

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CRECIMIENTO DE OOCITOS BIDERIANOS EN MACHOS ADULTOS DE *Rhinella*
marina MEDIANTE EL USO DE HORMONAS Y DISRUPTORES ENDOCRINOS**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en
Ciencias Biológicas**

DIANA CAROLINA VARGAS HURTADO

QUITO, 2011

Certifico que la disertación de Licenciatura de Ciencias Biológicas de la Srta. Diana Carolina Vargas Hurtado ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Oscar Pérez Vaca

Director de la Disertación

Quito, 26 de Abril del 2011.

A mis padres por su gran apoyo y esfuerzo....

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial al Dr. Oscar Pérez Vaca, cuyo apoyo, dirección, participación y amistad fueron fundamentales durante la realización de la presente investigación. De igual manera, quisiera agradecer de manera muy especial a la Dra. María Eugenia Del Pino, al Ing. Julio Sánchez Otero y al Dr. Brad Wilson por el valioso aporte brindado al presente trabajo.

Mi eterno agradecimiento a mis padres, Jacqueline Hurtado y Alexei Vargas y mi hermana Andrea Vargas que me han apoyado incondicionalmente en este y todos los proyectos emprendidos durante el transcurso de mi vida. A mi familia, principalmente a mis abuelos Alba de Vargas, Napoleón Estupiñán, Martha Santacruz y René Hurtado y mis tíos Xavier Hurtado, Rommel Hurtado y Eduardo Carrión por su enorme contribución durante la carrera.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología del Desarrollo, Belén Proaño, Kathya Bustamante, Lucía Dután, Pablo Mancheno, David Ortega y Joselyn Prado por su importante contribución y ayuda en la ejecución del presente trabajo y por su invaluable amistad. Al Sr. Luis Eduardo López por su enorme participación dentro de la recolección de los animales en el campo.

A mis amigos y allegados, especialmente Diana Cañar y Diana Peñaherrera, por estar presentes en los buenos y malos momentos y finalmente un agradecimiento muy especial a Daniel Cisneros parte fundamental de mi vida y de quien recibí apoyo, ánimo y cariño durante el proceso de elaboración de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1.	INDIVIDUOS ESTUDIADOS	13
4.2.	MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO.....	13
4.2.1.	TERRARIOS.....	14
4.2.2.	LIMPIEZA	14
4.2.3.	ALIMENTACIÓN	15
4.3.	DESCRIPCIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS.....	15
4.3.1.	ANESTÉSICO MS-222: TRICAINÉ METHANESULPHONATE (Wright y Whitaker, 2001).....	15
4.3.2.	SOLUCIÓN DE RINGER PARA ANFIBIOS	15
4.3.3.	PROGESTERONA (Sigma-Aldrich product information sheet, 2011).....	16
4.3.4.	ATRAZINA	16
4.3.5.	SOLUCIÓN SALINA STEINBERG	16
4.3.6.	FIJATIVO SMITH'S	17
4.4.	ORQUIDECTOMÍA.....	17
4.4.1.	OPERACIÓN	17
4.4.2.	CUIDADO POST-OPERATORIO	18
4.5.	TRATAMIENTOS	19
4.5.1.	CONTROL	19
4.5.2.	PROGESTERONA	20
4.5.3.	ATRAZINA	20
4.5.4.	ATRAZINA Y PROGESTERONA.....	20

4.6. EXTRACCIÓN DE TEJIDOS.....	21
4.6.1. PREPARACION DEL TEJIDO PARA CORTES HISTOLÓGICOS	21
4.6.2. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA CORTES HISTOLÓGICOS.....	22
4.6.3. TINCIÓN PARA CORTES HISTOLÓGICOS	22
4.7. ANALISIS MORFOLÓGICO	23
4.8. ANALISIS ESTADÍSTICO	24
5. RESULTADOS	25
5.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL OVARIO DE <i>Rhinella marina</i>	25
5.2 DESCRIPCIÓN DE LA GÓNADA MASCULINA DE LOS MACHOS DE <i>Rhinella marina</i> PREVIO A LOS TRATAMIENTOS	25
5.2.1 TESTÍCULOS	25
5.2.2 ÓRGANO DE BIDDER.....	26
5.3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ORGANO DE BIDDER	26
5.3.1 CONTROL: ORQUIDECTOMÍA	28
5.3.2 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA	29
5.3.4 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE ATRAZINA Y PROGESTERONA	30
6. DISCUSIÓN.....	32
6.1 ÓRGANO DE BIDDER, OVARIO Y TESTÍCULOS DE <i>Rhinella marina</i>	32
6.2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ÓRGANO DE BIDDER	34
6.2.1 CONTROL: ORQUIDECTOMÍA	36
6.2.2 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA	37
6.2.3 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE ATRAZINA	41
6.2.4 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE ATRAZINA Y PROGESTERONA	45
7. CONCLUSIONES	46
8. LITERATURA CITADA.....	47
9. FIGURAS	56

10. TABLAS	78
11. ANEXOS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cortes histológicos del ovario de <i>Rhinella marina</i> hembra comparación	57
Figura 2. Zona de transición testículo-órgano de Bidder.	58
Figura 3. Testículo <i>Rhinella marina</i>	59
Figura 4. Cortes histológicos testículo <i>Rhinella marina</i> , testículo derecho animal # 1 tratamiento control: orquidectomía.....	60
Figura 5. Órgano de Bidder <i>Rhinella marina</i> previo a los tratamientos	61
Figura 6. Oocitos del órgano de Bidder previo a los tratamientos.....	62
Figura 7. Órganos de Bidder después de los tratamientos	63
Figura 8. Diagramas de caja del diámetro máximo de los oocitos de los órganos derecho e izquierdo de los machos orquidectomizados.	64
Figura 9. Oocitos tratamiento control: orquidectomía	65
Figura 10. Diagramas de caja del diámetro máximo de los oocitos de los órganos de Bidder por tratamiento	66
Figura 11. Órgano de Bidder izquierdo macho # 1 tratamiento control: orquidectomía	67
Figura 12. Oocitos tratamiento orquidectomía y administración de progesterona	68

Figura 13. Oocitos estadio IV órgano de Bidder derecho animal # 10 tratamiento orquidectomía y administración de progesterona	69
Figura 14. Oocitos estadio III y IV órganos de Bidder derecho e izquierdo animal # 11 tratamiento orquidectomía y administración de progesterona.....	70
Figura 15. Oocitos estadio II, III y VI órgano de Bidder derecho animal # 12 tratamiento orquidectomía y administración de progesterona.	71
Figura 16. Órgano de Bidder derecho e izquierdo animal # 8 después del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona	72
Figura 17. Oocitos tratamiento orquidectomía y administración de atrazina	73
Figura 18. Órgano de Bidder derecho e izquierdo animal # 3 tratamiento orquidectomía y administración de atrazina	74
Figura 19. Oocitos tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona.....	75
Figura 20. Órgano de Bidder derecho animal # 20 tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona	76
Figura 21. Órgano de Bidder izquierdo y derecho animal # 22 tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de los individuos colectados	81
Tabla 2. Medidas y pesos de los individuos antes y después de la operación.	82
Tabla 3. Medidas y peso de los testículos	83
Tabla 4. Diámetro máximo oocitos de los órganos de Bidder previo a los tratamientos.....	84
Tabla 5. Medidas del órgano de Bidder y los oocitos de los machos orquidectomizados después de los dos meses de tratamiento.	86

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Distribución de las frecuencias de los estadios de las células germinales en el órgano de Bidder.....	88
Anexo 2. Competencia en la copulación de machos control y machos expuestos a la atrazina.	88
Anexo 3. Porcentajes y número de especies en peligro de extinción por familia en anfibios.	89
Anexo 4. Terrarios en donde fueron colocados los individuos de cada tratamiento.....	90
Anexo 5. Tabla de la oogénesis de <i>Rhinella marina</i>	90

1. RESUMEN

En la región anterior de los testículos de los machos de la familia Bufonidae se localiza un ovario rudimentario, no funcional, llamado órgano de Bidder, el cual crece y se desarrolla en un ovario funcional si los testículos son removidos. En esta investigación se analizó el efecto de hormonas y disruptores endócrinos sobre el crecimiento de los oocitos del órgano de Bidder de machos adultos orquidectomizados de la especie *Rhinella marina*. Un total de 22 machos adultos fueron orquidectomizados y sometidos a dosis diarias de una solución salina, atrazina y progesterona durante un periodo de dos meses; el efecto de dichas sustancias sobre los 22 machos fue analizado mediante observaciones en su morfología interna y externa y mediciones del diámetro máximo de los oocitos biderianos.

Todos los tratamientos, control, atrazina, progesterona y atrazina+progesterona, exhibieron un incremento en el diámetro máximo de los oocitos biderianos. Los tratamientos que presentaron los oocitos de mayor tamaño y con características correspondientes a estadios de la oogénesis posteriores, fueron el tratamiento progesterona seguido por el tratamiento atrazina+progesterona; sin embargo, la cantidad de oocitos crecidos en estos tratamientos fue bastante baja. Estos resultados sugieren que la hormona progesterona es el reactivo más adecuado para el crecimiento de los oocitos biderianos de machos orquidectomizados de la especie *Rhinella marina* y que posiblemente su exposición a periodos más prolongados de tiempo y/o a distintas concentraciones podría producir un mayor número de oocitos crecidos.

Palabras clave: atrazina, oogénesis, órgano de Bidder, orquidectomización, progesterona, vitelogénesis.

2. ABSTRACT

Anterior to the testis of males toads of the Bufonidae family is located a rudimentary non-functional ovary called Bidder's organ, which grows and develops into a functional ovary if the testes are removed. This research analyzed the effect of hormones and endocrine disruptors of adult orchidectomized *Rhinella marina* males on the growth of Bidder's organ oocytes. A total of 22 adult males were orchidectomized and subjected to daily doses of saline, atrazine and progesterone solutions for a period of two months. The effects of these compounds, on the oogenesis of the 22 males, were tested by observations in the internal and external morphology and measurements of maximum diameter of the Bidderian follicles.

All treatments, control, atrazine, atrazine+progesterone and progesterone, showed an increase in the maximum diameter of bidderian oocytes after the two months of treatment. The treatments that produced more oocytes of advance oogenesis stages were the progesterone treatment followed by the atrazine+progesterone treatment. However, the number of grown oocytes in these treatments was quite low. These results suggest that the hormone progesterone is the most suitable reagent to induce growth in the Bidderian oocytes of orchidectomized *Rhinella marina* toads, and that possibly a greater number of grown oocytes may be produced if there is an exposure to longer periods of time and/or different concentrations of this substance.

Keywords: atrazine, Bidder's organ, oogenesis, orchidectomy, progesterone, vitellogenesis.

3. INTRODUCCIÓN

La presente investigación propone el crecimiento de los oocitos del órgano de Bidder en el anuro bufónido *Rhinella marina* mediante disruptores endócrinos y tratamientos hormonales.

El órgano de Bidder es un ovario vestigial presente en la mayoría de especies de la familia Bufonidae; siendo su presencia, una característica única (sinapomorfía) de los clados más derivados de bufónidos. (Pramuk, 2006; Pramuk *et al.*, 2008; Frost *et al.*, 2006; Duellman y Tueb, 1986). Este órgano se desarrolla a partir del primordio gonadal en la etapa larval de los embriones de esta familia. Inicialmente, el primordio gonadal de ambos sexos tiene características de ovario, las cuales se mantendrán en las hembras hasta el final de su desarrollo. Sin embargo, en los machos, la parte posterior del primordio se diferenciará en testículos al final de la metamorfosis, mientras que la parte anterior mantendrá las características de ovario formándose así el órgano de Bidder (Brown *et al.*, 2002; Norris y Lopez, 2011; Falconi *et al.*, 2004; Falconi *et al.*, 2007).

De color rojizo y formas variadas, el órgano de Bidder se localiza en la parte anterior del testículo, justo frente a los riñones (Echeverría, 1990). Presenta además una típica morfología ovárica, con una médula compuesta de tejido conectivo rica en vasos sanguíneos y un cortex con células foliculares que se encuentran rodeando a oocitos nucleados, similares a los oocitos previtelogénicos del ovario (Farias *et al.*, 2002; Falconi *et al.*, 2007).

Estos oocitos pueden crecer y experimentar vitelogénesis mediante la realización de una orquidectomía (Brown, 2002; Pancak-Roessler y Norris, 1991), la cual se define como la extirpación quirúrgica de uno o de ambos testículos (National Cancer Institute, 2010). La ejecución de una orquidectomía, en las especies de la familia Bufonidae que poseen

órgano de Bidder, causará un incremento en el tamaño de dicho órgano. De igual manera, los oocitos dentro del órgano de Bidder crecerán e iniciarán el proceso vitelogénico alcanzando estadios de la oogénesis posteriores (Cannatella *et ál.*, 2001; Brown *et ál.*, 2002; Pancak-Roessler y Norris, 1991).

La ausencia de hormonas masculinas, producidas por los testículos, genera los cambios en el órgano de Bidder; estas hormonas, cuando están presentes, poseen un efecto inhibitorio en el crecimiento de dicho órgano. Sin embargo, los machos orquidectomizados carecen de oviductos funcionales por lo que no podrán poner huevos (Brown *et ál.*, 2002; Pancak-Roessler y Norris, 1991; Ghosh *et ál.*, 1990). Según un estudio realizado por Brown *et ál.* (2002) en *Rhinella marina*, el tiempo de maduración de los oocitos después de la orquidectomía es bastante lento, alcanzando los estadios II y III de la oogénesis, tres meses después de la orquidectomización de los machos. De igual manera, Pancak-Roessler y Norris (1991) en su estudio sobre el efecto de hormonas gonadotropinas sobre el crecimiento y maduración de oocitos birderianos de la especie *Bufo woodhousii* obtuvieron oocitos que iniciaron la segunda fase de crecimiento (estadios III y IV).

La oogénesis es el proceso de formación de los gametos femeninos (Wolpert, *et ál.*, 2007). Las células germinales femeninas, llamadas también oogonias, son las células progenitoras de los oocitos; éstas durante la oogénesis sufrirán meiosis lo que permitirá la reducción del número cromosómico (Wolpert, *et ál.*, 2007; Gilbert, 2010).

En vertebrados, el crecimiento de los oocitos está acompañado por pausas o arrestos específicos durante la meiosis los cuales se producen en determinados momentos de la oogénesis (Bill, 2002). Una gran diferencia entre mamíferos y anfibios es que las oogonias en anfibios son células madre auto-renovables que perduran toda la vida del organismo y pueden generar una nueva cohorte de oocitos cada año (Gilbert, 2010).

La oogénesis en anfibios comienza con la primera división meiótica de las células germinales, las cuales sufrirán un arresto en diplotene de la profase I. Después del arresto, cuando los oocitos en crecimiento han alcanzado un tamaño de 400 μm de diámetro (estadio III), los oocitos pasan por un periodo de crecimiento nuclear y citoplasmático llamado vitelogénesis, el cual es necesario para acumular plaquetas de yema que se utilizarán, como nutriente, en los estadios tempranos del desarrollo del embrión (Schuetz, 1974; Gilbert, 2010).

La proteína vitelogenina, precursor de las plaquetas de yema, es sintetizada en el hígado y transportada por el sistema sanguíneo al ovario, en donde es colectada mediante receptores en la superficie de los oocitos y transportada al interior de la membrana mediante endocitosis. Dentro del oocito, esta proteína es convertida (a través de un proceso proteolítico) en lipoviteína y fosvitina, proteínas insolubles que forman parte de las plaquetas de yema (Hausen y Riebesell, 1991; Wallace y Bergink, 1974; Wallace y Selman, 1990). Durante el periodo de crecimiento también se puede observar claramente la vesícula germinal o núcleo de la célula (Schuetz, 1974; Gilbert, 2010).

Los oocitos primarios en los anfibios pueden permanecer en arresto durante varios años, hasta que se produce una señal ambiental que activa una cascada hormonal en la que la glándula pituitaria o hipófisis (regulada a su vez por neurosecreciones producidas por el hipotálamo) produce hormonas gonadotropinas las cuales inducen a las células foliculares a producir progesterona, hormona que finalmente induce la activación del factor promotor de la maduración provocando el reinicio de la meiosis y la consecuente interrupción del arresto (Gilbert, 2010; Petrino y Schuetz, 1987; Duellman y Tueb, 1986).

La interrupción del arresto está caracterizada por la ruptura de la vesícula germinal, durante la cual, el núcleo se desintegra y los cromosomas se contraen y migran al polo

animal para continuar con la primera división meiótica. La ruptura de la vesícula germinal representa morfológicamente el inicio de la maduración del oocito. La maduración del oocito en los anfibios, por lo tanto, representa el estadio final de la ovogénesis, el cual, finalmente prepara al oocito para la fertilización. Poco después de terminada la primera división meiótica, se produce un segundo arresto en metafase de meiosis II y el oocito maduro es liberado del ovario por un proceso llamado ovulación. Este segundo arresto será interrumpido solamente después de que los oocitos hayan sido fertilizados. La evidencia sugiere que el flujo de iones calcio estaría involucrado en la interrupción del segundo arresto (Bill, 2002; Gilbert, 2010; Fort, 2005).

El sistema endocrino cumple un papel muy importante en la modulación y regulación de la ovogénesis. Las hormonas, especialmente las hormonas gonadales, están involucradas en el crecimiento de los oocitos (a través de la estimulación de la vitelogénesis), en la reiniciación del proceso meiótico y en los cambios estructurales del citoplasma y del cortex celular después de la ruptura de la vesícula germinal. Las hormonas gonadotropinas, estimulan la síntesis de varios tipos de esteroides en el ovario de los anfibios; los cuales a su vez, están involucrados en procesos intra y extra ováricos relacionados con la maduración de las células foliculares y de los oocitos (Schuetz, 1974; Norris y Lopez, 2011). La hormona folículo estimulante, por ejemplo, es trascendental dentro del proceso vitelogénico ya que estimula la producción de 17β -estradiol, el cual a su vez estimula al hígado para que produzca vitelogenina, materia prima de las plaquetas de yema (Gilbert, 2010; Norris y Lopez, 2011).

Un aspecto interesante sobre el proceso de maduración de los oocitos es que puede ser gatillado experimentalmente, mediante distintos estímulos fisiológicos y no fisiológicos. Por ejemplo las hormonas gonadotropina coriónica humana (hCG), progesterona y testosterona, y los extractos de pituitaria han sido utilizadas para inducir la

maduración y ovulación en varias especies de anfibios (Bravo, *et al.*, 1978). En el estudio de Pancak-Roessler y Norris, (1991) realizado en *Bufo woodhousii* se muestra los efectos de las hormonas gonadotropina coriónica humana (hCG) y gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) sobre el órgano de Bidder de machos orquidectomizados de esta especie. Después de 26 días de tratamiento hormonal, los machos operados mostraron un incremento sustancial en peso y volumen en el órgano de Bidder; este aumento se debió a una significativa proliferación del número total de células germinales (oogonia y oocitos), así como también a un incremento en el tamaño de los oocitos preexistentes. También se observó que dichos oocitos, mostraban estadios medios y tardíos (Anexo 1) y que solamente dentro de este grupo hubo una ocurrencia significativa de vitelogénesis.

Compuestos químicos también pueden provocar maduración e incluso completa feminización en individuos machos de distintas especies de anfibios, ya que actúan como disruptores endócrinos modificando la señal hormonal del individuo y alterando el sistema masculino reproductivo (Diamanti-Kandarakis *et ál.*, 2009).

El termino feminización es utilizado en medicina para describir dos tipos de procesos; el primero se refiere al proceso normal de desarrollo en la hembras de la adquisición de los caracteres sexuales primarios y secundarios y el segundo se refiere a la inducción o desarrollo anormal de caracteres sexuales femeninos en los machos de una especie determinada (Blood *et ál.*, 2007). En los machos la feminización generalmente se produce debido a desordenes genéticos o adquiridos del sistema endócrino (Norris y Lopez, 2011). Por ejemplo, se ha comprobado que la exposición de distintas especies masculinas (de diferentes taxa) a disruptores endócrinos altera el señalamiento hormonal normal durante el desarrollo embriónico, lo que puede cambiar permanentemente la morfología y función del sistema reproductivo en el adulto y su comportamiento reproductivo (McCoy *et ál.*, 2008).

Varios pesticidas utilizados en la industria agrícola son disruptores endócrinos y causan anomalías reproductivas en los individuos expuestos a ellos. McCoy *et al.* (2008) señala el efecto que producen los pesticidas agrícolas sobre los machos de la especie *R. marina* en distintos sitios con un impacto agrícola diferente; concluyendo que las anomalías de los machos de dicha especie están asociadas estadísticamente con la actividad agrícola y que dichas anomalías incrementan de una manera directamente proporcional al incremento de la agricultura (McCoy *et al.*, 2008).

La atrazina es uno de los pesticidas más usados en la industria agrícola alrededor del mundo; los agricultores han usado atrazina por más de cuarenta años como herbicida en varios tipos de cultivos (The Center for Regulatory Effectiveness, 2003). Este químico también es conocido por ser un potente disruptor endócrino que se activa a bajas concentraciones. En anfibios, este compuesto suele ser más potente debido a que su actividad dentro de estos organismos se produce a niveles mucho más bajos en comparación con otros taxa (Hayes *et al.*, 2002).

Un estudio realizado por Hayes *et al.* (2010) muestra las consecuencias reproductivas de la exposición de los machos adultos de *Xenopus laevis* a la atrazina. Larvas de *X. laevis* con un genotipo masculino (ZZ) fueron criadas en atrazina (2.5 ppb) desde la eclosión del huevo hasta la metamorfosis de los individuos y se observaron los cambios morfológicos de estos individuos en los estadios adultos. Se observó que los machos adultos que fueron expuestos a la atrazina mostraron una desmasculinización (castración química) y completa feminización; es decir que el hermafroditismo observado en la metamorfosis resultó, en la mayoría de los casos, en una feminización; esta feminización fue completa y persistente ya que a pesar de ser genotípicamente machos los individuos de esta especie presentaban características fenotípicas femeninas, así como

también eran reproductivamente funcionales (Anexo 2) y capaces de producir huevos viables.

Rhinella marina (Linneaus, 1758), es una de las especies más adecuadas para convertirse en modelo para la estandarización del crecimiento de los oocitos del órgano de Bidder, ya que presenta diversas características que la convierten en una especie apta para ser utilizada dentro de este proyecto. *Rhinella marina* presenta una gran variedad de sinónimos taxonómicos, entre los cuales se encuentran: *Bufo marinus*, *Bufo pythecodactylus*, *Rhinella marinus*, *Rana marina*, entre otros (Solís *et ál.*, 2010). La gran variedad de sinónimos que esta especie posee se debe a que en el género al que pertenece existe una gran controversia en relación a su clasificación taxonómica. Frost *et ál.* (2006), por ejemplo, separa al género *Bufo* en dos géneros distintos *Rhinella* y *Bufo*, mientras que Pauly *et ál.* (2009), señala que se debe considerar a *Rhinella* como un subgénero más que como un género distinto. Esta diferencia en la clasificación ha promovido que se generen los números sinónimos en esta especie; sin embargo, los nombres más usados son *Bufo marinus* y *Rhinella marina* siendo este último el más actualizado dentro de la clasificación taxonómica (The Taxonomicon, 2011).

Rhinella marina es una de las especies de anuros más comunes y mayormente distribuidas alrededor del mundo. Su rango nativo de distribución se extiende aproximadamente, desde los 27° N al sureste de Texas y el oeste de México hasta los 10° S en el centro de Brazil (Zug y Zug, 1979). Su amplio rango de distribución actual, se debe a las numerosas introducciones que ha tenido este animal, en varios países; entre los cuales se encuentran Australia, Aruba, República Dominicana, Japón, entre otros. Otro factor que contribuye a su gran distribución es la capacidad de adaptarse a distintos ambientes, siendo una especie invasiva que ha generado numerosos problemas en los países en los que ha sido introducido (Solís *et ál.*, 2008).

Es un sapo típico de gran volumen que pertenece a la familia Bufonidae. El tamaño de un animal adulto puede variar entre 100-150 mm con un máximo de 230 mm; las hembras generalmente presentan un mayor tamaño en relación a los machos. Su piel es seca y de estructura rugosa en la espalda y lisa en el abdomen. La coloración típica de esta especie es gris, oliva o café con patrones variables en el dorso y crema en el abdomen. Una larga y ovalada glándula parótida yace justo debajo de sus ojos. Sus pupilas son horizontales y el iris es dorado. Posee un puente óseo que va desde la nariz hasta la zona superior de sus ojos (Robinson, 1998). Es nocturno y terrestre; habita en lugares húmedos y cubiertos, como campos de caña, sabanas, bosques abiertos, patios y jardines húmedos. Se adapta fácilmente a hábitats degradados y ambientes perturbados por el hombre, por lo que puede adaptarse fácilmente a condiciones de laboratorio. Su dieta es generalista; puede comer pequeños insectos vivos o comida enlatada para mascotas. Es muy flexible en cuanto a requerimientos de reproducción, las puestas son de gran tamaño y el crecimiento de los embriones y renacuajos es bastante rápido (Coloma *et ál.*, 2007). Debido a ello esta especie está catalogada por la lista roja de la UICN como especie de última preocupación en relación a su alta distribución, su tolerancia a un amplio rango de hábitats y su supuesta gran población (Powell *et ál.*, 2010).

La reproducción *ex situ* de los anfibios se ha convertido en una tarea prioritaria debido al número alarmante de extinciones de varias especies de anfibios que se ha producido alrededor del mundo. De las más de 6.200 especies descritas, 38 se cree ya están extintas, 1.856 (equivalente al 32% o un tercio de la totalidad) se encuentran en peligro de extinción y 2.469 especies (43%) forman parte de poblaciones en declive. Dentro del orden Anura, el 31,6% de las 5.532 especies descritas se encuentran amenazadas o extintas (Amphibian Ark, 2009; Insciences Organization, 2009; AmphibiaWeb, 2010; IUCN, 2010). Existen cuatro familias, que poseen una cantidad

significativa de especies en peligro de extinción: Leptodactylidae (ranas neotropicales típicas), Ranidae (ranas verdaderas) Hylidae (ranas arborícolas) y Bufonidae (sapos verdaderos) (Stuart *et ál.*, 2004) (Anexo 3).

En Ecuador la situación no es distinta. De las 479 especies descritas formalmente, alrededor del 31% (146) se encuentran dentro de las categorías de riesgo de extinción y 11 especies ya estarían extintas (Coloma, 2010). Es más, la mayoría de las especies afectadas pertenecen al género *Atelopus* (familia Bufonidae); de las 18 especies pertenecientes a este género, 11 aparentemente han disminuido sus poblaciones durante los últimos 15 años (Ron *et ál.*, 2003). Los programas de reproducción *in situ*, no obstante, presentan un problema de viabilidad a largo plazo (La Marca, *et ál.*, 2005). Por ejemplo, se está tratando de reproducir *ex situ* a individuos de la especie *Atelopus sp*, proyecto que hasta el momento, no ha logrado ser exitoso debido a varios factores ambientales y etológicos relacionados con esta especie (Ron *com pers*, 2010). De igual manera, estudios poblacionales de la especie en mención, indican que existen poblaciones con una proporción mayor de machos en relación al número de hembras, complicando aún más su reproducción (Coloma *com pers*, 2009).

Basados en estos conceptos, se propone ensayar la funcionalidad de los oocitos biderianos induciéndolos a su crecimiento en bufónidos machos de la especie *Rhinella marina* mediante la aplicación de distintos tratamientos hormonales y químicos con el fin de obtener oocitos de estadios oogénicos posteriores los cuales podrían servir a futuro para ensayos de fertilización *in vitro*; esto podría convertir a *Rhinella marina* en una especie modelo para la conservación de otras especies dentro de la familia Bufonidae mediante la realización de la misma metodología.

Esta investigación, por lo tanto, tiene como objetivo general acelerar el proceso de crecimiento en los oocitos del órgano de Bidder de machos orquidectomizados de la especie *R. marina* mediante el uso de hormonas y disruptores endócrinos, y como objetivos específicos establecer el tratamiento más adecuado para la producción de oocitos biderianos fertilizables en los dichos machos orquidectomizados, definir mediante cortes histológicos y observaciones de las diferencias morfológicas, el estadio de la oogénesis de los oocitos biderianos de los machos sometidos a los distintos tratamientos e inducir la producción de caracteres femeninos (feminización) en los machos orquidectomizados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Para esta investigación se utilizaron animales de la especie *Rhinella marina*, orden Anura, familia Bufonidae. Se recolectó un total de 24 machos adultos en dos localidades distintas a lo largo del año 2010. Los datos de los colectores, los sitios y las fechas de colección se encuentran detallados en la tabla 1.

El reconocimiento de los machos adultos durante la recolección se realizó mediante la observación del callo nupcial, (tejido dermal de color café oscuro en el pulgar de cada extremidad anterior) dimorfismo sexual de algunas especies de anuros (Duellman y Trueb, 1986). Posterior a la recolección, los individuos fueron transportados al laboratorio en cajas de cartón grandes con huecos a los lados.

4.2. MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO

En el laboratorio los animales fueron pesados, medidos (longitud boca-año), fotografiados (no se muestran fotografías) e identificados (Tabla 2). Posterior a la identificación los especímenes fueron distribuidos en cuatro terrarios (que corresponderían a los cuatro tratamientos) en grupos de seis individuos por cada terrario. Durante la asignación de cada animal para cada tratamiento, se tomó en cuenta el tamaño y la longitud boca-año de dichos animales, para procurar disminuir el error experimental entre cada tratamiento.

Previo a la aplicación de los tratamientos, los sapos fueron sometidos a un proceso de aclimatación a las condiciones estándares de laboratorio durante un periodo de dos meses, de acuerdo a lo que se recomienda en la bibliografía (National Health and Medical

Research Council, 2008). Las condiciones estándares se encuentran detalladas a continuación.

4.2.1. TERRARIOS

Se utilizó terrarios plásticos transparentes de 70 x 30 x 30 cm (largo, ancho y profundidad, respectivamente), los cuales fueron adecuados mediante la colocación de una malla plástica en la base suspendida en una reja de plástico, generando una distancia entre la base del terrario y la malla de un centímetro aproximadamente, permitiendo que el terrario tenga humedad constante mediante la colocación de agua en este espacio. También se hizo una abertura en la tapa de cada terrario la cual fue cubierta con malla para permitir aeración y evitar a su vez que los animales se escapen. De igual manera se colocaron dos recipientes grandes (27 x 10 x 6,5 cm) llenos de agua reposada y se instalaron escondites hechos con botellas plásticas cubiertos con cinta de ducto (Anexo 4). Tanto las adecuaciones de los terrarios como su tamaño fueron recomendados por el Dr. Brad Wilson, médico veterinario del zoológico de Atlanta.

Los terrarios fueron ubicados en sitios donde se permitía una exposición de aproximadamente 12 horas de luz natural indirecta a temperaturas que oscilaban entre los 17° a 20° centígrados.

4.2.2. LIMPIEZA

La limpieza de los terrarios se realizó periódicamente para evitar cualquier tipo de enfermedad. Una vez por semana se limpiaron los terrarios a profundidad; es decir que todos los individuos eran trasladados a un terrario más pequeño mientras que se desarmaba, lavaba y volvía a armar cada parte del terrario. Los terrarios eran lavados primero con agua corriente y después se les pasaba agua reposada para eliminar el cloro. Asimismo, los recipientes de agua reposada fueron lavados y llenados diariamente.

4.2.3. ALIMENTACIÓN

Los sapos fueron alimentados tres veces por semana con tres grillos adultos grandes cada uno. Cuando había disponibilidad, se colocaba suplemento vitamínico (Rep-Cal HERPTIVITE) en los grillos, el cual fue donado por la Balsa de los sapos - PUCE. Previo a las operaciones y los tratamientos, los animales fueron alimentados con ratones de pocos días de edad para proporcionarles todas las vitaminas y minerales necesarios para su supervivencia.

4.3. DESCRIPCIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS

4.3.1. ANESTÉSICO MS-222: TRICAINA METANESULFONATO (Wright y Whitaker, 2001).

Solución Stock (0,5%)

- 1 g MS-222
- 1000 ml H₂O destilada

Para la operación se diluyó la solución stock con agua destilada hasta que se alcanzó una concentración del 0,15% y se ajustó el pH entre 7 a 7.4 con bicarbonato de sodio.

4.3.2. SOLUCIÓN DE RINGER PARA ANFIBIOS (Wright y Whitaker, 2001).

- 6,6 g NaCl
- 0,15 g KCl
- 0,15 g CaCl₂
- 0,2 g NaHCO₃
- 1000 ml H₂O destilada

4.3.3. PROGESTERONA (Sigma-Aldrich product information sheet, 2011)

Solución Stock (20 µg/ml)

- 0,001g Progesterona
- 1ml Etanol Absoluto
- 49 ml Solución de Ringer para anfibios

Para la administración de la hormona, se diluyó la solución stock con solución de Ringer para anfibios hasta que se obtuvo una concentración de 7 µg/ml (Browne *et ál.*, 2006).

4.3.4. ATRAZINA

Solución Stock (10.000 ppb)

- 0,005 g Atrazina
- 5ml Etanol absoluto
- 495 ml Agua reposada

Para la administración del disruptor endócrino, se realizaron dos diluciones: para la primera se puso 100 µl de la solución stock y 900 µl de agua reposada y para la segunda se puso 100 µl de la dilución uno y se aforo a un litro con agua reposada.

4.3.5. SOLUCIÓN SALINA STEINBERG (Smith y Ecker, 1969).

Solución Stock (10 x)

- 34g NaCl
- 0.5g KCl
- 0.8g CaNO₃-4H₂O
- 2g MgSO₄-7H₂O

- 0.1 g Kanamicina
- 6.0g Tris
- 1000 ml H₂O destilada

Se ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico. Para manipular los oocitos se diluyó la solución stock hasta una concentración de 1X.

4.3.6. FIJATIVO SMITH'S (Liu, 2006)

Solución A

- 1% Dicromato de potasio

Solución B

- 5% Ácido acético
- 7,4% Formaldehído

Para preparar este fijativo se mezcló la solución A con la solución B en un volumen 1:1 justo antes de su utilización.

4.4. ORQUIDECTOMÍA

4.4.1. OPERACIÓN

Se realizó la remoción de ambos testículos (orquidectomía bilateral) en los 24 machos adultos recolectados. Los animales fueron anestesiados sumergiéndolos parcialmente en el anestésico MS-222 SIGMA-ALDRICH (Cat. No. E10521) (ver 4.3.1.) por 20 minutos aproximadamente. Durante los cuales se observó el nivel de inducción del anestésico en cada animal mediante el procedimiento descrito en el libro de Wright y

Whitaker (2001), *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Una vez que los individuos alcanzaron un nivel de inducción alto, se procedió a realizar el procedimiento quirúrgico.

Con tijeras de punta fina (MEDITEC cc) se realizó una pequeña incisión (de 15 mm de longitud aproximadamente) a 1cm de la línea media del animal para evitar hemorragias producidas por cortes en la vena abdominal ventral. A continuación, se apartaron los órganos (intestinos y estomago principalmente) utilizando pinzas de punta roma (MEDITEC cc) hasta encontrar el testículo. Una vez encontrado, se procedió a removerlo con las tijeras de punta fina tratando de evitar cortar el riñón (órgano altamente vascularizado). En algunos casos la remoción fue parcial debido a que el órgano de Bidder rodeaba la punta del testículo. No obstante, se trató de remover la mayor cantidad de testículo como fuese posible, evitando dañar el órgano de Bidder.

Durante la operación se tomaron fotos y medidas del órgano de Bidder de ambos lados de cada individuo. De igual manera, se tomaron fotos y medidas de los dos testículos removidos. Finalmente las incisiones fueron suturadas con hilo de sutura reabsorbente Vicryl *Plus* antibacterial # 3 ETHICON y se colocó un poco de clorhexidina 0,5% (savlon) en la herida para evitar infección.

Cabe recalcar que todos los instrumentos para operar así como el sitio de operación fueron debidamente esterilizados. Las tijeras y pinzas fueron autoclavadas y se utilizó etanol al 70% y clorhexidina 0,5% para esterilizar el sitio de operación.

4.4.2. CUIDADO POST-OPERATORIO

Posterior a la operación los animales fueron trasladados a un terrario estéril (22,5 largo x 13,5 ancho x 13 profundidad) en donde se les colocó una solución restauradora de

electrolitos llamada Solución de Ringer para anfibios (4.3.2.), que se conoce rehidrata de manera eficaz a los anfibios (Wright y Whitaker, 2001), en una toalla absorbente ubicada en la base del terrario.

Durante una semana se mantuvo a los individuos en los terrarios de recuperación. Tiempo durante el cual, se limpio los terrarios y se cambio la Solución de Ringer para anfibios a diario. También se controló el estado de recuperación de cada animal mediante la observación de la cicatrización de la herida. Después del periodo de recuperación los animales fueron regresados a sus terrarios originales para someterlos a los diferentes tratamientos.

4.5. TRATAMIENTOS

Los sapos orquidectomizados fueron sometidos a cuatro tratamientos distintos durante un periodo de dos meses. Tanto las inyecciones como la solución que contenía el disruptor endocrino fueron administradas diariamente.

4.5.1. CONTROL

Se inyectó 100 μ l de la Solución de Ringer para anfibios en la región intraperitoneal de los machos orquidectomizados. Los animales sometidos a este tratamiento fueron solamente cuatro debido a que uno de ellos murió durante la operación y el otro murió a las tres semanas de tratamiento. La causa de la muerte del segundo individuo (infección pulmonar de parásitos) se determinó mediante la realización de una necropsia (Wilson com pers, 2011).

4.5.2. PROGESTERONA

Se inyectó 100 µl de la Solución de Ringer para anfibios que contenía una concentración de progesterona SIGMA-ALDRICH (Cat. No. P8783) de 7 µg/ml (ver 4.3.3). La solución de progesterona también se inyectó en la región intraperitoneal de cada individuo.

4.5.3. ATRAZINA

Antes de la orquidectomía, se realizó una aclimatación de los individuos pertenecientes a este tratamiento debido a que se disolvió la atrazina en agua reposada, la cual se colocó en la base del terrario para que esté en contacto permanente con la superficie ventral del animal. Para la aclimatación, los animales fueron colocados individualmente en terrarios (22,5 largo x 13,5 ancho x 13 profundidad) con 100 ml de agua reposada que no contenía el disruptor endocrino durante un periodo de dos semanas. Dentro de este tiempo se observó la reacción de cada animal a la exposición permanente a una solución acuosa.

Durante el tratamiento, se preparó la solución de atrazina (Gesaprim 9WG ECUAQUIMICA) mediante la realización de soluciones seriadas (ver sección 4.3.4.) para alcanzar la concentración requerida (0,1 ppb). Cabe mencionar que dentro de este tratamiento y en el tratamiento de atrazina y progesterona, las condiciones descritas en la sección 4.2.1 para los terrarios fueron cambiadas. Se eliminaron las mallas y las charcas dejando libre la base del terrario para colocar un litro de la solución de atrazina.

4.5.4. ATRAZINA Y PROGESTERONA

Los animales dentro de este tratamiento fueron sometidos tanto a las inyecciones de progesterona (100 µl en la región intraperitoneal) como a la solución de atrazina, metodologías descritas en las secciones 4.5.2 y 4.5.3, respectivamente.

4.6. EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Finalizados los dos meses, los individuos de los cuatro tratamientos fueron sacrificados para extraer los órganos de Bidder izquierdo y derecho. La morfología externa y el tamaño de los oocitos de dichos órganos fueron registrados por medio de micrografías utilizando un estereoscopio Stemi SV11 ZEISS y una cámara digital Canon PowerShot G9. Durante el proceso de manipulación de los respectivos órganos, se utilizó una solución de Steinberg 1X (ver 4.3.5.) para evitar la deshidratación de los oocitos. Posteriormente, fueron fijados en una solución Smith's (4.3.6.) y guardados durante 24 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego fueron sometidos a tres lavados de 30 minutos cada uno con agua destilada, para ser almacenados a temperatura ambiente en una solución de formaldehído 1,5% y ser analizados morfológicamente mediante cortes histológicos. Se realizó el mismo procedimiento con los oocitos de una hembra para su posterior comparación.

4.6.1. PREPARACION DEL TEJIDO PARA CORTES HISTOLÓGICOS

Para la preparación de las muestras se modificó el protocolo descrito por Liu (2006) para la tinción histoquímica de oocitos. Se realizaron dos lavados de diez minutos con agua destilada. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados gradualmente mediante el uso de alcohol a diferentes concentraciones: se realizó un lavado de 30 minutos con etanol al 70%, uno de 30 minutos con etanol al 90% y dos con etanol al 100% el primero de 30 minutos y el segundo de 24 horas en agitación. Pasadas las 24 horas, las muestras fueron colocadas en amilacetato durante otras 24 horas más. Consecutivamente, los tejidos fueron aclarados con tolueno; en una campana de gases, se realizaron tres cambios de tolueno de 30 minutos cada uno

Los tejidos deshidratados y aclarados fueron posteriormente infiltrados mediante su colocación en pocillos de placas cóncavas excavadas llenas con paraplast (Histosec Pastillas-MERCK) las cuales fueron colocadas en una plancha THERMO-SCIENTIFIC (Cat. No. MH6616X1MK2) a 60°C. Durante la infiltración, se realizaron tres transferencias de las muestras a un pocillo de parafina pura; la primera transferencia se realizó después de 30 minutos, la segunda después de 1 hora y la tercera después de 36 horas.

Finalmente, se transfirieron los tejidos a moldes cúbicos de cartulina llenos de paraplast derretida procurando que las muestras queden ubicadas en la parte central del cubo y se dejó solidificar los moldes a temperatura ambiente para su posterior seccionamiento.

4.6.2. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA CORTES HISTOLÓGICOS

Sobre un pedazo de madera se montó cada bloque de parafina que contenía el tejido, utilizando un micrótopo (820 Reichet HistoSTAT Rotary microtome) se cortó el tejido en secciones de 25 µm de espesor, las cuales fueron colocadas en placas Superfrost® Plus FISHER SCIENTIFIC (Cat. No. 12-550-143) utilizando agua para lograr su completa adhesión.

4.6.3. TINCIÓN PARA CORTES HISTOLÓGICOS

Para la tinción de las placas se siguió el protocolo de tinción con eosina y hematoxilina de Mayer (Lee, 1960) con algunas modificaciones. Se utilizaron cajas plásticas Wheaton para colocar las soluciones, las cuales fueron ordenadas para que las placas pasaran de una solución a otra de manera seriada. Durante la tinción de las placas, la parafina fue removida mediante tres lavados de 10 minutos cada uno en xileno al 100 %. Posteriormente, las muestras fueron rehidratadas a través de lavados graduales, de cinco

minutos cada uno, en etanol al 100, 95, 70 y 50 % y un lavado de 5 minutos en agua destilada.

A continuación, se colocaron las placas en una caja que contenía una solución de hematoxilina de Harris durante 10 minutos, después de los cuales las muestras fueron lavadas con agua corriente. Posteriormente, se colocó las placas en una solución de diferenciación (1 % HCl, 70 % Etanol) por 30 segundos. Después de este tiempo se realizó un lavado con agua corriente y se incubó por 90 segundos en una solución de hidróxido de amonio (NH₄OH) al 0,3 %.

Se realizó la tinción de las placas con eosina Y durante dos minutos, después de los cuales se lavó las placas con agua corriente. Una vez teñidas se procedió a deshidratar las placas con dos lavados de etanol; el primero en etanol al 95 % por cinco minutos y el segundo en etanol al 100 % por otros cinco minutos. Después de la deshidratación, las placas fueron colocadas en una solución de etanol-xileno 1:1 por dos minutos y en una solución de xileno al 100 % por dos minutos más. Finalmente, se montó a las placas colocando unas gotas de Permount® FISHER SCIENTIFIC (Lot. No. 050884) sobre los cortes y cubriéndolas con un cubreobjetos largo (24 x 50 mm).

4.7. ANALISIS MORFOLÓGICO

Para establecer el estadio de la oogénesis tanto de las micrografías como de los cortes del órgano de Bidder de los machos orquidectomizados sometidos a los tratamientos, se midió el diámetro de los oocitos más grandes de cada órgano de Bidder y se lo comparó con la tabla de oogénesis descrita por Brown *et ál.* (2002), para la especie *Rhinella marina* (Anexo 5).

4.8. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para observar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de los oocitos del órgano de Bidder de los machos orquidectomizados se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) factorial (4 x 2) utilizando como variable, el diámetro máximo de los oocitos del órgano de Bidder derecho e izquierdo de los animales de cada tratamiento. También se realizaron comparaciones ortogonales para determinar la combinación de los tratamientos frente al control o entre tratamientos del órgano de Bidder de cada lado. Todos estos análisis fueron realizados en el programa estadístico SPSS 17.0. Finalmente, dichas interacciones fueron graficadas mediante diagramas de caja (box plots) utilizando el programa Golden Grapher 7.0.

5. RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL OVARIO DE *Rhinella marina*

El pedazo de ovario de la hembra adulta extraído quirúrgicamente contenía oocitos en diferentes estadios de la oogénesis. Los oocitos más grandes (1.200 μm de diámetro) presentaron una clara diferenciación entre el polo animal y vegetal con una mayor concentración de pigmento (de color café oscuro) en el polo animal; la vesícula germinal se encontraba desplazada hacia este polo (Figura 1A- B). También se encontraron oocitos de menor tamaño que presentaban distintas coloraciones (café claro, blanco opacos y transparentes), diámetros y diferentes características morfológicas y citológicas (Figura 1, B); los oocitos de todos los estadios se encontraban rodeados por una capa de células foliculares.

5.2 DESCRIPCIÓN DE LA GÓNADA MASCULINA DE LOS MACHOS DE *Rhinella marina* PREVIO A LOS TRATAMIENTOS

La gónada de los machos orquidectomizados, la cual estaba localizada en la cavidad celómica, presentó las dos estructuras que forman parte de la gónada masculina en Bufónidos; el órgano de Bidder y el testículo. Ambas estructuras presentaron diferencias en su morfología, claramente observables en la zona de transición entre el testículo y el órgano de Bidder; las diferencias encontradas se pudieron observar tanto en su morfología externa como en los cortes histológicos (Figura 2A- B).

5.2.1 TESTÍCULOS

Los testículos de cada animal se encontraron en ambos lados de la cavidad abdominal unidos, mediante peritoneo, al lado ventral de los riñones y al órgano de Bidder por su extremo anterior. Los testículos removidos, observados *in vivo*, eran de color

amarillo pálido, forma ovalada alargada y presentaban una alta vascularización y un ensanchamiento en la región de unión al órgano de Bidder (Figura 3). En los cortes histológicos se observaron túbulos seminíferos (Figura 4A- B) con espermatogonias (células progenitoras de espermatozoides), espermaticitos y agrupaciones de espermatozoides, los cuales se caracterizaron por su forma alargada, cabeza filiforme y cola más larga que la cabeza (Figura 4C). Los testículos izquierdo y derecho de los veinticuatro animales midieron 21.3 mm de largo y 4 mm de ancho y pesaron 106 mg, en promedio (Tabla 3).

5.2.2 ÓRGANO DE BIDDER

Durante las operaciones, se encontró al órgano de Bidder adherido al extremo anterior de cada testículo y unido a un cuerpo graso. Estructuralmente, presentó una coloración rosada-pálida y un tamaño (difícil de determinar al momento de la operación) y forma variables. En algunos animales se observaron manchas de color negro alrededor de todo el órgano de Bidder o en determinadas regiones (Figura 5A- B- C). Al medir el diámetro máximo de los oocitos biderianos, se determinó que el órgano de Bidder contenía oocitos con un diámetro máximo promedio de 189 μm . La mayor parte de los cuales, según la tabla de oogénesis para *R. marina* (Brown *et ál.*, 2002), se encontraban en el estadio I de la oogénesis mientras que únicamente tres de los veinticuatro animales se hallaban en el estadio II (Tabla 4). Morfológicamente, los oocitos biderianos eran ligeramente transparentes con una gran vesícula germinal fácilmente visible *in vivo* (Figura 6).

5.3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ORGANNO DE BIDDER

Después de los dos meses de tratamiento se observó una mayor vascularización en el órgano de Bidder y los oocitos de todos los tratamientos como se muestra en el órgano

de Bidder de los animales # 2, 10, 15, y 24 de cada tratamiento (Figura 7A- B- C- D). No obstante, si se pudo determinar que los oocitos aumentaron considerablemente de tamaño alcanzado un diámetro promedio general de 346 μm (Tabla 5).

Al comparar los tratamientos, mediante el ANOVA factorial (4 x 2), se determinó que existían diferencias significativas, en el diámetro máximo de los oocitos, entre los tratamientos ($F = 2,9$; $p = 0,04$) pero no entre testículo izquierdo y derecho ($F = 2,4$; $p > 0,5$). Sin embargo, la prueba de homogeneidad de varianzas presentó significación ($F = 2,6$; $p = 0,02$) y el coeficiente de variación para estos datos fue 58,6 %, por lo que se realizó un ANOVA factorial de los datos transformados (transformación logarítmica) en el que se encontró diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($F = 4,3$; $p = 0,009$) pero no entre órgano de Bidder izquierdo y derecho ($F = 1,4$; $p > 0,5$); este ANOVA presentó un coeficiente de variación del 7 %.

En las comparaciones ortogonales, se encontró un media mayor, numéricamente, en el tratamiento control del órgano de Bidder izquierdo comparado con los otros tratamientos; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas ($p = 0,09$). De igual manera, se observó una diferencia numérica mayor entre el tratamiento progesterona frente al control pero tampoco se encontraron diferencias significativas ($p = 0,07$). Entre los demás tratamientos no se observaron diferencias significativas. En cuanto al órgano de Bidder derecho, no se encontraron diferencias significativas en las comparaciones ortogonales ($p > 0,05$); sin embargo, durante el análisis estadístico, también se encontró significación ($p = 0,03$) en la prueba de homogeneidad de varianzas y el coeficiente de variación para estos datos fue del 63,6 %. Debido a ello, se realizó una nueva comparación ortogonal con los datos transformados, la cual arrojó diferencias significativas entre todos los tratamientos ($p = 0,04$), entre el control y los tratamientos ($p = 0,02$), entre el tratamiento progesterona frente a los demás tratamientos y el control ($p = 0,016$) y entre el

tratamiento progesterona frente al tratamiento atrazina ($p = 0,05$) y diferencias altamente significativas entre el tratamiento progesterona frente al control ($p = 0,007$). El coeficiente de variación de los datos transformados fue del 26%.

Mediante los diagramas de caja se observó que existían datos atípicos de oocitos que se encontraban muy por encima o debajo de la mediana, también se pudo comprobar la variabilidad de medianas entre los tratamientos de los órganos de Bidder izquierdo y derecho. (Figura 8A). En cuanto al órgano de Bidder derecho, tanto el tratamiento progesterona como el de atrazina con progesterona presentan datos atípicos muy por encima de su mediana (Figura 8B). Cabe recalcar que los diagramas de caja de las figuras 8 y 10 muestran las medianas y no las medias de cada tratamiento.

5.3.1 CONTROL: ORQUIDECTOMÍA

En los animales pertenecientes al tratamiento control: orquidectomía, se observó un ligero incremento en el diámetro de los oocitos, así como también en su número. Al examinar los cortes histológicos, las micrografías y el diámetro máximo de los oocitos se encontró un gran número de los oocitos en estadio I de la oogénesis: vesícula germinal grande que ocupa casi todo el diámetro del oocito, citoplasma transparente a través del cual se puede ver la vesícula germinal, numerosos nucléolos distribuidos alrededor de todo el núcleo o en la periferia y dos capas de células foliculares que se encuentran recubriendo a los oocitos (Figura 9A- B). El diagrama de caja para este tratamiento no arrojó datos atípicos ni alejados de la mediana. Para el órgano de Bidder derecho el promedio del diámetro máximo de los oocitos fue de $207 \mu\text{m}$ y del órgano izquierdo fue de $229 \mu\text{m}$ (Figura 10A).

Dentro de este tratamiento, el animal #1, presentó una morfología distinta en su órgano de Bidder. Antes de la operación se pudo observar que, en este animal, tanto el

órgano izquierdo como el derecho poseían una coloración café oscura (atípica) alrededor de todo el órgano y que dichos órganos eran bastante pequeños. Posterior al tratamiento, se observó un notable crecimiento en ambos órganos y una mayor proliferación de oocitos (Figura 11A- B- C- C').

5.3.2 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA

Se encontró oocitos de estadio I, de estadio II: coloración blanquecina-transparente, vesícula germinal grande localizada en el centro del oocito con cromosomas extendidos y nucléolos distribuidos en la periferia del núcleo, rodeados por una pared de dos capas de células foliculares, y oocitos de estadio III: oocitos ligeramente pigmentados y altamente vascularizados, en los que se comienza a observar la formación de plaquetas de yema (Figura 12A- B- C- D). De los cuales su gran mayoría pertenecían al estadio II de la oogénesis. El promedio del diámetro máximo de los oocitos del órgano de Bidder derecho fue de 546 μm y del órgano izquierdo fue de 352 μm .

Se encontraron datos atípicos en el diagrama de caja de animales en los que se observaron oocitos de estadios superiores (Figura 10B). El animal # 10 presentó en el órgano de Bidder izquierdo un oocito pigmentado que perteneciente al estadio III o IV de la oogénesis (Figura 13). En el animal # 11 se observaron oocitos pigmentados de gran tamaño pertenecientes al estadio IV de la oogénesis en los órganos de Bidder derecho e izquierdo. (Figura 14A- B- C- D). En el animal # 12 se encontró el oocito de mayor tamaño registrado en todos los tratamientos (1400 μm), en el cual se observó la morfología característica de un oocito perteneciente al estadio VI de la oogénesis: oocitos de color café oscuro bastante pigmentados, clara diferenciación entre polo animal y vegetal con una mayor concentración de pigmento oscuro en el lado animal y la vesícula germinal desplazada hacia este polo (Figura 15A- B). En el sapo # 8, también se encontró un oocito

de estadio IV (Figura 16B). Además, se observaron unas manchas negras en la región de unión al testículo, las cuales fueron encontradas durante la operación y después de los tratamientos (Figura 16A- C- C'- D).

5.3.3 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE ATRAZINA

Mediante los cortes histológicos y las micrografías se encontraron oocitos pertenecientes a los estadios I, II y III de la oogénesis (Figura 17A- B- C- D- D'). En las mediciones del diámetro máximo de los oocitos también se observaron diámetros pertenecientes a estos tres estadios arrojando un diámetro promedio para el órgano de Bidder derecho de 323 μm y para el órgano izquierdo de 322 μm . En el diagrama de caja de este tratamiento no se observaron datos atípicos; no obstante, se encontraron datos bastante alejados de las medias globales en los órganos de Bidder de ambos lados (Figura 10C).

El animal #3, perteneciente a este tratamiento, presentó una morfología y citología atípicas. En las micrografías de los órganos de Bidder de ambos lados se observaron manchas de color café claro que cubrían la mayor parte de dichos órganos. Además, al observar los cortes histológicos de este animal se encontraron grandes zonas con oocitos atrésicos y pocos oocitos desarrollados (Figura 18A- B- B'- C- D- D').

5.3.4 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE ATRAZINA Y PROGESTERONA

Mediante las micrografías y los cortes histológicos se encontró oocitos en estadios I, II, III y IV de la oogénesis; la mayoría de los cuales pertenecían al estadio II de la oogénesis (Figura 19A- B- C- D- E- F). Los oocitos en estadios I, II y III presentaron las características previamente descritas en las secciones 5.3.1 y 5.3.2. Los oocitos de estadio IV presentaron las características distintivas de los oocitos pertenecientes a este estadio

(Brown *et ál.*, 2002): pigmentación de color café oscuro en la totalidad del oocito, abundante cantidad de plaquetas de yema y vesícula germinal ligeramente desplazada hacia el polo animal con numerosos nucléolos ubicados en su periferia. El diámetro promedio del órgano de Bidder derecho fue de 405 μm y el izquierdo fue de 310 μm . En el diagrama de caja se encontraron datos atípicos por encima y debajo de la mediana en los órganos de Bidder derecho e izquierdo respectivamente, también se observó un dato no atípico localizado por encima de la mediana grupal (Figura 10D).

El único oocito en estadio IV de este tratamiento (709 μm), fue encontrado en el órgano de Bidder derecho del animal # 20 (Figura 20A- A'- B). En el animal # 22 se encontraron zonas con oocitos atrésicos en los órganos de Bidder izquierdo y derecho, claramente observables en las micrografías y en los cortes histológicos (Figura 21A- A'- B- B'- C- D- D').

6. DISCUSIÓN

6.1 ÓRGANO DE BIDDER, OVARIO Y TESTÍCULOS DE *Rhinella marina*.

En los vertebrados la producción de órganos reproductivos (ovario y testículos) sexualmente dimórficos es uno de los factores más importantes que determinan el éxito en la reproducción sexual (DeFalco y Capel, 2009). En un inicio las células germinales de las gónadas en vertebrados tienden a diferenciarse como ovario. Sin embargo, esta diferenciación será completada en hembras mientras que en machos será modificada (hacia la formación de testículos) mediante la inducción de las células somáticas de dichas gónadas (Falconi *et ál.*, 2007).

Similar al ovario de *Xenopus laevis*, el ovario de una hembra adulta de *Rhinella marina* posee oocitos mononucleados de diferentes estadios vitelogénicos rodeados de células foliculares. Los cuales, en cada estadio, presentan características citológicas y morfológicas únicas y distinguibles entre sí (Dumont, 1978; Brown *et ál.*, 2000). Brown *et ál.* (2002) describe dichas características en la tabla de oogénesis para *Rhinella marina*; debido a ello, esta tabla fue utilizada para determinar el estadio de la oogénesis en la que se encontraban los oocitos biderianos de cada tratamiento, los cuales también fueron comparados con los oocitos del pedazo de ovario extraído de la hembra comparación.

El órgano de Bidder y el testículo de *R. marina* presentan características morfológicas y citológicas distintas. Los testículos, son redondos compactos y de color amarillo-pálido, con espermatogonias y espermatozoides empaquetados en túbulos seminíferos (Oliveira *et ál.*, 2003; Brown *et ál.*, 2000), estructuras claramente observables en los cortes histológicos (Figura 4). Mediante los cortes también se pudo establecer que los machos orquidectomizados estaban sexualmente maduros ya que presentaron densas

concentraciones de espermatozoides y espermátidas dentro de los túbulos seminíferos (Zug y Zug, 1979). La madurez sexual también pudo ser determinada mediante la longitud boca-anano de los individuos colectados; estudios sugieren que los machos de la especie *Rhinella marina* son sexualmente maduros cuando alcanzan una longitud boca-anano de 85-95 mm (Zug y Zug, 1979); la longitud corporal promedio de los machos dentro de este estudio fue de 107 mm.

El órgano de Bidder, de color rosado-pálido y tamaño y forma variables, posee una típica morfología ovárica. Cada órgano, está cubierto por una delicada capa de tejido conectivo de la cual se extienden finas proyecciones hacia la porción interna, formando el estroma. También posee una médula, que contiene células sanguíneas, arterias, venas y células con melanina (manchas observadas en algunos individuos) y un cortex, con oocitos biderianos estructuralmente equivalentes a los oocitos previtelogénicos del ovario (Farias *et ál.*, 2002). La similitud morfológica de los oocitos biderianos con los oocitos del ovario permitió la determinación del estadio de la oogénesis de los oocitos biderianos en los machos orquidectomizados de este estudio.

En todos los tratamientos, se encontraron individuos con grandes o pequeñas regiones de oocitos atrésicos. Pancak-Roessler y Norris (1991), en su estudio sobre el efecto de las hormonas gonadotrópicas sobre el crecimiento del órgano de Bidder, también encontró oocitos atrésicos en algunos de los sapos pertenecientes a cada tratamiento aplicado (tanto en sapos orquidectomizados y no orquidectomizados expuestos a inyecciones de soluciones salinas como los que fueron expuestos a hormonas gonadotrópicas). Los oocitos atrésicos encontrados en este estudio, estaban localizados en diferentes partes del órgano de Bidder y en algunas ocasiones contenían depósitos pigmento de color café oscuro. Consecuentemente, la presencia de oocitos atrésicos es una

característica común dentro de este órgano ya que ha sido encontrada en algunos estudios del órgano de Bidder (Farias *et ál.*, 2002; Pancak-Roessler y Norris 1991). En los machos orquidectomizados de todos los tratamientos, excepto el control, también se pudieron encontrar pequeños gránulos de color café localizados en la periferia del ooplasma de los oocitos biderianos, equivalente a lo hallado por Pancak-Roessler y Norris (1991).

6.2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ÓRGANO DE BIDDER

En los anfibios, la presencia de un cromosoma sexual heteromórfico es bastante inusual; aproximadamente, solo el 4% de las especies de anfibios que han sido cariotipados poseen cromosomas sexuales citológicamente diferenciados (Norris y Lopez, 2011). La determinación sexual en los anfibios está controlada por genes que actúan como marcadores de genotipos sexuales; sin embargo, ninguno de estos genes es común para todas las especies (Eggert, 2004; Wallace *et ál.*, 1999). En cuanto al proceso de diferenciación sexual, la señal más temprana de diferenciación de las gónadas, que en un principio son órganos bipotenciales morfológicamente idénticos en machos y hembras, es una modificación en la localización de las células germinales.

Debido a ello, se conoce que factores epigenéticos pueden modificar los procesos de determinación y diferenciación sexual dentro de este grupo (Norris y Lopez, 2011). Algunos anfibios, exhiben un proceso inusual de diferenciación sexual, como es el caso de ciertas especies de la familia Bufonidae en las que el primordio gonadal anterior se diferencia en órgano de Bidder (ovario rudimentario) mientras que el primordio posterior se diferencia en ovario o testículo (Brown *et al.*, 2002). La aplicación de progesterona y atrazina exógenas (factores epigenéticos) en los machos orquidectomizados de *Rhinella marina* (Bufonidae) provocó un crecimiento en los oocitos del órgano de Bidder de los

machos orquidectomizados, claramente observable en el promedio del diámetro máximo de los oocitos biderianos durante la operación y posterior a los tratamientos (de 189 a 346 μm).

Las diferencias significativas en el ANOVA factorial y las comparaciones ortogonales indican que la tasa de crecimiento de los oocitos fue distinta en cada tratamiento aplicado; ya que para los órganos de Bidder derecho e izquierdo de los individuos pertenecientes a cada tratamiento se encontraron diferencias entre dichos tratamientos frente al control. Sin embargo, en el lado izquierdo las diferencias no fueron significativas solo mayores mientras que para el lado derecho estas diferencias si fueron significativas; esto pudo deberse a que en el lado derecho se registraron los oocitos de mayor diámetro en los tratamientos orquidectomía y administración de progesterona y orquidectomía y administración de atrazina y progesterona.

Las diferencias también se observan al analizar las medias de cada tratamiento; la media más alta perteneció al tratamiento progesterona (483 μm), seguida por el tratamiento atrazina más progesterona (358 μm), el tratamiento orquidectomía y administración de atrazina (322 μm) y finalmente el tratamiento orquidectomía: control, con una media de 218 μm ; lo que indica que cada compuesto actúa de forma distinta en el proceso de crecimiento de los oocitos biderianos y que la hormona progesterona fue más exitosa que el disruptor endócrino atrazina en la inducción de maduración. Esto también pudo comprobarse en las comparaciones ortogonales en las que se registraron diferencias significativas entre el tratamiento orquidectomía y administración de progesterona frente al tratamiento orquidectomía y administración de atrazina.

6.2.1 CONTROL: ORQUIDECTOMÍA

La remoción de los testículos sin la administración de hormonas y disruptores endócrinos, provocó un alargamiento del órgano de Bidder considerablemente notorio en los órganos derecho e izquierdo del individuo # 1 (Figura 11), y un incremento en el tamaño de los oocitos biderianos, equivalente a lo encontrado por Brown *et ál.* (2002) y Pancak-Roessler y Norris (1991). Al extraer los testículos, el órgano de Bidder crece y sus oocitos alcanzan estadios de la oogénesis superiores ya que se elimina el efecto inhibitorio de los testículos sobre el crecimiento de este órgano (Falconi *et ál.*, 2007). Este efecto, se cree que es producido por ciertas hormonas masculinas secretadas por los testículos que, al estar presentes, impiden el desarrollo del órgano de Bidder y sus oocitos (Zaccanti y Tognato, 1976).

Todos los oocitos encontrados en los individuos pertenecientes al tratamiento control: orquidectomía, aumentaron de tamaño (218 μm diámetro máximo promedio) y al ser comparados con en la tabla de oogénesis para *Rhinella marina* (Brown *et ál.*, 2002) se determinó que estos pertenecían al estadio I de la oogénesis después de los dos meses de administración de la solución salina. Pancak-Roessler y Norris (1991), en su estudio sobre el efecto de las hormonas gonadotropinas en el órgano de Bidder, obtuvieron resultados similares después de tratar a machos orquidectomizados con una solución salina durante un mes. La similaridad de resultados a diferentes tiempos puede ser explicada con el estudio de Brown *et ál.* (2002), el cual concluye que la mayor parte del incremento en el diámetro de los oocitos se produce después del primer mes de realizada la orquidectomía. Sin embargo, Brown *et ál.* (2002), obtuvieron oocitos de mayor diámetro dos meses después de realizada la orquidectomía. Esto puede deberse a que el diámetro máximo inicial de los oocitos del estudio de Brown *et ál.* (2002), fue mucho mayor al encontrado en este estudio.

6.2.2 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA

Se conoce que los esteroides son las principales hormonas que están involucradas en la inducción de la diferenciación sexual. Varios estudios sobre la aplicación de estas hormonas en embriones y larvas de anfibios han demostrado que existe una gran variedad de esteroides que causan reversión sexual en anfibios (Hayes, 1998; Norris y Lopez, 2011). Un estudio sobre el efecto de las hormonas esteroideas en el proceso de determinación sexual fue realizado por Padoa (1936), en el cual se demostró que el tratamiento de larvas de la especie *R. esculenta*, con estrógeno indujo la diferenciación de las larvas, produciendo una descendencia en la que el 100 % de los sapos eran machos.

La mayoría de estudios que prueban el efecto de la determinación sexual mediante la utilización de esteroides, han sido realizados en embriones y larvas de anfibios (Hayes, 1998; Norris y Lopez, 2011). En este estudio, se utilizó progesterona para promover el crecimiento de los oocitos del órgano de Bidder ya que a pesar de que fue utilizada en machos adultos su acción dentro del organismo fue dirigida a el órgano de Bidder, el cual posee oocitos previtelogénicos (Falconi *et ál.*, 2007; Brown *et ál.*, 2002; Farias *et ál.*, 2002).

El mecanismo de acción de la progesterona, observado en este estudio, está relacionado con el proceso de oogénesis. Evento complejo que involucra cambios moleculares y celulares durante la formación, crecimiento y maduración de las células germinales femeninas; cambios que prepararán a los oocitos para su posterior fertilización (Bravo, *et ál.*, 1978; Gilbert, 2010; Wolpert, *et ál.*, 2007; Norris y Lopez, 2011). Los oocitos del órgano de Bidder en los machos adultos de *R. marina*, se encuentran en estadios de la oogénesis previtelogénicos (estadios I y II); es decir que posiblemente han

alcanzado el arresto en profase I pero que no han empezado a acumular plaquetas de yema (Farias *et ál.*, 2002; Falconi *et ál.*, 2007; Gilbert, 2010).

La vitelogénesis, se produce después de que los oocitos han alcanzado el estadio III de maduración (400 μm de diámetro aproximadamente), proceso que consiste en la acumulación de plaquetas de yema necesarias para la posterior nutrición del embrión (Schuetz, 1974; Gilbert, 2010). Los oocitos del órgano de Bidder, por ende, lograrán estadios de la oogénesis mayores una vez que inicien el proceso de vitelogénesis. En este estudio, tanto la hormona progesterona como el disruptor endócrino atrazina fueron utilizados para inducir la iniciación de la vitelogénesis.

El ciclo hormonal en el ovario de las hembras adultas de los anfibios es el encargado de regular el proceso de crecimiento y maduración de los oocitos y de incitar las posteriores conductas reproductivas que conllevan a la fertilización y producción de embriones (Norris y Lopez, 2011; Redshaw, 1972). Señales ambientales favorables para la reproducción estimulan al hipotálamo para que produzca GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas); esta hormona migra a la pituitaria y estimula la producción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante FSH, las cuales viajan por el sistema sanguíneo hasta las células foliculares y estimulan la producción de estradiol (E_2) y progesterona (P_4). El estradiol es la hormona encargada de transportar las moléculas de vitelogenina (proteína precursora de las plaquetas de yema) producidas en el hígado, hacia los oocitos a través del sistema sanguíneo, mientras que la hormona progesterona está involucrada en el proceso de maduración nuclear en oocitos completamente desarrollados (oocitos estadio VI). Sin embargo, los niveles de producción de ambas hormonas varían dependiendo de la especie y sus estrategias reproductivas; por lo tanto, se considera que ambas hormonas actúan en sinergia para producir en la hembra un comportamiento

reproductivo y gatillar pasos moleculares que conducirán a la ovulación (Norris y Lopez, 2011, Browne *et ál.*, 2006).

El análisis estadístico en este estudio, confirmó que la hormona progesterona participó dentro del proceso de crecimiento ya que el tratamiento progesterona arrojó los resultados más significativos entre todos los tratamientos aplicados debido a que se obtuvo oocitos con un diámetro máximo por encima de la media grupal y del propio tratamiento (oocitos de estadios IV y VI). Las comparaciones ortogonales afirman lo dicho anteriormente ya que se encontró diferencias mayores en el lado izquierdo ($p = 0,07$) y diferencias altamente significativas en el lado derecho ($p = 0,007$), en los órganos de Bidder de los machos del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona frente a los machos control: orquidectomía.

Sin embargo, los datos atípicos, encontrados por encima y debajo de la media en el diagrama de caja del tratamiento progesterona (Figura 8; A), nos indican que este tratamiento fue parcialmente exitoso ya que la cantidad de oocitos crecidos obtenidos fue muy baja (solo un oocito estadio VI y pocos estadio IV). Esto pudo deberse a que las hormonas esteroides actúan de manera distinta en cada especie e incluso en cada individuo.

Estudios con varios tipos de esteroides en diferentes especies de anfibios demuestran que existe una gran variabilidad de resultados entre sí (Hayes, 1998; Wallace *et ál.*, 1999), sugiriendo que el efecto hormonal puede variar de especie en especie e incluso de organismo en organismo; dependiendo de la especie, esteroides exógenos pueden ser metabolizados a compuestos activos y más potentes. Los factores que producen dicha variabilidad pueden ser ambientales (temperatura, alimentación, tiempo y duración del tratamiento; entre otros) o intrínsecos del propio organismo (metabolismo) (Norris y Lopez, 2011).

Estudios *in vitro* han demostrado que la tasa de crecimiento de los oocitos depende críticamente de la disposición de vitelogenina en el medio circundante, del tipo de alimentación y del sistema hormonal del individuo (ya que la síntesis de esta proteína está controlada por hormonas) (Wallace y Bergink, 1974; Hausen y Riebesell, 1991). En animales jóvenes de *Xenopus laevis*, por ejemplo, se requiere un periodo de 1 a 1.5 años para producir oocitos completamente desarrollados, mientras que en hembras estimuladas con gonadotropinas solo se requieren dos meses (Hausen y Riebesell, 1991). También se ha determinado que la síntesis y fosforilación de nuevas cadenas vitelogenina son eventos altamente relacionados y que se requiere aproximadamente dos horas (dependiendo del metabolismo del organismo) para la síntesis de una nueva molécula de vitelogenina. Esto sugiere que, dentro de este estudio, posiblemente los factores tiempo o alimentación estuvieron involucrados en la producción del bajo número de oocitos crecidos. No obstante, los resultados presentados aquí, son significativos al ser comparados con otros estudios en los que se obtuvieron oocitos vitelogénicos que alcanzaron estadios III y IV en el proceso de ovogénesis (Brown, 2002; Pancak-Roessler y Norris 1991).

La concentración hormonal también pudo ser otro factor que influyó la obtención de un bajo número de oocitos crecidos. Para este estudio, la concentración de progesterona, inyectada diariamente, fue de 7 µg/ml. Un estudio realizado por Browne *et ál.* (2006) demuestra que esta concentración es la adecuada para la inducción de ovulación en hembras de la especie *Bufo fowleri* que presentan un número bajo de oocitos en estadio VI. Al pertenecer al mismo género se podría pensar que el efecto de la concentración de progesterona podría ser el mismo en machos *Rhinella marina* sin embargo la concentración usada en este estudio, pudo haber sido un factor determinante en la obtención de pocos oocitos de estadios posteriores ya que de la totalidad de los animales pertenecientes a este tratamiento, un solo animal (equivalente al 8,3 % de la totalidad) produjo un oocito estadio

VI, el cual al ser comparado con el promedio del diámetro máximo de los oocitos de este tratamiento fue considerablemente superior (449 μm de promedio general vs. 1.402 μm).

Otro factor que pudo influenciar el bajo número de oocitos crecidos fue el tipo de alimento ya que al ser poco variada (fundamentalmente grillos) pudo disminuir la concentración de las moléculas que son materia prima de la vitelogenina. Un adecuado suministro de alimentos es un factor externo que modifica el ciclo reproductivo de las hembras en anfibios. Usualmente, los sapos y las ranas almacenan sus suministros energéticos en cuerpos grasos de la cavidad abdominal; por lo tanto, la masa total de estos cuerpos es usada como indicador de la condición nutricional de individuo (Norris y Lopez, 2011). En este estudio, se encontraron cuerpos grasos bastante grandes en los animales sometidos a los distintos tratamientos; es decir, que dichos animales contaron con el adecuado suplemento nutricional. Consecuentemente, la poca variación en el tipo de alimentación no pudo influenciar el bajo número de oocitos obtenido.

A futuro, se recomienda ensayar el efecto de la progesterona sobre la maduración de los oocitos biderianos en machos de *Rhinella marina* a diferentes tiempos y/o concentraciones para determinar cuál fue la variable que produjo el bajo número de oocitos de estadios vitelogénicos posteriores.

6.2.3 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE ATRAZINA

Numerosos químicos fabricados por el hombre actúan dentro del metabolismo de los organismos imitando y alternado proceso fisiológicos estrógeno-dependientes. Estas sustancias químicas, llamadas disruptores endocrinos, producen alteraciones significativas e irreversibles en los procesos de reproducción y desarrollo a concentraciones extremadamente bajas. Los anfibios son altamente sensibles a estos compuestos ya que la mayoría de ellos requiere un ambiente acuático para su reproducción y desarrollo. El

control hormonal de la reproducción en anfibios es afectado por disruptores endocrinos mediante la alteración de la síntesis o liberación de las hormonas producidas durante el ciclo reproductivo femenino (Norris y Lopez, 2011; Diamanti-Kandarakis *et ál.*, 2009). En este estudio se utilizó atrazina (un tipo de disruptor endócrino) para provocar una alteración irreversible en el ciclo hormonal de la especie *Rhinella marina* y obtener oocitos de estadios oogénicos superiores mediante la exposición del lado ventral de los individuos al disruptor endocrino disuelto en el agua.

Entre otros efectos, la atrazina altera tejidos reproductivos masculinos en los organismos que han sido expuestos al químico durante el desarrollo, causando demasculinización y feminización en las gónadas de machos vertebrados (Hayes *et ál.*, 2011). En los anfibios, el efecto de este químico es mucho más fuerte ya que se activa a concentraciones mucho más bajas en comparación con otros taxa. La atrazina en este estudio fue utilizada para promover el proceso de crecimiento de los oocitos biderianos más que para observar los efectos deletéreos que causa este disruptor endócrino en los organismos; por ello los resultados sobre el efecto de este compuesto químico fueron observados únicamente en el órgano de Bidder de machos orquidectomizados. Cabe recalcar que, en este estudio, la inducción del crecimiento de los oocitos biderianos mediante la exposición de los animales a la atrazina no fue observada en machos no orquidectomizados; sin embargo, se han encontrado machos de *Rhinella marina* con testículos funcionales que han desarrollado oocitos biderianos de estadios vitelogénicos tardíos debido a la exposición de estos animales a disruptores endocrinos en zonas de alta actividad agrícola (McCoy *et ál.*, 2008). Debido a ello, se recomienda realizar este experimento a futuro en el laboratorio y en condiciones más controladas para determinar si los testículos pueden inhibir el efecto de la atrazina sobre el crecimiento de los oocitos del órgano de Bidder de machos de *Rhinella marina*.

Varios estudios han sido realizados para observar el efecto demasculinizante y feminizante que la atrazina posee durante el desarrollo embrionario de algunas especies de anfibios, en los cuales se observa una alteración en el proceso de desarrollo sexual en los machos de estas especies. Estas observaciones incluyen, anormalidades en el testículo, presencia de gónadas intersexadas, anormalidades en el órgano de Bidder (en las especies de la familia Bufonidae) e incluso la completa castración química de los machos (Hayes *et ál.*, 2002; Norris y Lopez, 2011; Hayes *et ál.*, 2010; Hayes *et ál.*, 2003).

En el tratamiento orquidectomía y administración de atrazina, la atrazina provocó el crecimiento de los oocitos biderianos de los machos orquidectmizados. Sin embargo, al ser comparados con la tabla de oogénesis de *Rhinella marina* (Brown, 2002), estos oocitos solamente alcanzaron los estadios II y III de la oogénesis. En el diagrama de caja, por ejemplo, a pesar de que existen datos alejados de la media no se observan datos atípicos. Igualmente, al comparar la media de este tratamiento (323 μm), con el promedio del tratamiento progesterona (484 μm), especialmente en el órgano de Bidder derecho, se encontraron diferencias significativas ($p = 0,05$). Lo que indica que este tratamiento fue menos exitoso que el tratamiento orquidectomía y administración de progesterona en el crecimiento de los oocitos biderianos.

Se cree que el mecanismo de acción de la atrazina dentro del organismo se debe a un incremento en la producción de la enzima aromataza P450; la cual es responsable de convertir andrógenos en estrógenos (testosterona a estradiol). Como consecuencia de su incremento, se produce un aumento en los niveles de estrógeno en los machos de varias especies de anfibios y peces (grupos en los que este efecto ha sido ampliamente estudiado) lo que finalmente provoca la feminización de los individuos. Este mecanismo de acción, sin embargo, no es concluyente en los anfibios ya que se ha observado que la aromataza

p450 puede ser activada mediante dos vías distintas en peces y mamíferos: activación mediante estrógenos a través de receptores de estrógenos (ERs) o mediante el factor esteroideogénico 1 (SF-1); vías que no han sido estudiadas aún en anfibios (Norris y Lopez, 2011). En este estudio, si se observaron los efectos feminizadores que provoca la conversión de andrógenos en estrógenos ya que se observó un incremento de tamaño en los oocitos del órgano de Bidder de los machos perteneciente a este tratamiento; sin embargo, dichos efectos no fueron pronunciados ya que no se encontraron oocitos biderianos de estadios vitelogénicos tardíos.

La ausencia de oocitos biderianos de estadios vitelogénicos tardíos pudo deberse a que posiblemente la concentración de atrazina dentro del tratamiento no fue la adecuada. En un estudio realizado por Hayes *et ál.* (2003) sobre el efecto feminizante de la atrazina a diferentes concentraciones en larvas de machos de la especie *Rana pipiens* se encontró que los efectos más pronunciados eran producidos cuando los renacuajos eran expuestos a las concentraciones más bajas de atrazina; es más la concentración que presentó los efectos más pronunciados fue 0,1 ppb (concentración que fue usada en este estudio). De igual manera, el uso de la atrazina como disruptor endocrino nunca había sido probado en especies terrestres adultas, por lo que se tuvo que idear un mecanismo mediante el cual los individuos estuvieran en contacto permanente con el químico (para imitar de alguna forma los estudios realizados en las larvas o especies acuáticas de anfibios).

Además del efecto feminizador en las gónadas masculinas, se conoce que la atrazina deteriora el sistema inmune aumentando la sensibilidad de los anfibios a infecciones (Norris y Lopez, 2011). La inmunodepresión, por tanto, posiblemente pudo ser otro factor que influyó en la obtención de oocitos de estadios vitelogénicos tempranos

únicamente (oocitos de estadios II y III de la oogénesis). No obstante, ninguno de los animales dentro de este tratamiento presentaron enfermedades o infecciones notorias; es más su peso y tamaño fue mayor después de los dos meses de tratamiento, lo que indica que comían regularmente y que su estado de salud era el apropiado.

6.2.4 ORQUIDECTOMÍA Y ADMINISTRACIÓN DE ATRAZINA Y PROGESTERONA

Al observar los resultados del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona, orquidectomía: control y orquidectomía y administración de atrazina por separado. Se puede inferir que los resultados obtenidos dentro del tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona se deben en gran parte a la acción de la progesterona más que a la acción de la atrazina y que además ambos compuestos no presentan una acción sinérgica. Las comparaciones ortogonales dentro del tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona, a diferencia del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona, no arrojan diferencias significativas cuando es comparado con los demás tratamientos; similar a lo que ocurre en el tratamiento atrazina. Sin embargo, se pueden encontrar un mayor número oocitos de estadio mayores de oogénesis (III y IV), lo que indica que posiblemente la hormona progesterona es la que indujo el crecimiento en los oocitos mencionados.

De igual manera, al comparar el diámetro máximo promedio de los oocitos de este tratamiento (358 μm) con los diámetros máximos promedios de los otros tratamientos se puede observar que si se produjo un crecimiento en los oocitos del órgano de Bidder de los machos pertenecientes a este tratamiento pero que dicho crecimiento no se compara con la obtenida en el tratamiento progesterona. Dichas aseveraciones no se pueden corroborar debido a que estos dos compuestos nunca han sido probados de manera conjunta en estudios anteriores.

7. CONCLUSIONES

1. La orquidectomía en machos de la especie *Rhinella marina* provoca la iniciación de la vitelogénesis y el crecimiento en los oocitos biderianos mediante la eliminación del efecto inhibitor de los testículos.
2. La administración de compuestos exógenos (progesterona y atrazina) mejoran los efectos de la orquidectomía sobre los oocitos del órgano de Bidder incentivando su crecimiento a estadios vitelogénicos posteriores (III, IV y VI).
3. La vitelogenina presente en el medio circundante determina el grado de crecimiento de los oocitos biderianos.
4. Procesos estrógeno-dependientes regulan la síntesis y transporte de vitelogenina y la posterior formación y almacenamiento de las plaquetas de yema.
5. Estos oocitos alcanzan estadios vitelogénicos posteriores cuando el animal posee los mecanismos y materiales necesarios para el proceso de acumulación de materiales de reserva (vitelogénesis).
6. La hormona progesterona indujo un mayor crecimiento en los oocitos biderianos en relación al disruptor endógeno atrazina en machos de la especie *Rhinella marina*.
7. No existe una sinergia entre el efecto de la atrazina y la progesterona en la maduración de los oocitos del órgano de Bidder de machos orquidectomizados de *Rhinella marina*.

8. LITERATURA CITADA

- Amphibian Ark. 2009. Keeping threatened amphibian species afloat. The Amphibian Extinction Crisis. [en línea]. <<http://www.amphibianark.org/extinctioncrisis.htm>> [Consultado: Marzo del 2010].
- Amphibian Web. 2010. Worldwide Amphibian Declines: How big is the problem, what are the causes and what can be done? [en línea] <<http://amphibiaweb.org/declines/declines.html>> [Consultado: Abril del 2010].
- Bill, S. 2002. Developmental biology: An arresting activity. *Nature* 416: 804 - 805.
- Blood, D., Studdert, V., Gay, C. 2007. Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary. 3th Edition. Saunders Elsevier. Edinburgh-Scotland.
- Brown, F., del Pino, M. E., Krohne, G. 2002. Bidder's organ in the toad *Bufo marinus*: Effects of orchidectomy on the morphology and expression of lamina-associated polypeptide 2. *Development, Growth and Differentiation* 44: 527 - 535.
- Browne, R., Li, H., Seratt, J., Kouba, A. 2006. Progesterone improves the number and quality of hormone induced Fowler toad (*Bufo fowleri*) oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4 : 3.
- Cannatella, D., L. Ford, y L. Bockstanz. 2001. Neobatrachia: "higher" frogs. [en línea]. University of Arizona. <<http://phylogeny.arizona.edu/tree/eukaryotes/animals/chordata/salientia/neobatrachia.html>> [Consultado: Febrero del 2010].

- Coloma, L. A. 2010. Anfibios de Ecuador. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. [en línea].
<<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/amphibiawebec/anfibiosecuador/index.html>> [Consultado: Marzo del 2010].
- Coloma, L., Quiguango-Ubillús, A., Félix-Novoa, C. 2007. Amphibiaweb Ecuador.
Rhinella marina. [en línea].
<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/amphibiawebec/especies/anura/bufo_nidae/marinus/index.html> [Consultado: Marzo del 2010].
- DeFalco, T y Capel, B. 2009. Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End. *Cell and Developmental Biology*. 25: 457 - 482.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J., Giudice, L., Hauser, R., Prins, G., Soto, A., Zoeller, T., Gore, A. 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* 30(4): 293 - 342.
- Duellman, W & Trueb, L. 1986. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill Publishing Company. Baltimore-USA.
- Dumont, J y Brummett, A. 1978. Oogénesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *Journal of Morphology*. 155: 73 - 98.
- Echeverria, D. 1990. Organogénesis y ciclos estacionales del órgano de Bidder en las larvas de *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología* 5(1): 1-9.
- Eggert, C. 2004. Sex determination: the amphibian models. *Reproduction Nutrition Development*. 44: 539 - 549.

- Falconi, R., Dalpiaz, D., Zaccanti, F. 2007. Morphological Aspects of Gonadal Morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura): Bidder's Organ Differentiation. *The Anatomical Record* 290: 801 – 813.
- Falconi, R., Dalpiaz, D., Zaccanti, F. 2004. Ultrastructural Aspects of Gonadal Morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura) 1. Sex Differentiation. *Journal of Experimental Zoology*. 301a: 378 – 388.
- Farias, C., Carvalho-e-Silva, S., de Brito-Gitirana, L. 2002. Bidder's organ of *Bufo ictericus*: a light and electron microscopy analysis. *Micron* 33 (7-8): 673 - 679.
- Fort, D. 2005. Final Report: Validation of a Rapid Progestin-Based Endocrine Disruption Screening Assay. [en línea].
<http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/6103/report/F> [Consultado: Mayo del 2011].
- Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F. B., De Sá, R. O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S. C., Raxworthy, C. J., Campbell, J. A., Blotto, B. L., Moler, P., Drewes, R. C., Nussbaum, R. A., Lynch, J. D., Green, D. M. & Wheeler, W. C. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297: 1 - 370.
- Ghosh A., Ghosh D., Ghosh P., Biswas N. 1990. Influence of pituitary on histology of Bidder's organ in castrated toad *Bufo melanostictus*. *Indian Journal of Experimental Biology*. 28 (8): 790 - 1.
- Gilbert, S. 2010. *Developmental Biology*. Ninth Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Massachusetts-USA.

- Hayes, T. 1998. Sex Determination and Primary Sex Differentiation in Amphibians: Genetic and Developmental Mechanisms. *The Journal of Experimental Zoology*. 281: 373 – 399
- Hayes, T., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A., Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *PNAS* 99 (8): 5476 – 5480.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. 2003. Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and Field Evidence. *Environmental Health Perspectives*. 111 (4): 568-575.
- Hayes, T., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S. 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *PNAS* 107 (10): 4612 - 4617.
- Hayes, T., Anderson, L., Beasley, V., Solla, S., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, V., Luque, E., McCoyk, K., Muñoz-de-Toro, M., Oka, T., Oliveira, C., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, L., Trudeau, V., Victor-Costa, A., Willingham, E. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. [Epub ahead of print].
- Hausen, P y Riebesell, M. 1991. The early development of *Xenopus laevis*: An Atlas of the Histology. Springer-Verlag. Berlin-Germany.

- Insciences Organization. 2009. Biologist Karen Lips Investigates Amphibian Extinction Mystery. [en línea]. <http://insciences.org/article.php?article_id=4151> [Consultado: Marzo del 2010].
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2010. IUCN Red List Status, Amphibians. [en línea]. <<http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/red-list-status>> [Consultado: Marzo del 2011].
- La Marca, E., Lips, K., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibañez, R., Rueda-Almonacid, J., Schutle, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Pupo, J., García-Pérez, J., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, A., Toral, E., Young, B. 2005. Catastrophic Populations Declines and Extinctions in Neotropical Harlequin Frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37(2): 190-201.
- Lee, L. 1960. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3th Edition. McGraw Hill Publishers. New York-USA.
- Liu, J. 2006. *Xenopus* protocols: cell biology and signal transduction. Human Press. New Jersey-USA.
- McCoy, K., Bortnick, J., Campbell, C., Hamlin, H., Guillette, L., Colette, M. 2008. Agriculture Alters Gonadal Form and Function in the Toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives* 116(11): 1526-1532.
- National Cancer Institute. 2010. National Institutes of Health. Dictionary of Cancer Terms: orchidectomy. [en línea]. <<http://www.cancer.gov/dictionary/?CdrID=318820> > [Consultado: Febrero del 2010].

- National Health and Medical Research Council. 2008. Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes. [en línea].
<http://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/file/publications/synopses/ea18.pdf>
[Consultado: Marzo del 2011].
- Norris, D y López, K. 2011. Hormones and Reproduction of Vertebrates. Volume 2: Amphibians. Elsevier Inc. San Diego-USA.
- Oliveira, C., Aline, C., Omena, P., Santos, L., Zieri, R. 2003. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. Biociencias. 11 (1): 39-46.
- Pancak-Roessler, M., Norris, D. 1991. The Effects of Orchidectomy and Gonadotropins on Steroidogenesis and Oogenesis in Bidder's Organs of the Toad *Bufo woodhousii*. The Journal of Experimental Zoology 260: 323-336.
- Pauly, G., Hillis, D., Cannatella, D. 2009. Taxonomic Freedom and the Role of Official Lists of Species Names. Herpetologica. 65(2): 115–128.
- Petrino, T y Schuetz, A. 1987. Cholesterol mediation of progesterone production and oocyte maturation in cultured amphibian (*Rana pipiens*) ovarian follicles. Biology of Reproduction. 36(5):1219-28.
- Powell, J., Bolaños, R., Chaves, F., Ponce, P. 2008. *Rhinella marina*. En: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. [en línea].
<<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/41065/0/print>>. [Consultado: Marzo del 2010].

- Pramuk, J. 2006. Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* 146: 407-452.
- Pramuk, J. B., Robertson, J. B., Sites, J. W. & Noonan, B. P. 2008. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography* 17: 72-83.
- Redshaw, M. 1972. The Hormonal Control of the Amphibian Ovary. *American Zoologist* 12 (2): 289-306.
- Robinson, M. 1998. A field guide to frogs of Australia: from Port Augusta to Fraser Island including Tasmania. Reed-New Holland.
- Ron, S., Duellman, W., Coloma, L., Bustamante, M. 2003. Population Decline of the Jambato Toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology* 37 (1): 116–126.
- Schuetz, A. 1974. Role of Hormones in Oocyte Maturation. *Biology of Reproduction* 10: 150-178.
- Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D., Waller, R. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*. 306: 1783-1786.
- Solís, F., Ibáñez, R., Hammerson, G., Hedges, B., Diesmos, A., Matsui, M., Hero, J.-M., Richards, S., Coloma, L., Ron, S., La Marca, E., Hardy, J., Powell, R., Bolaños, F., Chaves, G. & Ponce, P. 2008. *Rhinella marina*. en: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. [en línea]. <www.iucnredlist.org>. [Consultado: Marzo del 2011].

- The Center for Regulatory Effectiveness. 2003. Atrazine.us-Use & Conservation Tillage. [en línea]. <<http://www.thecre.com/atrazine/use.htm>>. [Consultado: Mayo del 2011].
- The Taxonomicon. 2011. Taxon: *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758). [en línea]. <<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1395877&tree=0.1>>. [Consultado: Mayo del 2011].
- Wallace, H., Badawy, G., Wallace, B. 1999. Amphibian sex determination and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55: 901-909.
- Wallace, R y Bergink, E. 1974. Amphibian Vitellogenin: Properties, Hormonal Regulation of Hepatic Synthesis and Ovarian Uptake, and Conversion to Yolk Proteins. *American Zoologist* 14 (4): 1159-1175.
- Wallace R y Selman K. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *Journal of Electron Microscopy Technique*. 16(3):175-201.
- Wolpert, L., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. 2007. *Principles of Development*. Third Edition. Oxford University Press. New York-USA.
- Wright, K y Whitaker, B. 2001. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Krieger Publishing Company. Florida-USA.
- Zaccanti, F., Tognato, G. 1976. Effects of different doses of diethylstilbestrol dipropionate on the Bidder's organ of intact or orchidectomized adult males of *Bufo bufo*. *Monitore Zoology*. 10:105-117.

Zug, G. y Zug, P. 1979. The Marine Toad, *Bufo marinus*. A Natural History Resume of Native Populations. Smithsonian Institution Press. Washington-USA.

9. FIGURAS

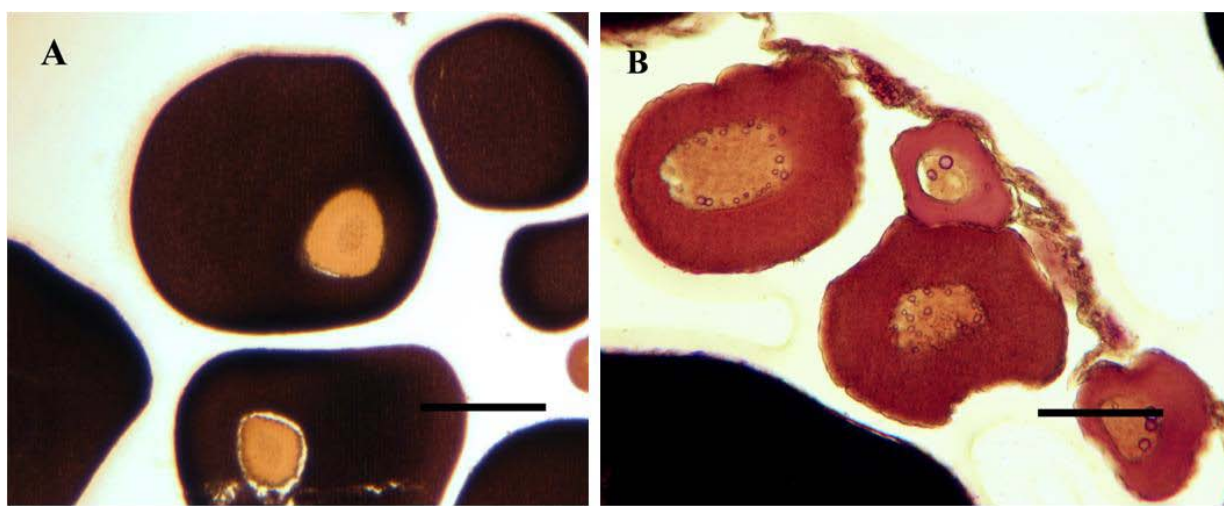


Figura 1. Cortes histológicos del ovario de *Rhinella marina* hembra comparación. (A) Oocitos estadio V, (B) oocitos estadio II (esquina superior derecha) y estadio I (centro). Las barras representan 500 μm (A); 125 μm (B). Los estadios de la ovogénesis de esta figuras y las siguientes fueron determinados mediante la comparación de las características morfológicas y el diámetro de los oocitos con la tabla de ovogénesis descrita por Brown *et al* (2002), para la especie *Rhinella marina* (Anexo 5).

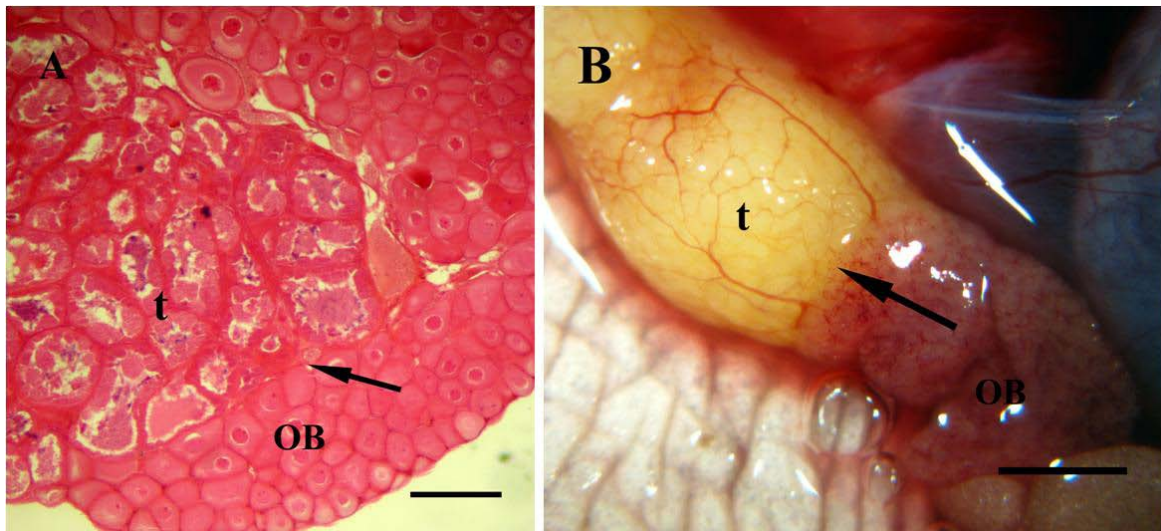


Figura 2. Zona de transición testículo-órgano de Bidder. (A) Corte histológico del órgano de Bidder izquierdo, animal # 12 del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona después de los dos meses de tratamiento. (B) micrografía del órgano de Bidder izquierdo animal # 10 previo al tratamiento orquidectomía y administración de progesterona en donde se observan claramente las diferencias morfológicas entre ambas estructuras. Las flechas indican la zona de transición. La barra representa 500 μ m (A); 2 mm (B). t, testículo; OB, órgano de Bidder.



Figura 3. Testículo *Rhinella marina*. Micrografía del testículo derecho del macho # 1 del tratamiento control: orquidectomía. La parte superior más gruesa (flecha) corresponde al sitio de unión con el órgano de Bidder. La barra representa 2 mm.

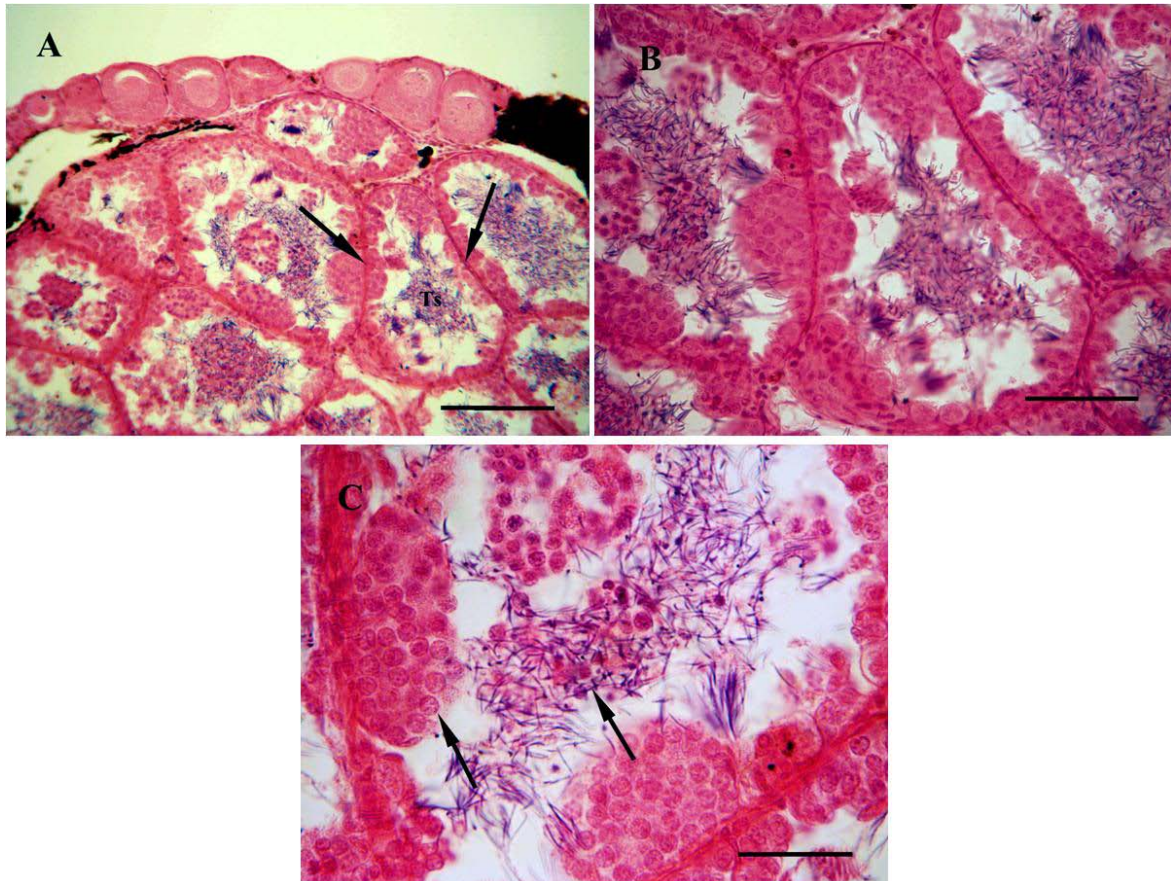


Figura 4. Cortes histológicos testículo *Rhinella marina*, testículo derecho animal # 1 tratamiento control: orquidectomía. (A) Testículo rodeado de oocitos pertenecientes al órgano de Bidder. Las flechas señalan un túbulo seminífero; Ts. (B) Mayor magnificación de un túbulo seminífero. (C) espermatozoides de *R. marina*. Flecha superior zquierda, espermatocito; flecha inferior derecha espermatozoides. La barra representa 200 μm (A); 100 μm (B); 50 μm (C).

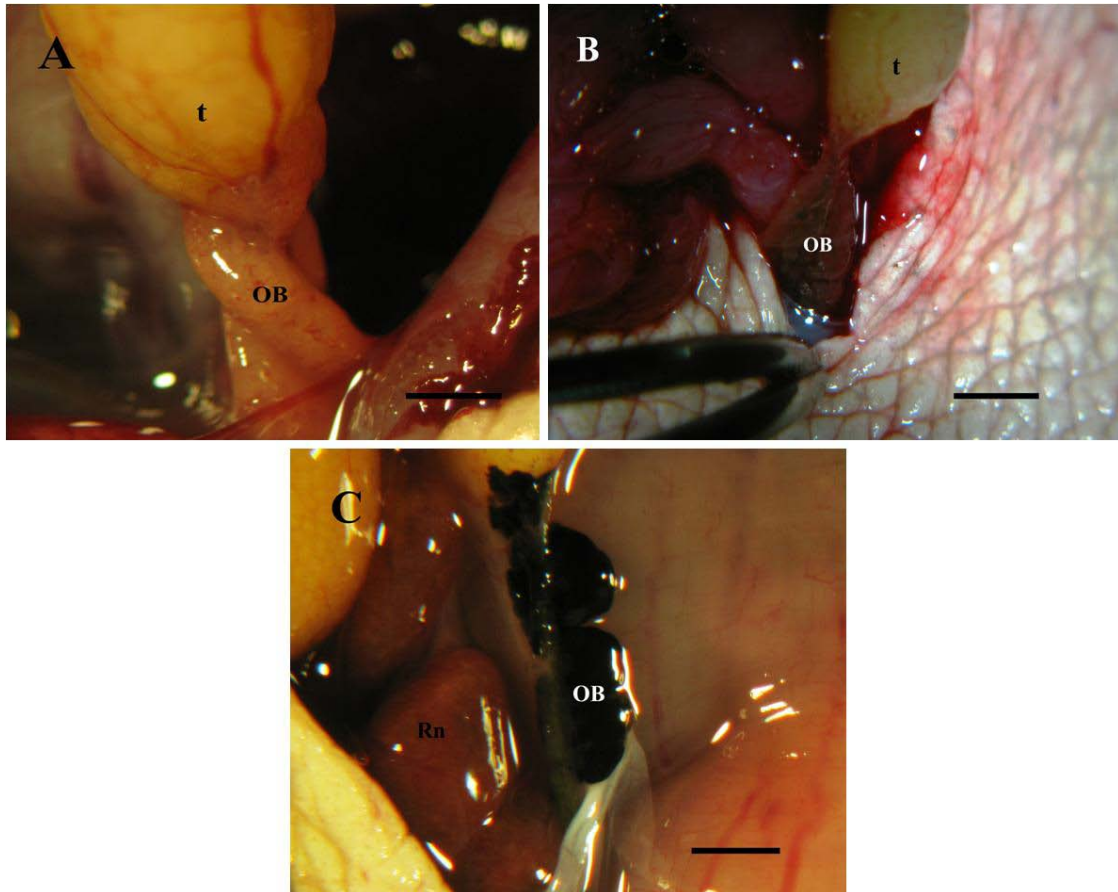


Figura 5. Órgano de Bidder *Rhinella marina* previo a los tratamientos. (A) típica morfología del Órgano de Bidder, órgano de Bidder derecho animal # 10 del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona. (B) órgano con pigmentación en determinadas zonas, órgano de Bidder derecho animal # 9 del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona. (C) órgano totalmente pigmentado, órgano de Bidder izquierdo animal # 1 del tratamiento control: orquidectomía. t, testículo; OB, órgano de Bidder; Rn, riñón. La barra representa 1 mm (A); 2 mm (B y C).

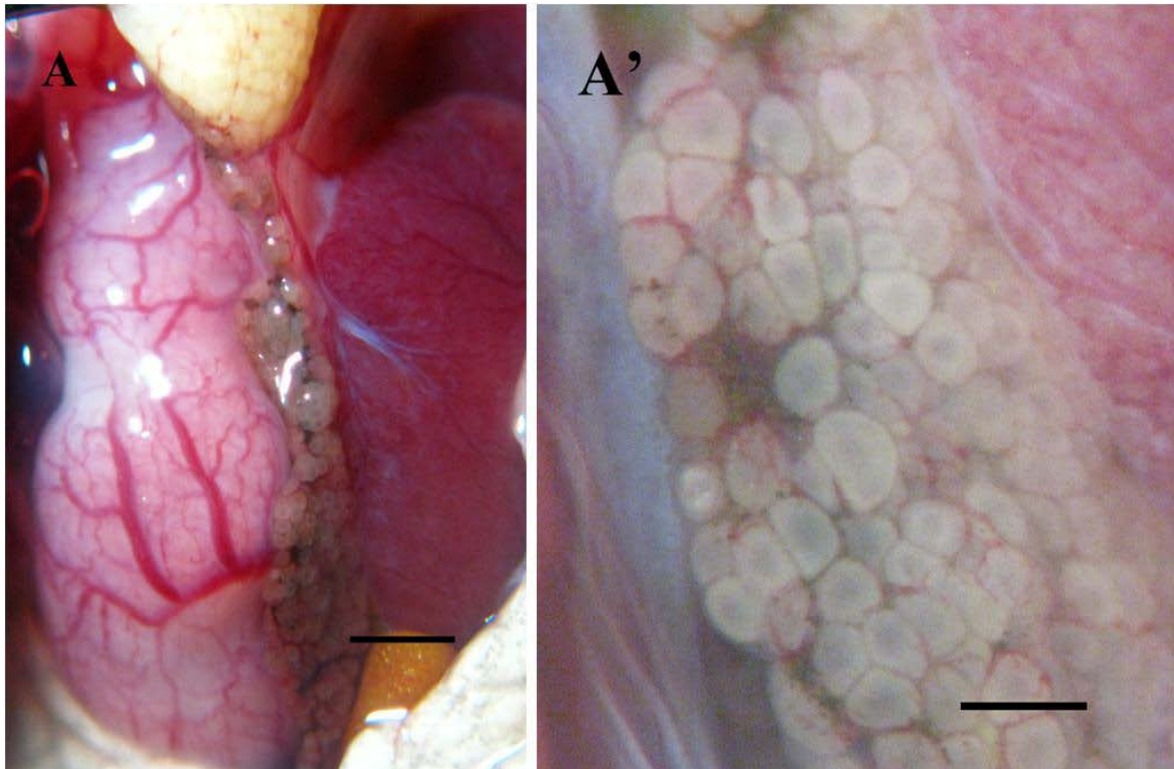


Figura 6. Oocitos del órgano de Bidder previo a los tratamientos. Oocitos estadio I del órgano de Bidder derecho, animal # 13 del tratamiento orquidectomía y administración de atrazina. Se observa claramente la vesícula germinal a través de los oocitos transparentes. La barra representa 2 mm (A); 200 μ m (A').

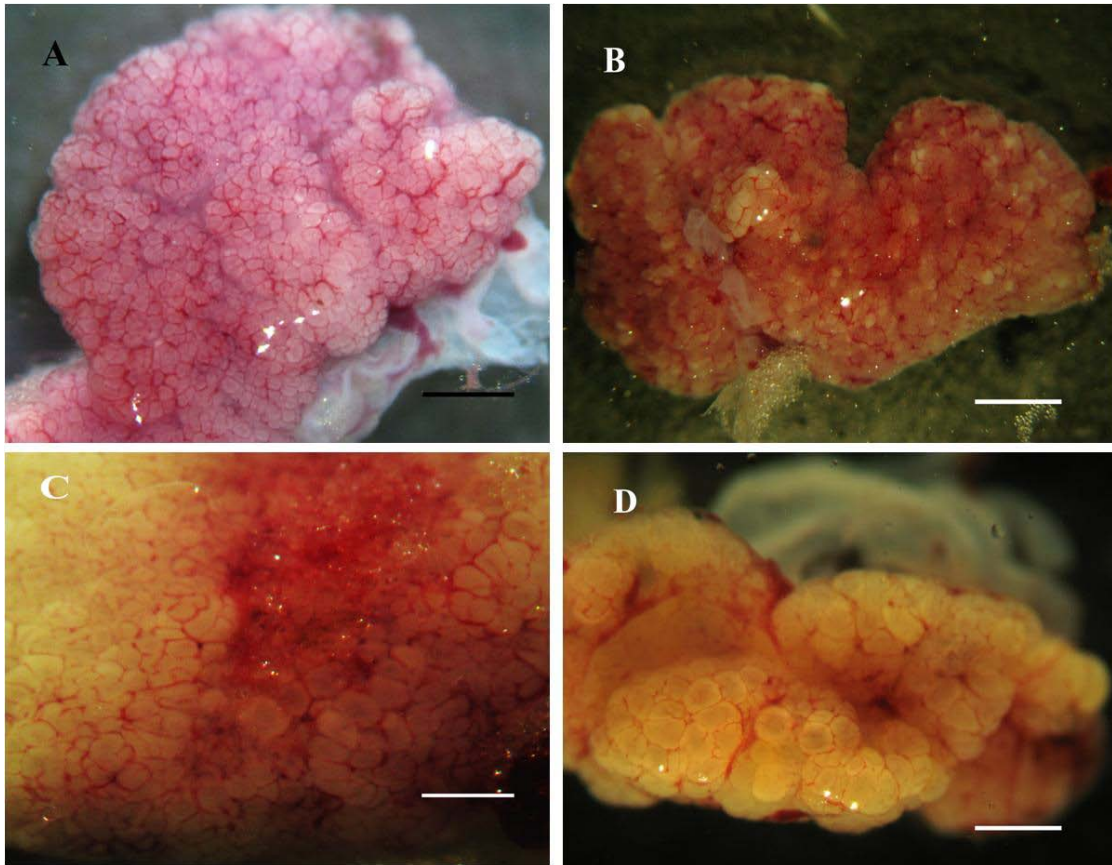


Figura 7. Órganos de Bidder después de los tratamientos. Órganos de Bidder y oocitos altamente vascularizados después de los dos meses de tratamiento. (A) animal # 2 del tratamiento control: orquidectomía (B) animal # 10 del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona. (C) animal # 15 del tratamiento orquidectomía y administración de atrazina. (D) animal # 24 del tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona. La barra representa 1 mm (A); 1,8 mm (B); 400 μm (C); 700 μm (D).

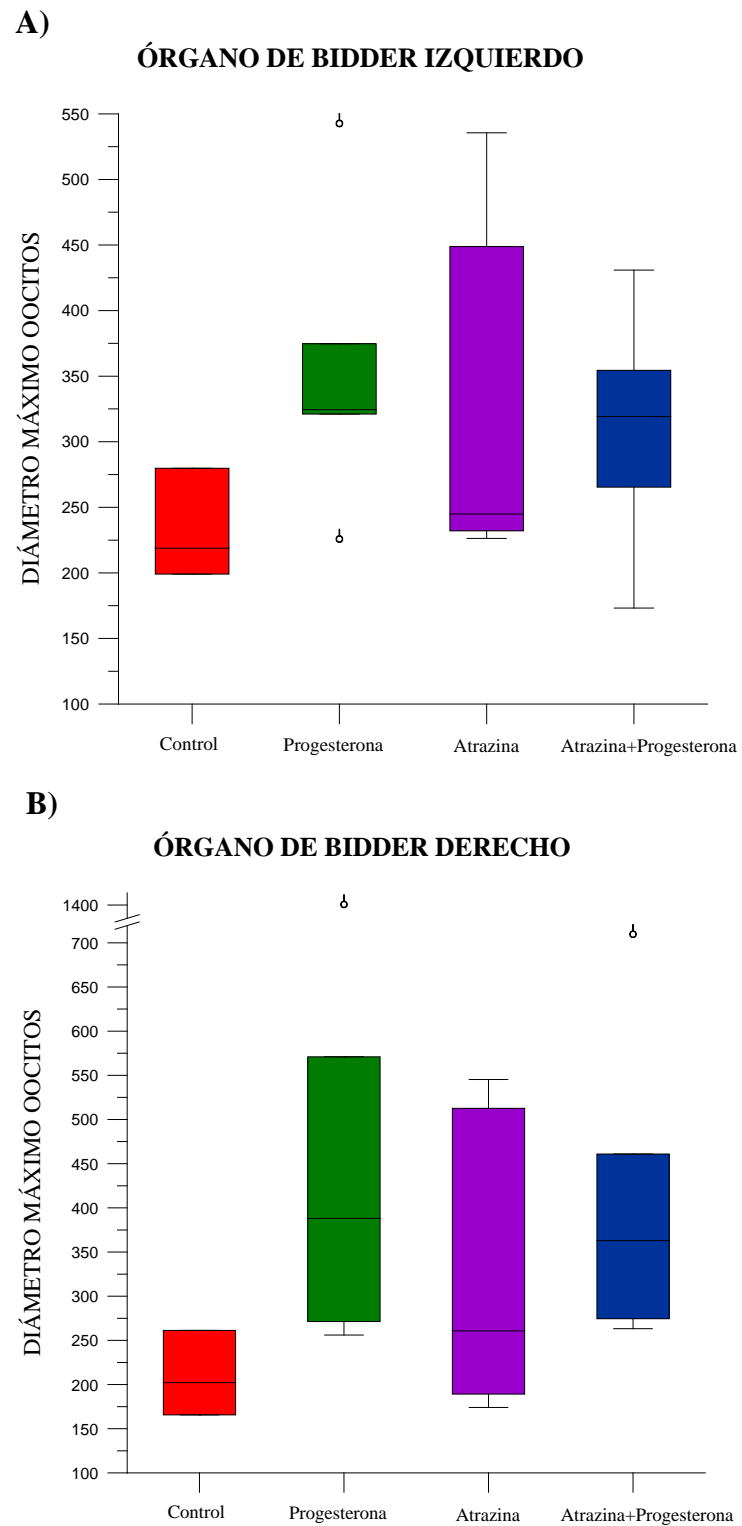


Figura 8. Diagramas de caja del diámetro máximo de los oocitos de los órganos derecho e izquierdo de los machos orquidectomizados.

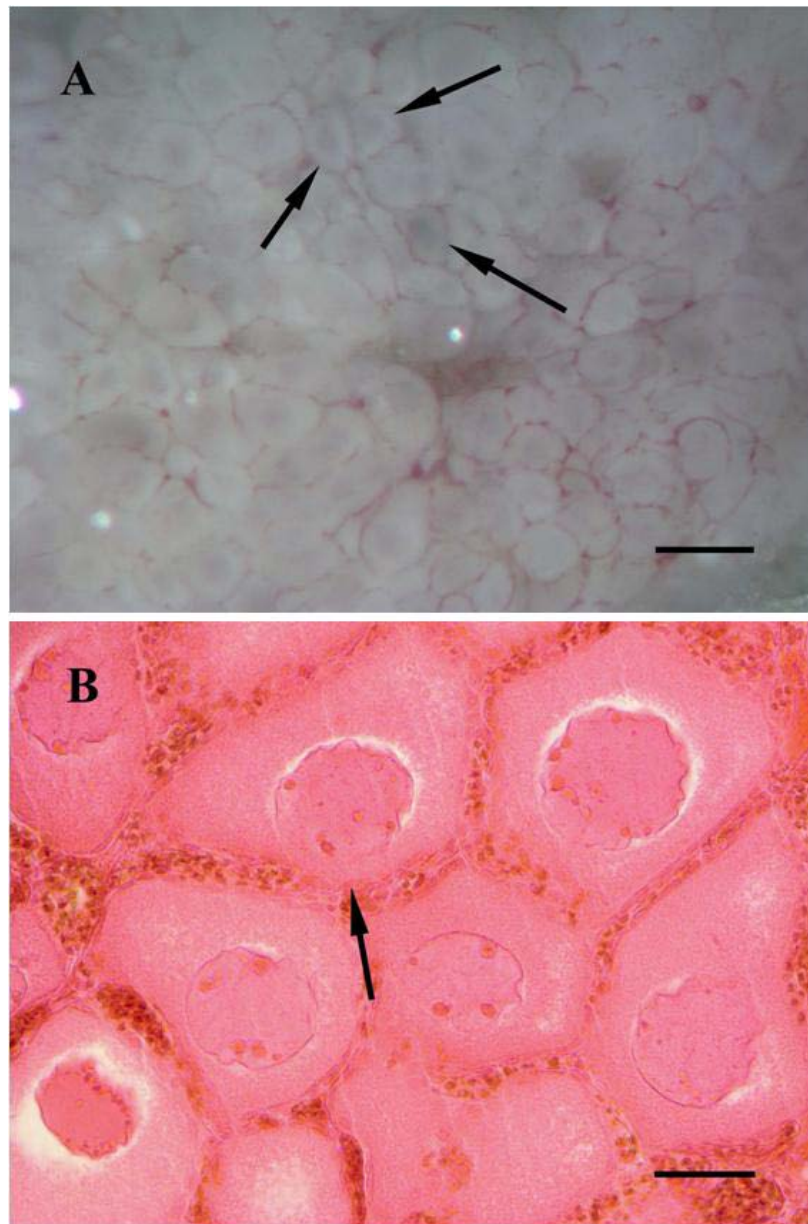


Figura 9. Oocitos tratamiento control: orquidectomía. (A) oocitos macho control # 6, órgano de Bidder derecho. Las flechas señalan oocitos en estadio I de la oogénesis; transparentes, vesícula germinal visible. (B) oocitos macho control # 2, órgano de Bidder derecho. La flecha indica un oocito estadio I, núcleo con numerosos nucléolos distribuidos aleatoriamente. La barra representa 250 μm (A); 60 μm (B).

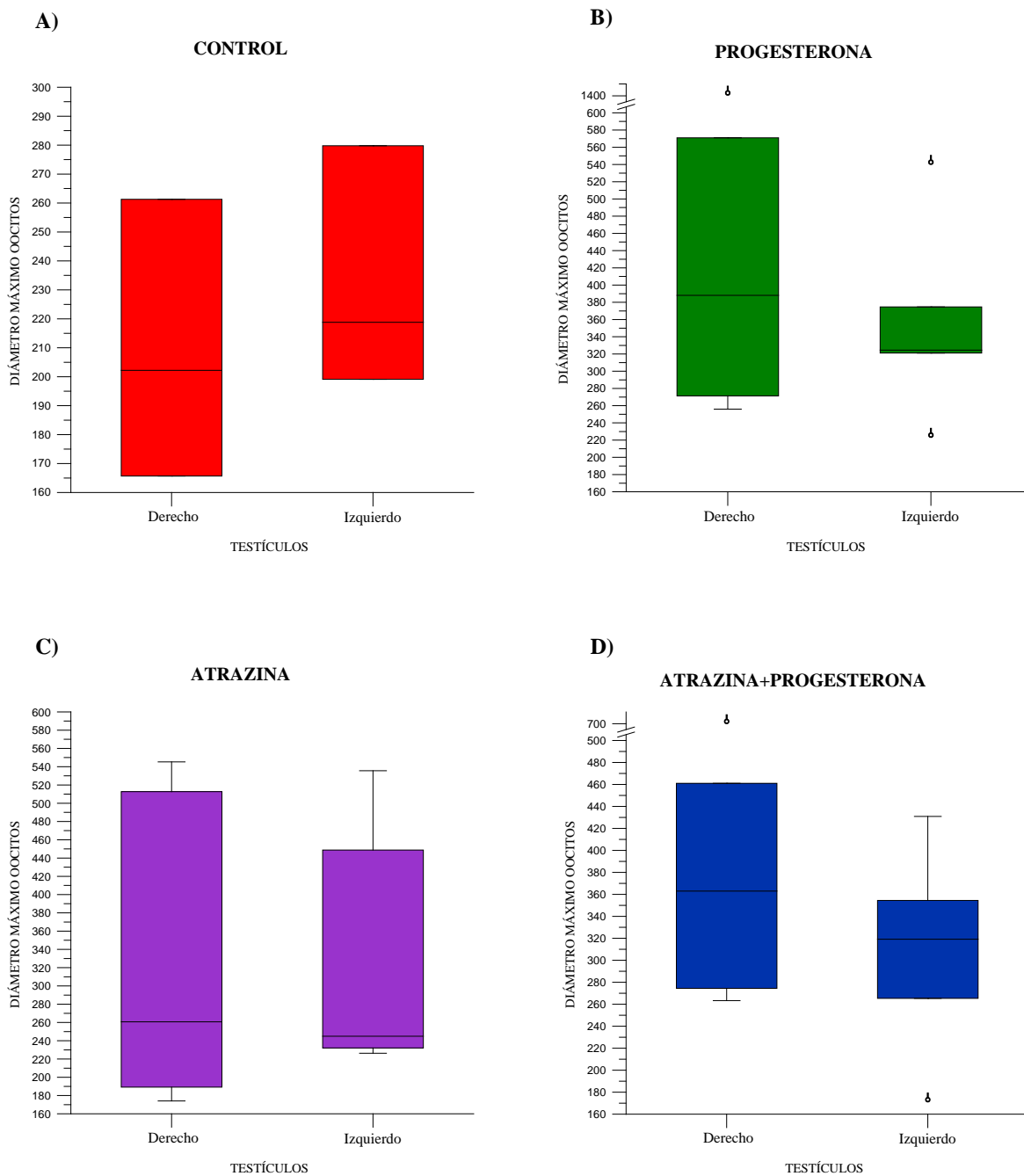


Figura 10. Diagramas de caja del diámetro máximo de los oocitos de los órganos de Bidder por tratamiento. (A) control: orquidectomía; (B) orquidectomía y administración de progesterona; (C) orquidectomía y administración de atrazina; (D) orquidectomía y administración de atrazina y progesterona.

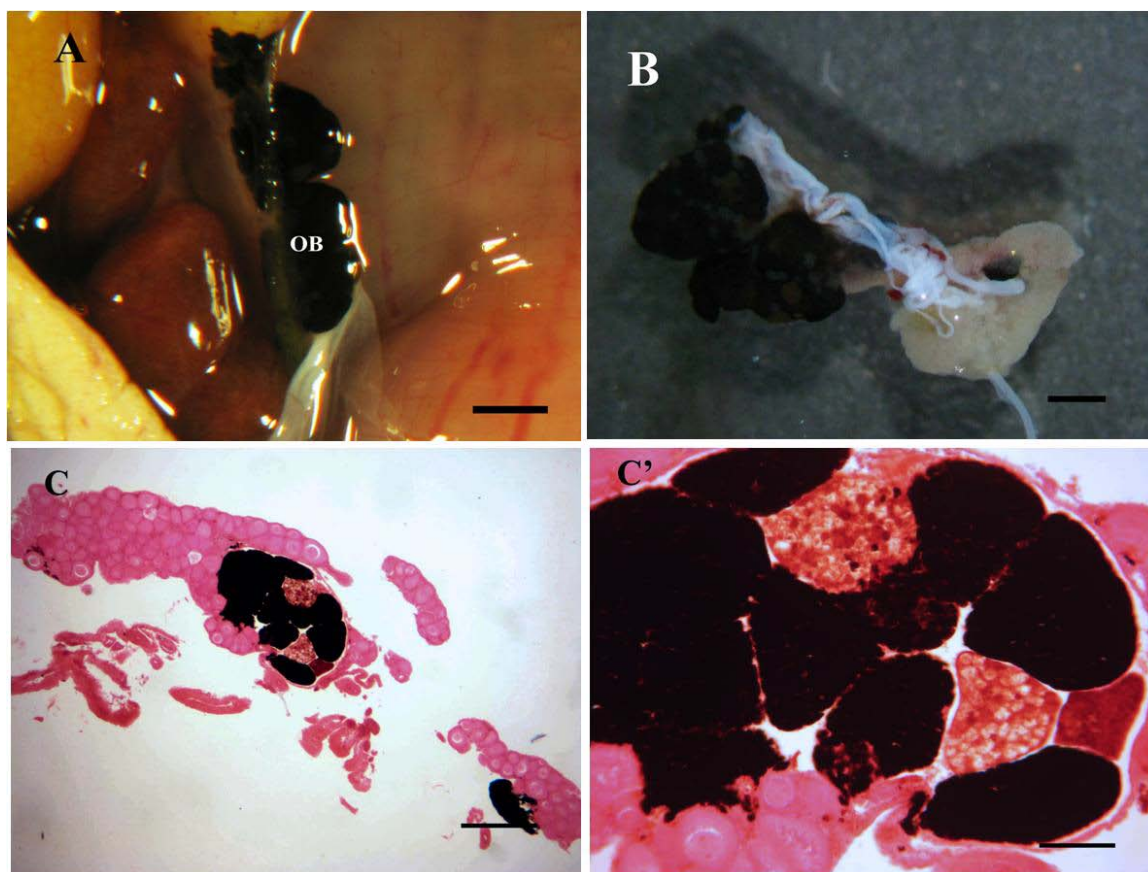


Figura 11. Órgano de Bidder izquierdo macho # 1 tratamiento control: orquidectomía. (A) micrografía del órgano de Bidder previo al tratamiento. (B) micrografía del órgano de Bidder después de los dos meses de tratamiento, se observa una clara proliferación de oocitos. (C) corte histológico. Las barras representan 1 mm (A); 960 μm (B); 480 μm (C); 120 μm (C').

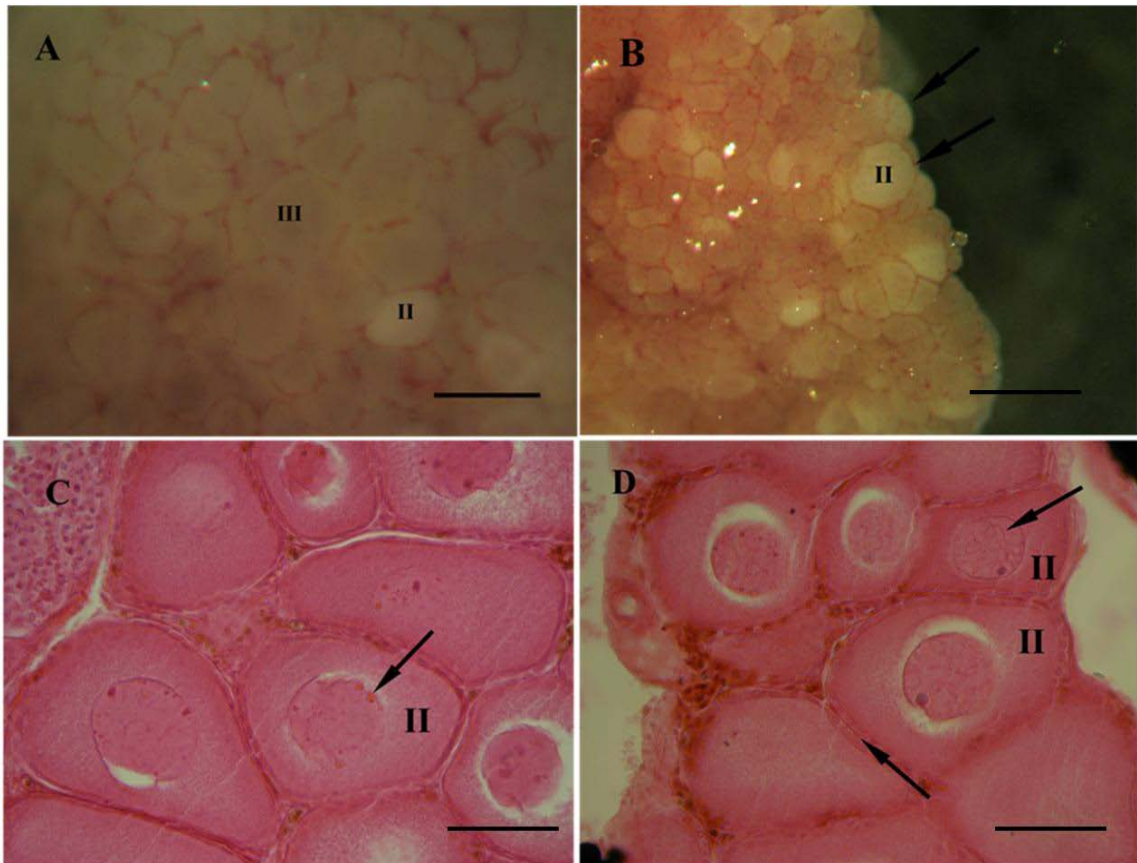


Figura 12. Oocitos tratamiento orquidectomía y administración de progesterona. (A) oocitos del órgano de Bidder izquierdo del macho # 9. (B) oocitos del órgano de Bidder derecho del macho # 10. Las flechas señalan oocitos estadio II altamente vascularizados. (C) oocitos órgano de Bidder izquierdo macho # 7. La flecha indica un oocito de estadio II con la vesícula germinal con numerosos núcleos ubicados en la periferia. (D) oocitos órgano de Bidder derecho individuo # 10. Flecha superior derecha, señala cromosomas dentro del núcleo. Flecha inferior izquierda, pared de células foliculares. Los números romanos indican el estadio de la oogénesis de los oocitos. La barra representa 200 μm (A); 700 μm (B); 90 μm (D y C).

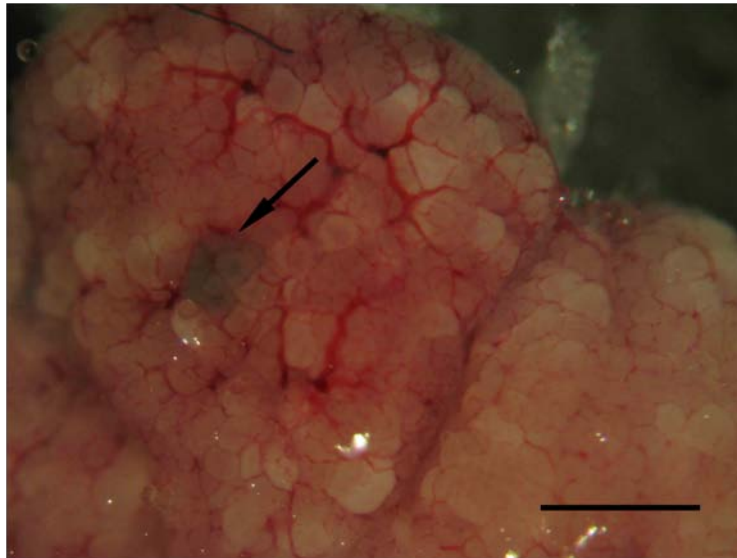


Figura 13. Oocitos estadio IV órgano de Bidder derecho animal # 10 tratamiento orquidectomía y administración de progesterona. La barra representa 1 mm.

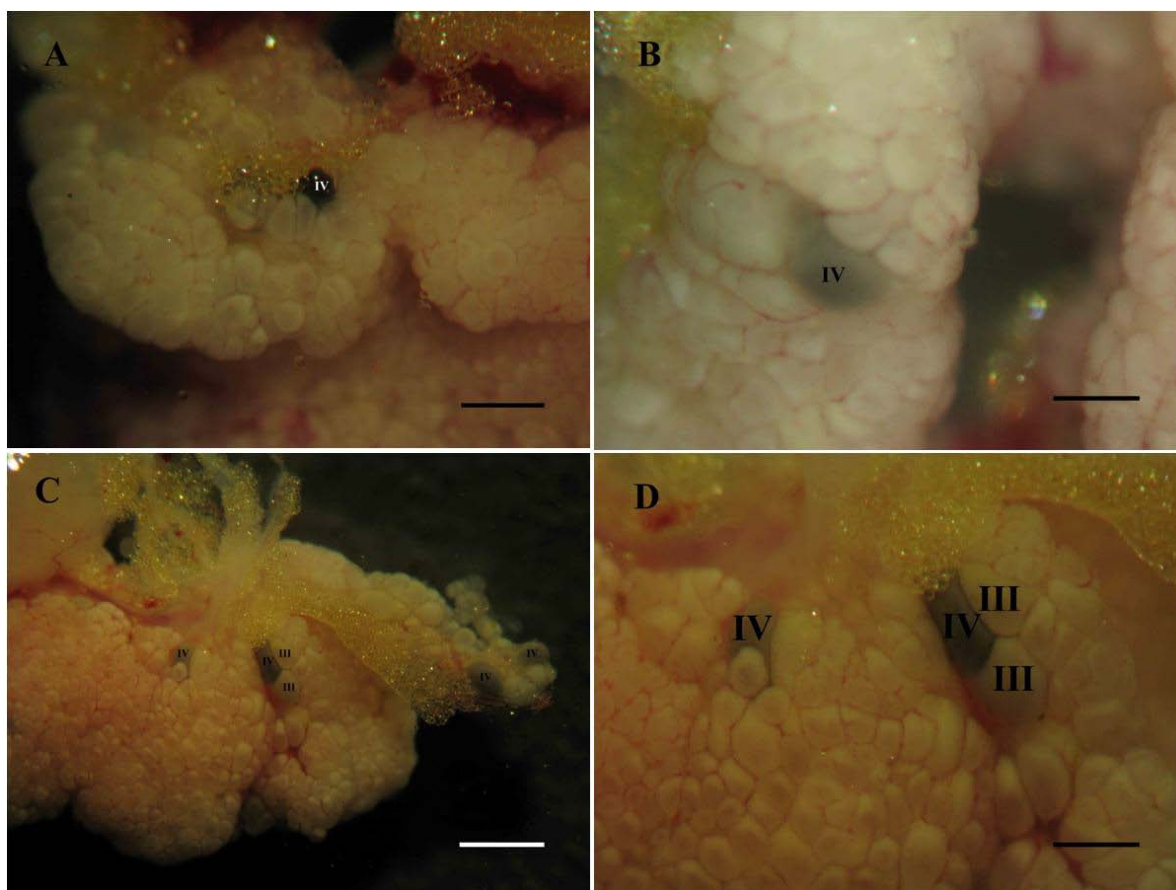


Figura 14. Oocitos estadio III y IV órganos de Bidder derecho e izquierdo animal # 11 tratamiento orquidectomía y administración de progesterona. (A y B) órgano de Bidder derecho. (C y D) órgano de Bidder izquierdo. Los números romanos indican el estadio de la oogénesis de los oocitos. La barra representa 500 μm (A); 285 μm (B); 1 mm (C); 350 μm (D).

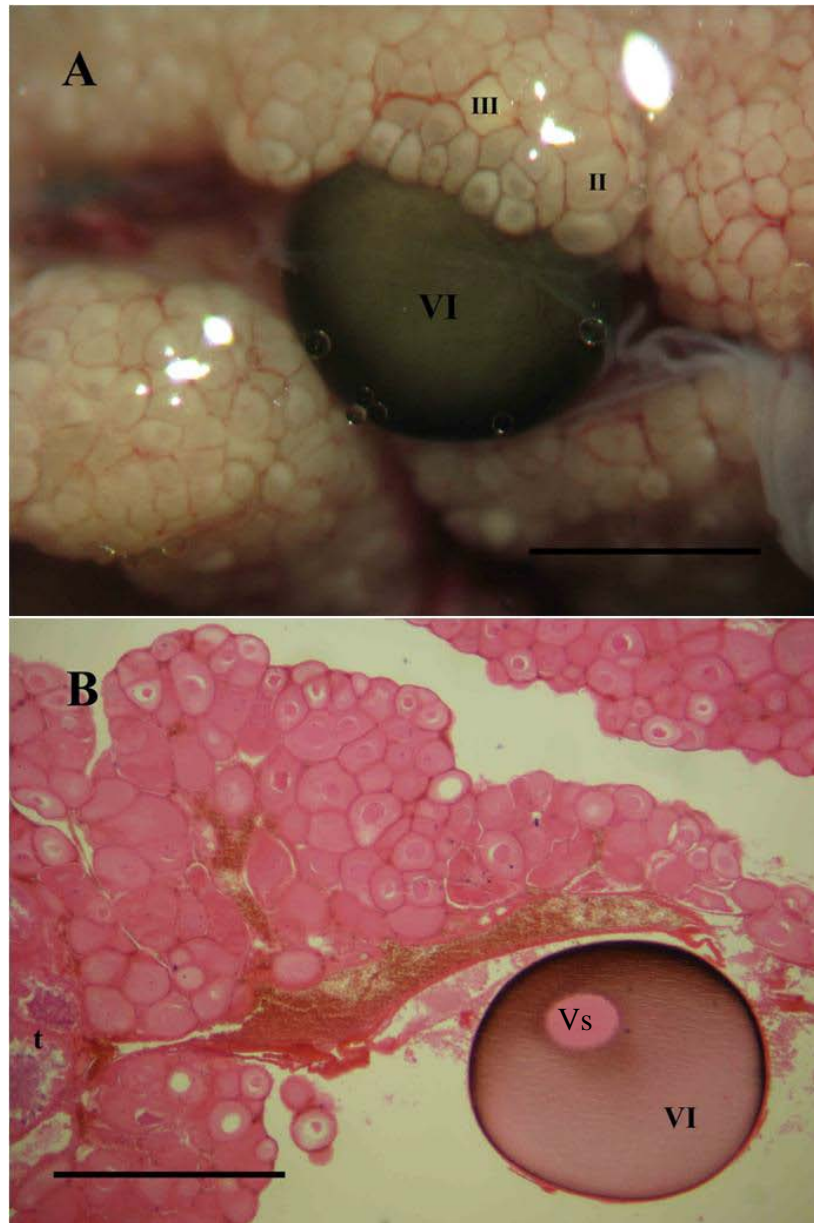


Figura 15. Oocitos estadio II, III y VI órgano de Bidder derecho animal # 12 tratamiento orquidectomía y administración de progesterona. (A micrografía. (B) corte histológico. Los números romanos muestran el estadio de la oogénesis en el que se encuentran los oocitos. t, testículo; Vs, vesícula germinal. La barra representa 1 mm (A y B).

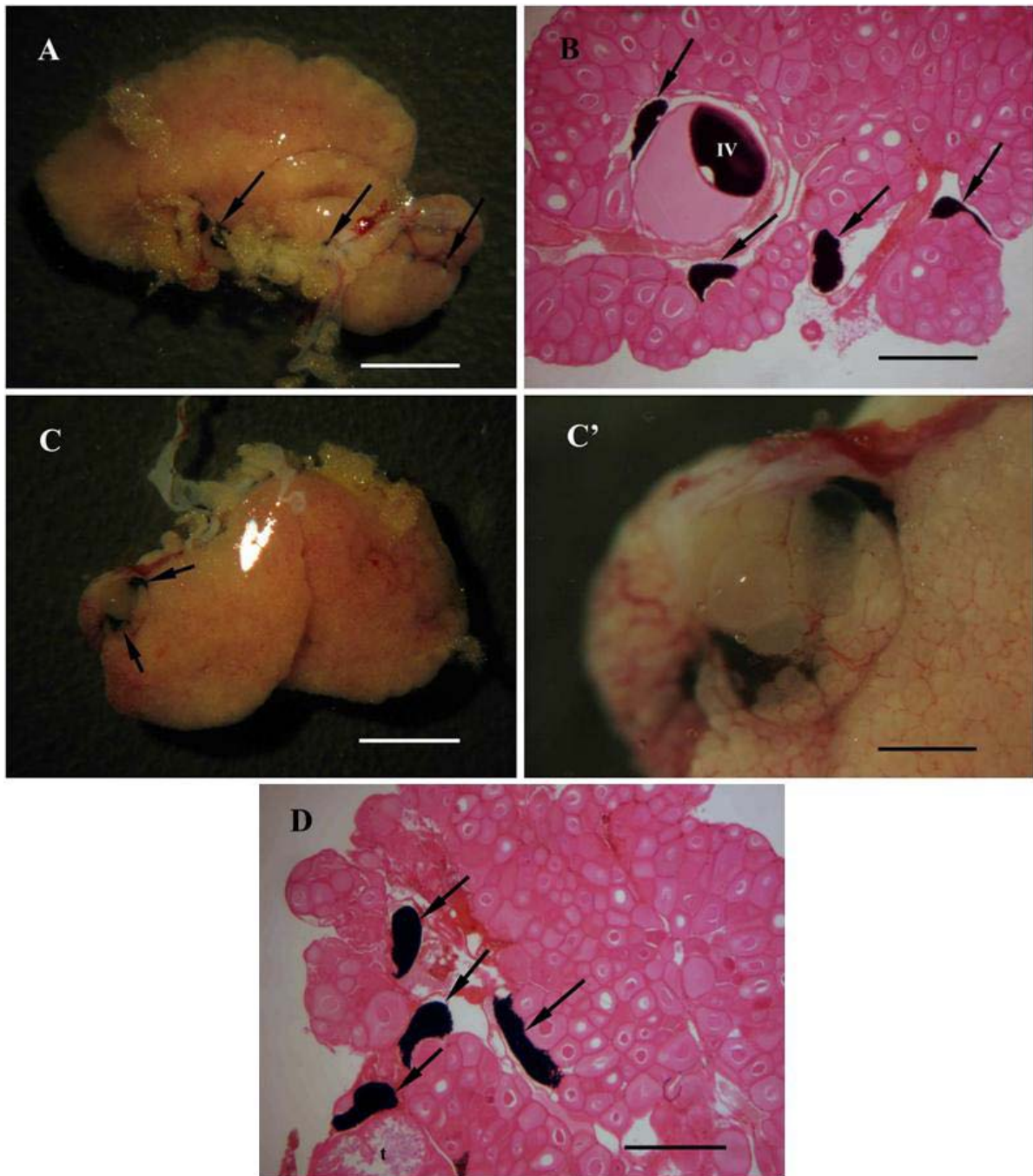


Figura 16. Órgano de Bidder derecho e izquierdo animal # 8 después del tratamiento orquidectomía y administración de progesterona. (A) micrografía órgano de Bidder derecho. (B) corte histológico órgano de Bidder derecho con un oocito estadio IV. (C) micrografía órgano de Bidder izquierdo. (C') manchas encontradas previo y después del tratamiento. (D) corte histológico órgano de Bidder izquierdo. Las flechas señalan las manchas halladas. t, testículo. La barra representa 3 mm (A y C); 800 μ m (B y D); 700 μ m (C').

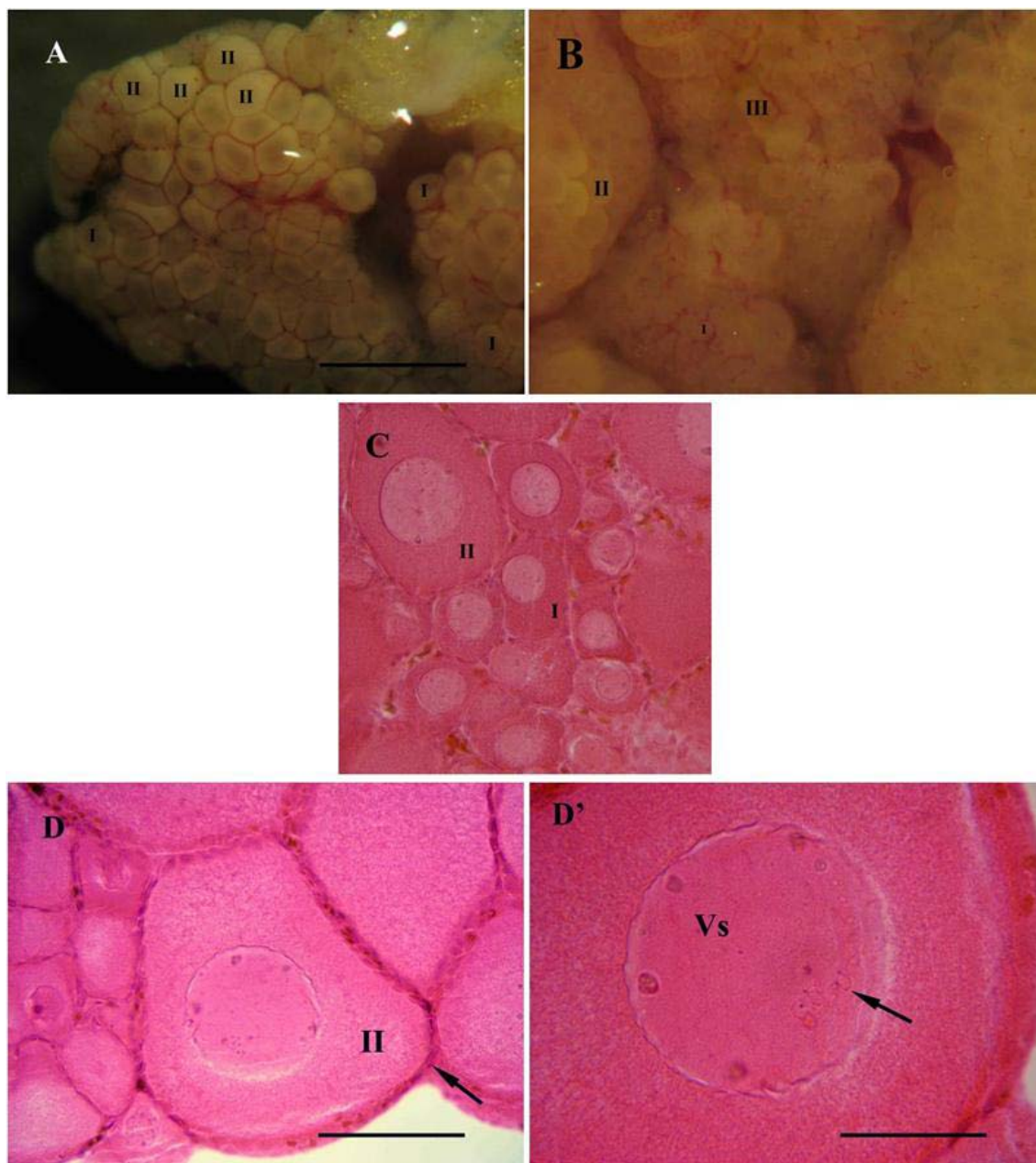


Figura 17. Oocitos tratamiento orquidectomía y administración de atrazina. (A) micrografía órgano de Bidder izquierdo animal #13. (B) micrografía órgano de Bidder izquierdo animal #17. (C) corte histológico órgano de Bidder derecho animal # 16 (D) corte histológico órgano de Bidder izquierdo animal # 15. Oocito estadio II. La flecha señala la doble capa de células foliculares. (D') vesícula germinal oocito estadio II. La flecha señala los cromosomas dentro del núcleo. Vs, vesícula germinal. Las barras representan 1mm (A); 900 μm (B); 95 μm (C); 140 μm (D); 70 μm (D').

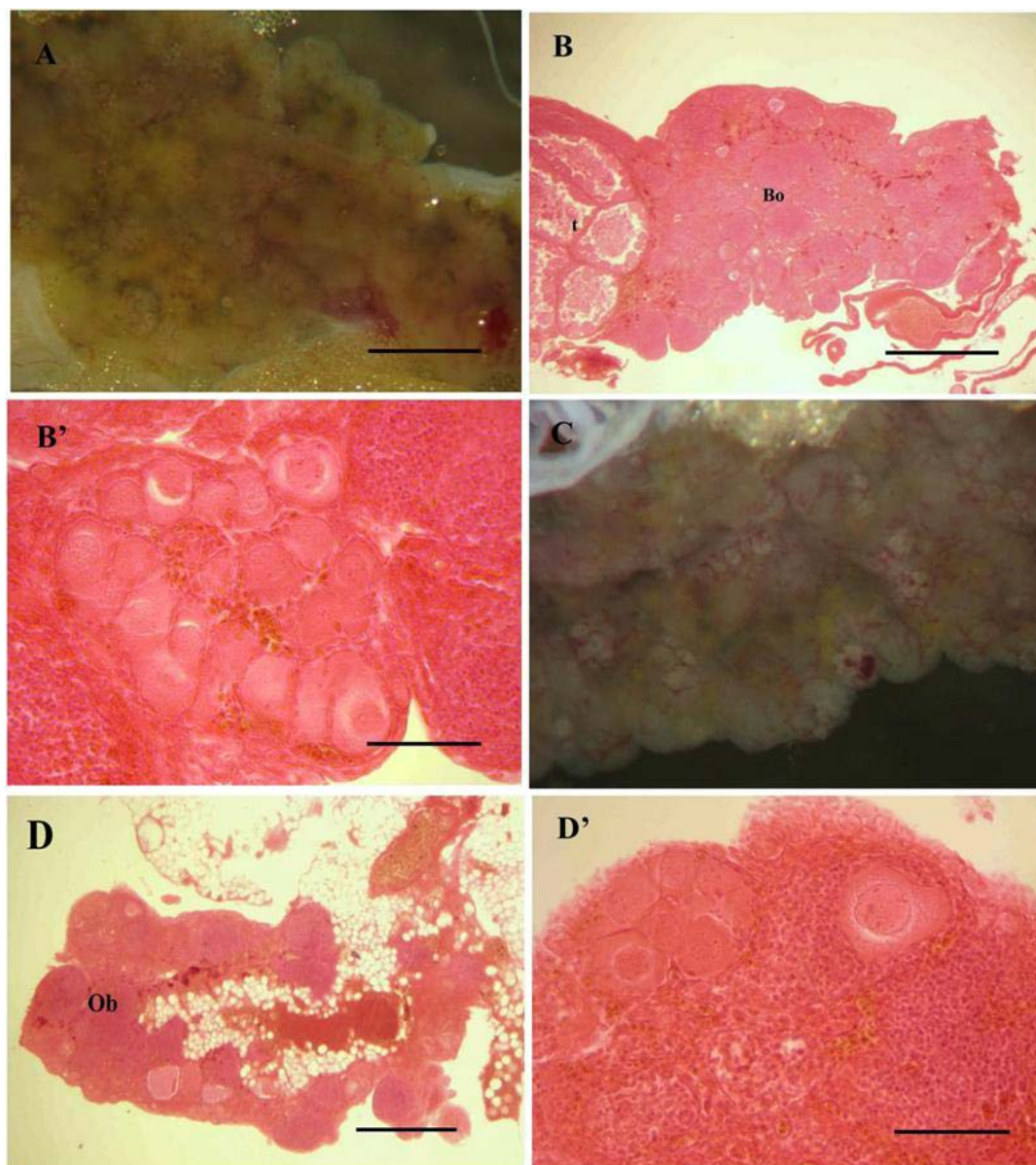


Figura 18. Órgano de Bidder derecho e izquierdo animal # 3 tratamiento orquidectomía y administración de atrazina. (A) micrografía órgano de Bidder derecho. Se observan manchas alrededor de toda la estructura (B) corte histológico órgano de Bidder derecho, con grades zonas de oocitos atrésicos. (B') oocitos atrésicos órgano de Bidder derecho (C) micrografía órgano de Bidder izquierdo; se observan las mismas manchas del órgano de Bidder derecho (D) corte histológico órgano de Bidder izquierdo, con grandes zonas de oocitos atrésicos. (D') oocitos atrésicos órgano de Bidder izquierdo. t, testículo; Bo, órgano de Bidder. Las barras representan 1 mm (A); 900 μm (B); 110 μm (B' y D'); 550 μm (C); 650 μm (D).

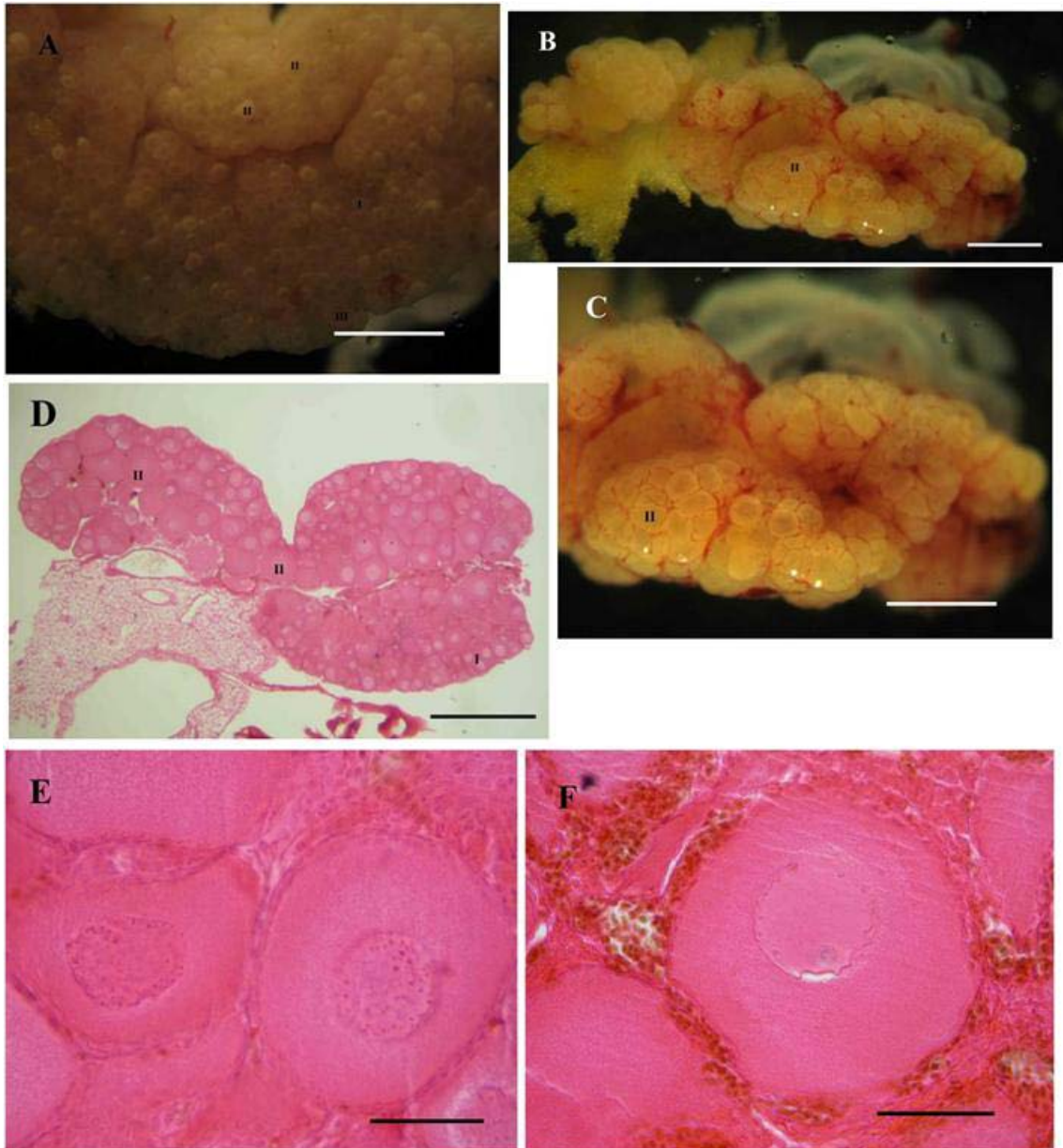


Figura 19. Oocitos tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona. (A) micrografía órgano de Bidder izquierdo animal #23. (B) micrografía órgano de Bidder derecho animal #24. (C) micrografía órgano de Bidder derecho animal # 24 (D) corte histológico órgano de Bidder izquierdo animal # 20. (E) corte histológico órgano de Bidder derecho animal # 19 oocitos estadio II. (F) corte histológico órgano de Bidder izquierdo animal # 24. Oocito estadio I. Las barras representan 1 mm (A y C); 3 mm (B); 700 μm (D); 100 μm (E y F).

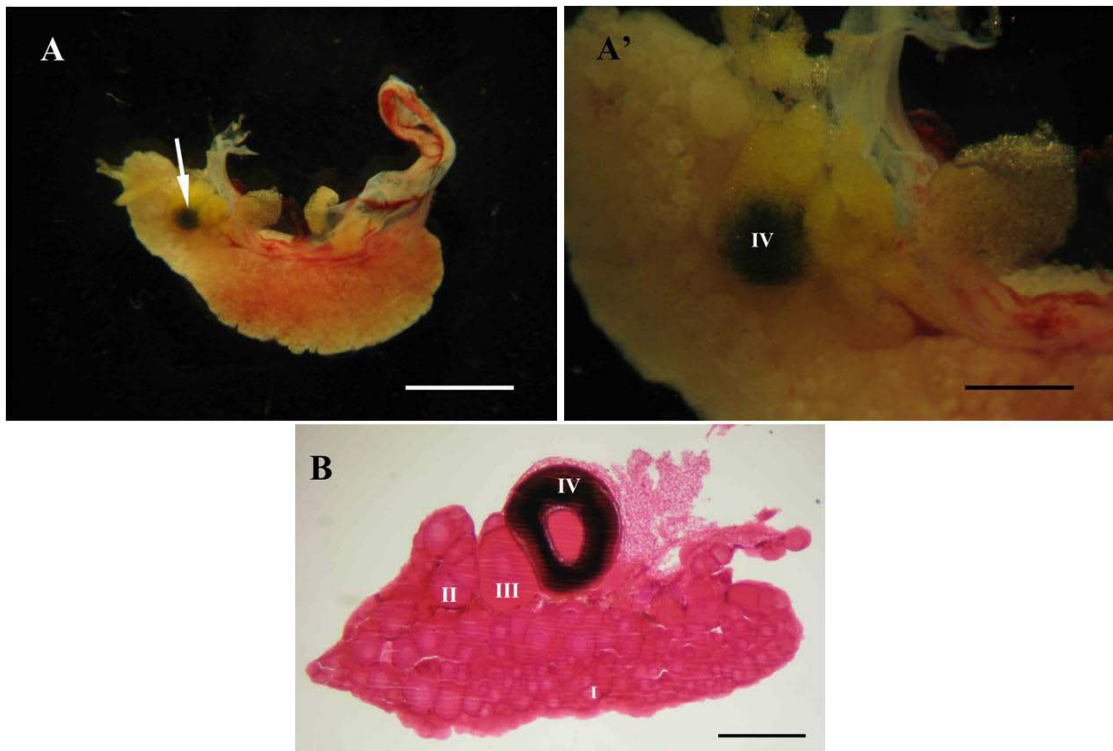


Figura 20. Órgano de Bidder derecho animal # 20 tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona. (A) micrografía. Flecha, oocito estadio IV (A') micrografía. Acercamiento del oocito estadio IV (B) corte histológico. Los números romanos indican el estadio de desarrollo de los oocitos. Las barras representan 3 mm (A); 900 μ m (A'); 600 μ m (B).

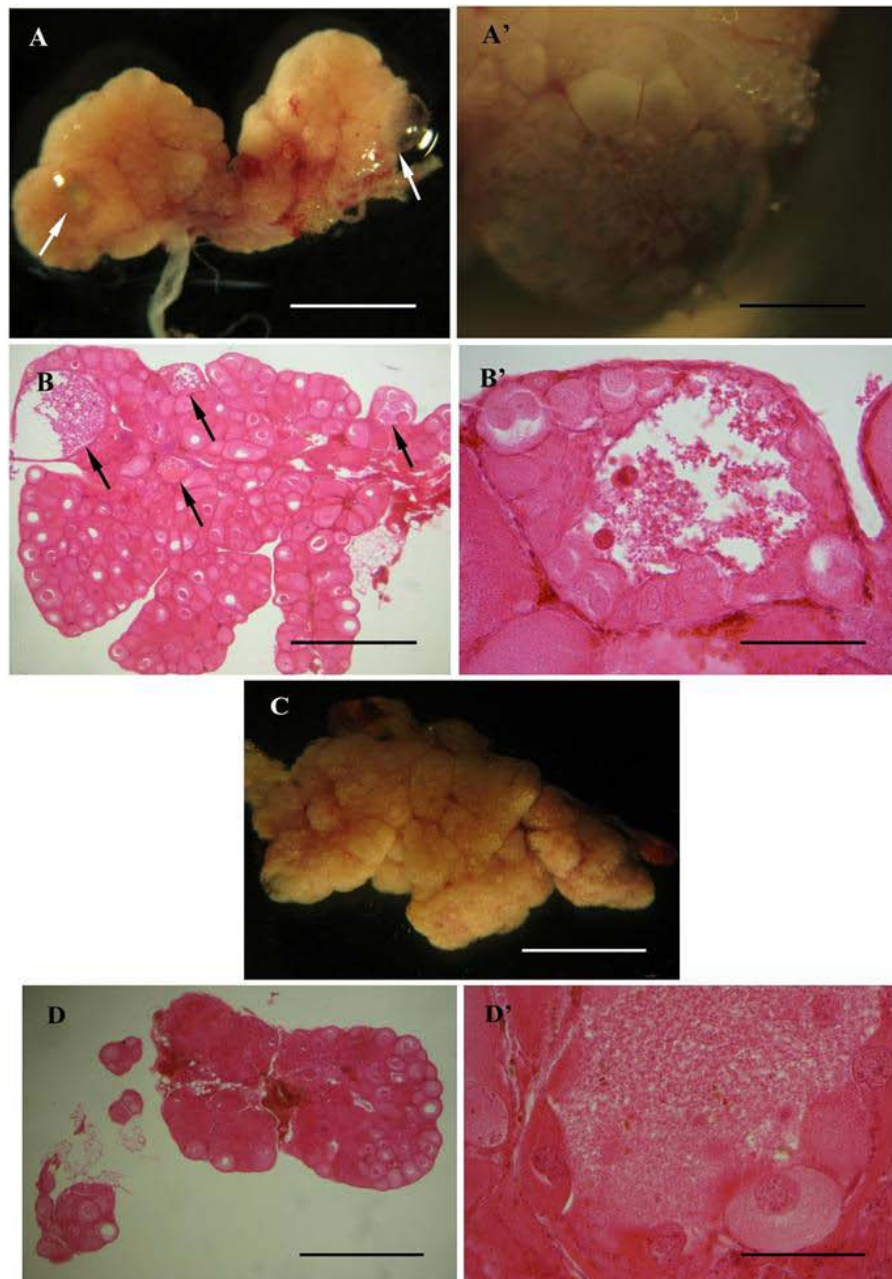


Figura 21. Órgano de Bidder izquierdo y derecho animal # 22 tratamiento orquidectomía y administración de atrazina y progesterona. (A) micrografía órgano de Bidder derecho. (A') acercamiento zona oocitos atrésicos. (B) corte histológico órgano de Bidder derecho. (B') acercamiento zona oocitos atrésicos. Las flechas indican las zonas con oocitos atrésicos. (C) micrografía órgano de Bidder izquierdo. (D) corte histológico órgano de Bidder izquierdo (D') acercamiento zona oocitos atrésicos. Las barras representan 1 mm (A, B y D); 600 μ m (A'); 150 μ m (B' y D'); 3 mm (C).

10. TABLAS

Tabla 1. Lista de los animales colectados

# Animal	Fecha Colección	Colectores	Lugar	Tratamiento
1	03-Abril-2010	Diana Vargas, Luis Eduardo López, Jacqueline Hurtado	Sto. Domingo de los Tsachilas, Sto. Domingo	control
2	16-Julio-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Pablo Mancheno	Sto. Domingo de los Tsachilas, Sto. Domingo	control
3	28-Agosto-2010	Katia Bustamante	Jama, Manabí	atrazina
4	09-Septiembre-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	control (murió)
5	09-Septiembre-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	control
6	09-Septiembre-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	control
7	03-Abril-2010	Diana Vargas, Luis Eduardo López, Jacqueline Hurtado	Sto. Domingo de los Tsachilas, Sto. Domingo	progesterona
8	03-Abril-2010	Diana Vargas, Luis Eduardo López, Jacqueline Hurtado	Sto. Domingo de los Tsachilas, Sto. Domingo	progesterona

Tabla 1. Lista de los animales colectados (continuación)

# Animal	Fecha Colección	Colectores	Lugar	Tratamiento
9	28-Agosto-2010	Kathya Bustamante	Jama, Manabí	progesterona
10	28-Agosto-2010	Kathya Bustamante	Jama, Manabí	progesterona
11	09-Septiembre-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Katia Bustamante	Jama, Manabí	progesterona
12	09-Septiembre-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	progesterona
13	03-Abril-2010	Diana Vargas, Luis Eduardo López, Jacqueline Hurtado	Sto. Domingo de los Tsachilas, Sto. Domingo	atrazina
14	16-jul-10	Oscar Pérez, Diana Vargas, Pablo Mancheno	Sto. Domingo de los Tsachilas, Sto. Domingo	atrazina (murió)
15	28-Agosto-2010	Kathya Bustamante	Jama, Manabí	atrazina
16	09-Septiembre-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	atrazina

Tabla 1. Lista de los animales colectados (continuación)

# Animal	Fecha Colección	Colectores	Lugar	Tratamiento
17	09-Septiembre-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	atrazina
18	09-Septiembre-2010	Oscar Perez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	atrazina
19	03-Abril-2010	Diana Vargas, Luis Eduardo López, Jacqueline Hurtado	Sto. Domingo de los Tsachilas, Sto. Domingo	atrazina+progesterona
20	16-Julio-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Pablo Mancheno	Sto. Domingo de los Tsachilas, Sto. Domingo	atrazina+progesterona
21	28-Agosto-2010	Katia Bustamante	Jama, Manabí	atrazina+progesterona
22	09-Septiembre-2010	Oscar Pérez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	atrazina+progesterona
23	09-Septiembre-2010	Oscar Perez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	atrazina+progesterona
24	09-Septiembre-2010	Oscar Perez, Diana Vargas, Daniel Cisneros, Lucía Dután, Pablo Mancheno, Kathya Bustamante	Jama, Manabí	atrazina+progesterona

Tabla 2. Medidas y pesos de los animales antes y después de la operación. (Los machos que murieron no constan en la tabla)

TRATAMIENTO	# ANIMAL	PESO (g)		LONGITUD Boca-Ano (cm)	
		Inicial	Final	Inicial	Final
Control	1	108,3	78,8	10,4	11,6
Control	2	100,5	110,7	10,9	11,5
Control	5	82,2	99,91	10,3	9,9
Control	6	94,6	89,5	10,6	10,3
Progesterona	7	101,2	118,5	10,8	11,6
Progesterona	8	111,6	129,8	11,4	11,8
Progesterona	9	84,9	85,9	9,4	10,5
Progesterona	10	174,7	135,4	11,9	11,4
Progesterona	11	91,2	103,1	10,4	11,1
Progesterona	12	129,5	140,8	10,8	12
Atrazina	3	143,2	141,6	12,8	12,7
Atrazina	13	121,5	145,1	11,5	12,8
Atrazina	15	95,3	98,8	9,8	11,3
Atrazina	16	72,1	55,4	9,2	9,6
Atrazina	17	111,9	121,4	10,3	11,4
Atrazina	18	184,9	130,5	10,9	12,5
Atrazina + Progesterona	19	131,2	123,9	10,6	11,6
Atrazina + Progesterona	20	121,1	111,2	11,8	12,2
Atrazina + Progesterona	21	99,3	99,8	10,6	11,4
Atrazina + Progesterona	22	73,4	88,4	8,8	10,2
Atrazina + Progesterona	23	110,2	95,6	10,4	10,6
Atrazina + Progesterona	24	138,8	131,8	11,4	12,4

Tabla 3. Medidas y peso de los testículos. Se presentan los datos de los testículos de cada lado (I= izquierdo; D= derecho)

TRATAMIENTO	# ANIMAL	TESTICULO					
		Largo (mm)		Ancho (mm)		Peso (g)	
		I	D	I	D	I	D
Control	1	16,7	21,7	4,2	3,8	0,13	0,17
Control	2	32,5	25,5	5,0	5,0	0,28	0,26
Control	5	18,3	21,7	3,5	3,7	0,12	0,14
Control	6	26,7	27,7	4,0	4,5	0,25	0,26
Progesterona	7	20,8	20,3	4,0	4,5	0,17	0,10
Progesterona	8	20,8	19,2	3,8	4,0	0,18	0,14
Progesterona	9	22,0	23,8	3,5	3,5	0,15	0,17
Progesterona	10	16,8	24,5	3,8	3,5	0,12	0,19
Progesterona	11	20,8	24,0	3,5	3,8	0,16	0,12
Progesterona	12	21,2	20,7	3,3	4,0	0,16	0,12
Atrazina	3	21,7	18,3	4,2	4,3	0,15	0,12
Atrazina	13	26,0	19,2	3,7	3,8	0,17	0,17
Atrazina	15	18,0	20,0	4,0	4,8	0,16	0,17
Atrazina	16	16,7	22,5	3,2	3,3	0,08	0,15
Atrazina	17	24,7	20,8	4,3	4,0	0,17	0,16
Atrazina	18	24,2	23,8	4,8	4,8	0,31	0,30
Atrazina + Progesterona	19	18,2	18,7	2,7	3,3	0,09	0,13
Atrazina + Progesterona	20	19,5	21,0	4,7	5,0	0,16	0,19
Atrazina + Progesterona	21	27,8	18,2	4,0	4,0	0,13	0,12
Atrazina + Progesterona	22	15,5	18,7	3,5	4,8	0,12	0,17
Atrazina + Progesterona	23	14,0	17,3	3,7	3,5	0,10	0,10
Atrazina + Progesterona	24	23,5	22,5	3,7	3,7	0,14	0,15
PROMEDIO DE CADA LADO		21,2	21,4	3,9	4,1	0,16	0,16
PROMEDIO TOTAL		21,3		4,0		0,16	

Tabla 4. Diámetro máximo oocitos de los órganos de Bidder previo a los tratamientos.

Se presenta el diámetro máximo de los oocitos de cada lado. ND, datos no disponibles.

Entre paréntesis estadio de la ovogénesis de los oocitos de máximo diámetro (I= izquierdo;

D= derecho).

TRATAMIENTO	# ANIMAL	OOCITOS	
		Diámetro max. (µm)	
		I	D
Control	1	207 (1)	136 (1)
Control	2	ND	128 (1)
Control	5	113 (1)	ND
Control	6	152 (1)	96 (1)
Progesterona	7	214 (1)	190 (1)
Progesterona	8	130 (1)	251 (1)
Progesterona	9	207 (1)	368 (2)
Progesterona	10	160 (1)	189 (1)
Progesterona	11	121 (1)	151 (1)
Progesterona	12	280 (1)	368 (2)
Atrazina	3	162 (1)	195 (1)
Atrazina	13	179 (1)	233 (1)
Atrazina	15	152 (1)	141 (1)
Atrazina	16	166 (1)	ND
Atrazina	17	180 (1)	136 (1)
Atrazina	18	121 (1)	141 (1)
Atrazina + Progesterona	19	278 (1)	259 (1)
Atrazina + Progesterona	20	153 (1)	102 (1)
Atrazina + Progesterona	21	147 (1)	177 (1)
Atrazina + Progesterona	22	164 (1)	149 (1)
Atrazina + Progesterona	23	204 (1)	226 (1)
Atrazina + Progesterona	24	259 (1)	316 (2)
PROMEDIO DE CADA LADO		178	199
PROMEDIO TOTAL		189	

Tabla 5. Medidas del órgano de Bidder y los oocitos de los machos orquidectomizados después de los dos meses de tratamiento. Entre paréntesis estadio de la oogénesis de los oocitos de máximo diámetro (I= izquierdo; D= derecho).

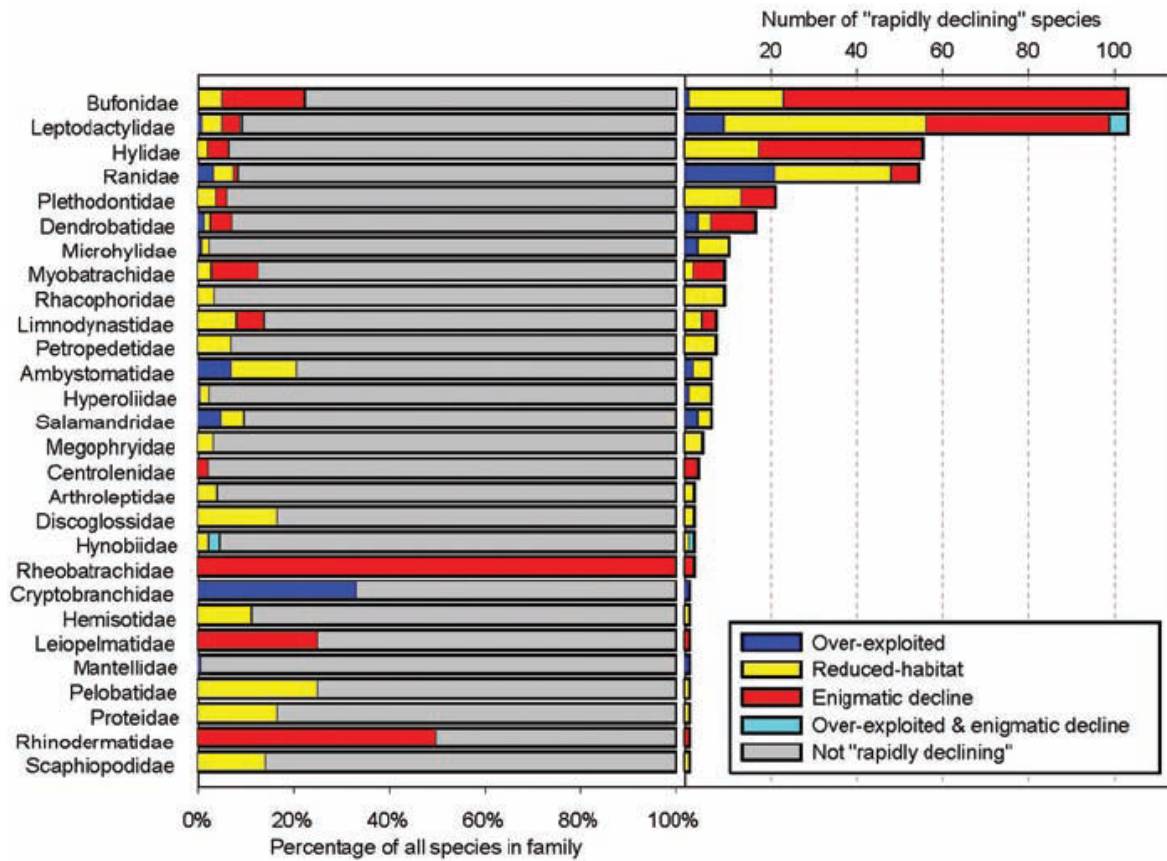
TRATAMIENTO	# ANIMAL	ÓRGANO DE BIDDER					
		Largo (mm)		Ancho (mm)		Oocitos (μ m) Diámetro máx.	
		I	D	I	D	I	D
Control	1	6,4	6,7	2,0	0,8	217 (1)	165 (1)
Control	2	7,1	10,7	4,4	2,4	199 (1)	235 (1)
Control	5	4,7	8,2	5,4	2,8	219 (1)	169 (1)
Control	6	5,2	2,2	3,7	1,1	279 (1)	261 (1)
Progesterona	7	8,2	12,1	5,8	5,2	225 (1)	271 (1)
Progesterona	8	11,7	13,7	6,6	6,1	324 (2)	321 (2)
Progesterona	9	7,0	7,5	2,8	3,6	324 (2)	256 (1)
Progesterona	10	10,4	17,7	5,6	4,4	374 (2)	571 (3)
Progesterona	11	11,0	9,3	3,7	6,4	542 (3)	369 (2)
Progesterona	12	19,6	17,7	2,2	6,6	321 (2)	1402 (6)
Atrazina	3	8,1	7,5	2,2	2,7	254 (1)	174 (1)
Atrazina	13	9,8	9,5	3,5	3,4	449 (2)	513 (3)
Atrazina	15	12,7	13,5	4,4	4,2	232 (1)	286 (1)
Atrazina	16	7,5	4,4	2,8	2,2	235 (1)	235 (1)
Atrazina	17	13,5	13,6	5,8	7,0	536 (3)	545 (3)

Tabla 5. Medidas del órgano de Bidder y los oocitos de los machos orquidectomizados después de los dos meses de tratamiento (continuación).

TRATAMIENTO	# ANIMAL	ÓRGANO DE BIDDER					
		Largo (mm)		Ancho (mm)		Oocitos (μm) Diámetro máx.	
		I	D	I	D	I	D
Atrazina	18	5,3	8,3	2,0	4,9	226 (1)	189 (1)
Atrazina + Progesterona	19	13,1	12,9	4,6	2,6	292 (1)	337 (2)
Atrazina + Progesterona	20	5,8	10,1	2,6	3,1	173 (1)	710 (4)
Atrazina + Progesterona	21	11,6	13,6	3,4	1,6	265 (1)	263 (1)
Atrazina + Progesterona	22	10,8	10,9	4,7	2,6	346 (2)	389 (2)
Atrazina + Progesterona	23	10,2	9,1	4,0	3,6	354 (2)	274 (1)
Atrazina + Progesterona	24	6,4	7,4	2,0	2,4	431 (2)	461 (3)
PROMEDIO DE CADA LADO		9,4	10,3	3,8	3,6	310	382
PROMEDIO TOTAL		9,8		3,7		346,0	

11. ANEXOS

Anexo 3. Porcentajes y número de especies en peligro de extinción por familia en anfibios. Solo se incluyeron familias con al menos una especie en peligro de extinción y las principales causas para su declinamiento (Stuart *et al.*, 2004).



Anexo 4. Terrarios en donde fueron colocados los individuos de cada tratamiento



Anexo 5. Tabla de la oogénesis de *Rhinella marina*. La oogénesis de *R. marina* fue clasificada en seis estadios definidos de acuerdo a la tabla de oogénesis de Dumont (1972) para *Xenopus laevis* (Brown *et al.*, 2002).

Table 1. Stages of oogenesis in *Bufo marinus*[†]

Stage	Oocyte diameter (µm)	Cytological characteristics
1	50–300	The cytoplasm is translucent with absence of yolk platelets. The GV is centrally located and contains nucleoli. (Fig. 1B,C).
2	300–450	The cytoplasm is white translucent, due to the formation of yolk platelets. In the GV, lampbrush chromosomes are visible and numerous nucleoli are present, located mainly in the periphery (Fig. 1C,D).
3	450–600	The oocyte is opaque and slightly pigmented (white oocytes in Fig. 1A). Yolk platelets are larger. The centrally located nucleus contains nucleoli distributed mostly in the nuclear periphery. Vascularization is visible around oocytes.
4	600–1000	Dark pigment occurs in the entire oocyte, with a higher concentration in the animal pole. Yolk platelets are more abundant and larger. The GV is slightly displaced towards the animal region. Numerous nucleoli are located in the nuclear periphery. Vascularization is visible around oocytes.
5	1000–1200	Animal and vegetal poles of the oocyte are clearly visible, with a higher concentration of dark pigment in the animal pole. Yolk platelets are more abundant and larger. The GV is displaced towards the animal region. Numerous nucleoli are located in the nuclear periphery. GVBD was not determined. Vascularization is visible around the oocytes.
6	1200–1400	Animal and vegetal poles of the oocyte are clearly visible, with a higher concentration of dark pigment in animal pole (full grown oocyte in Fig. 1A). The equatorial band of pigment could not be distinguished from the slightly pigmented vegetal region. Vascularization was visible around oocytes. GVBD and the histology were not analyzed in oocytes of this stage.

[†]Stages of oogenesis were defined according to *Xenopus laevis* (Dumont 1972). GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown.