumocitos 2 (n2) encontrados en su mayoría junto con el tejido conjuntivo (tc) y macrófagos (ma). La escala representa 200 micras (A) y 20 micras (B).

Sistema digestivo

Para el **intestino delgado** de *M. musculus*, se identifican tres tejidos: mucosa, submucosa y muscular. La mucosa se encuentra formada por un epitelio de células cilíndricas simples, una lámina propia y músculo liso. En el epitelio luminal se encuentran esparcidas células caliciformes, encargadas de la producción de mucus. La submucosa se caracteriza por presentar tejido conjuntivo de sostén. Además, hay una capa muscular interna formada por tejido muscular longitudinal y una capa muscular más externa formada por tejido muscular liso y circular, rodeada por la serosa (**Figura 2**).

Figura 2. Pared del intestino delgado de *M. musculus* con objetivos de 40x y 100x.

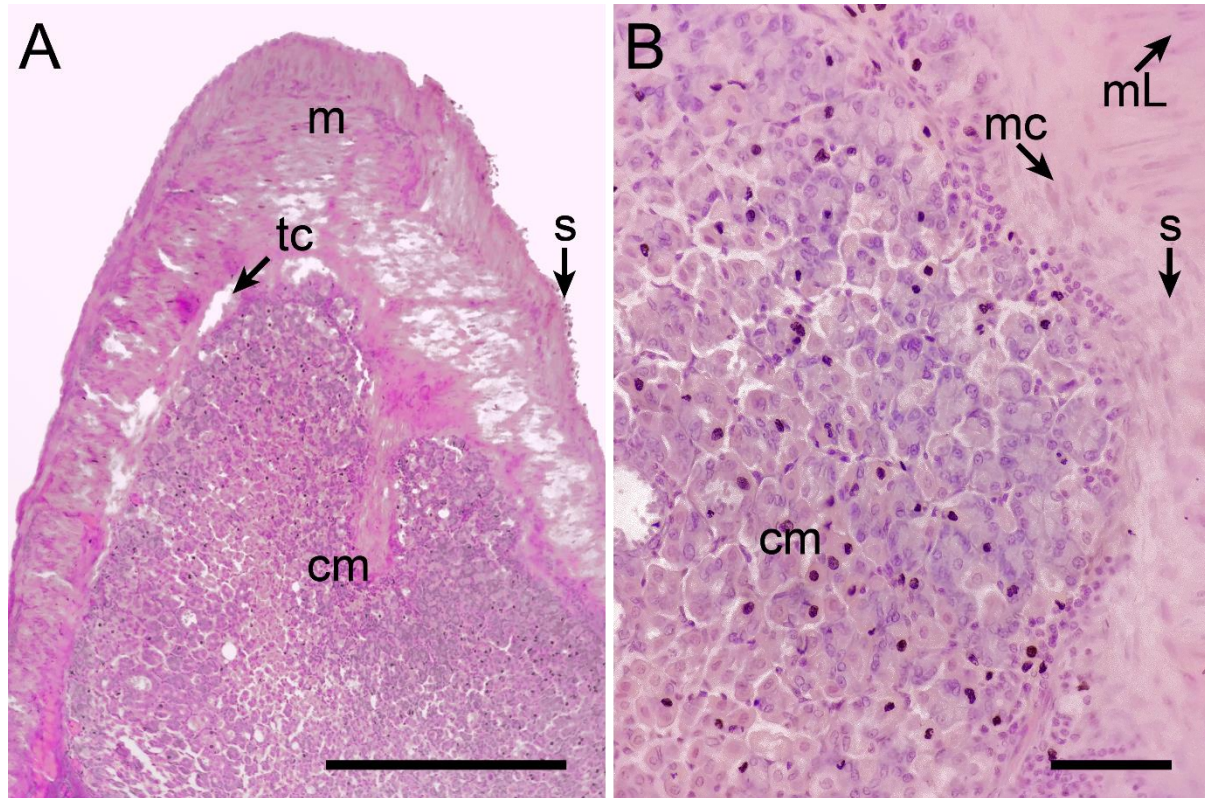


Nota: A: Tejido muscular (m); criptas de Lieberkühn (cL); epitelio cilíndrico simple (ep); células caliciformes (ca); serosa (s). B, células cilíndricas del epitelio (cc). La escala representa 100 micras (A) y 15 micras (B).

El **estómago** en las tres especies está formado por cuatro capas de tejidos; la interna o mucosa (tapizada por el epitelio luminal estomacal), constituida por epitelio cilíndrico simple en forma de pliegues e invaginaciones; una capa intermedia o submucosa en donde se presentan células glandulares que protegen de las condiciones ácidas; una capa muscular con bandas de músculo liso y longitudinal, y finalmente, la más externa, la capa serosa, la cual protege y evita el roce del estómago y otros órganos. En el estómago de *M. musculus* se observa un mayor número de células tanto a nivel muscular como de la submucosa (**Figura 3**). Para *E. johnstonei* (**Figura 4**) y *H. frenatus* (**Figura 5**), encontramos tamaños similares de las estructuras, así mismo, se observan de manera más detallada las invaginaciones de la mucosa, en estas fosas o

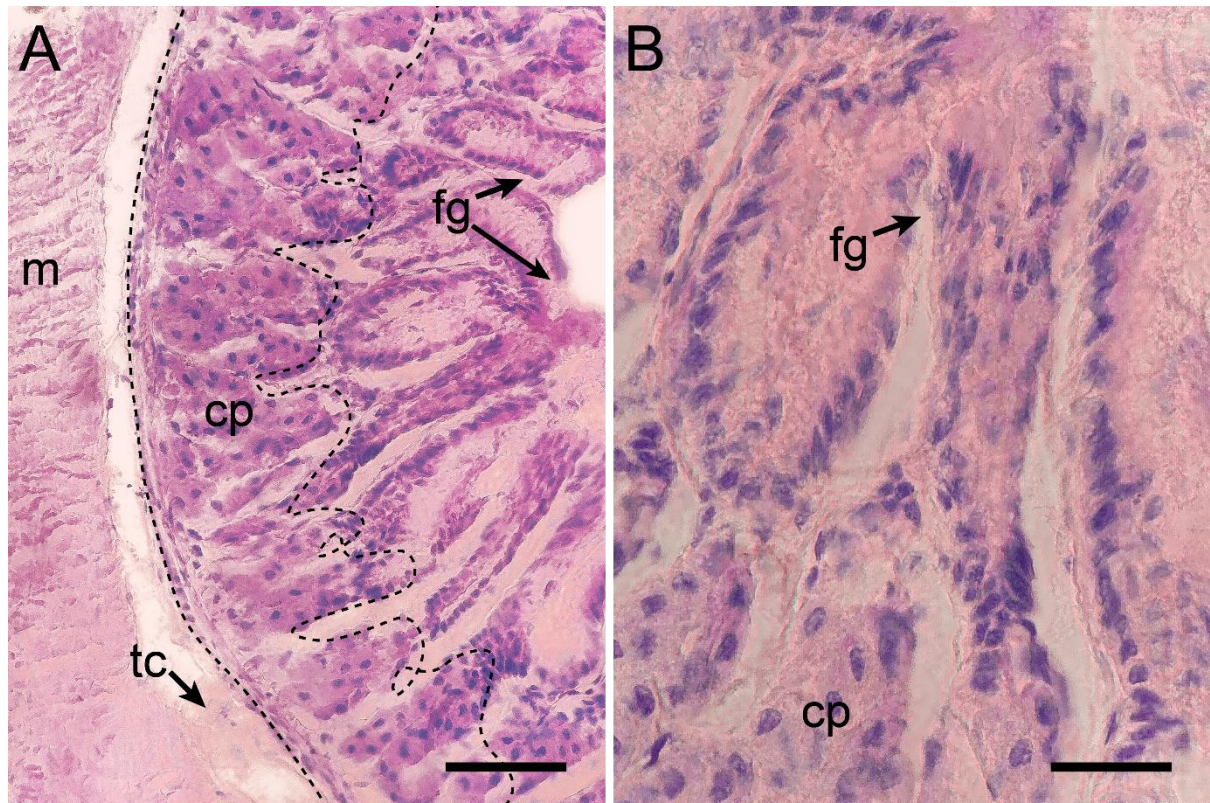
invaginaciones gástricas, desembocan las glándulas gástricas de la submucosa, lubricando la superficie de la mucosa.

Figura 3. Pared estomacal de *M. musculus* con objetivos de 4x y 10x.



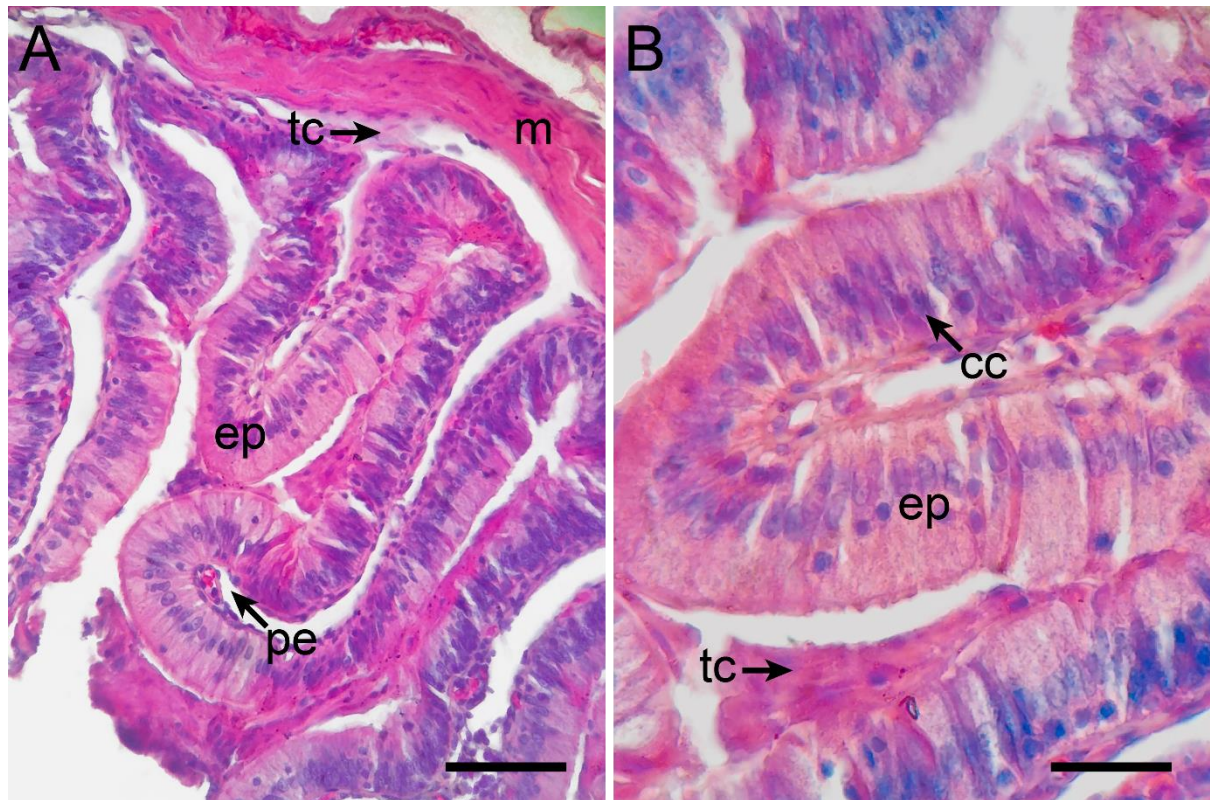
Nota: Capa muscular (m); tejido conjuntivo (tc); células mucosas (cm) con poco tejido conjuntivo entre ellas; serosa (s), formada por células epiteliales simples y un conjuntivo muy delgado; músculo longitudinal (mL); músculo circular (mc). La escala representa 200 micras (A) y 50 micras (B).

Figura 4. Estómago de *E. jonhstonei* con objetivos de 40x y 100x.



Nota: Haces musculares (m); células parietales de las fosas gástricas (cp); fosas gástricas (fg); tejido conjuntivo (tc). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

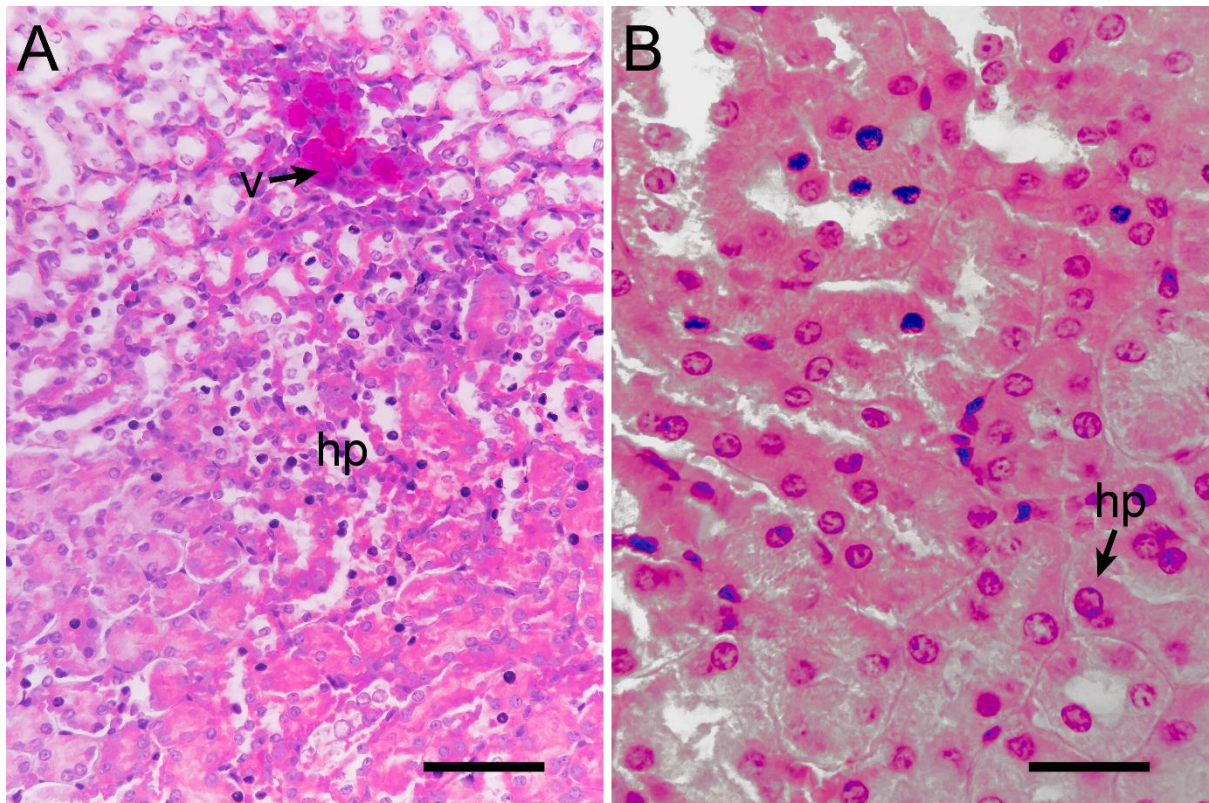
Figura 5. Estómago de *H. frenatus* con objetivos de 40x y 100x.



Nota: Tejido muscular (m) liso y circular; epitelio estomacal columnar simple (ep); pliegues de la mucosa estomacal (pe); tejido conjuntivo de sostén (tc); células epiteliales columnares (cc). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

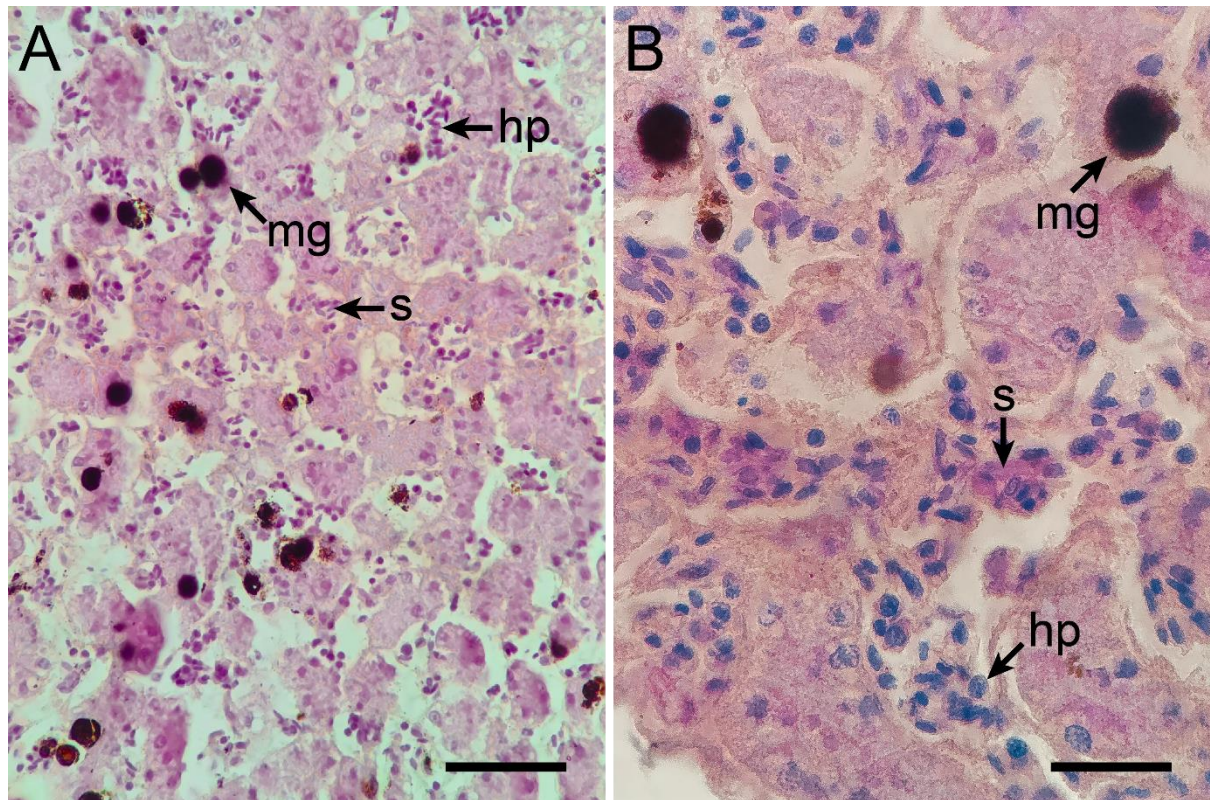
Para las tres especies empleadas, el **hígado** está conformado por hepatocitos, células estructurales encargadas del proceso metabólico al ser células secretoras de proteínas (glicoproteínas, lipoproteínas, albuminas, entre otros), y la producción de bilis; estos se organizan en laminas recibiendo el nombre de parénquima, además se encontraron capilares sinusoidales (**Figura 6**), y abundante tejido conjuntivo y células de Kupffer (células que se encuentran generalmente alrededor de los sinusoides hepáticos). Adicionalmente, en *E. jonhstonei* y *H. frenatus* se observan estructuras de pigmentación oscura, ajenas a la estructura tisular del hígado, estas estructuras son melanomacrófagos (**Figura 7-8**), agrupaciones celulares anormales que indican enfermedad en el individuo o la presencia de un contaminante externo en el entorno.

Figura 6. Corte transversal de hígado de *M. musculus* con objetivos de 10x y 40x.



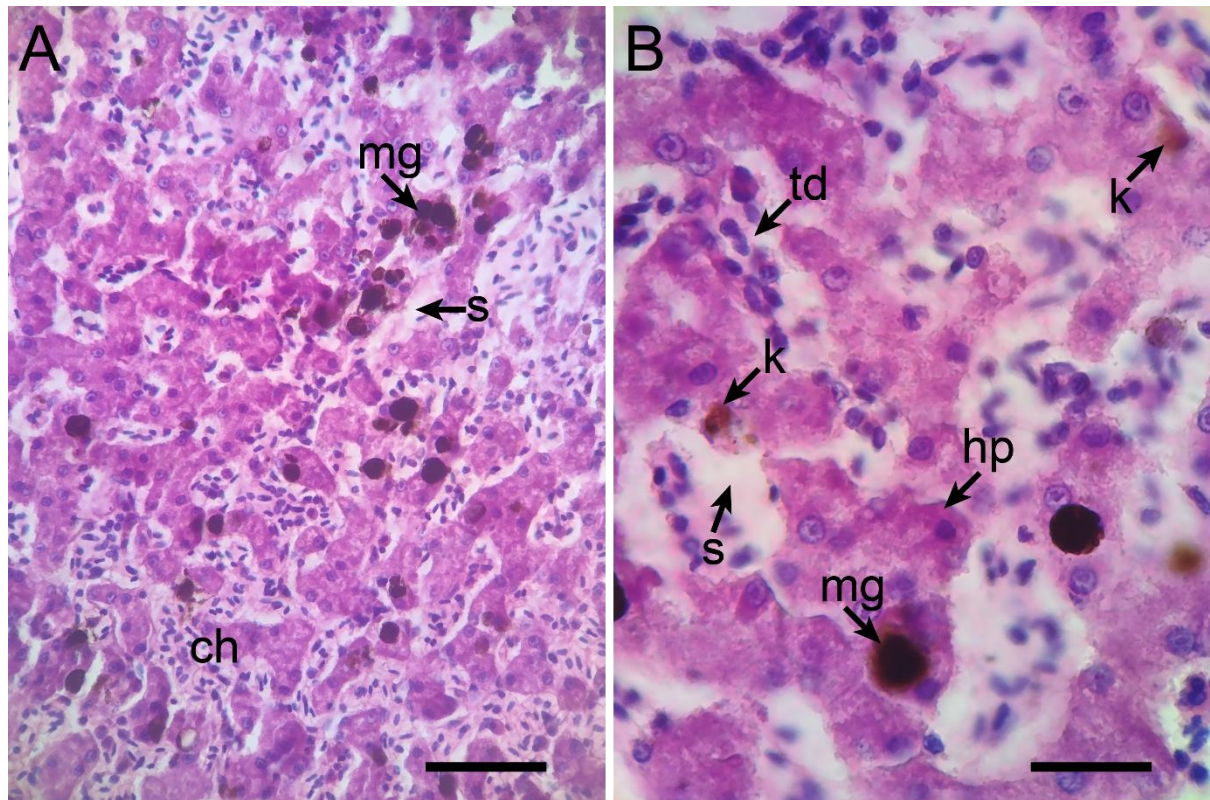
Nota: Hepatocitos (h), sinusoides hepáticas (v: vasos sanguíneos). La escala equivale a 200 micras (A) y 50 micras (B).

Figura 7. Hígado de *E. jonhstonei* con objetivos de 40x y 100x.



Nota: Hepatocitos (hp); melanomacrófagos (mg) vasos sanguíneos o sinusoides (s); La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

Figura 8. Hígado de *H. frenatus* con objetivos de 40x y 100x.



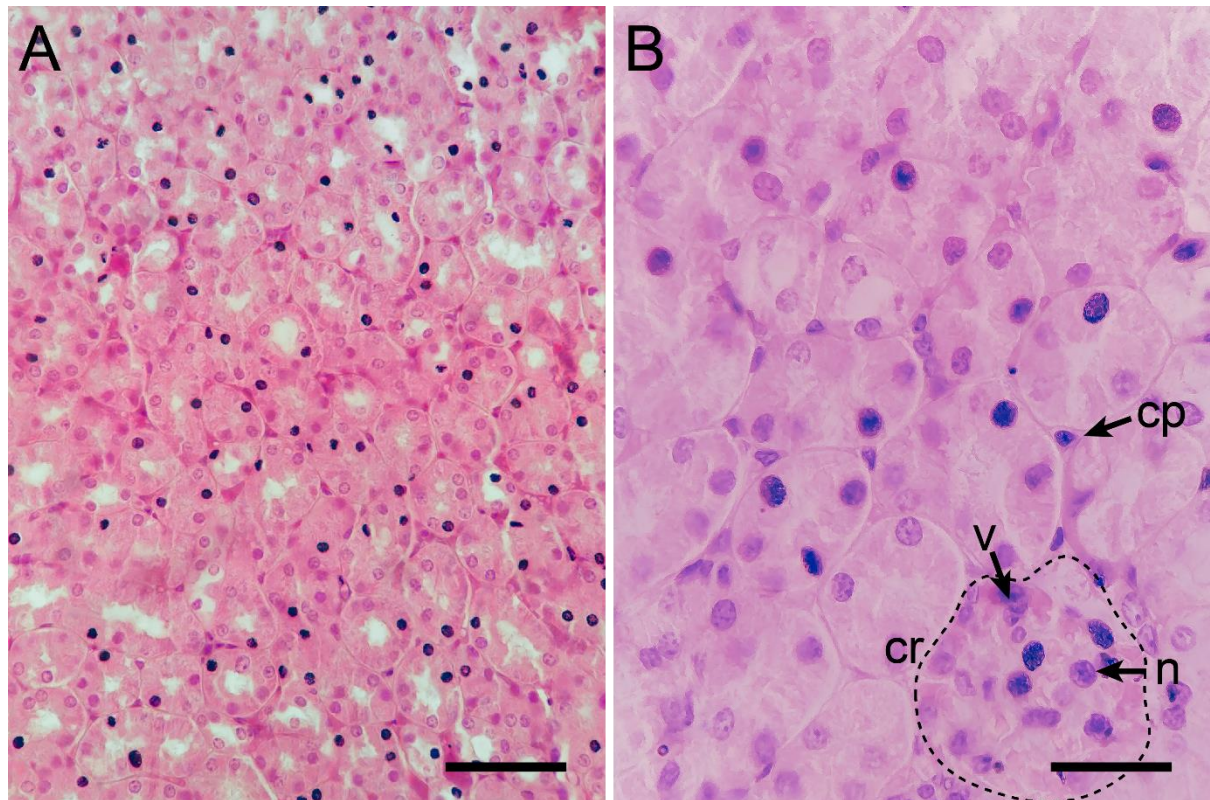
Nota: Células hepáticas (ch); melanomacrófagos (mg); sinusoides (s); células de tejido linfático difuso (td); células de Kupffer (k); hepatocitos (h). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

Sistema endocrino

En el **riñón** de *M. musculus* (**Figura 9**) y *H. frenatus* (**Figura 10**), se diferencian dos zonas; la corteza y la médula. La corteza es la zona más externa y contiene los corpúsculos renales, las porciones contorneadas de los túbulos proximales y distales, y parte de la porción recta, mientras que en la médula se localizan los túbulos colectores, a los cuales se vierte el contenido excretado de la nefrona, y de éstos a la uretra.

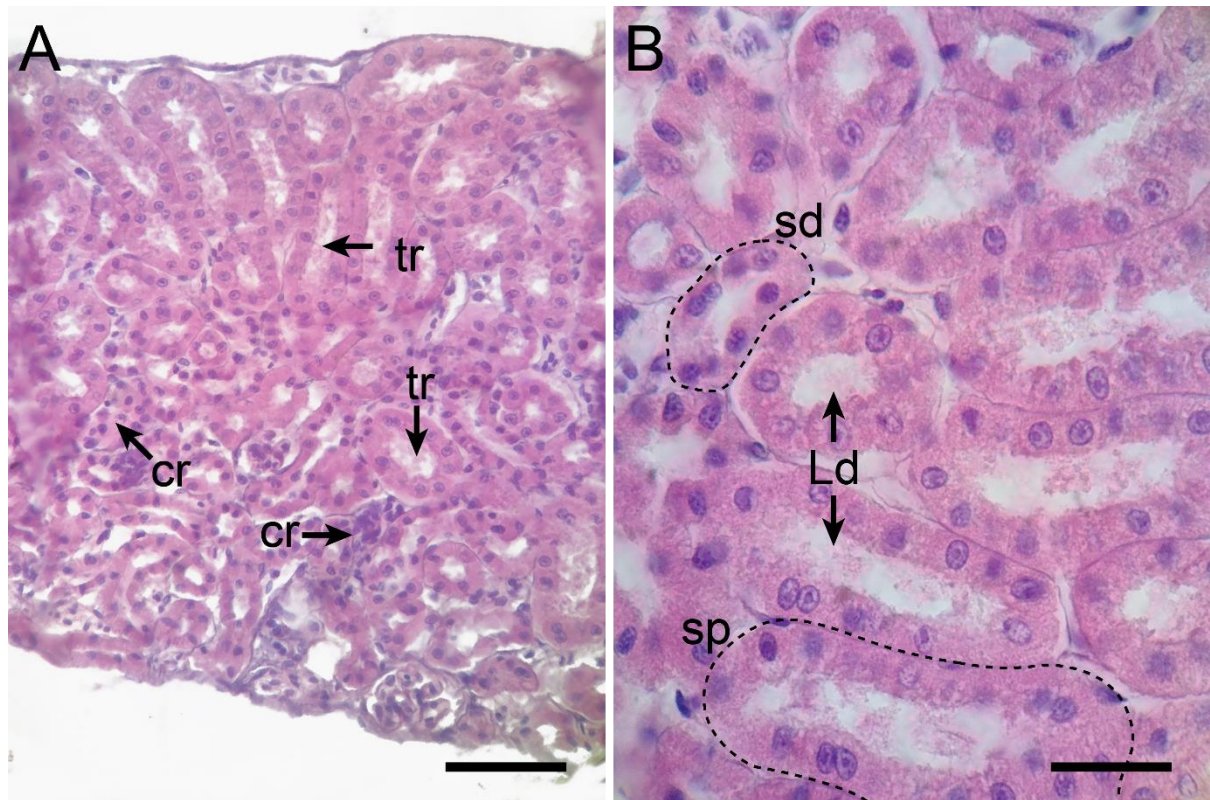
En anfibios y peces el **riñón** es opistonéfrico, en *E. johnstonei*, el **riñón** está constituido por corpúsculos y túbulos renales donde se diferencian dos estructuras: segmentos proximales y segmentos distales (**Figura 11**).

Figura 9. Riñón de *M. musculus* con objetivos de 40x y 100x.



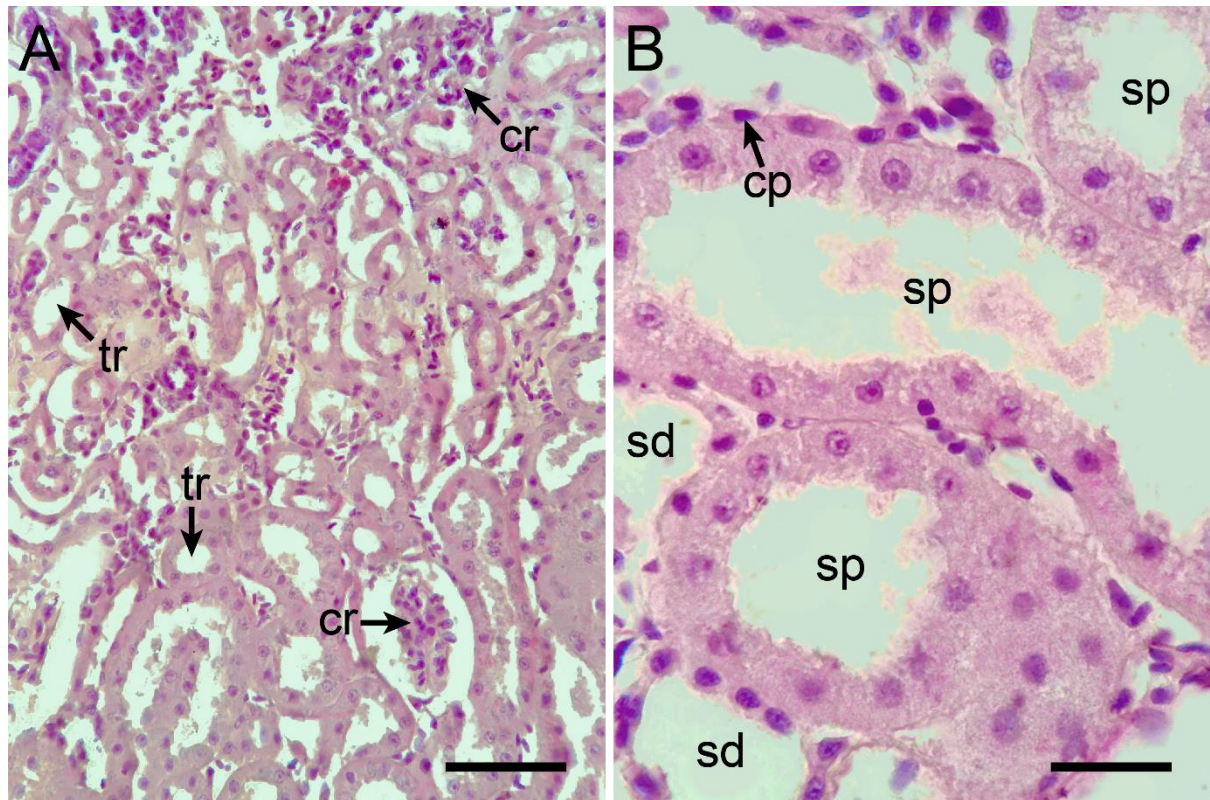
Nota: Corpúsculos renales (líneas punteadas) (cr); núcleos (n); vasos sanguíneos (v); célula de capa parietal (cp). La escala equivale a 50 micras (A) y 20 micras (B).

Figura 10. Riñón de *H. frenatus* con objetivos de 40x y 100x.



Nota: Corpúsculos renales (cr); (2) túbulos renales (tr), segmento proximal (sp); segmento distal (sd); lumen del ducto (Ld). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

Figura 11. Corteza renal en riñón de *E. jonhstonei* con objetivos de 40x y 100x



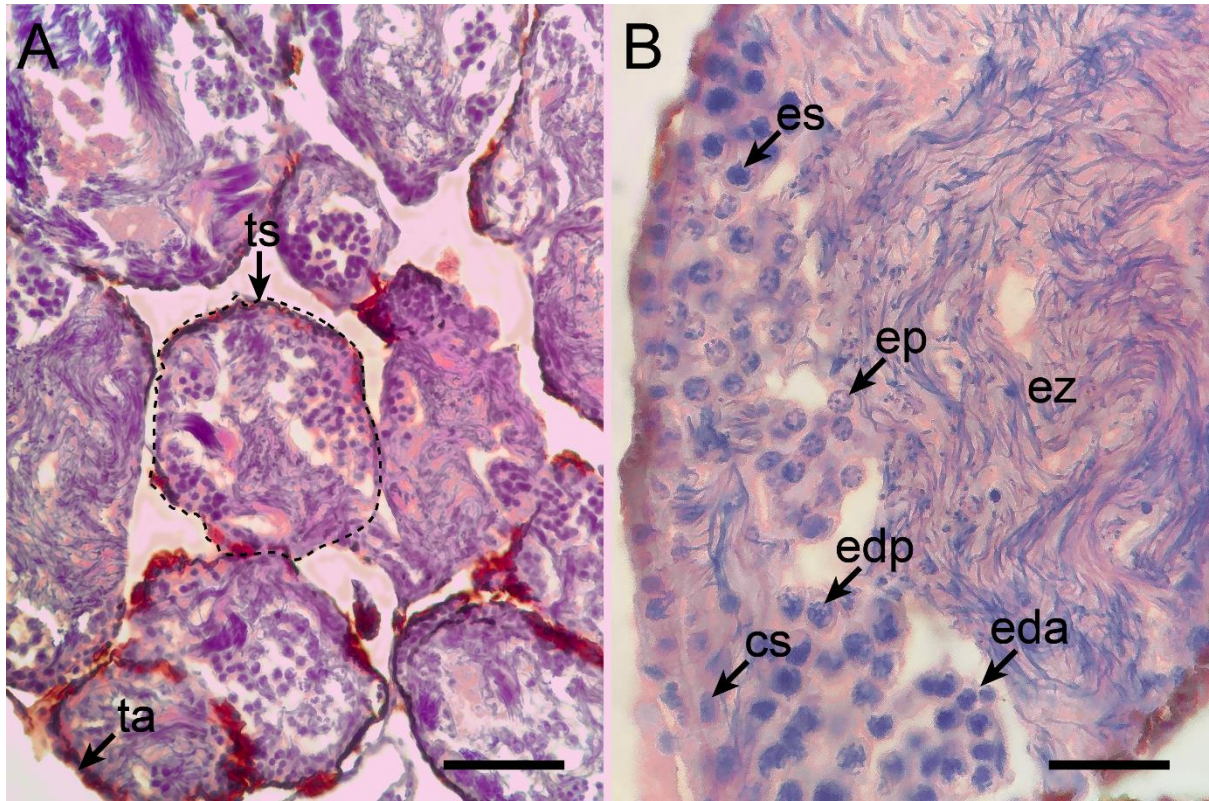
Nota: Corpúsculos renales (cr); (2) túbulos renales (tr), segmento proximal (sp); segmento distal (sd); célula de capa parietal (cp). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

Sistema reproductivo

En el **testículo** de *E. johnstonei* se observa un ciclo espermatogénico continuo, es decir, en un mismo túbulo seminífero podemos encontrar cistos de todas las fases espermatogénicas (asociados con las células de Sertoli): cistos de espermatogonias, de espermátocitos primarios y avanzados, cistos de espermátidas tempranas, tardías y finalmente los espermatozoides se encuentran en el lumen del túbulo seminífero (**Figura 12**).

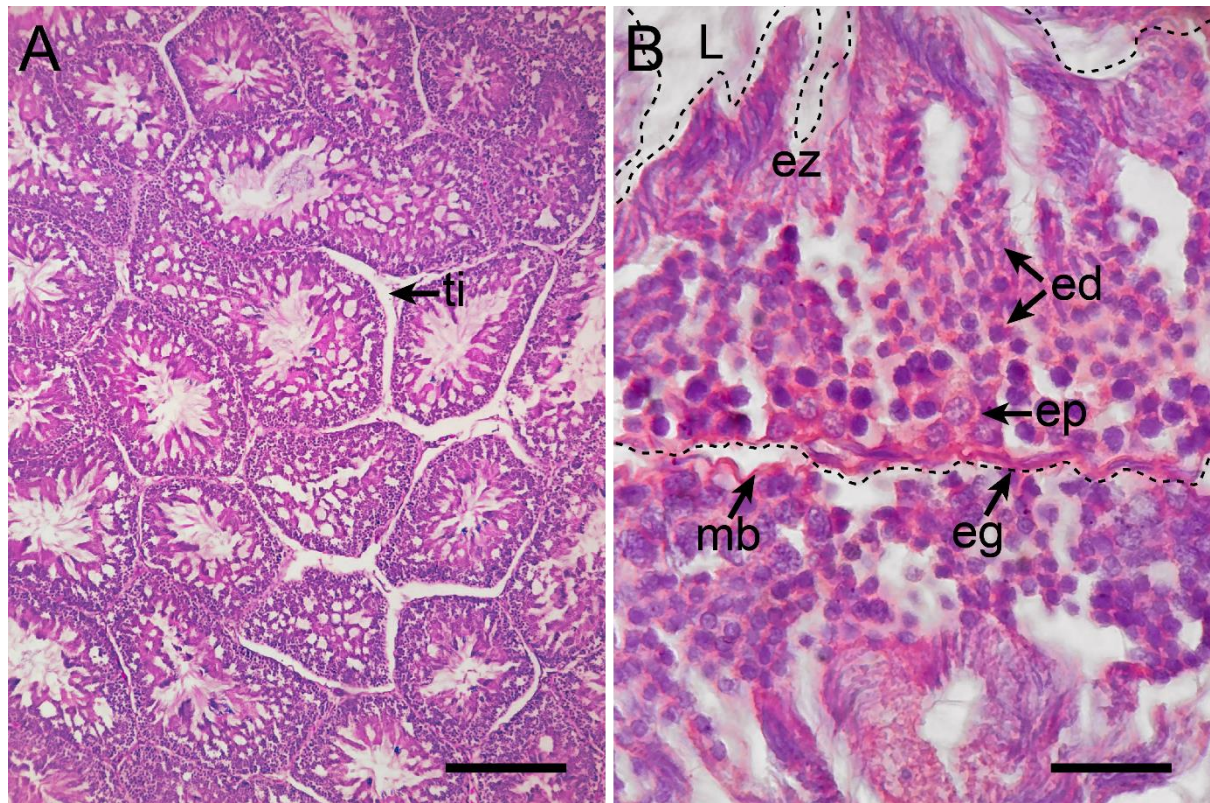
En el **testículo** de los machos adultos de *H. frenatus* se observa un ciclo espermatogénico continuo, cada uno de los estadios espermatogénicos se encuentra en los túbulos seminíferos; las agrupaciones de espermatozoides son fácilmente identificables hacia el lumen del túbulo seminífero (**Figura 13**). En el **epidídimo** se presentan agrupaciones de espermatozoides en el lumen (indicando que se trata de un individuo adulto o que ya es sexualmente activo), el epitelio luminal es columnar simple, por debajo del cual se observa escaso tejido conjuntivo y más externamente fibras delgadas de músculo liso (**Figura 14**).

Figura 12. Testículo de *E. jonhstonei*, túbulos seminíferos con objetivos de 40 y 100x.



Nota: Túbulos seminíferos (ts); túnica albugínea (alrededor del conjunto de túbulos seminíferos) (ta); espermatozoides luminales (ez); túnica albugínea (ta); células de Sertoli (cs); cisto de espermatocitos primarios (ep); cisto de espermatocitos primarios (edp); cisto de espermátidas tempranas (eda). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

Figura 13. Testículo de *H. frenatus* con objetivos de 40x y 100x.



Nota: Túbulos seminíferos (A); tejido intersticial (c); epitelio germinal (va desde la membrana basal hasta los espermatozoides, contiene cada fase de la espermatogénesis) (eg); membrana basal (mb); espermatoцитos (ep); espermátidas (ed) tempranas (redondas) y avanzadas (alargadas); espermatozoides (ez); luz del túbulo seminífero (L). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

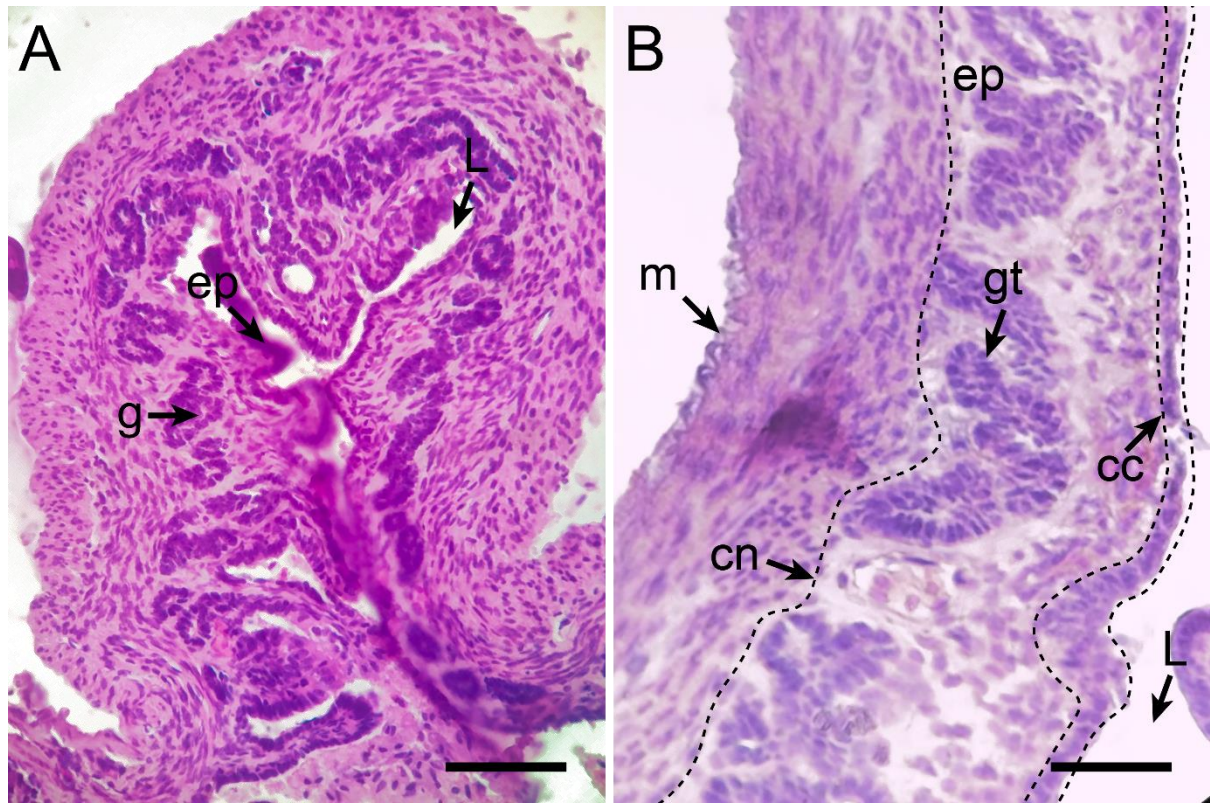
Figura 14. Epidídimo de *H. frenatus* con objetivos de 40x y 100x.



Nota: Epidídimo convoluto, cada unidad observada (ce, delimitada por líneas punteadas) es el mismo conducto que aparece en el corte; epitelio columnar simple (ep); tejido conjuntivo (tc); núcleo de las células columnares del epitelio (cc); espermatozoides en el lumen del conducto (ez). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

Los oviductos de *H. frenatus* están rodeados por serosa y una capa fina de fibras musculares; en el infundíbulo, en la parte interna es más alargada presentando pliegues, estos pliegues oviductales delimitan el lumen, así mismo, en el epitelio encontramos células ciliadas y células no ciliadas, las cuales son las responsables de secretar nutrientes, proteínas y calcio para la formación de la cascara del huevo. (**Figura 15**).

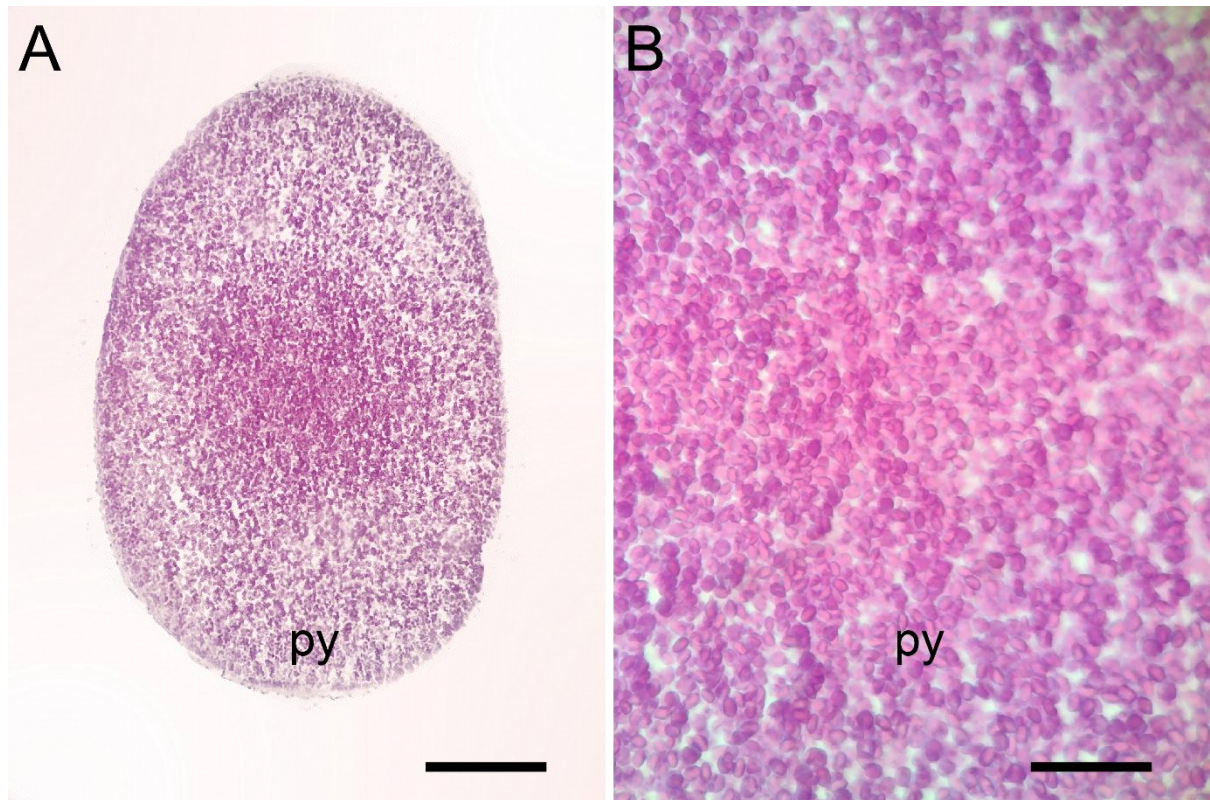
Figura 15. Infundíbulo, conducto ovárico de *H. frenatus* con objetivos de 40x y 100x.



Nota: Epitelio luminal (ep); formado por células ciliadas del epitelio (cc) y células no ciliadas del epitelio (cn); células glandulares tubulares (gt); lumen (L); fibras musculares lisas (m). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

En el **folículo vitelogénico** de una hembra adulta *E. jonhstonei* se encuentra el citoplasma del ovocito repleto de plaquetas de yema y algunas vacuolas, indicando que este individuo está en una fase de vitelogénesis (**Figura 16**).

Figura 16. Folículo vitelogénico de *E. jonhstonei* con objetivos de 40x y 100x.

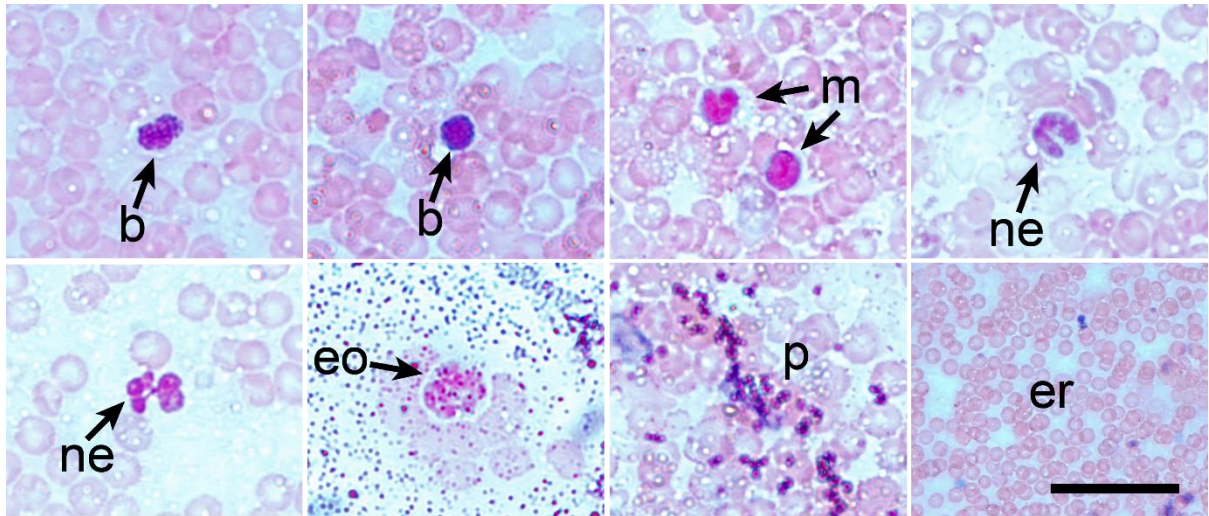


Nota: Plaquetas de yema (py). La escala representa 50 micras (A) y 20 micras (B).

Tejido sanguíneo

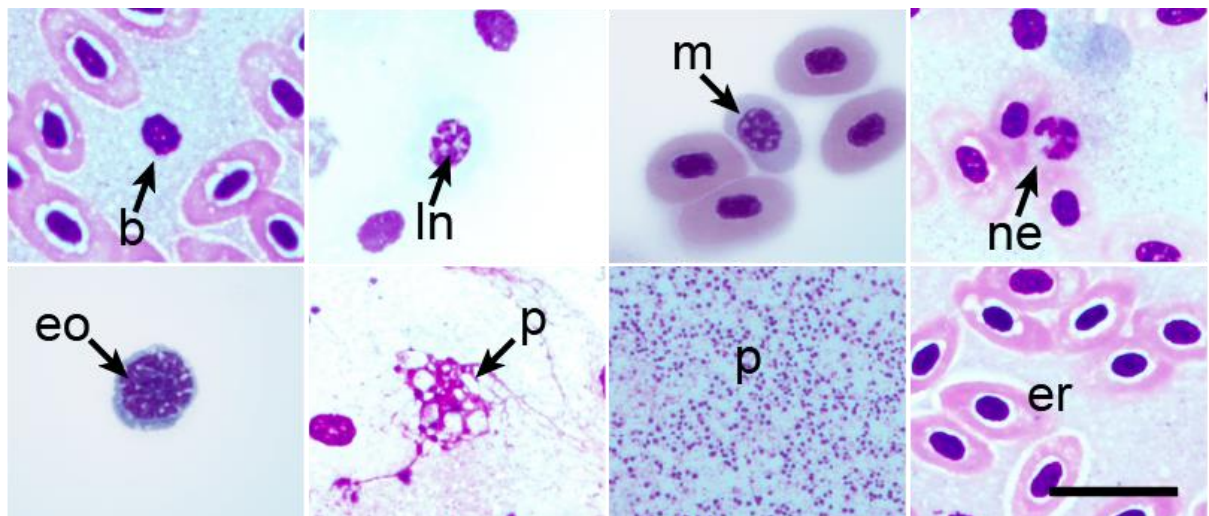
En los **frotis sanguíneos** de *M. musculus* y *H. frenatus* se encontraron neutrófilos (glóbulos blancos), plaquetas y eritrocitos (glóbulos rojos) en gran abundancia, dentro de los cuales se identificaron monocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, así mismo, se observan eritrocitos maduros en gran medida en todo el frotis de *M. musculus* (**Figura 17**), en *H. frenatus* se observa que los eritrocitos son elípticos y nucleados (**Figura 18**).

Figura 17. Sangre de *M. musculus* con objetivos de 100x.



Nota: Basófilo (b); monocito (m); neutrófilos (ne); eosinófilos (eo); plaquetas (pl); eritrocitos (er). La escala equivale a 20 micras y 50 micras para los eritrocitos.

Figura 18. Sangre de *H. frenatus* con objetivos de 100x.



Nota: Basófilo (b); linfocito (ln); monocito (m); neutrófilos (ne); eosinófilos (eo); plaquetas (pl); eritrocitos (er). La escala equivale a 20 micras y 50 micras para los eritrocitos.

4. Discusión

La histología como pilar en la docencia e investigación

En este estudio se buscó identificar y describir la morfología tisular de diferentes sistemas de órganos en vertebrados, específicamente en *M. musculus*, *E. jonhstonei* y *H. frenatus*, mediante la preparación de láminas histológicas y la toma de fotografías de las mismas se crea la colección histológica de la Escuela de Biología de la UIS, generando un recurso valioso que puede ser utilizado tanto por estudiantes en su proceso de aprendizaje como por docentes e investigadores en el campo de la biología.

Una colección histológica proporciona material de fácil acceso y una herramienta fundamental para la preparación de clases, la realización de investigaciones y el estudio detallado de la estructura tisular de los organismos seleccionados. Así mismo, se ha visto que la histología como disciplina, abarca diversas habilidades que son esenciales para comprender y analizar los tejidos biológicos. Estas habilidades incluyen la capacidad de reconocer y comprender las características morfológicas y funcionales de los tejidos, la capacidad de identificar diferentes tipos de células, tejidos y órganos a partir de micropreparados, y la habilidad de interpretar estos micropreparados (Rodríguez, 2014). La correcta aplicación de las técnicas histológicas favorece a la creación de imágenes mentales que, cuando se asocian con conceptos, se convierten en herramientas poderosas para comprender el funcionamiento de las estructuras tisulares (Ortiz & Merchán, 2012). Es así, que esta colección histológica facilita la investigación y el avance científico al proporcionar un punto de partida para futuros estudios comparativos y exploraciones en el campo de la morfología tisular de los vertebrados.

La histología no solo es fundamental para lo anterior, sino que también desempeña un papel crucial en la identificación de patologías (Moxham et al., 2017; Carneiro et al., 2023). Un

ejemplo revelador se observó en las muestras de *E. johnstonei* usadas, donde se detectaron pequeños puntos dispersos en el hígado, conocidos como melanomacrófagos, acumulaciones celulares que resultan de la exposición a contaminantes y que por ello son utilizados como indicadores de la presencia de sustancias tóxicas en áreas específicas, aportando así información sobre el estado de salud de los organismos y alertando de manera temprana sobre posible daño tisular (Fragoso, 2010; Sanz-Ochotorena et al., 2021).

Histología: perspectiva tisular

Al estudiar el desarrollo de los sistemas de tejidos, se pueden obtener datos relevantes para realizar análisis epidemiológicos y comparar las estructuras entre diferentes grupos. A su vez relacionar las diversas características de los individuos con factores evolutivos que han tenido cada una de las especies. Mediante el uso de la histotecnica es posible analizar diferencias en la espermatogénesis de especies como *E. johnstonei* y *H. frenatus*, donde la espermatogénesis en *E. johnstonei* es de tipo cística, en los cuales se agrupan cada uno de los estadios espermáticos, a diferencia de *H. frenatus*, en donde las células germinales se encuentran distribuidas por todo el túbulo en diferentes etapas del desarrollo, desde las espermatogonias hasta los espermatozoides maduros (y es similar al proceso evidenciado en aves y mamíferos) (Rodríguez-Gómez et al., 2018; Carezzano et al., 2013). También se asocia la presencia de las células de Leydig en el tejido intersticial del testículo, actuando como responsables de la producción de hormonas, principalmente testosterona. Por otro lado, los conductos eferentes y deferentes, son los encargados del transporte de espermatozoides durante la eyaculación, y finalmente se observaron las células de Sertoli que se encuentran en los túbulos son las encargadas de dar soporte estructural, nutrir y permitir el desarrollo y maduración de las células germinales (Rodríguez-Casuriaga, 2011).

El intestino de *M. musculus* está compuesto por tres estructuras: la mucosa, la submucosa y la musculatura. La primera, presenta epitelio en forma de vellosidades, encargadas de la absorción; glándulas que liberan las enzimas del proceso digestivo. En la submucosa se encuentran las glándulas submucosas, tubulares y ramificadas las cuales segregan el moco que lubrica la parte interna del intestino (Moreno-Duran et al., 2007). En la muscular existen dos capas: circular interna y longitudinal externa. La interna formada por fibras que rodean el intestino en forma de anillos; y la externa con fibras que se disponen a lo largo del intestino, estas capas musculares se encargan en conjunto de generar los movimientos peristálticos característicos del intestino (Ferrufino et al., 1996).

En el estómago de *M. musculus*, *H. frenatus* y *E. johnstonei*, como en la mayoría de los mamíferos, reptiles y anfibios; y de manera muy similar al intestino, presentan tejidos que permiten la digestión y procesamiento de alimentos (Hiyagón, 2014). A nivel general, el estómago posee una capa mucosa, revestida por epitelio especializado con glándulas que segregan moco para proteger el revestimiento interno del estómago de los ácidos gástricos (López-López et al., 2007). La capa muscular está formada por dos capas principales de musculo liso, una circular interna y una longitudinal externa, que en conjunto permiten la contracción muscular durante la digestión; finalmente, la capa serosa o peritoneo visceral, cubre la superficie externa del estómago, se compone de tejido conectivo y epitelio, dando lubricación al estómago, permitiendo su movimiento en la cavidad abdominal (Illanes et al., 2006). Entre mamíferos, reptiles y anfibios hay varias diferencias en cada una de las capas descritas: la capa mucosa de mamíferos tiene un revestimiento glandular más complejo debido a la mayor cantidad de células y funciones, lo cual puede estar asociado con la dieta y complejidad de alimentos y presas de cada especie (Jaffé, 2002).

A nivel histológico el pulmón está compuesto por bronquiolos, alveolos y tejido conjuntivo (Castro, 2019). A diferencia de los mamíferos, en anfibios la red alveolar es más simple, el epitelio alveolar está en contacto directo con los capilares sanguíneos, estos sacos alveolares se encuentran conectados dentro del tejido pulmonar (Sánchez & Concha, 2018; Castro, 2019). En los geckos se tiene una estructura pulmonar en forma de saco, y es allí donde ocurre el intercambio gaseoso, es una estructura más parecida a la de anfibios que a la de mamíferos (Perry et al., 1994).

El riñón desempeña funciones esenciales en las tres especies, como la excreción de desechos, producción de hormonas, regulación de líquidos, entre otras, siendo de vital importancia. En los diferentes grupos se encuentran distintos tipos de riñones: *M. musculus* y *H. frenatus* poseen riñones metanefros y *E. johnstonei* un riñón de tipo mesonefro (Estrada & Uribe, 2002; Sanz-Ochotorena et al., 2011). A pesar de esta diferencia, su estructura es similar y comparte tejidos y principalmente funciones; la corteza renal contiene los corpúsculos y túbulos renales, lugar donde se da la filtración de la sangre y reabsorción y secreción de líquidos respectivamente; la medula renal, encargada de concentrar la orina en el riñón; los vasos sanguíneos se encargan de suministrar oxígeno necesario para la función renal y el tejido intersticial rodea y soporta las estructuras renales (Estrada & Uribe, 2002).

En las tres especies se tienen hepatocitos (células que constituyen la mayoría del tejido encargados de la síntesis de proteínas, producción de bilis y almacenamiento de lípidos), sinusoides hepáticos (son vasos sanguíneos especializados que se encuentran inmersos entre los hepatocitos, encargados del intercambio entre la sangre y los hepatocitos), y células de Kupffer (fagocitan y eliminan partículas extrañas, indispensables en la respuesta inmunológica del hígado) (Sanz-Ochotorena et al., 2011; López et al., 2011). En el caso particular de *E.*

jonhstonei y *H. frenatus*, fueron hallados melanomacrófagos, son células de Kupffer con una alta concentración de melanina y desechos, siendo indicadores de contaminantes (Fragoso, 2010; Sanz-Ochotorena et al., 2021).

5. Conclusiones

Se logró obtener micropreparados histológicos mediante la correcta ejecución de la histotecnica. Contar con tejidos frescos no garantiza la obtención de láminas propicias para el estudio de las estructuras tisulares, pues el éxito de la histotecnica comprende desde el proceso de fijación, pasando por la deshidratación, corte, tinción y final montado de las mismas.

La creación de estas láminas permite iniciar con una base fundamental para crear una colección completa de micropreparados histológicos, la cual es y será útil y de gran ayuda en la formación de los futuros Biólogos de la UIS, así mismo, fomentará entre los estudiantes el interés en el área de la histología, impulsando el desarrollo de estudios e investigaciones tanto en descripción, desarrollo y comparación de y entre especies.

Referencias bibliográficas

Battersby, S, Hirschhorn, R. Amman, B. (2008). Commensal rodents. En: Bonnefoy, X., Kampen, H., Sweeney, K. (eds.). *Public health significance of urban pests. World Health Organization, Copenhagen*. pp 387–419.

Caicedo-Portilla, R. & Dulcey-Cala, C. (2011). Distribución del gecko introducido *Hemidactylus frenatus* (Dumeril y Bribon 1836) (Squamata: Gekkonidae). *Colombia Biota colombiana*, 12(2).

Carneiro, M. Quenta-Huayhua, M. Peralta-Mamani, M. Honório, H. Santos, P. Rubira-Bullen, I. & Rubira, C. M. F. (2023). Clinicopathological analysis of actinic cheilitis: a systematic review with meta-analyses. *Head and Neck Pathology*, 1-14.

Carezzano, F., Urquiza, S. P., Dorflinger, K., & Alonso, M. (2013). Testicular morphohistology of *Odontophrynus americanus* (Dumeril & Bibrón, 1841) (Anura, Odontophrynidae) of Argentina. *The Biologist*, 11(1), 119-129.

Castro, L. (2019). Comparación anatómica e histológica de los pulmones del cuy (*Cavia porcellus*) nacidos en la sierra y en la costa. Tesis para optar el Título profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo. <https://hdl.handle.net/20.500.12893/5783>

De Juan, J. (1999). El Concepto de Histología a través de los textos. ¿De qué están hechos los organismos? El nacimiento de la mirada histológica. *Publicaciones de la Universidad de Alicante, España*. pp. 117-119.

Díaz-Pérez, J. Sampedro-Marín, A. Ramírez-Pinilla, M. (2017). Actividad reproductiva y dieta de *Hemidactylus frenatus* (Sauria: Gekkonidae) en el norte de Colombia. *Papéis Avulsos de Zoologia. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*. 57 (36), 459-472.

Estrada, E. Uribe, M. (2002) *Atlas de histología de vertebrados*. Universidad Nacional Autónoma de México. Coordinación de servicios editoriales, Las prensas de Ciencias.

Ferrufino, J. Taxa, L. Angeles, G. (1996). Histología normal del intestino delgado. *Revista Médica Herediana*, 7 (1), 46-57.

Fonseca, F. (2016). Descripción macroscópica y microscópica del tracto reproductivo en machos de *Macroperipatus aff. grey* (Onychophora: Peripatidae). Tesis de Pregrado. Universidad Industrial de Santander. http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/pags/cat/popup/pa_detalle_matbib_N.jsp?parametros=178588|%20|58|115

Fragoso, M. (2010). Evaluación morfológica del bazo de sapo gigante (*Rhinella marina*), expuesto a una mezcla de contaminantes en la zona de Coatzacoalcos, Veracruz. Tesis de Maestría. Repositorio Nacional Conacyt. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/3663>

Gómez, D. & Ramírez-Pinilla, M.P. (2004). Ovarian histology of the viviparous matrotrophic lizard *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology* 259, 90-105.

Hernández-Córdoba, O. (2018). Hábitos alimenticios de una población de *Eleutherodactylus johnstonei* en una zona a las orillas del río Meléndez, al sur de Cali, Valle del Cauca. *Revista de Ciencias, Universidad del Valle*, 18 (2), 153-160.

Hiyagón, S. (2014). Estudio morfométrico del estómago del cobayo (*Cavia porcellus*) lactante. Tesis para optar el Título profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/3713>

Illanes, J. Fetilio, B. Chamblas, M. Leyton, V Verdugo, F. (2006). Descripción histológica de los diferentes segmentos del aparato digestivo de avestruz (*Struthio camelus var. domesticus*). *International Journal of Morphology*. 24(2), 205-214.

Jaffé, W. (2002). Curso de postgrado en planificación alimentaria y nutricional. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 15(1), 42-43.

Lizcano, S. (2017). Caracterización y descripción de los estadios embrionarios de la raya dulce acuícola *Potamotrygon magdalenae*. Tesis de Pregrado. Universidad Industrial de Santander.

http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/pags/cat/popup/pa_detalle_matbib_N.jsp?parametros=181385|%20|55|92

Lopez, B. Tsai, M. Baratta, J. Longmuir, K. & Robertson, R. (2011). Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice. *Comparative hepatology*, 10(1), 1-10.

López-López, V. V., Galavíz, M. A., Román Reyes, C., Medina-Hernández, E. A., Dabrowski, K., & Haws, M. C. (2015). Descripción histológica comparativa del desarrollo del sistema digestivo y visual de larvas de chame *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae). *Latin american journal of aquatic research*, 43(3), 484-494.

Lutz, B. (1954). Anfíbios anuros do Distrito Federal/The frogs of the Federal District of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro 52: 155–197 (Portuguese), 219–238.

Moreno-Durán, C., López-Hurtado, C., & Ruiz-Sanchez, F. (2007). Histología del sistema digestivo de *Didelphis albiventris* (Lund, 1840). *Universitas Scientiarum*, 12(1), 41-53.

Moxham, B. Emmanouil-Nikoloussi, E. Brenner, E. Plaisant, O. Brichova, H. Kucera, T. & Chirculescu, A. (2017). The attitudes of medical students in Europe toward the clinical importance of histology. *Clinical Anatomy*, 30(5), 635-643.

Ortega, J. Serrano, V. & Ramírez-Pinilla, M. P. (2005). Reproduction of an introduced population of *Eleutherodactylus johnstonei* at Bucaramanga, Colombia. *Copeia*, 2005(3), 642-648.

Ortiz, S. & Merchán, N. (2012). Significado del aprendizaje y la enseñanza de la anatomía: contribuciones desde las percepciones de los estudiantes. *Zona Próxima*, (17), 24-37.

Páez, V. Bock, B. Gutiérrez, P. García, J. (2002). Guía de campo de algunas especies de anfibios y reptiles de Antioquia. Universidad de Antioquia.

Panti-May, J. Gurubel-González, Y. Palomo-Arjona, E. Cetina-Trejo, R. Machain-Williams, C. Robles, M. Hernandez-Betancourt, S. (2018). Características poblaciones de *Rattus rattus* y *Mus musculus* presentes en comunidades rurales de Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 21: 345-356.

Perry, S. F., Hein, J. & Van Dieken, E. (1994). Gas exchange morphometry of the lungs of the tokay, *Gekko gecko* L. (Reptilia: Squamata: Gekkonidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 164, 206-214.

Rodríguez-Casuriaga, R. (2011.). Análisis de la espermatogénesis del cobayo mediante citometría de flujo, y desarrollo de un método de purificación de células en profase meiótica temprana. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/3908>

Rodríguez, L. (2014). Metodologías de enseñanza para un aprendizaje significativo de la histología. *Revista Digital Universitaria*. revista.unam.mx. 15 (11). ISSN 1607 – 6079. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art90/>

Rodríguez-Gómez, Y. Ochotorena, A. Lara-Martínez, R. Segura-Valdéz, M. Jiménez-García, L. (2018). Comprender la espermatogénesis en anfibios y Reptiles: un reto para los estudiantes de la carrera de biología. Convención Internacional de Ciencias Morfológicas IV

Congreso virtual de Ciencias Morfológicas IV Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal.

Romero de Pérez, G. & Ramírez-Pinilla, M.P. (2002). El tracto reproductivo de la hembra en Crocodylia: estudio histológico y ultraestructural de Caiman *Crocodylus fuscus* (Alligatoridae). *Acta Biológica Colombiana*. 7(1):3-19.

Rueda-Cediel, P. Kattan, G. Ramírez-Pinilla, M.P. (2008). Ovarian and oviductal morphology of a brood parasitic bird, *Molothrus bonariensis* (Passeriformes, Icteridae). *Acta Zoológica*. 89:261-276.

Sánchez, T., & Concha, I. (2018). Estructura y funciones del sistema respiratorio. *Neumología pediátrica*, 13(3), 101-106.

Sanz-Ochotorena, A. Segura-Valdés, M. Rodríguez-Gómez, Y. Lara-Martínez, R. & Jiménez-García, L. (2011). Pigmentos en los testículos de cinco anfibios endémicos de Cuba (*Eleutherodactylus turquinensis*, *E. cuneatus*, *E. glamyrus*, *Bufo longinasus longinasus* y *B. longinasus cajalbanensis*). *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 14(1), 30-37.

Sanz-Ochotorena, A. Rodríguez, Y. Segura-Valdés, M. Lara-Martínez, R. Jiménez-García, L. (2021). Alteraciones histopatológicas en el hígado del sapo *Peltophryne empusa* (Anura: Bufonidae) del Occidente de Cuba: ¿señal de alarma? *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 9 (1) ene-jun. 1-7.

Serrano-Pérez, C. A., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2021). Morphology and histology of the male reproductive tract of *Caecilia thompsoni* (amphibia: Gymnophiona). *The Anatomical Record*, 304(5), 1119-1135.

Valencia, L. García, A. Ramírez-Pinilla, M. P. & Fuentes, J. (2011). Estimates of DNA damage by the comet assay in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura, Eleutherodactylidae). *Genetics and Molecular Biology*, 34, 681-688.