

**CONSUMO DE OXIGENO EN LAS PRIMERAS
ETAPAS DEL DESARROLLO DE
*Hyla labialis***

Por: Jaime F. George C. Ph.D.*
Irma Colmenares de Escamilla*
Clara Manrique de Avilan*

RESUMEN

Mediante un respirómetro Warburg se estudió el consumo de oxígeno durante las primeras etapas del desarrollo de *Hyla labialis*. Se observó un aumento después de la fertilización, una nivelación entre el 3er. clivaje y blastula, un aumento en gástrula, luego un ligero descenso hasta embrión de 5 mm para aumentar hasta el de 7 mm. Se discuten las implicaciones de estos cambios.

INTRODUCCION

En la generalidad de los casos, la respiración celular utiliza el oxígeno, libera energía y produce anhídrido carbónico. La cantidad de anhídrido carbónico producida y la cantidad de oxígeno empleada depende de los tipos de alimentos que se oxidan. La relación teórica de este intercambio gaseoso da el cociente respiratorio (C.R.).

Hay una gran variedad de métodos que se pueden utilizar para investigar el consumo de oxígeno. Algunos de ellos pueden aplicarse a una gama completa de sistemas que van desde estructuras subcelulares hasta organismos completos. El consumo de oxígeno se expresa como índice de la actividad respiratorio (QO₂). El QO₂ es el volumen de oxígeno consumido (corregido para condiciones estándar de temperatura y presión) y expresado generalmente en microlitros por unidad de peso y por unidad de tiempo.

Se han realizado gran número de investigaciones en relación con el consumo de oxígeno durante el desarrollo de gran variedad de animales. Hopkins y Handford (1943) por ejemplo, observaron una considerable diferencia en el consumo

de oxígeno entre las especies de *Ambystoma*. Durante la metamorfosis, la larva de *A. punctatum* consume 1.225 μ l/g. de peso seco/hora, en tanto que la larva *A. tigrinum* consume 1.919 μ l/g. Estos autores reportan que la actividad respiratoria de *A. punctatum* aumenta progresivamente en el período embrionario y tiende a decaer en el período larval, en cambio en *A. tigrinum*, el QO₂ sube durante la metamorfosis. Este ascenso está asociado con la liberación de tiroxina en el sistema sanguíneo. De este trabajo en larvas de *Ambystoma* y de los trabajos de Helff (1926) en *R. pipiens*, de Atlas (1931) en *R. pipiens* y *R. selvatica* y de Etkin (1934) en *R. catesbiana* está claro que hay variaciones interespecíficas en el consumo de oxígeno durante las primeras etapas de desarrollo.

Más tarde, Tuft en 1953 y Lovtrup en 1959 observaron una nivelación en el consumo de oxígeno durante la etapa de neurulación de *R. pipiens* y durante un breve período del desarrollo larval. Lovtrup en 1959 atribuye los cambios de la curva respiratoria a la variación de sustratos de metabolitos predominantes en cada fase del desarrollo.

Wallace, en 1942 y Brachet en 1960 relacionaron la actividad enzimática con el aprovechamiento de las fuentes de

* Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

* Este trabajo se llevó a cabo mediante una ayuda de investigación del Fondo Colombiano de Investigaciones y Proyectos Especiales Francisco José de Caldas COLCIENCIAS.

energía en los primeros estados del desarrollo de los anfibios. Boell y Weber (1955) observaron un aumento exponencial de la citocromo oxidasa durante el desarrollo de *Xenopus*, en cambio Long y Grant, en 1961, observaron un descenso de la actividad enzimática en *R. pipiens*.

Posteriormente se han realizado infinidad de trabajos relacionados con el consumo de oxígeno o con enzimas que se relacionan con él, en individuos adultos (Kilpatrick y Zimmerman, 1976; Petero y Nash, 1976; Cepica 1975), o en el proceso de desarrollo (Poznakhirkina y Korochkin, 1975).

MATERIALES Y METODOS

Los anfibios utilizados en este estudio pertenecen a la especie *Hyla labialis*, Peters, W. descrita por E.R. Dunn en 1944. Esta especie semiarborícola es abundante en sitios altos húmedos, (2.000 a 3.000 m.) al oriente de la Cordillera Andina de Colombia desde la parte Sur del Departamento de Cundinamarca hasta la zona alta del Departamento de Norte de Santander (Cochran y Goin, 1970). La reproducción es acíclica y la ovogénesis ocurre a través de todo el año (Hunter y Valdivieso, 1962).

Las ranas adultas fueron colectadas en el sitio denominado San José de Spring, localizado a 6 Km al norte de Bogotá y fueron guardadas en frascos especiales en condiciones óptimas de humedad y alimentación.

Para la obtención de los huevos en el laboratorio se utilizó el método de ovulación inducida (Ryan y Grant, 1940). Este método consiste en sacar la pituitaria de cinco sapos *Bufo marinus* y homogeneizarlas en 1 cm³ de solución salina isotónica para anfibios (0.750/o NaCl). Luego se seleccionan una hembra y un macho y a cada uno se le inyecta 0.5 cm³ de la suspensión de pituitaria por vía intraperitoneal. Se coloca la pareja en un frasco y se aísla en un sitio protegido de la luz directa para facilitar el proceso de ovulación.

El amplexus (abrazo) y la ovulación se observan veinticuatro horas más tarde cuando las hembras empiezan a poner los huevos y el macho a fertilizarlos.

Se tomaron muestras de cincuenta especímenes en cada uno de los estados de desarrollo de acuerdo con la clasificación de Pollister y Moore en 1973 para la *R. selvatia*. Además se tomó una muestra equivalente de huevos sin fertilizar que fueron obtenidos directamente del desove de una hembra sola, mediante estímulo hormonal.

Las muestras se colocaron con agua en el frasco del manómetro de tal manera que el volumen total llegue a 2.5 ml. El frasco posee una cámara central en la cual se colocan 0.2 ml de hidróxido de potasio (10o/o) para absorber el dióxido de carbono producido. De esta forma el volumen total de fluido dentro del frasco es de 2.7 ml.

Se utilizaron frascos de unos 20 ml previamente calibrados. Las lecturas se hicieron cada 10 minutos utilizando un respirómetro Warburg a 26°C. Se calcularon consumos de oxígeno teniendo en cuenta las constantes para los diferentes vasos y las correcciones debidas a variaciones en la presión y temperatura.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 1 representa el consumo de oxígeno en μ l por mg de peso seco por hora en las diferentes etapas estudiadas en el desarrollo. Los resultados se muestran en la Figura 1.

También en la Tabla 1 se presentan los resultados en la forma de μ l de oxígeno por miligramos de peso seco por hora en una forma acumulada los cuales aparecen también en la Figura 2.

Los datos de la Figura No.1 indican que el consumo de oxígeno en las primeras etapas aumenta progresivamente hasta el 3er. clivaje, disminuyen ligeramente en el estado de mórula para alcanzar su nivel más bajo en el estado de blástula. Se observa entonces un aumento en gástrula seguido de un descenso progresivo en las etapas subsiguientes hasta embrión de 3 mm, después de lo cual el consumo de oxígeno aumenta en los embriones hasta los 7 mm.

Prácticamente todos los investigadores que han estudiado los primeros estados de desarrollo reportan un aumento del consumo de oxígeno con la fertilización. Nuestros datos corroboran estas observaciones.

La disminución en el consumo de oxígeno observada en el estado de Blástula de *Hyla labialis* concuerda con los datos presentados por Lovtrup y Iversen (1969) para erizos de mar. Esto ha sido interpretado como una aparente relación entre el consumo de oxígeno y los procesos de división celular en los cuales se observa un aumento durante la interfase y una disminución durante la división de las células (Zeuthen, 1953; Scholander y colaboradores, 1952). Iversen, Sofer y George en 1963 y Deuchar en 1966, reportaron por otra parte una disminución en la síntesis de proteínas en los huevos de erizo de mar, durante la metafase.

Las observaciones anteriores podrían estar en alguna forma relacionadas con la nivelación e inclusive con el ligero descenso en el consumo de oxígeno en el estado de blástula.

El aumento en el consumo de oxígeno en el estado de gástrula es muy explicable por la serie de cambios que en él se registran como son los movimientos celulares, el comienzo de la síntesis de mRNA (Balinsky 1971) y de enzimas dirigidas por el genoma paterno (Moyer y Wright, 1966), además de muchos otros fenómenos ampliamente conocidos como la definición de las capas primarias en el embrión.

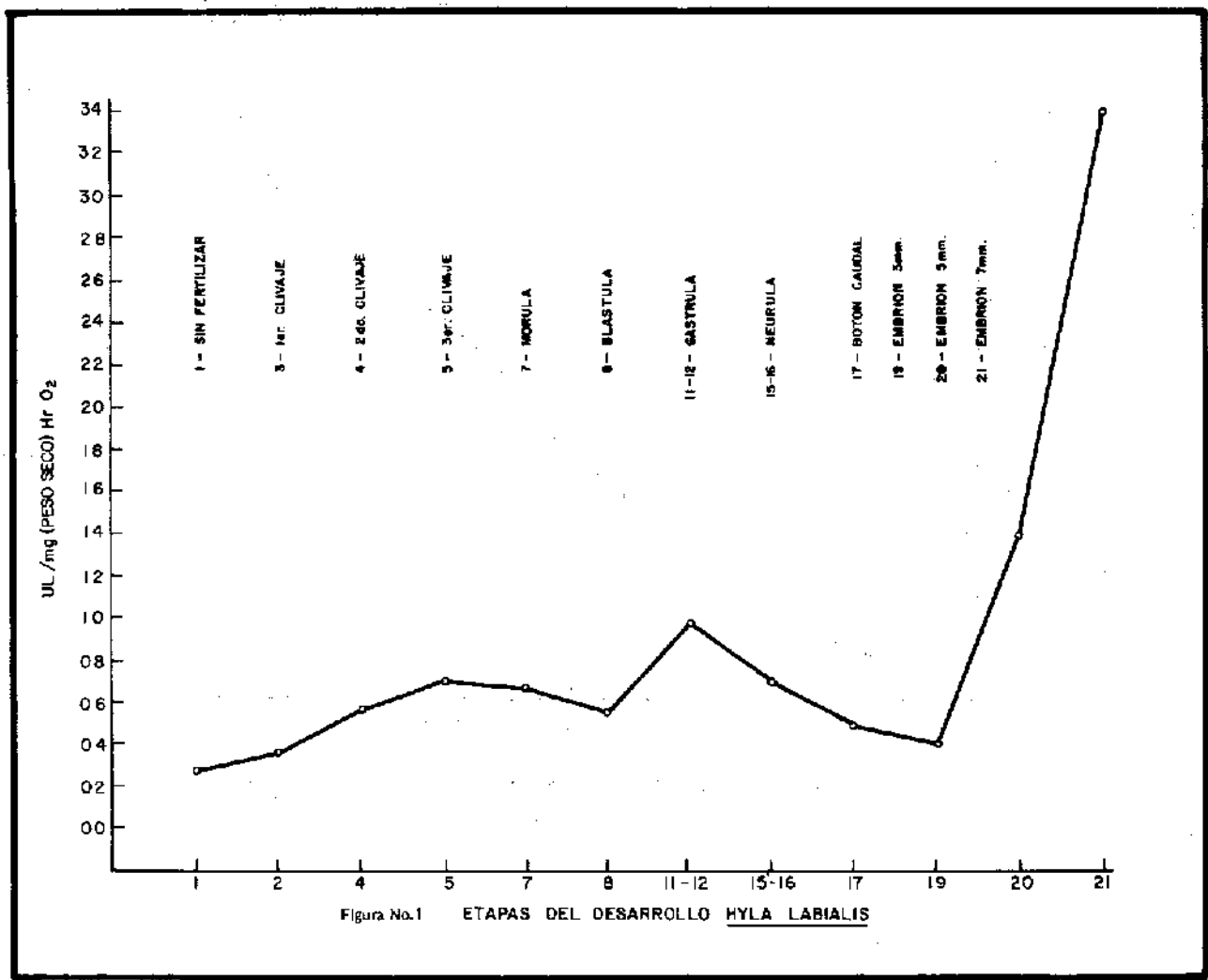
El descenso en el consumo de oxígeno que se observa desde los estados de neurula hasta embrión de 3 mm está de acuerdo con los datos de Deuchar (1966) quien reporta una disminución de citocromo oxidasa durante estas etapas en embriones de *Xenopus laevis*, asumiendo que se pudiese hacer una extrapolación de estos resultados a *Hyla labialis*.

El aumento en el consumo de oxígeno observado en las etapas de 5 y 7 mm concuerdan perfectamente con los que se podría esperar en estas etapas en las cuales el embrión, al iniciar vida libre, aumenta su actividad muscular con el consiguiente consumo de oxígeno para satisfacer una mayor demanda de energía.

La gráfica 2 presenta el consumo acumulado de oxígeno a través de los diferentes estados de desarrollo de *Hyla labialis*.

Es sorprendente la similitud de esta gráfica con la que presenta Boell en 1955 para *R. pipiens*. En ambas se presenta una inflexión en el estado de Neurula indicando una cierta disminución en la rata de aumento de consumo de oxígeno. Estas inflexiones se podrían relacionar con la disminución en la actividad de citocromo oxidasa discutida previamente.

Como complemento de esta investigación y para confirmar las comparaciones hechas con *Rana pipiens* sería interesante realizar experimentos sobre la actividad específica de citocromo oxidasa en los diferentes estados de desarrollo de *Hyla labialis*, los cuales se llevarán a cabo en nuestros laboratorios.



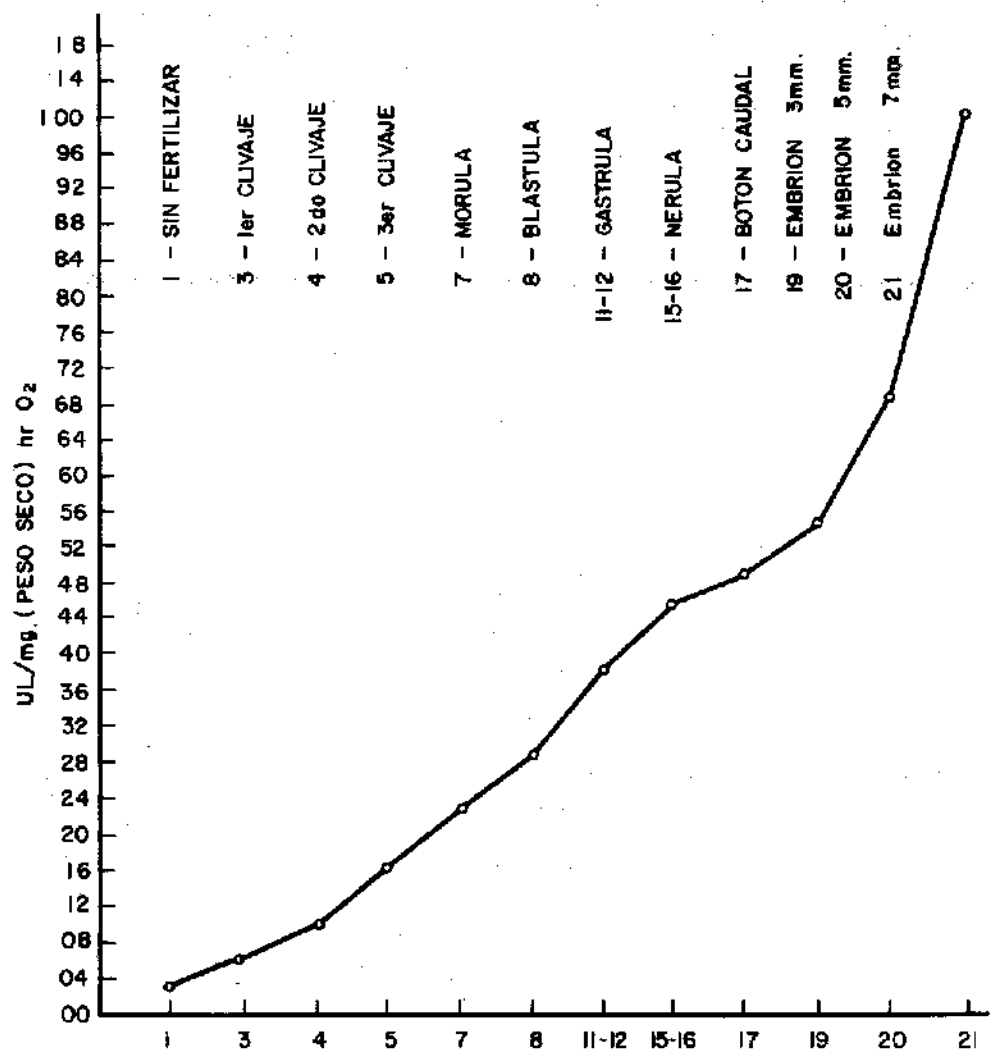


Figura No.2 ETAPAS DEL DESARROLLO HYLA LABIALIS

TABLA I. Promedio de Consumo de Oxígeno durante las Etapas del Desarrollo de *Hyla labialis*

FASE	$\mu\text{l O}_2/\text{mg peso seco/ hr.}$	$\mu\text{l O}_2/\text{mg de peso seco-}/\text{hr.}$ Acumulado
Huevos sin fertilizar. Estado 1	0.0270	0.0270
Primer clivaje. Estado 3	0.0363	0.0633
Segundo clivaje. Estado 4	0.0556	0.0919
Tercer clivaje. Estado 5	0.0690	0.1609
Mórula. Estado 7	0.0682	0.2291
Blástula. Estado 8	0.0558	0.2849
Gástrula. Estado 11-12	0.0977	0.3826
Neurula. Estado 15-16	0.0699	0.4525
Botón de cola. Estado 17	0.0471	0.4996
Embrión 3 mm. Estado 19	0.0467	0.5463
Embrión 5 mm. Estado 20	0.1370	0.6833
Embrión 7 mm. Estado 21	0.3410	1.0243

BIBLIOGRAFIA

- Atlas (1931). Introduction a la Embriología. Ediciones Omega.
- Balinsky (1971). Herpetological Expedition to Colombia. National Geographic Society. Research Repts. Proyect. 113:122.
- Bocel y Weber (1955). Manometric Techniques. 4th. Ed. Burges Minn.
- Brachet, J. (1960). The Biochemistry of Development Pergamon Press.
- Cepica (1975) Trans. Roy. Soc. S. Africa 22:35.
- Cochran y Goin, (1970). The phenomena of anuran metamorphosis II. Physiol. Zool. 7:129-148.
- Deuchar (1966). La reproducción de la Rana *Hyla labialis*. Caidasia 8,(40):573-583.
- Dunn (1944). Herpetology of the Bogota Area. Rev. Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. 6:21-68-81.
- Etkin (1934). Features in the Architecture of physiological Function. Cambridge Univ. Press. London.
- Helff (1926). The rate of oxygen consumption of frogs during embryonic development and growth. Physiol. Zool. 2:278-291.
- Hopkins y Handford (1943). Physiology of the Amphibia. 1964. Academic Press New York and London.
- Hunter y Valdivieso (1962). The respiratory metabolism of frog as related to season J. Cellular Comp. Physiol. 45:343-359.

- Kipatriek y Zimmerman (1976). Frogs of Colombia. Bull. U. S. Natn. Mus. 1:288-655.
- Long y Grant (1961). Biología Celular. Interamericana. 157-192.
- Lovtrup y Iverson (1969). Cell Physiology, 3th ed. W.S. Saunders Co. Philadelphia.
- Moyer y Wright, (1966). Oxygen consumption and heart rate of several species of anuran amphibian during Submergence. Comp. Biochem. Physiol. 20:691-707.
- Petero y Nash (1976). The energetics of development. Columbia University Press, New York.
- Pollister y Moore (1973). Determinación de los patrones isozimicos de la Deshidrogenasa Láctica. Las primeras etapas del desarrollo de *Hyla labialis* M.S. Tesis. Universidad Javeriana.
- Poznakhirina y Korochkin (1975). Biochemical Aspects of Amphibian Development Methuen Monographs on Biological Subjects Methuen Co. Ltd. London. (John Wiley & Sons Inc. New York).
- Ryan y Grant (1940). Notas sobre el desarrollo embriológico de *Hyla labialis*. Boletín del Instituto de la Salta. 211:261-265.
- Scholander y otros (1952). The influence of oxygen tension of the oxygen consumption of *Rana pipiens* larvae. Physiol. Zool. 4:271-286.
- Tuft (1953). Energy Exchange and Enzyme Development (Willer Weiss & Hamburger). Saunders Company. 520s.
- Wallace (1942). Chemical Embriology. Interscience Publisher. New York.
- Zeuthen (1953). Studies on Amphibian Metamorphosis II. The oxygen consumption of tadpoles under going precocius metamorphosis following treatment with thyriod and diiodo tyrosine. J. Exptl. Zool. 45:69-93.