

MORFOLOGÍA MACRO Y MICROSCÓPICA DE LAS GÓNADAS DE *PELTOPHRYNE EMPUSA* (ANURA: BUFONIDAE)

MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC MORPHOLOGY OF THE GONADS OF *PELTOPHRYNE EMPUSA* (ANURA: BUFONIDAE)

✉ JAIRON PÉREZ COPA^{1,✉}, ANA SANZ OCHOTORENA², YAMILKA RODRÍGUEZ GÓMEZ²,
MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDÉZ³, REYNA LARA MARTÍNEZ³, LUIS FELIPE JIMÉNEZ-GARCÍA³

1. Museo Nacional de Historia Natural de Cuba
2. Facultad de Biología, Universidad de la Habana
3. Laboratorio Nanobiología celular, Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue hacer una descripción macro y microscópica de la morfología gonadal de *Peltophryne empusa*. Para realizarlo se recolectaron seis ejemplares (dos machos y cuatro hembras) de esta especie en las dos estaciones, seca y húmeda, del período 2018-2019 en la localidad de San Paúl, Artemisa, Cuba. Los ejemplares fueron anestesiados mediante una solución de dietiléter al 99 %, luego medidos y pesados y posteriormente diseccionados. Las gónadas masculinas fueron extraídas íntegramente, mientras que sólo se tomaron fragmentos de los ovarios. Estas muestras fueron luego fijadas en formaldehído al 4 % y glutaraldehído al 2,4 % para ser procesadas por técnicas de microscopía óptica y electrónica, respectivamente. Las gónadas masculinas estaban compuestas por dos testículos alargados, no pigmentados y muy lobulados y dos órganos de Bidder en posición cefálica. Las gónadas femeninas no presentaban el órgano de Bidder. Varios cistos con células sexuales en diferentes etapas de la espermatogénesis fueron encontrados en los testículos como: espermatozoides, espermátidas, espermatoцитos, células de Sertoli y tejido conectivo. El órgano de Bidder poseía ovocitos previtelogénicos, cuerpos atrésicos y tejido adiposo. Los espermatozoides presentaron cabeza, cola y una membrana ondulante. El ovario estaba formado por ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos, cuerpos atrésicos y lechos germinales. Los ovocitos estaban divididos en un polo animal pigmentado y uno vegetal, el núcleo contenía nucléolos y cromosomas en escobilla (*lampbrush*). La presencia de características reproductivas durante la etapa seca en las hembras pudo deberse a la abundancia de precipitaciones al inicio de esta.

PALABRAS CLAVES: morfología gonadal, órgano de Bidder, ovario, testículo, ultraestructura.

ABSTRACT: The goal of this study is to make a macroscopic and microscopic description of the gonadal morphology of *Peltophryne empusa*. To do so, six specimens (two males and four females) were collected during the two seasons (dry and wet) of the period 2018-2019 in San Paúl, Artemisa, Cuba. Specimens were anesthetized with a diethyl-ether 99% solution, then, they were sized and measured. After that they were dissected and the entire masculine gonads and part of the feminine ones were taken and fixed in formaldehyde 4% and glutaraldehyde 2.4% solutions to be processed by optical and electronic microscopy respectively. Masculine gonads consisted in two elongated non pigmented and very lobulated testicles and two Bidder's organs located in cephalic position. Feminine one had no Bidder's organ. Several cysts with sexual cells in different stages of the spermatogenesis were found in the testicles such as: spermatozoa, spermatids, spermatocytes, Sertoli cells and connective tissue. Bidder's organ consisted in previtellogenetic oocytes, atresic bodies and fat tissue. Spermatozoa were formed by a head, a tail and an undulant membrane. Previtellogenetic and vitellogenetic oocytes, as well as atresic bodies and germinal bed were found in the ovaries. Oocytes were divided in an animal and a vegetal pole, the nucleus contained nucleoli and lamp brush chromosomes. These characteristics are similar to those of other are also found in other Cuban and foreign anurans. The presence of reproductive characteristics during the dry season in females might have been due to the high precipitations at the beginning of that season.

KEY WORDS: Bidder's organ, gonads morphology, ovary, testicle, ultrastructure.

✉ Jairon Pérez Copa
jaironcopa@gmail.com

Recibido: 11 de agosto de 2020

Aceptado: 24 de marzo de 2021



Este es un artículo publicado en acceso abierto
bajo una licencia Creative Commons



INTRODUCCIÓN

Entre los países que conforman el llamado punto caliente de biodiversidad o *hot spot* del Caribe se encuentra Cuba, lo cual es producto del alto número de especies de plantas y animales que en ella habitan (Myers *et al.*, 2000). Entre los grupos de animales presentes en el archipiélago cubano se destacan los anfibios con 68 especies (66 de las cuales son endémicas) (Alonso y García, 2017). *Peltophryne* es uno de los géneros que conforman este grupo y cuenta con 12 especies. Se distribuyen en las Antillas mayores e islas Vírgenes Británicas (Pregill, 1981). Del total de especies, 8 son exclusivamente cubanas (Alonso *et al.*, 2012).

Se han realizado estudios sobre la biología reproductiva de otros miembros del género en Cuba, ya sea la espermatogénesis (Sanz *et al.*, 2007), la morfología de las gónadas (Sanz *et al.*, 2008) o sobre el órgano de Bidder (Sanz, 2015). Sin embargo, no se ha hecho ningún estudio relacionado con la biología reproductiva de *P. empusa* excepto por la descripción de su metamorfosis en condiciones de laboratorio (Kidov *et al.*, 2017). Por esto es necesario la realización de estudios sobre la biología reproductiva, pues puede brindar información útil para la conservación de la especie. Además, se conoce poco sobre la función de órgano de Bidder, una estructura similar a un ovario presente mayoritariamente en los machos de la familia Bufonidae, así como en algunas hembras (Piprek *et al.*, 2014). Sin embargo, se sabe que, si son extirpados los testículos, este órgano deriva en un ovario (Harms, 1921; Browns *et al.*, 2002). Además, se piensa que puedan presentar función endocrina (Abramyan, 2010). Es por ello que el objetivo de este trabajo es realizar una descripción macro y microscópica de las gónadas de *P. empusa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *P. empusa* fueron recolectados en la Finca San Paúl (22,9303°N; 82,45731°W), una localidad perteneciente al municipio San Antonio de los Baños, provincia Artemisa, Cuba. Estas colectas se llevaron a cabo durante el período 2018-2019, donde obtuvieron un total de dos ejemplares machos y cuatro hembras.

Los ejemplares fueron posteriormente llevados al laboratorio donde se anestesiaron mediante una solución de dietiléter al 99 %. Posteriormente se procedió a medirlos, desde la punta del hocico hasta la cloaca mediante un pie de rey con un error de 0,01 mm, y a pesarlos mediante una balanza con un error de 0,5 g. Una vez hecho esto se diseccionaron y

se les extrajeron las gónadas (en caso de los machos) o partes de ellas (en caso de las hembras).

Las muestras fueron entonces fijadas en soluciones de formaldehído al 4 % y de glutaraldehído al 2,5 % para ser procesadas por técnicas histológicas para microscopías óptica y electrónica, respectivamente. Luego, en el caso de las muestras para ser analizadas mediante microscopía óptica, pasaron a ser teñidas con hematoxilina-eosina y con la técnica tricrómica de Mallory. En el caso de las muestras para microscopía electrónica se tiñeron mediante azul de toluidina y acetato de uranilo y citrato de plomo.

Los cortes histológicos fueron observados mediante un microscopio óptico Novel a 4x, 10x y 40x. En el caso de los cortes para microscopía electrónica, se empleó un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM.

RESULTADOS

Machos: Los ejemplares machos presentaron un par de gónadas situadas bajo las vísceras y encima de los riñones. Eran alargadas y estaban compuestas por un testículo y un órgano de Bidder situado en posición cefálica. Sólo se detectaron cuerpos grasos en la época seca, los cuales eran amarillos y de aspecto digitiforme. Los testículos eran no pigmentados y muy lobulados, dichos lóbulos podían estar hasta separados del testículo principal sin que hubiera tejido adiposo que los uniera (Fig.1A). El órgano de Bidder era redondeado y pequeño en comparación con el testículo y su superficie era irregular debido a los ovocitos presentes.

Bajo el microscopio óptico, las gónadas estaban divididas entre órgano de Bidder y testículo por una capa de tejido conectivo. El órgano de Bidder poseía una cantidad abundante de tejido adiposo, de forma tal que los ovocitos estaban desplazados hacia uno de los lados y dispuestos en una hilera. El testículo contenía túbulos seminíferos delimitados por tejido conectivo, así como cistos donde ocurría la espermatogénesis (Fig. 1B).

Los ovocitos presentes en el órgano de Bidder se encontraban en fase previtelogénica con muchos nucléolos (de 2 - 24) en el núcleo (Fig.1C). Se encontraron también cuerpos atrésicos. En cuanto al testículo, los cistos se encontraban en distintas fases de la espermatogénesis, de forma independiente, no continua, como en la espermatogénesis radial de los amniotas. Aunque predominaban los espermatozoides y las espermátidas (tempranas, medias y tardía), así como células de Sertoli y células de tejido conectivo (Fig.1D). De manera general, en ambas estaciones del año se encontraron espermatozoides y espermátidas en las gónadas, aunque en la temporada seca fueron mucho menos numerosos.

En las muestras para microscopio electrónico se observó que los espermatozoides estaban formados por una cabeza y una cola, aunque se encontró uno con dos colas (Fig. 1E). La cabeza era alargada y elíptica, con un extremo aguzado y estaba formada por el núcleo compactado de cromatina, un espacio subacrosómico y el acrosoma. La cola poseía una membrana ondulante y estaba compuesta por nueve pares periféricos y un par central de microtúbulos. También se observaron espermátidas en formación rodeadas por el citoplasma de las células de Sertoli, las cuales poseían numerosas mitocondrias (Fig. 1F).

Hembras: Las hembras se encontraron con la cavidad abdominal repleta de ovocitos (cubrían toda

la cavidad abdominal) en ambas estaciones del año. No se encontró el órgano de Bidder ni se observó una división entre ambos ovarios. Los ovocitos estaban pigmentados por el polo animal, mientras que el polo vegetal poseía vitelo y era de color blanco amarillento. Sólo se encontraron cuerpos grasos en una hembra durante la temporada seca, los cuales tenían el mismo aspecto que los hallados en los machos.

Vistos bajo el microscopio óptico, en ambas épocas del año se encontraron ovocitos vitelogénicos y previtelogénicos. También se observaron lechos germinales situados en la periferia de los ovarios y una leve cavidad central (Fig. 2A) así como cuerpos

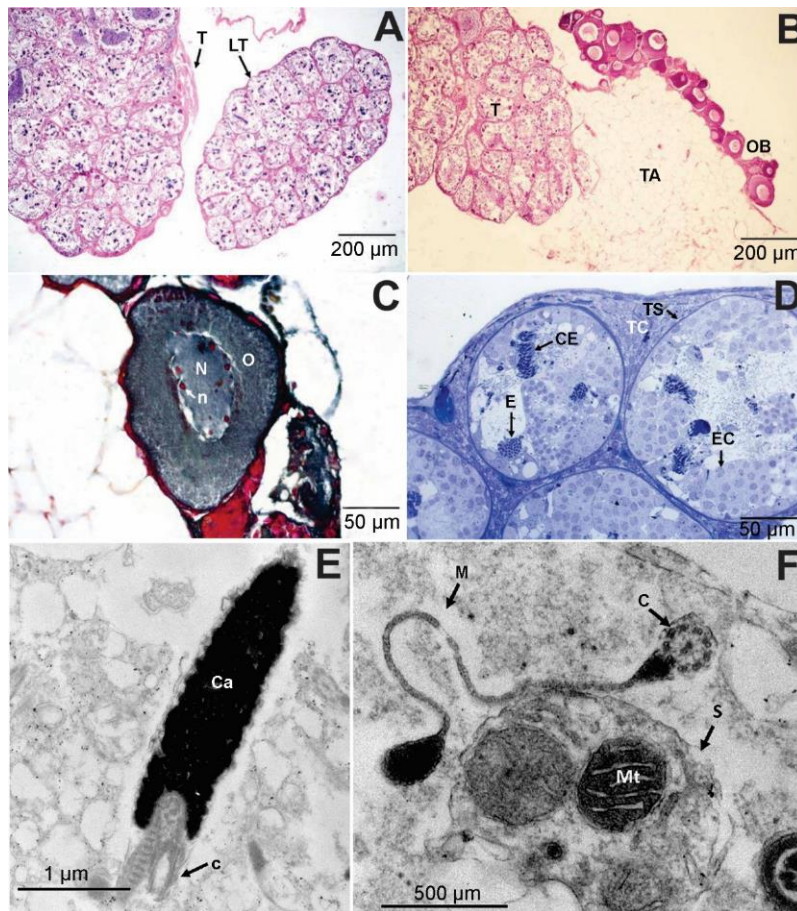


FIGURA 1. Microfotografías de las gónadas masculinas de *Peltophryne empusa*. A-D mediante microscopio óptico, E y F mediante microscopio electrónico. Testículo, A y B. Ovocito, C. Gónada masculina vista a través del microscopio óptico de campo claro, D. Espermatozoide con dos colas, E. corte transversal de una espermátida avanzada, F. (C) cola, (c) microtúbulos periféricos y centrales de la cola, (CE) cisto de espermátidas, (E) espermátidas tempranas, (EC) espermatocitos, (LT) lóbulo del testículo, (M) membrana ondulante, (Mt) mitocondria, (Ca) cabeza, (N) núcleo, (n) nucléolo, (O) ovocito, (OB) órgano de Bidder, (S) célula de Sertoli, (T) testículo, (TA) tejido adiposo, (TC) tejido conectivo, (TS) túbulo seminífero.

FIGURE 1. Microphotographs of the male gonads of *Peltophryne empusa*. A-D by an optic microscope, E and F by an electronic microscope. Testicle, A and B. Oocyte, C. Masculine gonad seen through the bright field optic microscope, D a two-tail spermatozoa, E. transversal cut from an advanced spermatid, F. (C) tail, (c) central and peripheral microtubules of the tail, (CE) cyst of spermatids, (E) early spermatids, (EC) spermatocytes, (LT) testicle lobule, (M) undulant membrane, (Mt) mitochondria, (Ca) head, (N) nucleus, (n) nucleolus, (O) (O) ovocito, (OB) Bidder's organ, (S) Sertoli cell, (T) testicle, (TA) fat tissue, (TC) connective tissue, (TS) seminiferal tubule.

atrásicos. Los ovocitos presentaban una gran cantidad de vitelo en el polo vegetativo, mientras que el polo animal estaba pigmentado (Fig. 2B) y se encontraban rodeados por dos capas: una membrana vitelina y una capa de células foliculares (Fig. 2C). Los núcleos poseían nucléolos y cromosomas en escobilla (*lampbrush*) (Fig. 2D). Bajo el microscopio electrónico se observó el complejo de Golgi (Fig. 2E), las mitocondrias (Fig. 2F) y los complejos de unión (Fig. 2G).

DISCUSIÓN

Las características presentes en las gónadas masculinas de *Peltophryne empusa* son similares a las encontradas en otros sapos: cubanos como *P. fustiger* (Sanz *et al.*, 2007), *P. gundlachii* y *P. cataulaciceps* (Sanz *et al.*, 2015) y extranjeros como *Rhinella marina* (Brown *et al.*, 2002) y *Bufo lentiginosus* (King, 1908). El hecho de haber hallado el órgano de Bidder en posición cefálica del testículo

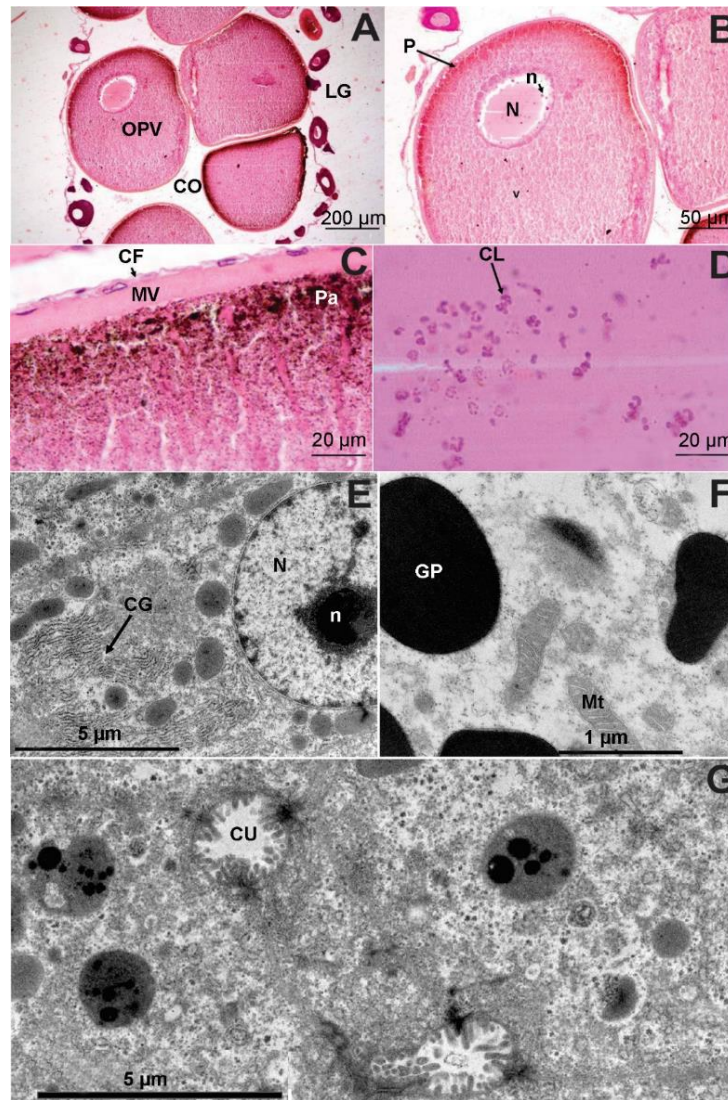


FIGURA 2. Microfotografías de los ovarios de *Peltophryne empusa* A-D mediante microscopio óptico, E-G mediante microscopio electrónico. (OPV) Ovocito previtelogénico, A y B. Capas que rodean a los ovocitos, C. (CL) Cromosomas en escobilla, D. Ovocito, E. (GP) Gránulo de pigmento, (Mt) mitocondrias, F. (CU) complejos de unión, G. (CF) capa de células foliculares, (CG) complejo de Golgi, (CO) cavidad del ovario, (LG) lecho germinal, (MV) membrana vitelina, (N) el núcleo, (n) un nucléolo, (Pa) pigmentos del polo animal, (P) pigmentos, (V) el vitelo.

FIGURE 2. Microphotographs of the ovaries of *Peltophryne empusa*. A-D by an optic microscope, E-G by an electronic microscope. (OPV) previtelogenic oocyte, A and B. layers that surround the oocytes, C. (CL) lampbrush chromosomes, D. oocyte, E. (GP) pigment granule, (Mt) mitochondria, F. (CU) union complexes, G. (CF) follicular cells layer, (CG) Golgi complex, (CO) ovarian cavity, (LG) germinal bed, (MV) vitelline membrane, (N) nucleus, (n) nucleolus, (Pa) pigments in the animal pole, (P) pigments, (V) vitellum.

indica que esta especie pertenece al tipo II según la clasificación de Piprek *et al.* (2014).

El hecho de que el testículo sea alargado lo hace similar a *P. gundlachii* (Sanz *et al.*, 2015), la presencia de lóbulos lo asemeja a *P. peltocephala* (Sanz *et al.*, 2015) aunque el encontrarse completamente separado del testículo es único en esta especie, puesto que los lóbulos de *P. peltocephala* están unidos a los testículos mediante tejido conectivo. El haberse encontrado tejido adiposo en el órgano de Bidder sólo ha sido encontrado en *P. taladai* (Sanz-Ochotorena *et al.*, 2019). En cuanto a los cortes histológicos, la organización de los tejidos es similar a la hallada en otras especies de anuros cubanos tanto de las ranitas (*Eleutherodactylus atkinsi*, *E. goini*, *E. planirostris*, *E. riparius*, *E. varleyi* y *E. zugi*) (Rodríguez *et al.*, 2015) como de los sapos *P. fustiger* (Sanz *et al.*, 2008).

Se observaron tres características que pueden indicar una posición intermedia de esta especie entre los grupos de bufónidos cubanos: pequeños y grandes. Aunque tal parece que esté más emparentado, por una mayor cantidad de similitudes, con los sapos grandes como menciona Alonso *et al.*, (2012). Esas tres características son: 1- Testículos no pigmentados, como en *P. fustiger* (Sanz *et al.*, 2008), el cual es un sapo del grupo de los grandes; 2- Presencia de membrana ondulante en las colas de los espermatozoides (como en los sapos pequeños); 3- Existencia de espermatozoides con dos colas, como en *P. fustiger* (Sanz *et al.*, 2008).

La presencia de núcleos con nucléolos y cuerpos atrésicos en el órgano de Bidder se corresponde a lo encontrado en otras especies de bufónidos cubanos (Sanz *et al.*, 2015) y foráneos (Farias *et al.*, 2002). El hecho de que se encontraran nucléolos indica que el órgano de Bidder no es sólo una estructura anatómica, ya que estos se asocian principalmente con la biogénesis de los ribosomas (Boisvert *et al.*, 2007). Estos ribosomas son necesarios para la síntesis de la maquinaria requerida por el ovocito en la síntesis de proteínas (Gilbert, 2013). Los nucléolos pudieran también ayudar en la síntesis de ribosomas que permitan la síntesis de diversas enzimas necesarias para la producción de andrógenos y estrógenos (Scaia *et al.*, 2011), o la conversión de pregnenolona o progesterona en 17-hidroxi-progesterona, testosterona, androstendiona, 17 β -estradiol y estrona (Coolombo y Belvedere, 1980).

En cuanto a lo encontrado en las hembras, la ausencia de órgano de Bidder pudo haberse debido a la gran cantidad de ovocitos que estas presentaron, lo cual hizo difícil la búsqueda de esta estructura. La diferenciación entre el polo animal y vegetativo en cuanto al grado de pigmentación también se ha encontrado en otras especies de sapos cubanos como *Peltophryne taladai* (Sanz *et al.*, 2010) y foráneos

como *Rhinella scheideri* (Montezol *et al.*, 2017), así como otros anuros como *Rana tigerina* (Sretarugsa *et al.*, 2001). Esta característica puede relacionarse con que dicha pigmentación protege el núcleo (que se encuentra en el polo animal) de la radiación ultravioleta.

Las características observadas en los ovocitos como los nucléolos, los cromosomas *lampbrush*, la capa de células foliculares, la membrana vitelina y la presencia de mitocondrias y complejo del Golgi en el citoplasma celular también han sido observadas en otros anfibios cubanos como *P. fustiger*, *P. longinasa*, *P. peltocephala*, *Eleutherodactylus goini*, *E. riparius*, *E. cuneatus*, *E. zugi* y *E. caspari* (Sanz *et al.*, 2007). La presencia de numerosos nucléolos y cromosomas *lampbrush* en el núcleo, junto con la presencia de una gran cantidad de mitocondrias, podría deberse a la actividad sintética de los ovocitos. Estos se encuentran en el proceso de desarrollo para así prepararse para el posterior desarrollo del embrión una vez esté fecundado.

Es posible que la razón por la cual se encontró una gran cantidad de ovocitos a inicios de la temporada seca sea debido a las abundantes lluvias durante ese mes. Esto puede deberse a que *P. empusa*, sea una especie de sapo cuyo ciclo reproductivo sea discontinuo, típico de especies que habiten en regiones con estacionalidad (Montezol *et al.*, 2027), como en es el caso de Cuba, con temporada seca y lluviosa. Las especies de anfibios tropicales que viven en regiones con variaciones estacionales, normalmente poseen un ciclo reproductivo influenciado por las lluvias (Huang *et al.*, 1996; Pough *et al.*, 2001; Ferreira y Mehanna, 2012).

AGRADECIMIENTOS. Se agradece a Yoanka Perugorría y al Instituto de Medicina Legal por ayudar en el montaje de las muestras para ser analizadas por microscopía óptica. También a Alicia Garrido Cabrera, Yaquelin Hernández Betancourt, Luis Romero Garrido, Eduardo Romero Alarcón, Ernesto Romero Alarcón y Amanda Borrego Díaz, la familia de San Paúl que permitió el uso de su patio trasero para la recolecta de los ejemplares.

REFERENCIAS

- Abramyan, J., D. Wilhelm y P. Koopman. 2010. Molecular characterization of the Bidder's organ in the cane toad (*Bufo marinus*). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 314(6): 503-513.
- Alonso-Bosch, R. y L.Y. García-Padrón. 2017. Anfibios. Pp. 348-375. En: *Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas* (C.A. Mancina y D.D. Cruz, Eds.). Editorial AMA, La Haban, 502 pp.

- Alonso, R., A.J. Crawford y E. Bermingham. 2012. Molecular phylogeny of an endemic radiation of Cuban toads (Bufonidae: *Peltophryne*) based on mitochondrial and nuclear genes. *Journal of Biogeography* 39(3): 434-451.
- Bishop, P.J., A. Angulo, J.P. Lewis, R.D. Moore, G.B. Rabb, y J.G. Moreno. 2012. The Amphibian Extinction Crisis-what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan?. *S.A.P.I.E.N.S. Surveys and Perspectives Integrating Environment and Society*. 5(2): 97-111
- Boisvert, F.M., S. van Koningsbruggen, J. Navascués y A.I. Lamond. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nature reviews Molecular cell biology* 8 (7): 574.
- Brown, F.D., E.M. Del Pino y 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* 44(6): 527-535.
- Colombo, L., y P.C. Belvedere. 1980. Steroid-hormone biosynthesis by male bidders organs of the toad *Bufo Bufo* (L). *General and comparative endocrinology* 40(3): 320-321.
- Farias, C.F., S.P. Carvalho-e-Silva y L. de Brito-Gitirana. 2002. Bidder's organ of *Bufo ictericus*: a light and electron microscopy analysis. *Micron* 33(7-8): 673-679.
- Ferreira A., y M. Mehanna. 2012. Seasonal testicular changes in *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura, Hylidae). *Biocell* 36(2):57-62.
- Gilbert, S.F. 2013. *Developmental Biology*. Tenth Edition. Sinauer Associated Inc. 719 pp.
- Harms, J.W. 1921. Verwandlung des Bidderschen Organs in ein Ovarium beim Männchen von *Bufo vulgaris* Laur. *Zoologischer Anzeiger* 53: 253-265.
- Huang, W.S., J.Y. Lin, y J.Y.L. Yu. 1996. The male reproductive cycle of the toad, *Bufo bankorensis*, in Taiwan. *Zoological Studies*. 35: 128-137.
- Kidov A.A., K.A. Matushkina, S.A. Blinova y K.A. Afrin. 2017. Laboratory Reproduction of the Cuban Toad, *Peltophryne empusa* (Cope, 1862). *Current Studies in Herpetology* 17: 36-43
- King, H.D. 1908. The structure and development of Bidder's organ in *Bufo lentiginosus*. *Journal of Morphology* 19(2): 439-468.
- Montezol, M., M. Cassel, D. Silva, A. Ferreira y M. Mehanna. 2018. Gametogenesis and reproductive dynamics of *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae): Influence of environmental and anthropogenic factors. *Acta Zoologica* 99(1): 93-104.
- Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A. Da Fonseca, y J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772): 853.
- Pereda, J.A. 2017. La crisis biológica de los anfibios: los vertebrados más amenazados. *El Ecologista* 81: 21-23
- Piprek, R. P., M. Klo y J.Z. Kubiak. 2015. Bidder's organ-structure, development and function. *International Journal of Developmental Biology* 58(10-11-12): 819-827.
- Pough F.H., R.M. Andrews, J.E. Cadle, M.L. Crump, A.H. Savitzky, K.D. Wells. 2001. *Reproduction and Life History*. Pp 228-259 En: *Herpetology*. Prentice Hall New York. 726 pp.
- Pounds, J.A., M.R. Bustamante, L.A. Coloma, J.A. Consuegra, M.P. Fogden, P.N. Foster y S.R. Ron. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439(7073): 161.
- Pregill, G. 1981. Cranial morphology and the evolution of West Indian toads (Salientia: Bufonidae): resurrection of the genus *Peltophryne* Fitzinger. *Copeia* 1981: 273-285.
- Rivalta, V., L. Rodríguez-Schettino, C.A. Mancina y M. Iturriaga. 2014. Amphibians of Cuba: checklist and geographic distributions. *Smithsonian Herpetological Information Service* 145: 1-48.
- Rodríguez, Y., A.S. Ochotorena, M.D.L.S. Valdés y R. Lara. 2015. Gametogenesis Stages of Cuban *Eleutherodactylus* Frogs Revealed by TEM Studies. [Inédito]. 2 pp.
- Sanz A., Y. Rodríguez, M. de L. Segura, R. Lara, y L.F. Jimenez. 2015. El órgano de Bidder en sapos (*Peltophryne* spp.) endémicos de Cuba. Aspectos morfológicos y de ultraestructura. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 4(1): 78-88.
- Sanz Ochotorena, A. C., Y. Rodríguez Gómez, M. de L. Segura-Valdez, R. Lara Martínez y L. F. Jiménez García. 2019. Atlas de la morfología microscópica de las gónadas de anfibios y reptiles de Cuba. La Habana, Editorial UH. 176 pp.
- Sanz, A., Y. Rodríguez, M. de L. Segura-Valdez y L.F. Jimenez. 2007. Ultrastructure of spermiogenesis in *Bufo fustiger* (Anura: Bufonidae). *Acta Microscópica* 16 (1-2) suplemento 2: 1-2.
- Sanz, A., Y. Rodríguez, M. de L. Segura-Valdez, L.F. Jimenez y M. Iturriaga. 2007. Gametogenesis in cuban amphibians. *Acta Microscópica* 16 (1-2) suplemento 2: 1-2.
- Sanz, A., Y. Rodríguez, M. de L. Segura-Valdez, R. Lara, y L.F. Jimenez. 2008. Estructura y ultraestructura de la gónada de los machos de *Bufo fustiger* (Anura: Bufonidae). *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* 11(2): 81-86.
- Scaia, M.F., E. Regueira, A.G. Sassone, M.C. Volonteri y N.R. Ceballos. 2011. The Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Presence of steroidogenic enzymes. *Journal of*

- Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 315(8): 439-446.
- Sretarugsa, P., W. Weerachatanukul, J. Chavadej, M. Kruatrachue y P. Sobhon. 2001. Classification of developing oocytes, ovarian development and seasonal variation in *Rana tigerina*. *Science Asia* 27: 1-14.
- UICN. 2011. IUCN Red list of threatened species. Versión 2011. 2. Disponible en <http://www.iucnredlist.org/>. Último acceso: 28 de noviembre de 2011
- Wake, D.B. y T.V. Vance. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS*. 105 (1): 11466-11473