

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

ESTADIOS DE LA ESPERMATOGÉNESIS DE LA RANA PLATANERA **OSTEOPILUS SEPTENTRIONALIS (ANURA: HYLIDAE).**

Autores:

Roxana Rodríguez Ortiz¹, Yamilka Rodríguez Gómez², Ana Sanz Ochotorena³

1 Licenciada en Biología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

2 Profesora Titular, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

3 Profesora Titular, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

roxy.rodriguez.ortiz@gmail.com

RESUMEN

Osteopilus septentrionalis, la conocida rana platanera, es la única representante de la familia Hylidae en Cuba, siendo la especie más exitosa adaptativamente. Presenta un patrón primitivo de reproducción por la presencia de estadios larvales. Hasta el momento no se han realizado estudios sobre la morfología gonadal de los machos de esta especie a partir de la descripción histológica de las mismas. El estudio de su reproducción ayudaría a explicar su éxito adaptativo y brindaría información necesaria para la confección y el desarrollo de programas de manejo y conservación. El objetivo de este trabajo es describir los estadios de la espermatogénesis de Osteopilus septentrionalis mediante técnicas de microscopía en una localidad de Matanzas, Cuba. Los ejemplares fueron recolectados en Matanzas, entre los meses de octubre del 2013 y septiembre del 2014. Sus testículos se procesaron a través de métodos clásicos para microscopía óptica y electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos permiten afirmar que esta especie presenta el patrón espermatogénico cístico característico de anfibios anuros. Se observaron todos los estadios espermatogénicos en las gónadas. Los espermatozoides de estos ejemplares están formados por cabeza y cola, cuentan con prominentes brazos de dineína y carecen de estructuras accesorias en la cola.

Palabras claves: anfibios, espermatogénesis, espermatozoides, ultraestrucura

INTRODUCCIÓN

En Cuba la familia Hylidae se encuentra representada por una única especie, *Osteopilus septentrionalis*, más conocida popularmente como "rana platanera" [1]. La misma presenta la mayor plasticidad adaptativa de los anfibios que habitan en Cuba. Se reproduce en el agua, donde se desarrollan los huevos y las larvas. Los hábitats acuáticos pueden ser permanentes o estacionales [1]. La plasticidad adaptativa de esta especie tanto para el hábitat como para la selección de sitios para la reproducción condiciona que se halle prácticamente en todos los ecosistemas terrestres de Cuba, desde zonas costeras (que no soportan gran diversidad de anfibios), manglares, regiones desérticas y campos agrícolas, hasta los bosques lluviosos de las montañas; utilizando prácticamente todo tipo de cuerpos de agua. En las ciudades es característico encontrar en el interior de viviendas humanas al único representante cubano del género *Osteopilus* [2].

En los vertebrados, la estructura de las gónadas es similar en los aspectos básicos [3], pero particularmente en los anfibios se han encontrado diferencias que son utilizadas por los investigadores para intentar comprender las complejas relaciones que existen en este grupo zoológico [4]. De ahí que el estudio de la biología de la reproducción de esta especie ayude a explicar su éxito adaptativo y se pueda obtener información necesaria para la confección y el desarrollo de programas de manejo y conservación. El objetivo de este trabajo es describir los estadios de la espermatogénesis de *Osteopilus septentrionalis* mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 30 machos en los meses de octubre del 2013 a septiembre del 2014. Las recolectas fueron realizadas mensualmente en la provincia de Matanzas, Cuba. Los individuos fueron sacrificados *in situ*. Mediante una incisión abdominal con unas tijeras de microcirugía se abrió cada animal y una vez localizadas ambas gónadas fueron extraídas.

La gónada derecha de cada ejemplar fue fijada en paraformaldehído al 4 %. Las muestras fueron procesadas por la técnica clásica de inclusión en parafina. Las preparaciones se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E) para su posterior observación en un microscopio óptico Olympus BX51, con cámara digital para el registro fotográfico y se utilizaron objetivos de 4, 10 y 20X.

El procesamiento del material para microscopía electrónica de transmisión se inició con la fijación aldehídica de las gónadas izquierdas en una solución de glutaraldehído al 2.5 %. La inclusión se llevó a cabo con resina epóxica (Merck). Los bloques obtenidos fueron cortados en un ultramicrótomo (LeicaUltracut), utilizando cuchillas de vidrio para los cortes semifinos (200-500 nm) y de diamante para los ultrafinos (40-60 nm). Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina. Los cortes ultrafinos que se obtuvieron fueron colocados en rejillas de 200 *mesh* y se procedió a contrastarlos utilizando acetato de uranilo (PolySciences) al 3 % (en agua bidestilada) y citrato de plomo (PolySciences) al 0.3 %. Las rejillas contrastadas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL JEM 1010 que opera a 80 kV y se realizó el registro digital de las imágenes en una computadora Pentium 3 acoplada al microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los machos presentan dos testículos ovoides no pigmentados, los cuales se localizan adosados a los riñones por el mesorquio a nivel de su mitad anterior, aunque en etapa reproductiva pueden ser más largos y extenderse hasta la porción final de los riñones en la medida que avanza el proceso de producción de células sexuales. La disposición que presentaron los testículos en la cavidad abdominal es semejante a lo descrito para cinco anfibios endémicos de Cuba [5], así como para otros anuros [6]. Se encuentran recubiertos por una túnica albugínea, la cual desde su posición periférica al testículo, penetra un poco y envuelve a los numerosos compartimentos en el interior de este, llamados túbulos seminíferos, los cuales muestran una forma ovoide. La túnica albugínea es más gruesa que en las especies del género *Eleutherodactylus* analizadas por otro autor [7] y resultó carente de pigmentos al igual que lo descrito para *E. planirostris* [8]. La pigmentación de los testículos es una característica poco usual, que se observa en algunas especies de anuros [9].

Cada túbulo se encuentra rodeado por una membrana basal y están separados unos de otros por tejido intersticial, el cual proporciona apoyo a la gónada. En el tejido intersticial que rodea a los túbulos seminíferos se encontraron las células de Leydig, las cuales son alargadas con forma ovoide y con núcleo conspicuo. La función de estas células consiste en la producción de testosterona, jugando un papel fundamental en el incremento del tamaño testicular y en el proceso de espermatogénesis [10]. En observaciones microscópicas se detectaron en el interior de estas células abundantes mitocondrias y retículo endoplasmático liso, ambos, organelos característicos de células productoras de esteroides, lo cual sugiere una función endocrina en el proceso espermatogénico [7, 8]. Además otros autores plantean que las células de Leydig pueden suprimir la espermatogénesis en el estadio de espermatogonia secundaria en aquellas especies con patrón de reproducción discontinuo [11].

Se observó el patrón espermatogénico por cistos característico de los anfibios. Los cistos contienen células germinales íntimamente relacionadas morfofuncionalmente con células de Sertoli. La presencia de células de Sertoli es una característica permanente en la mayoría de los vertebrados [10]. Lo anterior concuerda con lo encontrado para cecilias [12], donde se plantea que las células de Sertoli se encuentran en el interior del cisto en todo momento del proceso de espermatogénesis, sin que estas desaparezcan. Dentro de los cistos, las células germinales se hallaron en un mismo estadio de diferenciación, desarrollándose así sincrónicamente.

Las células sexuales que inician el proceso de producción de los gametos masculinos son las espermatogonias. Estas presentaron el mayor tamaño entre todas las células observadas en el interior de los cistos, mostrando una forma ovoide y con núcleo casi esférico. Se ubican cercanas a la membrana basal del túbulo seminífero, adyacentes a la lámina basal y apoyadas sobre las células de Sertoli, donde se establecen como una población que da lugar al sucesivo estadio espermatogénico. Lo observado coincide con lo descrito para otros anfibios [13]. Sin embargo, es contrario a lo encontrado en *Eleutherodactylus* donde las células de mayor tamaño fueron los espermatocitos I [7].

En el proceso de diferenciación, una vez que las espermatogonias alcanzan la profase I de la meiosis se convierten en espermatocitos I. Estos presentaron forma semejante a las células que le dieron origen, pero el tamaño es menor. En el estadio de espermatocito I se observa una estrecha relación con las células de Sertoli [7]. En los mamíferos esta relación garantiza el paso de moléculas e iones que son necesarios para que la espermatogénesis transcurra adecuadamente y pudiera ser que en los anfibios cumpla esta misma función [10].

Los espermatocitos II se observaron en división. Estos son fácilmente distinguibles por su pequeño tamaño y por presentar un núcleo redondeado con densas aglomeraciones de cromatina. Las espermátidas se encuentran ubicadas hacia el lumen del túbulo seminífero. Son células redondeadas cuyo núcleo ocupa casi todo su interior.

En la medida que avanza la espermiogénesis las espermátidas se diferencian hasta dar lugar a los espermatozoides. Estos se evidenciaron en el centro de los cistos como células alargadas que forman ramilletes orientados en la misma dirección. En los espermatozoides maduros se observaron dos zonas: la cabeza y la cola. Las variaciones en las características morfológicas de los espermatozoides pueden ser consecuencia de los diferentes ambientes de fertilización [14] y debido a esto adquieren valor taxonómico. En anuros existe una tendencia a la simplificación del espermatozoide a través de la pérdida de estructuras debido a reversiones secundarias y a la fertilización externa [14, 15]. En la parte más externa de la cabeza se encuentra el acrosoma alargado, siguiendo a este se distingue el espacio subacrosómico carente de cono o perforatorio y luego el núcleo muy electrodenso debido a la elevada compactación de la cromatina. Según varios investigadores el acrosoma es una estructura que varía mucho en los espermatozoides y que le da forma a la cabeza [15, 16]. Esto concuerda con un estudio [17] en el que se plantea que el acrosoma es cónico en la mayoría de los anuros aunque es sacular en las especies del género *Rana* (consideradas muy evolucionadas entre los anuros) o muestra una estructura en espiral a los lados del núcleo en *Rhacophorus*, género considerado también como evolucionado. El acrosoma de *Colostethus sp.* está descrito como romo en sección longitudinal [18].

En un corte transversal de la cabeza entre el acrosoma y el núcleo se observó una región más clara correspondiente al espacio subacrosómico, donde hacia el centro y posterior a este se encuentra el núcleo. En el espacio subacrosómico de *O. septentrionalis* se observó la ausencia de cualquier estructura (cono o perforatorio) a diferencia de *Phylomedusa bicolor, Phylomedusa tarsius* y *Phylomedusa hypochondrialis* las cuales presentan esta región granular [19]. Algunos autores consideraron que el cono subacrosómico presente en el espermatozoide de *Ascaphus* (anuro primitivo) es característico de los urodelos pero no está presente en la mayoría de los anuros [17]. Otros autores observaron perforatorio en *Cophixalus ornatus* (Anura: Microhylidae) [20].

En la concavidad del núcleo se encuentran los centriolos a partir de los cuales se organizan los microtúbulos del axonema. La cola está formada por el axonema que corre a todo su largo, la región correspondiente a la pieza media y la pieza principal presentan una vaina mitocondrial rodeando el axonema, y la pieza final que solo tiene axonema y membrana plasmática. En las especies que muestran un modo acuático de fertilización la movilidad del espermatozoide es importante para su locomoción hasta el ovocito de la hembra, aun cuando las cloacas del macho y la hembra estén muy próximas en el momento de la puesta, de ahí la importancia de la gran cantidad de mitocondrias presentes en *O. septentrionalis*. La posición de las mitocondrias varía en los espermatozoides de las distintas familias de anuros [17]. En las familias Bufonidae, Hylidae y Eleutherodactylidae la localización de las mitocondrias es alrededor del axonema.

El axonema en un corte transversal se encuentra constituido por nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central, lo que se conoce como disposición 9+2. Los dobletes se observan conectados por brazos de dineína. En *Eleutherodactylus planirostris* se observaron brazos de dineína cortos y en algunos casos ausentes [8], al igual que para cuatro especies del mismo género [7].

En los ejemplares estudiados no se observó membrana ondulante como estructura accesoria de la cola del espermatozoide. Generalmente el espermatozoide de la familia Hylidae tiene una membrana ondulante y una fibra axial y otra yuxtaxonemal [15], características estas de las más comunes en los espermatozoides de los anuros.

CONCLUSIONES

- Los testículos de Osteopilus septentrionalis presentan todos los tipos celulares característicos de las gónadas de los anfibios durante la espermatogénesis.
- Los espermatozoides de estos ejemplares están formados por cabeza y cola, cuentan con prominentes brazos de dineína y carecen de estructuras accesorias en la cola.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Rodríguez-Schettino, L. Anfibios y Reptiles de Cuba. UPC Print, Vaasa, Finlandia. 2003; 169 pp.
- Díaz, L M, Cádiz, A. Guía taxonómica de los anfibios de Cuba, Bélgica, ABC Taxa. 2008; Vol. 4 i-vi, 294 pp.
- 3. Duellman, W, Trueb, L. Biology of Amphibians. The Johns Hopkins University Press, Baltimore y London. 1994; 613 pp.
- 4. Tries, R. Morphology of Vertebrate. Sperm. Pergamos Press. 1995; 504 pp.
- 5. Sanz-Ochotorena, A., Segura-Valdés, M L, Rodríguez-Gómez, Y, Lara-Martínez, R, Jiménez-García, L F. Pigmentos en los testículos de cinco

anfibios endémicos de Cuba (*Eleutherodactylus turquinensis, E, cuneatus, E. glamyrus, Bufo longinasus longinasus y B. cajalbanensis*). D.R. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.2011; 14(1):85-92.

- De Santos, L R, De Oliveira, C. Morfometría testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). Rev. Bras. Zool. 2007; 24 (1): 64-70.
- Rodríguez, Y. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Morfología de las gónadas de cuatro especies del género *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae). Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Ciudad de la Habana. 2008; 87pp.
- Iturriaga, M, Rodríguez Y, Sanz A. Structural and ultrastructural description of the gonads of *Eleutherodactylus planirostris* (Anura: Eleutherodactylidae). Herpetol. Notes. 2012; 5:281-290.
- De Oliveira, C, Zanetoni, C, Zieri, R. "Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura)". Rev. Chil. Anat. 2002; 20(3):263-268.
- 10. Gilbert, S F. Developmental Biology. Carol Wigg (Ed.) 8va. Edición. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, E.U.A. 2006; 817 pp.
- Shalan, A G, Bradshaw, S D, Withers, P C, Thompson, G, Bayomy, M F, Bradshaw, F J, Stewart, T. Spermatogenesis and plasma testosterone levels in Western Australian burrowing desert frogs, *Cyclorana platycephala, Cyclorana maini,* and *Neobatrachus sutor,* during aestivation.Gen. and Comp. Endocrinol. 2004; 136:90-100.
- Smita, M, Oommen, O V, Jancy, M G, Akbarsha, M A. Stages in Spermatogenesis of Two Species of Caecilians, *Ichthyophis tricolor* and *Uraeotyphlus cf. narayani* (Amphibia: Gymnophiona): Light and Electron Microscopic Study. J. Morphol. 2004; 261:92-104.
- Jamieson, B G M. Reproductive Biology and Phylogeny of Anura. Sci. Pub. Inc. 2003; 452 pp.
- 14. Garda, A A, Costa, G C, Colli, G R, Báo, S N. The spermatozoa of Pseudinae (Amphibia, Anura, Hylidae), with a test of hypothesis that sperm

ultrastructure correlates with reproductive modes in anurans. J. Morphol. 2004; 261:196-205.

- Van der Horst, G, Wilson, B A, Charming, A. Amphibian sperm: phylogeny and fertilization environment. In Jamieson, B. G. M., Ausio, J., and Justine, J.-L. (Eds), Advances in Spermatozoa1 Phylogeny and Taxonomy. Mem Mus Nat Hist Nat, Paris. 1995; 166:333-342.
- Teixeira R D, Colli, G R, Báo, S N. The ultrastructure of the spermatozoa of the lizard *Micrablepharus maximiliani* (Squamata, Gymnophthalmidae), with considerations on the use of sperm ultrastructure characters in phylogenetic reconstruction. Acta Zool. 1999; 80:47–59.
- Kwon, A S, Lee, Y H. Comparative spermatology of anuran with special references to phylogeny. In: Jamieson BGM, Ausio[']J, Justine JL. Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mem Mus Nat Hist Nat, Paris. 1995; 166:321–332.
- Aguiar-Jr., O, Garda, A A, Lima, A P, Colli, G R, Báo, S N, Recco-Pimentel, S
 M. Biflagellate Spermatozoon of the Poison-Dart Frogs *Epipedobates femoralis* and *Colostethus sp.* (Anura, Dendrobatidae). J. Morphol. 2003; 255:114-121.
- Costa, G C, Garda, A A, Teixeira, R D, Colli, G R, Báo, S N. Comparative analysis of the sperm ultraestructure of three species of *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae). Acta Zool. 2004; 85: 257-262.
- Scheltinga, D M, Jamieson, B G M, Bickford, D P, Garda, A A, Báo, S N, McDonald, K R. Morphology of the spermatozoa of the Microhylidae (Anura, Amphibia). Acta Zool. 2002; 83:263-275.

ANEXOS

Leyenda de las fotomicrografías de las gónadas de Osteopilus septentrionalis:



Fig 1. Testículo teñido con hematoxilina-eosina donde se observa el patrón cístico y la presencia de espermatozoides.



Fig 2. Sección de testículo teñido con azul de toluidina donde se observan partes de dos cistos. ta: túnica albugínea, eg: espermatogonia, esp I: espermatocitos primarios (I), rez: ramillete de espermatozoides.



Fig 3. Secciones de testículo contrastados con con acetato de uranilo y citrato de plomo donde se observan las células sexuales en los diferentes estadios de la espermatogénesis y el núcleo de una célula de Sertoli. **A:** Espermatogonia. Nú: núcleo, eg: espermatogonia. **B:** Cisto de espermatocitos primarios (I). esp I: espermatocito primario(I). **C:** Espermatocito secundario (II) en división. esp II: espermatocito secundario (II). **D:** Cisto de espermátidas. S: Sertoli, Nú: núcleo de Sertoli, ed: espermátida.

Fig 4. Cabeza de un espermatozoide contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. Nú: núcleo, es: espacio subacrosómico, ac: acrosoma.

Fig 5. Cola en corte transversal de un espermatozoide contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. ci: citoplasma, mi: mitocondrias, ax: axonema.