

## **MORFOLOGÍA TESTICULAR DE DOS SAPOS PEQUEÑOS, AMENAZADOS Y ENDÉMICOS DE CUBA *PELTOPHRYNE GUNDALCHII* Y *P.CATAULACICEPS***

Ana Sanz-Ochotorena <sup>1</sup>, Yamilka Rodríguez-Gómez <sup>1</sup>, María de Lourdes Segura - Valdez <sup>2</sup>, Reyna Lara-Martínez <sup>2</sup> y Luis Felipe Jiménez-García <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento Biología Animal y Humana. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba

<sup>2</sup>Laboratorio Nanobiología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

### RESUMEN

*Peltophryne gundlachi* (Ruibal, 1959), y *Peltophryne cataulaciceps* (Schwartz, 1959) tienen hábitat restringido, sus poblaciones están disminuyendo por la contaminación, la pérdida de su entorno y la quitridiomycosis y presentan alguna categoría de peligro en la Lista Roja de la UICN. Poco se sabe de la biología de estas especies y es crucial la caracterización de sus gónadas y células sexuales. El objetivo de este trabajo es caracterizar la morfología de los testículos para obtener una mejor comprensión de este proceso que permita conocer su biología reproductiva y recomendar acciones que contribuyan a la conservación de estos pequeños sapos. Se recolectaron tres machos de cada especie en la Isla de la Juventud en julio de 2011. Los animales fueron anestesiados y tratados éticamente. Una gónada se fijó en paraformaldehído 4% y otra en glutaraldehído 2.5% para ser procesados por microscopía de luz, fluorescencia y TEM. Los resultados indican la presencia del órgano de Bidder en la parte anterior de cada testículo. Existe presencia de numerosas células que contienen pigmentos distribuidos al azar en la túnica albugínea y el intersticio testicular. Esto podría ser una estrategia para proteger las gónadas de los rayos UV o signos de contaminación. Además, por primera vez en bufónidos cubanos se encontraron pigmentos en el órgano de Bidder. Se apreciaron espermatogonias, espermatocitos I y II, espermatidas jóvenes, intermedias y tardías y espermatozoides asociadas con las células de Sertoli en una organización cística. Los espermatozoides se

caracterizan por una extraordinaria compactación nuclear y una membrana ondulante.

## INTRODUCCIÓN

Las doce especies de sapos endémicos de las Antillas están distribuidas en las cuatro Antillas Mayores y es notorio que ocho de ellas sean endémicas de Cuba (3). Pertenecen a la Familia Bufonidae y su género actual es *Peltophryne*, "resucitado" por Pregill (4) y que posteriormente fue devuelto al género *Bufo* por Pramuk (5) y Pramuk *et al.* (6). Finalmente, Frost *et al.* (7), sugieren restituir *Peltophryne* a *Bufo* apoyados discretamente por Pramuk *et al.* (8), pero en ambos casos las relaciones filogenéticas del género no quedaban bien resueltas, algo que consiguieron Van Boxclaer *et al.* (9) y aún mejor con mayor número de muestras Alonso *et al.* (10). La polémica parece haber terminado al menos para ubicarlos en género y por tanto, el criterio taxonómico más actual y riguroso es el del género *Peltophryne*.

Desde hace varios años los autores del presente trabajo estudian las características morfológicas de las gónadas de los sapos cubanos (11, 12, 13, 14) en busca de una mejor comprensión de la biología reproductiva de este grupo tan importante como enigmático y amenazado. Entre otras razones porque los machos de los bufónidos deben presentar el órgano de Bidder y quizás también las hembras. Los investigadores describen al órgano de Bidder como una estructura exclusiva de los machos bufónidos y esto se ha utilizado frecuentemente como un carácter diagnóstico para esta familia (15, 16, 17). Sin embargo esa estructura puede estar presente también en las hembras (18, 19, 20). Aún no existen evidencias científicas que demuestren que el órgano de Bidder sea una estructura vestigial o posea alguna función endocrina (21). Algunos autores (22) sugieren que puede convertirse en un ovario funcional como una estrategia reproductiva de las especies de este grupo, sin embargo su trabajo fue experimental. Esto no descarta el hecho que en la naturaleza a falta de hembras en las poblaciones de estos bufónidos el órgano de Bidder pueda convertirse en un verdadero ovario.

Caracterizar este órgano y describir la estructura de sus gónadas y células sexuales en las poblaciones de sapos cubanos ha sido uno de nuestros objetivos como un paso importante para incrementar el conocimiento sobre la dinámica reproductiva de las especies así como tributar a su conservación. Además, con estos resultados se contribuye a esclarecer la filogenia y posición taxonómica de estos sapos. El objetivo del presente trabajo es mostrar las características de las gónadas del macho de dos de los sapitos pequeños cubanos: el sapito de las sabanas arenosas, *Peltophryne cataulaciceps* (1) y *P. gundlachi* (2), conocido como sapito matraca porque tiene un canto penetrante y continuo, evaluado por la IUCN el primero como

en Peligro (23) y el segundo como Vulnerable (24) debido sobre todo a pérdida y degradación de sus respectivos hábitats

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Peltophryne cataulaciceps* (Schwartz, 1959)

Es una especie exclusiva de la zona occidental, que se ha encontrado en el suroeste de la provincia de Pinar del Río y es más común en el norte de la Isla de la Juventud, desde 0 hasta 70 m s.n.m. La especie vive en sabanas arenosas que han sido fuertemente impactadas, principalmente en Pinar del Río, por acciones humanas como la minería (extracción de arena) y la ganadería, (25). Su tamaño es muy pequeño, con longitud máxima de 30 mm en los machos y 27 mm en las hembras y tiene hábitos principalmente nocturnos, pero los juveniles a veces están activos durante el día (3). Los machos vocalizan entre julio y agosto en pleno apogeo reproductivo en sabanas inundadas, desde la vegetación herbácea densa (26).

### *Peltophryne gundlachi* (Ruibal, 1959)

Es una especie endémica de Cuba y la Isla de la Juventud y vive por debajo de los 70 m de altitud. Su hábitat natural son los bosques secos y húmedos, praderas secas o inundables estacionalmente, marismas de agua dulce y áreas rocosas. Está amenazado por la pérdida de su hábitat. Tamaño pequeño (hasta 37.6 mm). Su cuerpo está típicamente cubierto por tubérculos espinosos. Habita fundamentalmente en sabanas, pastizales, áreas abiertas de cultivo, ciénagas y otras zonas llanas. . Especie explosiva en la época reproductiva, poco frecuente o rara fuera de este período. La reproducción ocurre de mayo a octubre durante las fuertes precipitaciones. Los machos vocalizan desde la orilla de cuerpos temporales de agua, que a veces son sólo pequeñas charcas (3).

Se colectaron cuatro machos de cada especie en la Isla de la Juventud en su propio hábitat. Todos los animales fueron tratados como lo establece el código de ética para manipulación de animales.

Los ejemplares se anestesiaron, se realizó una incisión longitudinal en el abdomen y otra transversal en la parte inguinal para visualizar las gónadas y conductos "in situ" y, posteriormente, extraerlos. Los fragmentos de testículos se fijaron en paraformaldehído al 4% y fueron sometidos a la técnica clásica de inclusión en **parafina. Los cortes se obtuvieron en un microtomo manual entre 5 y 7 $\mu$ m y se colocaron en portaobjetos con albúmina como adherente.** A las 24 horas los cortes se tiñeron mediante diferentes técnicas: hematoxilina y eosina, tricrómica de Mallory y también se aplicó la técnica de DAPI. Las observaciones se realizaron en un microscopio Carl Zeiss modelo Axiomat, con objetivos de 20X, 40X y 100X. Las

observaciones se realizaron en un microscopio Carl Zeiss modelo Axiomat, con objetivos de 20X, 40X y 100X. Las imágenes se digitalizaron mediante el programa Scion Image. Otros fragmentos de gónadas se colocaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato a pH 7.4. En el caso del procesamiento para microscopía electrónica las piezas se lavaron con PBS y se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% por varias horas. La inclusión se llevó a cabo con resina epóxica. Los cortes ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo Leica Ultracut y fueron contrastados utilizando acetato de uranilo al 3 % y citrato de plomo al 0.3 %. Se observaron las rejillas bajo un microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM 1010.

## RESULTADOS

Los testículos en ambas especies son muy pequeños (entre 3mm y 4mm) algo ovalados y están rodeados por tejido conectivo fibroso que constituye la túnica albugínea la cual se observó pigmentada de oscuro (Figura 1). Entre las unidades seminíferas hay tejido intersticial compuesto por células de Leydig, fibroblastos y vasos sanguíneos. Los pigmentos penetran el tejido intersticial de forma muy evidente (Figura 4). En la parte craneal de cada gónada se observó un órgano de Bidder en todos los especímenes estudiados (Figura 2).

En relación a la arquitectura histológica de los elementos seminíferos, el epitelio germinal, tejido germinal o parénquima está dispuesto en lóbulos seminíferos (Figuras 1, 2, 4). En este epitelio, hay un ordenamiento de las células en forma de cistos o quistes. Esto significa que, grupos de células sexuales asociados con células de Sertoli forman quistes de células espermátogénicas en un mismo grado de desarrollo y que constituyen las unidades morfológicas de los testículos, es decir, son los elementos seminíferos o productores de células sexuales de las gónadas.

En el tejido germinal se observaron diferentes tipos celulares dentro de los cistos: espermatogonias en el borde del epitelio; espermatocitos sobre todo espermatocitos primarios o I transitando por la profase I de la meiosis y se apreciaron espermátidas tanto tempranas con la cromatina ya muy densa, como intermedias con una cierta cola naciente, y tardías en la secuencia de la diferenciación celular o espermiogénesis. Los espermatozoides se vieron en el lumen o cercano a este. Cada uno de estos grupos de células estaba en la misma fase de diferenciación. Todos los animales estudiados estaban completamente espermátogénicos.

Los espermatozoides se caracterizan por agruparse en ramilletes (Figura 1). Presentan la cabeza alargada, con un acrosoma y el núcleo muestra una extraordinaria compactación. La cola tiene una característica membrana ondulante

(Figura 5 Izquierda y Derecha). El aparato flagelar presenta el patrón de microtúbulos 9 + 2 (Figura 5 derecha).

## DISCUSIÓN

En cuanto a la estructura histológica general del testículo observada en las especies objeto del presente trabajo se verificó una gran similitud con las descripciones de otras especies de anuros en general (25, 26) y en particular con la de otros bufónidos cubanos (11, 12, 13, 14). Las células en los túbulos seminíferos mostraron una intensa actividad espermatogénica y un ordenamiento en cistos o quistes dentro de los túbulos lo cual afirma esta típica disposición en los anuros.

Los espermatoцитos I fueron observados en la profase I de la meiosis, en la cual ocurrió el intercambio genético.

El espermatozoide tanto de *P. cataulaciceps* como el de *P. gundalchi* muestran características similares a las de otros miembros del género. La cabeza alargada con un acrosoma y el núcleo con la cromatina electrodensa son signos de su compactación y de su incapacidad de transcripción lo cual es parte de su estrategia funcional para proteger la información genética que porta (27). Aunque aún no se conozca si para lograr la compactación se sustituyen las histonas asociadas al ADN o esté presente el manchete como en otras especies (27, 28). El aparato flagelar comparte el patrón de microtúbulos 9 + 2 con otros anuros (29, 30, 31, 32) y otros vertebrados (33).

La presencia de membrana ondulante lo acerca a anuros de otros géneros y no a otros bufónidos supuestamente más cercanos. Por ejemplo, Sanz-Ochotorena *et al.* (11), encontraron que los espermatozoides de *B. fustiger* carecen de membrana ondulante. Sin embargo, la presencia de membrana ondulante en *P. catalauciceps* y *P. gundlachi* como en *P. longinasa*, tanto en *P. longinasa longinasa* como en *P. longinasa cajalbanensis* (12) puede ser un carácter muy importante a la hora de dilucidar su ubicación taxonómica entre otros géneros y su posición entre los sapos pequeños de Cuba.

En cuanto al órgano de Bidder, algunos autores afirman que pudiera convertirse en un ovario funcional y consideran que tiene características morfológicas potenciales que le posibilitan convertirse en ovarios funcionales si fuese necesario ante necesidades de la población o de perpetuación de la especie en cuestión (17). Otros investigadores sostienen que el órgano de Bidder es una estructura endocrina presente en hembras y en machos (19, 21). Solo se ha encontrado en una hembra adulta de *P. peltocephala* entre los sapos cubanos la presencia de un órgano de Bidder (20) y aún no se conoce su función ni en hembras ni en machos,

La presencia de pigmentos parece ser o una característica morfológica que va siendo no tan rara o una protección contra las radiaciones cada vez más dañinas, o como apuntan algunos autores (34, 35), con los cuales concordamos, pudiera ser un signo de respuesta a la contaminación de sus hábitats. La presencia de estos observada por primera vez en el órgano de Bidder de *P. cataulaciceps* y *P. gundlachi* no solo en la túnica albugínea de la parte testicular, abre nuevas interrogantes y preocupaciones con relación a estos sapos, verdaderas joyas de la herpetofauna no solo por su carisma y endemismo, sino por su función en los ecosistemas.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Schwartz, A. (1959): A new species of toad, Bufo *cataulaciceps* from the Isla de Pinos and Western Cuba. Proc. Biol. Soc. Washington 72:109-120.
2. Ruibal, (1959): Bufo *gundlachi*, a new species of Cuban toad. Breviora, no 105, p. 1-14
3. Díaz, L. M. y A. Cádiz. (2008): Guía taxonómica de los anfibios de Cuba. Abc Taxa 4, Bélgica, vi + 294 pp+1CD.
4. Pregill, G. K. (1981): Cranial morphology and evolution of the West Indian toads (Salientia: Bufonidae): resurrection of the genus *Peltophryne* Fitzinger. *Copeia* 2:273-285.
5. Pramuk, J. B. 2000. Prenasal bones and snout morphology in West Indian Bufonids and the *Bufo granulosus* species group. *Journal of Herpetology* 34 (2): 334-340.
6. Pramuk, J. B., Hass, C. A.; Hedges, S. B. 2001. Molecular phylogeny and biogeography of West Indian toads (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20 (2):294-301.
7. Frost D. R.; Grant, T.; Faivovich, J. N.; Bain, R. H.; Haas, A.; Haddad, C. F. B.; De Sá, R. O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S. C.; Raxworthy, C. J.; Campbell, J. A.; Blotto, V. L.; Moler, P.; Drews, R C.; Nussbaum, R. A.; Lynch, J. D.; Green, D. M.; Wheeler, W. C. (2006): The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297:1-370
8. Pramuk, J. B., T. Robertson, J. W. Sites y B. P. Noonan (2008): Around the world in 10 million years: Biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography* 17: 72-83.
9. Van Bocxlaer, I., S. P. Loader, K. Roelants, S. D. Biju, M. Menegon y F. Bossuyt (2010): Gradual adaptation toward a range-expansion phenotype initiated the global radiation of toads. *Science* 327: 679-682

10. Alonso, R., Crawford, A. J., & Bermingham, E. (2012): Molecular phylogeny of an endemic radiation of Cuban toads (Bufonidae: *Peltophryne*) based on mitochondrial and nuclear genes. *Journal of Biogeography* 39: 434-451.
11. Sanz-Ochotorena A., M. L. Segura-Valdés, Y. Rodríguez Gómez, R. Lara-Martínez, L. F. Jiménez-García (2008): Estructura y ultraestructura de las gónadas del macho de *Bufo fustiger* (Anura: Bufonidae) Revista TIP 11 (2), 81-86
12. Sanz- Ochotorena A., M. L. Segura-Valdés, Y. Rodríguez Gómez, R. Lara-Martínez, L. F. Jiménez-García (2009): Ultraestructura de la gónada del macho de dos subespecies de *Bufo longinasus* Revista TIP 13 (2): 36-39
13. Sanz-Ochotorena A, M.L. Segura-Valdés, Y. Rodríguez-Gómez, R. Lara-Martínez y L.F. Jiménez-García (2010): Contributions for the taxonomy of *Bufo longinasus dunni* using TEM and AFM for spermatogenesis. Poster en el X Congreso Internacional de Microscopía (septiembre 19-24). Río de Janeiro. Brasil 2010
14. Sanz-Ochotorena A, M: L. Segura-Valdés, Y. Rodríguez-Gómez, R. Lara-Martínez y L. F. Jiménez-García (2011): 11no Interamerican Congress on Microscopy. CIASEM 2011: Mérida. México. Use of different microscopy techniques to describe gametogenesis in a Cuban endemic toad. (Poster)
15. Gordon A. (1932): Bidder's Organ in *Bufo melanostictus* Schneider *Copeia* Vol. 1932, No. 2 pp. 78-80
16. Duellman, W. E. & Trueb, L. (1994): Biology of amphibians. McGraw-Hill, 670p.
17. Farias C. F., S. P. Carvalho-e-Silva and L. de Brito-Gitirana: Bidder's organ of *Bufo ictericus*: a light and electron microscopy analysis. *Micron* Volume 33, Issues 7-8, pp 673-679 (2002).
18. Falconi, R., D. Dalpiaz and Francesco Zaccanti (2004): Morphological Aspects of Gonadal Morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia: Anura): Bidder's Organ Differentiation *J. Exp. Zool.* 301A: 378-388.
19. Farias, CF, Azevedo, Rodrigo Alves, de Brito-Gitirana, L (2006): Expression pattern of glycoconjugates in the Bidderian and ovarian follicles of Brazilian toad *Bufo ictericus* as analyzed by lectin histochemistry. *Brazilian Journal of Biology*, Brasil, v. 66, n. 1a, p. 29-41.
20. Sanz-Ochotorena A., Y. Rodríguez-Gómez, M. L. Segura-Valdés, R. Lara-Martínez, L. F. Jiménez García (2012): Características microscópicas de las gónadas de *Peltophryne peltoccephala* (Tschudi, 1838) (Anura. Bufonidae). Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas. 1-11pp

21. Abramyan J, Wilhelm D, Koopman P. (2011): Molecular characterization of the Bidder's organ in the cane toad (*Bufo marinus*). J Exp Zool B Mol Dev Evol. Sep 15; 314(6):503-13
22. Brown, F. D., E. M. Del Pino, G.Krohne (2002): Bidder's organ in the toad *Bufo marinus*: Effects of orchidectomy on the morphology and expression of lamina-associated polypeptide 2 Development, Growth & Differentiation, Volume 44, Issue 6, pages 527–535.
23. Stuart, S. N., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodrigues, D. L. Fischman y R. W. Waller. (2004): Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science 306: 1783-1786.
24. Hedges B., Luis Díaz (2004): *Peltophryne gundlachi*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. www.iucnredlist.org.
25. Peña García, E., P. I. López García, J. Lazcano Lara, A. T. Leiva Sánchez y U. S. Seal (eds.) (1998): En Memorias del Primer Taller para la Conservación, Análisis y Manejo Planificado de Plantas Silvestres Cubanas, Sección II, p. 53. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN.
26. Alonso, R. y A. Rodríguez. 2003. Advertisement calls of Cuban toads of the genus Bufo (Anura, Bufonidae). Phyllomedusa 2(2): 75-82.
27. Gilbert, Scott. F. (2010): Developmental Biology. Eight Edition. Sinauer Associates. Inc. 818 pp.
28. Rodríguez-Gómez Y. y A. Sanz-Ochotorena (2009): Morfología y ultraestructura de los espermatozoides de dos especies del Género Anolis (Sauria: Polychrotidae). Revista TIP 12(1):12-18.
29. Oliveira, C. & Vicentini, C.A. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). *Biociências* 6, 79-88 (1998).
30. Santos de Souza, R. Reproductive Cycle of Males of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Biota Neotropica* 7(2), (2007).
31. 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).
32. 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).
33. 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).

34. Arencibia, G., Capetillo, N., Cruz, Y., Pérez, I., Tizol, R., Delgado, G., Nodar, R. & Isla, M. (2005): Evaluación de la contaminación de la Bahía de Guantánamo, Cuba. XXV Congreso de Ciencias del Mar y XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Viña del Mar. Chile
35. Torres-Rodríguez, A., Puente-Lee, I., González, S., Castrillón, M: (2009): Caracterización histológica y ultraestructural de los centros melanomacrófagos y su proliferación por efecto de los metales en hígado de *Rana catesbeiana* (Rana toro): Congreso Interamericano de Microscopía Electrónica. Rosario, Argentina

## ANEXOS

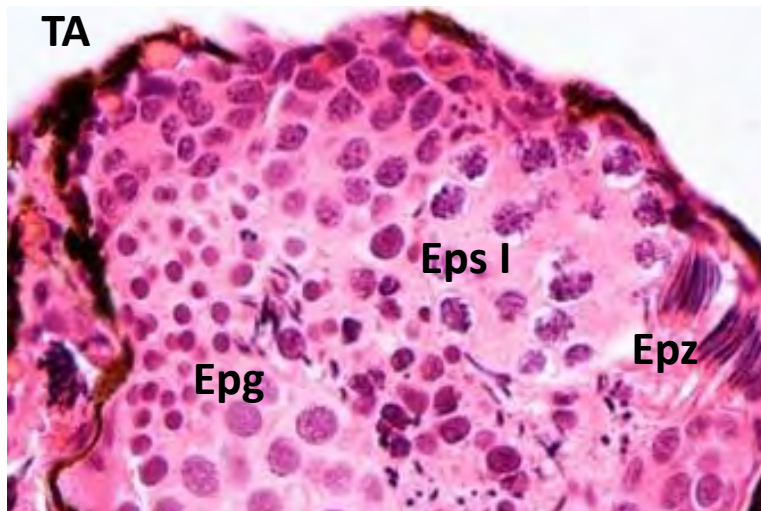


Figura 1: Fragmento de la parte testicular de la gónada de *P. gundlachi*. Se aprecia la túnica albugínea pigmentada y esta penetra al interior de los cistos. Se observan cistos de espermatogonias, de espermatocitos I con los cromosomas en profase y cistos de espermatozoides. TA= túnica albugínea, Epg= Espermatogonias, EpsI = Espermatocitos II, Epz= Espermatozoides. H-E 1000X



Figura 2: Gónada de un macho de *Peltophryne cataulaciceps*. Observe el órgano de Bidder (OB) y los cistos de espermatozoides (Epz) H-E 100X

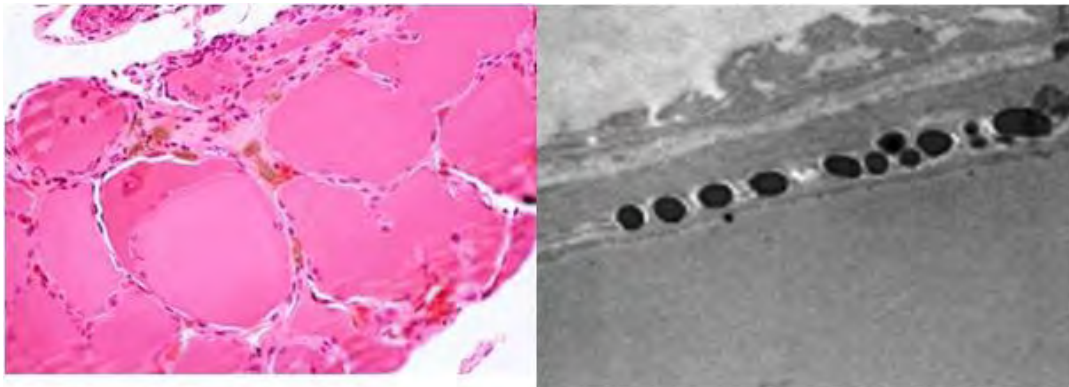


Figura 3: Izquierda: órgano de Bidder pigmentado en *P. catalauiiceps* H-E 400X. Derecha: Fotomicrografía al MET de la misma zona de la foto anterior en la cual se observa el pigmento organizado en melanosomas 12K

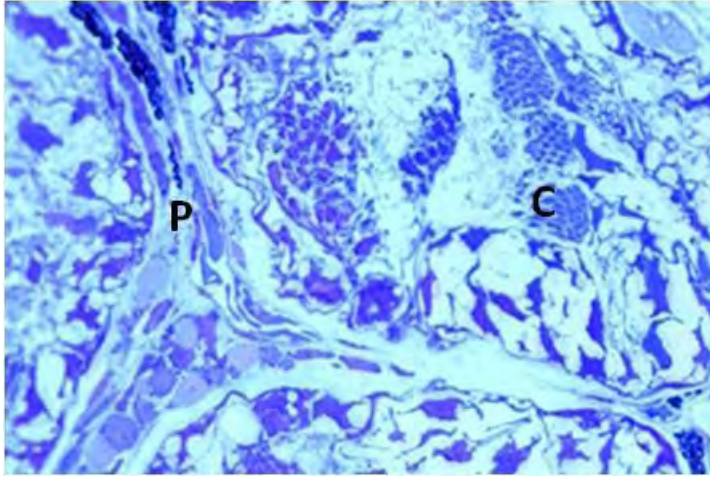


Figura 4: Corte semifino de la zona testicular de *P. gundlachi* Observe el tejido intersticial con pigmentos y cistos en los lóbulos seminíferos. P=pigmento, C=Cistos. Azul de toluidina 1000X.

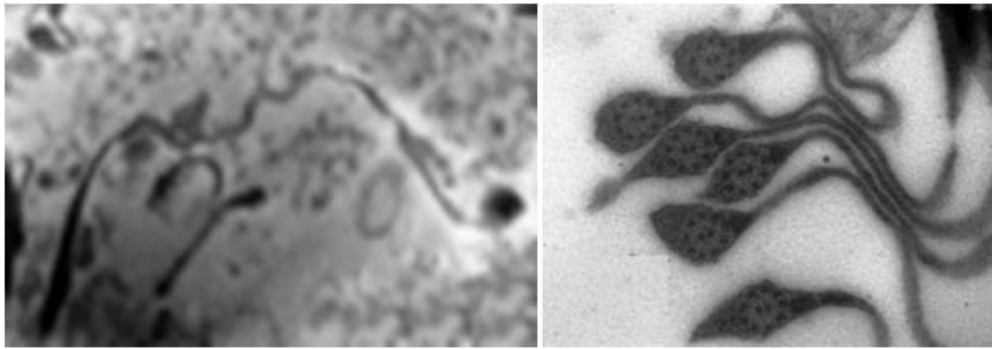


Figura 5: Izquierda. Espermatozoide de *P. gundalchi* donde es muy visible la membrana ondulante. 20K  
 Derecha: cortes transversales de colas de espermatozoides de *P. peltophryne* y se aprecia el patrón microtubular 9+2 y también la membrana ondulante 50K