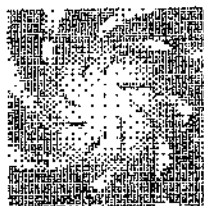


**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE *Batrachophrynus macrostomus*
Peters 1873 "rana de Junín" (Anfibia: Anura: LEPTODACTYLIDAE)
Y SUS IMPLICANCIAS REPRODUCTIVAS.**

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Bach. MIKELO NOVA HEREDIA DIAZ

LIMA, PERU

1999

RESUMEN

Se describe la morfología espermática en nueve especímenes de *Batrachoprhnus macrostomus*, teniendo como indicadores la forma y tamaño de la cabeza y cola.

Se encontró que el espermatozoide tiene organización lineal; su cabeza es vermiforme con un acrosoma cónico y una cola compuesta de un solo flagelo. El tamaño de su cabeza es 18.91 μm y del acrosoma es 2.74 μm , estas características descritas son propias de especies de anuros que presentan fecundación externa y comunes a especies de la familia Leptodactylidae; la longitud de su flagelo es de 33 μm .

El conocimiento de la forma y tamaño espermático de *B. macrostomus* será fundamental para el establecimiento de un patrón de morfología espermática que sirva como indicador de la fertilidad.

INDICE

I.-INTRODUCCION	9
II.-ANTECEDENTES	11
III.- MATERIALES Y METODOS	16
1.- Muestra Biológica	16
2.- Morfología Espermática	17
2.1.- Estudio de la Morfología Espermática	17
2.1.1.- Tinción Hematoxilina-Eosina	17
2.1.2.- Tinción Giemsa	18
3.- Tratamiento de Datos	18
IV.- RESULTADOS	20
1.- Muestra Biológica	20
2.- Morfología Espermática	20
V.- DISCUSION	23
VI.- CONCLUSIONES	27
VII.- RECOMENDACIONES	28
VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29
IX.- ANEXOS	35
- TABLAS	36
- FIGURAS	39

I.- INTRODUCCION

Las especies de anfibios tienen gran importancia por su indispensable papel en la cadena trófica, servir como una fuente alternativa de proteína animal y por contener principios activos de uso medicinal. En las últimas décadas sus poblaciones han disminuido ostensiblemente por alteraciones ambientales como la existencia de residuos químicos empleados en la agricultura y minería, que remedan la actividad de hormonas naturales provocando la disminución del número de espermatozoides y alteraciones en el aparato reproductivo masculino. Por otro lado, la reducción de la capa de ozono permite la incidencia de los rayos UV, provoca alteraciones al nivel de DNA en huevos de anfibios. Además, la destrucción de sus hábitats, su caza para consumo humano y su empleo como atractivo visual han colocado a algunas especies de este grupo en situación vulnerable.

Batrachoprhnus macrostomus "rana de Junín" es una especie endémica de los lagos altoandinos del Perú, que se encuentra inmersa en esta problemática, al estar en vías de extinción por la alta tasa de depredación a la que ha estado sujeta, por su valor proteico y económico en el mercado local, así como la destrucción de

su hábitat por contaminación minera, aguas residuales y variaciones de los niveles del agua de los lagos.

Para evitar la extinción de la especie se han desarrollado programas de crianza en cautiverio de *B. macrostomus* con parcial éxito, debido al desconocimiento de aspectos básicos de la biología reproductiva como la morfología, la motilidad y concentración espermática, la interacción entre gametos, la composición de los huevos y de las condiciones de fertilización. Conocimientos necesarios para el adecuado manejo reproductivo en cautiverio de la especie y su posterior reintroducción a su hábitat natural.

De lo anterior, se desprende que es necesario implementar programas de manejo y conservación de esta especie, que incluyan el estudio de la biología reproductiva.

En el presente trabajo se hace una descripción de la morfología espermática de *B. macrostomus*, que servirá para el establecimiento de un patrón de morfología espermática ha ser empleado como indicador de fertilidad y en el manejo reproductivo en cautiverio de la especie.

II.- ANTECEDENTES

Debido a la importancia de los caracteres morfológicos de los espermatozoides como indicadores de fertilidad y el ser empleados para establecer relaciones filogenéticas, se plantearon líneas de estudio conducentes a entender la estructura y ultraestructura de los espermatozoides de los diferentes taxa de anfibios.

En los anuros, el estudio de la morfología espermática empezó con Broman (1901 y 1907), quien describe el espermatozoide de *Pelobates fuscus* y *Rana fusca*; al mismo tiempo Ballowitz (1903, 1905 y 1906) describe los espermatozoides de *Discoglossus pictus*, *Pelodytes punctatus* y *Rana muta*.

En 1906, Retzius utilizando caracteres espermáticos define cual es el tipo de espermatozoide plesiomórfico de los anfibios, que está compuesto de una cabeza pequeña, de forma cónica a ovoidal cubierta en su parte superior por un acrosoma pequeño, una pieza intermedia corta y con un solo flagelo en la cola. Caracteres que los diferencian de los espermatozoides apomórficos en cada especie (Kwon y Lee, 1995).

La morfología espermática en los anfibios es el resultado de cambios citoplasmáticos y nucleares durante la espermatogénesis, siendo Champy y Coujard (1939) quienes describirán estos cambios y los relacionarán con la forma del espermatozoide en varias especies de batracios como *Paramesotriton deloustali*, *Pleurodeles waltii*, *Ichthyophis glutinosa*, *Rana granami*, *Rana erythraea*, *Xenopus laevis*, *Bufo melanostictus* y *Leptodactylus pentadactylus*, denotando que la forma del espermatozoide de ésta última especie, está compuesta por una cabeza fusiforme y una cola con un solo flagelo.

Favard (1955) describe la espermatogénesis y las características morfo-espermáticas de *Discoglossus pictus* (urodela: anfibia). Pisano y Adler (1968) estudian las espermatides en *Telmatobius haughalis schreiteri*, miembro de la familia Leptodactylidae y que habita en condiciones extremas de temperatura, reportando que tiene un ciclo continuo durante todo el año y no hay diferencias con especies que habitan en condiciones menos extremas como *Bufo rangeri*.

Kalt (1976) estudia la morfología y cinética de la espermatogénesis en *Xenopus laevis*.

Lee y Kwon en 1992, estudian la espermatogénesis, a nivel ultraestructural, de *Hyla japonica* con la finalidad de establecer diferencias con los espermatozoides de *Bufo sp* y Kazufumi et. al (1995) emplea la microscopía electrónica para aclarar

el proceso complicado de la ploriferación de la espermatogonía por divisiones mitóticas en *Xenopus laevis* y su influencia en la morfología espermática.

Paralelamente a los estudios de la espermatogénesis en los anfibios, Seshachar (1943) compara las diferencias morfológicas de los espermatozoides entre los ordenes de la clase anfibia, describiendo un espermatozoide simple para los anuros, mientras que los ápodos presentan un espermatozoide con un acrosoma en forma de bulbo, y los Urodelos; presentan un espermatozoide alargado y un filamento accesorio en la cola. Estos antecedentes fueron empleados por Barbieri (1950), quien describió los espermatozoides de batracios del genero *Leptodactylus*, concluyendo que la similitud en los caracteres citológicos no deben ser aceptados como criterio de diferenciación entre especies. Pero Fouquette (1994) determinaría relaciones filogenéticas empleado los caracteres morfológicos de los espermatozoides de 194 especies de anuros.

En el estudio comparativo de la ultraestructura de los espermatozoides en especies de diferentes taxas, Fawcett (1970) concluye que las características morfológicas de las células espermáticas son el resultado de su herencia filogenética y solo una pequeña proporción de variaciones estructurales en la morfología del esperma en cualquier taxón puede ser directamente asociada con su fertilización. Sin embargo, Frazen (1977) encuentra que la morfología espermática generalmente esta correlacionada mejor con la biología reproductiva que con la taxonomía y Afzelius (1979) postula que la estructura del espermatozoide es el resultado de su herencia filogenética y de las adaptaciones funcionales (fertilización).

En 1975 Furieri, describe la morfología espermática de *Bombina variegata* y su relación con el tipo de reproducción, postulando que las especies que presentan fertilización externa mantienen un espermatozoide con organización lineal y un solo flagelo. Van der Horst (1979) describe los espermatozoides de tres especies de anuros, *Xenopus laevis*, *Bufo Rengeri* y *Pyxicephalus delandii cryptotis*, reportando que las células espermáticas de estas especies presenta caracteres propios de espermatozoides con fertilización interna y externa. En 1989, Van der Horst *et. al*, comparan los espermatozoides entre especies de diferentes taxas de vertebrados e invertebrados, reportando que la composición de la cola y el número de mitocondrias contribuirán a comprender la relación entre los caracteres morfológicos y el tipo de fertilización.

El proceso de fecundación en los anfibios es similar al que acontece en los mamíferos (Gwatkin y Williams, 1970). Diferenciándose en la necesidad del espermatozoide de penetrar las numerosas capas del huevo para ser capacitado y poder fertilizar, al mismo. En 1971a,b Elison, describe el proceso de fecundación externa en los anfibios *Bufo americanus* y *Rana pipens*, demostrando que la actividad lítica del acrosoma y la composición de las membranas de los oocitos son fundamentales para el proceso de fecundación y la interacción entre los gametos, además del medio en que se encuentren. En 1974, Brandon *et. al* postula que la morfología de la cabeza del espermatozoide juega un papel importante en la fecundación, por estar relacionadas con el grosor de la membrana de los huevos.

En 1979 Ficheral, describe la estructura y funcionalidad de los espermatozoides de algunos anfibios, proponiendo que los estudios de la morfología y estructura de los espermatozoides deben ser enfocados desde el punto de vista bioquímico y en función con las condiciones de fertilización.

De este modo Swan *et. al* (1980) estudia el tipo de movimiento espermático en *Bufo marinus*, concluyendo que está determinado por la composición de la cola, el tamaño de la pieza intermedia y el número de mitocondrias, además del medio donde se realizará la fertilización. Del mismo modo, Mainoya (1981) establece esta relación en *Chiromantis xerampelina* (Anura: Rhacophoridae).

Por otro lado, Van der Horst *et. al* (1995) asocia el tamaño del acrosoma y cabeza con el tipo de fertilización en especies de anuros africanos, diferenciándose del orden Urodela. Al ser el tamaño de la pieza intermedia la que indicará el tipo de fecundación para especies de éste orden (Kwon y Lee, 1995).

III.- MATERIALES Y METODOS

1.- Muestra Biológica

Los anuros del género *Batrachophrynus macrostomus* "Rana de Junin" fueron colectados de la Laguna de Punrum que se encuentra en el Departamento de Pasco, a una altitud de 4500 msnm en la Ecorregión Puna.

Los caracteres externos han sido identificados de acuerdo a la guía elaborada por Sinsch (1986).

Los ejemplares, en número de nueve, fueron sacrificados por inmersión en una solución de cloretona al 1%, sustancia que adormece al animal hasta descerebrarlo, de esta forma se guarda flácido y maniobrable.

Para la fijación se empleó una bandeja con un papel secante y humedecido con formol al 10%, se extendió al espécimen en el papel de tal forma que queden sus

dedos abiertos y las patas posteriores encogidas en posición de descanso. El proceso de fijación tiene una duración de 24 horas, aproximadamente. Luego fueron empaquetados en gasa empapada en formol y embolsados herméticamente para su traslado al Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

2.- Morfología Espermática.

Para analizar la morfología espermática se procedió de la siguiente manera:

- Se removieron los testículos y se colocaron en un disco de cultivo Falcon 3001 que contenía agua destilada.
- Con la ayuda de pinzas finas se trituraron los testículos y se obtuvo una "suspensión espermática", que fue utilizada para el estudio 2.1.

2.1.- Estudio de la Morfología espermática

2.1.1.- Tinción Hematoxilina-Eosina

- De la suspensión espermática se tomó 10 μ l y se realizó un frotis en una lámina portabjeto, la cual se dejó secar.
- Se fijó la lámina con etanol al 96%.
- Para colorear se empleó Hematoxilina por un minuto y Eosina por 3 minutos, con un intervalo de tiempo para el lavado del colorante y el

secado de la lámina.

2.1.2.- Tinción Giemsa

- De la suspensión espermática se tomó 10 μ l y se realizó un frotis en una lámina portaobjeto, la cual se dejó secar.
- Se fijó la lámina con metanol. Coloreándose con Giemsa (4%) por 30 minutos.
- Luego se lavó con agua destilada.
- Se dejó secar a temperatura ambiente.

Para describir la forma y el tamaño espermático de *B. macrostomus* se contabilizaron 100 células espermáticas por individuo, empleándose un microscopio de campo claro marca Nikon con filtro azul para obtener luz blanca; las observaciones se realizaron con objetivos de 400 y 1000 aumentos; con ocular micrométrico y la lámina patrón para las mediciones. Se tomaron microfotografías empleando una cámara Nikon FX-35 y películas ASA 400 KODAK adaptadas al microscopio.

3.- Tratamiento de Datos.

Empleando el programa STATGRAPHICS 6.0 se determinaron:

- Las medidas de tendencia central : para las longitudes de cabeza, acrosoma y flagelo.

- Los cuartiles y el diseño del gráfico de cajas.
- El análisis de correlación entre las variables : longitud de cabeza, longitud de acrosoma y longitud del flagelo.

IV.- RESULTADOS

1.- Características biométricas y morfológicas

B. macrostomus, presenta piel dorsal de color marrón con manchas oscuras y sin glándulas . La piel de la región abdominal presenta pliegues y vientre blanco con pocos puntos oscuros. Dedos largos y delgados terminados en punta, pies con membrana interdigital completa y tímpano oculto.

Los especímenes estudiados presentan las características que son mencionadas por Sinsch (1986) y determinan a *B. macrostomus*. En estos la media de la longitud hocico-año (SVL) es de 127.33 mm y la longitud de la pata posterior (PL) es de 191.77 mm (Tabla 1).

2.- Morfología y Tamaño espermático

Para la descripción de los espermatozoides de anuros se ha considerado el plan de organización (Furieri, 1975): la forma del acrosoma, la cual es cónica o

sacular, y la forma de la cabeza, que se clasifican en fusiforme, cuneiforme y vermiforme. Además, del número de flagelos, que pueden ser simples o dobles.

Los espermatozoides de *B. macrostomus*, muestran un plan básico lineal de organización, que se compone de una cabeza y un flagelo. Con la coloración Giemsa se observa una cabeza delgada, larga y vermiforme, diferenciándose el acrosoma (Fig. 2). Considerándose para las mediciones: el acrosoma, la parte media y el núcleo como una unidad.

El espermatozoide *B. macrostomus* presenta un acrosoma en la parte anterior de la cabeza, que se visualizó utilizando el colorante Giemsa (Fig. 2) observándose la forma cónica en la Figura 1.

Los espermatozoides de anfibios se diferencian en la estructura de la cola, variando en el número de flagelos. *B. macrostomus* presenta un sólo flagelo que fue observado empleando la coloración Hematoxilina-Eosina (Fig. 3).

Para *B. macrostomus* la longitud de la Cabeza (HL) es de $18.91 \mu\text{m} \pm 2.88$ (Tabla 2), confirmándose al observar que este valor se encuentra en el intervalo con mayor número de espermatozoides con medidas próximas a la media (Fig. 4). La longitud del acrosoma (AL) es de $2.74 \mu\text{m} \pm 0.51$ (Tabla 2).

La longitud del flagelo (TL) es $10.48 \mu\text{m} \pm 5.42$, observándose longitudes de $33 \mu\text{m}$ y $3 \mu\text{m}$ como valores máximo y mínimo para TL (Tabla 2). Valores que

muestran que las dimensiones del Flagelo presentan mayor dispersión (Fig. 6) en comparación con las dimensiones de Cabeza (Fig. 5).

Como resultado del estudio de las características forma y tamaño de las células espermáticas en nueve especímenes, en la Tabla 3 se observa las longitudes promedio de Cabeza, Acrosoma y Flagelo. Dimensiones que fueron empleadas para establecer relaciones entre las variables HL y AL (Fig. 7), obteniéndose un coeficiente de correlación de Pearson $r = 0.815$, el cual es significativo, porque se observa que la longitud del acrosoma aumenta en proporción que aumenta la longitud de la cabeza. Caso contrario sucede cuando se trata de correlacionar las variables HL y TL (Fig. 8) o AL y TL (Fig. 9) obteniéndose un $r = 0.495$ y $r = 0.264$ respectivamente, considerados no significativos.

V.- DISCUSION

El conocimiento de los hábitos y condiciones de fertilización son importantes para el manejo sostenible de las especies de importancia económica, siendo la descripción de las características morfológicas de los gametos un indicador muy importante para el desarrollo de programas reproductivos integrados.

Los espermatozoides de *Batrachophrynus macrostomus* presenta un plan de organización lineal, que en la mayoría de anfibios esta asociado a la fertilización externa, pero se diferencia de las células espermáticas de *Bombina variegata*, que tiene un plan de organización en paralelo y esta adaptado a la fertilización interna (Furieri, 1975).

El espermatozoide de *B. macrostomus* presenta una cabeza vermiforme con un acrosoma cónico y un solo flagelo, características similares al espermatozoide de *Telmatobius oxycephalus* (Fouquette, 1994). Las cuales son clasificados como caracteres plesiomórficos para la forma de la cabeza y del acrosoma y apómórficos por la composición simple de la cola (Kwon y Lee, 1995). Además, el

espermatozoide de *B. macrostomus* presenta medidas similares en la longitud de cabeza (HL = 18.91 μm) y del acrosoma (AL = 2.74 μm) a las que tienen las especies de la familia Leptodactylidae, como *Leptodactylus wagneri* (HL = 18 μm) y *Leptodactylus pentadactylus* (AL = 2.2 μm). Estos caracteres de forma y tamaño pueden ser empleados como taxonómicos y establecer relaciones filogenéticas con especies de su familia.

La longitud del flagelo (TL = 10.84 μm) no puede ser considerada como un carácter taxonómico debido a que las medidas tomadas provienen de espermatozoides con el flagelo fragmentado, que es ocasionado al momento de preparar la muestra o por el tiempo de conservación del espécimen (Fouquette, 1994), esto explicaría la mayor dispersión de las longitudes del flagelo (Fig. 6) con respecto a las longitudes de la cabeza (Fig. 5). Así como, la falta de correlación entre las variables HL /TL ($r = 0.495$) y AL /TL ($r = 0.264$). Reportándose para el presente estudio la longitud de mayor tamaño del flagelo que es 33 μm en lugar de la longitud media (Tabla 2) como lo reportará Fouquette (1994) al estudiar las células espermáticas de 24 especies de la familia Leptodactylidae.

La morfología del acrosoma y la cabeza, así como el número de flagelos es el resultado de las adaptaciones funcionales y de la herencia genética (Afzelius, 1979). En los espermatozoides de *B. macrostomus* observamos que estas adaptaciones se expresan como una cabeza y acrosoma pequeños (HL = 18.91 μm y AL = 2.74 μm), similares con las longitudes de cabeza y acrosoma de espermatozoide de anuros africanos con fertilización externa (HL = 16.0 μm y AL =

2.2 μm) (Van der Horst, 1995), pero se diferencian de las especies con fertilización interna, que tienen espermatozoides con un acrosoma y una cabeza más grandes. Explicable porque pareciera que son las dimensiones adecuadas para contener una mayor concentración de enzimas digestivas y penetrar al gameto femenino, que tiene un mayor número de membranas para evitar la deshidratación.

De lo anterior se desprende la importancia que tiene conocer la morfología espermática de *B. macrostomus* porque puede ser empleada como indicador de fertilidad. La forma y el tamaño descritos servirán para reportar la existencia de alteraciones de cabeza y cola como espermatozoides microcefalos o macrocefalos, que son formas cuya relación entre el tamaño de cabeza y el acrosoma (Fig. 5; $r = 0.815$) se encuentra alterada.

La condensación de la cromatina y la disminución de volumen de las células espermáticas también determinan la forma de la cabeza y facilitan el desplazamiento del espermatozoide por su adaptación hidrodinámica (Bustos, 1986) En *B. macrostomus* el movimiento espermático se realiza en un medio acuoso en el cual participan la forma de la cabeza que es vermiforme y la cola que presenta un solo flagelo. Diferenciándose de *Bufo marinus* (Swan et al., 1980), que tiene un espermatozoide con una cabeza fusiforme y una cola compuesta de un axonema, un filamento axial y una membrana ondulante; caracteres adaptados para la fertilización en un medio viscoso, éstas diferencias explicarían la falta de éxito en los programas de manejo reproductivo de *B. macrostomus*, por el desconocimiento de las características físicas del medio de fertilización (Cabrejos, 1997). Así como, la

posibilidad de la disminución de poblaciones de *B. macrosotomus* en los lagos y lagunas altoandinas por el efecto citotóxico de los compuestos químicos empleados en la minería y agricultura en las células espermáticas de la especie en estudio, causando alteraciones morfofuncionales en los espermatozoides (Blaustein y Wake ,1995).

VI. CONCLUSIONES

- 1.- El espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus* presenta características que son propias de especies con fertilización externa, como la organización lineal y las longitudes pequeñas de cabeza y acrosoma.
- 2.- El espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus* presenta caracteres taxonómicos como cabeza vermiforme, acrosoma cónico y un solo flagelo.
- 3.- La longitud de la cabeza del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus* es de $18.91\mu\text{m}$ y de su acrosoma, $2.74\mu\text{m}$. Características de tamaño comunes a especies de la familia Leptodactylidae. Así mismo, la longitud del flagelo es de $33\mu\text{m}$.
- 4.- Las características morfológicas del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus* pueden ser utilizadas para establecer relaciones filogenéticas por tener caracteres plesiomórficos por la forma de la cabeza y del acrosoma, y apomórficos por la presencia de un solo flagelo.

VII.- RECOMENDACIONES

1.- La continua evaluación de los caracteres morfológicos de los espermatozoides de *Batrachophrynus macrostomus* servirá para establecer un patrón indicador de fertilidad.

2.- Estudios morfológicos más detallados del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus*, como la descripción de la pieza intermedia y el número de mitocondrias, así como de las características funcionales de estos espermatozoides servirán para un mejor manejo reproductivo de esta especie de importancia económica en el Perú.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AFZELIUS B.A. 1979.** Sperm structure in relation to phylogeny in lower Metazoa Pp. 243-252. In D. W. Fawcett and J. M. Bedford (Eds.), The spermatozoon: maturation, motility, surface properties and comparative aspects. Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich.
- BALLOWITZ, E. 1903.** Die merkwürdigen, 2 1/4 Millimeter langen Spermien de Batrachiers *Discoglossus pictus* Otth. Arch. mikrosk. Anat. 63: 343-364, Pl. 16.
- BALLOWITZ, E. 1905.** Die Spermien des Batrachiers *Pelodytes punctatus* Bonap. Anat. Anz. 27: 542-547.
- BALLOWITZ, E. 1906.** Über das regelmässige Vorkommen auffällig heteremorpher Spermien im reifen Sperma des Grasfroches *Rana muta* Laur. Zool. Anz. 30: 730-737.
- BARBIERI F. D. 1950.** Observaciones sobre los cromosomas y espermatozoides de algunos batracios del genero *Leptodactylus*. Acta Zoologica Lioana. Tomo IX: 456-463.

BRANDON R.A., MARTAN J., WORTHAM J.W.E., ENGLERT D. 1974. The influence of interspecific hybridization on the morphology of the Spermatozoa of *Ambystoma* (Caudata, Ambystomatidae). *Journal of Reproduction Fertility*. Vol. 41: 275-284.

BROMAN, I. 1901. Notiz über das "Halsstück" der Spermien von *Pelobates fuscus*, nebst kritischen Bemerkungen über die Nomenclatur der Spermienchwanzfaden. *Anat. Anz.* 20: 347-351.

BROMAN, I. 1907. Über Bau und Entwicklung der Spermien von *Rana fusca*. *Arch. mikrosk. Anat.* 70: 330-339, Pl. 19-20.

BLAUSTEIN A.R.; WAKE D. 1995. Declive de las poblaciones de anfibios. *Investigacion y Ciencia*. Junio. Vol 6: 8-13.

BUSTOS O. E.; LEIVA S. 1986. Caracterización de los cambios citoquímicos del núcleo del espermatozoide postespermatoteleosis. Universidad Católica de Chile. Facultad de Medicina. Editorial McGraw-Hill. Primera Edición. pp. 33

CABREJOS P. J.L. 1997. Rana de Junin. *Batrachophrynus macrostomus*. Crianza en el Valle del Mantaro. ONG Amistad Europea. Editorial Agua Viva. Primera Edición. pp. 67

CHAMPY CH.; COUJARD R. 1939. Observations cytologiques et Biologiques sur la

spermatogenese de quelques Batraciens et les caracteres sexuels secondaires. Notes et Revue. pp. 20.

ELISON R.P. 1971a. Fertilization of Partially Jellied and Jellyless Oocytes of the frog *Rana pipens*. Journal of Experimental Zoology. 176 (1): 415-428.

ELISON R.P. 1971b. Sperm Lytic Activity and Its Relation to Fertilization in the frog *Rana pipens*. Journal of Experimental Zoology. 177(1): 207-218.

FAVARD P. 1955. Spermatogenese de *Dsciglossus pictus*. Annuals. Des Science Naturele Zoolgie. 11va. Serie. Tomo XVIII No. 25: 368-393.

FAWCETT, D. W. 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. Biol. Reprod. Suppl. 2: 90-127.

FOUQUETTE J.M.; DELAHOSSAYE A. 1994. Systematic Application of Spermatology, and the comparative Sperm morphology of Anuran Amphibians. Tesis Doctoral. Universidad de Texas, Austin. Department of Zoology & Department of Acuatic Resources. pp 105.

FRAZEN J. 1977. Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. Verh. dt. zool. Ges. 177(1): 123-138.

FRIEND, G. F. 1936. The sperms of the British Muridae. Q. J. Microsc. Sci. 78 (2):

419-443.

FURIERI. 1975. The peculiar morphology of the spermatozoon of *Bombina variegata* (L.). *Monit. Zool. Ital. (N.S.)* 9: 185-201.

GWATKIN R.B.; WILLIAMS D. 1970. Capacitation of Frog Sperm. *Nature*. Vol. 27: 183-184.

KALT M. R. 1976. Morphology and Kinetics of Spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 195: 393-408.

KAZUFUMI T., TESHIMA K., MAEDA M.; ABE S. 1995. Characteristic Features of Preleptotene Spermatocytes in *Xenopus laevis*: Increase in the Nuclear Volume and first Appearance of Flattened Vesicles in these Cells. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 273: 264-270.

KWON A.S.; LEE Y. 1995. Comparative spermatology of anurans with special references to phylogeny. *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. *Mem. Mus. nat. Hist. nat.* 166:321-332.

LEE H. Y.; KWON A. S. 1992. Ultrastructure of Spermiogenesis in *Hyla japonica* (Anura, Amphibia). *Acta Zoologica (Stockholm)*, Vol. 73 No. 1: 49-55.

MAINOYA J.R. 1981. Observations on the ultrastructure of spermatids in testis of

Chiromantis xerampelina (Anura: Rhacophoridae). African Journal of Ecology.
Vol. 19: 365-368.

PICHERAL, B. 1979. Structural, comparative, and functional aspects of spermatozoa in urodeles. Pp. 267-288. In D. W. Fawcett and J. M. Bedford (Eds.), The spermatozoon: maturation, motility, surface properties and comparative aspects. Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich.

PISANO A.; ADLER, R. 1968. Submicroscopical Aspects of *Telmatobius hauthali schreiteri* Spermatis. Zeitschrift für Zellforschung. Vol. 87: 345-349.

RETZIUS, G. 1906. Die Spermien der Amphibien. Biol. Untersuch. (N.F.) 13: 49-70.

SESHACHAR B. R. 1943. The Amphibian Sperm. Current Science. No. 9: 247-249.

SINSCH U. 1986. Anfíbios de la Sierra Central del Perú: Una Clave de Identificación para adultos y larvas. Boletín de Lima (45): 23-33.

SWAN M. A., LINCK R. W., ITO S.; FAWCETT, D. 1980. Structure and Function of the undulating membrane in Spermatozoon propulsion in the toad *Bufo marinus*. Journal of Cell Biology. Vol. 85: 866-880.

VAN DER HORST G. 1979. Spermatozoon Structure of Three Anuran (Amphibian) Species). Fertilization Pattern and Sperm Tail Structure. Electron Microscopy

Society of Southern Africa. Proceedings. Vol 9. pp. 32.

VAN DER HORST G., VAN DER MERWE L.; VISSER J. 1989. Fertilization Pattern and Sperm Tail Structure. Electron Microscopy Society of Southern Africa. Proceedings. Vol 9. pp. 19.

VAN DER HORST G., WILSON B.; ALAN CHANNING A. 1995. Amphibian Sperm: Phylogeny and Fertilization Environment. Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Mem. Mus. nat. Hist. nat. 166: 333-342.

IX.- ANEXOS

Tabla 1.- Datos biometricos de *Batrachophrynus macrostomus* (unidades en mm)

Especimen	SVL	PL
1	130	219
2	126	219
3	137	159
4	114	193
5	135	106
6	138	230
7	101	173
8	140	217
9	125	210
x	127.33 ± 12.07	191.77 ± 37.56

SVL : Longitud del hocico-ano
PL : Longitud e la pata posterior

Tabla 2.- Resumen de las estadísticas correspondientes a las Longitudes de Cabeza (HL), Acrosoma (AL) y Flagelo (TL) del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus* (unidades en μm)

Longitud	Cabeza(HL)	Acrosoma(AL)	Flagelo (TL)
Núm. De espermatozoides	911	911	911
Mínimo	10.00	1	3.00
Máximo	33.00	5	33.00
Media	18.9160	2.74	10.4867
Std. Error	0.09402	0.017	0.1798
DS.	2.8806	0.5198	5.4266
Mediana	19.00	--	10.00
Moda	20.00	3	10.00
Var. Est.	8.0537	0.2702	29.2202

Tabla 3.- Longitudes promedios de Cabeza (HL), Flagelo (TL) y Acrosoma (AL) para cada espécimen estudiado.

Espécimen	HL	TL	AL
1	17.09	11.54	2.53
2	16.92	9.33	2.64
3	17.15	10.53	2.61
4	18.84	11.84	2.76
5	18.69	8.76	2.92
6	19.76	9.92	2.84
7	19.23	9.08	2.76
8	20.68	12.12	2.76
9	20.53	10.53	3.00



FIGURA 1.- Acrosoma cónico del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus* Tincion Hematoxilina-Eosina. 1250X. AL: Longitud del acrosoma

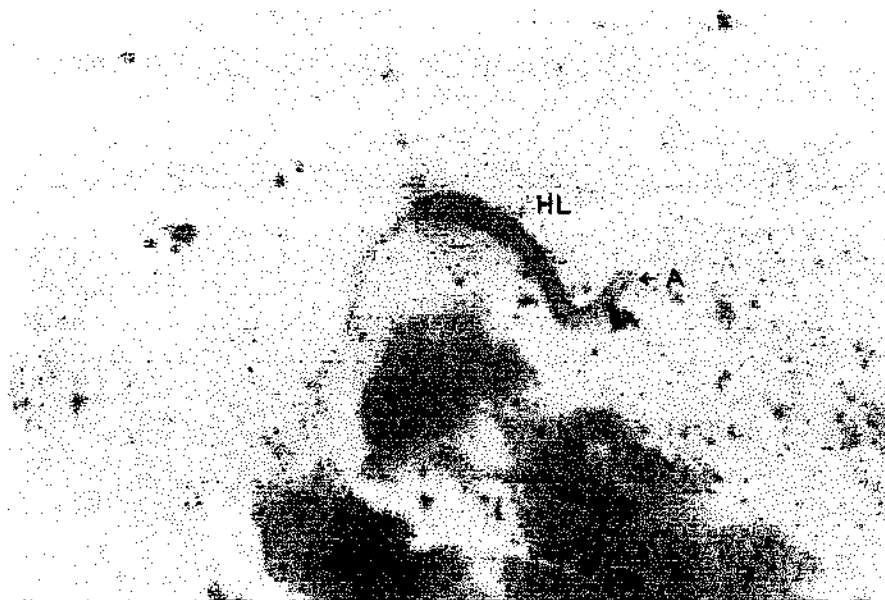


FIGURA 2.- Cabeza vermiforme del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus* Tinción Giemsa. 1250X
HL: Longitud de la Cabeza A: Acrosoma



FIGURA 3.- Espermatozoide de *Batrachoprhnus macrostomus*. Tinción Hematoxilina-Esoina. 1250X. H: Cabeza, T: Flagelo, A: Acrosoma

Figura 4.- Longitud de la cabeza del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus* (unidades en μm)

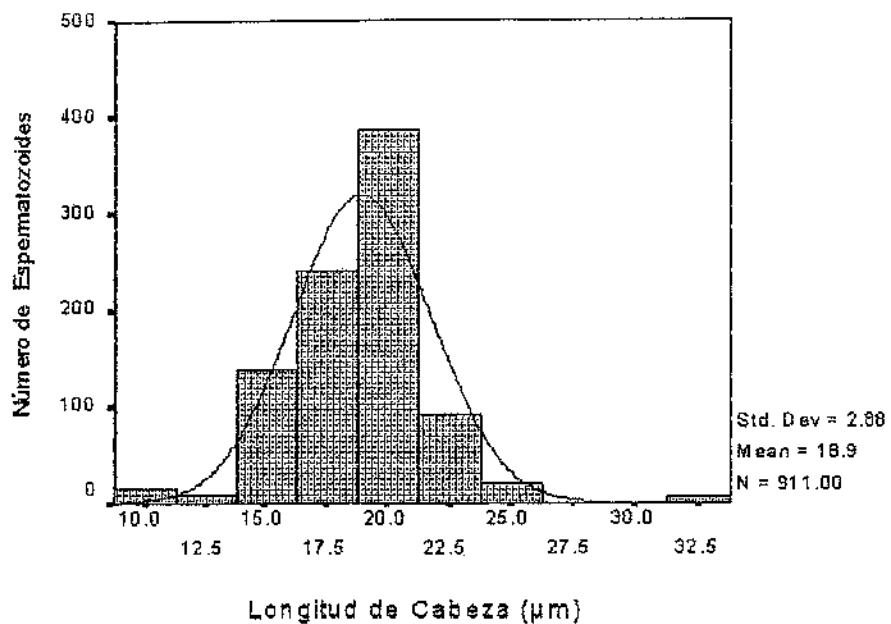


Figura 5.- Dispersión de las longitudes de Cabeza del espermatozoide en cada espécimen de *Batrachoprhnus macrostomus*.

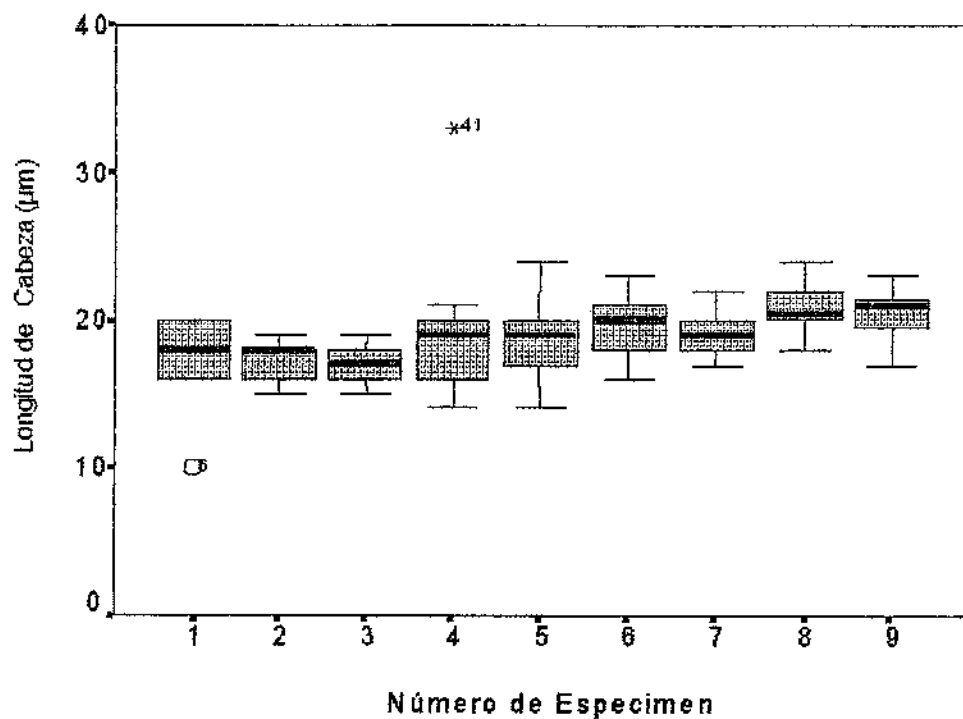


Figura 6.- Dispersión de las longitudes del Flagelo en cada espécimen de *Batrachorhynchus macrostomus*

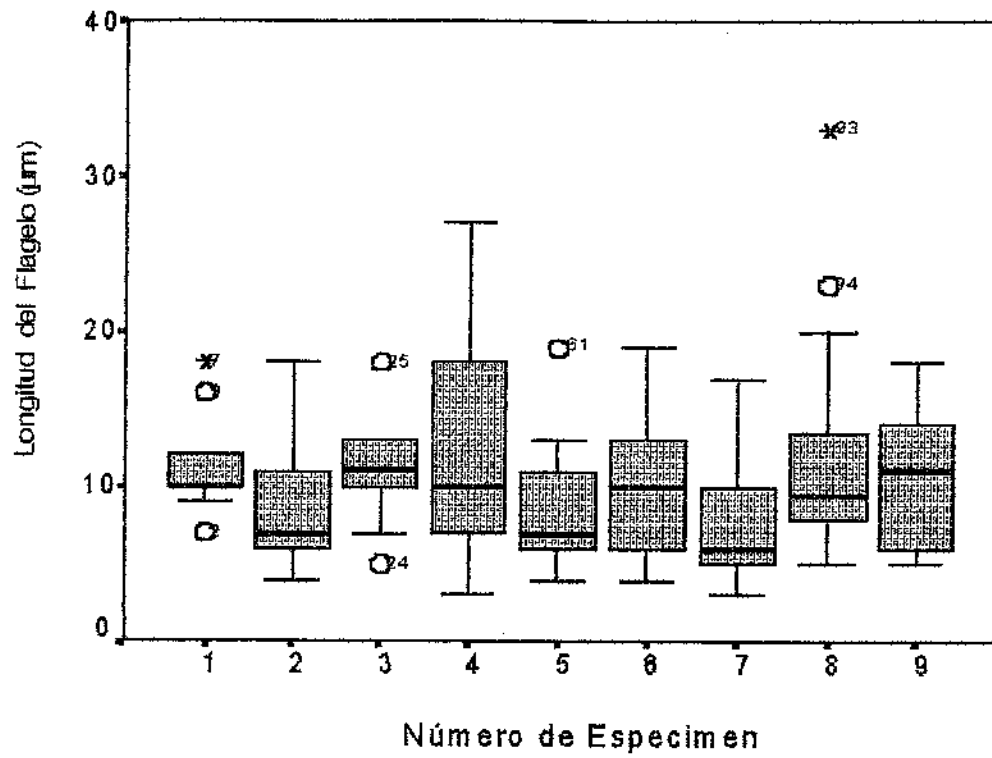
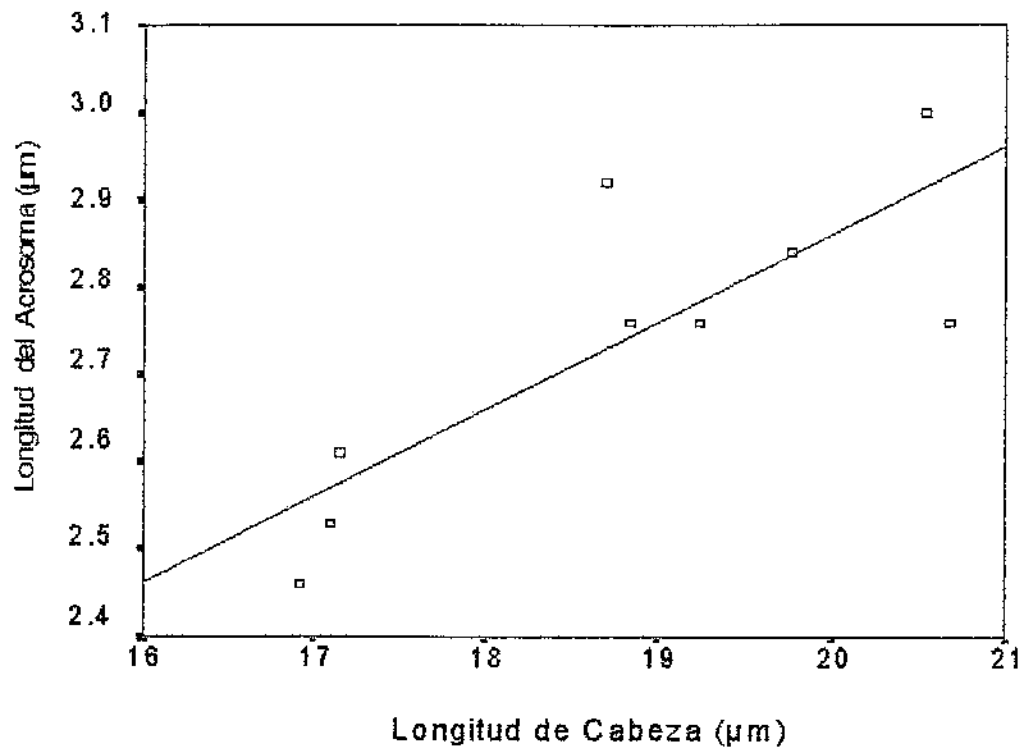


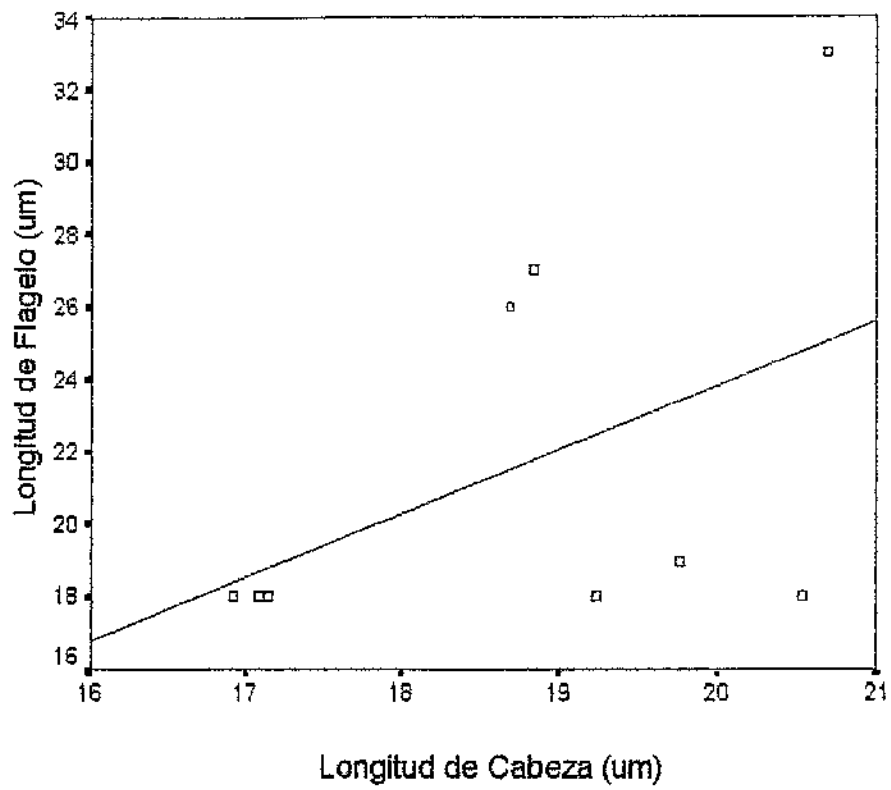
Figura 7.- Variación de la longitud del acrosoma en relación con la longitud de cabeza del espermatozoide de *Batrachoprhnus macrostomus*



R = 0.815

N = 9

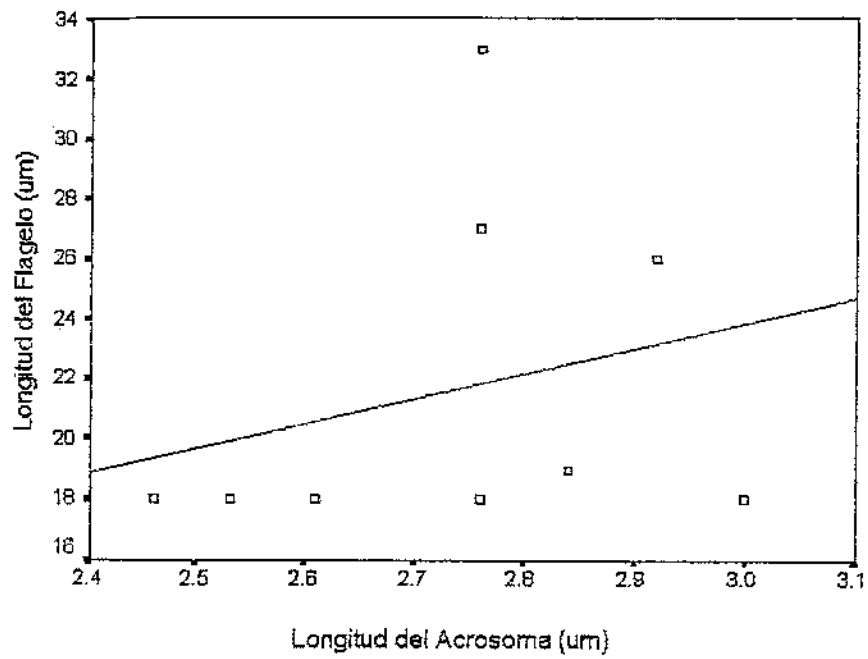
Figura 8.- Variación de la longitud del flagelo en relación con la longitud de cabeza del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus*



R = 0.495

N = 9

Figura 9.- Variación de la longitud del flagelo en relación con la longitud del acrosoma del espermatozoide de *Batrachophrynus macrostomus*



R = 0.264

N = 9