

ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA DE LA GÓNADA DE LOS MACHOS DE *Bufo fustiger* (ANURA: BUFONIDAE)

Ana Sanz-Ochotorena^a, María de Lourdes Segura-Valdez^b,
Yamilka Rodríguez-Gómez^a, Reyna Lara-Martínez^b,
y Luis Felipe Jiménez-García^b

^aDepto. de Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. ^bLab. de Nanobiología Celular, Depto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, C.P. 04510. México, D.F.

RESUMEN

Por primera vez se describe la morfología y ultraestructura de la gónada de los machos del sapo endémico de Cuba, *Bufo fustiger*. Fueron colectados ocho ejemplares adultos en el área de La Chorrera en la provincia Pinar del Río los cuales fueron trasladados al laboratorio y tratados adecuadamente. Se procesaron las gónadas para ser observadas por microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión (MET). Se utilizó el microscopio de fuerza atómica para la observación de espermatozoides. Los resultados indican que la gónada de los machos tiene un órgano de Bidder en posición anterior. La parte correspondiente al testículo muestra una organización en túbulos seminíferos y dentro de éstos las células sexuales (espermatogonias, espermatoцитos I y II, espermátidas en diferenciación y espermatozoides) están dispuestas en cistos de forma similar a otros anuros lo cual indica una conservación de esta característica dentro de los anfibios y los anamniotas. Se observan espermátidas al MET en el proceso de espermiogénesis con la presencia de mitocondrias y la formación del acrosoma. El espermatozoide es delgado, con la cabeza cónica. La cola tiene un axonema con el patrón microtubular 9 + 2 y se observaron espermatozoides con dos colas. No se detectó la presencia de membrana ondulante. Estos resultados pudieran contribuir a esclarecer la sistemática del grupo.

Palabras Clave: *Anura, Bidder, Bufo fustiger, gónadas, ultraestructura.*

ABSTRACT

Morphology and ultrastructure of the male gonad of the endemic toad to Cuba, *Bufo fustiger* was described. Eight adults were collected in the area of La Chorrera in Pinar del Rio province. They were transferred to the laboratory and treated properly. Gonads were processed to be observed by light microscopy and transmission electron microscopy (TEM). We used the atomic force microscope to observe spermatozoa. The results indicate that in anterior position the male gonad has a Bidder organ. The proper testis shows an organization in seminiferous tubules, and within these, sex cells (spermatogonia, spermatocytes I and II, spermatids in differentiation and spermatozoa) are arranged in the form of cysts similar to other anurans which indicates a conservation of this feature within amphibians and anamniotas. Spermatids with the presence of mitochondria and the formation of the acrosome were observed by TEM in spermiogenesis process. The sperm is thin, with a conical head. The tail has an axonema pattern with 9 + 2 microtubules. Also were observed spermatozoa with two tails. Was not detected the presence of undulating membrane. These results could help shed light on the taxonomy of the group.

Key Words: *Anura, Bidder, Bufo fustiger, male gonads, ultrastructure.*

INTRODUCCIÓN

En los anuros, los testículos son órganos rodeados por tejido conectivo fibroso que constituye la túnica albugínea. En relación a la arquitectura histológica de los elementos seminíferos, el epitelio germinal debe estar dispuesto en túbulos seminíferos en Anura¹.

El tejido germinal, el cual constituye el parénquima de los testículos, tiene diferentes tipos celulares: espermatogonias en el borde del epitelio; espermatocitos y espermátidas en la secuencia de la diferenciación celular, y espermatozoides en el lumen o cercano a este. En este epitelio, hay un ordenamiento de las células en forma de cistos o quistes, es decir, grupos de células sexuales asociados con células de Sertoli forman quistes de células espermatogénicas. Cada uno de estos grupos de células en la misma fase de diferenciación y con un sincronismo de desarrollo debe ser característica común en los anfibios².

Además, los sapos machos de la Familia Bufonidae tienen una característica única y es la presencia en la parte anterior del testículo de un ovario vestigial conocido como órgano de Bidder^{3,4}, el cual según algunos autores^{5,6} pudiera convertirse en ovario funcional si fuese preciso y si los testículos son removidos pueden desarrollarse en ovarios funcionales representando una estrategia para la reproducción de estas especies. A pesar de un número creciente de estudios^{7,8} la información sobre el órgano de Bidder de los bufónidos sigue siendo escasa.

Bufo fustiger es un sapo endémico de Cuba, que tiene una relativa abundancia en la zona occidental de la Isla⁹ y se conoce muy poco acerca de su biología por lo cual el objetivo del presente trabajo es realizar un estudio de las gónadas del macho de esta especie mediante microscopía convencional de luz y electrónica (MET) con el fin de obtener una mejor comprensión de su morfología.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron ocho machos de *B. fustiger* en La Chorrera, provincia de Pinar del Río en la región occidental de la isla de Cuba en los meses de actividad reproductiva, entre mayo y septiembre. Todos los animales fueron tratados éticamente. Los ejemplares se anestesiaron y se realizó la disección. Las gónadas y también el órgano de Bidder se fijaron en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato a pH 7,4 y se procesaron para las técnicas de inmunofluorescencia¹⁰ y de microscopía electrónica de transmisión¹¹.

Las gónadas de algunos machos se fijaron en líquido de Bouin y fueron sometidas a la técnica clásica de inclusión en parafina. Los cortes se obtuvieron en un microtomo manual entre 5 y 7µm y se colocaron en portaobjetos con albúmina como adherente. A las 24 horas los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina y con la técnica de Mallory. 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 Motic 2000.

En el caso de las muestras para microscopía electrónica de transmisión se lavaron con PBS, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% en buffer fosfato a pH 7,4 por varias horas, después 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 ultrafinos con un microtomo modelo Ultracut de Leica. Los cortes se observaron bajo un microscopio JEOL JEM 1010.

También se prepararon suspensiones de espermatozoides de algunos ejemplares y se observaron por el microscopio de fuerza atómica de acuerdo a protocolos previamente descritos¹². Las extensiones de espermatozoides se observaron con un microscopio de fuerza atómica BioScope (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, USA).

RESULTADOS

La gónada masculina de *B. fustiger* es alargada, mide aproximadamente 2 cm, en etapa reproductiva es de color amarillo claro y en su parte anterior o craneal presenta un órgano de Bidder en el cual se pueden apreciar las rugosidades que evidencian la presencia de numerosos folículos ovogénicos (Figura 1), el resto de la gónada es el testículo. Toda la gónada está cubierta por una fina capa de tejido conectivo, la túnica albugínea y no se observa pigmentación.

El epitelio germinal de la zona correspondiente al testículo está organizado en túbulos (Figura 2). Delimitados por escaso y fino tejido conectivo estos túbulos forman unidades morfológicas, que son los elementos seminíferos del testículo. Entre las unidades seminíferas hay tejido intersticial compuesto por células de Leydig, fibroblastos y vasos sanguíneos (Figura 2).



Figura 1. Gónada masculina de *Bufo fustiger*. Observe en la parte anterior el órgano de Bidder.

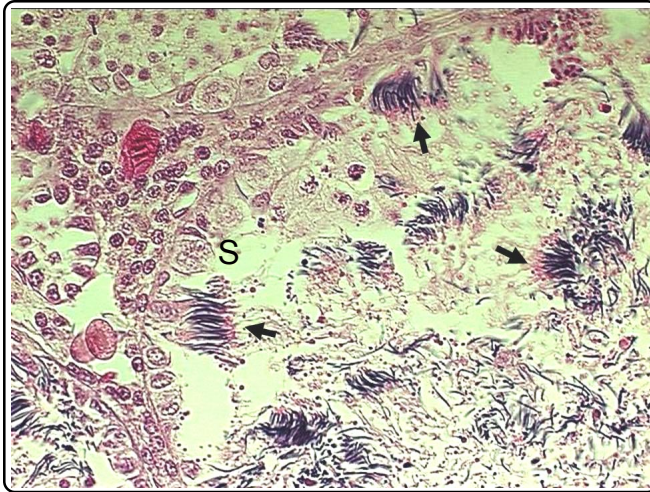


Figura 2. Túbulo seminífero de *B. fustiger*. Se observan en su interior cistos de espermatozoides (flechas). Se aprecian también otros dos túbulos en la zona izquierda con cistos de espermatogonias y espermatocitos. Célula de Sertoli= S. Tricrómica de Mallory. 60X.

Cada túbulo o lóculo seminífero contiene *clusters* o agrupaciones de células germinales en diferentes estadios de diferenciación organizadas en cistos o quistes que ocurren debido a la íntima asociación morfofuncional con las células de Sertoli. En los cistos (Figura 2) las células están en un mismo estado de diferenciación y con un desarrollo sincrónico. Rara vez los cistos presentan células con algunas diferencias en su desarrollo por lo cual puede afirmarse que los cistos o quistes son un grupo celular en un mismo estado de diferenciación.

Los diferentes tipos celulares diferenciados fueron identificados de acuerdo a su morfología y disposición en los cistos.

Las células espermátogénicas en los cistos se observan en todos los grados de desarrollo: espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátidas redondas o tempranas, espermátidas tardías y espermatozoides agrupados como ramilletes (Figura 2).

Las espermatogonias definitivas mitóticas son células cuyos núcleos son redondeados y frecuentemente se observó al microscopio electrónico la presencia de un nucléolo excéntrico (Figura 3). Presentan gránulos de cromatina y en general están muy cerca de la pared del túbulo, asociadas a las células de Sertoli.

Los espermatocitos I son el resultado de la diferenciación de las espermatogonias que entraron en la profase meiótica, su núcleo es ligeramente condensado y, en general, los espermatocitos se observan en las distintas fases de la primera división meiótica, que presentan diferentes grados de compactación de los materiales nucleares. En el microscopio electrónico de transmisión se aprecian los cromosomas en la profase I de la meiosis (Figura 4).

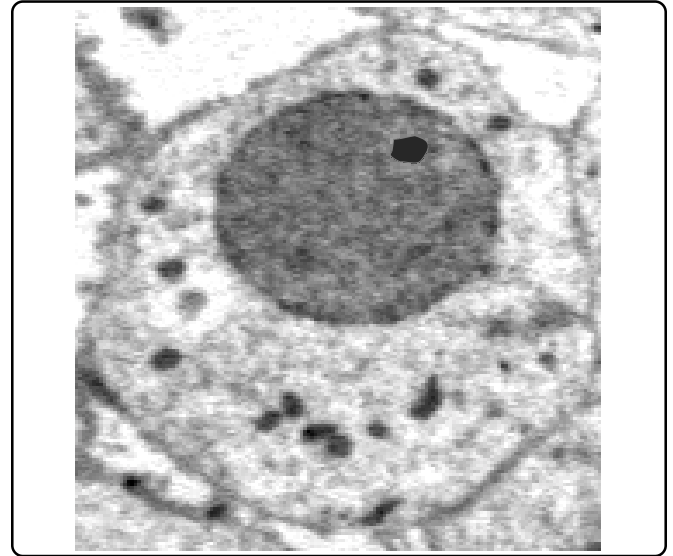


Figura 3. Espermatogonia al microscopio.

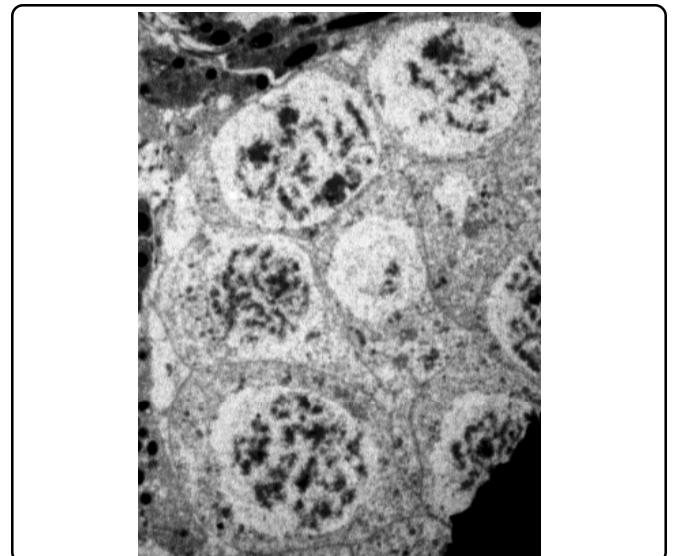


Figura 4. Cisto de espermatocitos. Microscopio electrónico de transmisión (MET) 2K (MET) 5K.

Los espermatocitos II los cuales ya son células haploides y bastante menores que sus antecesoras, son difíciles de observar pues son muy transitorias y rápidamente pasan por la segunda división de la meiosis para originar a las espermátidas. Éstas, en el estado primario, son células redondeadas. Las espermátidas II o en alargamiento son células con núcleos alargados y compactos (Figura 5). Estas células pasan el proceso de espermiogénesis para generar a los espermatozoides, se puede observar en esta transición la presencia de mitocondrias en el citoplasma, la formación del acrosoma (Figura 6) y la síntesis del axonema de la cola o flagelo (Figura 7).

Los espermatozoides están caracterizados por una extraordinaria compactación nuclear y una reducción del citoplasma. Son

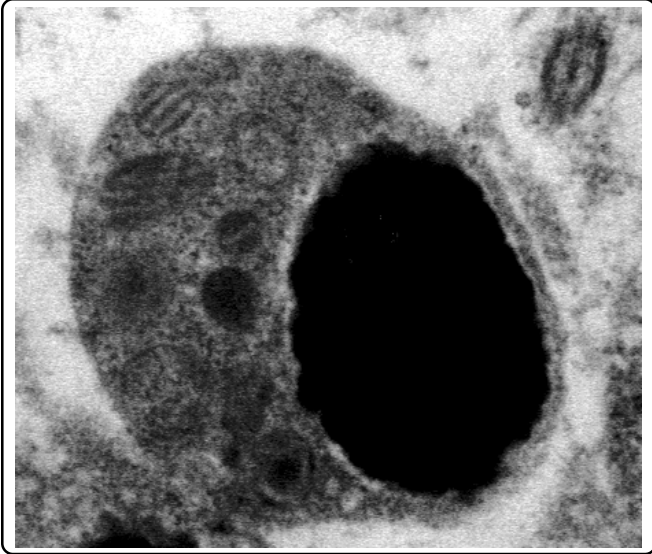


Figura 5. Espermátida II en proceso de espermiogénesis. Observe la presencia en el citoplasma de varias mitocondrias y la compactación de la cromatina en el núcleo. 30K.

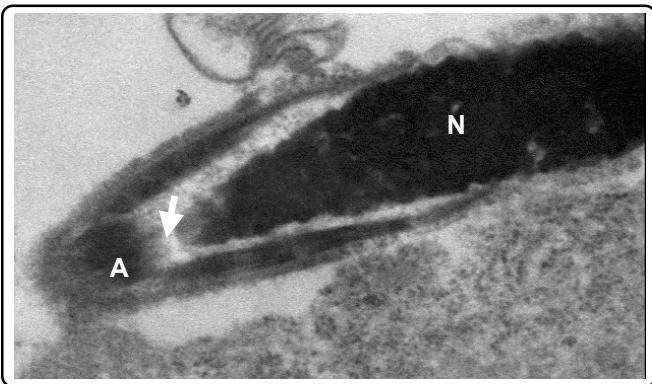


Figura 6. Espermatozoide en formación. Se aprecia parte de la cabeza con el acrosoma, (A) el espacio subacrosómico (flecha) y el núcleo con la cromatina muy densa (N). 30K.

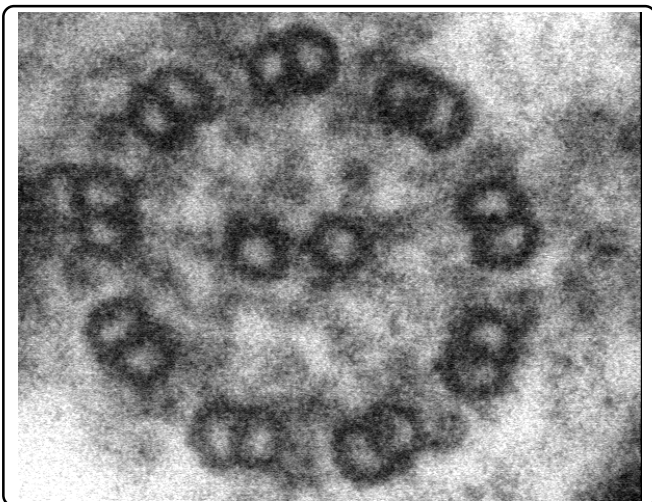


Figura 7. Corte transversal de la cola del espermatozoide. Se observa el axonema con el patrón de microtúbulos 9+2. 43K.

delgados y la cabeza es cónica y en algunos puede observarse la presencia de dos colas (Figura 8) no fue apreciada una estructura similar a una membrana ondulante. Los espermatozoides en desarrollo están dispuestos en ramilletes o haces muy bien organizados debido a su asociación con las células de Sertoli de cuyo citoplasma van a ser liberados al lumen de los túbulos seminíferos (Figura 2).

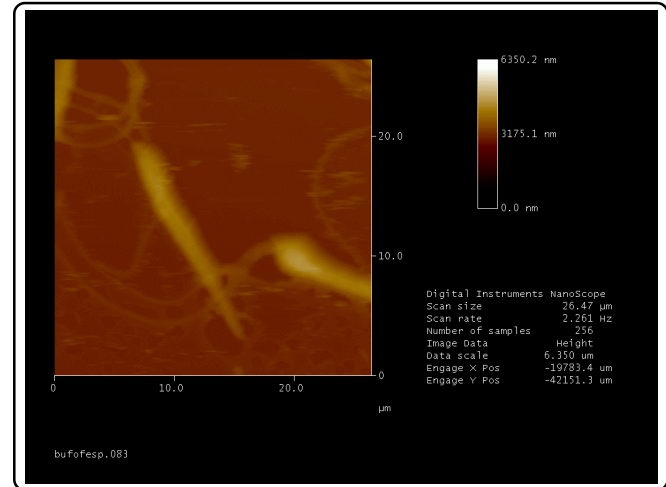


Figura 8. Espermatozoides de *Bufo fustiger* observados en el microscopio de fuerza atómica.

La parte anterior de la gónada del macho de *B. fustiger* es el órgano de Bidder y se aprecian en el microscopio de luz los ovocitos previtelogénicos similares a los ováricos, con células foliculares planas y uno o dos nucléolos (Figura 9). En el microscopio electrónico de transmisión puede observarse un ovocito del órgano de Bidder, con la presencia de dos nucléolos bien conspicuos (Figura 10).

DISCUSIÓN

En cuanto a la arquitectura histológica general del testículo observada en *Bufo fustiger* se verificó una gran similitud con las descripciones de otras especies de anuros^{13,14}.

La 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 anfibios anuros en general, por ejemplo, para *Physalaemus cuvieri*² y, en particular, del mismo género, para *Bufo woodhousei*¹⁵ y *Bufo bufo*⁶.

Los espermatozoides I fueron observados en la profase I de la meiosis, en la cual ocurrió el intercambio genético. En esta investigación se observó que los espermatozoides I eran comúnmente más grandes que las espermatozoides. Estos resultados coinciden con varios autores^{16,4} quienes afirmaron que la célula más grande observada durante el proceso de la espermatogénesis es el espermatozoides I. El espermatozoides primario



Figura 9. Parte anterior de la gónada de *Bufo fustiger* donde pueden observarse los ovocitos del órgano de Bidder y cistos de espermatozoides. Entre ambos, tejido conectivo y un vaso sanguíneo. Tricrómica de Mallory (400 X).

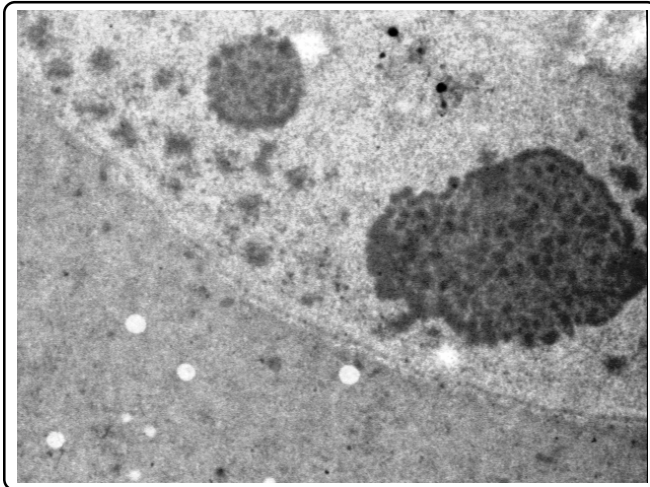


Figura 10. Zona de un ovocito del órgano de Bidder. Observe los dos nucléolos y la envoltura nuclear.

o espermatozocito I pasó el proceso de crecimiento y si bien no incrementa tanto en tamaño como su homóloga femenina el ovocito I¹⁷ sí se aprecia mayor que las espermatogonias que le preceden, y aún más que los espermatozocitos II a quienes origina en la primera división de maduración de la meiosis. Sin embargo, Oliveira *et al.*² afirman que la célula más grande en el proceso de la espermatogénesis en *Physalaemus cuvieri* es la espermatogonia I.

Las siguientes etapas de la espermatogénesis se caracterizan por un alargamiento celular y nuclear, que se producen simultáneamente con la condensación de la cromatina¹⁸, pues está ocurriendo el proceso de espermiogénesis y en esta etapa se observan las espermátidas desde redondeadas o tempranas hasta los espermatozoides. Al final de la espermatogénesis, los espermatozoides se mantienen unidos como en ramilletes, que

siguen siendo sostenidos por las células de Sertoli¹³.

El espermatozocito de *B. fustiger* muestra características similares a las de otros miembros del género^{19,20}, la cabeza es cónica con un acrosoma, espacio subacrosómico y el núcleo. El aparato flagelar comparte el patrón 9 + 2 de microtúbulos con anuros^{21,22} y otros vertebrados²³. La ausencia de membrana ondulante y la presencia de dos colas en algunos es peculiar.

Con relación a la presencia del órgano de Bidder en esta especie objeto de estudio, algunos autores afirman que pudiera convertirse en un ovario funcional^{1,4,5} y consideran que tiene características estructurales capaces de producir células sexuales. Farias *et al.*²⁴ encontraron el órgano de Bidder presente también en las hembras de *Bufo ictericus*, sin embargo, en *B. fustiger* no se observó la presencia de este órgano en las hembras ni aun se cuenta con investigaciones que permitan afirmar para esta especie que este peculiar órgano, o quizá ovario rudimentario, pueda convertirse en funcional si las condiciones lo requieran.

Aunque la arquitectura del epitelio germinal del sapo *B. fustiger* representa un modelo típico de los anuros, la disposición cística de las células germinales se confirma como una importante característica de los anfibios anuros, así como de otros vertebrados anamniotas. Las particularidades de sus espermatozoides pueden estar relacionadas con aspectos filogenéticos²² y con las estrategias de reproducción de los anuros¹.

AGRADECIMIENTOS

A Intercambio Académico de la UNAM por permitirnos realizar estancias en el Laboratorio de Nanobiología Celular de la Facultad de Ciencias y al Programa de Doctorado Conjunto Universidad Nacional Autónoma de México-Universidad de la Habana (UNAN-UH).

REFERENCIAS

1. Duellman, W.E. & Trueb, L. Biology of amphibians (McGraw-Hill, 1994) 670 págs.
2. Oliveira, C., Zanetoni, C. & Zieri, R. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Rev. Chil. Anat.* **20(3)**, 263-268 (2002).
3. McDiarmid, R. Comparative morphology and evolution of frogs of the Neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus*, and *Oreophrynella*. *Bull. Los Angeles County Museum Natural History* **12**, 1-66 (1971).
4. 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).
5. Farias, 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. Farias, C.F., Azevedo, R.A. & de Brito-Gitirana, L. Expression pattern of glycoconjugates in the Bidderian and ovarian follicles of Brazilian toad *Bufo ictericus* as analyzed by lectin histochemistry. *Brazilian Journal of Biology* **66**(1a), 29-41 (2006).
9. Rivalta, V., Sampedro, A. & Moreno, L.V. Misteriosos pobladores de la naturaleza en "Anfibios y Reptiles de Cuba" (Rodríguez-Schettino, L., ed.) 56-62 (UPC Print, Vaasa, Finlandia) (2003).
10. George, R., Segura, M.L., González, L. & Jiménez, L.F. Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues Changes in the uterus by hormone action. *Biol. Cell.* **94**, 99-108 (2004).
11. Vázquez-Nin, G.H. & Echevarría, O.M. Introducción a la Microscopía Aplicada a las Ciencias Biológicas (UNAM, Fondo de Cultura Económica, México, D.F., 2000).
12. Jiménez-García, L.F. & Segura-Valdez, M.L. en Atomic Force Microscopy: Methods and Applications. *Methods in Molecular Biology* (Braga, P.C. & Ricci, D., eds.) 191-199 (Humana Press New Jersey, 2004)
13. Oliveira, C. & Vicentini, C.A. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). *Biociências* **6**, 79-88 (1998).
14. Santos de Souza, R. Reproductive Cycle of Males of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Biota Neotropica* **7**(2), (2007).
15. Atherton, R. W. A gradient analysis of spermatogenesis in the toad *Bufo woodhousei* Girard (1854). *Herpetologica* **30**, 240-244 (1974).
16. 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).
17. Gilbert, S.F. *Developmental Biology* (Sinauer Associates Inc., 2006). 751 págs.
18. Amaral, M.J., Fernandes, A.P., Bao, S.N. & Recco-Pimentel, S.M. An ultrastructural study of spermiogenesis in three species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). *Biocell.* **23**(3), 211-21 (1999).
19. 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* **1068**(suppl2), 203-216 (2001).
20. 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).
21. 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).
22. 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).
23. 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).
24. Farias, C.F., de Brito-Gitirana, L. & Carvalho-e-Silva, S.P. Bidder's organ in the female of *Bufo ictericus*: morphological characterization. *Contributions to Zoology* **4**(317) (2004).