

**LA GONADA LARVAL DE *Bufo arenarum* SOMETIDA A HORMONA TIROIDEA \*\***

Dora Rengel \* y Armando Pisanó \*

Laboratorio de Investigaciones Embriológicas (CONICET)

Montevideo 126, 4º piso (1019) - Buenos Aires - Argentina.

\*\* Trabajo realizado utilizando Subsidio Pid. 3-093800/85 - CONICET (Argentina)

\* Miembros de la Carrera del Investigador del CONICET.

**RESUMEN**

La gónada de *Bufo arenarum* se presenta con características femeninas en todas las larvas dado que esta especie representa un ejemplo de raza sexual "indiferenciada". El sexo genético masculino recién se evidencia luego de la metamorfosis. A fin de comprobar la eventual vinculación entre diferenciación gonadal y hormona tiroidea, se trataron las larvas con tri-iodo-tironina. Los resultados demuestran un incremento en el número y en el grado de maduración de los ovocitos.

Palabras clave: *Bufo arenarum* - Gónada larval - Hormona tiroidea.

**INTRODUCCION**

Observaciones orientadas a estudiar el desarrollo de la gónada de *Bufo arenarum* determinaron que esta especie, al igual que otros bufónidos, representa un ejemplo de "raza sexual indiferenciada"; es decir, que la gónada se diferencia en testículo, en los ejemplares genéticamente masculinos, recién después de la metamorfosis, mostrando hasta este parámetro de desarrollo, características morfológicas típicamente ováricas<sup>1</sup>.

Según algunos autores, tanto el desarrollo como la diferenciación de la gónada en los Anfibios, no dependería de la funcionalidad de la glándula tiroidea<sup>2-3-4</sup>. No obstante, este resul-

tado no puede aplicarse a todas las especies; al respecto Krichel<sup>5</sup> señala, en *Bufo viridis*, una aceleración de la ovogénesis alimentando las larvas con tiroides. Se sabe además la importancia que reviste esta glándula durante la metamorfosis de los Anfibios<sup>6,7,8,9,10,11,12,13,14,15</sup>; estudios histológicos e histoquímicos, indican que durante esa etapa se torna marcadamente más activa, tanto que, por lo menos en anuros, al comenzar la sucesión de los eventos que se verifican durante la metamorfosis, la tiroides se desarrolla más rápidamente que el resto del cuerpo considerado como un todo<sup>16,17</sup>.

En base a lo expuesto y en modo particular por la disonancia de los muy escasos resultados que se refieren a la acción de la tiroides sobre el desarrollo y la diferenciación de la gónada de anfibio, hemos considerado oportuno estudiar las eventuales variaciones morfológicas que pudiera presentar la gónada de larvas de *Bufo arenarum* sometidas a la acción de tri-iodo-tironina.

**MATERIAL Y METODO**

Se utilizaron larvas de *Bufo arenarum* obtenidas por fertilizaciones realizadas en laboratorio, luego de haber estimulado los ejemplares con macerado de hipófisis conservada según Pisanó<sup>18</sup>. Al comenzar los ensayos, las larvas tenían 12 días de edad y mostraban el opérculo completo, es decir que se encontraban en el estadio 25 de la tabla de Del Conte y Sirlin<sup>19</sup>.

Para cada grupo de los 80 ensayos, se formaron tres lotes de treinta larvas cada uno, según el esquema que sigue:

- a) larvas control;
- b) larvas tratadas con 4  $\mu\text{g}/\text{l}$  de tri-iodo-tironina;
- c) larvas tratadas con 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  de tri-iodo-tironina.

No han podido ser utilizadas dosis más elevadas debido a que las larvas no resisten la presencia de esta hormona suministrada en mayor cantidad.

Tanto las larvas controles como las que se sometieron a la acción de la hormona, se mantuvieron a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C}$  -  $22^{\circ}\text{C}$ ), en peceras de 3 litros, que contenían agua decolorada, con o sin hormona, según el caso.

La tri-iodo-tironina (3,3,5 - triiodo-DL-tyronine) se agregaba día por día al cambiar el agua de las peceras y contemporáneamente se proporcionaba abundante alimento que consistió en lechuga hervida.

Diariamente se realizaban observaciones para reconocer eventuales modificaciones no sólo morfológicas, sino también inherentes al comportamiento de los ejemplares.

Al comenzar el ensayo se fijaron algunas larvas en Bouin con el objeto de reconocer, mediante la observación histológica, el cuadro de la gónada. A los 42, 52 y 62 días de tratamiento se fijaron en Bouin, después de haberlas abierto ventralmente, larvas problemas con sus respectivos controles. Las gónadas junto con el mesonefros fueron incluidas en parafina y los cortes de 5 mm de espesor, se tiñeron según las técnicas convencionales, con hematoxilina y eosina.

Al comenzar la reabsorción de la cola de las larvas (estadio XVIII, según la tabla de Martín *et al*<sup>20</sup>, el ensayo se consideraba finalizado debido a que, a partir de este momento, se verificaba una elevada mortandad especialmente entre las larvas sometidas a la mayor dosis de hormona.

## RESULTADOS

Antes de resumir los resultados histológicos de mayor interés, considera-

mos conveniente señalar algunas de las diferencias observadas en el comportamiento larval. Al respecto, hemos podido constatar un marcado aumento de la actividad y una mayor respuesta a los estímulos externos ya en los primeros días de tratamiento. No obstante, y en modo especial las larvas mantenidas en mayor concentración de hormona (15  $\mu\text{g}/\text{l}$ ), aproximadamente 50 días después del tratamiento, dejan de alimentarse o lo hacen escasamente, si bien poseen un digestivo desarrollado. Casi todas las larvas que reciben la hormona, independientemente de la cantidad, logran alcanzar a partir de los 10 días de tratamiento, estadios más avanzados con respecto al de los controles de la misma edad, sin embargo no existe sincronía en un mismo grupo tratado. Es de destacar que las larvas de los grupos sometidos a la mayor concentración de tri-iodo-tironina fueron las primeras en alcanzar el inicio de la reabsorción de la cola; el otro grupo tratado con dosis de 4  $\mu\text{g}/\text{l}$  aceleró en menor grado el abandono de los estadios larvales.

En nuestra descripción pasaremos por alto la sucesión de los eventos que acontecen en la estructura larval a lo largo del período de suministración de la hormona, dado que consideramos más oportuno focalizar sólo los resultados inherentes a la gonada.

Considerando que los datos varían en función del período de suministración y de la cantidad de hormona, los resultados se esquematizarán para cada uno de los grupos.

### 1 - Controles al inicio del tratamiento hormonal

A la lupa binocular, mediante disección es posible observar dos pequeñas esferas blancas ubicadas en la cara superior interna del respectivo mesonefros, que corresponden al esbozo de la gónada.

A nivel microscópico se constata que este esbozo está constituido fundamentalmente por células estromales y muy pocas células germinales, es decir que se presenta poco colonizado.

## 2 — Tratamiento hormonal (42 días)

### a) Larva control:

La observación a la lupa binocular demuestra que la gónada se presenta con características similares a las ya descritas para las larvas de *Bufo arenarum* de esta misma edad<sup>1</sup>.

En efecto, en fresco, la progónada aproximadamente esférica y translúcida muestra esferas diminutas y blanquecinas; la metagónada se caracteriza por asemejarse a un delgado cordón translúcido y con aspecto de rosario que se apoya sobre la cara interna del respectivo mesonefros.

El análisis microscópico de cortes seriados revela que la progónada contiene ovocitos (las esferas que en vivo se presentaban blanco-amarillentas). La metagónada muestra en cambio, ovogonios ubicados periféricamente que se mezclan con algunos protogonios (Fig. 1, a).

### b) Larvas tratadas con 4 $\mu\text{g/l}$ :

El análisis macroscópico realizado con aumento apropiado, muestra que la progónada de todas las larvas es de forma esférica, translúcida y de volumen mayor que la de los controles; en la metagónada también se constata un marcado engrosamiento con respecto a la de los ejemplares no tratados.

El análisis comparativo histológico entre progónada de larvas normales y de tratadas con hormona, revela que esta última se encuentra constituida por un mayor número de ovocitos, cuyo respectivo volumen es superior al demostrado por el ovocito de los controles. La metagónada presenta en cambio ovogonios dispuestos periféricamente y es frecuente encontrar gonios en división (Fig. 1, c).

### c) Larvas tratadas con 15 $\mu\text{g/l}$ :

En casi todas las larvas, la progónada ha perdido su típica forma esférica, pasando a ser piriforme.

El estudio histológico demuestra que en la progónada los ovocitos se encuentran rodeados por células folicu-

lares y poseen volumen distinto atribuible a fases distintas de crecimiento (Fig. 1, b).

La metagónada presenta ovogonios similares en volumen a los del grupo tratado con 4  $\mu\text{g/l}$ , pero más numerosos y bastante desordenados, habiéndose perdido la disposición periférica descrita para el grupo de dosis menor. En algunas zonas se visualiza una notable cantidad de células sanguíneas. Son frecuentes los gonios en división.

## 3 - Tratamiento hormonal (52 días)

### a) Larva control:

La progónada se presenta esférica y, en fresco, translúcida; la metagónada se mantiene en forma de rosario y se torna opaca.

El estudio histológico señala que el cuadro de la progónada es similar al del grupo anterior. También la metagónada mantiene características similares a las de los controles de los grupos de 42 días de tratamiento hormonal. Es decir, los ovogonios se disponen caóticamente o a veces colonizan en mayor número áreas particulares. Se observan además, distribuidos periféricamente, gonios con núcleo vesiculoso, polilobulado o escotado.

### b) Larvas tratadas con 4 $\mu\text{g/l}$ :

A nivel macroscópico la progónada es levemente oblonga, mientras que la metagónada no difiere de la del grupo control.

El examen microscópico seriado demuestra que el aspecto de la progónada no es disímil del observado en el grupo de 42 días de tratamiento hormonal; los ovocitos no parecen ser más numerosos.

En la metagónada, los gonios tienen la misma distribución y aspecto que en las larvas no tratadas de igual edad.

### c) Larvas tratadas con 15 $\mu\text{g/l}$ :

El análisis macroscópico permite constatar que la progónada posee un volumen levemente mayor que el constatado en los controles y que la metagónada no ha sufrido significativas variaciones.

El examen histológico muestra en la progónada abundantes ovocitos circundados por células foliculares; se encuentran también ovocitos en degeneración. La metagónada presenta numerosos gonios distribuidos periféricamente.

En resumen, existen sólo leves diferencias en el cuadro histológico con respecto al descripto para los 42 días de tratamiento hormonal y por lo tanto omitimos la iconografía dado que representaría una mera repetición.

#### 4 - Tratamiento hormonal (62 días)

##### a) Larva control:

Tanto la progónada, como la metagónada, mantienen, macroscópicamente, las características descriptas para el grupo control de 42 días de tratamiento.

Histológicamente no se han verificado cambios de consideración; en la progónada sólo los gonios se presentan, quizás, más numerosos, pero los ovocitos, tanto en número como en volumen, no muestran un incremento significativo. El cuadro más notable lo presenta la metagónada que evidencia en la gran mayoría de las larvas, un desplazamiento periférico de las células germinales. En muy pocos casos, numéricamente no significativos, se mantienen las características de la metagónada de las larvas no tratadas del grupo precedente.

##### b) Larvas tratadas con 4 $\mu\text{g}/\text{l}$ :

Macroscópicamente la progónada continúa presentando forma subsférica y en fresco, por transparencia, muestra numerosos gránulos amarillentos. La metagónada, de mayor volumen que la de los controles, aparece como un cordón en forma de rosario, que se extiende en la cara interna del mesonefros.

El análisis histológico revela en la progónada, ovocitos en crecimiento y gonios en división que han aumentado significativamente en número con respecto a lo que ocurre en la progónada de larvas no tratadas. En la metagónada han proliferado los ovocitos que se agrupan en determinadas áreas.

##### c) Larvas tratadas con 15 $\mu\text{g}/\text{l}$ :

El volumen de la progónada es mayor con respecto al presentado por la de los controles y su vascularización ha aumentado. La metagónada pierde su aspecto filiforme y denota un engrosamiento muy pronunciado en su primera porción es decir en la región más próxima a la muy corta mesogónada.

Desde un punto de vista histológico la progónada ofrece un cuadro enriquecido por elementos ovocitarios en distintas fases de crecimiento, que se presenta activo y tumultuoso. No existe sincronía en el proceso de maduración ovocitaria: se encuentran ovocitos de distinta fisonomía histológica y de diversa afinidad tintorial (Fig. 2, a); algunos de ellos son intensamente basófilos con núcleo y nucleolo muy evidentes, otros, de estadios menos avanzados, y eosinófilos, se reúnen en las áreas más periféricas y no es infrecuente encontrar ovocitos binucleados (Fig. 2, b). La metagónada ha sufrido un cambio estructural significativo dado que ha sido invadida por ovogonios y algunos ovocitos (Fig. 2, c). El conjunto de los cuadros descriptos, proporciona a la gónada el aspecto de un ovario primitivo que perteneciera a larvas de *Bufo arenarum* de estadios cercanos al climax de la metamorfosis.

#### DISCUSION

1 - El examen comparativo de los datos obtenidos señala que las larvas de *Bufo arenarum*, mantenidas desde el estadio de opérculo cerrado, en presencia de tri-iodo-tironina en dosis de 4  $\mu\text{g}/\text{l}$  o respectivamente, de 15  $\mu\text{g}/\text{l}$ , aceleran los procesos de metamorfosis; la reabsorción de la cola se inicia aproximadamente a los 60 días de haber proporcionado la hormona. El resultado no es novedoso, en efecto, se atribuyen a Gudernatsch<sup>6</sup> las primeras observaciones fehacientes que relacionan la metamorfosis de los anfibios con la acción de la hormona tiroidea. Lo que podemos agregar es que en nuestro ensayo, especialmente en presencia de la dosis más elevada, se verifica un desa-

rollo asincrónico entre las larvas de un mismo grupo, si bien acelerado con respecto al de los controles. Todas las larvas, sin considerar la dosis empleada, demuestran desde los 10 días de tratamiento, un notable aumento de actividad, que parece detenerse a los 50 días, momento en que comienzan a rehusar el alimento y a comportarse como larvas que han alcanzado el climax de la metamorfosis.

2 - El conjunto de los resultados señala que la gónada larval sufre la acción de la hormona tiroidea suministrada. En efecto: el aspecto de la gónada control a partir de los 42 días y hasta los 62 días de vida larval no varía de manera significativa: la progónada queda esférica, translúcida y con una relativa escasa cantidad de ovocitos que el análisis histológico demuestra que se encuentran en etapa inicial de crecimiento; la mesogónada, que posee menor cantidad de ovocitos que la primera se reconoce por sus características que la diferencian también de la metagónada. Esta última, a los 62 días, histológicamente presenta en determinadas áreas el desplazamiento periférico de elementos germinales.

Un cuadro completamente distinto lo ofrece en cambio la gónada de larvas mantenidas en presencia de tri-iodo-tironina: la progónada macroscópicamente cambia de forma e histológicamente se constata que ha incorporado a la mesogónada de modo tal que resulta sumamente difícil reconocer esta última a los 62 días de tratamiento. Exhibe un mayor número de ovocitos de estadios cada vez más avanzados, con diferente afinidad tintorial y con anomalías. La metagónada que engruesa en las áreas más proximales, encierra ovocitos en distinta fase de desarrollo que ocupan amplias zonas.

Las observaciones, tanto macro como microscópicas realizadas, comparativamente, desde los 42 hasta los 52 días de tratamiento hormonal, evidencian un progresivo proceso de maduración ovocitaria; en el período que sigue, ésta se torna más acelerada y en ocasiones tumultuosa.

3 - Los resultados indican además que en *Bufo arenarum* la tri-iodo-tironina favorece una anticipada y relativa maduración de los ovocitos, sin que se insinúe la diferenciación en testículo en los ejemplares genéticamente masculinos. Este proceso en la normalidad se verifica un mes después de la metamorfosis. Si bien nuestras observaciones corroboran ampliamente las de Krichel<sup>5</sup> quien señala en larvas de *Bufo viridis* una adelantada ovogénesis al proporcionar, como alimento, glándula tiroidea, confirmarían la hipótesis que la diferenciación de la gónada, por lo menos en *Bufo arenarum*, no dependería exclusivamente de la presencia de hormona tiroidea.

4 - El aumento volumétrico significativo que sufre el ovocito de larvas tratadas con tri-iodo-tironina puede interpretarse como la consecuencia del impacto de esta hormona en el hígado que se traduciera en una síntesis de vitelogenina<sup>21</sup>. Su incorporación en el ovocito favorecería el aumento volumétrico dependiente de la vitelogénesis.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Pisanó A., Pizarro N.: Observaciones sobre el desarrollo de la gónada de *Bufo arenarum*. Rev. Soc. Arg. Biol. 34: 175-184, 1958.
2. Swingle W.: Acceleration of metamorphosis in frog larvae by thyroid feeding and the effects upon the alimentary tract and sex glands. J. Exp. Zool. 24: 521-544, 1918.
3. Hoskins E., Hoskins M.: Experiments with the thyroid, hypophysis and pineal glands of *Rana sylvatica*. Anat. Rec. 16: 151-156, 1919 a.
4. Hoskins E., Hoskins M.: Growth and development of Amphibia is effect by thyroidectomy. J. Exp. Zool. 29:1-69, 1919 b.
5. Krichel M.: Analysis of development. Ed. Saunders Co., Philadelphia & London, 1931, p. 649.
6. Gudernatsch JF.: Feeding experiments on tadpoles. I. Roux's Arch. Entw-mech. 35:457-483, 1912.
7. Allen BM.: Extirpation experiments in *Rana pipiens* larvae. Science 44:755-757, 1916.
8. Allen BM.: The influence of the thyroid and hypophysis upon growth and development of amphibian larvae. Quart. Rev. Biol. 4:325-352, 1929 a.

9. Allen BM.: Transplants of the thyroid anlagen into anuran tadpoles. *Anat. Rec.* 44:207-210, 1929 b.
10. Allen BM.: The endocrine control of amphibian metamorphosis. *Biol. Rev.* 13: 1-19, 1938.
11. Hoskins E., Hoskins M.: On thyroidec-tomy in amphibia. *Anat. Rec.* 51:363-366, 1917.
12. Bolten M.: Ein Fall von Thyroid - In-suffizienz bei einer Froschlarve. *Neder-landsel Tydsch V. Geneesk.* 70:1711-1713, 1926.
13. Uhlenhuth E.: Die Morphologie und Physiologie der Salamanders-childdrüse. *Roux's Arch. Entw-mech.*, 109:611-749, 1927.
14. Etkin W.: Growth of the thyroid gland of *Rana pipiens* in relation to metamor-phosis. *Biol. Bull.* 59:285-292, 1930.
15. Etkin W.: A thyrotropic field effect in the tadpole. I. *J. Exp. Zool.* 82:463-496, 1939.
16. Etkin W.: The phenomena of anuran metamorphosis. III. *J. Morph.* 59:69-90, 1936.
17. Mazzeschi A.: Sulle correlazioni dell'aparato endocrino durante lo sviluppo di *Rana agilis*. *Arch. Zool. Ital.* 28:297-322, 1940.
18. Pisanó A.: Efficienza funzionale e strut-tura dell'ipofisi di Anfibia mantenuta in medio oleoso. *Arch. Zool. Ital.* 42:221-227, 1957.
19. Del Conte E., Sirlin J.: Pattern series of the first embryony stages in *Bufo are-narum*. *Anat. Rec.* 112:125-136, 1952.
20. Martin MC., de Núñez AM., Tomatis ME.: Metamorfosis en Anfibia: I. Desa-rollo metamórfico en larvas de *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia: Anura). *Historia Natural* 5 (32):1-19, 1985.
21. Knowland J.: Amphibian morphogene-sis. Fox H. Ed. Humana Press-Clifton New Jersey, 1978, 214.

## SUMMARY:

"The larval gonad of *Bufo arenarum* exposed to thyroid hormone"

In order to analyze the effect of thyroid hormone on the *Bufo arenarum*'s gonad, that is a "undifferentiated race", the embryos were exposed to tri-iodo-thyronine.

The results suggest that in this spe-cies, gonadal differentiation would be related to thyroid hormone. Moreover, we can observe that the number of oocytes are increased and that they are more ripe than in the control gonads.

Key words: *Bufo arenarum* - Larval gonad - Thyroid hormone.

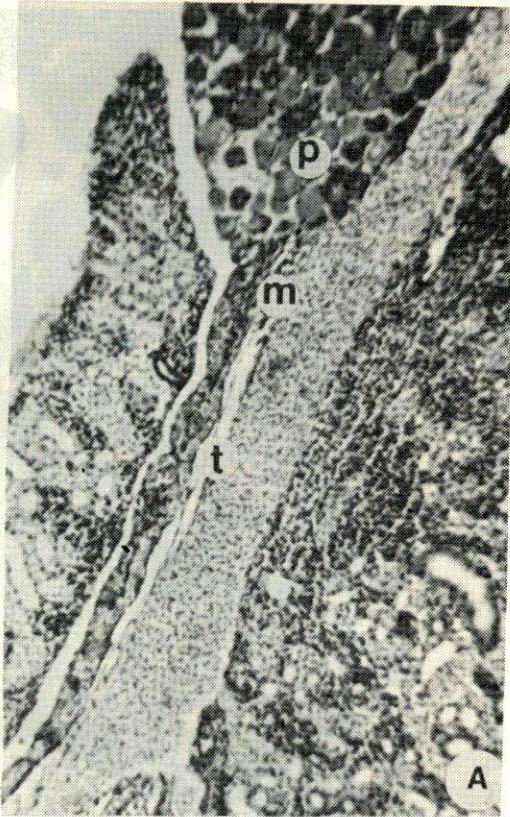
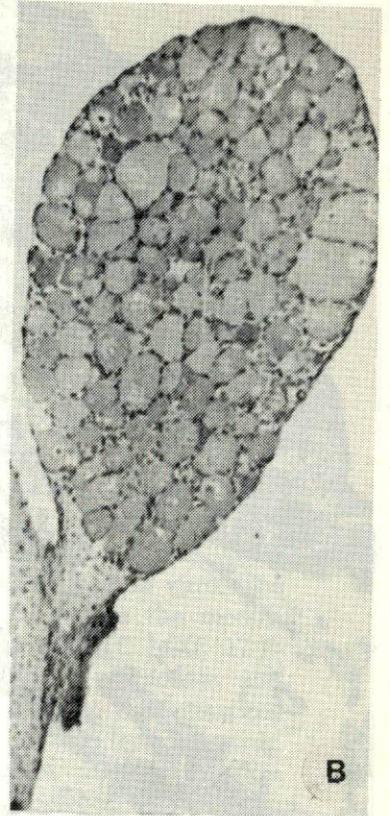
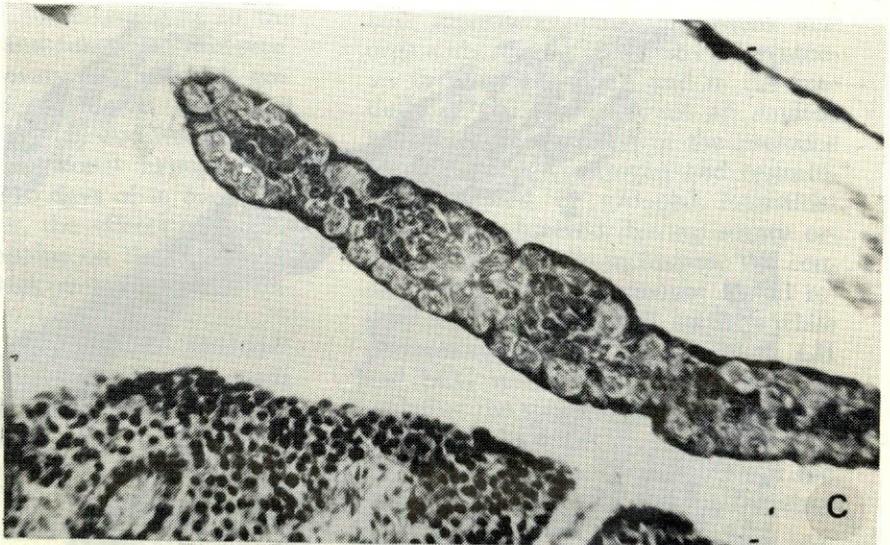


Figura 1:

A: 42 días de vida larval, control: pro (p), meso (m) y metagónada (t). 320X.



B: 42 días de tratamiento: dosis de 15 ug/l de hormona; progónadas con ovocitos en crecimiento. 320X.



C: 42 días de tratamiento: dosis de 4 ug/l de hormona; metagónadas con ovogonios periféricos. 400X.

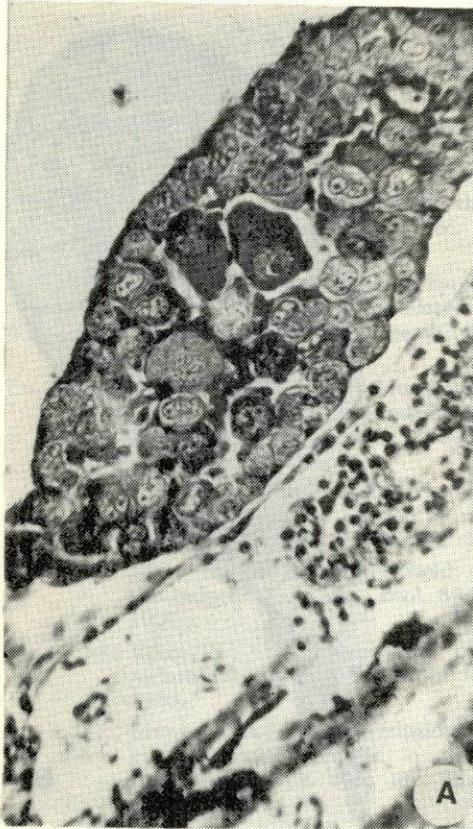
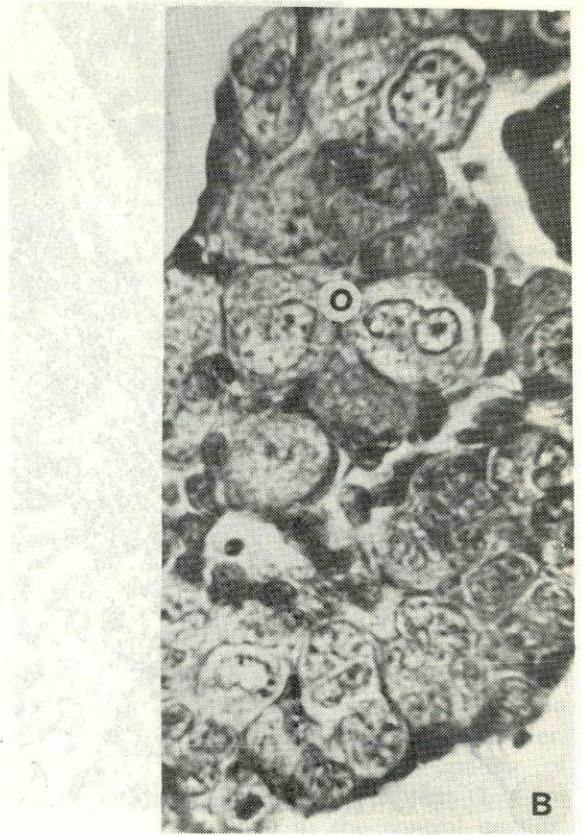
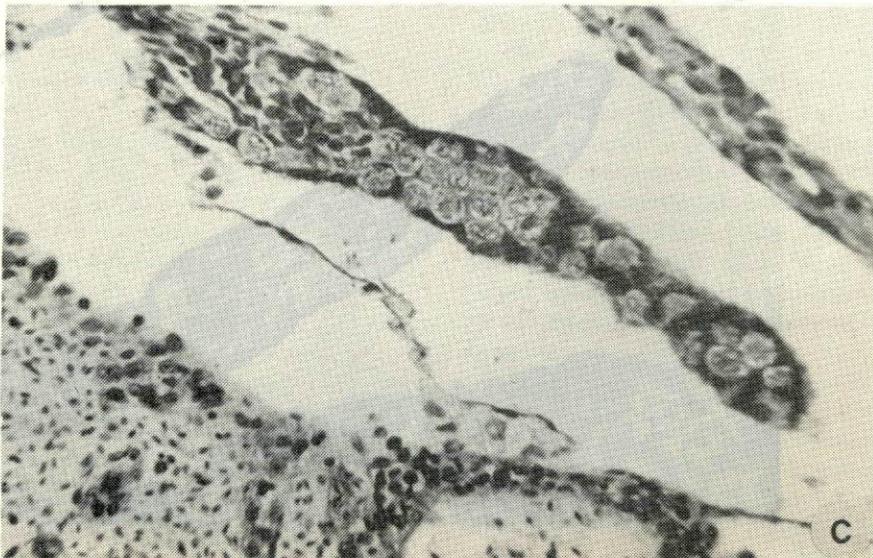


Figura 2:  
 A: 62 días de tratamiento con 15 ug/1 de hormona; progónada con ovocitos que demuestran distinta afinidad tinctorial y diferente grado de crecimiento. 400X.



B: Particular: nótese el ovocito binucleado (o). 800X.



C: 62 días de tratamiento con 15 ug/1 metagónada con ovogonios y al gún ovocito. 400X.