

ULTRAESTRUCTURA DE LA GÓNADA DEL MACHO DE DOS SUBESPECIES DE *Bufo longinasus*

Ana Sanz-Ochotorena^{1*}, María de Lourdes Segura-Valdés²,
Yamilka Rodríguez-Gómez¹, Reyna Lara- Martínez² y
Luis Felipe Jiménez-García²

¹Depto. de Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 No. 455, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. ²Laboratorio de Nanobiología Celular, Depto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F. E-mail: *anita@fbio.uh.cu

RESUMEN

Bufo longinasus está clasificado como un organismo en peligro de extinción y aparece en la Lista Roja de la UICN de Especies. Se tiene escasa información sobre la biología de esta especie, así como de la posibilidad de la existencia de subespecies, por ello los resultados de esta investigación contribuirán al conocimiento de su taxonomía. El objetivo principal de este trabajo es describir la gónada masculina de *Bufo longinasus longinasus* y *B. longinasus cajalbanensis* colectados en la provincia de Pinar del Río, en su período reproductivo. Después de capturados y transportados al laboratorio, los ejemplares fueron anestesiados con éter. Las gónadas se observaron *in situ*, se extrajeron y se colocaron en fijadores para microscopía electrónica de transmisión. Los resultados muestran que la gónada masculina tiene al órgano de Bidder justo encima de los testículos. En la parte de la gónada correspondiente al testículo se observó la presencia de una túnica albugínea muy pigmentada. Los ovocitos del ovario y del órgano de Bidder fueron morfológicamente idénticos. Los tipos celulares: espermatogonias, espermatocitos, espermátidas (tempranas, medias y tardías) y espermatozoides tienen una organización quística, es decir, forman grupos de células asociadas a las células de Sertoli, que son los cystos espermatogénéticos o espermatocistos dentro de los túbulos seminíferos. Los espermatozoides se caracterizan por una extraordinaria compactación nuclear y se observó la presencia de una membrana ondulante.

Palabras Clave: *Bufo longinasus*, espermatozoides, gónadas, órgano de Bidder, pigmentos.

ABSTRACT

Bufo longinasus is classified as endangered in the IUCN Red List of Threatened Species. There is very little knowledge about this species as well as the possibility of the existence of subspecies, so the results of this research may help to clarify systematic aspects. The main goal of the study is to describe the male gonad of *Bufo longinasus* by Transmission Electron Microscopy. Four male toads of *B. longinasus longinasus* and *B. longinasus cajalbanensis* in reproductive period were collected in Pinar del Rio Province. Once the specimens were in the laboratory, they were anesthetized with ether. Gonads were observed *in situ*, and then dissected and placed in transmission electron fixatives. The results show that the male gonad has Bidder's organ just above the testicles. The testicle has a highly pigmented tunica albuginea. Oocytes from the ovary and Bidder's organ were morphologically identical. With respect to proliferation and cell differentiation, it appears that the cell types (spermatogonia, spermatocytes, early, middle and late spermatids, and sperm) have a cystic organization, that is, they form groups of cells associated to Sertoli cells. The sperm cells are characterized by an extraordinary nuclear compactness and the presence of an undulating membrane.

Key words: *Bufo longinasus*, sperm, gonads, Bidder's organ, pigments.

INTRODUCCIÓN

En los anuros, los testículos son órganos pares ovoides constituidos por túbulos seminíferos tortuosos y rodeados por tejido conectivo fibroso que constituye la túnica albugínea^{1,2}. La arquitectura histológica de los túbulos seminíferos (el tejido germinal) constituye el parénquima testicular; muestra diferentes tipos celulares: espermatogonias en el epitelio basal; espermátocitos y espermátidas en la secuencia de la diferenciación celular, y espermatozoides en el lumen o sitios cercanos³. En este epitelio, en la mayoría de los anuros existe un ordenamiento cístico o quístico, es decir, grupos de células sexuales asociados a células de Sertoli que son los cistos espermatogénicos o espermátocistos. Estas unidades de agrupaciones de células en la misma fase de diferenciación y con un desarrollo sincrónico, es característica común en los anfibios^{3,4}. También y específicamente en los machos de la familia Bufonidae, diversos autores, entre los cuales se encuentran, Farias *et al.*⁵ y Falconi *et al.*^{6,7} constatan la presencia del órgano de Bidder como un ovario vestigial en la parte craneal del testículo.

Hay pocas investigaciones acerca de las estructuras que conforman el sistema reproductor masculino en anuros, específicamente en las especies de las zonas neotropicales como Cuba y ninguna que aborde el estudio a nivel ultraestructural. Por otra parte, diversas estrategias reproductivas que se producen en el grupo¹ parecen ser indicativas de las variaciones morfológicas⁸ y funcionales en los órganos reproductivos.

Además, el “sapito narizón”, como se le conoce a *Bufo longinasus*, endémico de Cuba, está clasificado como en peligro de extinción en la Lista Roja de la UICN de Especies Amenazadas, debido a que su distribución es muy fragmentada y la extensión de su hábitat en los bosques de tierras altas de Cuba está disminuyendo. Existe muy poco conocimiento sobre la biología de esta especie, así como de la posibilidad de la existencia de subespecies (*B. longinasus durni*, *B. longinasus cajalbanensis*, *B. longinasus ramsdeni* y *B. longinasus longinasus*).

Por todo lo anterior, en este trabajo se aborda la descripción de los aspectos histológicos de la gónada masculina de dos subespecies de *Bufo longinasus* y de las características ultraestructurales de sus células germinales, con la intención de incrementar el conocimiento de la biología de esta especie y con ello contribuir a esclarecer aspectos taxonómicos, como la existencia real de varias subespecies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron colectados en los meses de actividad reproductiva cuatro machos de *B. longinasus longinasus* en La Sierra del Rosario, y cuatro de *B. longinasus cajalbanensis* en Cajalbana provincia de Pinar del Río en la región occidental de la Isla de Cuba. Todos los animales fueron tratados como lo establece el código de ética para manipulación de animales. Previamente a la

disección los animales fueron anestesiados con éter en una campana hermética. Fragmentos de testículos y también del órgano de Bidder se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, se lavaron con PBS y se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% por varias horas. Después, las muestras se enjuagaron y deshidrataron en alcoholes crecientes terminando con óxido de propileno. La preinclusión se realizó con una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica 1:1 por 16 horas. La inclusión se llevó a cabo con resina epóxica durante 16 horas a 60°C y se obtuvieron cortes semifinos y ultrafinos con un microtomo modelo Ultracut de Leica. Los cortes se observaron bajo un microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM 1010.

RESULTADOS

Macroscópicamente (Fig. 1) se observa la presencia de un órgano de Bidder en la parte anterior de los testículos de todos los ejemplares colectados. La gónada *in vivo* se aprecia de color gris oscuro y en los cortes a diferente grosor se observan células pigmentarias mucho más abundantes en la zona testicular que en el órgano de Bidder, donde son escasas.



Figura 1. Gónada de *Bufo longinasus* con el órgano de Bidder en posición anterior.

En el órgano de Bidder pueden verse folículos previtelogénicos (Fig. 2) con una capa de células foliculares planas a su alrededor y, por fuera de ésta, la presencia de una teca con fibras colágenas, fibroblastos y vasos sanguíneos. En la misma figura 2 se puede también apreciar que los ovocitos tienen un núcleo prominente y en éste se observan varios nucléolos.

Por fuera de la porción testicular de la gónada existe una túnica albugínea de tejido conectivo fibroso que es la que presenta las células pigmentarias ya mencionadas. La túnica pigmentada penetra al interior del testículo y se dispone entre los túbulos

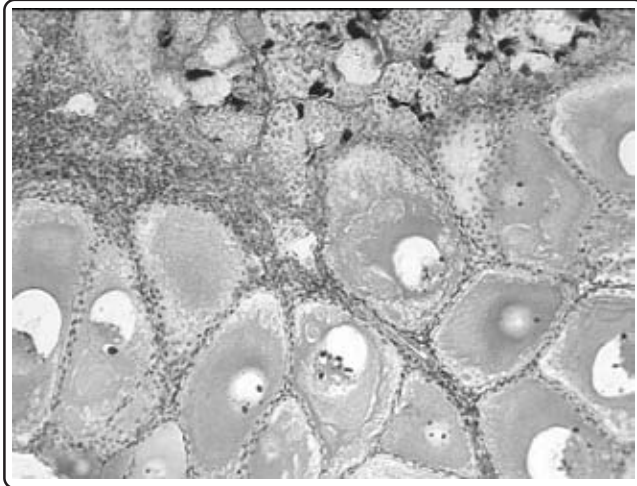


Figura 2. Corte semifino del órgano de Bidder. Se observan ovocitos previtelogénicos. En parte superior se ven cistos de espermatozoides. 60X.

seminíferos, en esa zona se encuentran también vasos sanguíneos y un tipo particular de células somáticas (Fig. 3).

En los túbulos seminíferos las células sexuales en un mismo estadio de desarrollo se agrupan en cistos o quistes (Figs. 2-4) y es posible encontrar cistos diversos en un mismo túbulo seminífero. Cada cisto tiene una célula somática o de Sertoli a cuyo citoplasma se asocian las células sexuales masculinas en cada etapa. Todos los cortes histológicos analizados tenían espermatozoides en formación o ya constituidos lo cual evidencia que los sapos estudiados eran sexualmente maduros.

En la secuencia de la espermatogénesis, en los túbulos seminíferos se observaron espermatogonias (Figs. 3 y 4), espermatoцитos I

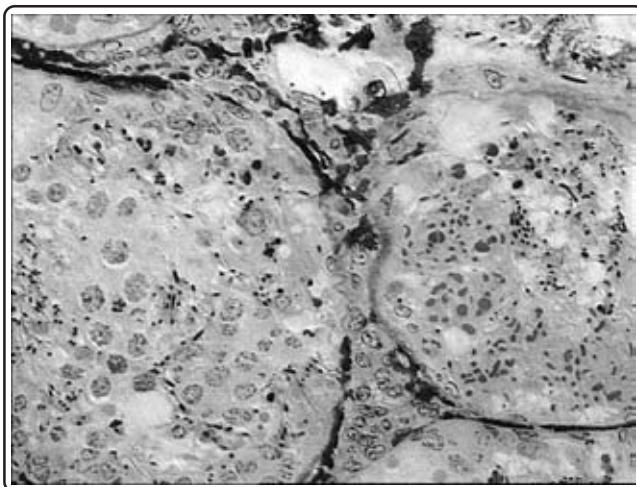


Figura 3. Corte semifino del testículo de *Bufo longinasus* teñido con azul de toluidina (imagen tratada con grises) donde se muestran túbulos seminíferos. Observe el pigmento entre los túbulos y la disposición en cistos de las células -espermatozonias- en los túbulos. 60X.

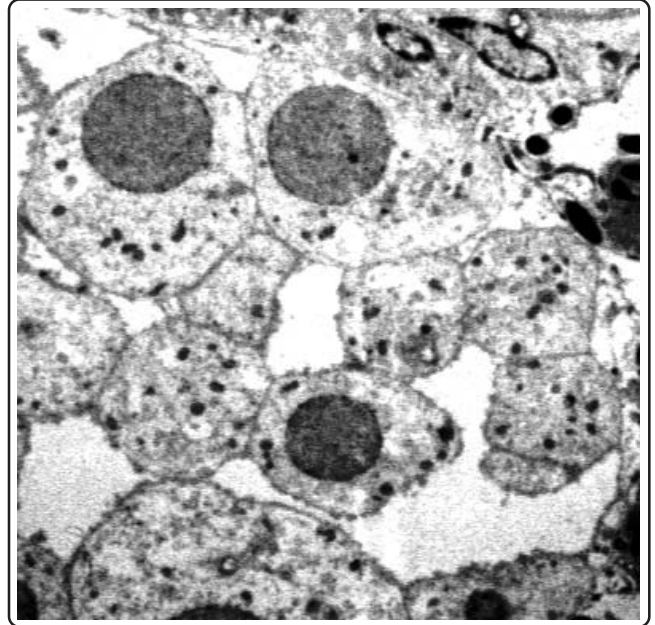


Figura 4. Microfotografía al Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM) de un cisto de espermatogonias de *B. longinasus*. 2K.

(Fig. 5) y espermatoцитos II, espermátidas tempranas o redondeadas, espermátidas tardías con diverso grado de alargamiento (Fig. 6), señal inequívoca de la espermiogénesis y de la formación de los espermatozoides y espermatozoides frecuentemente organizados en ramilletes (Fig. 1).

Las espermatogonias que originan por mitosis a otras de su estirpe, tienen el núcleo de forma redonda con gránulos de cromatina y se observa la presencia de un nucléolo en posición excéntrica. Estas células están asociadas a células grandes evidentemente somáticas y agrupadas en cistos muy cercanos a la pared de los túbulos.

Los espermatoцитos I o primarios son las células más conspicuas, y la cromatina en su núcleo está organizada típicamente lo cual evidencia que está pasando por el proceso meiótico. Al microscopio electrónico de transmisión se aprecian los cromosomas en la profase I de la meiosis (Fig. 5) y acorde con ese proceso el núcleo de estas células presenta diferentes grados de compactación de los materiales nucleares. Los espermatoцитos II o secundarios resultaron células muy difíciles de ver y fueron menores y con el núcleo más compactado que sus antecesoras.

Las espermátidas se observaron también en los cistos de formas muy diversas; las presumiblemente tempranas originadas por la división de los espermatoцитos II son redondeadas y las que van pasando el proceso de espermiogénesis más alargadas como ya se describió y con la cromatina en el núcleo muy compactada (Figs. 6 y 7). En la transición hacia espermatozoides, se puede apreciar al microscopio electrónico de transmisión, la presencia

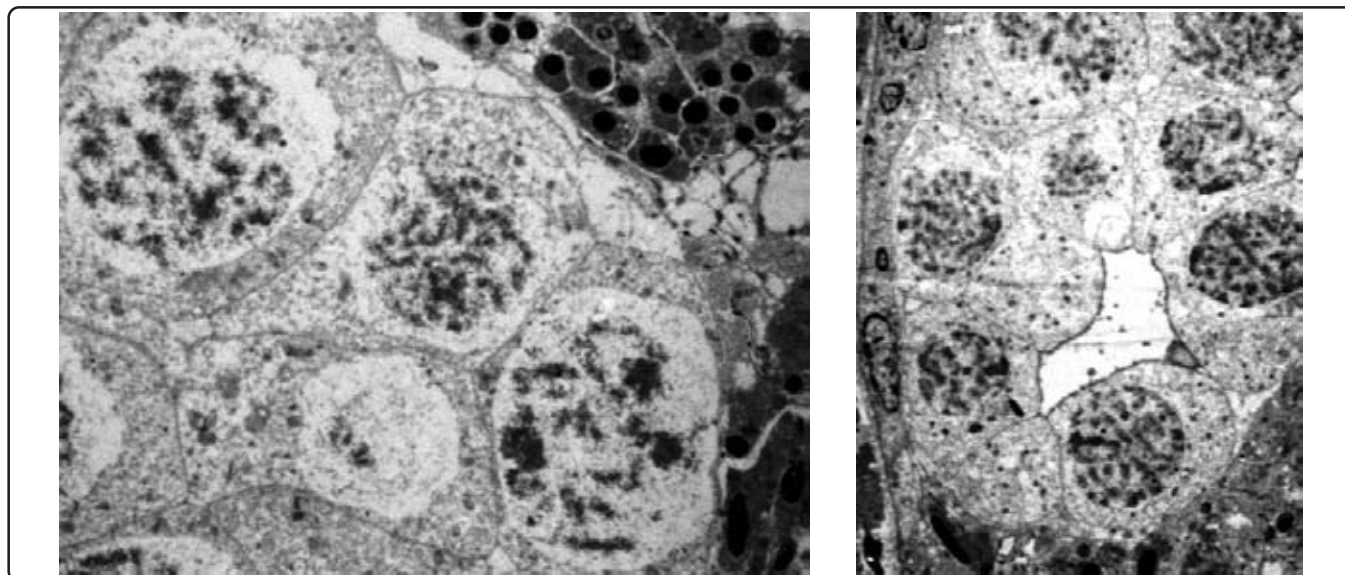


Figura 5. Microfotografía al Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM) de un cisto de espermatocitos primarios de *B. longinasus* donde son visibles los cromosomas. 3K.

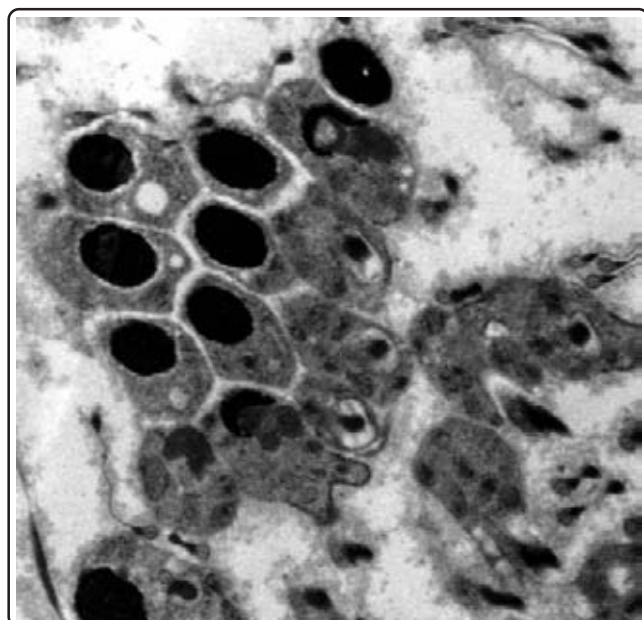


Figura 6. Microfotografía al Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM) de un cisto de espermátidas de *B. longinasus*. Observe las colas en la esquina superior derecha de la foto. 8K.

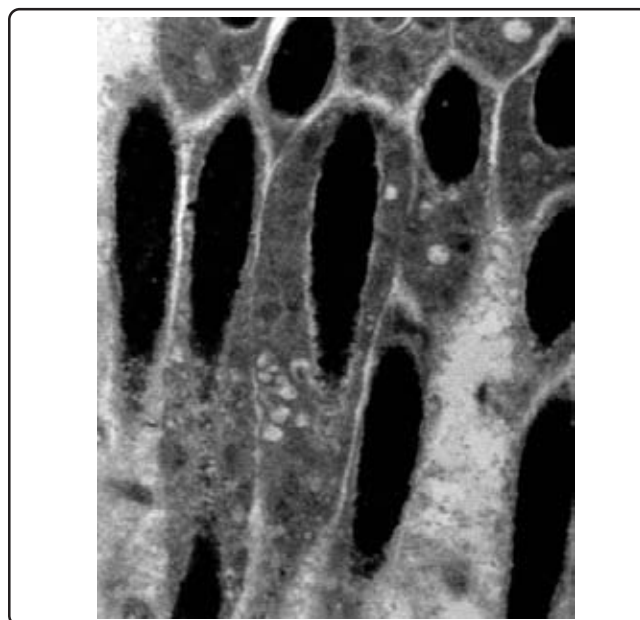


Figura 7. Microfotografía al Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM) donde se muestra el proceso de espermiogénesis mediante el alargamiento de los núcleos. 8K.

de mitoncondrias en el citoplasma, la formación del acrosoma (Fig. 7) y la síntesis del axonema de la cola o flagelo (Fig. 8).

Los espermatozoides presentan la cabeza (Fig.9) y la cola largas. Al microscopio electrónico de transmisión, en la cabeza se observa el acrosoma sobre el núcleo y debajo de aquél, el espacio subacrosómico. El núcleo exhibe una extraordinaria compactación y no es posible distinguir alguna granulación (Fig.9) La cola tiene una peculiar membrana ondulante visible en la figura 10.

DISCUSIÓN

La estructura histológica general del testículo observada en *Bufo longinasus* muestra una gran similitud con las descripciones de otras especies del orden Anura^{9,10}.

Acerca de la pigmentación de las gónadas de estos machos, Oliveira *et al.*³ consideran que la pigmentación de los testículos es una característica poco usual que se observa en algunas especies de anuros.

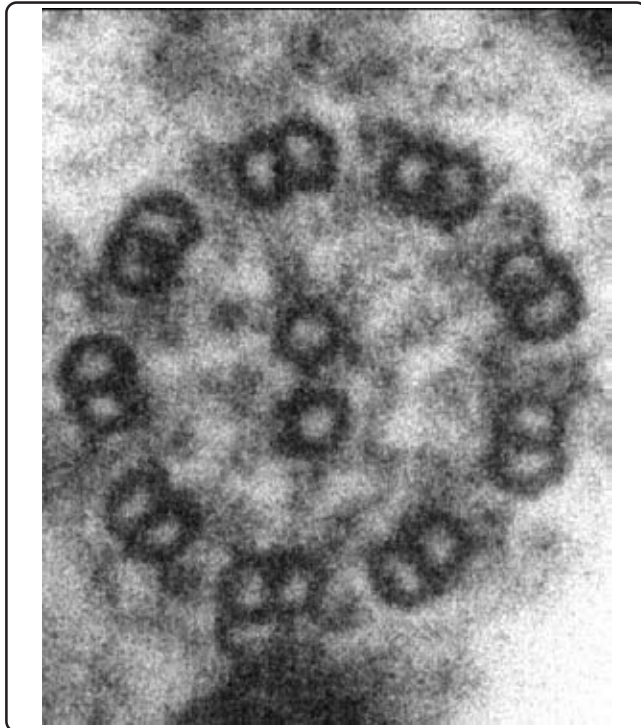


Figura 8. Microfotografía al Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM) del axonema del espermatozoide de *B. longinasus* con el clásico patrón 9+2. 43K.

En el interior de los túbulos, se presenta un ordenamiento de las células sexuales masculinas en cistos o quistes, lo cual confirma la típica disposición descrita en los anfibios anuros, como por ejemplo para *Physalaemus cuvieri*³ y en particular del mismo género, como *Bufo woodhouse*¹¹ y *Bufo bufo*⁶.

Todos los machos estudiados mostraron una intensa actividad espermatogénica y evidenciaron su madurez sexual. Se observaron todos los tipos celulares de la espermatogénesis tanto a nivel del microscopio de campo claro como al electrónico de transmisión.

Los espermatoцитos I fueron las células más grandes detectadas en la presente investigación. El espermatoцитo I pasa toda la profase I de la meiosis en la denominada fase de crecimiento¹² y aunque no crece tanto como su homóloga femenina en igual etapa, incrementa muy poco el tamaño. Estos resultados coinciden con varios autores^{4,10} quienes afirmaron que la célula más grande observada durante el proceso de la espermatogénesis es el espermatoцитo I; pero no coincide lo observado con Oliveira *et al.*³, quienes informaron que la célula masculina de mayor tamaño observada por ellos en los túbulos seminíferos del anuro *Physalaemus cuvieri* es la espermatogonia I. Los diseños de la cromatina que se observan en estas células al microscopio electrónico son la evidencia de las distintas etapas de la profase I de la meiosis lo cual las distingue de cualquier otro tipo celular.

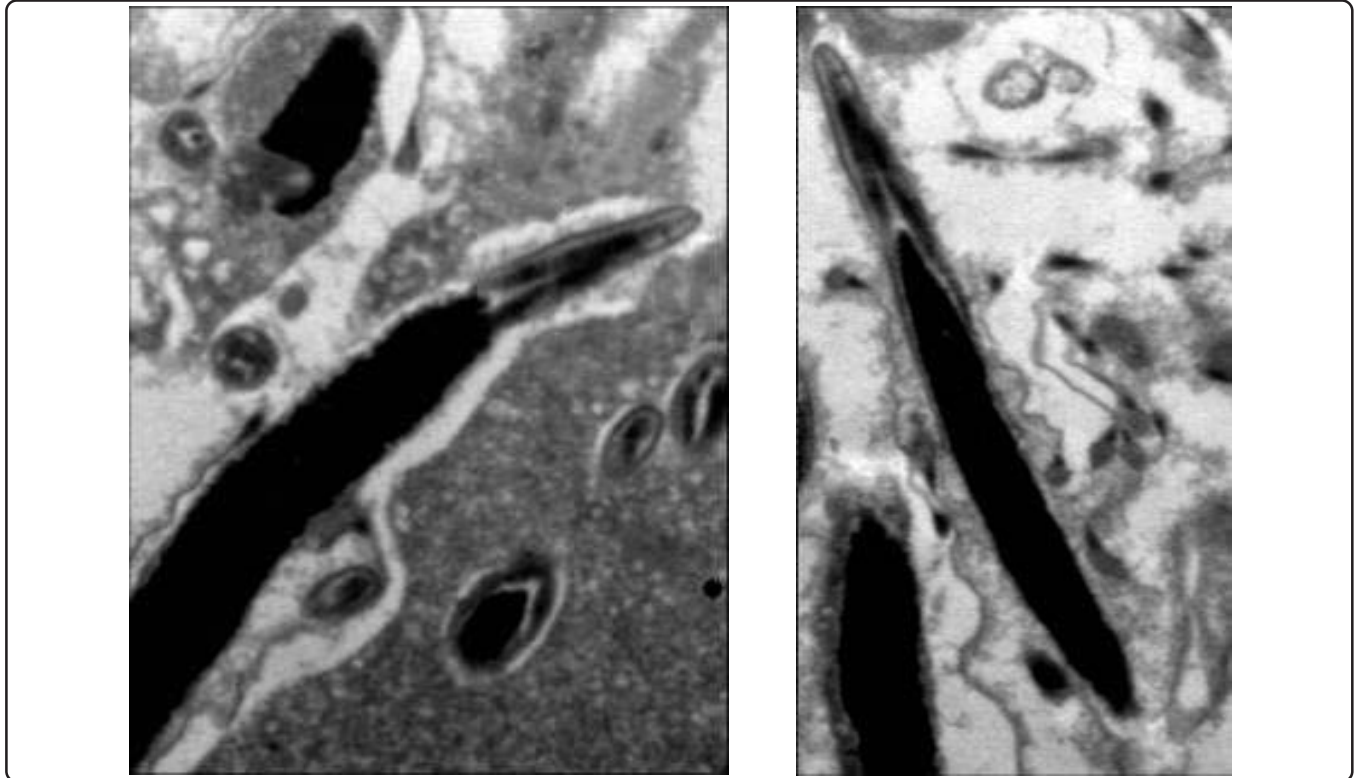


Figura 9. TEM Dos cabezas de espermatozoides donde se aprecia el espacio subacrosómico cónico. No hay diferencias. También es posible ver espermátidas. Derecha = *Bufo longinasus longinasus*. Izquierda = *Bufo longinasus cajalbanensis*. 6K.



Figura 10. Microfotografía al Microscopio Electrónico de Trasmisión de la cola de espermatozoides de *B. longinasus* donde se observa la membrana ondulante. 12K.

Los espermatoцитos II son originados por los espermatoцитos I, en la primera división de la meiosis¹² y son células muy transitorias porque su división es muy rápida¹⁰. Los espermatoцитos II se observaron más pequeños y con la cromatina más densa que sus antecesoras.

Las etapas subsiguientes de la espermatogénesis comprenden inicialmente un alargamiento celular y nuclear de las espermátidas que se produce simultáneamente con la condensación de la cromatina¹³, como parte del proceso llamado espermiogénesis, aunque no por generalizado menos sorprendente, el cual va a originar finalmente a los espermatozoides. Los espermatozoides agrupados típicamente como en ramilletes son sostenidos también por las células de Sertoli⁹.

El espermatozoide de *B. longinasus* muestra características similares a las de otros miembros del género, la cabeza es cónica con un acrosoma, espacio subacrosómico y el núcleo^{14,15}. El aparato flagelar comparte el patrón de microtúbulos 9 + 2 con otros anuros^{16,17} y otros vertebrados¹⁸. La presencia de membrana ondulante lo acerca a otros anuros pero no a otros de su mismo género. Sanz-Ochotorena *et al.*¹⁹ encontraron que los espermatozoides de *B. fustiger* carecen de membrana ondulante. Sin embargo, en esa misma investigación se observaron espermatozoides con dos colas. La ausencia de diferencias en la morfología de los espermatozoides de las subespecies de *B. longinasus* estudiadas confirma su parentesco incluso su

cercanía geográfica entre ellas.

En cuanto al órgano de Bidder, algunos autores afirman que pudiera convertirse en un ovario funcional^{1,5,20} y consideran que tiene características estructurales que le permitiría producir células sexuales.

En la hembra de *B. longinasus* no se observó el órgano de Bidder (datos sin publicar) aunque Farías *et al.*²¹ lo encontraron en las hembras de *Bufo ictericus*. Por otra parte, aún no se cuenta con investigaciones que permitan afirmar para esta peculiar estructura, o quizás ovario rudimentario, presente en los machos de los bufónidos que pueda convertirse en funcional, si las condiciones lo requieren.

Las características del epitelio germinal del sapo *B. longinasus* constituye un modelo típico de los anuros y la disposición en cistos de las células germinales se confirma como una importante característica de estos anfibios, así como de otros vertebrados anamniotas. Las particularidades de sus espermatozoides pueden estar relacionadas con aspectos filogenéticos^{18,22}.

La presencia de membrana ondulante en *B. longinasus*, tanto en *B. longinasus longinasus* como en *B. longinasus cajalbanensis* puede ser un carácter muy importante a la hora de dilucidar su ubicación taxonómica y su posición entre los sapos pequeños de Cuba.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias de la UNAM por su apoyo para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Duellman, W.E. & Trueb, L. Biology of amphibians (McGraw-Hill, 1994). 670 págs.
2. Kardong, K.V. Vertebrados. Anatomía Comparada, Función, Evolución (McGraw-Hill Interamericana, 1999). 731 págs.
3. Oliveira, C., Zanetoni, C. & Zieri, R. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Rev. Chil. Anat.* **20**(3), 263-268 (2002).
4. Rastogi, R.K., Bagnara, J.T., Lela, L. & Krasovich, M.A. Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *J. Morphol.* **197**, 277-302, (1988).
5. Farías C.F., Carvalho-e-Silva, S.P. & de Brito-Gitirana, L. Bidder's organ of *Bufo ictericus*: a light and electron microscopy analysis. *Micron* **33**(7-8), 673-679 (2002).
6. Falconi, R., Dalpiaz, D. & Zaccanti, F. Morphological Aspects of Gonadal Morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia anura): Bidder's Organ Differentiation. *J. Exp. Zool.* **301A**, 378-388 (2004).
7. Falconi R., Dalpiaz, D. & Zaccanti, F. Morphological Aspects of Gonadal Morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia anura): Bidder's Organ Differentiation. *The Anatomical Record Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* **290**, 7, 801 (2007).
8. Sanz-Ochotorena, A., Segura-Valdéz, M.L., Rodríguez- Gómez,

- Lara-Martínez, R. & Jiménez-García, L.F. Estructura y ultraestructura de la gónada de los machos de *Bufo fustiger* (Anura; Bufonidae). TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol. **11**(2), 81-86 (2008).
9. Oliveira, C. & Vicentini, C.A. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). *Biociências* **6**, 79-88 (1998).
10. Santos de Souza, R. Reproductive Cycle of Males of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). Abstracts in *Biota neotropica* **7**(2), 3 pp (2007).
11. Atherton, R.W. A gradient analysis of spermatogenesis in the toad *Bufo woodhousei* Girard (1854). *Herpetologica*, **30**, 240-244 (1974).
12. Gilbert, S.F. Developmental Biology. (Sinauer Associates, Inc, Eighth Edition, 2006) 751 págs.
13. Amaral, M.J., Fernandes, A.P., Bão, S.N. & Recco-Pimentel, S.M. An ultrastructural study of spermiogenesis in three species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). *Biocell*. **23**(3), 211-221 (1999).
14. Bão, S.N., Vieira, G.H. & Fernandes, A.P. Spermiogenesis in *Melanophryniscus cambaraensis* (Amphibia, Anura, Bufonidae): ultrastructural and cytochemical studies of carbohydrates using lectins. *Cytobios* **106 Suppl 2**, 203-216 (2001).
15. Braz., S.V., Fernandes, A.P. & Bão, S.N. An ultrastructural study of sperm of the genus *Bufo* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *J Submicrosc Cytol Pathol*. **36**(3-4), 257-262 (2004).
16. Aguiar-Jr, O., Lima A.P., Bão, S.N. & Recco-Pimentel, S.M. Sperm ultrastructure of the Brazilian Amazon poison frogs *Epipedobates trivittatus* and *Epipedobates hahneli* (Anura, Dendrobatidae). *Acta Zoologica* (Stockholm) **85**, 21-28 (2004).
17. Aguiar-Jr, A., Giaretta, A. & Recco-Pimentel, S.M. The sperm of Hylodinae species (Anura: Leptodactylidae): Ultrastructural characteristics and their relevance to interspecific taxonomic relationships. *J. Biosci.* **31**(3), 379-388 (2006).
18. Simões, K., Orsi, A.M. & Viegas, K.A.S. Ultrastructural characteristics of spermiogenesis in the domestic duck (*Anas platyrhynchos*). *Anat Histol Embryol*. **34**(5), 307-311 (2005).
19. Rodríguez-Gómez, Y., Sanz-Ochotorena, A., Segura-Valdéz, M.L. & Jiménez-García, L.F. La ultraestructura del espermatozoide y su relación con el modo de reproducción en el Género *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae). Poster en VIII Congreso Latinoamericano de Herpetología. Varadero, Cuba noviembre 23-30 (2008).
20. Petrini, S. & Zaccanti, F. The effects of aromatase and 5-reductase inhibitors, antiandrogen, and sex steroids on bidder's organs development and gonadal differentiation in *Bufo bufo* tadpoles. *J. Exp. Zool.* **280**, 245-259 (1998).
21. Farfás, C.F., de Brito-Gitirana, L., Carvalho-e-Silva, S.P. & Potsch, S. Bidder's organ in the female of *Bufo ictericus*: morphological characterization. *Contributions to Zoology* **4**, 317-321 (2004).
22. Pramuk, J.B., Robertson, T., Sites Jr, J.W. & Noonan, B.P. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecol. Biogeogr.* **17**(1), 72-83 (2008).