

LABORATORIO: FECUNDACION ARTIFICIAL Y PRIMERAS ETAPAS DEL DESARROLLO EN *BUFO MATINUS*

Por: L.A. Urán(1)
J. Builes(2)

INTRODUCCION

El sapo *Bufo marinus* se utiliza a menudo para realizar prácticas de laboratorio muy sencillas pero de gran interés para profesores y estudiantes, a nivel de enseñanza media y superior, debido a que permite comprender y seguir en forma experimental, su fecundación artificial y las primeras etapas de su desarrollo (Builes, 1972).

Esta no es una práctica nueva, antes por el contrario, se ha realizado con *Rana pipiens* desde 1929 en Brasil y Estados Unidos (Rugh, 1961) y con *Bufo blombergi* (Heredia, 1974). Gracias a ella se puede proveer al estudiante de huevos de anfibio y de embriones vivos en las primeras etapas de desarrollo y seguirlos hasta la aparición de los órganos definitivos en los adultos.

También esta práctica, se puede realizar con otros vertebrados (Builes y Urán, 1974) y observar en ellos los mismos fenómenos.

La realización de este experimento, permitirá a profesores y alumnos, adquirir la práctica suficiente para intentar modificaciones y adaptaciones exigidas por las circunstancias de lugar, equipo, etc.. Se aconseja por lo tanto, sacar provecho de las dificultades que se puedan presentar durante su elaboración.

Si se siguen cuidadosamente las instrucciones, se podrán conservar los embriones vivos hasta la metamorfosis.

MATERIALES Y EQUIPOS (por curso).

Seis sapos adultos, de los cuales dos deben ser machos y al menos una hembra con óvulos maduros.

(1) Profesor, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia S.A.

(2) Idem.

(Los ejemplares machos y hembras se reconocen así: si al tomarlos por el dorso con el pulgar y el índice, haciendo presión sobre el abdomen por detrás de las extremidades anteriores, emiten sonido o canto, se trata de machos; en caso contrario, son hembras. Además los machos presentan callos nupciales en los dedos internos de las extremidades anteriores. Las hembras con óvulos maduros se reconocen porque al mirarlas contra una fuente de luz, se observa en el interior de la cavidad abdominal y a ambos lados, una masa granular oscura).

Dos tijeras (una fuerte para cortar huesos y otra, de disección).

Una aguja de disección.

Una jeringa de 5 cm³ ó más.

Una pinza de disección.

Un Microscopios.

Un Portaobjetos.

Estereomicroscopios o lupas (en el laboratorio de física se pueden conseguir).

Una caja de petri o un plato dulcero.

Solución de formol al 4 o/o en volumen.

Dos recipientes para guardar las hembras y los machos separados (pueden utilizarse las pocetas del laboratorio).

Agua destilada.

Agua de estanque.

PROCEDIMIENTO

A. Inducción a la Ovulación.

Cada hembra puede proporcionar miles de óvulos. Se conseguirá un alto rendimiento en la ovulación y fecundación, siguiendo las técnicas que se detallan a continuación: Tome tres sapos adultos, machos o hembras (no utilice la hembra que tiene los óvulos maduros), desmedúlelas introduciendo un estilete o aguja de disección, por la parte dorsal, en el punto de unión de la cabeza con el tronco, en la médula espinal. Empuje el estilete hacia la parte posterior del ejemplar, siguiendo el conducto de la médula. Cuando el animal pierda el control de las extremidades, ha quedado desmedulado. Corte el maxilar inferior y deje al descubierto los huesos del cráneo en su parte ventral, corte la cruz del esfenotmoides (Fig.1) por cada uno de sus brazos y levante la tapa. Debajo encontrará la hipófisis (glándula pituitaria), sáquela cuidadosamente y colóquela en un recipiente con 5 ml de agua destilada. Repita el procedimiento con los otros dos sapos. Macere las tres hipófisis en los 5 ml de agua destilada. Separe el tejido sobrante, tome con la jeringa el líquido e inyéctelo (2.5 ml a cada lado) en la cavidad abdominal posterolateral de la hembra que contiene óvulos maduros con el fin de que las hormonas gonadotrópicas contenidas en el extracto de hipófisis induzcan la ovulación (Fig.2). Coloque la hembra en un recipiente (o poceta) que contenga agua (dos o tres cm de profundidad).

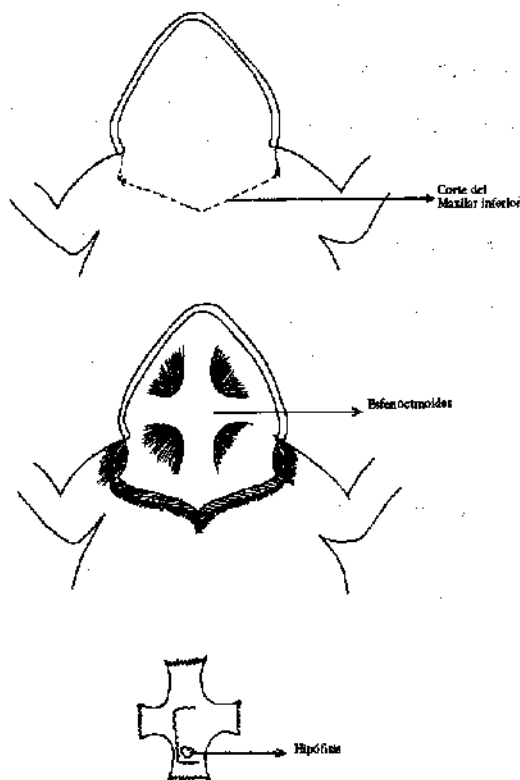


Figura 1. Corte maxilar inferior y extracción de hipófisis.

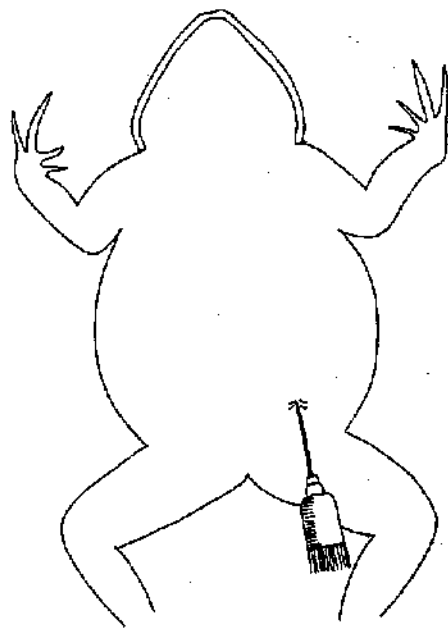


Figura 2. Inyección de macerado de hipófisis.

Tome los dos machos y guárdelos en otro recipiente, de la misma manera que la hembra inyectada.

NOTA: Para el macerado de pituitarias puede utilizar, además del *Bufo marinus*, cualquier otro anfibio.

B. Agua de Huevos.

Cuando hayan pasado entre 15 y 18 horas, si la hembra está desovando, desmedúlela según la técnica vista en la parte A. Haga un corte ventral (Fig.3). Observe los óvulos en los ovisacos. Haga un corte al ovisaco, tome de él varias cadenas de óvulos y colóquelas en un recipiente pequeño con agua de estanque. Déjelas reposar 20 minutos, para obtener una suspensión que se conoce con el nombre de "agua de huevos"

C. Fecundación.

Extraiga nuevas cadenas de óvulos de los ovisacos y colóquelas en una caja de petri seca (o en un platillo dulcero). Obsérvelas al estereeo o con la lupa. Esquematice.

Haga en los dos machos un corte ventral, después de desmedularlos. Extraiga los testículos de color amarillo pálido que aparecen asociados con los riñones (Fig.4). Macérelas en 5 ml de agua de estanque. Tome una gota y obsérvela al microscopio. Note la movilidad de los espermatozoides; esquematice. A continuación agregue una gota del agua de huevos (teniendo cuidado de que esta no lleve ningún huevo en suspensión). Déjela en reposo y observe. Con la

pinza de disección, tome los testículos macerados (el tejido que queda después de macerar) páselos varias veces sobre las cadenas de huevos que están en la caja de petri para asegurar una buena fecundación. Pasados cinco minutos, cubra los huevos con agua de estanque. Tome algunos y mírelos al estereomicroscopio. Observe, esquematice y compare con los esquemas realizados antes de fecundar. Ponga especial cuidado a la membrana gelatinosa.

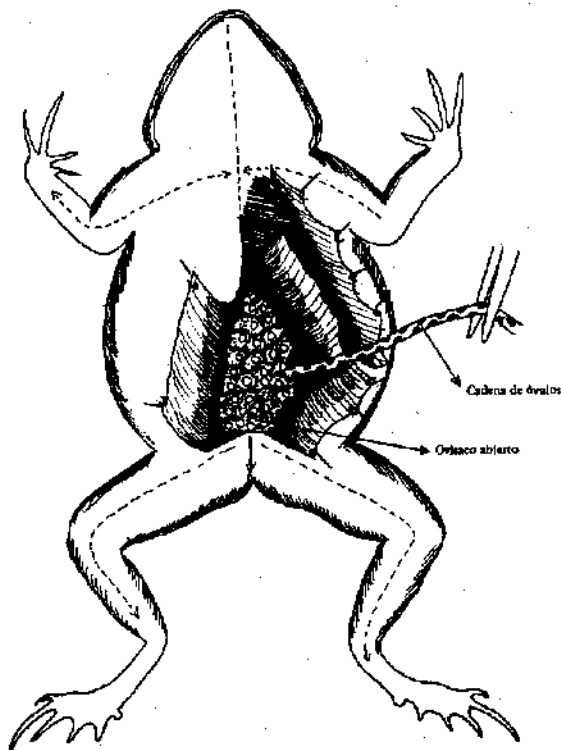


Figura 3. Extracción de las cadenas de óvulos del ovisaco.

D. Segmentación.

Observe al estereomicroscopio (o con una lupa) algunos huevos fecundados. La región oscura es el polo animal y la más clara el polo vegetal.

Siga observando y esquematice la aparición de la primera, segunda, tercera y cuarta segmentación o clivaje. La primera segmentación se determina por la aparición en el polo animal, de una hendidura o surco que se prolonga hacia el polo vegetal. La segunda segmentación aparece en forma similar pero perpendicular a la primera (Fig.5). ¿Cómo aparecen las otras segmentaciones? Esquematice y determine tiempos.

E. Etapas posteriores del desarrollo.

Cambie cada 12 horas el agua del recipiente donde están los embriones. Si quiere conservar alguna etapa

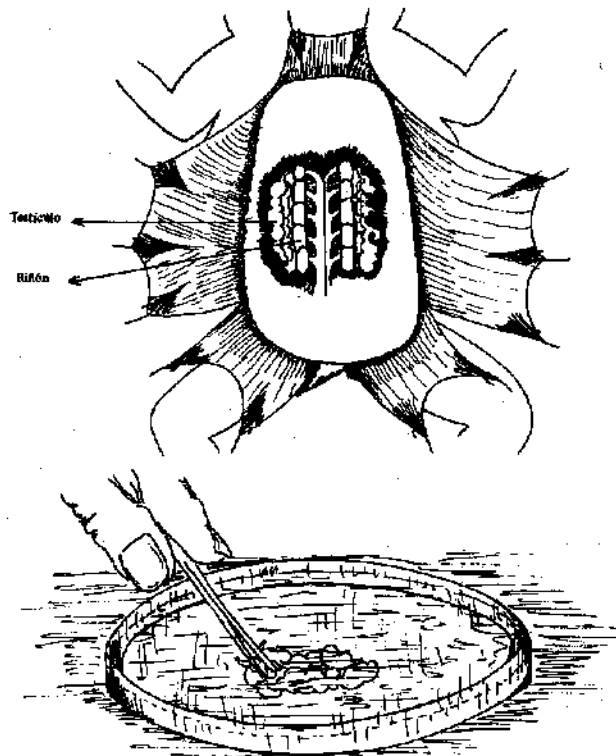


Figura 4. Localización y maceración de testículos.

del desarrollo puede fijarla en formol al 40/o en volumen. Para extraerlos utilice un gotero de orificio amplio para no causarles daño.

Continúe haciendo observaciones de las siguientes etapas: blástula, gástrula, néurula y eclosión. Además, anote el orden y el tiempo de aparición de las siguientes estructuras: branquias, ojos, boca, ano, espiráculo, extremidades anteriores y posteriores (Fig.5).

Como alimento para los renacuajos, utilice hojas de lechuga hervidas. Puede guardarse una reserva de éstas en el refrigerador. Al usarlas, deben llevarse a la temperatura ambiente, sumergiéndolas en agua tibia, antes de darlas a los renacuajos.

Cuando los renacuajos hayan sufrido la metamorfosis completa, llévelos a un lugar natural apropiado para que continúen su crecimiento, pues la experiencia demuestra la gran dificultad en criarlos en un terrario. Además, en esta forma devuelve a la naturaleza los ejemplares sacrificados.

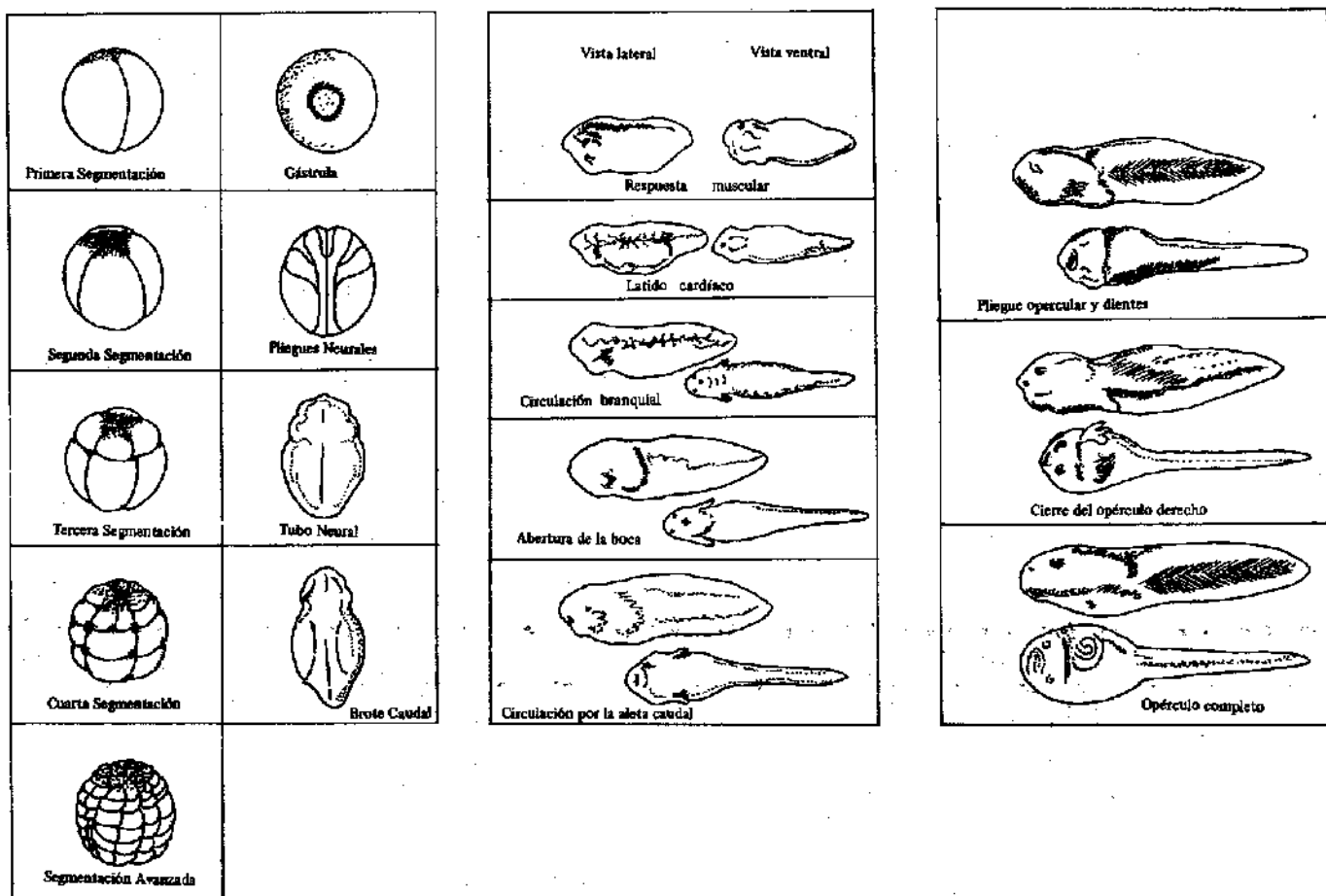


Figura 5. Principales etapas en el desarrollo de embriones de *Rana pipiens*. (Tomado de: Rugh, R. *Experimental Embriology*. New York. Burgess Publishing, 1965.

BIBLIOGRAFIA

- Builes, Jorge. *Manual de Laboratorio de Embriología Comparada y Experimental*. Universidad de Antioquia, Departamento de Biología, 1972
- Builes, J. y A. Urán. "Estudio del Ciclo Sexual de la Sabaleta *Brycon henni* Eigenmann. Su Comportamiento y Fecundación Artificial". *Act. Biol.*3(7):2-12, 1974.
- Heredia, Fabio. "Efecto Inhibidor del Semen de *Bufo blombergi* en el Desarrollo de los Huevos de otras Especies de Bufo". *Act. Biol.*3(8):34-40, 1974.
- Rugh, Roberts. *Experimental Embriology*. New York. Burgess Publishing Company, 3a. ed., 1965.
- Rugh, Roberts. *Laboratory Manual of Vertebrate Embriology*. New York. Burgess Publishing Company, 1966.