

ESTUDIO MORFOMÉTRICO SOBRE EL DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE LAS GLÁNDULAS TIROIDES DURANTE LA METAMORFOSIS DE *BUFO ARENARUM*

LEANDRO ANDRÉS MIRANDA Y ARMANDO PISANÓ
Laboratorio de Investigaciones Embriológicas (LABINE) (CONICET).
Montevideo 126, 4º Piso, (1019) Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. Se ha estudiado el desarrollo y la evolución de las glándulas tiroideas durante la morfogénesis de *Bufo arenarum*. Usando diferentes parámetros morfométricos, hemos relacionado el crecimiento y desarrollo larval con el desarrollo de las glándulas tiroideas. Se observó que la longitud total, el peso de las larvas, el volumen glandular tiroideo y el diámetro folicular, aumentan hasta el estadio XV (fin de la prometamorfosis), mientras que el número de folículos y la altura de las células foliculares tiroideas se incrementan hasta el estadio XVII (mitad del clímax metamórfico). Todos estos parámetros disminuyeron considerablemente durante el clímax metamórfico mientras que en animales postmetamórficos se observó un incremento en los valores registrados. En base a los resultados obtenidos concluimos que hay un período de síntesis y almacenamiento de hormonas tiroideas durante el crecimiento larval y un segundo período caracterizado por la liberación de hormonas tiroideas hacia el final de la prometamorfosis y durante el clímax metamórfico.

Palabras clave: *Bufo arenarum*, desarrollo, glándulas tiroideas, metamorfosis.

ABSTRACT. We studied the development and evolution of thyroid glands during *Bufo arenarum* morphogenesis. Using different morphometric parameters we related larval growth and metamorphosis with thyroid glands development. We observed that total length, larval weight, thyroid gland volume and follicle diameter increased until stage XV (end of prometamorphosis), meanwhile the number of follicles and follicle cell height increased until stage XVII (midclimax). All these parameters decreased during metamorphic climax and an increase was observed in postmetamorphic animals. Our results lead us to conclude that during larval growth there is a period of synthesis and store of thyroid hormones. There is a second period characterized by thyroid hormones release during the end of prometamorphosis and metamorphic climax.

Key words: *Bufo arenarum*, development, thyroid glands, metamorphosis.

Introducción

El fenómeno del desarrollo y de la metamorfosis en anfibios ha interesado de igual modo a biólogos y naturalistas durante siglos. Los estudios realizados por fisiólogos, bioquímicos y endocrinólogos han aportado gran cantidad de información so-

bre los distintos aspectos de la biología de vertebrados relacionados con el crecimiento y los cambios metamórficos.

Fue Gudernatsh (1912) quién inició el estudio de la regulación endócrina de la metamorfosis, al proponer que el mediador último de todos los cambios que ocurren durante la misma es la glándula tiroidea s

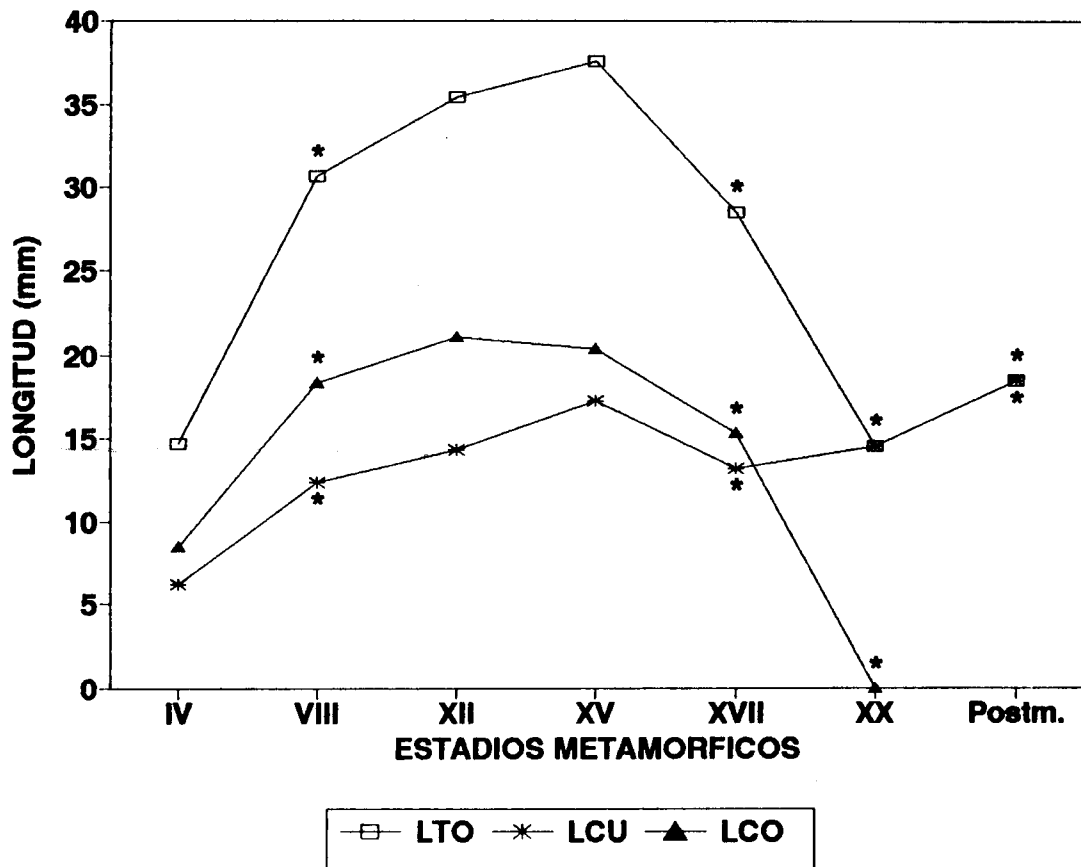


Figura 1: Longitud total (LTO), corporal (LCU) y de la cola (LCO) durante la metamorfosis de *Bufo arenarum*. Los errores estándares no representados fueron menores al 10 % de la media de cada grupo. Diferencias significativas * $P < 0,05$ respecto del estadio anterior (N=15).

través de sus hormonas: la triiodotironina (T_3) y la tiroxina (T_4). Años más tarde Etkin (1964, 1968) postuló el modelo existente más completo sobre los mecanismos endócrinos que regulan la metamorfosis de anfibios involucrando al eje hipotálamo-hipófiseo-tiroideo y a otras hormonas como la prolactina y las interrenales.

El análisis estructural y ultraestructural de las glándulas tiroideas de anuros muestra generalmente un fuerte incremento de actividad glandular cerca del clímax, llegando a niveles nunca señalados en otros estados de vida de los anfibios (Coleman *et al.*, 1968). El coloide folicular que es almacenado como prohormona (tiroglobulinas),

se incrementa al máximo durante la prometamorfosis y decrece en el clímax, dejando al final de la metamorfosis los folículos vacíos, colapsados, demostrando la terminación del período de fuerte síntesis y secreción hormonal (Rosenkilde y Ussing, 1990).

Las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas (TH) en larvas anuras, muestran prácticamente la misma situación que lo observado estructural y ultraestructuralmente. Se han encontrado bajos niveles de T_3 y T_4 durante la premetamorfosis, éstos se incrementan antes de la emergencia de los miembros anteriores, haciéndose máximos al llegar al clímax metamórfico para luego disminuir al final de la metamor-

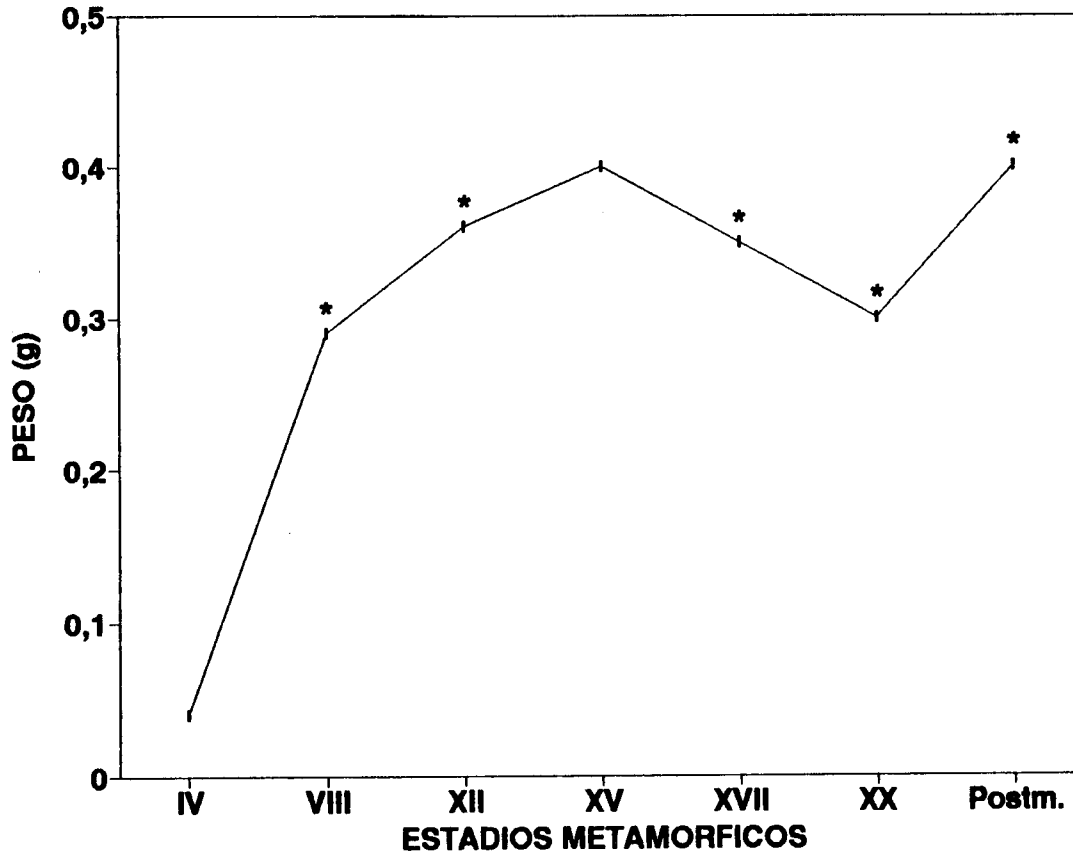


Figura 2: Peso húmedo durante la metamorfosis de *Bufo arenarum*. Los errores estándares no representados fueron menores que el 10 % de la media de cada grupo. Diferencias significativas * $P < 0,05$ respecto del estadio anterior (N=15).

fosis (Leloup y Buscaglia, 1977; Miyauchi *et al.*, 1977; Regard, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Suzuki y Suzuki, 1981; Weil, 1986).

Si bien existen trabajos sobre la histogénesis y evolución de las glándulas tiroideas durante la metamorfosis en diferentes especies anuras (Saxen *et al.*, 1957a, b; Coleman *et al.*, 1968) en *Bufo arenarum*, un sapo de amplia distribución en Sudamérica, no hay estudios al respecto. Por esta razón fue nuestra intención relacionar parámetros morfométricos corporales y parámetros indicadores de actividad tiroidea durante la morfogénesis de esta especie anura. Los parámetros morfométricos evaluados permiten estudiar cambios en las glándulas tiroi-

deas en especímenes de pequeño tamaño donde análisis hormonales por radioinmuno ensayo u otros métodos fisiológicos pueden aplicarse solamente con gran dificultad.

Materiales y métodos

Material biológico. Los embriones de *Bufo arenarum* se obtuvieron por inducción a la ovulación y fertilización *in vitro* según metodologías descritas (Miranda *et al.*, 1991). Los embriones obtenidos fueron colocados en cápsulas de Petri con solución de Holtfreter (3,5g NaCl + 0,05g KCl + 0,2g NaHCO₃ + 1000 ml agua destilada), hasta que el esbozo de los miembros posteriores se

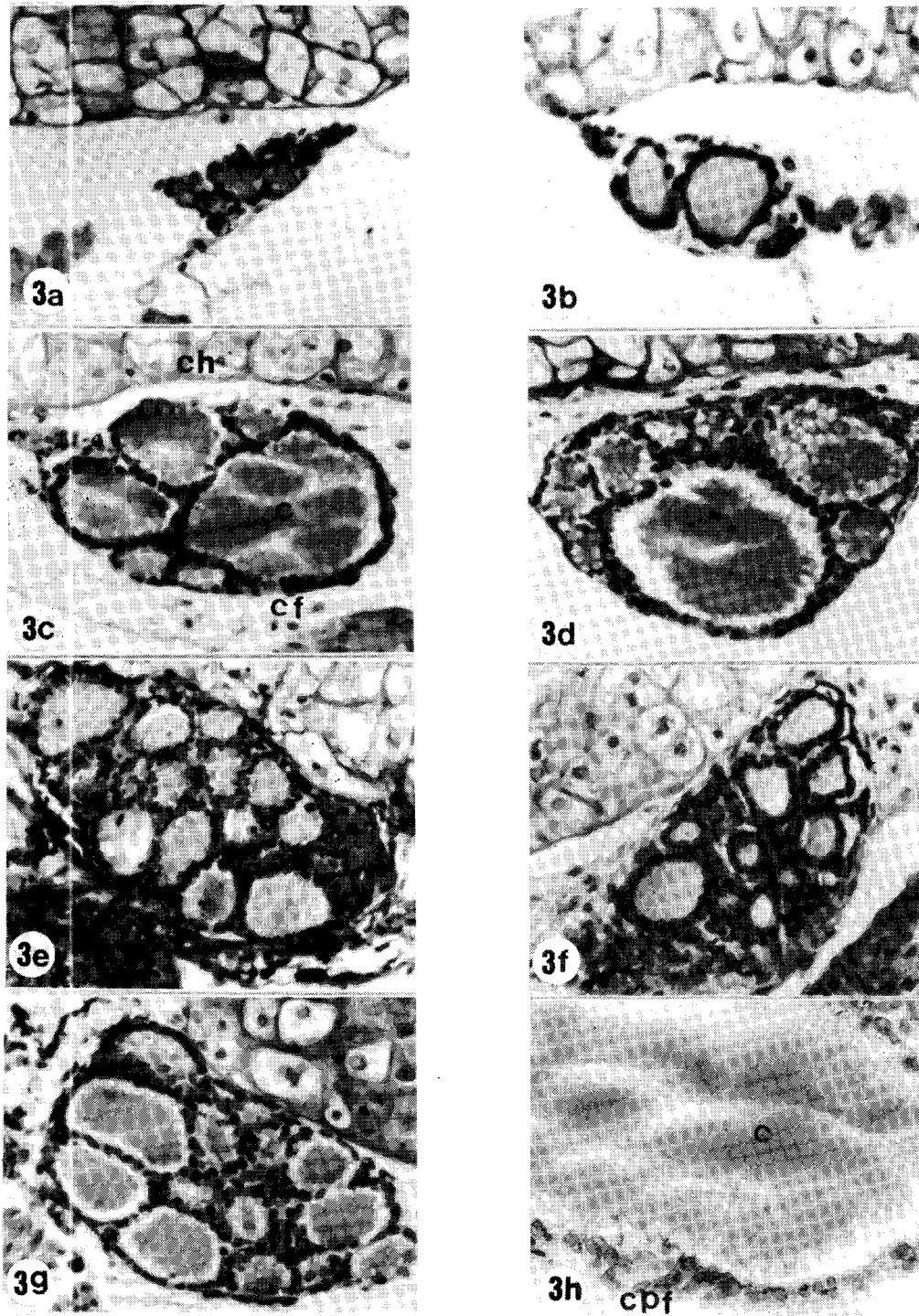


Figura 3: Evolución anatómica de las glándulas tiroides durante la metamorfosis de *Bufo arenarum*. (a) premetamorfosis (estadio IV), (b) premetamorfosis (estadio VIII), (c,h) prometamorfosis (estadio XII), (d) prometamorfosis (estadio XV), (e) clímax metamórfico (estadio XVII), (f) clímax metamórfico (estadio XX), (g) postmetamorfosis. cf, células foliculares; c, coloide; ch, cartílago hioideo; cpf, células parafoliculares. (a,b,c,d,e,f,g) (400 x), (h) (1000 x)

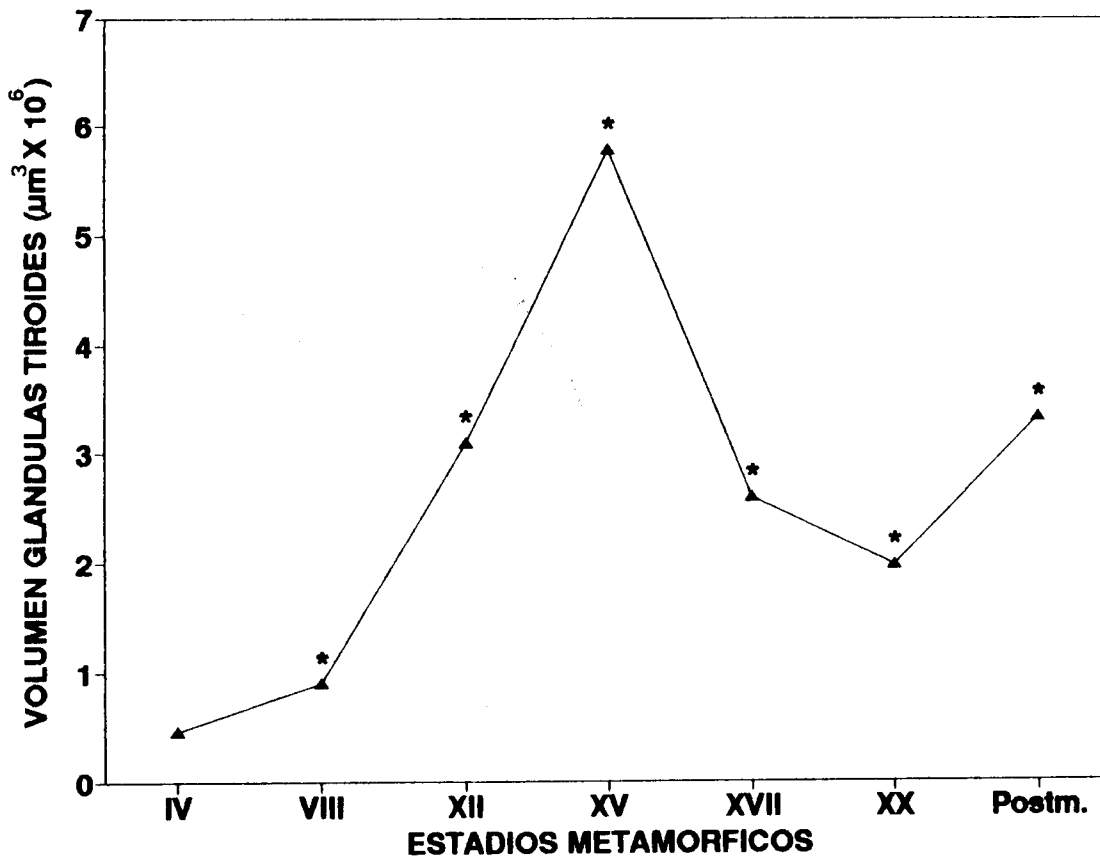


Figura 4: Volumen de las glándulas tiroides (VGT) durante la metamorfosis de *Bufo arenarum*. Los errores estándares no representados, fueron menores que el 10 % de la media de cada grupo. Diferencias significativas * $P < 0,05$ respecto del estadio anterior (N=5).

hizo visible (estadio I, Martin *et al.*, 1985). En este estadio se transfirieron a acuarios de 2 litros de volumen en una densidad de 10 por litro y se mantuvieron a una temperatura de 19-20°C y un fotoperíodo de 12 L:12 O. Las larvas fueron alimentadas *ad libitum* con lechuga hervida. Semanalmente fue renovado el medio y se verificó el estadio metamórfico alcanzado por las larvas. Se utilizaron larvas en los siguientes estadios metamórficos según Martin *et al.* (1985): IV y VIII (mitad y final de la premetamorfosis), XII y XV (mitad y final de la prometamorfosis), XVII y XX (mitad y final del clímax metamórfico) y postmetamórficos de un mes de vida. Estos estadios son equivalentes a

los estadios: 29, 34, 39, 41, 43 y 46 descritos por Gosner (1960). Los ejemplares fueron anestesiados con MS-222 (Sandoz, Argentina) y se procedió a su fijación por inmersión en el líquido de Bouin. Luego de la deshidratación de las piezas y de su inclusión en parafina-cera, se obtuvieron cortes transversales (6µm) seriados que fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

Morfometría 1. Longitud: Se midió la longitud total larval (LTO), tomada desde el extremo anterior cefálico hasta el ápice de la cola, la longitud del cuerpo (LCU), medida desde el extremo anterior cefálico hasta la cloaca y la longitud de la cola

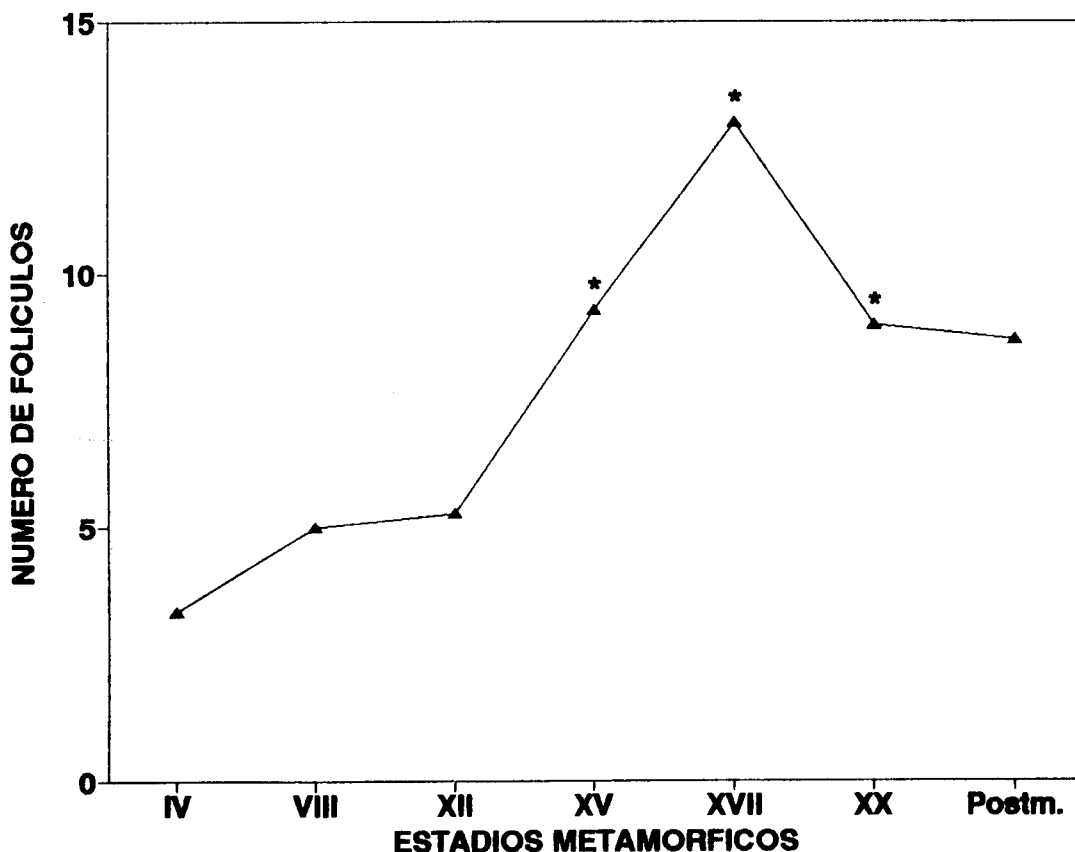


Figura 5: Número de folículos (NF) presentes en las glándulas tiroides de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Los errores estándares no representados, fueron menores que el 10 % de la media de cada grupo. Diferencias significativas * $P < 0,05$ respecto del estadio anterior (N=5).

(LCO), que se obtuvo por diferencia entre la longitud total y la longitud del cuerpo. Se midieron en milímetros 15 ejemplares vivos por estadio.

2. *Peso total húmedo (P)*: Este parámetro se determinó en una balanza electrónica con una sensibilidad de 0,001 g. Fueron pesados 15 animales vivos por estadio.

3. *Volumen de las glándulas tiroides (VGT)*: Se midió electrónicamente el área tiroidea de todos y cada uno de los cortes seriados de igual grosor (6 μ m). La suma total de las áreas se multiplicó por el grosor del corte obteniéndose así el volumen tiroideo, de forma que: $VGT = t \sum A \mu m^3$ donde t es el grosor del corte y $\sum A$ la

suma total de las áreas.

4. *Número de folículos (NF)*: Se contaron todos los folículos presentes en cinco cortes (dos laterales y tres centrales) de glándula tiroides.

5. *Diámetro folicular (DF)*: Se consideró únicamente el diámetro del folículo más ancho en cinco cortes de glándula tiroides (dos laterales y tres centrales).

6. *Altura células foliculares (ACF)*: Se midieron 10 células epiteliales (al azar) que formaban folículos tiroideos en cinco cortes (dos laterales y tres centrales).

Los datos evaluados representan los valores medios y los errores estándares de las mediciones realizadas en las tiroides de

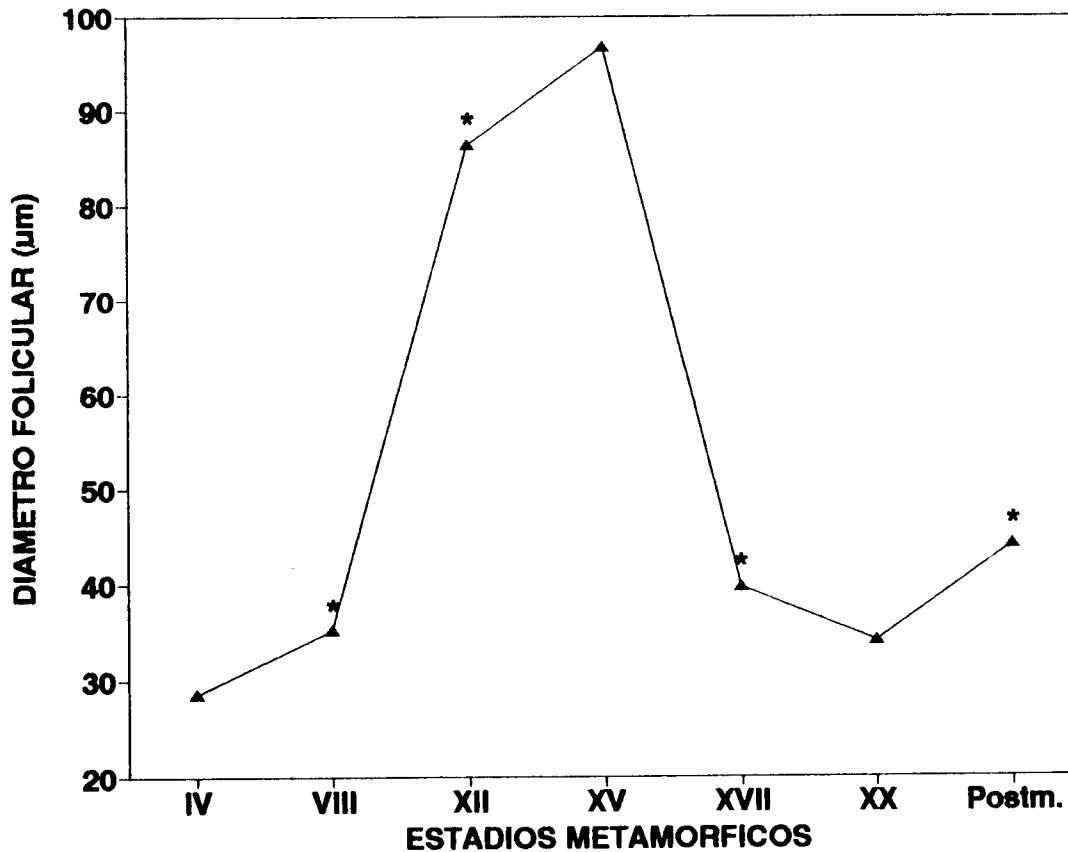


Figura 6: Diámetro folicular (DF) tiroideo durante la metamorfosis de *Bufo arenarum*. Los errores estándares no representados, fueron menores que el 10 % de la media de cada grupo. Diferencias significativas * $P < 0,05$ respecto del estadio anterior (N=5).

cinco animales por estadio. Las mediciones realizadas en glándulas tiroides, fueron tomadas siempre sobre la glándula derecha. Los resultados fueron analizados por test "t" de Student y "U" test de Mann-Whitney para datos no homogéneos.

Resultados

Longitud. En la especie estudiada se observó un crecimiento significativo en la longitud total del embrión (LTO) durante la pre- y prometamorfosis. Hacia el final de la prometamorfosis las larvas presentaron su tamaño máximo (3,8 cm) que fue aproximadamente del doble de los valores observa-

dos al comienzo de la premetamorfosis. Con el comienzo del clímax metamórfico se produjo una disminución en los valores observados de la LTO de tal forma que al final de dicho período equivalían a la mitad de la longitud máxima alcanzada. Los animales postmetamórficos experimentaron un crecimiento en longitud cercano al 30% con respecto a los valores obtenidos al final del clímax. La longitud corporal (LCU), aumentó notablemente hasta el final de la prometamorfosis, luego disminuyó hasta la mitad del clímax, para volver a aumentar hacia el final de la metamorfosis. La longitud de la cola (LCO) aumentó hasta la mitad de la prometamorfosis. Hacia el fin de esta eta-

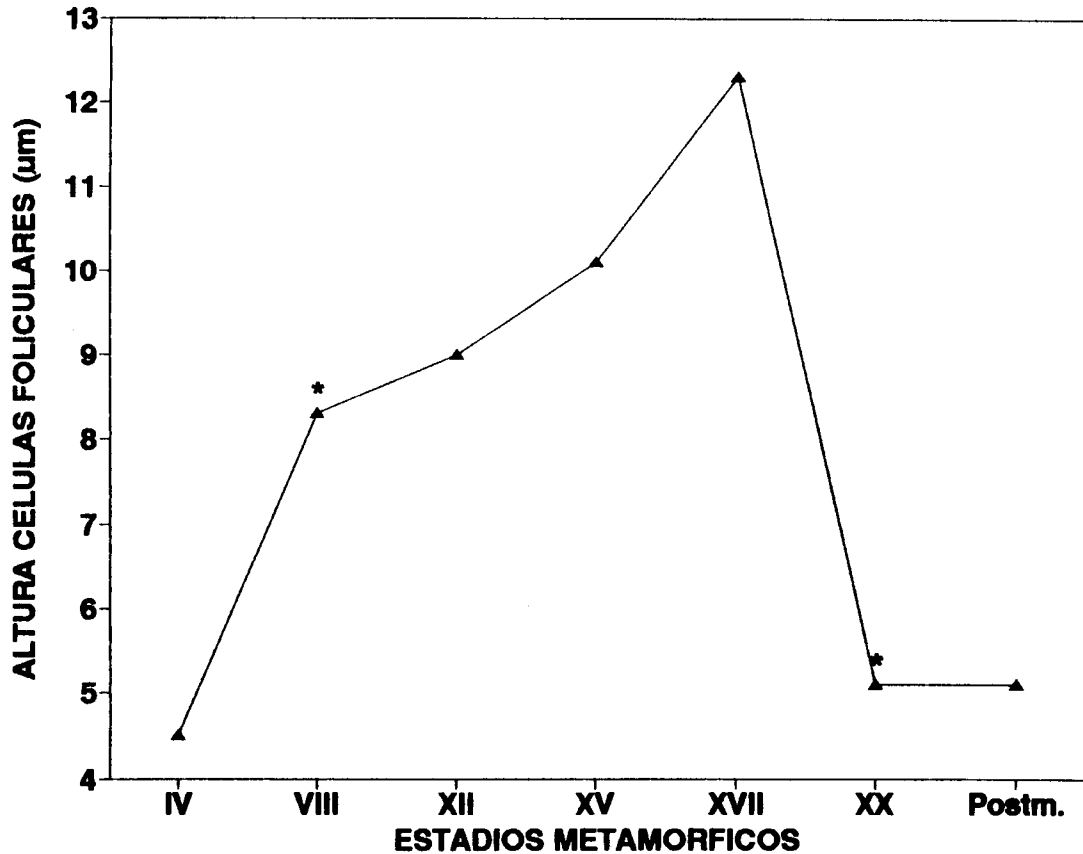


Figura 7: Altura de las células foliculares (ACF) tiroideas durante la metamorfosis de *Bufo arenarum*. Los errores estándares no representados fueron menores que el 10 % de la media de cada grupo. Diferencias significativas * $P < 0,05$ respecto del estadio anterior (N=5).

pa y durante el clímax metamórfico disminuyó su longitud hasta su total desaparición (figura 1).

Peso total húmedo. La variable peso aumentó considerablemente durante la pre- y prometamorfosis alcanzando las larvas su peso máximo (0,4 g) al final de esta etapa. Durante el clímax se registró una disminución en el peso de casi el 35 % del valor máximo. En cambio en animales postmetamórficos se observó una recuperación en el peso de casi el 20 % con respecto a los valores obtenidos al final del clímax (figura 2).

Evolución glándulas tiroides. A nivel microscópico en estadios premetamórficos pueden observarse las glándulas tiroides ubicadas por debajo del cartílago hioideo y que ya comienzan a organizarse en foliculos con coloide (figura 3a). A través de la metamorfosis las tiroides toman una forma elipsoidal (se desarrollan hacia los laterales de la larva), y el coloide de los foliculos va cambiando de consistencia desde compacto y poco vacuolado (pre- y mitad de prometamorfosis) (figuras 3a, b, c) a fracturado, menos denso y muy vacuolado (final de la prometamorfosis y clímax metamórfico) (fi-

guras 3d, e, f). En juveniles se observa que los folículos y el coloide toman características similares a las observadas en prometamorfosis (figura 3g). A mayor aumento puede observarse claramente como el coloide es absorbido por las células foliculares y ocasionalmente pueden encontrarse también algunas células parafoliculares (figura 3h).

Volumen glándulas tiroides. Este parámetro mostró un incremento ininterrumpido hasta el final de la prometamorfosis donde alcanzó su valor máximo. Un descenso se observó durante el clímax, volviendo a incrementarse en animales postmetamórficos (figura 4).

Número de folículos. El NF tiroideo aumentó desde la prometamorfosis hasta la mitad del clímax. Al final del clímax y en animales metamorfoseados este parámetro disminuyó (figura 5).

Diámetro folicular. El DF aumentó durante el desarrollo, mostrando valores máximos especialmente entre el final de la prometamorfosis y la mitad de la prometamorfosis. Durante el clímax disminuyó y en juveniles volvió a incrementarse (figura 6).

Altura células foliculares. Se observó un aumento en la ACF tiroideas durante pre- y prometamorfosis alcanzando el valor máximo hacia la mitad del clímax metamórfico. Al completar la metamorfosis este parámetro disminuyó drásticamente, obteniéndose valores similares en animales postmetamórficos (figura 7).

Discusión

Junto a las modificaciones morfológicas que caracterizan el desarrollo larvario de anuros, está comunmente aceptada la existencia de una gran tasa de crecimiento durante las primeras fases así como de un descenso del tamaño y peso del animal durante el clímax metamórfico. No obstante,

se han realizado pocos trabajos morfométricos en anuros (Taylor y Kollros, 1946; Cambar y Marrot, 1954; Cambar y Gipouloux, 1956) y en estos casos únicamente se han observado las variaciones de la longitud total. Estos autores observaron que la longitud máxima se alcanza al inicio del clímax metamórfico. Nuestros datos concuerdan con los obtenidos por estos autores en cuanto al gran incremento de la longitud existente durante la pre- y prometamorfosis, y a su declinación durante el clímax, pero no en cuanto al momento en que se alcanza la longitud máxima. Nuestros resultados coinciden plenamente con lo observado por Martin *et al.* (1985) en *Bufo arenarum*, en cuanto a que la longitud total máxima se obtiene en el estadio XV (final de la prometamorfosis).

En cuanto al peso se observa una correlación con lo que ocurre con la longitud total, aumentando durante el desarrollo llegando a un valor máximo en el estadio XV y disminuyendo drásticamente durante el clímax. Tanto la disminución de la LTO como del peso durante el clímax metamórfico se debería exclusivamente a la reabsorción de la cola, ya que si bien la larva sufre una serie de cambios morfológicos que transforman el cuerpo más o menos globular en el de un pequeño adulto, no hay modificaciones importantes en la longitud corporal.

Una vez finalizada la metamorfosis, como se refleja en los resultados obtenidos en la longitud corporal y el peso, los animales comienzan a crecer hasta alcanzar el tamaño propio de los adultos de su especie.

Durante el desarrollo de *Bufo arenarum* las tiroides toman una forma elipsoide, y los folículos que la constituyen van almacenando coloide que durante la pre- y principio de la prometamorfosis va cambiando de consistencia desde compacto y poco vacuolado a fracturado, menos denso y muy vacuolado hacia el final del clímax metamórfico. Estas variaciones en la consistencia del coloide indican las etapas de actividad

glandular (almacenamiento o liberación de hormonas).

Las células parafoliculares que ocasionalmente se observaron en algunos estadios de la metamorfosis de *Bufo arenarum*, que también se encontraron en *Xenopus laevis* (Coleman *et al.*, 1968) no pueden relacionarse directamente con los procesos metamórficos, siendo su función aún incierta. Los parámetros morfométricos analizados en nuestro estudio nos han permitido evaluar las distintas etapas de actividad de las glándulas tiroideas durante el desarrollo de *Bufo arenarum*. En el caso del VGT y DF un incremento en los valores de estos parámetros significa crecimiento de la glándula y almacenamiento de prohormona, mientras que el aumento de la ACF y del NF indica liberación de hormonas. Durante las primeras etapas del desarrollo larval se observó un incremento considerable de todos los parámetros analizados. En el caso del VGT y DF hasta el final de la prometamorfosis (indicando máximo almacenamiento de tiroglobulinas) y para la ACF y el NF hasta la mitad del clímax metamórfico (pico de liberación hormonal). Al final del clímax todos los parámetros estudiados disminuyeron abruptamente indicando el vaciamiento y cese de actividad de las tiroideas. En animales postmetamórficos se observó un aumento en el VGT y del DF mientras que la ACF y el NF se mantuvieron en los valores registrados al final de la metamorfosis. Los incrementos en estos parámetros indican un aumento en la acumulación de tiroglobulinas, posiblemente este resultado esté relacionado con la diferenciación sexual (proceso que requiere de hormonas tiroideas) de *Bufo arenarum* que ocurre entre los 30 y 40 días después de la culminación de la metamorfosis (Pisanó y Pizarro, 1958).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en algunas especies de anuros en cuanto a que la máxima actividad tiroidea en términos de volumen glandular, superficie secretora, número de folículos, y coloide vacuolado, coincide con el

período de emergencia de los miembros anteriores (Saxen *et al.*, 1957a, b; Coleman *et al.* 1968; Fox, 1983). Cabe señalar que en *Bufo arenarum*, la emergencia de los miembros anteriores caracteriza al estadio XVI y que de nuestro estudio se desprende que la máxima actividad glandular tiroidea ocurre entre los estadios XV y XVII.

Miranda *et al.* (1996), sugieren que en *Bufo arenarum*, la máxima liberación de tirotrófina (hormona hipofisaria que regula la liberación de hormonas tiroideas) tiene lugar entre los estadios XV y XVII (fin de la prometamorfosis y mitad del clímax) y que el pico de liberación de hormonas tiroideas, según los resultados de nuestro estudio, ocurre entre los estadios XVII y XX (mitad y final del clímax). El retardo existente entre la liberación de tirotrófina y el incremento plasmático de los niveles de hormonas tiroideas encontrados por diversos autores (Leloup y Buscaglia, 1977; Miyauchi *et al.*, 1977; Regard, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Suzuki y Suzuki, 1981; Weil, 1986) a mediados del clímax podrían reflejar el tiempo que necesita la maquinaria de biosíntesis y liberación de hormonas tiroideas para actuar después de la estimulación por tirotrófina.

Agradecimientos

Trabajo realizado utilizando el subsidio PID n° 3378900/92 otorgado por el CONICET.

Bibliografía

- CAMBAR, R. & MARROT, B.R. 1954. Table chronologique du développement de la grenouille agile (*Rana dalmatina* Bon). *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 88: 168-177.
- CAMBAR, R. & GIPOULOUX, J.D. 1956. Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du crapaud commun: *Bufo bufo* L. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 90: 198-217.
- COLEMAN, R., EVENNET, P.J. & DODD,

- J.M. 1968. Ultrastructural observations on the thyroid gland of *Xenopus laevis* Daudin throughout metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 10: 34-46.
- GOSNER, K. 1960. A simplified table for staging anurans embryos and larvae with notes on identifications. *Herpetologica*, 16: 183-190.
- GUDERNATSCH, J.F. 1912. Feeding experiments on tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion. *Wilhelm Roux Arch. entwicklungsmech. Organisme*, 35: 457-483.
- ETKIN, W. 1964. Metamorphosis. En: J.A. MOORE (ed.), *Physiology of the amphibia*, Academic press, New York: 427-468.
- ETKIN, W. 1968. Hormonal control of amphibian metamorphosis. En: W. ETKIN & L.I. GILBERT, (eds.), *Metamorphosis: A problem in development biology*, Appleton, New York: 313-348.
- FOX, H. 1983. *Amphibian morphogenesis*. New Jersey, Humana press. 303 pp.
- LELOUP, J. & BUSCAGLIA, M. 1977. La triiodothyronine hormone de la metamorphose des Amphibiens. *C. R. Acad. Sci. Ser.*, 284: 2261-2263.
- MARTIN, M.C., NUÑEZ, A.M. & TOMATIS, M. 1985. Metamorfosis en anfibios. I. Desarrollo metamórfico en larvas de *Bufo arenarum* Hensel (AMPHIBIA: ANURA). *Hist. Nat.*, 5: 289-302.
- MIRANDA, L.A., PAZ, D.A. & PISANO, A. 1991. Efecto de la actividad tiroidea en la tolerancia al frío de larvas de *Bufo arenarum*. *Rev. Esp. Herpet.*, 6: 55-60.
- MIRANDA, L.A., PAZ, D.A., DEZI, R. y PISANO, A. 1996. Immunocytochemical and morphometric study on the dynamic of TSH, PRL, GH and ACTH cells during *Bufo arenarum* development. (en prensa) *Cell and Tissue Research*. 285: 125-132.
- MIYAUCHI, H., LA ROCHELLE, F.T., SUZUKI, M., FREEMAN, M. & FRIEDEN, E. 1977. Studies on thyroid hormones and their binding in Bullfrog tadpole plasma during metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 33: 254-266.
- MONDOU, P.M. & KALTENBACH, J.C. 1979. Thyroxine concentrations in blood serum and pericardial fluid of metamorphosis tadpoles and adult frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 39: 343-349.
- PISANO, A. & PIZARRO, N. 1958. Observaciones sobre el desarrollo de la gónada de *Bufo arenarum*. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 34: 175-184.
- REGARD, L. 1978. Plasma thyroxine and triiodothyronine levels in spontaneously metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles and in adult anuran amphibia. *Endocrinol.*, 102: 674-684.
- ROSENKILDE, P. & USSING, A.P. 1990. Regulation of metamorphosis. En: W. Hanke (ed), *Biology and Physiology of Amphibians*, G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York: 125-138.
- SAXEN, L., SAXEN, E., TOIVONEN, S. & SALIMAKI, K. 1957a. Quantitative investigation on the anterior pituitary- thyroid mechanism during frog metamorphosis. *Endocrinol.*, 61: 35-44.
- SAXEN, L., SAXEN, E., TOIVONEN, S. & SALIMAKI, K. 1957b. The anterior pituitary and the thyroid function during normal and abnormal development of the frog. *Ann. Anat. Zool. Soc. Vanamo*, 18: 1-44.
- SUZUKI, M.R. & SUZUKI, M. 1981. Changes in thyroidal and plasma iodine compounds during and after metamorphosis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 45: 74-81.
- TAYLOR, A.C. & KOLLROS, J.J. 1946. Stages in the normal development on *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.*, 94: 7-23.
- WEIL, M.R. 1986. Changes in plasma thyroxine levels during and after spontaneous metamorphosis in a natural population of green frog, *Rana clamitans*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 62: 8-12.