

CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL OVOCITO DE BUFO ARENARUM DURANTE LA FECUNDACION (1)

POR FRANCISCO D. BARBIERI Y ANA E. SCHUGURENSKY

SUMMARY

Structural changes in *Bufo arenarum* eggs during fertilization.— The morphological organization of the mature oocyte of the toad *Bufo arenarum* is described. Some aspects of the activation process, such as the pellicular reaction, the emission of the second polar body, the rotation of orientation and the rotation of fertilization were studied and some observations on sperm penetration were made.

Desde hace algunos años, los huevos de *Bufo arenarum* Hensel son frecuentemente empleados para estudios de tipo experimental y bioquímico. Teniendo en cuenta que algunos de los problemas que se estudian sobre este material tienen relación con la fecundación, se ha juzgado conveniente estudiar algunas de las particularidades más importantes de este proceso desde el punto de vista morfológico. Nuestras observaciones serán cotejadas principalmente con las recogidas por Ancel y Vintemberger (1948) en huevos de *Rana fusca*, por tratarse de las más completas entre las efectuadas sobre huevos de Anfibios Anuros.

En primer término consideraremos la organización estructural del ovocito maduro tal como se presenta al ser depuesto, para analizar, en segundo término, las modificaciones que sufre como consecuencia de la fecundación. Finalmente agregaremos algunas observaciones sobre la penetración del espermatozoide.

(1) Trabajo parcialmente costado mediante subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (R. Argentina).

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los ejemplares de *Bufo arenarum* empleados en el presente trabajo fueron recolectados en los alrededores de San Miguel de Tucumán.

Los ovocitos maduros se consiguieron por tratamiento con hipófisis homólogas conservadas según Pisanó (1965) y la fecundación se efectuó siempre *in vitro* manteniéndose los huevos a 18°C. Las observaciones se practicaron sobre material fresco o previamente fijado. Como fijadores se emplearon el formol al 4-10 % (en frío, a temperatura ambiente y en caliente) y la solución de Ancel y Vintemberger (1948).

Los ovocitos fijados fueron estudiados al microscopio estereoscópico directamente, o bien después de ser seccionados siguiendo distintos planos. Además, numerosos ejemplares fueron incluidos en parafina y cortados en secciones seriadas con micrótopo. Estas preparaciones histológicas fueron coloreadas con hematoxilina o tratadas con la reacción de Feulgen para la evidenciación del material nuclear.

RESULTADOS

La organización morfológica antes de la fecundación

Los ovocitos depuestos de *Bufo arenarum*, como en otras especies, están rodeados por un doble sistema de involucros. En contacto directo con su superficie se encuentra una membrana anhistá para la que mantendremos la designación de *membrana vitelina* ("corion", según los autores de lengua francesa (Gallien, 1958) (fig. 2). Esta membrana, a su vez, está recubierta por un material gelatinoso segregado por la mucosa del oviducto, el que es emitido en forma de un largo cordón conteniendo a los ovocitos.

Como la morfología de los ovocitos de una misma deposición es relativamente uniforme, toda vez que nos refiramos a la frecuencia con que se da un determinado carácter, aludiremos a muestras pertenecientes a deposiciones diferentes.

El ovocito de *B. arenarum* es una esfera casi perfecta cuyo diámetro oscila alrededor de 1,5 mm. La superficie está parcialmente cubierta por un pigmento de tipo melánico cuyo color, generalmente pardo oscuro, puede variar desde el pardo-verdoso al pardo rojizo, evidenciando su naturaleza heterogénea. El pigmento está dispuesto de tal manera que permite reconocer dos hemisferios, uno más oscuro y otro más claro, clásicamente reconocidos como *polos animal* y *vegetativo*. La extensión

del casquete pigmentado puede variar en un grado considerable, pero generalmente sobrepasa el nivel ecuatorial, por lo que el área que corresponde al casquete vegetativo resulta más reducida. El color de este último es amarillento o grisáceo pálido. El límite entre ambos polos puede estar demarcado en forma relativamente neta o presentarse esfumado; en cualquier caso, se aprecia siempre la presencia de una zona intermedia de color grisáceo. La simetría es radial.

El centro del polo animal está señalado por una área clara, aproximadamente circular y de unos 50 micrones de diámetro, que corresponde a la *mancha polar superior* del huevo de *Rana fusca*. En el ámbito de esta mancha es relativamente fácil reconocer, como un punto oscuro, al poro del *infundíbulo de maduración*; no así, en cambio, al polocito resultante de la primera división meiótica. La *mancha polar inferior*, que aparece en el centro del polo vegetativo de *R. fusca*, no pudo ser observada en ningún caso en los ovocitos en estudio.

La organización profunda, tal como se aprecia en los especímenes fijados, corresponde también al tipo de simetría radial. La mayor parte del pigmento aparece concentrada en la corteza de la célula, como una capa que se adelgaza progresivamente a medida que se aleja desde el centro del polo animal (fig. 1). A nivel de la mancha polar superior el pigmento cortical aparece muy disminuído. Mediante el estudio de ovocitos seccionados meridiana y ecuatorialmente, se pudo observar que por debajo de esta zona una cierta cantidad de pigmento se dispone conformando un corto conducto por cuyo interior el citoplasma claro se extiende a través de la corteza del ovocito (fig. 1). En las preparaciones histológicas, el área cortical muestra las formaciones siguientes: 1) una capa de pigmento muy densa, de aspecto homogéneo y en la que no se reconoce plaquetas vitelinas, que se estrecha progresivamente hasta desaparecer por debajo del ecuador; 2) una segunda capa de pigmento, menos densa y de mayor espesor, que contiene plaquetas vitelinas. El espesor de esta última disminuye en forma relativamente brusca en las proximidades del ecuador, pero parece prolongarse hasta el centro mismo del polo vegetativo como una película subcortical poco densa en gránulos de pigmento, como ha sido observado en *Bufo lentiginosus* (King, 1901). Es decir que, en nuestras condiciones de observación, no hemos podido notar el plasmalema ni la capa hialina descritos en los ovocitos de otros Anfibios (Witteck, 1952).

Las plaquetas de vitelo se ordenan según el conocido gradiente animal-vegetativo (fig. 2). Cuando se observa con el microscopio estereoscópico ovocitos seccionados según un plano meridiano, en la masa central puede distinguirse las tres zonas señaladas en el caso de *R. fusca*. Inme-

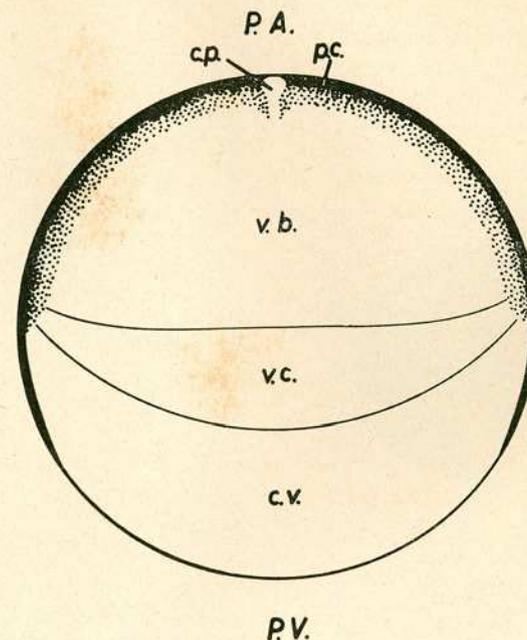
diatamente por debajo del polo animal el citoplasma es de color muy claro, casi blanco, debido al muy escaso número de gránulos de pigmento que contiene. Aquí se encuentran las plaquetas de menor tamaño cuyos contornos son ovoideos (fig. 1, v.b.). En el polo opuesto, en cambio, el citoplasma es de color ligeramente amarillento y aparece dispuesto como una cúpula con la concavidad hacia el polo animal (v.c.). Las plaquetas de esta zona, las de mayores dimensiones, son de contornos poligonales redondeados. El pigmento es escaso, pero algo más abundante que en la zona precedentemente descrita. Finalmente, entre estas dos regiones y ocupando la concavidad de la cúpula de vitelo, se observa una masa central de color gris relativamente oscuro, que a pesar de su color distinto correspondería topográficamente al *vitelo pardo central* de Roux (v.c.). Las plaquetas son aquí de talla mediana y se hallan acompañadas por numerosos gránulos de pigmento (la mayor densidad después de la corteza).

Las reacciones de activación

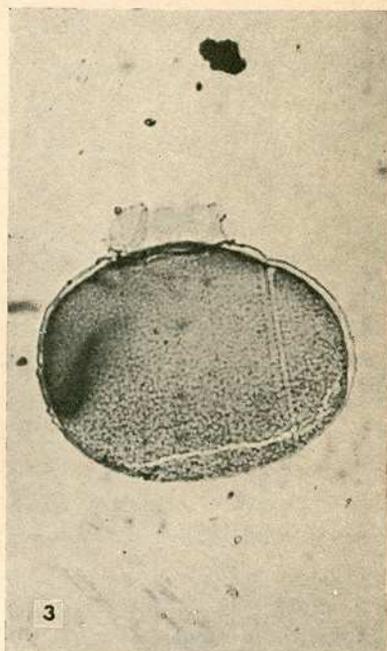
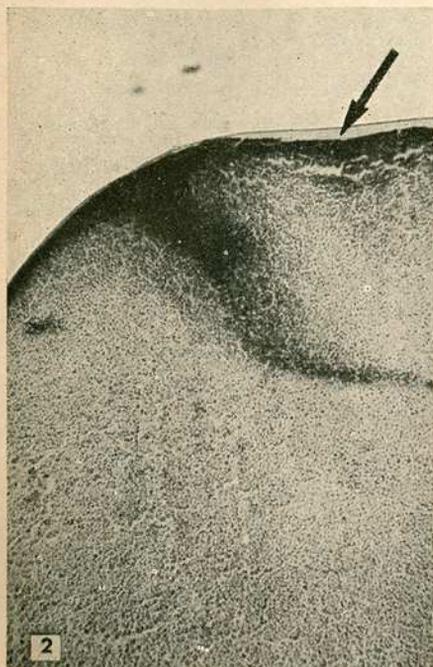
Caundo el ovocito es penetrado por el espermatozoide, se sucede una serie de cambios morfológicos que anteceden a la primera mitosis de segmentación y que se reúnen convencionalmente bajo la denominación de "activación". Siguiendo a Ancel y Vintemberger (1948), describiremos este proceso en tres etapas:

1. *Primera reacción pelicular de activación.* Entre las modificaciones comprendidas bajo esta denominación, la más aparente es la desaparición de la mancha polar superior, lo que ocurre unos 10 minutos después de la inseminación. Aunque de apreciación menos notable, también pudieron observarse breves desplazamientos del infundíbulo de maduración así como variaciones reversibles en el diámetro de su abertura superficial. Lo que no pudo notarse de manera clara, por lo menos en las muestras estudiadas, fue el desplazamiento de los límites del casquete pigmentado hacia el polo animal. Sin embargo, la superficie del huevo muestra cambios bastante constantes: primero la formación de finos pliegues que le dan un aspecto crispado y luego un aumento de su tensión, como si se acrecentase la turgencia del huevo.

2. *Expulsión del segundo polocito y rotación de orientación.* La rotación de orientación tiene lugar cuando el huevo puede girar libremente dentro del espacio perivitelino. En razón de que su centro de gravedad se halla más próximo al polo vegetativo, al término de este movimiento el eje de simetría coincide con la vertical, quedando el polo animal hacia



1. Corte esquemático de un ovocito maduro. P.A.: polo animal; P.V.: polo vegetativo; c.p.: campo polar; p.c.: pigmento cortical; v.b.: citoplasma con plaquetas pequeñas y muy escaso pigmento; v.c.: vitelo central, con plaquetas medianas y gránulos de pigmento; c.v.: cúpula vitalina.



2 Cuadrante correspondiente al polo animal en el que se aprecia el rastro de penetración del espermatozoide y el aplastamiento del polo animal que determina un aumento del espacio perivitelino (señalado). — 3. Sección aproximadamente mediana de un huevo al concluir la rotación de fecundación. El punto de origen del rastro espermático se ha desplazado hacia el polo vegetativo (parte inferior de la figura) como resultado del desplazamiento de la corteza.

arriba y el polo vegetativo hacia abajo. Esta rotación se inicia alrededor de los 30 minutos después de la inseminación y se completa en unos 15 minutos, es decir que cronológicamente semeja más el caso de *Rana fusca* que el de *Bufo vulgaris* (Ancel y Vintemberger, 1948).

Mientras tiene lugar la rotación de orientación es emitido el segundo polocito por el infundíbulo de maduración. Este polocito, a diferencia del primero, pudo ser visto superficialmente en los huevos de *B. arenarum*.

La acumulación de líquido en el espacio perivitelino parece acontecer al mismo tiempo que la rotación, como ha sido también observado en *B. vulgaris* (Ancel y Vintemberger, 1948). Al término de la rotación el aplastamiento del polo animal es muy pronunciado (fig. 2); el espacio perivitelino, más amplio en esa zona, aparece ocupado por un líquido ligeramente turbio.

3. *Rotación de fecundación.* Consistiría en un desplazamiento de la corteza del huevo con respecto a la masa subyacente (Ancel y Vintemberger, 1948). Mientras en un sector del huevo, como consecuencia de ese desplazamiento, el pigmento cortical desciende hacia el polo vegetativo, en la antípoda se aleja del mismo dejando un rastro de pigmento más claro que, en los huevos de algunas especies, toma el aspecto de una "medialuna gris". Estos movimientos, probablemente más complejos que lo imaginado inicialmente (Løvtrup, 1965), establecen la fijación del plano de simetría bilateral, señalando la medialuna gris la región dorsal del futuro embrión. Tanto por la observación de los huevos *in toto* como por el examen de los especímenes seccionados, hemos podido reconocer este movimiento de la corteza en los huevos de *B. arenarum*. Hemos conseguido establecer, además, que la amplitud del corrimiento es del orden de los 30°, lo que parece ser una característica de los huevos de Anuros (Clavert, 1962). Sin embargo, en los huevos de *B. arenarum* no se forma una medialuna típica como en los de *R. fusca* o de *Discoglossus pictus*. En los huevos de muchas deposiciones sólo llega a distinguirse la formación de una banda grisácea de límites irregulares y, algunas veces, de aspecto estriado (lo que indicaría el corrimiento de la corteza pigmentada). No hemos podido observar la concentración de pigmento señalada por Del Conte y Sirlin (1951) sobre el límite entre esta "medialuna gris" y el polo vegetativo.

Penetración del espermatozoide

Los espermatozoides de *B. arenarum* atraviesan las capas de gelatina que rodean a los ovocitos en forma relativamente rápida. En base a nues-

tras determinaciones *in vivo*, a 18°C, bastan de 3 a 5 minutos para que alcancen la membrana vitelina, tiempo idéntico al señalado para *B. lentiginosus* (King, 1901). Según ha sido mostrado en un trabajo precedente, esta penetración estaría condicionada por factores químicos del tipo de las "fertilisinas" (Barbieri y Villecco, 1966).

La entrada en el ovocito tiene lugar entre el polo animal y el ecuador. El espermatozoide, en su travesía por el interior del huevo, deja un rastro bien marcado, con acodamientos sobre el plano meridiano, que en la interpretación de Ancel y Vintemberger (1948), serían debidos a la rotación de fecundación (fig. 3).

* * *

Agradecemos al Dr. Armando Pisanó la realización de las fotomicrografías.

BIBLIOGRAFIA

- ANCEL, P. y VINTEMBERGER, P. 1948. Recherches sur le déterminisme de la symétrie bilatérale dans l'oeuf des amphibiens.— Bull. biol., Suppl., 31 : 1.
- BARBIERI, F. D. y VILLECCO, E., 1966. A fertilizin-like substance in the egg jelly of the toad *Bufo arenarum*.— Arch. zool. Ital. (en prensa).
- CLAVERT, J., 1962. Symmetrization of the egg of Vertebrates. In: M. Abercrombie y J. Brachet (ed.), Advances in Morphogenesis, 2 : 27. Academic Press. New York.
- DEL CONTE, E. y SIRLIN, J. L., 1951. Serie tipo de los primeros estadios embrionarios en *Bufo arenarum*.— Acta. zool. lilloana, 12 : 495.
- GALLIEN, L., 1958. Problèmes et concepts de l'Embriologie expérimentale. Gallimard, Paris.
- LØVTRUP, S., 1965. Morphogenesis in the amphibian embryo fertilization and blastula formation.— Wilhelm Roux' Arch. EntwMeeh. Org., 156 : 204.
- PISANÓ, A., 1956. Método para mantener la hipófisis de anfibio fisiológicamente "in vitro".— Arch. Farm. Bioquim. Tucumán, 7 : 387.
- WITTEK, M. 1952. La vitellogénese chez les Amphibiens.— Arch. Biol. Paris, 63 : 133.
- KING, H. D., 1901. The maturation and fertilization of the egg of *Bufo lentiginosus*.— Morph., 17 : 293.