

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Posibles causas de anomalías de desarrollo en renacuajos nacidos en la Iniciativa de Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos” de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Monografía previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

Jhoselyn Nicole Guairacaja Tituaña

Quito, 2023

Certifico que la monografía de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Jhoselyn Nicole Guairacaja Tituaña ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Dr. Andrés Ricardo Merino-Viteri

Director de la monografía

Quito, 30 de junio de 2023

DEDICATORIA

Se lo dedico a Dios.

Y se lo dedico a mi madre querida que estuvo siempre para mí con sus consejos, sus escarmientos y su apoyo. A mi padre que todos los días trabaja duro para que nunca nos falte nada.

A toda mi familia porque son lo más importante para mí y sé que están orgullosos de su bicha.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios que siempre iluminó mi camino y me brindó sabiduría.

También agradezco a mi madre Paulina Tituaña Iza y a mi padre Carlos Guairacaja Delgado por su amor incondicional, su infinita paciencia y por el esfuerzo que hacen día a día para que salga adelante y pueda cumplir mis metas. A mi hermano Matias Guairacaja Tituaña que estuvo en momentos difíciles con un abrazo reconfortante y algunas palabras de aliento.

A mis abuelos que amo con todo mi corazón, a mis padrinos, tíos, tías, primos, primas que han sido un gran apoyo en todo este trayecto de mi vida.

A Kennet Soria Bolaños por alentarme y ser un apoyo incondicional.

Agradezco a cada persona que se cruzó en mi vida ya que han sido parte de lo que soy ahora.

De igual manera agradezco a Freddy Almeida por permitirme realizar mis prácticas en la Iniciativa de Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos” y hacer que ame y me interesen aún más los anfibios.

Al Dr. Andrés Ricardo Merino-Viteri, Dr. Andrés Marco Romero-Carvajal y M. Sc. María Alejandra Camacho Monge por su tiempo.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN _____	1
2.	ABSTRACT _____	2
3.	INTRODUCCIÓN _____	3
4.	OBJETIVOS _____	5
4.1.	OBJETIVO GENERAL _____	5
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	5
5.	DESARROLLO _____	6
5.1.	Metamorfosis en anuros _____	6
5.2.	Generalidades de la glándula tiroides _____	7
5.3.	Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas _____	8
5.4.	Morfología de la glándula tiroides _____	9
6.	METODOLOGÍA _____	10
6.1.	Monitoreo de los renacuajos _____	10
6.2.	Disección y medición _____	11
6.3.	Extirpación de la glándula tiroides _____	12
6.4.	Histología del tejido tiroideo _____	12
6.5.	Compuestos activos de la tiroides _____	12
6.6.	Cuantificación de hormonas tiroideas _____	12
6.6.1.	Preparación de muestras _____	12
6.6.2.	Kits de inmunoensayo _____	13
6.7.	Genes asociados a hormonas tiroideas _____	13
7.	DISCUSIÓN _____	14
8.	CONCLUSIONES _____	16
9.	REFERENCIAS _____	17

1. RESUMEN

En este trabajo, se quiere dar a conocer cuáles son las hormonas responsables de los cambios morfológicos y fisiológicos que sufren los anuros para pasar de vivir en un ambiente acuático a un ambiente terrestre. Durante el desarrollo de las ranas la TSH (hormona estimulante de la tiroides) estimula la glándula tiroides para producir T4 y T3, las cuales regulan el desarrollo de tejidos y órganos para que haya la transición de renacuajo a rana adulta. Se han evidenciado varios casos en donde los anuros no realizan metamorfosis y terminan su ciclo de vida como renacuajos, para demostrar que el problema se debe a un mal funcionamiento de la glándula tiroides, se han empleado técnicas como extirpación de la glándula tiroides para realizar tinción del tejido, cuantificación de hormonas tiroideas y tecnología de microarrays para identificar los genes asociados a hormonas tiroideas. Dentro de la Iniciativa de Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos” de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador se han registrado que dentro de las poblaciones *ex situ* de la especie *Hyloxalus nexipus* algunos especímenes no han metamorfoseado en los tiempos normales registrados para su especie. Por lo que se propone realizar tinción en los tejidos de los especímenes que ya están preservados en alcohol o formol y el uso de kits de inmunoensayo para poder realizar la cuantificación de hormonas tiroideas en los especímenes que aún siguen con vida mediante.

Palabras clave: metamorfosis, malfuncionamiento de tiroides, hormonas, *Hyloxalus nexipus*, *ex situ*

2. ABSTRACT

In this work, we want to show which hormones are responsible for the morphological and physiological changes that anurans undergo when moving from an aquatic to a terrestrial environment. During frog development, TSH (thyroid stimulating hormone) stimulates the thyroid gland to produce T4 and T3, which regulate the development of tissues and organs to make the transition from tadpole to adult frog. To demonstrate that the problem is due to a malfunctioning thyroid gland, techniques such as thyroid gland removal for tissue staining, thyroid hormone quantification and microarray technology to identify genes associated with thyroid hormones have been used. Within the Iniciativa de Conservación de Anfibios "Balsa de los Sapos" of the Pontificia Universidad Católica del Ecuador, it has been recorded that in the *ex situ* populations of the species *Hyloxalus nexipus* some specimens have not metamorphosed on normal timeframes recorded for the species. It is therefore proposed to stain the tissues of specimens already preserved in alcohol or formalin and the use of immunoassay kits for thyroid hormones quantification on specimens that are still alive.

Keywords: metamorphosis, thyroid malfunction, hormones, *Hyloxalus nexipus*, *ex situ*

3. INTRODUCCIÓN

La clase Amphibia abarca tres órdenes los cuales presentan cambios metamórficos en su ciclo de vida; Gymnophiona (cecilias) y Caudata (salamandras) durante su ciclo de vida no cambian tanto su morfología de larvas a adultos (Cruz,2017). Sin embargo, en Anura (ranas) los cambios son más drásticos por distintas variaciones como el tipo de hábitat (de agua a tierra), locomoción (absorción de la cola y desarrollo de extremidades), alimentación (dejan de ser herbívoros), cavidad oral (desaparece y se alarga la mandíbula), branquias (son reabsorbidas), desarrollo de pulmones, incremento en el tamaño corporal (Miranda, 1995; Cruz, 2017; Zambrano, 2023).

El desarrollo de los anuros puede ser de manera directa (sin etapa larval) y de manera indirecta (con etapa larval). La metamorfosis es parte del desarrollo indirecto y empieza en un medio ambiente acuático, en este periodo las larvas pasan por una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y comportamentales para que logren adaptarse en la vida terrestre (Miranda, 1995; Cruz, 2017).

La metamorfosis consta de tres etapas llamadas premetamorfosis, prometamorfosis y clímax metamórfico, las cuales están asociadas a hormonas secretadas por la glándula tiroides como es la triyodotironina T3 y tiroxina T4 (Cruz, 2017). Durante el proceso de metamorfosis hay un incremento del retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi en las células foliculares pertenecientes a la glándula tiroides, lo cual está relacionado a la producción de las hormonas tiroideas (Miranda, 1995). Las hormonas tiroideas son fundamentales para que los anuros completen su ciclo de vida, ya que son las responsables de la diferenciación de órganos y de distintas células; los órganos de un renacuajo no le serían de gran ayuda a una rana adulta (Brown y Cai, 2007). Esta relación entre hormonas tiroideas y metamorfosis se debe investigar más a fondo ya que ha sido estudiada ampliamente solo en especies modelo, pero al existir una gran diversidad de anuros los patrones de desarrollo y patrones fisiológicos difieren (Cruz, 2017).

En estudios realizados en especies como *Rana pipiens* y *Xenopus laevis* se ha encontrado anomalías con respecto al proceso de metamorfosis como retrasos en el desarrollo, mal formaciones en la columna, crecimiento anormal del cuerpo y se ha comprobado que se debe a cuestiones con respecto a la glándula tiroides y las hormonas T3 y T4 (Allen, 1918; Rot-Nikcevic y Wassersug, 2004). En un reciente estudio se describe el leucismo en renacuajos de la especie *Ceratophrys*

stolzmanni y también que estos renacuajos no lograron completar su metamorfosis y proponen estudios de la glándula tiroides para lograr entender dicho suceso (Almeida-Reinoso et al., 2023). Dichas anomalías se han presentado en algunos renacuajos de la especie *Hyloxalus nexipus* que se encuentran en la Iniciativa de Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos” en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

La presente investigación bibliográfica buscará determinar las posibles causas que podrían llevar a larvas de anuro a presentar retrasos en su desarrollo, enumerar los distintos tipos de técnicas probadas para estudiar a estas posibles causas y recomendar una metodología que mejor se ajuste al caso de los renacuajos anómalos de la “Balsa de los Sapos”.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Reconocer las posibles causas de problemas de retraso o ausencia de la metamorfosis en anuros.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar sobre diferentes causas que puedan causar retraso en el proceso de metamorfosis en anuros.

Determinar las metodologías para explicar las posibles causas de anomalías en el desarrollo larval en anuros.

Proponer un estudio para entender las posibles causas de los retrasos en el desarrollo de renacuajos nacidos en las instalaciones de la Iniciativa de Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos”.

5. DESARROLLO

5.1. Metamorfosis en anuros

El desarrollo de los anuros está asociado completamente a la glándula tiroides y también está involucrada de manera indirecta la parte distal de la hipófisis que produce la TSH (hormona estimulante de la tiroides); si hubiese alguna alteración o mal funcionamiento tanto a nivel de glándula tiroides o la parte distal de la hipófisis se vería afectado el desarrollo del anfibio en su proceso de metamorfosis (Fabrezi y Cruz, 2014). Las hormonas involucradas en la metamorfosis son las tiroideas, prolactina y corticoides suprarrenales de las cuales el hipotálamo tiene control con respecto a la secreción de dichas hormonas (Kikuyama et al., 2021).

Durante la metamorfosis el cambio de tipo de ambiente de acuático a terrestre especialmente en el desarrollo de los anuros comprende cambios de cierta manera extremos como desarrollo de extremidades, pérdida de branquias y cola, reestructuración del cartílago craneal, intestino y dermis (Buchholz, 2017). La metamorfosis consta de tres etapas que son: la premetamorfosis que es a la cual los renacuajos logran desarrollarse, aunque haya ausencia de la glándula tiroides; la prometamorfosis en donde empieza el crecimiento de extremidades posteriores y reabsorción de la cola incentivada por las hormonas y por último está el clímax metamórfico donde ocurren varios cambios a nivel morfológico y fisiológico los cuales están estrechamente relacionados con un alto nivel de hormonas secretadas por la glándula tiroides. Factores ambientales como temperatura, accesibilidad a alimento, nivel de agua, número de renacuajos repercuten en la funcionalidad del hipotálamo, síntesis de hormonas y respuesta de los tejidos a dichos factores (Cruz, 2017; Kikuyama et al., 2021).

Una particularidad interesante de la metamorfosis de anfibios es que todo este tipo de cambios moleculares, bioquímicos y morfológicos son activados por un limitado grupo de células llamadas células epiteliales tiroideas. Conforme al tipo de tejido la susceptibilidad a las hormonas tiroideas difiere y activan un mecanismo de respuesta diferente como propagación celular, apoptosis, diferenciación y migración celular (Denver et al., 2002). Las hormonas tiroideas se encargan de la diferenciación de hueso, cartílago y desarrollo muscular en las extremidades, la escasez de dichas hormonas provocará una interrupción en el desarrollo de los brotes de extremidades y no se logrará la diferenciación de tejidos. Los órganos de las ranas adultas surgen de órganos preexistente que cumplían funciones similares como el cambio de epidermis, esto ocurre durante el clímax metamórfico como es la transición de proteínas larvarias a proteínas postmetamórficas en el hígado

y también la síntesis de úrea la cual es un proceso de regulación positiva ejecutada por las hormonas tiroideas. En el intestino delgado ocurre apoptosis a nivel de las células epiteliales para dar lugar al epitelio maduro además de las hormonas tiroideas también actúan hormonas como insulina y cortisol. Otro proceso en donde ocurre muerte celular es en las capas celulares de la epidermis larvaria la cual cambia a una epidermis de rana germinativa. La gran diferencia entre ambas epidermis es que cuando son renacuajos todas las células se replican y en las ranas solo las células basales cumplen dicha función (Schreiber y Brown, 2003; Brown et al., 2005; Gancedo, 2019).

En la regulación de la metamorfosis se da la transcripción genética la cual activa o desactiva genes que provocan un conjunto de cambios en células específicas, los cuales dependen de receptores de la hormona tiroidea. Además, durante la diferenciación morfológica y bioquímica se da la reprogramación genética en donde las hormonas tiroideas activan varios genes sobre los tejidos del renacuajo (Tata, 2006; Vieira, 2018).

5.2. Generalidades de la glándula tiroides

La glándula tiroides se encuentra en todos los vertebrados y se ha evidenciado que es la culpable de los cambios morfológicos durante todo el desarrollo. Sin embargo, las reservas de las hormonas tiroideas son distintas en cada especie. En los mamíferos la glándula tiroides está agrupada en una sola pieza, mientras que las aves y anfibios poseen dos lóbulos fáciles de distinguir en ambos lados de la tráquea (Cruz, 2017). La glándula tiroides ya está presente en los embriones de anfibios, sin embargo, su funcionalidad empieza durante la eclosión de los mismo. Se ha evidenciado que el pico de actividad de las hormonas tiroideas es mayor durante la prometamorfosis y durante el clímax metamórfico llega a su punto máximo, el cual se mantiene así hasta en las ranas que ya son adultas (Denver et al., 2002).

Hay una gran diversidad en cuanto a la actuación de las hormonas tiroideas en la fisiología de los distintos vertebrados debido a que pueden regular el desarrollo tanto desde que son embriones o adultos; un caso interesante son los anfibios ya que dependen de las hormonas tiroideas para poder iniciar la metamorfosis (Tata, 2006). La tiroxina (T4) es la hormona primordial secretada por la glándula tiroides en vertebrados, dicha hormona se desyoda mediante enzimas deiodinasas para producir la triyodotironina (T3) (Hersikorn y Smits, 2011). En estudios realizados con renacuajos expuestos a T3 se descubrió que los renacuajos tienen la capacidad de absorber y acumular gran

cantidad de esta hormona que circula en el medio que vive y va regulándola a lo largo de la metamorfosis (Denver et al., 2002).

Mediante señales que recibe el eje neuroendocrino que es parte del hipotálamo-hipófisis-tiroides se dan los cambios a nivel molecular, bioquímico y morfológico en la metamorfosis (Cruz, 2017). Existe una gran diferencia entre los mamíferos y anfibios con respecto al eje hipotálamo-hipófisis-tiroides ya que el control de la TSH (hormona estimulante de la tiroides); en anfibios es dada por el factor liberador de la corticosterona hipotalámico (CRF) y en los mamíferos es por la hormona liberadora de tirotrópina hipotalámica (TRH). Además, hormonas glucocorticoides como el cortisol y corticosterona también son activadas por el CRF las cuales también facilitan la metamorfosis (Coady et al., 2010).

El hipotálamo actúa en respuesta a los factores ambientales que se presenten, lo cual hace que hace que se emitan señales y una de estas sea captada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El cual actuara en respuesta definiendo el tiempo de duración y velocidad del desarrollo durante la metamorfosis. Además, se sabe que el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides junto a un eje hormonal de estrés interpretan estas señales mediante los corticosteroides (Cruz, 2017).

5.3. Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas

Para que la glándula tiroides secrete hormonas, activa una vía compleja de síntesis que involucra a las tiroglobulinas y yodotironinas. Comienza con la captación y almacenamiento de yoduro a partir de su alimentación y del agua en la que viven, los anfibios logran esto con el tracto gastrointestinal o las branquias. En presencia de receptores de electrones el yoduro se oxida a yodo activo, acumulándose cerca del lumen folicular debido a las peroxidasas tiroideas, estas activan también la síntesis de tiroglobulinas. La cual empieza en el retículo endoplasmático rugoso de las células foliculares y son envasadas por el Aparato de Golgi para que se pueda unir al yodo activo, dando lugar a MIT (3-monoyodotirosina) y DIT (3,5-diyodotirosina); un MIT y un DIT forman la T3 y dos DIT forman la T4. La hormona estimulante de la tiroides realiza hidrólisis para poder secretar las hormonas tiroideas al torrente circulatorio (Cruz, 2017; Gancedo, 2019).

5.4. Morfología de la glándula tiroides

La glándula tiroides en renacuajos está de manera ventral en la región de la boca, cada lóbulo posee folículos macroscópicos y van creciendo constantemente en la etapa de premetamorfosis. En los músculos que constituyen al aparato hiobranquial se localizan los lóbulos de manera interna al músculo genihiodeo y dorsal al músculo subarcualis oblicuo. Durante la etapa de prometamorfosis tiene un pronunciamiento más notorio. Sin embargo, en el clímax metamórfico debido a los cambios del aparato hiobranquial la glándula tiroides se vuelve complicada de visualizar (Cruz, 2017).

En los anfibios ya sean adultos o renacuajos se logra observar microscópicamente la forma de la tiroides, esto se debe a que la tiroides es más fácil de detectar a diferencia de otros vertebrados. Es característico ya que está conformada de abundantes folículos con forma ovoide siendo la unidad funcional de la glándula tiroides, la cual está rodeada por el epitelio monoestratificado de células foliculares que dan paso al lumen donde se almacena el coloide (fluido viscoso) (Gancedo, 2019). Para la observación de la glándula tiroides hay que tomar en cuenta que cambia mientras transcurre la metamorfosis debido a que se adapta a la fisiología del anfibio mientras se desarrolla además hay que tomar en cuenta algunas alteraciones que suele presentar la glándula tiroides como atrofia (disminución), hipertrofia (aumento), hipertrofia de células foliculares e hiperplasia de células foliculares (Grim et al., 2009).

6. METODOLOGÍA

Unos de los objetivos de este trabajo de titulación es proponer un estudio para entender las posibles causas de los retrasos en el desarrollo de renacuajos nacidos en las instalaciones de la Iniciativa de Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos”. Por lo cual se puede emplear varias técnicas para lograr dicho objetivo como:

6.1. Monitoreo de los renacuajos

Con la ayuda de la base de datos de la “Balsa de los Sapos” se ha recopilado la información del número de puestas, número de huevos, número de renacuajos que han metamorfoseado dentro del límite de tiempo normal y número de renacuajos que no metamorfosearon de la especie *Hyloxalus nexipus*.

Tabla 1. Datos del periodo de metamorfosis normal de renacuajos de la especie *Hyloxalus nexipus* criados en la Iniciativa De Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos”

Fecha de recolección de puesta	Número de huevos	Renacuajos nacidos	Fecha del primer individuo en metamorfosis registrado	Fecha del ultimo individuo en metamorfosis	Rango de días para llegar a la metamorfosis
29/01/20	9	8	22/02/20	01/03/20	24 - 32
23/07/21	13	9	06/09/21	16/09/21	45 - 55
28/12/21	12	9	07/02/22	16/02/22	41 - 78
26/01/22	14	11	24/02/22	04/03/22	29 - 37

Tabla 2. Datos de renacuajos no metamorfoseados preservados en la Iniciativa De Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos”

Nº	Fecha de traslado a acuario	Fecha de muerte	Tiempo como larva	Preservado en
1	27/09/21	20/05/22	235 días	Alcohol
2	27/09/21	20/05/22	235 días	Alcohol
3	27/09/21	01/06/22	247 días	Formol
4	27/09/21	01/06/22	247 días	Formol
5	29/11/21	19/12/22	385 días	Formol

Los renacuajos que no metamorfosearon y murieron están preservados en alcohol y en formol.

Actualmente hay tres especímenes con vida de la especie *Hyloxalus nexipus* que no han metamorfoseado. Su fecha de traslado a acuario fue el 07/11/22, lo cual quiere decir que han permanecido como renacuajos 229 días.

6.2. Disección y medición

Hay que tomar en cuenta que tener las medidas de cada parte del espécimen es fundamental para poder hacer una comparación y ver que tanto difieren especímenes normales y especímenes con anomalías. En primer lugar, se deberá tomar medidas con la ayuda de un calibrador digital de la longitud de todo el cuerpo, ancho y largo de la cabeza y largo de la cola. Después se podría realizar una disección realizando un corte transversal en la garganta y cloaca para que queden expuestas las vísceras, se puede extirpar todos los órganos para medirlos (Rot-Nikcevic y Wassersug, 2004).

6.3. Extirpación de la glándula tiroides

Se podría extirpar la glándula tiroides para poder observar detenidamente el tejido y saber si existe algún tipo de atrofia. Para esto se debe ubicar realizar un corte longitudinal al renacuajo en posición ventral, al nivel de la boca estará el músculo intermandibular e interhioideo los cuales se deben extirpar y se observara el aparato branquial en donde se encuentran adheridos los lóbulos de la glándula tiroides. Se puede realizar este procedimiento en cualquier estadio de los anuros (Cruz, 2017).

6.4. Histología del tejido tiroideo

La histomorfología de la glándula tiroides cambia durante la metamorfosis, para evaluar el estado del tejido tiroideo se puede realizar una tinción con hematoxilina y eosina, la cual se puede realizar en distintas etapas del desarrollo del renacuajo (Grim et al., 2009). La hematoxilina no es un colorante, para poder ser usada como tal debe oxidarse a hemateína y junto con iones de aluminio se forma hemalumbre. El cual es un colorante básico que tiñe de un azul o morado a los ácidos nucleicos que están en los núcleos celulares. Con respecto a la eosina, es un colorante ácido el cual tiñe de rosado a las estructuras proteicas básicas del citoplasma y matriz celular (Santos, 2017).

6.5. Compuestos activos de la tiroides

Para comprender la importancia de las hormonas tiroideas en el proceso de metamorfosis en anuros, se pueden realizar experimentos con productos químicos como metimazol el cual inhibe la peroxidasa tiroidea (enzima que sintetiza las hormonas tiroideas). Se ha evidenciado que al exponer renacuajos a este compuesto impide el desarrollo. Otro compuesto es la L-tiroxina (T4) que al desyodarse se vuelve T3 y se ha visto que los renacuajos al estar expuestos a esto se desarrollan más rápido que lo habitual (Coady et al., 2010).

6.6. Cuantificación de hormonas tiroideas

6.6.1. preparación de muestras

Para poder realizar la cuantificación de hormonas tiroideas se necesita tener a los renacuajos enteros, no se debe realizar ninguna extirpación de órganos, se los congela en nitrógeno líquido y se debe realizar la medición del largo del cuerpo y peso corporal. Se procederá a cortar en pedazos pequeños para ponerlos en un tubo de cultivo junto con un tampón de homogeneización, esta muestra

se debe agitar en vórtex, almacenarlo en hielo, centrifugarlo y guardarlo a -80 °C hasta su uso (Hersikorn y Smits, 2011).

6.6.2. kits de inmunoensayo

Para la cuantificación de hormonas tiroideas se usa la muestra anteriormente obtenida en kits de inmunoensayo enzimático competitivo, específicos para triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) o kits de inmunoensayo electroquimioluminiscente enlazado a enzimas (Hersikorn y Smits, 2011; Boccionia et al., 2022).

6.7. Genes asociados a hormonas tiroideas

Para poder observar los genes asociados a los distintos procesos del desarrollo de los anuros, se puede realizar un análisis de microarrays. En donde se necesitará muestras de ARN de un tejido específico del renacuajo que al procesarlos se mostrará el perfil molecular de los genes expresados. Para un mejor entendimiento de la expresión de genes se puede realizar esta técnica con distintas muestras en diferentes periodos del desarrollo de los renacuajos (Buchholz et al., 2007).

7. DISCUSIÓN

Dentro de las instalaciones de la Iniciativa de Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos” se ha registrado que algunos renacuajos de la especie *Hyloxalus nexipus* no han metamorfoseado durante un largo periodo de tiempo. En la base de datos de la “Balsa de los Sapos” los renacuajos de dicha especie metamorfosean hasta ranas juveniles en un periodo de tiempo de máximo 78 días, sin embargo, algunos especímenes han permanecido como renacuajos durante más de 300 días. Conforme a la investigación con respecto a posibles causas del retraso en la metamorfosis de los anuros, se ha evidenciado que la extirpación de la glándula tiroides en renacuajos provoca un crecimiento anormal y no realizan la metamorfosis (Allen, 1918). Por lo cual se puede atribuir que las anomalías que se han presentado están ligadas a un mal funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

Además, otras características que se han observado en los renacuajos sin metamorfosear de *Hyloxalus nexipus* es que muestran un color blanquecino en su piel a diferencia del color marrón oscuro que se ve en un renacuajo normal, esto puede ser un caso de plasticidad. Esto ya que en renacuajos de *Dendropsophus carnifex* se observó que el color de la piel era diferente, dependiendo del estanque donde se los encontró. Sin embargo, lo que definió que era un caso de plasticidad y no una variación genética fue que al cambiar a los renacuajos ambiente cambiaron de color lo que les favorecía a características como camuflaje (Pintanel et al., 2019).

Conforme a los síntomas visibles que presentan estos renacuajos de *Hyloxalus nexipus* criados *ex situ*, se puede hacer una propuesta de investigación donde se podría aplicar las técnicas mencionadas en la sección METODOLOGÍA de este documento. Ya que al tener varios especímenes preservados en alcohol y formol se puede diseccionar la glándula tiroides para realizar tinción histológica y observar si existe algún tipo de atrofia o hipertrofia ya sea en la glándula o en las células foliculares. Con respecto a los renacuajos que siguen con vida se puede sacrificarlos para hacer una cuantificación de hormonas tiroideas y de ser posible se puede usar la técnica de microarrays para obtener información de los genes implicados en la metamorfosis.

Además, del análisis de los especímenes existentes sin metamorfosear, sería interesante analizar a los renacuajos que si logran metamorfosear de la especie en cuestión y hacer la comparación

entre ambos, ya que las técnicas que se han propuesto pueden ser puestas en práctica en varias etapas del desarrollo de anuros.

En otros estudios realizados en *Xenopus laevis* y *Rana pipiens* también se mostró que los renacuajos que no metamorfosean logran desarrollar gónadas tanto en hembras se observó ovarios con huevos y en machos testículos con esperma (Allen, 1918; Rot-Nikcevic y Wassersug, 2004). Tomar en cuenta este acontecimiento se podría analizar más a fondo si los renacuajos que no metamorfosean de la especie *Hyloxalus nexipus* presentan diferenciación de gónadas al momento de realizar la disección del espécimen.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con lo expuesto, las hormonas que secreta la glándula tiroidea son fundamentales para el desarrollo de los vertebrados, especialmente se ha estudiado esta interacción en el proceso de metamorfosis de los anuros. Lo cual ha demostrado que las posibles causas del retraso en este proceso se deben a un defecto en el sistema de respuesta del hipotálamo-hipófisis-tiroides.

Gracias a los estudios que se han realizado con respecto al tema en cuestión, se ha podido recopilar técnicas viables y de bajo costo que se pueden emplear en futuros estudios con los especímenes preservados en las instalaciones de la Iniciativa de Conservación Anfibios “Balsa de los Sapos”.

De este modo, con toda la información recopilada acerca de las posibles causas de retraso en la metamorfosis en anuros, se podrá establecer una propuesta de investigación enfocada al estudio de la glándula tiroides de los renacuajos nacidos en las instalaciones de la Iniciativa de Conservación de Anfibios “Balsa de los Sapos”, que no han metamorfoseado.

9. REFERENCIAS

- Allen, B. M. (1918). The results of thyroid removal in the larvae of *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Zoology*, 24(3), 499-519.
- Almeida-Reinoso, D. P., Almeida-Reinoso, F., y Merino-Viteri, A. (2023). Report of leucism in tadpoles of *Ceratophrys stolzmanni* (Amphibia, Anura, Ceratophryidae) in laboratory. *Neotropical Biodiversity*, 9(1), 76-81.
- Boccionia, A. P. C., Lener, A., Peluso, J., Peltzer, P. M., Attademoa, A. M., Aronzón, C., y Lajmanovich, R. C. (2022). Evaluación comparativa de la toxicidad crónica individual y mixta del glifosato y el glufosinato de amonio en renacuajos de anfibios: un enfoque de múltiples biomarcadores. *Chemosphere*, 309 (1), 136554.
- Brown, D. D., y Cai, L. (2007). Amphibian metamorphosis. *Developmental biology*, 306(1), 20-33.
- Brown, D. D., Cai, L., Das, B., Marsh-Armstrong, N., Schreiber, A. M., y Juste, R. (2005). Thyroid hormone controls multiple independent programs required for limb development in *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(35), 12455-12458.
- Buchholz, D. R., Heimeier, R. A., Das, B., Washington, T., y Shi, Y. B. (2007). Pairing morphology with gene expression in thyroid hormone-induced intestinal remodeling and identification of a core set of TH-induced genes across tadpole tissues. *Developmental biology*, 303(2), 576-590.
- Buchholz, D. R. (2017). *Xenopus* metamorphosis as a model to study thyroid hormone receptor function during vertebrate developmental transitions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 459, 64-70.
- Coady, K., Marino, T., Thomas, J., Currie, R., Hancock, G., Crofoot, J., y Klecka, G. (2010). Evaluation of the amphibian metamorphosis assay: exposure to the goitrogen methimazole and the endogenous thyroid hormone L-thyroxine. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 29(4), 869-880.

- Cruz, J. C. (2017). Histomorfología de la glándula tiroides durante la ontogenia en *Pseudis paradoxa* (Anura, Hylidae) (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Denver, R. J., Glennemeier, K. A., y Boorse, G. C. (2002). Endocrinology of complex life cycles: amphibians. In *Hormones, brain and behavior* (pp. 469-XI). Academic Press.
- Fabrezi, M. y Cruz, J. C. (2014). Ontogenia de las glándulas tiroides durante el desarrollo larval de las ranas cornudas sudamericanas (Anura, Ceratophryidae). *Biología evolutiva* doi: 10.1007/s11692-014-9292-5.
- Gancedo Sancho, B. (2019). Actividad tiroidea en larvas y adultos de "*Rana perezi*": regulación por factores endógenos y ambientales (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Grim, K. C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., y Tietge, J. (2009). Thyroid histopathology assessments for the amphibian metamorphosis assay to detect thyroid-active substances. *Toxicologic pathology*, 37(4), 415-424.
- Hersikorn, B. D., y Smits, J. E. (2011). Compromised metamorphosis and thyroid hormone changes in wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) raised on reclaimed wetlands on the Athabasca oil sands. *Environmental Pollution*, 159(2), 596-601.
- Kikuyama, S., Hasunuma, I., y Okada, R. (2021). Development of the hypothalamo–hypophyseal system in amphibians with special reference to metamorphosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 524, 111143.
- Miranda, L. A. (1995). Desarrollo y evolución de la Pars Distalis Hipofisaria y de las glándulas tiroides durante la metamorfosis de *Bufo arenarum* (Disertación Doctoral). Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Pintanel, P., Salinas-Ivanenko, S., Gutiérrez-Pesquera, L. M., Almeida-Reinoso, F., Merino-Viteri, A., y Tejedo, M. (2019). Extreme colour variation in the larvae of the executioner clownfrog, *Dendropsophus carnifex* (Anura: Hylidae), living in nearby ponds of different light exposure and duration. *Austral Ecology*, 44(7), 1298-1301.

- Rot-Nikcevic, I., y Wassersug, R. J. (2004). Arrested development in *Xenopus laevis* tadpoles: how size constrains metamorphosis. *Journal of Experimental Biology*, 207(12), 2133-2145.
- Santos Vidal, S. (2017). Tinción Hematoxilina-Eosina (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Educación a Distancia, España.
- Schreiber, A. M., y Brown, D. D. (2003). Tadpole skin dies autonomously in response to thyroid hormone at metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1769-1774.
- Tata, J. R. (2006). Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Molecular and cellular endocrinology*, 246(1-2), 10-20.
- Vieira, V. A. R. O. (2018). Regulação gênica dos receptores dos hormônios tireoideanos durante a metamorfose de anfíbios anuros. *Revista Da Biologia*, 4(1), 16-21. <https://doi.org/10.11606/issn.1984-5154.v4p16-21>
- Zambrano Gómez, E. A. (2023). Desarrollo normal en *Epipedobates anthonyi* e *Hyloxalus nexipus* (Dendrobatidae) en base al desarrollo condrocralear (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.