

ALGUNOS ASPECTOS ACERCA DEL METABOLISMO DE MADURACION DE OVOCITOS DE ANFIBIOS EN *BUFO MARINUS*

Carlos Ramiro Sánchez R. (1)

RESUMEN

Especímenes de *Bufo marinus* de zonas tropicales, colectados entre marzo de 1981 y septiembre de 1982, no presentan una época de reproducción definida, sino períodos de mayor reproducción entre los meses de junio y septiembre, observándose un alto número de especies con ovocitos maduros durante diferentes épocas del año. Ovarios en diferentes estados de maduración exhiben correlación con ciertos parámetros allí comparados como: el peso del animal y del ovario que define el grado de madurez; el consumo del oxígeno en diferentes estados de maduración; la actividad de algunas enzimas del metabolismo de carbohidratos y la síntesis de proteínas. El consumo de oxígeno y la actividad enzimática, muestran correlación inversa con la madurez ovárica. La síntesis de proteínas aumenta durante el proceso de maduración ovocítica.

Estos resultados y su relación con las vías metabólicas, así como el posible efecto de la actividad pituitaria sobre la maduración, son aquí discutidos.

INTRODUCCION

La reproducción es una de las estrategias que los seres vivos utilizan para enfrentar su extinción.

Los estudios acerca de la reproducción han sido realizados, en su mayor parte, en países de zonas templadas debido a que presentan épocas del año muy bien definidas como son primavera, verano, otoño e invierno.

Periódicamente con el cambio de las estaciones, se alteran factores ambientales como el fotoperíodo y la temperatura, las cuales influyen en la concentración hormonal gonadotrópica. Estos cambios traen como consecuencia, variaciones en el comportamiento y en el metabolismo corporal.

Esto se presenta, principalmente, a nivel de organismos heterotermos, quienes reaccionan ante estímulos ambientales. Entre estos se encuentran los anfibios que han sido estudiados en Estados Unidos y Europa (Gregg, 1960; Stephen y otros, 1968), y en los países de zona templada de Suramérica como: Argentina, Chile y Uruguay (Salomón de Legname y otros, 1976; Legname y otros, 1972). Estos tres últimos han realizado estudios acerca del metabolismo de ovocitos, durante diferentes épocas del año, en *Bufo arenarum*, una especie de zona templada, encontrando una correlación entre variaciones en la actividad metabólica y regulación de la maduración de ovocitos en diferentes épocas del año, debido a la actividad hipofisaria. Estos resultados fueron confirmados por Gurdon (1974); Legname y otros (1976) y Schwetz (1977).

(1) Biólogo, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Trabajo de Grado.

La actividad de la hipófisis, por su parte, está determinada por el fotoperíodo, por lo que se producen dos tipos de metabolismo de ovocitos: a) El de otoño e invierno o metabolismo inmaduro, semejante al que presentan tejidos diferenciados del adulto, conocido como "metabolismo adulto" y b) El de primavera y verano o metabolismo maduro, que es semejante al que exhiben tejidos en formación embrionaria y huevos en segmentación, conocido como "metabolismo embrionario" (Legname y otros, 1972). Bigger (1972) confirmó las investigaciones de Legname en 1972. Además complementa esos trabajos con datos de las vías metabólicas. El metabolismo, durante otoño e invierno, prefiere la glucólisis seguida por el ciclo de Krebs. En primavera y verano, utiliza más que todo la vía de la pentosa fosfato y un ciclo especial denominado ciclo glutámico-aspartico. De esta manera, los ovocitos producen cantidades importantes de precursores para la síntesis de nucleótidos.

Los trópicos no poseen épocas estacionales definidas como las zonas templadas. El fotoperíodo y la temperatura son relativamente constantes durante el transcurso del año. Sin embargo, existen períodos de lluvia y sequía, los cuales no se presentan en zonas templadas. Por lo tanto, se presentan dos formas posibles de reproducción para la especie *Bufo marinus* de zona tropical. La primera sería una reproducción continua durante todo el año debido a la ausencia de fluctuaciones del fotoperíodo. La segunda sería dependiente del régimen de lluvias debido a que la primera parte de la ontogénesis se realiza en el agua.

También se cree que la hipófisis, tanto en *Bufo arenarum* como en *Bufo marinus*, desencadena factores fisiológicos que conllevan a la maduración de ovocitos.

Finalmente cabe destacar que hasta ahora no se conoce ningún trabajo realizado al respecto con anfibios del trópico como *Bufo marinus*. El presente trabajo podría considerarse, por lo tanto, como investigación piloto para anfibios de zona tropical.

PROCEDIMIENTO Y METODO

Especímenes de *Bufo marinus* fueron colectados en diferentes épocas del año en la localidad de Porce (situado al noreste del Departamento de Antioquia, clima cálido, temperatura promedio de 24°C). Seis muestreos fueron realizados en los municipios de San Carlos y Sopetrán (situados al oriente y al noroeste del Departamento de Antioquia respectivamente, con temperaturas medias y pisos térmicos similares a los presentados en la localidad de Porce).

Los animales eran mantenidos a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización (Legname y otros, 1972; Legname y Buhler, 1977). Para los experimentos eran

seleccionadas las hembras, con el fin de llevar a cabo el siguiente procedimiento:

- A. Determinación del Cociente Respiratorio.
- B. Disección del animal.
- C. Determinación del Estado de madurez del ovario.
- D. Determinación del consumo de oxígeno de ovocitos.
- E. Determinación de las actividades de algunas enzimas.

A. *Determinación del Cociente Respiratorio.*

Para este fin fue medido, en presencia de 5 ml de NaOH al 20o/o, el oxígeno consumido. La diferencia de oxígeno consumido y dióxido de carbono producido fue medida en ausencia de NaOH. Según la fórmula $O_2 \text{ (cons.)} - (O_2 \text{ cons.} - CO_2 \text{ prod.}) = CO_2 \text{ (prod.)}$ se calculó la cantidad de dióxido de carbono producido.

En ambos casos, las mediciones eran hechas por espacio de una hora cada diez minutos a 25°C con tiempo previo de estabilización del sistema y recuperación del animal.

B. *Disección del animal.*

Una vez pesado el espécimen, era inmovilizado sin producir muerte inmediata. Luego eran removidos ambos ovarios de la cavidad pleuropéritoneal, pesados y colocados en solución de Ringer (Salomón de Legname, 1969).

En algunos experimentos eran removidas porciones ováricas, pesadas y colocadas directamente en solución de Buffer fosfato pH 7.4 para los ensayos enzimáticos.

C. *Determinación de la madurez del ovario.*

La madurez de los ovarios era tipificada con base en características morfoestructurales como el aspecto general del ovario, el tamaño relativo de los ovocitos y la pigmentación.

D. *Determinación del consumo de oxígeno de ovocitos.*

El consumo de oxígeno de ovocitos era estimado a 25°C, siguiendo el método directo de Warburg. En frascos de reacción de 17 ml eran colocadas porciones de ovario en 3.2 ml. de solución de Ringer en la cámara principal. El CO₂ era absorbido por una solución de KOH al 20o/o colocada en la cámara central. El sistema era agitado a 18 ciclos por minuto con una amplitud de aproximadamente 5 cms.

E. Determinación de las actividades de algunas enzimas.

1. Homogenización

Las células eran rotas con homogenizador eléctrico (Ultra Turrax Janke y Kunkel K. G.) en presencia de Buffer fosfato pH 7.4 con EDTA 0.026 M. Algunos homogenizados contenían 0.25 M de sacarosa (Legname y otros, 1972). El homogenizado era centrifugado, primero, a 5000g durante 10 minutos y el sobrenadante nuevamente centrifugado entre 30000g y 40000g durante 15 minutos a una temperatura de 3°C en una centrífuga marca Beckman.

2. Ensayos enzimáticos.

Las actividades de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), la hexoquinasa (EC 2.7.1.1.), la fructosa-6-fosfato quinasa (EC 2.7.1.11), la piruvato quinasa (EC 2.7.1.40), la deshidrogenasa láctica (EC 1.1.1.27) y la deshidrogenasa málica (EC 1.1.1.37) fueron evaluadas de acuerdo a Bücher, Luh y Pette (1964), en un espectrofotómetro con registrador marca Beckman. Los registros fueron hechos a 340 nm en cubetas de vidrio de 1 ml.

3. Valoración de proteínas.

Las proteínas fueron determinadas de acuerdo a Lowry y otros (1951), usando albúmina de suero como estándar.

RESULTADOS

De los muestreos de especímenes de *Bufo marinus*, colectados entre marzo de 1981 y septiembre de 1982, resultaron 12 tipos de madurez ovárica basados en características morfoestructurales como la pigmentación, aspecto general del ovario, número y tamaño relativo de los ovocitos, siendo esta una "clasificación arbitraria" (figs. 1, 2, 3 y 4). Además, se aprecia ausencia de reproducción definida para la especie en mención de zona tropical. Posiblemente haya períodos de mayor reproducción entre los meses de junio y septiembre debido a la gran frecuencia con que se presentan ovarios en alto grado de maduración (fig. 5).

Para conseguir mayor información fisiológica accesoria fueron establecidos otros parámetros (tabla 1). Los únicos parámetros de correlaciones más precisas y definidas fueron el peso del animal y del ovario. Por lo que fue posible obtener cuatro grupos de madurez por el cociente entre estos dos parámetros (tabla 2).

En vista de esto se pensó en un parámetro de carácter más fisiológico que sirviera de conexión con aspectos objetivamente fisiológicos y bioquímicos. Por esta razón se

midió el consumo de oxígeno a través de diferentes estados de maduración. Se encontró una relación inversa entre madurez ovocítica y tasa de consumo de oxígeno (tabla 3).

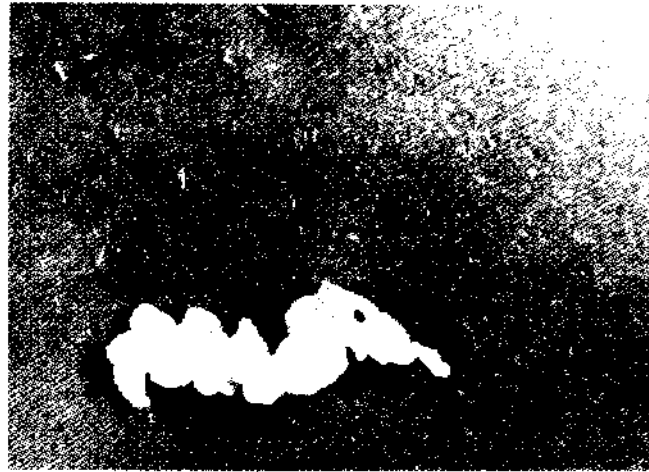


Fig. 1
Representa los tipos de "madurez arbitraria" tipificados como 1,2,3; en los cuales ningún ovocito presenta pigmentación.

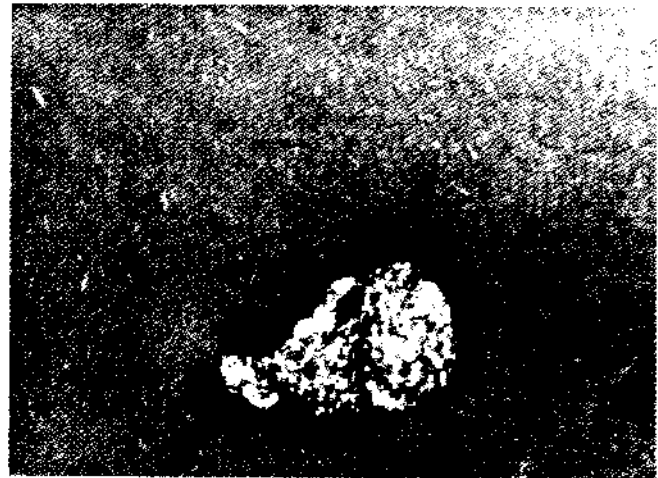
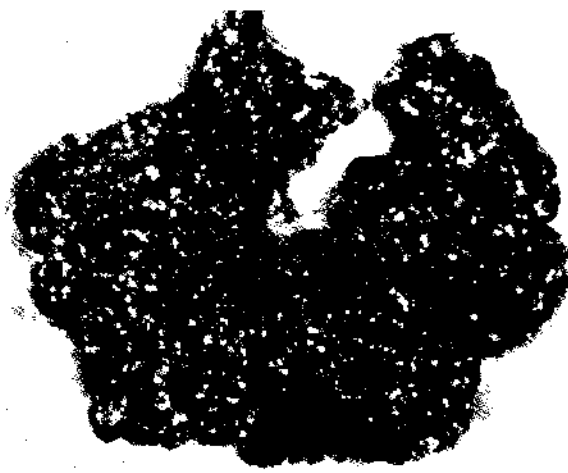


Fig. 2
Representa los tipos de "madurez arbitraria" tipificados como 4,5,6; en los cuales escaso número de ovocitos ha alcanzado pigmentación.



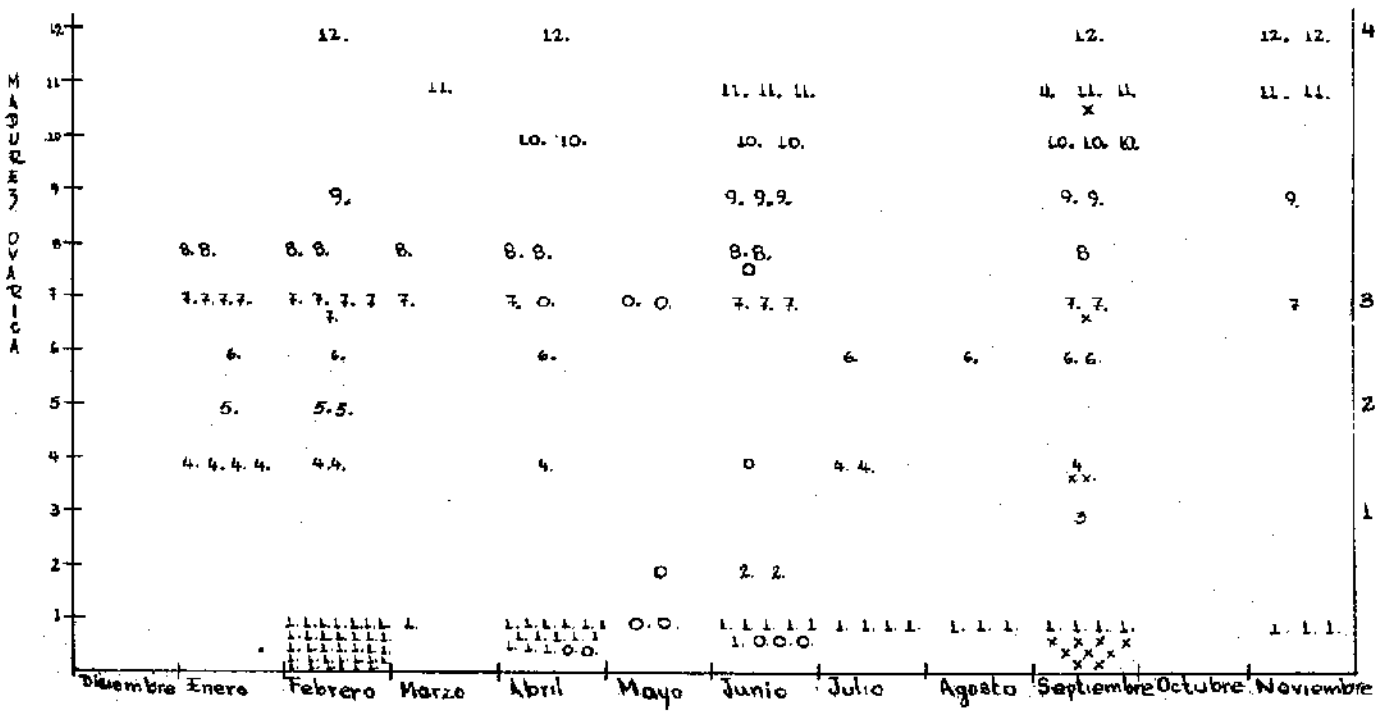
cm.



cm.

Fig. 3
Representa los tipos de "madurez arbitraria" considerados como 7,8,9; en los que se observan, muy poco número de ovocitos sin pigmentación.

Fig. 4
Representa los tipos de "madurez arbitraria" designados como 10, 11,12; en los que la casi totalidad de los ovocitos están maduros.



Meses del año [O] individuos colectados en San Carlos [X] individuos colectados en Sopenran

Fig. 5
Distribución de ovarios de individuos colectados entre marzo 1981 - septiembre 1982 en Porce.

TABLA No. 4

Peso Animal en gramos	Peso Ovario en gramos	Peso Grasa en gramos	Cociente P.A./P.O.	Cociente P.A./P.G.	Cociente P.O./P.G.	Tipos de Madurez arbitraria	Fecha Mes/año
326,4	14	5,8	23,31	56,28	2,41	7	27-1-82
364,5	8,6	4,2	42,38	86,79	2,05	7	27-1-82
423,6	6	0,15	70,6	28,24	40	4	27-1-82
450,3	22,7	7,6	19,84	59,25	2,99	8	27-1-82
310,2	3,5	0,25	88,63	1240,8	14	5	27-1-82
300,5	44	5,1	6,83	58,92	8,69	6	27-1-82
314,2	4,6	6,3	68,3	49,87	0,73	4	27-1-82
367,2	15,6	4,1	28,54	89,56	3,8	7	27-1-82
326,9	5,2	1	62,87	326,9	5,2	7	25-2-82
322,8	4,8	4,9	67,25	65,88	0,98	7	25-2-82
478,3	34,1	8,8	14,09	54,35	3,88	8	25-2-82
603,5	27,4	71,6	22,09	8,43	0,38	9	15-2-82
331,5	27,7	10	12,69	35,15	2,77	10	21-4-82
382,9	42,05	0,5	9,11	765,8	84,1	12	21-4-82
315,8	28,8	6,4	10,97	49,74	4,5	11	7-6-82
290,4	40,6	3,5	7,15	82,97	11,58	11	3-6-82
262,1	15,6	0,1	16,8	26,21	156	10	4-9-82
211,7	3,15	6	67,21	38,28	0,53	7	3-6-82

TABLA No. 2

VALORES PROMEDIOS DE COCIENTES P.a./P.o.
PERTENECIENTES A CADA GRUPO DE MADUREZ.

Tipos de Madurez	Madurez Grupos	P.a./P.o. Promedio	n
1-2-3	1	154,1	84
4-5	2	69,6	12
6-7	3	36,3	22
8-9-10-11-12	4	11,6	49

TABLA No. 3

TASAS PROMEDIAS DE CONSUMO DE OXIGENO A
NIVEL DE GRUPO DE MADURACION

Madurez Grupos	Consumo de oxígeno Promedio l./g.h.	Número de mediciones
1	50,79	3
2	51,65	2
3	39,02	9
4	33,57	11

Los eventos fisiológicos y bioquímicos aquí tenidos en cuenta, como las actividades enzimáticas y la síntesis de proteínas, así lo confirman. Las enzimas tienen la tendencia a disminuir sus actividades durante el desarrollo del proceso de maduración en los ovocitos. (tabla 4). La cantidad de proteínas aumenta con el avance de la madurez ovárica. (tabla 5).

Promedio de actividad enzimática por grupos de madurez ovárica.

Madurez Grupos	G-6-P-DH		No. exp.	M.L.C.		No. exp.	P.F.K.		No. exp.
	Ab.	Esp.		Ab.	Esp.		Ab.	Esp.	
1	1295,7	723,1	10	77,91	36,3	10	105,79	82,2	6
4	336,51	166,31	8	2,747	2,75	4	46,73	46,73	4

Madurez Grupos	P. K.		No. exp.	L. D. H.		No. exp.	M. D. H.		No. exp.
	Ab.	Esp.		Ab.	Esp.		Ab.	Esp.	
1	1676	995,27	10	1431,4	747,7	10	2524,7	1656,9	10
4	46,73	517,82	4	517,82	524,4	7	2416,04	999,8	8

Ab.: Promedio de actividad absoluta de cada enzima.
Esp.: Promedio de actividad específica de cada enzima en μ moles/mg prot. hora.

TABLA No. 5

VALORES PROMEDIOS DE LAS PROTEINAS PRESENTES
EN EXTRACTOS PROVENIENTES DE CADA GRUPO DE
MADUREZ

Madurez Grupos	μ g. Prot./ml. promedio	Número de pruebas
1	1932,5	10
2	2051,63	2
3	2336,6	6
4	2797,9	10

TABLA No. 6

PROMEDIOS DE PRECIPITACION PLUVIAL ANUAL
DURANTE LOS MESES DEL AÑO

Mes	Precipitación en mm (Promedio)	Años de Registro
Enero	97,8	18
Febrero	65,61	18
Marzo	199,28	18
Abril	272,8	18
Mayo	399,39	18
Junio	334,62	18
Julio	334,16	18
Agosto	378,45	18
Septiembre	378,38	18
Octubre	358,63	18
Noviembre	245,13	18
Diciembre	104,37	18

DISCUSION

Los resultados permiten confirmar la ausencia de una época de reproducción definida para anfibios del trópico, tal como se presenta en especies de zona templada durante las estaciones de primavera y verano (Legname y Buhler, 1977). Sin embargo, es probable que haya una época en la que el fenómeno de oviposición se presente en forma más acentuada (figura 5), que coincide con meses de alta precipitación pluvial (tabla 6). Posiblemente la presencia de abundantes lluvias en el ambiente desencadenen, a nivel hipofisario, producción de hormonas gonadotrópicas, lo que permite caracterizar como pituitario dependiente (Legname y otros, 1976; Stephen y otros, 1968; Gurdon, 1974) el fenómeno de maduración.

Igualmente los resultados respecto del peso corporal y del ovario, permiten concluir que existe una correlación entre los parámetros mencionados que lleva a definir en términos más precisos y menos arbitrarios, el estado de madurez, que presentan los ovarios. Por lo tanto ha sido posible ubicar doce tipos de "madurez arbitraria" en cuatro grupos así: en el primer grupo los tipos de madurez 1, 2 y 3; en el segundo grupo los tipos 4 y 5; en el tercer grupo los tipos 6 y 7; en el cuarto grupo, los restantes tipos 8, 9, 10, 11 y 12.

Además, la reducción en la tasa de consumo de oxígeno parece presentarse como una consecuencia de la madurez, y en efecto, ha sido concebida como índice de maduración en ovocitos de *Bufo marinus*, encontrándose en armonía con los resultados de Legname y Buhler (1977). Ellos consideraron el consumo de oxígeno de mitocondrias provenientes de ovocitos en diferente estado de maduración. Observaron que el consumo de oxígeno, medido en presencia de ácido cítrico y ácido fumárico, decrece con la madurez (Legname y Buhler, 1978). Del consumo de oxí-

geno medido en ovocitos intactos de *Bufo marinus*, ha resultado una correlación inversa con la madurez. La interpretación da cuenta de que, al comienzo del proceso de maduración, los ovocitos necesitan mucha energía para la síntesis de sus compuestos químicos complejos. Pero, a medida que los ovocitos maduran, decrece la demanda de energía. El ATP se acumula e inhibe por proceso de "feed back" la enzima reguladora de la glucólisis, es decir, la fructosa-6-fosfato quinasa (PFK), y el ciclo de Krebs en el sitio de la deshidrogenasa isocítrica. Esto explicaría, a primera vista, no sólo la disminución en el consumo de oxígeno de los ovocitos sino también la inhibición total de la PFK en algunos extractos preparados de ovocitos maduros. Sin embargo, durante la preparación del extracto, se diluye la concentración de metabolitos y coenzimas, trayendo como consecuencia una franca disminución en el efecto "feed back". Por esto parece igualmente probable que los ovocitos produzcan, al final del proceso de maduración, un inhibidor especial que posee una alta afinidad por la PFK. De donde, al ser alcanzada la madurez completa por el ovocito, empezaría entonces un metabolismo de reposo. Este tipo de metabolismo mantiene las funciones celulares esenciales debido a que todos los compuestos ya han sido fabricados.

Sin embargo, la situación con respecto al metabolismo de maduración de ovocitos en *Bufo marinus*, apenas comienza. Muchos interrogantes se encuentran aún por resolver. Todavía no se conoce mucho acerca de la cinética que regula la actividad enzimática en ovocitos de *Bufo marinus*. Tampoco se tienen establecidas claramente las variaciones en el metabolismo del ovocito en su tránsito de inmaduro a maduro. Aún falta por indagar la actividad de otras enzimas reguladoras de otras vías metabólicas y su relación con los cambios que se producen en el ovocito al entrar en proceso de maduración.

BIBLIOGRAFIA

- BIGGER, J. D. (1972). Metabolism of the oocyte. Oogenesis. University Press. Baltimore. pp. 241-251.
- BÜCHER, T. LUH, W. y PETTE D. (1964). Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden. Aus Hoppe-Seyler/Thierfelder "Handbuch der Physiologisch und Pathologisch Chemischen Analyse" 10. Aufl. Bd. VI/A, 1964 Springer-Verlag, Berlin.
- GREGG, J. R. (1960). Respiratory regulation in Amphibian development. Biol. Bull. 119: 428-439.
- GURDON, J. B. (1974). The control of gene expression in animal development. Harvar University Press. Cambridge. Massachusetts.
- HILL, W. R. (1980). Métodos indirectos de la medición de la tasa metabólica. Reverté S. A. Ed. Barcelona.
- LEGNAME, A. H. SALOMON DE LEGNAME H. MICELLI, D. C. SANCHEZ, S. S. RIERA, A.N.S. y FERNANDEZ (1972). Metabolic changes in *Bufo arenarum* oocytes induced by oviducal secretions develop Biol. 29: 283-292.

- LEGNAMÉ, A. H. SALOMON DE LEGNAME H., MICELLI, D. C. SANCHEZ, S. S. RIERA, A.N.S. (1976). Endocrine control of Amphibian oocyte metabolism. *Acta Embriol. Exp.* 1: 37-49,
- LEGNAMÉ, A. H. y BUHLER; M. I. (1977). Metabolic behavior and cleavage capacity in the Amphibian egg. *J. Embryol. Exp. Morph.*
- LOWRY, O. H. ROSEBRAUGH, N. J. y RANDALL, C. J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- SALOMON DE LEGNAME, H. (1969). Biochemical studies on the energetics of *Bufo arenarum* segmenting eggs. *Arch. Biol.* 80: 471-490.
- SCHWETZ, A. W. (1977). Molecular mechanisms controlling cytoplasmic and nuclear maturation in oocyte. *Research Review.* pp. 3-4.
- STEPHEN, S. SMITH, L. D. y ECKER R. E. (1968). Maturation of ovarian frog eggs without ovulation. *J. Exp. Zool.* 168: 39-48.